

Nová molekulární metoda a schéma typizace *Streptococcus pneumoniae* v České republice

A newly developed molecular method and typing scheme for Streptococcus pneumoniae in the Czech Republic

Zuzana Vacková, Martina Klímová, Jana Kozáková

Souhrn • Summary

Streptococcus pneumoniae, patřící celosvětově k velice závažným patogenům, může vyvolat celou škálu různých onemocnění. Na základě strukturální variability polysacharidových pouzdrných antigenů se *S. pneumoniae* klasifikuje do více než 90 sérotypů a 46 séroskupin. Tyto sérotypy a séroskupiny byly doposud rozlišovány především pomocí Quellung reakce. V tomto sdělení prezentujeme nové využití molekulární metody PCR pro identifikaci, ale především typizaci, *S. pneumoniae* v NRL pro streptokokové nákazy (NRL/STR) Státního zdravotního ústavu Praha. Metodika byla v průběhu roku 2012 v NRL/STR testována a od roku 2013 zařazena do rutinního provozu laboratoře.

Streptococcus pneumoniae is a highly important pathogen worldwide and can cause a range of diseases. Based on the structural variability of capsular polysaccharide antigens, *S. pneumoniae* is classified into more than 90 serotypes and 46 serogroups. Until recently, serotyping and serogrouping was done by the Quellung reaction. In this article, a novel PCR method for the identification and particularly for the serotyping of *S. pneumoniae* newly used by the National Reference Laboratory for Streptococcal Infections (NRL/STR) of the National Institute of Public Health, Prague, is presented. Tested in 2012, the method was implemented in routine practice of the NRL/STR in 2013.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2013; 22(1): 16–18.

Klíčová slova: PCR typování *Streptococcus pneumoniae*, Quellung reakce, *Streptococcus pneumoniae*

Keywords: PCR typing of *Streptococcus pneumoniae*, Quellung reaction, *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae patří celosvětově mezi nejvýznamnější patogeny. Způsobuje pestrou škálu různých infekcí, od život zpravidla neohrožujících akutních otitid či sinusitid, až po nejzávažnější invazivní onemocnění (IPO), jakými jsou meningitidy, bakterémie, sepse či pneumonie.

Nejdůležitějším faktorem virulence těchto grampozitivních diplokoků je kapsula. Jedná se o pouzdro polysacharidové povahy, tvořené typově specifickými antigeny. Na základě strukturální variability typově specifického polysacharidového pouzdrného antigenu se pneumokoky klasifikují do více než 90 sérotypů a do 46 séroskupin [1]. Většina (98 %) kmenů *S. pneumoniae* je typovatelných. Sérotypy můžeme dle složení očkovacích látek označit na dvě skupiny, vakcinační a nevakcinační. Distribuce sérotypů je ovlivněna geografickou polohou, socioekonomickými podmínkami, věkem pacienta, vakcinační strategií i klinickou formou onemocnění [2, 3, 4]. Při dlouhodobém používání konjugovaných vakcín je třeba uvažovat i nad problémem fenoménu replacementu, kompetitivní náhrady sérotypů krytých vakcínou jinými, tzn. nevakcinačními pneumokokovými sérotypy. Část kmenů (2 %) je netypovatelných (NT), jedná se o bezpouzdrné varianty *S. pneumoniae*.

Z mnoha důvodů je proto velice žádoucí sledovat a analyzovat zastoupení sérotypů u kmenů pneumokoků izolovaných z klinických materiálů pacientů. Nejen této problematice se NRL pro streptokokové nákazy (NRL/STR) již celou řadu let věnuje a snaží se novelizovat používané metodiky dle aktuálních odborných informací.

Běžně je identifikace a typizace *S. pneumoniae* založena na morfologii kmene, citlivosti k optochinu, rozpustnosti ve žluči, latexaglutinaci a Quellung reakci [5]. Nově je používána polymerázová řetězová reakce (PCR).

Jedná se o molekulární metodu uspořádanou do schématu multiplexové reakce PCR (mPCR) s vyhodnocením pomocí agaróзовé elektroforézy [6]. Účelem této metody je detekce pneumokokových genů v genomu bakterie, které jsou typické pro určitou kapsulu séroskupiny či sérotypu *S. pneumoniae*. Metoda mPCR využívá specifických primerů pro dané geny dle The Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, USA [7]. Používané geny jsou kapsulární determinanty (geny: *cpsA*, *wzy*, *cpsH*, *cpsI*, *capB*, *wciY*, *cpsK*, *cpsG*, *galU*, *wciP*, *cpsO*, *wci*, *Nbeta*, *wcwL*, *werG*, *wzx*, *wciL*). Do multiplex PCR reakcí bylo dále zařazeno testování *cpsA* genu pro molekulární potvrzení *S. pneumoniae*.

Metoda mPCR typující *S. pneumoniae*

Sestavili jsme devět různých mPCR reakcí dle složení poolových antisér pro Quellung reakci (viz Tabulka 1). Podle antisér jsme také jednotlivé mPCR reakce nazvali A – I. Jednotlivé mPCR reakce se liší počtem primerů pro sérotypy či séroskupiny, od dvou do sedmi a taktéž vždy obsahují primery pro detekci *cpsA* genu. K molekulární typi-

Tabulka 1: TABULKA SÉROTYPOVÉHO SLOŽENÍ mPCR SMĚSÍ PRO PCR REAKCE

mPCR	mPCR sérotyp/séroskopina:						
A	1	2	4	5	18A/B/C/F		
B	3	6A/B/C/D	6C/D	8	19A	19F	
C	7A/F	7C/B/40	20	24A/B/F	31		
D	9N/L	9V/A	11A/D	16F	37/33F/A		
E	10A	10F/C/33C	12F/A/44/46	21	33F/A/37	39	
F	17F	22F/A					
G	34	35A/C/42	35B	35F/47F			
H	13	14	15A/F	15B/C	23A	23B	23F
I	38/25F/A	12F/A/44/46					

zaci DNA *S. pneumoniae* se použije mPCR označená písmenem dle poolového antiséra, se kterým kmen dává pozitivní Quellung reakci. Jedná se tedy pouze o předurčenou jednu mPCR reakci pro daný izolát. V případě potřeby následuje dourčení Quellung reakcí s faktorovými antiséry.

Metoda mPCR je vyhodnocována kvalitativně na agarózní elektroforéze, porovnáváním velikostí amplifikovaných produktů vzorků, hodnocením pozitivní kontroly (referenční kmeny zpracované stejně jako vzorek) a negativní kontroly (voda) s 50bp DNA Ladderem a srovnáním s uváděnými výsledky CDC, Atlanta, USA [7].

Algoritmus používání mPCR reakce typující *S. pneumoniae* v NRL/STR:

- kultivace + optochinový test
- test rozpustnosti ve žluči
- Quellung reakce s poolovými antiséry A – I
- izolace DNA
- mPCR A - I
- elektroforetické vyhodnocení
- případné dourčení Quellung reakcí s faktorovými antiséry

Pro testování nové PCR metody bylo použito více než 200 kmenů *S. pneumoniae* napříč sérotypy, *S. pseudopneumoniae*, *S. sanguinis*. Jednalo se o kmeny získané z různých biologických vzorků – hemokultura, likvor, sputum, nazofaryngeální výtěr, stěr ze středouší, stěr z oka, bronchoalveolární laváž.

Popsaným mechanismem se podařilo správně identifikovat všechny kmeny *S. pneumonie* při použití doposud známých primerů až na úroveň sérotypu. Jednalo se o 77 sérotypů: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7A, 7B, 7C, 7F, 8, 9A, 9N, 9L, 9V, 10A, 10B, 10C, 10F, 11A, 11C, 11D, 11F, 12A, 12B, 12F, 13, 14, 15A, 15B, 15C, 15F, 16A, 16F, 17A, 17F, 18A, 18B, 18C, 18F, 19A, 19B, 19C, 19F, 20, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24A, 24B, 24F, 25A, 25F, 31, 33A, 33B, 33C, 33D, 33F, 34, 35A, 35B, 35C, 35F, 37, 38, 39, 40, 42, 44, 46, 47A, 47F. Jediný sérotyp – sérotyp 2, na který jsou známé primery a nebyl otestován, protože NRL/STR nemá ve sbírce dostupný kmen. Výsledky mPCR byly verifikovány Quellung reakcí a byly ve shodě. Kromě *S. pneumoniae* byly testovány i kmeny příbuzných streptokoků (*S. pseudopneumoniae*, *S. sanguinis*), které naopak v mPCR metodě vykazovaly negativní výsledky. Nebyl zde pozorován problém s falešnou pozitivitou.

Zavedení metody mPCR do systému typizace *S. pneumoniae* se ukázalo jako velice přínosné pro NRL/STR. Doposud hlavní používaná metoda pro typizaci byla Quellung reakce. Je to sice zlatý standard, metoda je však velice časově a finančně nákladná. Metoda mPCR umožňuje typování všech vakcinačních a i většiny nevakcinačních sérotypů *S. pneumoniae*. Jde o novou a moderní metodu s mnoha výhodami. Její velkou předností je časová nenáročnost, ale především menší finanční nákladnost, díky obrovské redukci potřeby antisér. PCR představuje metodu s vysokou citlivostí, přesností a specifitou. PCR díky těmto vlastnostem také pomáhá identifikovat nové sérotypy *S. pneumoniae*, na příklad sérotyp 6D, který není identifikovatelný klasickou sérologickou metodou.

Autoři děkují všem kolegům z mikrobiologických laboratoří, kteří posílají izoláty S. pneumoniae do NRL pro streptokokové nákazy.

LITERATURA

1. Bratcher PE, Park IH, Hollingshead SK. & Nahm MH. Production of a unique pneumococcal capsule serotype belonging to serogroup 6. *Microbiology*. 2009; 155: 576–583.
2. Zemlickova H, Jakubu V, Urbaskova P, Motlova J, Musilek M, Adamkova V. Serotype-specific invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae* in Czech children, *J Med Microbiol*. 2010; 59(9): 1079–1083. doi: 10.1099/jmm.0.018390-0
3. Motlova J, Benes C, Kriz P. Incidence of invasive pneumococcal disease in the Czech Republic and serotype coverage by vaccines, 1997–2006, *Epidemiol Infect*. 2009; 137(4): 562–569. doi: 10.1017/S0950268808001301.
4. Prymula R, Motlova J, Kriz P, Comparison of *Streptococcus pneumoniae* serotypes causing acute otitis media & invasive disease in young children in the Czech Republic. *Indian J Med Res* 2004;119 (Suppl): 168–170.
5. Merrill CW, Gwaltney JM Jr, Hendley JW, Sande MA. Rapid identification of pneumococci. Gram stain vs. the quellung reaction. *N Engl J Med*. 1973; 288(10): 510–512.
6. Siira L, Kaijalainen T, Lambertsen L, Nahm MH, Toropainen M, Virolainen A, From Quellung to Multiplex PCR, and Back When Needed, in Pneumococcal Serotyping. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(8): 2727. doi: 10.1128/JCM.00689-12.
7. <http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/pcr.htm>

*Mgr. Zuzana Vacková
Martina Klímová
MUDr. Jana Kozáková
NRL pro streptokokové nákazy, SZÚ - CEM*