

# Využití real-time PCR v urgentní diagnostice bakteriálních meningitid

J. Mrázek

## Bakteriální meningitidy

Bakteriální meningitidy patří k nejzávažnějším akutním infekčním onemocněním. Průběh bakteriální meningitidy je velmi rychlý a pokud nejsou včas rozpoznány příznaky tohoto onemocnění a není včas zahájena cílená antibiotická léčba, může bakteriální meningitida končit úmrtím pacienta nebo zanechat trvalé následky.

Nejčastějšími původci bakteriálních meningitid jsou *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* a *Haemophilus influenzae*. Přes etiologickou pestrost jsou jejich klinické, laboratorní i morfologické projevy velmi podobné. Proto má pro lékaře zásadní význam co nejrychlejší určení etiologického agens, aby mohla být včas zahájena racionální cílená terapie.

Klasické mikrobiologické metody, jako je latexová aglutinace přímo u lůžka pacienta a mikroskopie, jsou sice velmi rychlé, mají však svá úskalí. Kultivace je poněkud zdlouhavá a často u pacientů, u nichž byla zahájena terapie antibiotiky selhává. Izolace etiologického agens má význam především pro stanovení citlivosti na antibakteriální látky a pro sledování dalších vlastností izolovaného kmene, eventuálně pro epidemiologické studie.

## PCR a real-time PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda, která nabízí vysoce citlivou, specifickou a ve vhodné kombinaci použitých technologií také rychlou diagnostiku vybraných infekčních agens. Umožňuje totiž velmi účinně, enzymem DNA polymerázou zprostředkované, namnožení vybraného specifického úseku bakteriálního genomu, který je posléze detekován. Tím je prokázána či vyloučena přítomnost daného agens v klinickém vzorku.

Byla publikována celá řada PCR metodik pro průkaz původců bakteriálních meningitid. Velmi často využívanou cílovou oblastí pro průkaz bakterií je gen kódující *16S rRNA*. V této oblasti lze najít konzervativní úseky DNA společné pro bakterie obecně, ale také druhově specifické oblasti umožňující průkaz konkrétního druhu. Nicméně v závislosti na konkrétní sekvenci použitých primerů může docházet

ke zkřížené reaktivitě mezi vzájemně velmi blízkými druhy (např. streptokoků). Volbou jiných cílových oblastí, např. genů kódujících hlavní virulentní faktory, lze dosáhnout lepší specifity, ztrácí se však výhody vyplývající z univerzality detekce založené na *16S rRNA*.

Z hlediska použití PCR technik se nejčastěji setkáváme s klasickou PCR s detekcí produktu amplifikace na agarózovém gelu, s nested PCR a v posledních letech již dominující real-time PCR. Tento vývoj míří jednoznačně ve prospěch zkrácení doby potřebné pro analýzu vzorku. Mezi hlavní výhody real-time PCR však nepatří jen zkrácení doby analýzy – samotnou PCR je možno zkrátit na přibližně jednu hodinu, navíc bez nutnosti provádět elektroforézu – ale také snížení rizika kontaminace laboratoře produktem amplifikace, který může být příčinou falešně pozitivních výsledků.

## Naše zkušenosti

Naše laboratoř provádí PCR diagnostiku bakteriálních meningitid již od roku 2004, a to ze vzorku likvoru či krve.

První metody byly zavedeny ve spolupráci s NRL pro meningokokové nákazy a byly postaveny na principu nested PCR s elektroforetickou detekcí produktu na agarózovém gelu. Amplifikován byl nejprve úsek genu pro *16S rRNA* společný pro všechny bakterie. Takto bylo možno detekovat obecnou bakteriální DNA a získat předběžnou informaci o přítomnosti bakteriální DNA ve vzorku. Průkaz bakteriální DNA je však sám o sobě poměrně problematický, protože může být negativně ovlivněn kontaminací bakteriální DNA z prostředí či z použitých prostředků pro samotnou izolaci DNA a PCR – plasty, reagentie, DNA polymeráza. Pro průkaz bakteriální DNA je proto nezbytné zvolit postupy a materiály toto riziko minimalizující.

Po amplifikaci společného úseku *16S rRNA* v prvním kole PCR následovala druhá PCR s druhově specifickými primery pro průkaz *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* a *Listeria monocytogenes*. Vyšetření jednoho vzorku trvalo obvykle 7-9 hodin, výsledek byl prakticky dostupný teprve následující den po přijetí vzorku do laboratoře. Z hlediska specifity průkazu byl nejvíce problematický průkaz *S. pneumoniae* - specifický produkt amplifikace bylo možno pozorovat také u některých kmenů viridujících streptokoků. Nespecifické reakce byly zaznamenány také v průkazu *Listeria monocytogenes*. Průkaz *Haemophilus influenzae* byl spolehlivý pouze pro sérotyp b, zaznamenána byla ovšem také zkřížená reaktivita jednoho kmene *Haemophilus influenzae* s druhově specifickými primery (crgA) pro *Neisseria meningitidis*.

Celý proces vyšetřování vzorků s podezřením na bakteriální meningitidu byl doplněn jednokolovými PCR reakcemi pro průkaz *Neisseria meningitidis* amplifikací části genu *crgA*, regulujícího adhezi *Neisseria meningitidis* k cílových buňkám, a určení nejběžnějších sérotypů B a C amplifikací části *siaD* genu.

V následujících letech byla tato diagnostika, s výjimkou typizace *Neisseria meningitidis*, postupně převedena do formátu real-time PCR využívající

TaqMan (SmartCycler), resp. FRET (LightCycler) sondy. Použití real-time PCR výrazně zkrátilo čas potřebný k provedení testu. V současné době využíváme také automatické izolace DNA na přístroji QIAcube (QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN). Vyšetření jednoho vzorku je tak možno zkrátit na 2,5 hodiny od přijetí vzorku do laboratoře. Většina vzorků je zpracována již v den, kdy je vzorek doručen do laboratoře, a to včetně mimopracovních dní, kdy je zajištěn pohotovostní provoz laboratoře.

**Tabulka 1: Zkrácení doby trvání analýzy postupnou automatizací PCR vyšetření**

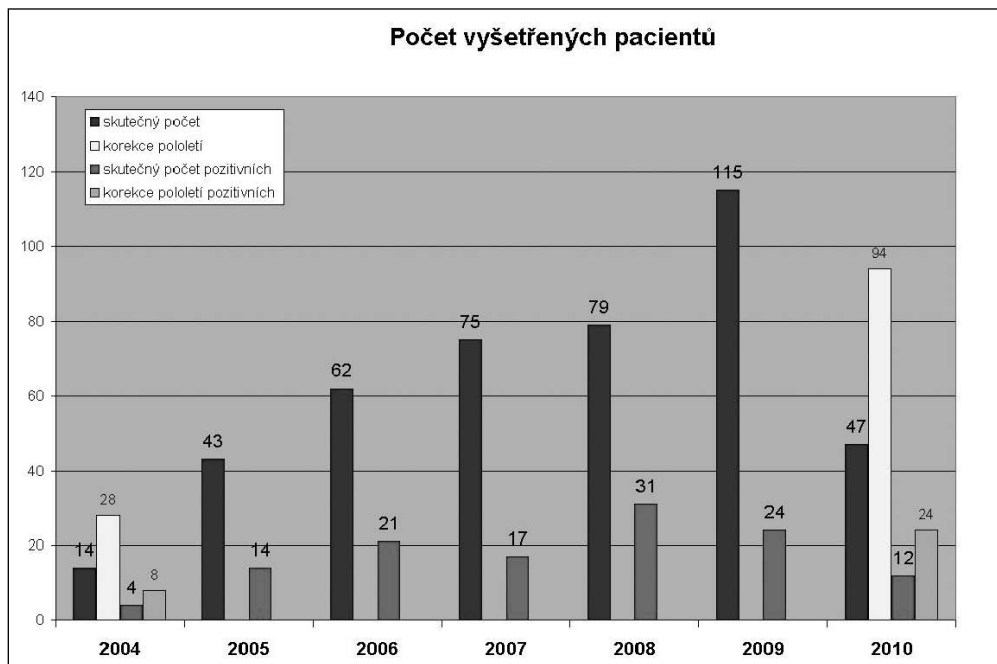
	metodika	doba trvání analýzy	„hands on time“
od 1.7.2004	nested PCR	8h	3h 30 min
od 1.7.2006	real-time PCR	3h	1h 45 min
od 1.5.2009	real-time PCR s automatizovanou izolací DNA	2h 30 min	45 min

Zrychlení diagnostiky není však jediným přínosem zavedení real-time PCR. V případě průkazu *Neisseria meningitidis* (cílovým genem pro amplifikaci je *porA*) bylo dosaženo také vyšší citlivosti ve srovnání s nested PCR. Průkazem založeným na amplifikaci části sekvence genu pro pneumolysin *Streptococcus pneumoniae* bylo dosaženo především lepší sepcificity a výborné citlivosti. Real-time PCR průkaz *Listeria monocytogenes* (gen pro listeriolysin O) rovněž vyřešil občasné nespecifické reakce pozorované v původní metodice.

### Získané výsledky

Od července 2004 bylo v naší laboratoři vyšetřeno celkem 478 vzorků od 435 pacientů, z toho na přítomnost DNA *Neisseria meningitidis* (363 pacientů, 42 pozitivních; 12 %), DNA *Streptococcus pneumoniae* (388 pacientů, 63 pozitivních; 16 %), DNA *Haemophilus influenzae b* (343 pacientů, 4 pozitivní; 1 %) a DNA *Listeria monocytogenes* (361 pacientů, 14 pozitivních; 4 %).

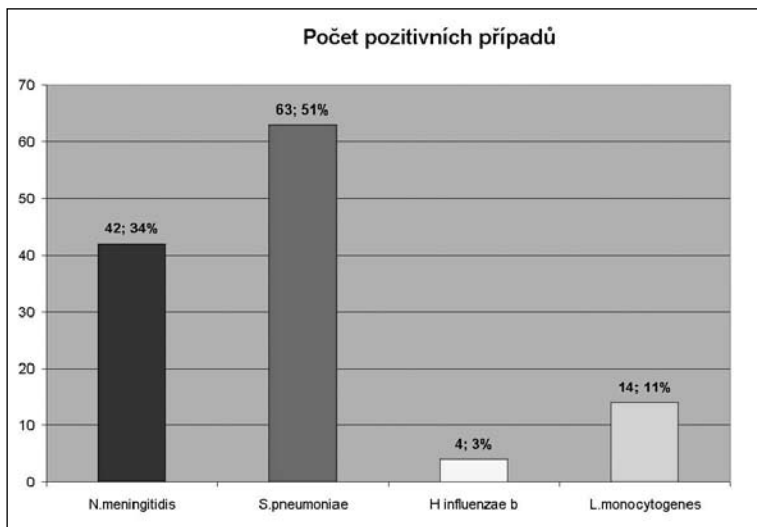
**Graf 1: Počet vyšetřených pacientů v jednotlivých letech. Údaje za rok 2004 a 2010 odpovídají jednomu pololetí, graf je tedy doplněn odhadem pravděpodobného celoročního počtu vyšetřených pacientů.**



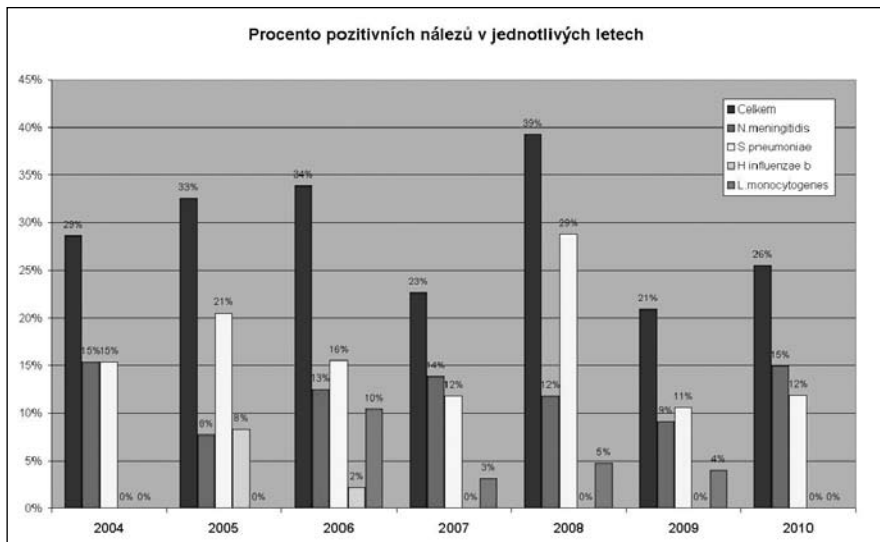
Nejčastěji zjištěnými původci purulentních meningitid ve vyšetřeném souboru pacientů jsou *Streptococcus pneumoniae* (51 % pozitivních případů) a *Neisseria meningitidis* (34 % pozitivních případů), přičemž typ C *Neisseria meningitidis* byl v naší laboratoři naposledy detekován v lednu 2006, od této doby byly všechny úspěšně otypované vzorky určeny jako typ B, což potvrzuje dominanci tohoto typu. *Listeria monocytogenes* (11 % pozitivních případů) se vyskytuje spíše ve vlnách (především přelom roků

2006/2007 a roků 2008/2009 v souvislostech s velkým počtem alimentárních nákaz). Od roku 2006, kdy byl naposledy v naší laboratoři zaznamenán případ bakteriální meningitidy vyvolané mikroorganizmem *Haemophilus influenzae* typ b (celkem 3 % pozitivních případů) byly pozorovány 4 případy kultivačního průkazu *Haemophilus influenzae* non-b z likvoru. Z toto vyplývá nutnost úpravy metodiky průkazu DNA *Haemophilus influenzae* tak, aby byly zachyceny i non-b sérotypy.

**Graf 2: Počet pacientů s pozitivním průkazem původce bakteriální meningitidy.**



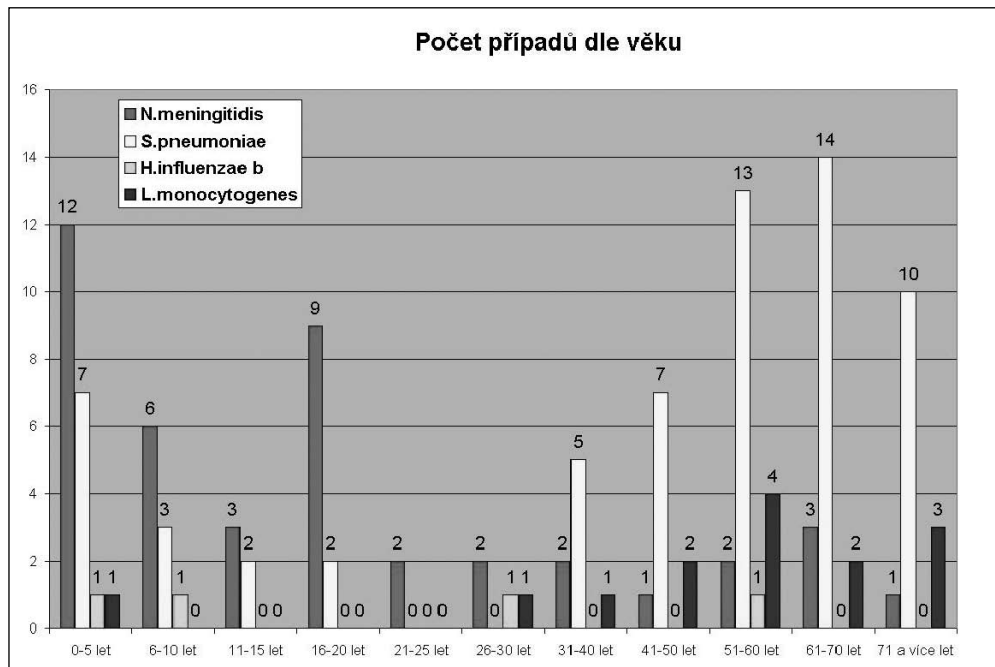
**Graf 3: Vývoj počtu pozitivních nálezů pro zjišťovaná agens v jednotlivých letech. Procentuální součet za jednotlivá agens se neshoduje s procentem pozitivních vzorků v celém souboru zahrnující všechna vyšetřovaná agens, protože někteří pacienti byli vyšetřeni pouze na vybrané původce bakteriálních meningitid.**



Distribuce pozitivních nálezů s ohledem na věk je pro jednotlivá agens typická. U *Neisseria meningitidis* jsou významná maxima ve věkové kategorii 0-5 let a 16-20 let. Bakteriální meningitidy způsobené

*Streptococcus pneumoniae* a *Listera monocytogenes* jsou s vyšší incidencí zaznamenávány u starších ročníků (50 a více let).

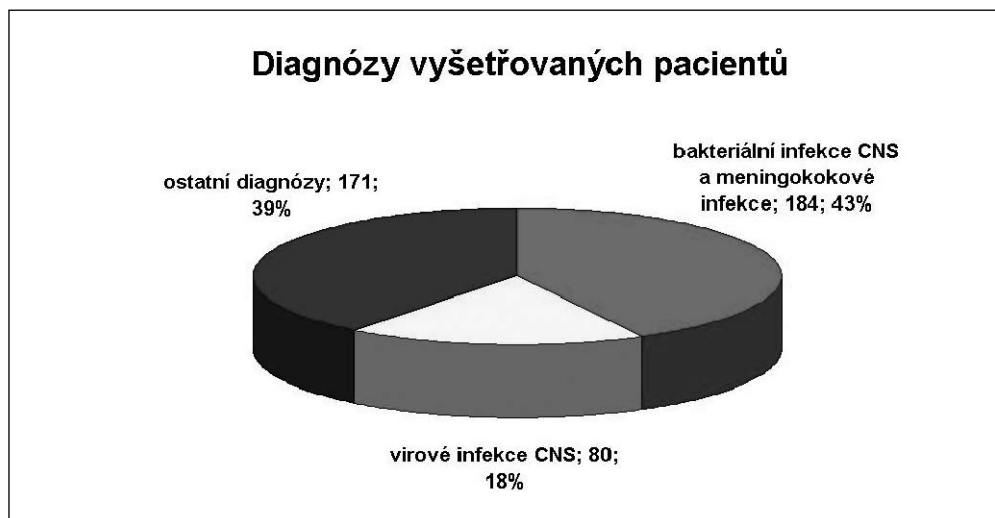
**Graf 4: Počty případů dle věku pacientů.**



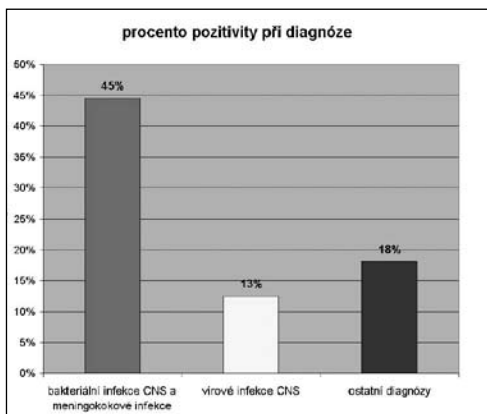
Ve vyšetřovaném souboru pacientů byli nejvíce zastoupeni pacienti s diagnózou G00 (bakteriální zánět mozkových a míšních plen – bakteriální meningitida) a diagnózou A39 (meningokokové infekce) – celkem tvořili 43% vyšetřených paci-

entů. U těchto pacientů, jejichž diagnóza nejvíce odpovídala zaměření použitých testů, byla pravděpodobnost pozitivního výsledku v některém ze 4 sledovaných agens 45%.

**Graf 5: Zastoupené diagnózy**



**Graf 6: Procento pozitivity při diagnóze**



Naopak – u další významné skupiny diagnóz virových infekcí CNS (převážně diagnóza A87 – virová meningitida, 18 % pacientů) tvořilo pozitivní nálezy pouze 13 % pacientů. Téměř 40 % pacientů mělo uvedenou jinou diagnózu a z nich bylo 18 % pozitivních.

## Závěr

Nevýhodou PCR metod pro určení původců infekčních onemocnění je, že se jedná o selektivní testy, které detekují pouze omezené spektrum zvolených agens. Zůstává tak neobjasněno poměrně velké procento případů bakteriálních meningitid. V tomto směru je možno hledat řešení zpět směrem k detekci univerzálních oblastí genu kódujícího 16S rRNA, ale je nutno vyřešit problém kontaminující bakteriální DNA. Kombinací tohoto přístupu se sekvenčními technikami, které umožňují určení prakticky jakéhokoli bakteriálního agens, pak můžeme zvýšit úspěšnost laboratorního průkazu původců bakteriálních meningitid. Vzhledem k tomu, že se však jedná ve srovnání s real-time PCR o podstatně technicky náročnější metody, lze očekávat dostupnost takto získaných výsledků v delším časovém odstupu.

Molekulárně biologická diagnostika v kombinaci s klasickými mikrobiologickými metodami nabízí rychlou a kvalitní diagnostiku purulentních meningitid a výrazně tak přispívá k minimalizaci následku těchto závažných stavů.

## Literatura

1. A. Bäckman et al: Evaluation of an extended diagnostic PCR assay for detection and verification of the common causes of bacterial meningitis and other biological samples, *Molecular and Cellular Probes* (1993) 13, 49-60
2. M.-K. Taha: Simultaneous Approach for Nonculture PCR-Based Identification and Serogroup Prediction of *Neisseria meningitidis*, *Journal of Clinical Microbiology* (2000) 38, 855-857
3. O. Greiner, P. J. R. Day, P. P. Bosshard, F. Imeri, M. Altwegg, D. Nadal: Quantitative Detection of *Streptococcus pneumoniae* in Nasopharyngeal Secretions by Real-Time PCR, *Journal of Clinical Microbiology* (2001) 39, 3139-3134
4. D. M. Whiley, M. E. Crisante, M. W. Syrmis, I. M. Mackay, T. P. Sloots: Detection of *Neisseria meningitidis* in Clinical Samples by a Duplex Real-time PCR Targeting the *porA* and *ctrA* Genes, *Journal of Molecular Diagnostics* (2003) 7, 141-145
5. H. K. Nogva, K. Rudi, K. Nasterstad, A. Hlock, D. Lillehaug: Application of 5'-Nuclease PCR for Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* in Pure Cultures, Water, Skim Milk, and Unpasteurized Ehole Milk, *Applied and Environmental Microbiology* (2000) 66, 4266-4271
6. A. Marty, O. Greiner, P. J. R. Day, S. Gunziger, K. Muhlemann, D. Nadal: Detection of *Haemophilus influenzae* Type b by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* (2004) 42: 3813-3815