

Identifikace bakterií molekulárně biologickými metodami

V. Hypiusová, L. Plíšková

Hlavními důvody využití PCR metod v bakteriologii jsou zejména rychlost vyšetření (bakteriální meningitidy, sepse), detekce bakterií pomalu či obtížně kultivovatelných či nekultivovatelných v běžných podmínkách (mykobakterie, *Legionella pneumophilla*) a možnost detekovat nejenom živé, ale i mrtvé nebo dezintegrované bakterie zejména po ATB terapii (1).

Pro detekci bakterií metodami PCR existují dva hlavní metodické přístupy. Nejčastěji používané je provádění specifických PCR reakcí, umožňujících detekci konkrétní bakterie. Další, v posledních letech stále více využívanou možností, je provádění širokospektrých (broad-range) PCR s primery cílenými do oblasti 16S rRNA společné všem bakteriím s následnou sekvenací dle Sangera. Tímto způsobem je možné identifikovat DNA jakékoli bakterie, přítomné ve vyšetřovaném biologickém materiálu. Využívá se zejména u kultivačně negativních infekcí (2).

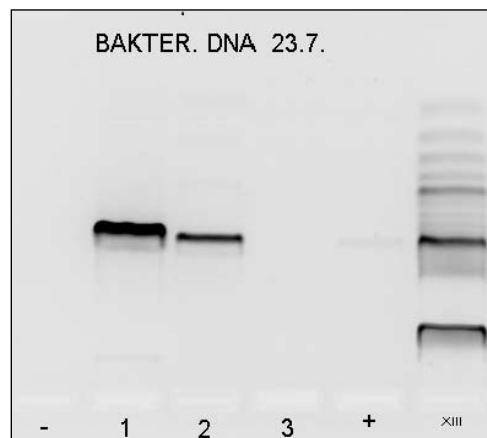
Nejčastěji využívané biologické materiály jsou biofilmy (bakterie rostoucí na cizorodém materiálu), kloubní či jiné punktáty, abscesy, plodová voda, likvor, stěry, dále chlopenní náhrady apod. Často diskutovaným a rozporuplným materiálem pro využití detekce pomocí 16S rDNA sekvenování je krev. Pro detekci v krvi je důležité načasování odběru, protože bakterie je z krve velmi rychle eliminována.

Zásadní význam má 16S rRNA sekvenování právě u kultivačně negativních infekcí, kdy umožňuje nejenom identifikovat etiologického původce onemocnění, ale především nasadit cílenou antibiotickou terapii. Do budoucna je nutné pro plné využití této metody v klinických mikrobiologických laboratořích poskytnout přesné pokyny, standardní postupy nejenom pro vlastní provádění, ale zejména pro interpretaci získaných výsledků (2).

Jak tedy postupujeme při provádění širokospektré PCR s následnou sekvenací na pracovišti ve FN Hradec Králové? Po izolaci bakteriální DNA následuje amplifikace za využití primerů z oblasti 16S rDNA genu (3). Vysoká citlivost PCR je velmi žádoucí, ale rovněž představuje velké nebezpečí kontaminace, a to zejména při této aplikaci identifikace bakteriální DNA. Proto je nutné přísně dodržovat zásady správné laboratorní praxe včetně vnitřní kontroly

kvality. Samozřejmě jsou oddělené prostory pro izolaci DNA a přípravu amplifikační směsi, která se připravuje v UV boxu. Před vlastní prací je nutné UV box a pomůcky vysvítit UV světlem a vydezinfikovat antibakteriálním prostředkem. Důležitou součástí je edukace personálu, nutnost používání ochranných pomůcek (rukavice, oblečení).

Po amplifikaci následuje elektroforetická detekce vzniklého produktu na 2% agarózovém gelu (obr. č. 1)



Obrázek č. 1: Ukázka elektroforetické detekce bakteriální DNA

Legenda:

Vzorek č. 1 - silná pozitivita bakteriální DNA

Vzorek č. 2 - slabá pozitivita bakteriální DNA

Vzorek č. 3 - bakteriální DNA neprokázána

Pozitivní kontrola +

Negativní kontrola

Velikostní marker a 50 bp

Při pozitivním nálezů bakteriální DNA následuje sekvenční analýza. Intenzita bandu pozitivní kontroly je kritériem, zda je možné bakteriální DNA identifikovat pomocí sekvenace. Vzorky o stejné či slabší intenzitě identifikovat sekvenční analýzou nelze. Vlastní sekvenace zahrnuje následující kroky:

1. Čištění PCR produktu po proběhlé PCR
2. Sekvenční PCR
3. Čištění po sekvenční PCR před vlastní sekvenací
4. Sekvenace, v našem případě na přístroji ABI 3130
5. Zhodnocení

Konečným výsledkem je sekvenace bakteriální DNA ve FASTA formátu (obrázek č. 2). Následuje automatické vyhodnocení pomocí identifikačních progra-

mů, volně dostupných na internetu. My používáme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), RDP (Ribosomal Database Project) a SepsisTest™ BLAST (Identification by 16S/18S rDNA Sequence Analysis). Pomocí těchto programů je hledána shoda naší nalezené sekvence s referenčními sekvencemi bakterií.

```
TCTGGTATCCCCACTCCCATGGTGTGACG
GGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTAT
TCACCGCAGTATGCTGACCTGCGATTACTA
GCGATTCCGACTTTCATGCACCTCGAGTTGCA
GAGTGCAATCCGGACTACGATCGGTTTTTCT
GGGATTGGCTCCACCTCGCGGCTTGGCTA
CCCTCTGTACCGACCATTGTATGACGTGT
GAAGCCCTGGTCATAAGGGCCATGAG
GACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCC
GGTTTGTCACCGGCAGTCTCATTAGAG
TGCCCAACTAAATGATGGCAACTA
ATGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCG
```

Obrázek č. 2: Ukázka FASTA formátu sekvence bakteriální DNA

Naprosto zásadní je rozhodnutí, zda identifikovaná bakterie je původcem onemocnění, patogenem nebo se jedná o kontaminující, kolonizující či nepatogenní bakterii. Rovněž je nutné zvážit klinické hledisko (anamnestické údaje, imunita pacienta, klinický a biochemický profil, ATB terapie) a odběr vzorku (před/po ATB terapii, místo odběru).

Při hodnocení výsledků sekvenční analýzy velmi úzce spolupracujeme s klinickým mikrobiologem a ošetřujícím lékařem.

Jako příklad nutné spolupráce uvádíme detekci bakteriální DNA na chlopenní náhradě u 67-letého pacienta s akutní endokarditidou. Vzhledem k dlouhodobé antibiotické terapii nebylo možné kultivačně

určit původce, metodou PCR s následnou 16S rDNA sekvenací byla identifikována bakterie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Rozpaky analytika, zda se jedná o etiologického původce onemocnění či náhodný nález vyřešil mikrobiolog, který byl tímto nálezem velmi potěšen a považoval jej za „skvělý výsledek. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* je totiž bakterie, která může endokarditidu vyvolat.

Metoda 16S rDNA sekvenování má ale svá omezení. Je méně citlivá než specifické PCR reakce a nelze pomocí této metody určit původce v případě duální infekce. Její význam v diagnostice bakterií zejména u kultivačně negativních infekcí neustále narůstá a proniká do všech větších diagnostických laboratoří.

Literatura:

1. Dempsey K. E., Riggio M. P., Lennon A. et al. Identification of bacteria on the surface of clinically infected and non-infected prosthetic hip joints during revision arthroplasties by 16S rRNA gene sequencing and by microbiological culture. *Arthritis Research and Therapy* 2007; 9 (3). Available online <http://arthritis-research.com/content/9/3/R46>.
2. Woo P. C. Y., Lau S. K. P., Teng J. L. L. et al. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol and Infection* 2008; 14 (10):908-34.
3. Greisen K., Loeffelholz M., Purohit A. et al. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(2):335-51.