

Zastosowanie metod PCR i FISH w szybkiej diagnostyce bakteryjnych zakażeń krwi

Use of PCR and FISH methods for rapid identification of bacterial bloodstream infections

Tomasz Gosiewski, Agata Pietrzyk, Monika Brzychczy-Włoch, Piotr B. Heczko

STRESZCZENIE

Katedra Mikrobiologii
Collegium Medicum
Uniwersytetu Jagiellońskiego
w Krakowie

WSTĘP

Celem pracy była ocena możliwości zastosowania metod PCR i FISH w szybkiej diagnostyce bakteryjnych zakażeń krwi.

MATERIAŁ I METODY

Analizie poddano 56 próbek: 28 próbek krwi żyłnej i 28 próbek podłoży hodowlanych. Wszystkie próbki krwi pochodziły od pacjentów z klinicznymi objawami sepsy, diagnozowanych w Pracowni Diagnostyki Mikrobiologicznej Katedry Mikrobiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Pobrane próbki krwi badano na obecność bakterii, równolegle w systemie hodowli monitorowanej BACTEC oraz za pomocą metod PCR (*polymerase chain reaction*) i FISH (*fluorescent in situ hybridization*). Dodatkowo, każdą butelkę z podłożem poddawano analizie za pomocą metody FISH. Izolację DNA prowadzono przy użyciu zestawu QIAamp DNA Blood Mini. W celu usunięcia inhibitorów PCR wprowadzono etap oczyszczania próbek chlorkiem amonu. Do reakcji PCR wykorzystano parę starterów 16SrRNA(+) i 16SrRNA(-) umożliwiającą wykrycie wszystkich gatunków bakterii. W metodzie FISH wykorzystano sondę EUB338 swoistą dla wszystkich gatunków bakterii oraz sondy swoiste dla *Enterobacteriaceae* (ENT183) i rodzaju *Staphylococcus* (STA).

ADRES

DO KORESPONDENCJI:

Dr n. med. Tomasz Gosiewski
Katedra Mikrobiologii
Collegium Medicum
Uniwersytetu Jagiellońskiego
ul. Czysza 18
31-121 Kraków
tel. 12 633 08 77 w 225; fax 12 423 39 24
e-mail: tgosiews@cm-uj.krakow.pl

WYNIKI

Odsetek wyników dodatnich dla próbek krwi żyłnej wynosił: 71,4%, 28,6% i 10,7% odpowiednio dla PCR, FISH i BACTEC. Różnice między wynikami uzyskanymi za pomocą metod PCR i FISH oraz PCR i BACTEC były statystycznie istotne. W przypadku analizy próbek podłoży hodowlanych, odsetek wyników dodatnich dla metody FISH wynosił 58,3%, natomiast dla metody hodowlanej 33,3%. Różnica ta nie była statystycznie istotna. Czas potrzebny do uzyskania wyników badań prowadzonych za pomocą metod PCR i FISH wynosił około 4–5 godzin. Amplifikacja DNA była możliwa jedynie dla próbek krwi poddanych dodatkowo wstępnej

procedurze oczyszczania i przepłukiwania osadu komórkowego. W pozostałych przypadkach obserwowano efekt inhibicji.

WNIOSKI

Uzyskane wyniki wykazały, że metody PCR i FISH pozwalają na wykrycie obecności bakterii w próbkach pełnej krwi, są bardziej czułe od metody hodowlanej, skracają czas oczekiwania na wynik do kilku godzin, zaś reakcja amplifikacji wymaga zastosowania dodatkowej procedury oczyszczania próbek krwi.

SŁOWA KLUCZOWE

diagnostyka sepsy, hodowla krwi, PCR, inhibicja PCR, FISH

ABSTRACT

INTRODUCTION

The aim of this study was to evaluate the possibility of applying PCR and FISH methods in rapid diagnostics of bacterial bloodstream infections.

MATERIAL AND METHODS

56 samples: 28 venous blood samples and 28 samples of culture media from BACTEC machine after incubation cycle were tested. All blood samples originated from patients with clinical symptoms of sepsis who were diagnosed in the Laboratory of Microbiological Diagnostics at the Chair of Microbiology Medical College Jagiellonian University in Krakow. The blood samples were tested to presence of bacteria in parallel, using PCR, FISH and culture monitored BACTEC system. Additionally, each bottle with medium was analyzed by FISH method. DNA was extracted with QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen). To remove PCR inhibitors the step of samples purification with ammonium chloride was added. For PCR reaction a pair of 16SrRNA(+) and 16SrRNA(-) starters which enables detection of all bacteria species was applied. In FISH method a probe specific to all bacteria species EUB338 and probes specific to *Enterobacteriaceae* (ENT183) and *Staphylococcus* genus (STA) were used.

RESULTS

Percentage of positive venous blood samples for PCR, FISH and BACTEC was: 71.4%, 28.6% and 10.7%, respectively. The differences between results obtained by PCR and FISH methods and by PCR and BACTEC were statistically significant. In case of culture media samples analysis a percentage of positive results for FISH was 58.3%, while for culture method 33.3%. This difference was not statistically significant. The time needed to receive a results of samples examination using PCR and FISH methods was about 4–5 hours. DNA amplification was obtainable only for these blood samples which were in addition initially purified, and special cellular sediment washing procedure was used. For unpurified samples inhibition effect was noted.

Conclusions

Results obtained by us indicated that PCR and FISH methods: allow to detect bacteria in whole blood samples, are much more sensitive than culture method, shorten waiting time for results to few hours and that the use of additional procedure of blood samples purification is needed to receive a positive result of amplification.

KEY WORDS

diagnostics of sepsis, blood culture, PCR, PCR inhibition, FISH

WSTĘP

Zakażenia wywoływane przez bakterie i grzyby od zawsze stanowiły poważny problem medyczny. Najgroźniejszym z nich jest zakażenie ogólnoustrojowe, czyli sepsa, określane także mianem posocznicy. Mimo postępów w jej leczeniu, osiągniętych głównie dzięki zastosowaniu antybiotykoterapii oraz wprowadzeniu do praktyki medycznej technologii pozwalających na długotrwałe podtrzymywanie czynności życiowych u pacjentów znajdujących się w stanie krytycznym, nadal nie udaje się utrzymać przy życiu wielu chorych. Paradoksalnie, w miarę rozwoju wiedzy medycznej i wprowadzania do leczenia coraz nowszych procedur terapeutycznych, zapadalność na sepsę się zwiększa. Lever i wsp. donoszą, że w USA w ciągu roku zapada na nią 750 tys. osób i jest ona przyczyną ponad 215 tys. zgonów [1]. W Unii Europejskiej z powodu ciężkiej sepsy umiera rocznie 146 tys. chorych. W samej tylko Wielkiej Brytanii śmiertelność z tego powodu waha się w przedziale 30–50/100 tys. w ciągu roku, co plasuje sepsę w czołówce dziesięciu najczęstszych przyczyn zgonów [2]. W krajach rozwiniętych sepsa rozwija się u 2–4/1000 żywo urodzonych dzieci, stając się główną przyczyną ich śmierci [3,4]. W Polsce brak dokładnych danych epidemiologicznych, ale Zieliński i wsp. podają, że w 2005 r. z powodu sepsy nastąpiło 967 zgonów, w tym 43 zgony dzieci [5]. Zwiększająca się śmiertelność z powodu posocznicy jest skutkiem narastającej oporności na antybiotyki, stosowania inwazyjnych metod leczenia oraz starzenia się społeczeństwa. Sepsa jest największym zagrożeniem dla osób z obniżoną odpornością, zwłaszcza kiedy są one długotrwałe hospitalizowane na oddziałach intensywnej opieki medycznej. Dotyka ona przede wszystkim pacjentów ze schorzeniami nowotworowymi, poddawanych immunosupresji, chorych oparzonych, osób w podeszłym wieku oraz dzieci [3,6].

W leczeniu zakażeń krwi najważniejszym i najtrudniejszym problemem decydującym o skuteczności terapii, a w konsekwencji o kosztach i czasie hospitalizacji jest skuteczna diagnostyka czynników wywołujących ogólnoustrojową odpowiedź zapalną w przebiegu sepsy. Oznaczenie czynnika etiologicznego pozwala na zastosowanie skutecznej, celowanej antybiotykoterapii. Materiałem poddawanym badaniu diagnostycznemu jest krew pobrana

od pacjenta manifestującego objawy kliniczne sepsy, takie jak: tachykardia, bradykardia, podwyższona lub obniżona ciepłota ciała, spadek ciśnienia tętniczego krwi i inne. Do tej pory tzw. złotym standardem diagnostycznym są hodowle krwi prowadzone na specjalnych podłożach, w systemach hodowli automatycznej, np. BACTEC (Becton Dickinson). Do zalet tych metod należy ich prostota oraz względnie niski koszt wykonania badania. Słabą stroną metody opartej na hodowli krwi jest natomiast jej czasochłonność, sięgająca nawet 5 dni (do czasu wydania wyniku badania) oraz niska czułość, która powoduje, że jedynie w około 15–20% hodowli udaje się uzyskać wzrost mikroorganizmów [5,7].

Wynika z tego, że w zdecydowanej większości przypadków lekarz może stosować jedynie antybiotykoterapię empiryczną z powodu braku uzyskania wzrostu mikroorganizmów odpowiedzialnych za infekcję. Sytuację dodatkowo pogarsza fakt poddawania pacjentów antybiotykoterapii przed pobraniem próbek krwi na posiew. Chorzy są często leczeni antybiotykami, zanim dochodzi do manifestacji objawów sepsy. Hodowle krwi w takim wypadku są bardzo utrudnione, z uwagi na to, iż znajdują się w niej antybiotyki, które hamują wzrost mikroorganizmów. Aby zwiększyć szansę na wykrycie czynników mikrobiologicznych we krwi, podejmowane są próby oparcia ich detekcji na metodach serologicznych, np. na wykrywaniu lipopolisacharydu (LPS) bakterii Gram-ujemnych czy galaktomannanu grzybów [8,9].

Innym celem molekularnym, który rokuje o wiele większe nadzieje na skuteczną, precyzyjną i szybką diagnostykę zakażeń krwi są kwasy nukleinowe drobnoustrojów będących czynnikami etiologicznymi infekcji. Zarówno DNA, jak i RNA każdego organizmu zawierają unikalne dla niego sekwencje, stanowiące swoisty „odcisk palca”. Dzięki znajomości tych sekwencji możliwe jest zastosowanie metod biologii molekularnej, takich jak PCR czy hybrydyzacja do oznaczania obecności mikroorganizmów we krwi. W literaturze można znaleźć doniesienia na ten temat, jednak – jak dotąd – metody hodowlane (mimo ich ograniczeń) są nadal powszechnie stosowane jako podstawowe i najczęściej jedyne badanie mikrobiologiczne krwi. Krew jako materiał do badań mikrobiologicznych stawia największe wyzwania spośród wszystkich materiałów biologicznych. Największą trudność sprawia to, że mikroorganizmy odpowiedzialne za zaka-

zenie znajdują się we krwi w bardzo małych ilościach lub też następuje tylko ich okresowy wysiew do krwi.

Czułość metod molekularnych znacznie przewyższa czułość metody hodowlanej. Poza tym wcześniejsze zastosowanie antybiotykoterapii nie wpływa na wynik badania, z uwagi na to, że nie ma potrzeby uzyskania wzrostu bakterii czy grzybów na podłożu hodowlanym, a konieczne jest jedynie wykrycie ich sekwencji DNA czy RNA [10]. Jednakże metody biologii molekularnej również napotykały trudności podczas prowadzenia diagnostyki mikrobiologicznej krwi. Krew w swoim składzie zawiera m.in. hem i laktoferynę, które są bardzo silnymi inhibitorami enzymów polimeraz DNA używanych w metodzie PCR [11]. Hem powoduje oddysocjowywanie DNA od polimerazy (rozpad kompleksu enzym – substrat), a także blokuje kieszeń katalityczną enzymu. Ponadto krew zawiera w swoim składzie różnego rodzaju enzymy proteolityczne mogące degradować polimerazę DNA oraz nukleolityczne, które degradują łańcuchy DNA i RNA będące właściwym materiałem diagnostycznym. Bardzo ważnym inhibitorem jest także EDTA dodawane do krwi jako antykoagulant, który ma zdolność helatowania jonów magnezu, niezbędnych do optymalnego działania enzymu polimerazy. Większość dostępnych procedur preparatyki krwi nie pozwala na pozbycie się efektu inhibicji polimeraz, co w konsekwencji prowadzi do uzyskania wyniku fałszywie negatywnego [12].

Celem pracy była ocena możliwości wykorzystania procedur biologii molekularnej, opartych na metodzie PCR (*polymerase chain reaction*) i fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ, w skrócie FISH (*fluorescent in situ hybridization*), które mogłyby znaleźć zastosowanie w szybkiej (trwającej kilka godzin) mikrobiologicznej diagnostyce molekularnej próbek krwi pobranej od pacjentów z klinicznymi objawami sepsy.

MATERIAŁ I METODY

Analizie poddano 56 próbek: 28 krwi żyłnej i 28 podłoży hodowlanych. Wszystkie próbki krwi pochodziły od pacjentów z klinicznymi objawami sepsy (ale jeszcze przed potwierdzeniem mikrobiologicznym), diagnozowanych w Pracowni Diagnostyki Mikrobiologicznej

Katedry Mikrobiologii CM UJ w Krakowie. Próbkę krwi pobierano natychmiast po wystąpieniu objawów klinicznych sugerujących sepsę, takich jak: wzrost albo obniżenie temperatury ciała ($> 38^{\circ}\text{C}$ lub $< 36^{\circ}\text{C}$), tachykardia ($\geq 90/\text{min}$), przyśpieszenie oddechu ($\geq 20/\text{min}$) oraz zmiana liczby leukocytów we krwi obwodowej ($< 4000/\mu\text{l}$ albo $> 12\ 000/\mu\text{l}$ lub $> 10\%$ niedojrzałych form granulocytów), zgodnie z zaleceniami dotyczącymi diagnostyki sepsy, czyli przede wszystkim w okolicach szczytu gorączki. Badania uzyskały akceptację Komisji Bioetycznej UJ (KBET/94/B/2009).

HODOWLA BAKTERII

Próbki krwi były podawane rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej w systemie hodowli monitorowanej BACTEC 9050 (BectonDickinson) oraz za pomocą metod PCR i FISH. Krew pobraną od pacjentów posiewano do odpowiednich podłoży przeznaczonych do hodowli bakterii tlenowych (Plus Aerobic/F+, BectonDickinson) i beztlenowych (Anaerobic/F, BectonDickinson). W przypadku wyhodowania bakterii próbkę poddawano klasycznej diagnostyce mikrobiologicznej wraz z oznaczeniem antybiotykooporności. Dodatkowo każdą butelkę z podłożem hodowlanym poddawano analizie metodą FISH, niezależnie od tego, czy wynik hodowli w aparacie BACTEC był pozytywny, czy negatywny. Równolegle w celu wykonania badań molekularnych pobierano 2 ml krwi do próbek Vacutainer K₃E (BectonDickinson).

Aby wyznaczyć czułość metod PCR i FISH, pobierano próbki krwi od ochotników, bez klinicznych objawów sepsy lub innej infekcji, do których dodano bakterie *E. coli* ATCC 25922, uzyskując szereg o malejącym gradiencie gęstości, obejmujący wartości od 10^6 do 10^1 cfu/ml (*colony forming unit* – jednostki tworzące kolonie). Następnie każdą próbkę z szeregu rozcieńczeń poddawano badaniu za pomocą metod PCR i FISH, aby wyznaczyć graniczną czułość obu metod.

IZOLACJA DNA Z KRWI

Całość izolacji DNA przeprowadzano pod nawiewem laminarnym, aby uniknąć kontaminacji. Metoda PCR wymagała wykorzystania izolatu DNA uzyskanego z krwi. Korek próbki Vacutainer opalano nad płomieniem palnika gazowego. Następnie strzykawką za-

opatrzoną w igłę pobierano 200 µl krwi i izolowano DNA za pomocą zestawu QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen). Zastosowano także procedurę izolacji rozszerzoną o etap lizy erytrocytów i usuwania hemoglobiny z próbek. W tym celu pobierano z probówki Vacutainer 200 µl krwi i wlewano ją do 800 µl 0,17 M świeżo przygotowanego lub mrożonego chlorku amonu (ICN Biomedicals). Mieszaninę inkubowano w 37°C w termobloku przez 20 min w celu rozbicia erytrocytów. Następnie próbkę wirowano przez 5 min przy 8500 x g w wirówce. Pipetą odrzucano nadsącz, osad zaś zawieszano w 1 ml jałowej wody i ponownie wirowano w tych samych warunkach. Płukanie i wirowanie powtarzano jeszcze dwukrotnie lub do momentu, aż pelet przybrał barwę bladoróżową. Z otrzymanego osadu, zawierającego leukocyty i ewentualnie komórki bakteryjne, izolowano DNA, wykorzystując zestaw do izolacji DNA QIAamp DNA Blood Mini Kit. Izolację przeprowadzono zgodnie z protokołem załączonym przez producenta zestawu. Analogicznie postępowano z próbkami płynu z butelek po zakończonej inkubacji w aparacie BACTEC 9050.

Każdy izolat DNA poddawano pomiarowi stężenia oraz czystości uzyskanego kwasu deoksyrybonukleinowego. Zastosowano metodę spektrofotometryczną oraz aparat NanoDrop (Thermo Scientific), za pomocą którego dokonywano pomiaru absorbancji próbki DNA w objętości 2 µl przy długości fali 260 nm i 280 nm. Oprogramowanie komputerowe samodzielnie wyliczało stężenie DNA wyrażone w [ng/µl] oraz czystość próbki jako stosunek wartości absorbancji 260 nm do 280 nm.

AMPLIFIKACJA METODĄ PCR

Mieszaninę reakcyjną sporządzano w objętości 25 µl. W jej skład wchodziły (wszystkie składniki z firmy DNA Gdańsk): 3,0 mM MgCl₂; 1x bufor do polimerazy *Delta 2*; woda; 0,5U polimerazy *Delta 2*; 100 µM każdego dNTP; po 10 µM starterów [13]: 16S rRNA(-)5' – GGA CTA CCA GGG TAT CTA AT – 3' i 16S rRNA(+) 5' – AGT TTG ATC CTG GCT CAG – 3'; 1,5 µl matrycy DNA. Przygotowane próbki umieszczono w termocyklerze PTC-200 (BioRad) i amplifikowano zgodnie z profilem termicznym [14]: 95°C przez 3 min; (95°C przez 45 sek; 59,3°C przez 45 sek; 72°C przez 1 min) x 30; 72°C przez 5 min. Następnie próbki poddawano rozdziałowi elektroforetycznemu w 1% aga-

rozcie (Prona) przy 5V/cm. Zastosowane startery pozwalały na uzyskanie produktu PCR o długości 798 pz. Kontrolę pozytywną reakcji PCR stanowiło DNA wyizolowane z krwi, do której uprzednio dodano bakterie *E. coli* ATCC 25922, natomiast kontrolą negatywną było DNA wyizolowane z próbki krwi od pacjenta bez klinicznych objawów sepsy lub innej infekcji.

HYBRYDYZACJA IN SITU FISH

Z probówki Vacutainer pobierano w komorze laminarnej 200 µl krwi. Następnie próbkę poddawano preparatyce jak do izolacji DNA, do momentu uzyskania bladoróżowego osadu. Analogicznie postępowano z próbkami płynu z butelek po zakończonej inkubacji w aparacie BACTEC 9050. Osad zawieszano w 20 µl jałowej, dejonizowanej wody, z czego 10 µl наносzono pipetą na powierzchnię szkiełka mikroskopowego do hybrydyzacji SuperFrost®Plus (Menzel–Glaser), aby uzyskać rozmaz o średnicy około 10 mm. Preparat suszono pod nawiewem laminarnym, a następnie zalewano 500 µl roztworu 4% paraformaldehydu (Sigma) i umieszczano na okres 20 min w temperaturze 4°C. Następnie preparat przepłukiwano PBS i zalewano 1–2 ml 96% metanolu (POCH). Całość przetrzymywano pod przykryciem przez 15 min w temperaturze 20°C.

Po zakończonym procesie utrwalania metanol odpłukiwano ciepłym (37°C) PBS i наносzono na preparat 20 µl rozcieńczonego roztworu lizozymu (1 mg/ml) (Sigma) z lizostafiną (0,05 mg/ml) (Sigma). Całość inkubowano przez 5 min w temperaturze 37°C, a następnie dwukrotnie płukano jałową wodą destylowaną. Hybrydyzację przeprowadzano przy użyciu znakowanych fluorochromami na 5' końcach, jednołańcuchowych sond oligonukleotydowych (Genomed) komplementarnych do konserwatywnego fragmentu 16S rRNA typowego dla danego rodzaju bakterii. Dla rodzaju *Staphylococcus* stosowano sondę STA: (CY3-5' – TCC TCC ATA TCT CTG CGC 3') [15], dla *Enterobacteriaceae* sondę ENT183: (CY3-5' – CTC TTT GGT CTT GCG ACG- 3') [16], zaś dla wykrycia wszystkich gatunków bakterii łącznie, sondę EUB338: (FITC-5' – GCT GCC TCC CGT AGG AGT – 3'-FITC) (17). Ponadto użyto barwnik DAPI (Sigma) wykazujący powinowactwo do DNA komórkowego.

W celu przeprowadzenia hybrydyzacji zmieszano po 5 μ l roztworu (50 ng/ μ l) sond EUB338 oraz STA lub ENT183 z 40 μ l buforu do hybrydyzacji: 20 mM Tris HCl pH 7,2 (Sigma); 0,9 M NaCl (Serva); 0,1% SDS (Serva) ogrzanego do temperatury około 50°C. Gotowy roztwór (50 μ l) nanoszono na preparat za pomocą pipety automatycznej i całość umieszczano w wilgotnej komorze osłoniętej folią aluminiową na 2 h w temperaturze 50°C. Następnie odpłukiwano sondę ciepłym buforem płuczającym, o takim samym składzie jak bufor do hybrydyzacji, ale bez dodatku 0,1% SDS i dobarwiano preparat roztworem DAPI; 50 μ l (5 μ l DAPI i 45 μ l wody jałowej, destylowanej) przez 3 min w temperaturze pokojowej. Wybarwiony preparat dokładnie płukano jałową, destylowaną wodą i suszono w ciemności. Preparat analizowano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego BX51 (Olympus) wyposażonego w obiektyw immersyjny 100x (Olympus) z lampą UV (Olympus) oraz kamerą F – View (Olympus). Uzyskany obraz analizowano za pomocą programu komputerowego AnalySYS (Soft Imaging).

METODY STATYSTYCZNE

Do analizy statystycznej wykorzystano test dokładny Fishera, dwustronny.

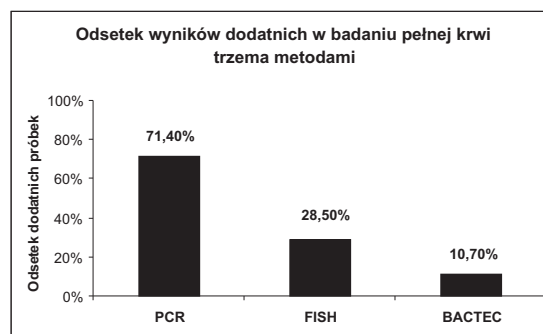
WYNIKI

Wszystkie wyizolowane próbki DNA poddano pomiarowi stężenia i czystości. Otrzymane stężenia zawierały się w przedziale 95,5–151,8 ng/ μ l, zaś czystość izolatów w przedziale 1,65–2,05.

Z badanych próbek krwi izolowano DNA metodą bez wstępnego oczyszczania z hemoglobiny oraz równoległe metodą z wstępną lizą erytrocytów w chlorku amonu. Reakcje PCR udało się przeprowadzić jedynie na próbkach DNA wyizolowanych z krwi poddanej wstępnej procedurze oczyszczania chlorkiem amonu i przepłukiwaniem osadu komórkowego. Podobnie nie udało się uzyskać żadnych dodatnich wyników w reakcji PCR przeprowadzonej na izolatach DNA uzyskanych z podłoża po hodowli w aparacie BACTEC. Dzięki oczyszczeniu próbek z hemoglobiny otrzymano dobrej jakości, wyraźny obraz mikroskopowy bez tła autofluorescencji (ryc. 2).

Metoda PCR pozwoliła wykryć we krwi już 6×10^1 cfu/ml bakterii z rodzaju *E. coli*, natomiast metoda FISH 6×10^3 cfu/ml komórek bakteryjnych. Wyniki te uznano za czułość obu metod molekularnych.

Zaobserwowano, że w przypadku badania próbek krwi żyłnej pobranych od pacjentów odsetek wyników pozytywnych wynosił: 71,4%, 28,6% i 10,7% odpowiednio dla PCR, FISH i BACTEC (ryc. 1).



Ryc. 1. Zestawienie wyników badania pełnej krwi pochodzącej od pacjentów z klinicznymi objawami sepsy za pomocą trzech metod badawczych.

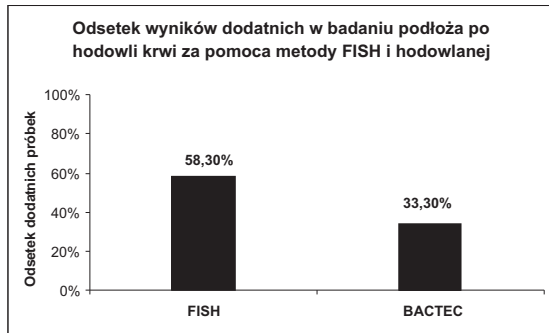
Fig. 1. Comparison of the results of whole blood samples originated from patients with clinical sepsis symptoms by three searching methods.



Ryc. 2. Zdjęcie z mikroskopu fluorescencyjnego uzyskane metodą FISH na pełnej krwi żyłnej. Widoczne bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* – zastosowano sondę ENT183; powiększenie 1000 x.

Fig. 2. Fluorescent microscopy photography in FISH method from venous whole blood. Bacteria from *Enterobacteriaceae* family are visible – ENT183 probe was used; magnification 1000 x.

Stwierdzono statystycznie istotne różnice między wynikami uzyskanymi metodami PCR i FISH oraz PCR i BACTEC ($p = 0,003$ i $p < 0,001$). Różnica między FISH i BACTEC nie była statystycznie istotna ($p = 0,177$). W przypadku próbek podłoża hodowlanych pochodzących z aparatu BACTEC wykazano, że odsetek wyników pozytywnych dla FISH wynosił 58,3%, natomiast dla BACTEC 33,3%, jednak różnica ta także nie była statystycznie istotna ($p = 0,414$) (ryc. 3).



Ryc. 3. Zestawienie wyników badania podłoża hodowlanego z butelek z aparatu BACTEC po zakończonej inkubacji za pomocą metody FISH i hodowlanej.

Fig. 3. Comparison of the results of the BACTEC medium samples after incubation by FISH and culture methods.

Czas potrzebny do uzyskania wyniku badania przy użyciu metod PCR i FISH wynosił około 4–5 godzin, zaś dla metody posiewu nawet 72 godziny.

DYSKUSJA

Współczesna diagnostyka mikrobiologiczna bakteryjnych zakażeń krwi sprowadza się właściwie tylko do hodowli krwi i dalszej diagnostyki wyhodowanego drobnoustroju. Taki sposób postępowania jest podyktowany z jednej strony ograniczonymi środkami finansowymi przeznaczanymi na badania laboratoryjne, zwłaszcza w krajach rozwijających się, z drugiej zaś brakiem alternatywy stanowiącej odpowiednią przeciwwagę dla metod hodowlanych. Do zalet tych metod należą prostota oraz względnie niski koszt wykonania badania. Słabą stroną metody opartej na hodowli krwi jest natomiast jej czasochłonność, sięgająca nawet 5 dni (do czasu wydania wyniku badania), oraz niska czułość, która powoduje, że jedynie w około 15–20% przypadków uda-

je się uzyskać wzrost mikroorganizmów [5,7]. W naszych badaniach odsetek pozytywnych wyników hodowli krwi wynosił 10,7%. Wydaje się, że dobre rozwiązanie stanowią metody diagnostyczne bazujące na biologii molekularnej, które są z powodzeniem stosowane w laboratoryjnej diagnostyce medycznej, z wyjątkiem molekularnej diagnostyki mikrobiologicznej krwi. Na czoło metod biologii molekularnej użytecznych w mikrobiologicznej diagnostyce medycznej wysuwają się PCR i różnego rodzaju hybrydyzacje kwasów nukleinowych, takie jak FISH.

Krew jako materiał diagnostyczny stanowi bardzo duże wyzwanie dla laboratoriów mikrobiologicznych na całym świecie. Wykrywanie drobnoustrojów we krwi jest bardzo trudne z uwagi na ich zwykle niewielką liczbę, ograniczaną dodatkowo przez zastosowane leczenie antybiotykami. Krew jest tkanką bogatą we wszelkiego rodzaju substancje, które mogą skutecznie uniemożliwić przeprowadzenie badania przy użyciu metod biologii molekularnej, zwłaszcza PCR jest bardzo wrażliwy na wpływ czynników destabilizujących. Najbardziej istotne są substancje blokujące enzym polimerazy DNA, który jest motorem reakcji amplifikacji DNA. Najważniejszy z nich jest hem, ale także immunoglobuliny czy trombocyty [18,19]. Hem powoduje oddysocjowywanie DNA od polimerazy (rozpad kompleksu enzym–substrat), a ponadto blokuje kieszeń katalityczną enzymu. Krew zawiera także enzymy proteolityczne mogące degradować polimerazę DNA oraz nukleolityczne, które degradują łańcuchy DNA i RNA będące właściwym materiałem diagnostycznym. Bardzo ważnym inhibitorem jest także EDTA dodawane do krwi jako antykoagulant, mający zdolność helatowania jonów magnezu niezbędnych do preparatyki próbek krwi.

W celu wyeliminowania efektu inhibicji reakcji PCR stosuje się różne metody. Zazwyczaj polegają one na bardzo dokładnym przepłukiwaniu próbek czy też ich rozcieńczaniu lub dodawaniu do mieszaniny reakcyjnej albuminy wołowej (BSA), glicerolu czy soli nieorganicznych, jak np. $FeCl_3$, które stanowią dla inhibitorów cel alternatywny i zmniejszają ich oddziaływanie na polimerazę DNA [20,21,22]. W przypadku metod hybrydyzacji in situ, a zwłaszcza jej fluorescencyjnej odmiany FISH, preparatyka krwi powoduje powstanie bardzo silnego tła autofluorescencji, które jest generowane przez obecną w próbce hemoglobinę.

Silne świecenie tła, jak i obecność różnego rodzaju białek powoduje z jednej strony trudności w odróżnieniu fluoryzujących komórek bakteryjnych od tła, a z drugiej niespecyficzną hybrydyzację sond do sekwencji 16S rRNA, w konsekwencji zaś zafałszowanie wyników.

W niniejszej pracy zastosowano preparatykę próbek krwi, polegającą na bezpośredniej izolacji DNA z krwi. Mimo uzyskania izolatów DNA, nie udało się przeprowadzić reakcji amplifikacji DNA, najprawdopodobniej na skutek inhibicji enzymu polimerazy przez hem. Dopiero rozszerzona metoda izolacji, polegająca na wstępnej lizie erytrocytów za pomocą chlorku amonu, a następnie na usuwaniu hemoglobiny przez dokładne płukanie próbki jałową wodą destylowaną, pozwoliła na zminimalizowanie ilości hemu w próbkach, co w połączeniu z zastosowaniem specjalistycznego zestawu do izolacji DNA skutkowało uzyskaniem czystych izolatów DNA, niepowodujących zahamowania reakcji amplifikacji. Prawdopodobnie z analogicznych powodów nie udało się uzyskać czystych preparatów DNA izolowanego z butelek po hodowli krwi. Stosowane podłoża były syntetyczne i zawierały substancje hamujące działanie antybiotyków, co zwiększało prawdopodobieństwo wyhodowania drobnoustrojów z krwi, jednak przy okazji najprawdopodobniej mogły one zablokować reakcję PCR.

Wielu autorów wskazuje na możliwość wykorzystania metody FISH do wykrywania bakterii i grzybów w butelkach z podłożami hodowlanymi po zakończeniu cyklu inkubacji w aparatach hodowli automatycznej, choć nie przyspiesza to diagnostyki mikrobiologicznej krwi [23,24]. Wydaje się, że dodatkowe badanie metodą FISH butelek uznanych przez system automatycznej hodowli za jałowe w aparacie BACTEC lub w innym systemie do hodowli krwi powinno podnosić poziom wykrywalności bakterii, jednak w naszych badaniach nie wykazano statystycznie istotnej różnicy między liczbą pozytywnych wyników uzyskanych za pomocą FISH (58,3%) i hodowli (33,3%). W przypadku badania próbek pełnej krwi stwierdzono statystycznie znamiennej różnicę między liczbą pozytywnych wyników uzyskanych metodą FISH i PCR, choć różnica między metodą hodowlaną a FISH nie była już statystycznie istotna ($p = 0,177$) (ryc. 1).

Najwyższy odsetek wyników pozytywnych badania pełnej krwi uzyskano za pomocą PCR (71,4%), następnie za pomocą FISH (28,6%),

a najniższy za pomocą hodowli w aparacie BACTEC (10,7%). Wszystkie dodatnie wyniki z hodowli uzyskały potwierdzenie w metodzie FISH i w PCR, podobnie jak wszystkie dodatnie wyniki z FISH znalazły potwierdzenie w metodzie PCR. Wysoki odsetek wyników pozytywnych uzyskanych w metodzie PCR świadczy o wysokiej jej czułości, istotnie przewyższającej czułość hodowli, ale także czułość metody FISH. Warto podkreślić, że nasze badania koncentrowały się wyłącznie na detekcji bakteryjnych czynników zakażeń krwi i nie uwzględniały grzybów, które też, chociaż rzadziej, mogą być przyczyną sepsy. Możliwe więc, że odsetek wyników dodatnich uzyskanych za pomocą PCR i FISH byłby jeszcze wyższy, gdyby zastosowano dodatkowo startery i sondy ukierunkowane na detekcję tych właśnie drobnoustrojów.

Nasza praca potwierdza możliwość wykorzystania metod molekularnych w szybkiej diagnostyce bakteryjnych zakażeń krwi. Uzyskane wyniki są na tyle obiecujące, że skłaniają do rozszerzenia badań i opracowania bardziej precyzyjnych narzędzi umożliwiających równoczesną identyfikację różnych gatunków bakterii we krwi oraz grzybów, a także detekcję mechanizmów oporności na antybiotyki. Dopiero to pozwoli na skuteczną diagnostykę molekularną sepsy.

WNIOSKI

1. Metody molekularne PCR i FISH pozwalają na wykrycie komórek bakteryjnych w pełnej krwi.
2. Zastosowanie metod molekularnych skracza czas oczekiwania na wynik do kilku godzin, natomiast w przypadku zautomatyzowanego systemu do hodowli krwi typu BACTEC czas ten sięga nawet kilku dni.
3. Wykorzystanie metody FISH do detekcji bakterii w próbkach podłoży uzyskanych po hodowli krwi zwiększyło odsetek wyników pozytywnych w porównaniu z metodą hodowlaną, ale różnica ta nie była statystycznie istotna.
4. Reakcja amplifikacji (PCR) jest bardzo czuła, lecz jednocześnie wrażliwa na inhibitory utrudniające jej przebieg, co w przypadku diagnostyki sepsy może oznaczać konieczność wprowadzenia dodatkowego etapu oczyszczania próbek.

Publikacja naukowa finansowana ze środków budżetowych w latach 2010–2013 jako projekt badawczy (N N401 006739).

PIŚMIENNICTWO

1. Lever A., Mackenzie I., Sepsis: definition, epidemiology and diagnosis. *Clinic. Rev.* 2008; 335(27): 879–883.
2. Martin G.S., Mannino D.M., Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 1546–1554.
3. Baltimore R.S. Neonatal sepsis: epidemiology and management. *Paediatr. Drugs* 2003; 5: 723–740.
4. Watson R.S., Carcillo J.A. Scope and epidemiology of pediatric sepsis. *Pediatr. Crit. Care Med.* 2005; 6: 3–5.
5. Zieliński A., Czarkowski M.P. Choroby zakaźne w Polsce w 2005 roku. *Przegl. Epidemiol.* 2007; 61: 177–187.
6. Williams M.D., Braun L.A., Cooper L.M., i wsp. Hospitalized cancer patients with severe sepsis: analysis of incidence, mortality and associated costs of care. *Crit. Care* 2004; 8: 291–298.
7. Jamal W., Tamaray G., Pazhoor A., Rotimi V.O. Comparative evaluation of BacT/ALERT 3D and BACTEC systems for the recovery of pathogens causing bloodstream infections. *Med. Princ. Pract.* 2006; 15: 223–227.
8. Alexander B.D. Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. *Transpl. Infect. Dis.* 2004; 4: 32–37.
9. Romaschin A.D., Harris D.M., Ribeiro M.B. i wsp. A rapid assay of endotoxin in whole blood using autologous neutrophil dependent chemiluminescence. *J. Immunol. Methods* 1998; 121: 169–185.
10. Klouche M., Schroder U. Rapid methods for diagnosis of bloodstream infections. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2008; 46: 888–908.
11. Abu Al-Soud P., Randstrom P. Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39: 485–493.
12. Akane A., Matsubara K., Nakamura H. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains a major inhibitor of polymerase chain reaction amplification. *J. Forensic. Sci.* 1994; 37: 362–372.
13. Hryniewiecki T., Gzyl A., Augustynowicz E., Rawaczyńska I. Reakcja amplifikacji bakteryjnego DNA w diagnostyce infekcyjnego zapalenia wsierdza. *Med. Dosw. Mikrobiol.* 2002; 54: 265–272.
14. Kane T., Johannigman J. The Detection of Microbial DNA in the Blood. *Ann. Surg.* 1998; 1: 1–9.
15. Urakawa H., Noble P.A., Fantroussi S.E., Kelly J.J., Stahl D.A. Single-base-pair discrimination of terminal mismatches by using oligonucleotide microarrays and neural network analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68: 235–244.
16. Friedrich U., Van Langenhove H., Altendorf K., Lipski A. Microbial community and physicochemical analysis of an industrial waste gas biofilter and design of 16S rRNA-targeting oligonucleotide probes. *Environ. Microbiol.* 2003; 5: 183–201.
17. Amann R.I., Binder B.J., Olson R.J., Chisholm S.W., Devereux R., Stahl D.A. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990; 56: 1919–1925.
18. Abu Al-Soud W., Rådström P. Capacity of Nine Thermostable DNA Polymerases To Mediate DNA Amplification in the Presence of PCR – Inhibiting Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64: 3748–3753.
19. Banas B., Kost B.P., Goebel F.D. Platelets, a typical source of error in real-time PCR quantification of mitochondrial DNA content in human peripheral blood cells. *Eur. J. Med. Res.* 2004; 9: 371–377.
20. Kreader C. Relief of Amplification Inhibition in PCR with Bovine Serum Albumin or T4 Gene 32 Protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996; 62: 1102–1106.
21. Rådström P., Abu Al-Soud P., Lantz P. A sample preparation method which facilitates detection of bacteria in blood cultures by the polymerase chain reaction. *J. Microbiol. Methods* 1998; 21: 217–224.
22. Michael D., Braida., Laura M., i wsp. Removal of PCR inhibitors from soil DNA by chemical flocculation. *J. Microbiol. Methods* 2003; 52: 389–393.
23. Gescher D.M., Kovacevic D., Schmiel D. i wsp. Fluorescence in situ hybridisation (FISH) accelerates identification of Gram-positive cocci in positive blood cultures. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2008; 19: 51–59.
24. Forrest G.N., Mehta S., Weekes E. i wsp. Impact of rapid in situ hybridization testing on coagulase-negative staphylococci positive blood cultures. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 58: 154–158.