

Průkaz DNA patogenních leptospir metodou PCR v NRL pro leptospiry

PCR detection of DNA of pathogenic *Leptospira* in the National Reference Laboratory for *Leptospira*

Tereza Marvanová, Kateřina Kybicová, Petr Kodym

Souhrn • Summary

Za zlatý standard je v laboratorní diagnostice leptospir považován mikroaglutinační test (MAT), který však je pozitivní asi až po 7-14 dnech od počátku infekce. Proto jsme vyvinuli metodu PCR, která je nezbytná ke správné a především včasné diagnostice leptospirozy. V tomto projektu jsme vybírali z různých typů průkazu DNA (amplifikace úseků různých genů dle literatury) nevhodnější set primerů (LipL32) pro detekci leptospir. Testovali jsme specifitu a senzitivitu pomocí různě koncentrovaných sérovarů leptospir a jim příbuzných bakterií. Provedli jsme optimalizaci konvenční PCR a zjistili vhodné koncentrace primerů, hořčiku a nevhodnější teplotu annealingu. Cílem tohoto projektu bylo zavést metodu PCR do rutinního laboratorního provozu a zvýšit tak spektrum nabízených služeb zákazníkům.

*The microscopic agglutination test (MAT) is designated the gold standard for the laboratory diagnosis of leptospirosis; nevertheless, the immune system needs 7 to 14 days after infection to produce enough antibody for a positive result. In an attempt to enable an earlier diagnosis of leptospirosis, we have developed a PCR assay. To this end, different types of DNA detection (amplification of gene sequences from the literature) and primer sets (LipL32) were compared. The specificity and sensitivity were tested using different concentrations of various serovars of *Leptospira* and some related bacteria. The conventional PCR assay was optimized and the appropriate concentrations of primers and magnesium were identified as well as the optimal annealing temperature. The aim of the project was to implement the PCR assay into routine laboratory practice, thus extending the range of service we can offer to our customers.*

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2016; 25(4): 140–142.

Klíčová slova: *Leptospira*, leptospiroza, PCR, laboratorní diagnostika, LipL32

Keywords: *Leptospira*, leptospirosis, PCR, laboratory diagnosis, LipL32

ÚVOD

Leptospiroza je jednou z hlavních příčin akutních horečnatých onemocnění a patří mezi nejčastěji se vyskytující zoonózy. Jejich původcem jsou různé druhy spirochét rodu *Leptospira* (v současné době je popsáno 25 sérologických skupin a více než 200 sérovarů). Leptospiry můžeme najít na celém světě, nejčastěji ale v tropických a subtropických oblastech, kde bývá incidence leptospirozy až stokrát vyšší než v Evropě. Zdrojem nákazy jsou rezervoároví hostitelé (nejčastěji krysy, potkani, ale také hmyzožravci, drobní savci a domácí zvířata). Lidé se nejpravděpodobněji nakazí při kontaktu s vodou, či půdou kontaminovanou močí infikovaných zvířat. Časté jsou také profesionální nákazy (deratizátoři, skladníci, čističi odpadních vod apod.). Leptospiry vnikají do organismu oděrkami na kůži, sliznicemi očí, nosu, úst - např. při koupání, provozování vodních sportů nebo práci ve znečištěné vodě, požitím kontaminovaných potravin nebo vdechnutím kontaminovaného aerosolu.

Výskyt leptospirozy je v klimatických podmínkách České republiky sporadický a specifická nemocnost se v současné době pohybuje kolem 0,4 případu na 100 000 obyvatel. Předpokládá se, že ve skutečnosti, je o něco vyšší díky nespecifickým příznakům, často zaměňovaným s chřip-

kovým onemocněním. Epidemické výskyty u nás výrazně ovlivňují dva přírodní fenomény. Prvním je periodické přemnožování drobných hlodavců a druhým jsou v poslední době časté záplavy (i lokálního charakteru). Zejména situace po opadnutí velké vody, kdy se lidé brodí v tůních, bahně a zatopených sklepech, zvyšuje riziko nákazy.

Inkubační doba leptospirozy je 2–21 dní. Nemoc má dvoufázový průběh. Mezi počáteční příznaky leptospirozy patří chřipce podobné stavy, kdy se u pacienta objevují náhlé horečky 39–40 °C, zimnice, bolesti hlavy a zvracení. V další fázi se objevuje postižení ledvin a jater, bolesti svalů a kloubů, icterus, gastrointestinální příznaky, pneumonie, splenomegalie, zvýšená krvácivost, respirační selhávání a další. V nehorším případě při Weilově chorobě dochází k multiorgánovému a hepatorenálnímu selhání, které může končit smrtí. Mnoho případů se projevuje formou lehčího onemocnění. Zásadní je včasná a rychlá diagnóza a zahájení antibiotické léčby.

Diagnostika leptospirozy je založena na přímém a nepřímém průkazu. Nejrozšířenější metodou nepřímého průkazu je mikroskopický aglutinační test (MAT). Podstatou této metody je hodinová až dvouhodinová inkubace živých leptospir z kultury s patientským sérem. Tato reakce způsobí aglutinaci až lýzu leptospir. Hodnocení reakce a její intenzity se provádí pomocí mikroskopu se zástínem. Za pozitivní reakci se považuje aglutinace 50 % leptospir v zorném poli. Jako přímý průkaz se v diagnostice leptospir používá kultivace moči nebo likvoru na Korthofově půdě, nicméně záchytnost této metody je velmi nízká. Zásadní nevýhodou výše uvedených diagnostických metod

je jejich časová náročnost a skutečnost, že k tvorbě specifických protilátek dochází v organismu až po 7–14 dnech od počátku infekce. Je proto nutné doplnit diagnostiku leptospirózy přímým průkazem infekčního agens metodou PCR, která umožňuje rychlý a citlivý průkaz DNA leptospir v patientských vzorcích. Leptospiry je možno zachytit v prvních cca 10 dnech od nákazy v nesrážlivé krvi a likvoru, po týdnů také v moči za předpokladu, že ještě nebyla zahájena antibiotická léčba. Metoda PCR je použitelná i pro další klinické materiály, jako jsou například jaterní biopsie či jiné tělní tekutiny.

METODIKA

Na základě údajů z literatury, jsme vybrali tři kandidátní sety primerů pro PCR, které by měly být nejvhodnější pro detekci leptospir, a to LipL32-45F, LipL32-286R, [Stoddard, 2012]; LEP1, LEP2 [Fornazari, 2012] a SecYIVF, SecYIV, [Ahmed 2009]. Tyto primery jsme vyzkoušeli dle metodik na *Leptospira icterohaemorrhagiae* ze sbírky leptospir v NRL. Nejlepších výsledků, při prvotním testování primerů, jsme dosáhli s použitím primerů LipL32. Na tuto metodiku jsme se proto zaměřili podrobněji.

Pro testování sensitivity testu bylo použito 8 laboratorních kmenů patogenních leptospir ze sbírky NRL pro leptospiry, jež se vyskytují na území České republiky (*L. icterohaemorrhagiae* Fryšava, *L. sorex* Jalna, *L. canicola*, *L. bratislava* Jež, *L. pomona* Šimon, *L. grippothyposa* P125, *L. sejroae* M84, *L. tarrasovi* DV-A). Všechny tyto kmeny byly kultivovány a pasážovány v Korthoffově médiu a jsou běžně používány i pro diagnostiku klinických vzorků metodou MAT. Po sedmi dnech kultivace jsme spočítali počet leptospir pomocí Bürkerovy komůrky. Následně jsme provedli izolaci DNA všech 8 kmenů leptospir pomocí komerčně vyráběného kitu PathogenFree DNA isolation Kit od firmy GeneProof. PCR reakce byly prováděny na termocycleru T-gradient BIOER Technology s následnou elektroforetickou detekcí. Na jednu reakci bylo potřeba 12,5 µl HotStart polymerázy, 5 µl vody, 1,25 µl primeru F (0,5 µM), 1,25 µl primeru R (0,5 µM) a 5 µl izolované DNA. Amplifikační protokol byl následující: počáteční denaturace 95 °C 15 min, 45 cyklů amplifikace (94 °C 1 min, 58 °C 1,5 min, 72 °C 2 min), závěrečná extenze 72 °C po dobu 10 minut, zakončeno ochlazením na 4 °C do vyhodnocení. Při testování sensitivity metody jsme vzorek o známé koncentraci leptospir naředili desítkovou řadou a stanovovali nejnižší počet buněk, při kterém dává reakce pozitivní výsledek.

Pro testování specificity primerů byly použity tyto bakterie příbuzné leptospirám získané z NRL pro borrelie: *Treponema pallidum* 1415352, *Escherichia coli* K12, *Borrelia garinii* 1525352, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia bavariensis* 1515352 a *Bartonella henselae*. Byl sestaven panel 14 vzorků, obsahující výše jmenované bakterie doplněné o patogenní leptospiry ze sbírky NRL *L. icterohaemorrhagiae* Fryšava, *L. sorex* Jalna, *L. canicola*, *L. bratislava* Jež, *L. pomona* Šimon, *L. grippothyposa* P125, *L. sejroae* M84, *L. tarrasovi* DV-A. Ve všech vzorcích byla změřena koncentrace DNA pomocí nanodropu (tab. 1).

Pro optimalizaci PCR jsme nejprve testovali nejvhodnější teplotu annealingu PCR reakce, vždy v tripletech

Tabulka 1: KONCENTRACE DNA VE VZORCÍCH POUŽITÝCH PRO PCR REAKCI

Kmen	koncentrace DNA (ng/µl)
<i>L. icterohaemorrhagiae</i> Fryšava	0,7
<i>L. sorex</i> Jalna	2,3
<i>L. canicola</i>	0,5
<i>L. bratislava</i> Jež	0,3
<i>L. pomona</i> Šimon	1,1
<i>L. grippothyposa</i> P125	0,5
<i>L. sejroae</i> M84	0,3
<i>L. tarrasovi</i> DV-A	1,1
<i>Treponema pallidum</i> 1415352	0,6
<i>Escherichia coli</i> K12	1,2
<i>Borrelia garinii</i> 1525352	0,3
<i>Borrelia burgdorferi</i>	0,4
<i>Borrelia bavariensis</i> 1515352	0,5
<i>Bartonella henselae</i>	0,9

a s použitím negativních kontrol. Provedli jsme PCR reakce s těmito teplotami annealingu: 56 °C, 58,4 °C, 60,6 °C a 62 °C. Nejlepších výsledků jsme dosáhli při teplotě 58,4 °C, tedy při stejné teplotě annealingu, kterou udává metodika. Dále jsme testovali koncentrace primerů. Primery jsme naředili na koncentrace: 0,25 µM, 0,5 µM, 1 µM a 1,25 µM. Optimálních výsledků jsme dosáhli při koncentracích 0,5 µM i 1 µM. Vzhledem k literatuře a snížení nákladů jsme se rozhodli používat nižší koncentraci primerů. V neposlední řadě jsme provedli i testování koncentrací hořčnatých iontů. Roztok MgCl₂ jsme naředili na koncentrace 1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM a 3 mM a opět provedli testování tripletu vzorků v každé koncentraci. Nejlepší výsledky jsme naměřili při koncentraci 1,5 mM. I v tomto případě optimální koncentrace hořčnatých iontů souhlasí s koncentrací uváděnou v metodickém postupu.

VÝSLEDKY

Pro detekci leptospirové DNA se nejlépe osvědčily primery LipL32. Dle metodiky jsme použili set primerů LipL32-45F (5' -AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG-3') a LipL32-286R (5' -GAA CTC CCA TTT CAG GGA TT-3') k amplifikaci úseku o délce 242 bp. Metoda má vysokou sensitivity: PCR byla pozitivní i při koncentraci 5,9 x 10³ leptospir /ml tekutého biologického materiálu. Pozitivní reakci jsme prokázali u všech testovaných patogenních druhů leptospir. U všech jiných bakterií, které byly do testování zařazeny, byl výsledek negativní, což poukazuje na vysokou specificitu metody. Metoda byla, prozatím ve zkušebním režimu, zařazena mezi testy používané v NRL pro leptospiry a slouží k detekci leptospirové DNA v krvi, moči a biotických vzorcích lidí i zvířat.

ZÁVĚR

V NRL pro leptospiry se k laboratorní diagnostice dosud používala pouze metoda kultivace s nízkým zachytem a sé-

rologická metoda mikroskopického aglutinačního testu, která je sice velice spolehlivá, ale k detekci protilátek může dojít až po jejich vytvoření, což snižuje její využití v časně fázi infekce v prvním týdnu po nákaze. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli zavést v NRL pro leptospiry laboratorní diagnostiku, která dokáže rozpoznat onemocnění již v akutní fázi.

Metoda PCR, kterou jsme v NRL otestovali a zavedli do rutinního laboratorního provozu, je založena na genu LipL32. Ten se nachází u všech patogenních druhů leptospir a kóduje příslušný povrchový membránový lipoprotein LipL32. Testy na různých druzích leptospir z kultury i na jiných spirochétách a dalších bakteriích prokázaly, že metoda vykazuje vysokou sensitivitu i specifitu. Za jednu z největších výhod této metody považujeme rychlost, kdy máme výsledek k dispozici do 6 hodin, což hraje nejen u pacientů hospitalizovaných na JIP velice důležitou roli. Včasná detekce leptospir může být ve velice závažných případech leptospirózy (u pacientů s Weilovou chorobou) i otázkou života a smrti.

Práce byla podpořena projektem interního grantu SZÚ 75010330.

LITERATURA

- Ahmed A (2009) Development and validation of a Real-Time PCR for Detection of pathogenic *Leptospira* Species in Clinical Materials. *PLoS ONE* 4. 2009; e7093
- Ahmed N (2006) Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2006; 5: 28
- Čermáková Z (2013) Real-time PCR method for the detection of the gene encoding surface lipoprotein LipL32 of pathogenic *Leptospira*: Use in the laboratory diagnosis of the acute form of leptospiroses. *Scandinavian Journal of the Infectious Diseases*. 2013; 45(8): 593–599
- Faine S (1994) *Leptospira* and leptospiroses. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida: 353 pp.
- Fornazari F (2012) Comparison of conventional PCR, quantitative PCR, bacteriological culture and the Warthin Starry technique to detect *Leptospira* spp. In kidney and liver samples from naturally infected sheep from Brazil. *Journal of Microbiological Methods* 1993; 90: 321–326
- Gravekamp C (1993) Detection of Seven of Pathogenic Leptospire by PCR Using Two Sets of Primers. *Journal of General Microbiol.* 1993; 137: 1961–1700
- Levett PN (2005) Detection of pathogenic leptospire by real-time quantitative. *PCR Journal of Medical Microbiology*. 2005; 54: 45–49
- Levett PN (2001) Leptospirosis. *Clin. Microbiol Rev.* 2001; 14: 296–326
- Levett PN (2005) Detection of pathogenic leptospire by real-time quantitative PCR. *Journal of Medical Microbiology*. 2005; 54: 45–49
- Levett PN (2004) Leptospirosis: A Forgotten Zoonosis? *Clinical and Applied Immunology Reviews*. 2004; 4(6): 435–448
- Nardone A (2004) Risk Factors for Leptospiroses in Metropolitan France: Results of a National Case-Control study, 1999-200. *Clinical Infectious Diseases*. 2004; 39(5): 751–753
- Picardeau M (2013) Diagnosis and epidemiology of leptospiroses. *Med mal Infect.* 2013; 43:1–9
- Stoddard RA (2009) Detection of pathogenic *Leptospira* spp. Through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2009; 64: 247–255

Tereza Marvanová
NRL pro leptospiry, SZÚ - CEM