

Rozšíření metodik v NRL pro hemofilové nákazy o molekulární real-time PCR

A molecular real-time PCR test newly implemented in the NRL for *Haemophilus* Infections

Zuzana Okonji, Věra Lebedová, Jana Kozáková

Souhrn • Summary

Bakterie *Haemophilus influenzae* se vyskytuje v opouzdřených či neopouzdřených variantách. Na podkladě kapsulárního antigenu lze rozlišit 6 typů a-f, neopouzdřené kmeny se označují jako netypovatelné NT. K typizaci lze kromě již zavedených klasických a molekulárních metod využít i nově zavedenou molekulární metodu rt-PCR.

The bacterium Haemophilus influenzae is found in both capsulated and non-capsulated variants. Based on the capsular antigen, six types, a-f, can be differentiated, and non-capsulated strains are referred to as non-typeable, NT. Apart from the conventional and molecular typing methods, a newly implemented molecular method, rt-PCR, can also be used for typing.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2018; 27(11-12): 286–287

Klíčová slova: *Haemophilus influenzae*, rt-PCR, typizace *Haemophilus influenzae*
Keywords: *Haemophilus influenzae*, rt-PCR, *Haemophilus influenzae* typing

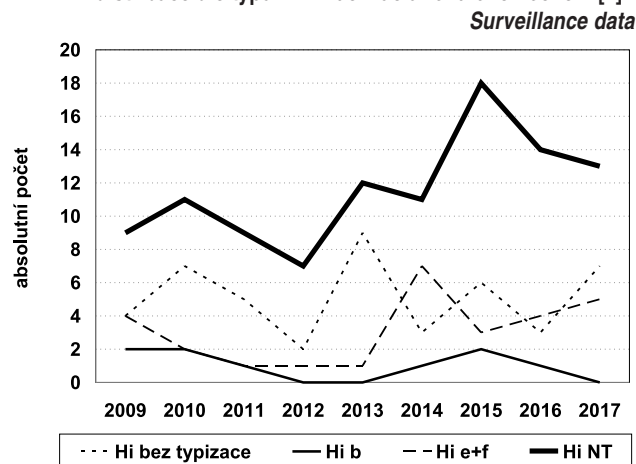
ÚVOD

Haemophilus influenzae je gramnegativní, nepohyblivá, nesporulující, opouzdřená či neopouzdřená bakterie, kterou lze dle kapsulárního antigenu rozlišit na 6 typů a-f. Z klinického pohledu umí kolonizovat zdravé jedince, ale také způsobovat závažná invazivní hemofilová onemocnění (meningitida, sepse, pneumonie, epiglotitida, artritida). Jedná se o typického humánního patogena.

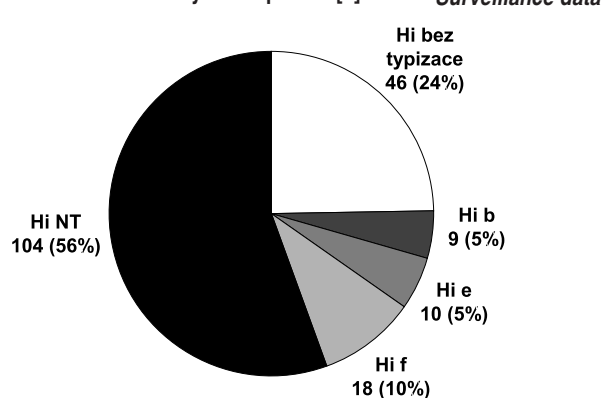
V České republice probíhá již od roku 1999 celorepublikový program aktivní surveillace závažných onemocnění způsobených *Haemophilus influenzae* b (Hib). Tento program byl roku 2008 rozšířen i na sledování závažných onemocnění způsobených *Haemophilus influenzae* „non-b“. Jedná se o opouzdřené kmeny *H. influenzae* a, c, d, e, f a neopouzdřené kmeny tzv. netypovatelné NT (HiNT). Aktuální databáze aktivní surveillace se skládá ze tří složek: EPIDAT/ISIN, databáze NRL pro hemofilové nákazy a databáze klinických vzorků vyšetřených metodou real-time PCR (rt-PCR) v Oddělení bakteriálních vzdušných nákaz.

V červenci roku 2001 bylo v ČR zavedeno plošné očkování proti Hib dětí do 1 roku věku, což vedlo k dramatickému poklesu incidence závažných hemofilových onemocnění způsobených Hib. V posledních letech se incidence závažných forem onemocnění způsobených *H. influenzae* pohybuje v rozmezí 0,1-0,28/100 000 obyvatel [1]. Nicméně došlo ke změně výskytu typů viz Graf 1. V prevakcinační éře bylo maximum výskytu Hib, ovšem nyní je hlavním původcem HiNT, ale každoročně jsou izolovány například i Hif či Hie viz Graf 2. Je třeba proto používat kvalitní diagnostiku, která umí nejenom identifikovat *H. influenzae*, ale také odlišit jeho jednotlivé typy (a-f, NT), k čemuž kromě klasických metod mohou sloužit i metody molekulární.

Graf 1: INVAZIVNÍ ONEMOCNĚNÍ *H. INFLUENZAE*, ČR, 2009–2017 – distribuce dle typu *H. Influenzae* a roku onemocnění [1]



Graf 2: INVAZIVNÍ ONEMOCNĚNÍ *H. INFLUENZAE*, ČR, 2009–2017 – distribuce typů *H. Influenzae* ve všech věkových skupinách [1]



METODIKA

NRL pro hemofilové nákazy (NRL/HEM) využívá běžně k identifikaci kmenů *H. influenzae* kulturační a biochemické testy. Identifikace kapsulárních antigenů *H. influenzae* se

provádí pomocí sklíčkové aglutinace. Vybrané kmeny jsou ověřovány také pomocí metody PCR s gelovou elektroforézou a podrobeny MLST sekvenaci.

Dále se již od roku 2003 v oddělení bakteriálních vzdušných nákaz provádí vyšetření primárně sterilních klinických vzorků při podezření na invazivní hemofilové onemocnění [2, 3]. Využívá se metoda rt-PCR s cílenou detekcí genu *hpd* kódující protein *D H. influenzae* [4]. Jedná se o gen přítomný v genomu opouzdřených i neopouzdřených *H. influenzae*.

Nově NRL/HEM nabízí metodu rt-PCR i k typizaci *H. influenzae*, primárně pro klinické bezkultivační vzorky, kde byla tato bakterie potvrzena. Samozřejmě lze tuto metodu využít v případě potřeby i pro verifikaci kmenů. Metoda je navržena dle aktuálního CDC doporučení [5]. Identifikace se provádí analýzou *cap* lokusu pomocí genů: *Hia acsB*, *Hib bcsB*, *Hic ccsD*, *Hid dcsE*, *Hie ecsH*, *Hif bexD*. V případě negativity všech typů se *H. influenzae* považuje za netypovatelný HiNT.

Nyní je možné zasílat do NRL/HEM kromě kultivačních vzorků i nekultivační ve formě primárně sterilních klinických vzorků (hl. likvor, krev, sérum, punktát) či izolované DNA z nich. Požadované množství materiálu pro typizaci *H. influenzae* metodou rt-PCR je minimálně 0,2–0,5 ml klinického materiálu či 75–100 µl izolované DNA. Klinický materiál je možné odebrat i po zahájení antibiotické terapie, což je jednou z výhod těchto molekulárních metod. Ideální je odesílat materiál ihned po odběru, jinak skladovat krátkodobě (do 24 hod) při teplotě 2–8 °C, déle zamražený při -70 °C. Transport DNA a likvoru nejlépe zamražený na obyčejném či suchém ledu, ostatní materiály chlazené nebo při pokojové teplotě.

ZÁVĚR

Díky rychlosti, jednoduchosti a citlivosti je molekulární metoda rt-PCR velice výhodnou variantou pro vyšetření klinických vzorků, která umožňuje *H. influenzae* nejen identifikovat, ale také typizovat.

LITERATURA

1. Lebedová V, Šebestová H, Křížová P. Závažná onemocnění způsobená *Haemophilus influenzae* v České republice v období 2009–2017. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*, 2018; 27(3–4): 83–90.
2. Vacková Z, Kozáková J, Křížová P, Lebedová V. 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. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*, 2015, 24(2), 102–104.
3. Kozáková J. Informace z NRL a odborných pracovišť CEM, Informace Oddělení bakteriálních vzdušných nákaz CEM SZÚ. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*, 2014; 23(2): 51.
4. Vacková Z, Lžičařová D, Stock NK, Kozáková J. Detekce DNA *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus pneumoniae* v klinickém materiálu metodou real-time PCR. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*. 2015, 64(4), 222–230.
5. <https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt10-pcr.html>

Mgr. Zuzana Okonji
MUDr. Věra Lebedová
MUDr. Jana Kozáková
Oddělení bakteriálních vzdušných nákaz
CEM, SZÚ