

Využitie syndrómového panelu PCR pri laboratórnej diagnostike infekcií dolných dýchacích ciest a porovnanie s bakteriologickou kultiváciou

Oxana Šulíková, Alena Donauerová, Katarína Kollárová

Oddelenie klinickej mikrobiológie, Medirex a.s.

Na identifikáciu vyvolávateľov infekcií dolných dýchacích ciest sa rutinne využíva kultivácia, sérologická diagnostika a molekulárnobiologické metódy. V práci bola porovnaná metóda PCR (panel multiplex PCR) s kultiváciou baktérií. V roku 2022 bolo na PCR diagnostiku pomocou FILMARRAY® Pneumonia plus Panel indikovaných 148 vzoriek, ktoré mali zároveň bakteriologickú kultiváciu z identického materiálu. Zhoda v zmysle negatívneho výsledku PCR/kultivácia, resp. pozitívneho s detekciou rovnakého infekčného agensu bola pozorovaná v 110 prípadoch. V 35 prípadoch bola metóda PCR senzitivnejšia ako kultivácia. V 18 prípadoch bola pozorovaná čiastočná zhoda (detekcia vyššieho počtu baktérií pomocou PCR) a v 17 prípadoch bola kultivácia negatívna. V 3 prípadoch (7 izolátov) bola kultivačná metóda citlivejšia ako PCR. Rýchla PCR diagnostika je efektívna najmä u kriticky chorých pacientov a optimálne je používať ju v kombinácii s kultivačným vyšetrením.

Kľúčové slová: infekcie dolných dýchacích ciest, molekulárna analýza, BIOFIRE® FILMARRAY® Pneumonia plus Panel

The use of the PCR syndrome panel in the laboratory diagnostics of lower respiratory tract infections and comparison with bacteriological culture

Cultivation, serological diagnosis and molecular biological methods are routinely used to identify the causative agents of lower respiratory tract infections. The PCR method (multiplex PCR panel) was compared with the bacterial culture technique. In 2022, 148 samples were examined in parallel by FILMARRAY® Pneumonia plus Panel PCR and bacteriological cultivation. Matched negative results of PCR/culture or positive results with detection of the same infectious agent were observed in 110 cases. In 35 cases, the PCR analysis was more sensitive than the cultivation method. In 18 cases, a partial concordance (detection of a higher number of bacteria by PCR) was observed, and in 17 cases, the culture was negative. In 3 cases (a total of 7 isolates), the culture method was more sensitive than PCR. Rapid PCR diagnostics is effective, especially in critically ill patients; and it is optimal to use it in combination with a culture examination.

Keywords: lower respiratory tract infections, molecular analysis, BIOFIRE® FILMARRAY® Pneumonia plus Panel

NewsLab, 2023; roč. 14 (2): 110-113

Úvod

Infekcie dolných dýchacích ciest sú časté ochorenia, ktoré nadväzujú alebo sprevádzajú infekcie horných dýchacích ciest. Sú celkovo závažnejšie ako infekcie horných dýchacích ciest. Patrí k nim laryngitída (subglotická časť laryngu) a tracheitída, diftéria, pertussis, akútna bronchitída, akútna exacerbácia chronickej bronchitídy, bronchiolitída, respiračný syncytiálny vírus, hantavírusový pľúcny syndróm a pneumónie⁽¹⁾. V etiológii sa najčastejšie uplatňujú vírusy (adenovírus, vírus chrípky typu A, B, vírus parainfluenzy, RSV, SARS-CoV-2 a iné) a baktérie (*Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Corynebacterium diphtheriae*, bakteriálne superinfekcie napr. *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*). V prípade chronickej obštrukčnej choroby pľúc bývajú „spúšťačom“ pneumónie vírusy, na ktoré následne nasadá bakteriálna infekcia (napr. *Streptococcus pneumoniae*, neopuzdrené kmene *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma pneumoniae*)⁽²⁾.

V diagnostike okrem anamnézy a klinického obrazu je kľúčové mikrobiologické vyšetrenie (kultivácia a PCR vyšetrenie z materiálov, ako je nazofaryngeálny výter, spútum, aspirát z dolných dýchacích ciest, bronchoalveolárna laváž; event. sérologické vyšetrenie), vyšetrenie iných laboratórnych parametrov (krvný obraz, biochemické vyšetrenie, cytológia BAL) a zobrazovacie vyšetrenia (Rtg hrudníka, CT vyšetrenie).

Cieľom práce bolo poukázať na význam aj úskalia molekulárnej analýzy v diagnostike infekcií respiračného systému.

Súbor

V roku 2022 (v období 12 mesiacov) bolo paralelne vyšetrených pomocou FILMARRAY® Pneumonia plus Panel PCR a kultivačne 148 vzoriek odobratých z dolných dýchacích ciest u 148 pacientov (1 pacient = 1 vzorka). Vyšetrené materiály boli bronchoalveolárna laváž, odsatý sekret z dýchacích ciest alebo spútum. Bola porovnávaná metóda PCR pomocou BIOFIRE® FILMARRAY® Pneumonia plus Panel s paralelne realizovaným bakteriálnym kultivačným

Tabuľka 1. Detekcia mikroorganizmov / génov rezistencie voči antimikrobiálnym látkam vo FilmArray Pneumonia Panel plus

Baktérie (semikvantitatívne)
• <i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i> complex
• <i>Enterobacter cloacae</i> complex
• <i>Escherichia coli</i>
• <i>Haemophilus influenzae</i>
• <i>Klebsiella aerogenes</i>
• <i>Klebsiella oxytoca</i>
• <i>Klebsiella pneumoniae</i> group
• <i>Moraxella catarrhalis</i>
• <i>Proteus</i> spp.
• <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
• <i>Serratia marcescens</i>
• <i>Staphylococcus aureus</i>
• <i>Streptococcus agalactiae</i>
• <i>Streptococcus pneumoniae</i>
• <i>Streptococcus pyogenes</i>
Atypické baktérie (kvalitatívne)
• <i>Chlamydia pneumoniae</i>
• <i>Legionella pneumophila</i>
• <i>Mycoplasma pneumoniae</i>
Vírusy
• Adenovírus
• Koronavírus (229E, HKU1, NL63, OC43)
• Middle East respiratory syndrom Coronavirus MERS-CoV
• Ľudský metapneumovírus
• Ľudský rinovírus/enterovírus
• Influenza A vírus
• Influenza B vírus
• Parainfluenza vírus
• Respiračný syncytiálny vírus
Gény rezistencie voči antimikrobiálnym látkam
Karbapenemázy:
• IMP
• KPC
• NDM
• OXA-48-like
• VIM
ESBL:
• CTX-M
Rezistencia voči meticilínu:
• <i>mecA/C</i> and MREJ (MRSA)

vyšetrením. Ako negatívne boli hodnotené nielen výsledky bez nálezu baktérií, ale aj detekcia bežnej ústnej mikrobiálnej flóry (pravdepodobne kontaminácia mikroflórou z horných dýchacích ciest pri odbere materiálu z dolných dýchacích ciest).

Metóda

BIOFIRE® FILMARRAY® Pneumonia plus Panel je kvalitatívna/semikvantitatívna multiplex PCR, ktorá umožňuje detekciu nukleových kyselín viacerých respiračných vírusov a baktérií a vybraných génov rezistencie proti antimikrobiálnym látkam. Analyzovaný materiál zahŕňa spúta (indukované alebo vykašľané, resp. endotracheálny aspirát) a bronchoalveolárnu laváž. Súprava FILMARRAY® Pneumonia plus Panel je uzavretý jednorazový systém, ktorý obsahuje všet-

ky činidlá potrebné na prípravu vzorky, reverznú transkripciu, polymerázovú reťazovú reakciu (PCR) a detekciu s cieľom izolovať, amplifikovať a detegovať nukleovú kyselinu z viacerých patogénnych mikroorganizmov. Počas spracovania systém BIOFIRE® FILMARRAY® extrahuje a purifikuje všetky nukleové kyseliny zo vzorky pomocou technológie magnetických guľôčok, vykoná „nested“ multiplexnú PCR a pomocou údajov krivky teploty topenia deteguje a generuje výsledok pre každý cieľ na platničke FILMARRAY® Pneumonia plus Panel⁽³⁾.

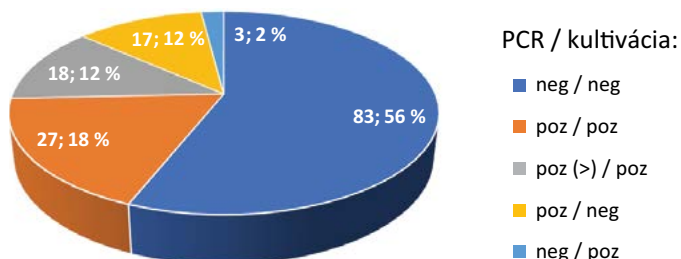
Spektrum vyšetovaných patogénnych mikroorganizmov v BIOFIRE® FILMARRAY® Pneumonia plus Panel je zhrnuté v **tabuľke 1**.

Kultivačné vyšetrenie sa realizovalo na kultivačných médiách, ako je krvný agar, McConkeyov agar, čokoládový agar s bacitracínom a Chromagar (príp. Sabouraudov agar; mykologický nález nebol hodnotený).

Výsledky

V období 12 mesiacov v roku 2022 bolo paralelne vyšetrených 148 vzoriek z dolných dýchacích ciest (od 148 pacientov) pomocou syndrómového multiplex panelu PCR (BIOFIRE® FILMARRAY® Pneumonia plus Panel) a kultivačne. Celkovo bola pozorovaná úplná zhoda (v zmysle negatívnych, resp. pozitívnych výsledkov) v 110 prípadoch, čo predstavuje 74 % (83 vzoriek (56 %) bolo zhodne negatívnych a v 27 (18 %) vzorkách bolo detegované rovnaké bakteriálne agens). V 35 prípadoch (24 %) bola citlivejšia metóda PCR (v 18 vzorkách (12 %) bolo metódou PCR detegovaných viac druhov mikroorganizmov ako pri kultivácii a v 17 prípadoch (12 %) bol výsledok kultivácie negatívny). U 3 vzoriek (2 %) bol pozorovaný pozitívny kultivačný nález (spolu 7 izolátov) napriek negatívnejmu výsledku PCR (**graf 1**).

Z pozorovaného spektra baktérií (**tabuľke 1** – Baktérie semikvantitatívne) boli najčastejšie zastúpené *Pseudomonas aeruginosa* (22), *Staphylococcus aureus* (19), *Klebsiella pneumoniae* group (15), *Streptococcus pneumoniae* (14) a *Haemophilus influenzae* (11). Z ďalších bakteriálnych druhov boli prítomné *Moraxella catarrhalis*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex, *Enterobacter cloacae* complex, *Klebsiella oxytoca*, *Streptococcus agalactiae*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella aerogenes*. V **grafe 2** je zobrazený počet detekcií jednotlivých sledovaných baktérií pomocou PCR vs. kultivačným vyšetrením. Metódou PCR sme v 1 prípade detegovali DNA *Legionella pneumophila* (nehodnotené), ktorá sa

Graf 1. Porovnanie detekcie vybraných druhov baktérií metódou FILMARRAY® Pneumonia plus Panel (PCR) vs. bakteriologickým kultivačným vyšetrením

Tabuľka 2. Zoznam mikroorganizmov, detegovaných buď v PCR paneli alebo kultivačne, ktoré nebolo možné porovnať

A) Detekcia ostatných mikroorganizmov v PCR paneli	Počet
Legionella pneumophila	1
Rhinovirus/Enterovirus	19
Parainfluenza vírus	7
RSV	4
Adenovirus	3
Influenza A	3
Coronavirus	2
B) Izolácia baktérií neprítomných v PCR paneli	Počet
Stenotrophomonas maltophilia	5
Enterococcus faecium	2
Enterococcus faecalis	1

Tabuľka 3. Zoznam detegovaných mikroorganizmov u pacientov s kombinovanou infekciou

Pac. č.	Vírus	Baktéria
1	Rhinovirus/Enterovirus	<i>M. catarrhalis</i> , <i>S. pneumoniae</i>
2	Rhinovirus/Enterovirus	<i>M. catarrhalis</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>
3	Rhinovirus/Enterovirus	<i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>S. aureus</i>
4	Rhinovirus/Enterovirus	<i>M. catarrhalis</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i>
5	Rhinovirus/Enterovirus	<i>S. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i>
6	Rhinovirus/Enterovirus	<i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i>
7	Rhinovirus/Enterovirus	<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. aerogenes</i>
8	Rhinovirus/Enterovirus + Parainfluenza	<i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i>
9	Rhinovirus/Enterovirus + Parainfluenza	<i>M. catarrhalis</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i>
10	Rhinovirus/Enterovirus + RSV	<i>K. oxytoca</i>
11	Rhinovirus/Enterovirus + RSV + Parainfluenza	<i>S. aureus</i> , <i>K. oxytoca</i>
12	Influenza A	<i>Acinetobacter spp.</i>
13	Influenza A	<i>M. catarrhalis</i>
14	Influenza A + Parainfluenza	<i>S. aureus</i> , <i>K. oxytoca</i>
15	Parainfluenza	<i>K. pneumoniae group</i> , <i>E. cloacae complex</i> , <i>S. marcescens</i>
16	Coronavirus	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter spp.</i>

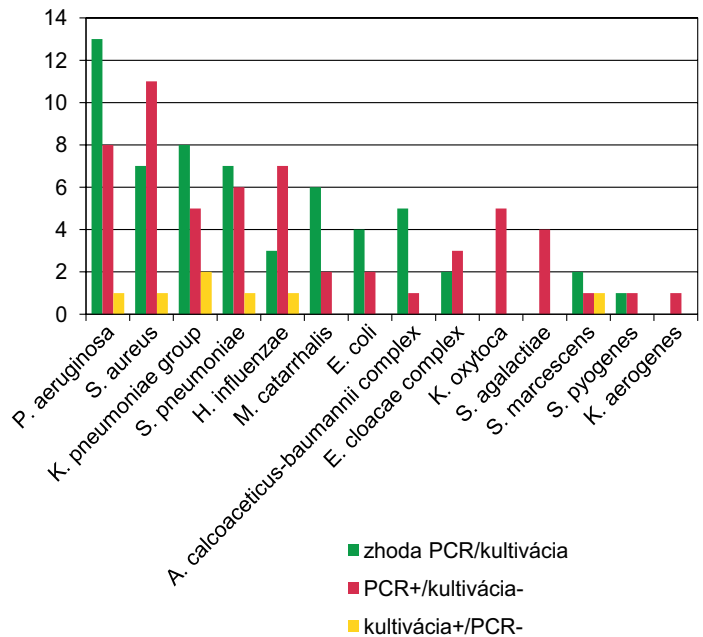
v našom laboratóriu bakteriologickou kultiváciou nevyšetruje. Naproti tomu boli vykultivované aj niektoré baktérie, ktoré nie sú zahrnuté v PCR paneli (**tabuľka 2**).

V 30 vzorkách (20 %) bol v PCR paneli zistený pozitívny nález vírusov spolu 38 vírusových agens (**tabuľka 2** – časť A), z toho v 16 prípadoch išlo o kombinovanú (vírusovú a bakteriálnu) infekciu (**tabuľka 3**). Najčastejšie bol vo vzorkách prítomný rinovírus/enterovírus v počte 19 prípadov. Z ďalších to boli vírus paradržipky (7 prípadov), RSV (4 prípady), adenovírus (3 prípady), vírus chrípky typu A (3 prípady) a koronavírus (zo skupiny 229E, HKU1, NL63, OC43) (2 prípady).

Záver a diskusia

BIOFIRE® FILMARRAY® Pneumonia plus Panel poskytuje možnosť detegovať nukleovú kyselinu 16 významných patogénnych bakteriálnych mikroorganizmov/komplexov (vráta

Graf 2. Porovnanie počtu pozitívnych detekcií metódou PCR vs. bakteriologickou kultiváciou u vybraných mikroorganizmov



ne 7 génov antimikrobiálnej rezistencie), 2 atypických baktérií a 9 vírusov. Jednou z najväčších výhod metódy je rýchlosť a jednoduché spracovanie vzorky (príprava vzorky trvá asi 2 min a celý proces je ukončený do 80 min).

Význam multiplex PCR panelu spočíva v rýchlom odlíšení bakteriálnej infekcie/koinfekcie pri ochoreniach dolných dýchacích ciest (a vyhnutie sa nevhodnej preskripcii antibiotík) od vírusovej etiológie^(4,5). Vyšetrenie bronchoalveolárnej laváže PCR metódou u pacientov s pneumóniou a rizikom gramnegatívnej infekcie skracuje dĺžku neadekvátnej antibiotickej terapie o 45 %⁽⁶⁾. Vzhľadom na vyššie ekonomické náklady je určený najmä pre pacientov z anestéziologicko-resuscitačných oddelení, JIS, oddelení patologických novorodencov, koronárnych jednotiek a ďalších.

Pri manažmente pacientov je potrebné brať do úvahy i predchádzajúce kultivačné nálezy a podanú antibiotickú liečbu. Metóda PCR má vysokú citlivosť a schopnosť zachytiť veľmi malé množstvo nukleovej kyseliny, tzn. aj z nevitálnych a rozpadnutých zvyškov baktérií. Táto skutočnosť by mohla byť jednou z príčin pozitívnych PCR výsledkov pri negatívnej kultivácii, resp. detekcie viac druhov infekčných agens oproti kultivácii v 35 vzorkách (24 %). Opačný prípad nastal v našom súbore v troch prípadoch (pozitívna kultivácia vs. negatívna PCR) (**graf 2**). Možným vysvetlením by mohla byť predanalytická fáza – odberová technika, napr. iná porcia materiálu pri odbere BAL, či rozdeľovanie materiálu do viacerých skúmaviek bez dostatočného premiešania vzorky. Pri detekcii viacerých druhov mikroorganizmov je tiež potrebné brať do úvahy odberovú techniku, napr. odber spúta, nesprávnu techniku odsávania sekrétu a horšiu spoluprácu pacienta napr. u detí.

Nevýhodami syndrómového PCR panelu sú okrem vyššej ceny vyšetrenia i obmedzený počet vyšetřovaných baktérií (v tomto prípade detekcia 3 ďalších druhov baktérií kultivačnou metódou; **tabuľka 2B**). Rozhodujúce pre správnu indiká-

ciu ATB terapie je aj stanovenie fenotypovej citlivosti pri jednotlivých izolátoch pomocou kultivačného vyšetrenia.

Vzhľadom na vyššie uvedené skutočnosti má multiplex PCR panel využitie v diagnosticko-terapeutickom algoritme u kriticky chorých pacientov. Napriek vysokej citlivosti, rýchlejšej informácii o možnej etiológii ťažkostí pacienta, o vyšet-

rení génov rezistencie určitých baktérií by mal byť v každom prípade doplnený kultivačným vyšetrením. Dôležitá je i správna technika a správne načasovanie odberu, podľa možnosti pred podaním/zmenou antibiotickej liečby. Výsledky by mali byť interpretované s ohľadom na klinický stav pacienta a úspešnosť terapie.

LITERATÚRA

1. Goering RV, Dockrell HM, Zuckerman M, et al. *Mimsova lékařská mikrobiologie*. Praha: Triton. 2016; ISBN 978-80-7387-928-0, 255-259.
2. Hurych J, Štícha R, et al. *Lékařská mikrobiologie Repetitórium*, Praha: Triton, 2021; ISBN 978-80-7553-976-2, 513-522.
3. <https://www.biofire.com/products/the-filmarray-panels/filmarray-pneumonia/>
4. Foschi C, Zignoli A, Gaibani P, et al. Respiratory bacterial co-infections in intensive care unit-hospitalized COVID-19 patients: Conventional culture vs BioFire FilmArray pneumonia Plus panel. *J Microbiol Methods*. 2021 Jul; 186: 106259. doi: 10.1016/j.mimet.2021.106259. Epub 2021 May 29. PMID: 34062210; PMCID: PMC8164500.
5. Peiffer-Smadja N, Bouadma L, Mathy V, et al. Performance and impact of a multiplex PCR in ICU patients with ventilator-associated pneumonia or ventilated hospital-acquired pneumonia. *Crit Care*. 2020 Jun 19; 24(1): 366. doi: 10.1186/s13054-020-03067-2. PMID: 32560662; PMCID: PMC7303941.
6. Darie AM, Khanna N, Jahn K, et al. D. Fast multiplex bacterial PCR of bronchoalveolar lavage for antibiotic stewardship in hospitalised patients with pneumonia at risk of Gram-negative bacterial infection (Flagship II): a multicentre, randomised controlled trial. *Lancet Respir Med*. 2022 Sep; 10(9): 877-887. doi: 10.1016/S2213-2600(22)00086-8. Epub 2022 May 23. PMID: 35617987.

MUDr. Oxana Šulíková

Klinická mikrobiológia, Medirex, a.s.
Galvaniho 17/C, 821 04 Bratislava
e-mail:oxana.sulikova@medirex.sk