

Charakterizace kmenů *Streptococcus pneumoniae* metodou MLVA (Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis) v NRL pro streptokokové nákazy SZÚ

Characterization of Streptococcus pneumoniae strains by Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA) in the NRL for Streptococcal Infections

Jana Kozáková, Martin Musílek, Zuzana Okonji

Souhrn • Summary

Pro klonální analýzu kmenů *Streptococcus pneumoniae* z invazivního pneumokokového onemocnění byla v NRL pro streptokokové nákazy SZÚ zavedena a ověřena metoda Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA). Oproti rutinně používané metodě Multilocus Sequence Typing (MLST) je výhodou metody MLVA snadnost a rychlost provedení i nižší nákladnost. Rozlišení klonů je u obou metod obdobné. Standardem klonální analýzy pro molekulární surveillance původců závažných pneumokokových infekcí je však MLST, MLVA může být doplňkem pro klonální porovnání izolátů z lokálních epidemiologických situací.

The NRL for Streptococcal Infections implemented and tested Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA) for clonal analysis of Streptococcus pneumoniae strains from invasive pneumococcal disease. As compared to the routinely used Multilocus Sequence Typing (MLST) method, MLVA has the advantage of being easier, faster, and less expensive to perform. Both methods have similar resolution. Nevertheless, the standard method for clonal analysis in molecular surveillance of causative agents of severe pneumococcal infections is MLST, and MLVA can be used as a complementary method for clonal comparison of local isolates.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2018; 27(11-12): 284–286

Klíčová slova: *Streptococcus pneumoniae*, klonální analýza, MLVA, VNTR

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, clonal analysis, MLVA, VNTR

ÚVOD

Pro průběžnou epidemiologickou surveillance invazivního pneumokokového onemocnění (IPO) na úrovni referenčních pracovišť a pro zjišťování charakteristik izolátů *Streptococcus pneumoniae* při místním výskytu onemocnění jsou klasické mikrobiologické metody nahrazovány molekulárně genetickými postupy. Kapsulární typová charakteristika pneumokokových izolátů je nově určována multiplex polymerázovou řetězovou reakcí (mPCR) [1] či sekvenací genů kapsulárního operonu (Capsular Sequence Typing, CST). Pro porovnání genomických charakteristik pneumokokových izolátů je používána makrorestrikční analýza elektroforézou v pulzním poli (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE). Klonální charakteristiky izolátů jsou zjišťovány metodou multilokusové sekvenční typizace (Multilocus Sequence Typing, MLST) [2], prováděné ve schématu sedmigenovém či celogenomovém. Alternativní metodou klonální charakterizace pneumokokových izolátů je analýza tandemově repetitivních intergenových oblastí (Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis, MLVA). Metoda MLVA pro *S. pneumoniae* byla v rámci řešení výzkumného projektu zavedena v Národní referenční laboratoři pro streptokokové nákazy SZÚ (NRL) jako doplněk k rutinně používaným metodám mPCR a MLST.

Metody MLST a MLVA popisují klonálně typovou charakteristiku izolátů sekvenčním typem (ST), resp. mlva-typem (MT). ST i MT údaj je vztažen k profilu alelických variant skupiny genových či intergenových oblastí. Metody MLST a MLVA užívají sjednocených typizačních schémat kurátorsky spravovaných ve webových databázích a umožňují tak přesnou korelaci genotypových údajů získaných jednotlivými laboratořemi.

PROVEDENÍ A VÝSLEDKY

V NRL jsou izoláty od pacientů s IPO charakterizovány metodou MLST jež je standardem klonální charakterizace kmenů *S. pneumoniae* v globálním rámci. U podsouboru izolátů z IPO z roku 2017 jsme provedli též MLVA analýzu. Varianty MLVA analýzy byly vyvinuty několika laboratořemi [3–6], zvolili jsme variantu dle Elberse *et al.*, u které je k dispozici analytické webové rozhraní s databází obsahující více než 3200 MT charakteristik s alelickými profily [7].

U genomu *S. pneumoniae* byly dříve popsány vícečetně přítomné intergenové BOX oblasti, tvořené oligonukleotidovými úseky v tandemově repetitivním uspořádání a o proměnlivém počtu (Variable Number Tandem Repeat, VNTR), možnou funkcí oblastí je účast v regulaci genové exprese [8]. Námi zvolená varianta MLVA zjišťuje počet repetitivních *boxB* úseků o délce 45 bp u osmi BOX oblastí. Výstupem analýzy je číselný profil, označující u jednotlivých oblastí počet *boxB* repetice, a též sumarizující MT charakteristika, jež je profilu přiřazena schématem webové MLVA databáze.

Analyzovaný soubor 48 izolátů tvořil výběr kmenů sérotypů vakcinačních (1, 4, 9V) i nevakcinačních (8, 9N, 22F).

Při MLVA analýze jsme u genomové DNA pneumokokových izolátů provedli PCR amplifikace fragmentů jednotlivých chromozomálních BOX oblastí obsahujících *boxB* repetice. Amplifikační primery, specifické pro každou BOX oblast, obsahovaly fluorescenční značku, umožňující následnou elektroforetickou detekci produktů amplifikace. Genetickým analyzátozem ABI 3130xl byla zjišťována velikost ampliconů jednotlivých BOX oblastí a z ní aproximován počet *boxB* repetic. Správná funkce algoritmu, přiřazujícího počet repetic, byla u ampliconů, reprezentujících odlišné alelické varianty BOX oblastí, ověřena sekvenací.

Výsledky klonální analýzy metodou MLVA rámcově velmi dobře odpovídaly klonálním charakteristikám určeným metodou MLST a dobře odpovídaly též typovým charakteristikám určeným mPCR genotypizací.

ZÁVĚR

Pro klonální charakterizaci izolátů *S pneumoniae* jsme v NRL zavedli a ověřili metodu analýzy MLVA. Metoda poskytuje rozlišení srovnatelné s metodou MLST užívanou globálně jako standardní. Oproti sekvenční metodě MLST je provedení metody MLVA podstatně metodicky jednodušší, uživatelsky snazší a méně pracné, získání výsledků je rychlejší, je i méně nákladné. Obdobně jako u metody MLST je i pro metodu MLVA dostupné webové rozhraní pro uživatelské určení klonální typové charakteristiky. I přes dílčí výhody metody MLVA se tento přístup klonální analýzy pneumokokových izolátů nestal v referenčních laboratořích prioritním – tím zůstává metoda MLST, v současnosti přecházející k provedení v celogenomovém rozsahu poskytujícím jemnější rozlišení. Metodu MLVA lze vhodně použít například pro časově zrychlené zjišťování klonální příbuznosti u izolátů z epidemiologických situací lokálního charakteru, u ohniskového výskytu infekce či porovnání kmenů od pacienta a kontaktních osob.

Poděkování

Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. 15-34887A. Veškerá práva podle předpisů na ochranu duševního vlastnictví jsou vyhrazena.

Autoři děkují všem kolegům, kteří odesílají izoláty *Streptococcus pneumoniae* do NRL pro streptokokové nákazy.

LITERATURA

1. Nová metoda a schéma typizace *Streptococcus pneumoniae*. Vacková Z, Klímová M, Kozáková J. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 2013; 62: 50–58.
2. Enright MC, Spratt BG. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology*, 1998; 144: 3049–60.
3. Elberse KEM, Nunes S, Sa Leao R, van der Heide HGJ, *et al.* Multiple-locus variable number tandem repeat analysis for *Streptococcus pneumoniae*: comparison with PFGE and MLST. *PLoS One*, 2011; 6: e19668. doi: 10.1371/journal.pone.0019668.
4. Koeck J, Nanjanpop-Lafourcade B, Cade S, *et al.* Evaluation and selection of tandem repeat loci for *Streptococcus pneumoniae* MLVA strain typing. *BMC Microbiol*, 2005; 5: 66–74.
5. Pichon B, Moyce L, Sheppard C, Slack M, *et al.* Molecular typing of pneumococci for investigation of linked cases of invasive pneumococcal disease. *J Clin Microbiol*, 2010; 48: 1926–1928.
6. Pinto TC, Souza AR, de Pina SE, Costa NS, *et al.* Phenotypic and molecular characterization of optochin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Brazil, with description of five novel mutations in the ATPC gene. *J Clin Microbiol*, 2013; 51: 3242–3249.
7. dostupné na: <https://mlva.net/spneumoniae/>
8. Martin B, Humbert O, Camara M, Guenzi E, *et al.* A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res*, 1992; 20: 3479–83.

Jana Kozáková
Martin Musílek
Zuzana Okonji
Oddělení vzdušných bakteriálních nákaz
CEM SZÚ