

Výběr vhodného klinického materiálu a postup izolace DNA pro účely detekce a typizace *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* molekulárními metodami v případě podezření na invazivní bakteriální onemocnění

Selecting appropriate clinical specimens and DNA isolation procedure for the purposes of the detection and typing of Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, and Haemophilus influenzae by molecular methods in suspected invasive bacterial infections

Zuzana Vacková, Jana Kozáková, Pavla Křížová, Věra Lebedová

Souhrn

Naše sdělení se zabývá výběrem vhodného materiálu a jeho přípravou pro bezkultivační laboratorní diagnostiku, průkaz a typizaci DNA původců invazivních meningokokových, pneumokokových a hemofilových onemocnění. Jedná se především o klinické obrazy odpovídající invazivnímu onemocnění: meningitida, septikémie, bakteriemie, pneumonie. Vhodným klinickým materiálem dle EU „case“ definice je pouze materiál z míst za normálních podmínek sterilních (cerebrospinální mok, krev, popř. sekční materiál). Tento materiál se v Oddělení vzdušných bakteriálních nákaz, CEM, SZÚ po jeho doručení ihned zpracovává. Prvotní zpracování je pomocí zde předkládaného postupu izolace DNA. S izolovanou DNA se dále pracuje molekulárními technikami PCR a real-time PCR za účelem identifikace a následné typizace uvedených původců invazivních bakteriálních onemocnění. V současné době nabízíme možnost celkového vyšetření zmiňovaného klinického materiálu při podezření na invazivní onemocnění způsobené bakteriemi *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* nebo *Haemophilus influenzae* a posléze typizace *Neisseria meningitidis* či *Streptococcus pneumoniae*. Provádění těchto vyšetření má velký význam, vzhledem ke stále se zvyšujícímu procentu invazivních bakteriálních onemocnění kultivačně negativních, laboratorně diagnostikovaných pouze metodami PCR.

This article is about selecting appropriate clinical specimens and processing them for non-culture laboratory diagnosis, detection, and typing of DNA of the causative agents of invasive meningococcal, pneumococcal, and Haemophilus infections. The patients present with clinical pictures of invasive infection: meningitis, septicemia, bacteraemia, or pneumonia. As it follows from the EU case definition, only specimens collected from normally sterile sites are considered appropriate, i.e. cerebrospinal fluid (CSF), blood, or autopsy specimens. These clinical specimens are processed as soon as received by the Unit for Airborne Bacterial Infections, Centre for Epidemiology and Microbiology, National Institute of Public Health. Step 1 of the processing is DNA isolation using the procedure specified in this article. The DNA obtained is analyzed by molecular methods such as PCR and real-time PCR allowing for the identification and subsequent typing of the above mentioned causative agents of invasive infections. At present, the laboratory is able to provide a comprehensive analysis of the clinical specimens from patients with suspected invasive bacterial infections caused by Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, or Haemophilus influenzae, followed by subsequent typing of Neisseria meningitidis and Streptococcus pneumoniae, if appropriate. These advanced investigations are increasingly relevant as the proportion of culture-negative cases of invasive bacterial infections whose laboratory diagnosis is only feasible by PCR-based methods is on the rise.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2015; 24(2): 102–104.

Klíčová slova: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, izolace DNA, molekulární bezkultivační typizace

Keywords: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, DNA isolation, non-culture molecular typing

V České republice existuje v platné legislativě Vyhláška č. 473/2008 Sb. O systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce [1], která se zabývá ve své příloze číslo 6 Systémem epidemiologické bdělosti invazivních meningokokových onemocnění, v příloze číslo 7 Systémem epide-

miologické bdělosti invazivních onemocnění vyvolaných *Haemophilus influenzae* typ b a non-b a v příloze číslo 21 Systémem epidemiologické bdělosti invazivních pneumokokových onemocnění. Ve zmiňované legislativě jsou popsány klinické definice onemocnění, metody laboratorní diagnostiky a epidemiologická kritéria. I na podkladu EU legislativy jsou přejímány EU „case“ definice rozřazující případy na možné (splňující jen klinickou definici onemocnění), pravděpodobné (splňující klinickou definici onemocnění s epidemiologickou vazbou) a potvrzené (splňující kromě klinické definice také laboratorní kritéria).

Souhrnně lze říci, že laboratorními kritérii pro potvrzení invazivního meningokokového onemocnění (IMO), in-

vazivního pneumokokového onemocnění (IPO) a invazivního hemofilového onemocnění jsou: kultivační průkaz původce, mikroskopický průkaz původce, bezkultivační průkaz antigenu či bezkultivační průkaz nukleové kyseliny (DNA) původce onemocnění.

Toto sdělení se věnuje problematice bezkultivačních vzorků za účelem průkazu DNA původce onemocnění, z pohledu výběru vhodného klinického materiálu na vyšetření a prvotnímu zpracování, tzn. izolaci DNA z klinických vzorků, jedná se o postup používaný v Oddělení vzdušných bakteriálních nákaz, CEM, SZÚ.

Výběr klinického materiálu:

Vhodným klinickým materiálem pro vyšetření při úvaze zmiňovaných původců invazivních bakteriálních onemocnění jsou pouze materiály z míst primárně sterilních tzn. cerebrospinální mok, krev (nejlépe plná krev), popř. sekční materiál. Materiál musí být odebrán sterilně do sterilní umělohmotné šroubovací zkumavky, pouze pro molekulární vyšetření. Požadovaná množství na vyšetření je 0,5–1,0 ml klinického materiálu či 100–200 µl izolované DNA, dle rozsahu požadavku na vyšetření. Klinický materiál je možné odebrat do 3.–4. dne po zahájení léčby antibiotiky. Pokud laboratoř nedisponuje potřebnými molekulárními technikami k vyšetření, je třeba materiál odeslat dle možností ihned do Oddělení vzdušných bakteriálních nákaz, jako infekční materiál kurýrem. Ideálně před zasláním informovat telefonicky. Krev či sekční materiál jsou transportovány při pokojové teplotě, zamražený likvor v krabičce na suchém ledu (při rychlém poslání stačí obyčejný led). V případě nutnosti skladování lze klinický materiál krátkodobě (do 24 hod) uchovávat při 2–8 °C, dlouhodobě zamražen při -70 °C viz: <http://www.szu.cz/oddeleni-bakterialnich-vzdusnych-nakaz>.

Postup izolace DNA z klinického materiálu:

Pro izolaci DNA je v NRL používán komerční izolační kit QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN) [2]. Dále potřebnými chemikáliemi jsou [2, 3]: Lyzozym (Sigma Aldrich), TE pufr pH 8,0 (Sigma Aldrich), Mutanolysin (Sigma Aldrich), Proteinasa K (QIAamp DNA Mini kit, QIAGEN), pufr ATL, AL, AW1, AW2, AE (QIAamp DNA Mini kit, QIAGEN), Ethanol 96 - 100% (Sigma Aldrich), PCR voda (Bio-Rad). Je doporučeno provádět u jednoho vzorku izolaci DNA v dupletu, společně s jednou negativní izolační kontrolou (místo klinického vzorku PCR voda). Obecně zásady platící pro všechny kroky izolace DNA jsou: používání osobních ochranných pomůcek, pipetování v boxu, práce v chladících stojácích, krátká centrifugace před každým otevřením víček, při podezření na potřísnění výměna rukavic, do boxu dávat jen materiál používaný před nejbližší inkubací, používat vyzářený materiál UV, doba inkubací se dá využít k přípravě a vyzáření materiálu pro další kroky.

Příprava: Do vyzářeného bezpečnostního boxu se připraví vše potřebné pro izolaci DNA (sterilní rukavice, eppendorfky popsané číslem vzorku a datem izolace DNA, kolony, sběrné zkumavky, dostatečné množství jednorázových špiček). UV záření se zapne na 20 minut.

Preinkubace: Nejprve se připraví roztok lyzozymu a mu-

tanolysinu v TE pufru: Z mrazicího boxu se vyjme eppendorfka s pracovním roztokem mutanolysinu (komerčně dostupný lyofilizovaný prášek mutanolysinu se ředí PCR vodou na zásobní koncentraci 3000 U/ml, prášek se uchovává při -20 °C, naředěný enzym při -20 °C) a vloží se do lednice, aby se roztok rozmrazil. Lyzozym (komerčně dostupný prášek lyzozymu se skladuje při 2–8 °C) naváží na analytických vahách (0,004 g na 1 vzorek) do eppendorfky pomocí sterilní špachtle, přidat adekvátní objem TE pufru (50 µl na 1 vzorek), intenzivně třepat až do rozpuštění. Krátká centrifugace a přidat roztok mutanolysinu (2,5 µl na 1 vzorek). Směs promíchat pipetou. Thermoblok předeheat na 37 °C. Z lednice vyjmout ethanol a proteinasu K (skladuje se při 2–8 °C, dlouhodobě při -20 °C) a nechat vytemperovat na pokojovou teplotu. Pipetuje se 50 µl směsi lyzozymu s mutanolysinem do každé eppendorfky. Přidat 200 µl klinického vzorku (při velkém množství materiálu lze použít 400 µl). Inkubace v thermobloku 1 hodinu při 37 °C, krátké vortexování. Vyčistit box, připravit materiál pro všechny následující kroky a na dobu inkubace zapnout UV záření.

Inkubace s proteinasou K: Po skončení inkubace se vyjmou vzorky, krátká centrifugace. Thermoblok ihned předeheat na 56 °C. Přidat 20 µl proteinasy K ke každému vzorku, mírné vortexování. Inkubace v thermobloku 30 minut při 56 °C. Vyčistit box, připravit materiál pro všechny následující kroky a na dobu inkubace zapnout UV záření.

Inkubace s AL (lytickým) pufrém: Po skončení inkubace vyjmout vzorky, vypnout thermoblok, krátká centrifugace. Přidat 200 µl AL pufru, krátké vortexování. Inkubace 10 min při pokojové teplotě, krátká centrifugace.

Vysrážení DNA ethanolém: Přidat 250 µl ethanolu, pomalu promíchat pipetou (obsah nesmí vystříknout), krátká centrifugace.

Navázání DNA na membránu kolonek: Celý objem včetně precipitátu přepipetovat do stejně označené kolony. Okraj kolony se nesmí namočit! Nejprve přepipetovat 500 µl, centrifugace krátce při 8000 ot./1 min, výměna sběrné zkumavky, přepipetovat zbylý objem, opět centrifugace při 8000 ot./1 min. Výměna sběrné zkumavky.

Promytí: Do kolony přidat 500 µl pufru AW1. Centrifugace při 8000 ot./1 min. Vyměnit sběrnou zkumavku. Do kolony přidat 500 µl pufru AW2. Centrifugace při 13000 ot./3 min. Vyměnit sběrnou zkumavku. Centrifugace při 13000 ot./1 min.

Eluce DNA: Kolony přemístit do stejně popsaných eppendorfek. Do kolony přidat 100 µl pufru AE (pokud se předpokládá extrémně nízká či vysoká koncentrace DNA, můžeme zvolit jiný objem AE pufru, ne však pod 50 µl). Inkubace 5 min při pokojové teplotě. Centrifugace při 8000 ot./1 minutu. Izolovaná DNA je nyní v eppendorfce. Zkontrolujeme, že každá eppendorfka s DNA je označena a vzorek lze použít pro molekulární metodiky či DNA skladovat zamražením.

Oddělení vzdušných bakteriálních nákaz nabízí molekulární vyšetření přímo klinických vzorků, jedná se nejen o identifikaci uváděných původců invazivních bakteriálních onemocnění, ale také o jejich typizaci. Pro laboratoře

klinické mikrobiologie provádějící pouze identifikaci agens, NRL nabízí následnou typizaci původce onemocnění ať již z klinických vzorků, tak z izolátů DNA. V tomto případě může laboratořím pomoci zde uváděný postup izolace DNA. Nadále platí nabídka pomoci laboratořím se zavěšením či úpravou jejich vyšetřovacích metodik, kontaktní osoba Mgr. Zuzana Vacková CEM, SZÚ Praha.

Molekulární detekce a typizace bakteriálních agens z klinických vzorků v NRL MEN a STR: NRL pro meningokokové (MEN) a streptokokové (STR) nákazy společně provádí real-time PCR detekci *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* a *Haemophilus influenzae* z klinického materiálu. Dále NRL MEN používá seminestred PCR metodu pro detekci *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* a typizaci *Neisseria meningitidis* z klinického materiálu. NRL STR ještě používá multiplex PCR metodu pro základní typizaci *Streptococcus pneumoniae* z klinického materiálu. Molekulární metodiky jsou v mikrobiologii velmi aktuálními laboratorními metodami. Národní referenční laboratoře se neustále snaží o jejich modernizaci a vývoj dle nejnovějších poznatků. Aktuální informace o prováděných vyšetřeních společně se žádankami na vyšetření jsou dostupné na webových stránkách: <http://www.szu.cz/oddeleni-bakterialnich-vzdusnych-nakaz>, <http://www.szu.cz/narodni-referencni-laborator-pro-meningokokove-nakazy>, <http://www.szu.cz/narodni-referencni-laborator-pro-streptokokove-nakazy>.

Provádění těchto molekulárních vyšetření má velký význam, vzhledem ke stále se zvyšujícímu procentu invazivních bakteriálních onemocnění kultivačně negativních, laboratorně diagnostikovaných pouze metodami PCR. Ze stejného důvodu je třeba provádět kromě molekulární iden-

tifikace původců onemocnění také jejich typizaci. Autoři touto cestou děkují všem kolegům z nemocničních a laboratorních pracovišť, kteří posílají klinické vzorky či izoláty DNA na vyšetření do Oddělení vzdušných bakteriálních nákaz. Pracovištím, které těchto služeb nevyužívají, autoři představují aktuální možnosti NRL a zvou ke spolupráci.

LITERATURA

1. Vyhláška č. 473/2008 Sb. O systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce
2. Manuál QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN). Dostupné z: file:///C:/Users/Vackova%20Zuzana/Downloads/HB-0329-002%201072897_HB_QIAamp_DNA_Mini_Blood_Mini_0612_20120709.pdf
3. PCR for Detection and Characterization of Bacterial Meningitis Pathogens: *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae*, in Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*, WHO manual, 2nd edition, 2011, Chapter 10. Dostupné z: <http://www.cdc.gov/meningitis/bacterial.html>
4. Blood and Body Fluid DNA Extraction for Streptococci, CDC Feb 2014. Dostupné z: <http://www.cdc.gov/streplab/downloads/pcr-body-fluid-DNA-extract-strep.pdf>

Mgr. Zuzana Vacková
MUDr. Pavla Křížová
NRL pro meningokokové nákazy

MUDr. Jana Kozáková
NRL pro streptokokové nákazy

MUDr. Věra Lebedová
NRL pro hemofilové nákazy,
Oddělení vzdušných bakteriálních nákaz,
CEM, SZÚ