

Porovnání výsledků rt-PCR a seminested PCR v identifikaci a typizaci *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* a *Haemophilus influenzae* z klinických vzorků invazivních onemocnění

The comparison of rt-PCR and seminested PCR outcomes in the identification and typing of Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, and Haemophilus influenzae from clinical specimens of patients with invasive infection

Zuzana Vacková, Pavla Křížová, Jana Kozáková

Souhrn

Cílem práce bylo porovnání dosažených výsledků molekulárních metod využívaných v Oddělení bakteriálních vzdušných nákaz (OBVN) CEM SZÚ pro účely detekce, identifikace a typizace bakterií *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* a *Haemophilus influenzae* v klinických (kultivačně negativních) vzorcích při podezření na uvedená invazivní bakteriální onemocnění. OBVN nabízí využití molekulární diagnostiky uvedených bakteriálních původců meningitid a sepsí z klinických vzorků již řadu let. Spektrum metod se však změnilo. Z původní polymerázové řetězové reakce s elektroforetickým vyhodnocením (seminested PCR) k real-time polymerázové řetězové reakci (rt-PCR). Bylo provedeno souběžné srovnání obou metodik na 56 klinických vzorcích, které ukazuje lepší výsledky rt-PCR oproti seminested PCR.

The aim was to compare the outcomes of molecular methods used in the Unit for Airborne Bacterial Infections (UABI) for the detection, identification, and typing of the bacteria Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, and Haemophilus influenzae from clinical culture-negative specimens of patients with suspected invasive bacterial infection. The UABI has been providing molecular diagnosis of the above-mentioned bacterial pathogens from clinical specimens of patients with meningitis or sepsis for years. However, the range of the methods used has changed: the UABI switched from the polymerase chain reaction (PCR) with reading of the results by electrophoresis (seminested PCR) to the real-time polymerase chain reaction (rt-PCR). The outcomes of the two methods were compared using 56 clinical specimens, with rt-PCR proving superior to seminested PCR.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2015; 24(11-12): 384–387.

Klíčová slova: seminested PCR; rt-PCR; identifikace a typizace *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus pneumoniae*; molekulární metody.

Keywords: seminested PCR; rt-PCR; identification and typing of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae*; molecular methods.

ÚVOD

Neisseria meningitidis, *Streptococcus pneumoniae* i *Haemophilus influenzae* patří celosvětově k bakteriím, jež jsou schopny vyvolat život ohrožující invazivní onemocnění: meningitidy, sepse, pneumonie. Standardními vyšetřovanými klinickými materiály jsou likvor, krev, sérum, sekční materiál.

OBVN má již řadu let zavedenu seminested polymerázovou řetězovou reakci (seminested PCR) s vyhodnocením na agarozovém gelu pro klinické vzorky odebrané při podezření na invazivní meningokokové onemocnění. Na začátku se jednalo pouze o detekci *Neisseria meningitidis* s určením séro skupin B a C [1], později byla metoda rozšířena o detekci *Streptococcus pneumoniae* a *Haemophilus influenzae*. Dále byla obohacena charakterizace *Neisseria*

meningitidis o určení séro skupin A, W, Y [2]. V tomto uspořádání probíhalo testování až do roku 2014, kdy došlo k implementaci nové metody real-time PCR (rt-PCR) identifikace *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* a *Haemophilus influenzae*, která nahrazuje od roku 2016 původní metodiku seminested PCR. Charakterizace *Neisseria meningitidis* pomocí rt-PCR probíhá od roku 2015, roku 2016 je plánováno zavedení této metody i pro typizaci *Haemophilus influenzae*. Typizace *Streptococcus pneumoniae* v současné době probíhá pomocí multiplexové PCR s vyhodnocením na agarozovém gelu.

MATERIÁL A METODIKA

Klinické vzorky

Použity byly klinické vzorky zasílané do Oddělení bakteriálních vzdušných nákaz s požadavkem identifikace jednoho či všech tří zmiňovaných patogenů při podezření na invazivní bakteriální onemocnění. Jedná se o vzorky kultivačně negativní. Druhy zaslaného materiálu byly mozkomíšni mok, krev nesrážlivá, krev srážlivá - sérum, hemokultivační nádoby (Bactec), pitevní materiál (petechie), bakteriální DNA izolované z klinických vzorků. Celkem bylo testováno 56 klinických vzorků.

Molekulární metody

Seminested PCR: Je modifikací klasické PCR s tím rozdílem, že jsou použity dva páry primerů místo jednoho. První pár primerů amplifikuje požadovaný úsek delší a druhý pár primerů nasedá na místo v PCR produktu amplifikovaném v první PCR reakci. Jako cílové sekvence pro identifikaci byly použity geny: *16S rRNA* - *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *crpA* - *N. meningitidis*, *orf-2 a siaD* pro určení *N. meningitidis* do séro skupin A, B, C, Y, W.

Real-time PCR (rt-PCR): jedná se o kvalitativní verzi metody PCR využívající hodnocení intenzit fluorescenčních barviv. Jako cílové sekvence pro identifikaci byly použity geny: *sodC* - *N. meningitidis*, *lytA* - *S. pneumoniae* a *hpd* - *H. influenzae* [3], *sacB*, *synD*, *synE*, *synG*, *synF*, *xcbB* pro určení *N. meningitidis* do séro skupin A, B, C, X, Y, W.

VÝSLEDKY

Duplicítně bylo testováno 56 klinických vzorků [n=56]. U 76 % [n=42] vzorků došlo ke shodě výsledků obou metodik, u 24 % [n=14] vzorků bylo dosaženo rozdílných výsledků (vyznačení v Tab. 1.). Ze skupiny rozdílných výsledků byl rozdíl vždy shodný, tzn. negativita při použití seminested PCR, ale pozitivita při využití rt-PCR. V 64 % [n=9] těchto případů se jednalo o neshodu na úrovni iden-

tifikace bakteriálního agens, z tohoto počtu u 22 % [n=2] vzorků byl u seminested PCR velice hraniční nález vyhodnocený však jako negativní a u rt-PCR pozitivní výsledek. V 36 % rozdílných případech byl rozdíl [n=5] jen na úrovni typizace bakteriálního agens, pomocí seminested PCR nebylo dosaženo typizace, ale pomocí rt-PCR ano.

Charakteristiky metod v daném souboru vzorků ukazují na vysokou specifitu i senzitivitu obou metodik, nicméně u rt-PCR se ukazuje vyšší citlivost.

- seminested PCR: senzitivita = $18/(18+10) = 0,64$; 64 %, specificita = $38/(38+0) = 1$; 100 %
- rt-PCR: senzitivita = $28/(28+0) = 1$; 100 %, specificita = $28/(28+0) = 1$; 100 %
- seminested PCR typing N.m.: senzitivita = $8/(8+9) = 0,47$; 47 %, specificita = $28/(28+0) = 1$; 100 %
- rt-PCR typing N.m.: senzitivita = $16/(16+1) = 0,94$; 94 %, specificita = $28/(28+0) = 1$; 100 %

Hodnocení seminested PCR metody probíhá okometricky na gelové elektroforéze, při použití ladderu a pozitivních kontrol. Vyhodnocení rt-PCR metody se provádí v programu cyklu (Bio-Rad CFX Manager) dle dosažených hodnot ct (cycle of threshold), jako pozitivní se vzorek hodnotí při nižší hodnotě ct než 40, u minimálně dvou hodnot v tripletovém zpracování. Hodnocení rt-PCR je tedy přesnější. Nebyl sledován součinný vliv druhu klinického materiálu s případným neshodným výsledkem metodik.

| Číslo vzorku | Dg. | Druh klinického vzorku | Výsledek seminested PCR | Výsledek rt-PCR | Ct |
|--------------|------|------------------------|--------------------------|--------------------------|-------|
| 41/14 | G009 | LI | pozitivní N.m. B | pozitivní N.m. B | 30,91 |
| 42/14 | A392 | sekční mat. (petechie) | pozitivní N.m. C | pozitivní N.m. C | 29,50 |
| 43/14 | A392 | sekční mat. (petechie) | pozitivní N.m. C | pozitivní N.m. C | 27,00 |
| 44/14 | G009 | LI | negativní N.m.,H.i.,S.p. | pozitivní S.p. | 32,33 |
| 45/14 | G009 | Krev | negativní N.m.,H.i.,S.p. | negativní N.m.,H.i.,S.p. | |
| 46/14 | A879 | LI | negativní N.m.,H.i.,S.p. | negativní N.m.,H.i.,S.p. | |
| 48/14 | G039 | LI | negativní N.m.,H.i.,S.p. | negativní N.m.,H.i.,S.p. | |
| 49/14 | A392 | Krev | pozitivní N.m. | pozitivní N.m. B | 40,00 |
| 50/14 | G039 | LI | pozitivní N.m. B | pozitivní N.m. B | 37,40 |
| 51/14 | G039 | SE | pozitivní N.m. | pozitivní N.m. B | 29,50 |
| 52/14 | A392 | LI | pozitivní N.m. B | pozitivní N.m. B | 31,33 |
| 54/14 | G009 | LI | negativní N.m.,H.i.,S.p. | negativní N.m.,H.i.,S.p. | |
| 55/14 | R509 | DNA-LI | negativní N.m.,H.i.,S.p. | pozitivní N.m. | 37,50 |
| 57/14 | G009 | LI | negativní N.m.,H.i.,S.p. | negativní N.m.,H.i.,S.p. | |
| 58/14 | R51 | LI | negativní N.m.,H.i.,S.p. | negativní N.m.,H.i.,S.p. | |
| 59/14 | R509 | LI | negativní N.m.,H.i.,S.p. | negativní N.m.,H.i.,S.p. | |
| 60/14 | R509 | Krev | negativní N.m.,H.i.,S.p. | negativní N.m.,H.i.,S.p. | |
| 61/14 | A41 | LI | negativní N.m.,H.i.,S.p. | negativní N.m.,H.i.,S.p. | |
| 62/14 | G009 | Krev | negativní N.m.,H.i.,S.p. | negativní N.m.,H.i.,S.p. | |
| 63/14 | R509 | DNA-LI | pozitivní N.m. B | pozitivní N.m. B | 35,50 |
| 64/14 | R509 | LI | negativní N.m.,H.i.,S.p. | negativní N.m.,H.i.,S.p. | |
| 65/14 | G001 | LI | pozitivní S.p. | pozitivní S.p. | 21,96 |
| 66/14 | G009 | LI | pozitivní N.m. | pozitivní N.m. B | 32,76 |
| 1/15 | G009 | LI | negativní N.m.,H.i.,S.p. | negativní N.m.,H.i.,S.p. | |

| Číslo vzorku | Dg. | Druh klinického vzorku | Výsledek seminested PCR | Výsledek rt-PCR | Ct |
|--------------|------|------------------------|--------------------------|--------------------------|-------|
| 2/15 | G009 | LI | pozitivní S.p. | pozitivní S.p. | 26,58 |
| 3/15 | G009 | LI | negativní N.m.,H.i.,S.p. | negativní N.m.,H.i.,S.p. | |
| 4/15 | R509 | Krev | negativní N.m.,H.i.,S.p. | negativní N.m.,H.i.,S.p. | |
| 5/15 | R560 | LI | hraniční S.p. | pozitivní S.p. | 33,07 |
| 6/15 | R560 | DNA-LI | hraniční S.p. | pozitivní S.p. | 34,27 |
| 7/15 | G009 | LI | pozitivní S.p. | pozitivní S.p. | 16,68 |
| 8/15 | G039 | LI | negativní N.m.,H.i.,S.p. | negativní N.m.,H.i.,S.p. | |
| 9/15 | G039 | SE | negativní N.m.,H.i.,S.p. | negativní N.m.,H.i.,S.p. | |
| 10/15 | A392 | LI | pozitivní N.m. | pozitivní N.m. C | 25,38 |
| 11/15 | G009 | LI | pozitivní S.p. | pozitivní S.p. | 19,13 |
| 12/15 | A399 | SE | negativní N.m.,H.i.,S.p. | negativní N.m.,H.i.,S.p. | |
| 13/15 | A879 | LI | negativní N.m.,H.i.,S.p. | negativní N.m.,H.i.,S.p. | |
| 14/15 | A879 | Krev | negativní N.m.,H.i.,S.p. | negativní N.m.,H.i.,S.p. | |
| 15/15 | A879 | Krev | negativní N.m.,H.i.,S.p. | negativní N.m.,H.i.,S.p. | |
| 16/15 | A879 | LI | negativní N.m.,H.i.,S.p. | negativní N.m.,H.i.,S.p. | |
| 17/15 | A879 | LI | pozitivní N.m. C | pozitivní N.m. C | 31,99 |
| 18/15 | G039 | LI | negativní N.m.,H.i.,S.p. | pozitivní N.m. B | 35,29 |
| 19/15 | G009 | LI | pozitivní S.p. | pozitivní S.p. | 25,36 |
| 20/15 | R509 | Bactec | negativní N.m.,H.i.,S.p. | negativní N.m.,H.i.,S.p. | |
| 21/15 | G020 | LI | negativní N.m.,H.i.,S.p. | pozitivní H.i. | 25,38 |
| 22/15 | G020 | SE | negativní N.m.,H.i.,S.p. | negativní N.m.,H.i.,S.p. | |
| 23/15 | R51 | LI | pozitivní S.p. | pozitivní S.p. | 26,66 |
| 24/15 | G039 | LI | pozitivní N.m. B | pozitivní N.m. B | 21,63 |
| 25/15 | G039 | SE | negativní N.m.,H.i.,S.p. | pozitivní N.m. B | 39,00 |
| 26/15 | G008 | Krev | negativní N.m.,H.i.,S.p. | pozitivní S.p. | 37,84 |
| 27/15 | G008 | LI | negativní N.m.,H.i.,S.p. | negativní N.m.,H.i.,S.p. | |
| 28/15 | A879 | LI | negativní N.m.,H.i.,S.p. | negativní N.m.,H.i.,S.p. | |
| 29/15 | A399 | Krev | negativní N.m.,H.i.,S.p. | pozitivní N.m. B | 32,62 |
| 30/15 | A419 | Krev | negativní N.m.,H.i.,S.p. | negativní N.m.,H.i.,S.p. | |
| 31/15 | G008 | LI | negativní N.m.,H.i.,S.p. | pozitivní N.m. B | 27,16 |
| 32/15 | A879 | LI | negativní N.m.,H.i.,S.p. | negativní N.m.,H.i.,S.p. | |
| 33/15 | A879 | Krev | negativní N.m.,H.i.,S.p. | negativní N.m.,H.i.,S.p. | |

ZÁVĚR

Zavedení používání rt-PCR se v OBVN ukázalo jako velice vhodné. V porovnání obou PCR metodik byla vyhodnocena výrazně lépe rt-PCR. Oproti seminested PCR se podařilo metodou rt-PCR identifikovat o 24 % více klinických vzorků na úrovni bakteriálního agens a typizovat o 36 % více klinických vzorků *N. meningitidis*, což umožnila vyšší senzitivita a citlivost metodiky. Možnost detekce i nízkých koncentrací DNA v klinických vzorcích je velice zásadní, jelikož se jedná především o vzorky za běžné situace sterilní. Hledá se tedy i malé množství molekul DNA uvedených bakteriálních agens. Mezi kvantitou bakteriální DNA v klinických vzorcích a závažností infekčních onemocnění nebyl doposud prokázán rozhodující vztah. Výhodou obou PCR metodik je možnost detekce bakteriálního agens i po zahájení antibiotické terapie (nedetekujeme živé

bakterie, ale pouze DNA bakterií). Velkou výhodou metodiky rt-PCR, pro klinické vzorky závažných diagnóz, je i rychlejší laboratorní diagnostika a možnost typizace uvedených agens. OBVN nabízí rozšířený provoz vyšetřování klinických vzorků invazivních onemocnění viz: <http://www.szu.cz/jodd-vzdusne-nakazy-doporucene-postupy>.

LITERATURA

1. Kalmusová J, Pavlíková V, Křížová P. *et al.* První výsledky PCR diagnostiky invazivního meningokokového onemocnění. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2001; 7(1): 15–19. ISSN 1211-264X.
2. Kalmusová J, Bronská E, Křížová P. Diagnostika invazivního meningokokového, hemofilového a pneumokokového onemocnění PCR metodou. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2004; 10: 130–133. ISSN 1211-264X.

3. Vacková Z, Lžičarová D, Stock, N.K, Kozáková, J. Detekce DNA *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus pneumoniae* v klinickém materiálu metodou real-time PCR. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2015, 64(4): 220–228. ISSN 1803-6597.

Podpořeno MZ ČR - RVO („Státní zdravotní ústav - SZU, 75010330“).

*Zuzana Vacková, Pavla Křížová, Jana Kozáková
Oddělení bakteriálních vzdušných nákaz
SZÚ-CEM*