

RYCHLÁ PCR DIAGNOSTIKA INVAZIVNÍHO MENINGOKOKOVÉHO ONEMOCNĚNÍ

MUDr. Jitka Kalmusová

Národní referenční laboratoř pro meningokokové nákazy, Státní zdravotní ústav, Praha

PCR (polymerase chain reaction) diagnostika je určena hlavně pro lékaře na infekčních odděleních, dětských odděleních, JIP a lůžkových ARO. V Národní referenční laboratoři pro meningokokové nákazy je zavedena metoda PCR pro detekci *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus pneumoniae*, která rozšiřuje bezkultivační metody (přímou mikroskopii a latexovou aglutinaci) dosud užívané v diagnostice závažných bakteriálních onemocnění. Tato metoda umožňuje rychlé určení patogena o nízké koncentraci přímo z klinického materiálu.

Klíčová slova: polymerázová řetězová reakce, PCR, rychlá diagnostika.

RAPID PCR DIAGNOSTICS OF INVASIVE MENINGOCOCCAL DISEASE

PCR (polymerase chain reaction) diagnostics is an ideal tool to be used by physicians at departments of infectious diseases, pediatric departments, intensive care units and critical care units of departments of anaesthesiology, resuscitation and intensive care. In National Reference Laboratory for Meningococcal Infections the PCR method has been introduced to detect *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*. The method adds to the non-cultivation methods (direct microscopy, latex agglutination) used in serious infectious diseases diagnostics to date. It makes it possible to directly identify low-concentration pathogens in clinical material.

Key words: polymerase chain reaction, PCR, rapid diagnostics.

V Národní referenční laboratoři (NRL) pro meningokokové nákazy Státního zdravotního ústavu Centra epidemiologie a mikrobiologie je od roku 1999 zavedena a optimalizována polymerázová řetězová reakce (PCR) metoda pro detekci *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus pneumoniae* (1). Tato diagnostika je určena hlavně pro lékaře na infekčních odděleních, dětských odděleních, JIP a lůžkových ARO. PCR metoda významně zrychluje diagnostiku u závažných bakteriálních onemocnění, kde existuje vážné podezření na zmiňovanou etiologii v době, kdy ještě není potvrzen kultivační nález a stav pacienta je vážný. Výhodou této metody je, že lze prokázat bakteriální agens ještě několik dní po zahájení léčby antibiotiky, kdy pokusy o kultivační průkaz mají minimální šanci na úspěch, nebo kde je nasazena antibiotická léčba u obvodního lékaře nebo pediatra, kdy ještě klinické příznaky nejsou dostatečně rozvinuty a stav pacienta se začíná postupně zhoršovat ještě dříve, než je přijat do nemocnice. Antibiotická léčba neovlivňuje pozitivitu PCR, jak se většina lékařů obává u pacientů, u kterých je podána první nebo druhá dávka antibiotika. Proto při suspektním invazivním meningokokovým onemocněním (IMO) je nutno nasadit ATB před hospitalizací, jak to doporučuje standard v předhospitalizační péči (3). Včasná ATB léčba u invazivního meningokokového onemocnění snižuje vysokou smrtnost tohoto onemocnění.

Ve světě nabývá PCR stále širšího uplatnění právě u invazivního meningokokového onemocnění, kde je v řadě zemí aplikována předhospitalizační antibiotická terapie (4). IMO jsou v ČR poměrně málo častá, ale jejich smrtnost je relativně vysoká. K polovině úmrtí dochází do 24 hodin od vzniku prvních klinických příznaků, část nemocných umírá již před přijetím do nemocnice, většinou se jedná o pacienty s meningokokovou sepsí či se septickým šokem. Onemocnění vzniká náhle, většinou u dříve zdravých dětí a mladistvých. Zpočátku je klinický obraz necharakteristický (chřipkové příznaky, horečka, únavnost, bolesti kloubů), už v této fázi se mohou objevit u pacientů s meningokokovou sepsí důležité nebolestivé petechie. Bolesti břicha a průjmy, nepřítomnost meningeálních příznaků a afebrilní průběh nevylučují IMO, naopak mohou zpomalit jeho rozpoznání (2, 3). Právě PCR metoda umožňuje v krátké době (do 5 hodin

po odběru klinického materiálu) určit séroskupiny *Neisseria meningitidis*. Standardně určujeme vždy séroskupiny B a C, dále jsme schopni detekovat séroskupiny A, W135, Y. Ostatní bakteriální agens *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* jsme schopni detekovat do 9 hodin po odběru klinického materiálu.

Materiál na vyšetření PCR je většinou do NRL zaslán v situacích, kdy klasické vyšetřovací metody byly negativní. V období 2001–2005 (červen) bylo vyšetřeno 480 vzorků klinického materiálu pacientů se závažným onemocněním, které byly zaslány do NRL: 250 mozkomíšních moků, 106 krví, 113 sér, 7 bronchoalveolárních laváží, 1 hrudní výpotek, 1 perikardiální výpotek, 1 sérum post mortum a 1 punktát čelistní dutiny. U těžkých pneumonií vyšetřujeme bronchoalveolární laváže a hrudní výpotky, které vykazují větší záchyt bakteriálního agens než sérum.

Tabulka 1. Bakteriální agens u PCR pozitivních vzorků

	likvor	sérum	krev	BAL	hr. výpotek	jiný materiál	celkem	%
<i>N. meningitidis</i>	25	22	15	0	0	1	63	30,3
<i>N. meningitidis B</i>	49	7	7	0	0	0	63	30,3
<i>N. meningitidis C</i>	24	4	4	0	0	0	32	15,4
<i>S. pneumoniae</i>	30	3	2	6	1	0	42	20,2
<i>H. influenzae</i>	5	0	1	1	0	1	8	3,8
pozitivní PCR (celkem)	133	36	29	7	1	2	208	100

Průkaz bakteriálních agens v různém klinickém materiálu ukazuje u PCR pozitivních vzorků tabulka 1.

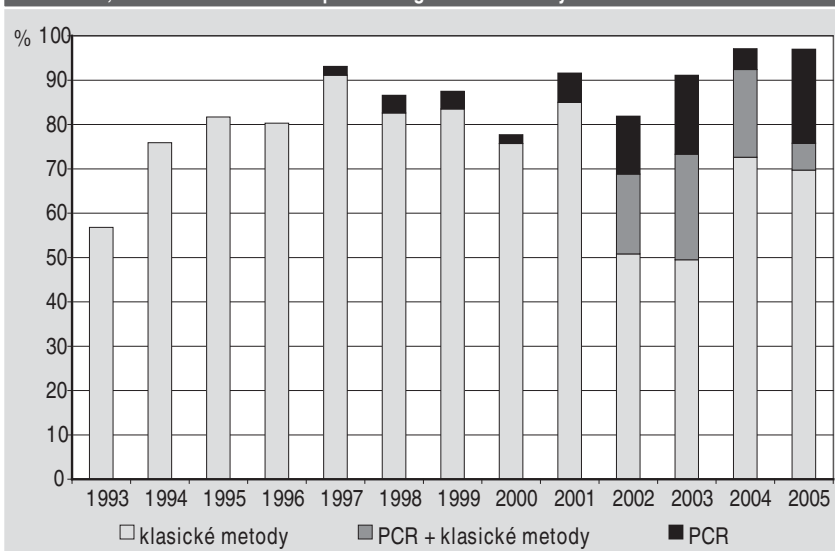
Meningokoková etiologie je metodou PCR prokázána celkem ve 158 (76%) vzorcích, z toho u 63 (30,3%) se jedná o *N. meningitidis B* a u 32 (15,4%) o *N. meningitidis C*. V 63 (30,3%) vzorcích se nám nepodařilo metodou PCR prokázat séro skupinu. Ve 42 (20,2%) vzorcích je prokázán *S. pneumoniae* a jen v 8 (3,8%) vzorcích je prokázán *H. influenzae*. Průkaz *H. influenzae* je zřejmě snížen tím, že od roku 2001 je v ČR zahájeno povinné očkování vakcínou proti *H. influenzae b*.

PCR diagnostika umožňuje rychlejší a citlivější průkaz etiologického agens, u závažných bakteriálních onemocnění má však také svá úskalí – falešnou pozitivitu, která může být způsobena kontaminací již při odběru klinického materiálu, nebo falešnou negativitu způsobenou nižší citlivostí metody. Veškeré výsledky získané metodou PCR je proto nutné posuzovat v kontextu s klinickým stavem pacienta a, pokud je to možné, s klasickými mikrobiologickými metodami.

Podmínky pro správný odběr materiálu a jeho transport jsou k dispozici v NRL a na webových stránkách CEM SZÚ (<http://www.szu.cz/cem/hpcem.htm>).

Zavedení PCR metody přispělo ke zvýšení procenta laboratorně potvrzených IMO a zlepšuje možnost hodnocení epidemiologické situace v naší republice (graf 1). Potvrzení meningokoka PCR metodou lze kombinovat s další bezkultivační metodou multilokusovou sekve-

Graf 1. Laboratorní potvrzení invazivního meningokokového onemocnění, Česká republika 1993–2005, surveillance data NRL pro meningokokové nákazy



nační typizací (MLST) přímo z klinického materiálu. MLST umožňuje určit, kromě jiného, zda pacient onemocněl hypervirulentním klonem. Obě bezkultivační metody umožňují zpřesnění vakcinační strategie v naší republice.

Poděkování:

Všem klinickým pracovníkům za posílání klinického materiálu a laborantkám V. Pavlíkové, R. Pospíšilové a M. Heroldové za výbornou technickou spolupráci.

Literatura

1. Kalmusová J, Bronská E, Křížová P. Diagnostika invazivního meningokokového, hemofilového a pneumokokového onemocnění PCR metodou. *Klin mikrobiol inf Lék* 2004; 3:130–133.
2. Kasal E, Rožnovský L, Křížová P, et al. Léčebný protokol invazivního meningokokového onemocnění (IMO). *Prakt. Lék.*, 2005; 85, č. 4: 196–199.
3. Rožnovský L, Gutvirth J, Beneš J, et al. Návrh Standardu efektivní klinické péče v přednemocniční neodkladné péči (PNP): Invazivní meningokoková onemocnění. *Klin mikrobiol inf Lék* 2002; 8: 57–59.
4. Strang JR, Pugh EJ. Meningococcal infections: reducing the case fatality rate by giving penicillin before admission to hospital. *Br Med J* 1992; 305: 143–147.