

Utjecaj PCR inhibitora na molekularnu dijagnostiku pneumokokne pneumonije

Influence of PCR inhibitors on molecular diagnosis of pneumococcal pneumonia

Ivana Mareković^{1*}, Vanda Plečko², Zagorka Boras¹, Ladislav Pavlović¹, Ana Budimir², Zrinka Bošnjak², Blanka Kamauf-Balabanić¹, Sonja Marinković¹, Lidija Žele-Starčević², Smilja Kalenić²

SAŽETAK. Cilj: Utvrditi utjecaj inhibitora prisutnih u uzorcima krvi i njenih frakcija te u uzorcima iz respiratornog sustava na rezultate PCR-a za *Streptococcus pneumoniae* u bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom. **Ispitanici i metode:** U istraživanje je bilo uključeno 80 ispitanika s izvanbolničkom pneumonijom u kojih je, osim konvencionalnih mikrobioloških pretraga, napravljena i lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction, PCR*) za fragment gena pneumolizina na uzorcima seruma (N=77) i bronhoalveolarnih ispiraka (BAL) (N=19). U uzorcima je utvrđivana prisutnost PCR inhibitora, a za njihovo uklanjanje korišteno je razrjeđivanje uzoraka. **Rezultati:** Primijenjenim mikrobiološkim metodama *S. pneumoniae* dokazan je kod ukupno 25 (31,3 %) ispitanika s izvanbolničkom pneumonijom. PCR rezultati u svih 77 uzoraka seruma bili su negativni, a prisutnost PCR inhibitora utvrđena je u jednom uzorku seruma. PCR je u uzorcima BAL-a bio pozitivan kod tri ispitanika, a inhibitori nisu utvrđeni niti u jednom uzorku BAL-a. **Rasprava:** Pri planiranju i izvođenju PCR-a na kliničkim uzorcima treba misliti na moguću prisutnost PCR inhibitora koji mogu biti uzrok lažno-negativnih rezultata. Određenim postupcima PCR inhibitori mogu se ukloniti iz kliničkih uzoraka ili se njihovo djelovanje može umanjiti (metoda izolacije DNA, optimizacija uvjeta umnažanja, razrjeđivanje uzoraka). Prisutnost inhibitora u uzorku može se utvrditi dodavanjem interne kontrole u svaki uzorak ili pomoću *spikinga*. **Zaključak:** S obzirom na to da je u ovom istraživanju prisutnost inhibitora utvrđena samo u jednom uzorku seruma, može se zaključiti da PCR inhibitori u uzorcima seruma i BAL-a ne utječu na rezultate PCR-a za *S. pneumoniae* u bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom.

Ključne riječi: bronhoalveolarni ispirak (BAL), inhibicija, izvanbolnička pneumonija, krv, PCR

ABSTRACT. Aim: To determine if inhibitors in blood and respiratory specimens influence the polymerase chain reaction (PCR) results for *Streptococcus pneumoniae* in patients with community-acquired pneumonia (CAP). **Patients and methods:** The study included 80 patients with CAP. In addition to conventional microbiological methods, PCR for fragment of pneumolysin gene in serum (N=77) and BAL (N=19) specimens was also performed. The presence of PCR inhibitors in specimens was determined with spiking and inhibitors were removed by diluting the specimens. **Results:** With all methods, *S. pneumoniae* was detected in 25 (31,3 %) of patients with CAP. PCR results in 77 serum specimens were negative. PCR inhibitors were detected in one serum specimen. BAL specimens were PCR-positive in three patients and there were no inhibitors detected. **Discussion:** When planning and performing PCR on clinical specimens, PCR inhibitors should be considered as a possible cause of false-negative results. Several procedures are used to remove PCR inhibitors from clinical specimens or to diminish their influence (extraction method, optimizing DNA amplification, diluting of specimens). Presence of inhibitors can be determined by adding of an internal control to each specimen or with spiking. **Conclusions:** In this study the presence of inhibitors was determined in only one serum specimen. It can be concluded that PCR inhibitors in serum and BAL specimens do not influence the PCR results for *S. pneumoniae* in patients with CAP.

Key words: blood, bronchoalveolar lavage (BAL), community-acquired pneumonia, inhibition, PCR

¹ Klinika za plućne bolesti Jordanovac, Zagreb

² Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju, Klinički bolnički centar Zagreb

Primljeno: 1. 7. 2008.

Prihvaćeno: 14. 10. 2008.

Adresa za dopisivanje:

* Ivana Mareković,

Klinika za plućne bolesti Jordanovac,
Jordanovac 104, 10 000 Zagreb
e-mail: ivanamarekovic@yahoo.com

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

UVOD

Zbog ograničenja konvencionalnih mikrobioloških metoda, posebno u bolesnika prethodno liječenih antimikrobnim lijekovima, u dijagnostici pneumokokne pneumonije primjenjuje se i molekularna metoda *lančane reakcije polimeraze* (engl. *polymerase chain reaction, PCR*). Iako bi spomenuta dijagnostička metoda u idealnim uvjetima trebala biti brza i osjetljiva, prilikom primjene na kliničkim uzorcima bolesnika njezina osjetljivost može biti smanjena djelovanjem različitih inhibitora. Stoga

PCR bi u idealnim uvjetima trebao biti brza i osjetljiva dijagnostička metoda. Prilikom primjene na kliničkim uzorcima bolesnika, osjetljivost joj može biti kompromitirana prisustvom inhibitora koji mogu rezultirati lažno-negativnim nalazima. Inhibitori PCR reakcije dokazani su u brojnim kliničkim uzorcima.

prilikom evaluacije PCR-a u dijagnostici pneumokokne pneumonije treba svakako uzeti u obzir i djelovanja inhibitora PCR reakcije.

U dijagnostici pneumokokne pneumonije PCR je, kao dijagnostička metoda, istraživana na uzorcima krvi i njenim frakcijama (puna krv, serum, plazma, izolirani leukociti), te na uzorcima sputuma^{1,2}. U posljednje vrijeme istražuje se i moguća dijagnostička vrijednost PCR-a na uzorcima bronhoalveolarnih ispiraka (BAL), pogotovo u bolesnika kod kojih je već započeto antimikrobno liječenje^{3,4}.

S obzirom na to da uzorci krvi i njenih frakcija, kao i uzorci iz respiratornog sustava, zauzimaju istaknuto mjesto među kliničkim uzorcima bogatim inhibitorima, cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utječu li inhibitori prisutni u ovim uzorcima na rezultate PCR-a za *Streptococcus pneumoniae* u bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom.

ISPITANICI I METODE

U istraživanje je uključeno 80 ispitanika s izvanbolničkom pneumonijom koji su pregledani i/ili hospitalizirani u Klinici za plućne bolesti Jordanovac. Kriterij za kliničku dijagnozu izvanbolničke pneumonije bio je novonastali plućni infiltrat utvrđen radiološkom snimkom uz prisutnost

odgovarajućih simptoma u ispitanika koji unatrag 14 i više dana od pojave simptoma nisu bili hospitalizirani niti su boravili u gerijatrijskoj ili sličnoj ustanovi.

U ispitanika su, osim konvencionalnih mikrobioloških pretraga (preparat po Gramu i kultura sputuma/BAL-a, pneumokokni antigen u urinu i hemokultura), napravljene i molekularne mikrobiološke pretrage na uzorcima seruma (N=77) i BAL-a (N=19). Konvencionalne mikrobiološke pretrage napravljene su u Klinici za plućne bolesti Jordanovac u Zagrebu, a molekularne u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Za izolaciju DNA korišten je High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Konvencionalni PCR za fragment gena pneumolizina napravljen je kako su opisali Dagan i sur., a PCR produkt odgovarajuće veličine od 355 bp detektiran je elektroforezom u 2% agarozu gelu⁵. Kao pozitivna kontrola korištena je pneumokokna DNA izolirana iz bakterijske suspenzije pneumokoka, dok je kao negativna kontrola korištena sterilna destilirana voda.

REZULTATI

Svim primijenjenim mikrobiološkim metodama *S. pneumoniae* dokazan je u ukupno 25 (31,3%) ispitanika s izvanbolničkom pneumonijom.

S. pneumoniae dokazan je pneumokoknim antigenom u urinu u 21,1% (16/76), a kulturom sputuma u 12,5% (8/64) ispitanika. Kultura BAL-a bila je pozitivna u 5,3% (1/19) ispitanika. Sve hemokulture ostale su sterilne (N=11). U dva ispitanika s pozitivnim pneumokoknim antigenom u urinu bila je pozitivna i kultura sputuma, a u jednog kultura BAL-a.

PCR rezultati u svih 77 uzoraka seruma bili su negativni. Kako bi se utvrdilo jesu li rezultati stvarno negativni ili je PCR reakcija u njima bila inhibirana, napravljen je *spiking* kako je opisano u literaturi^{6,7}. U svaki negativni uzorak seruma prije amplifikacije dodana je mala količina pneumokokne DNA, te je reakcija ponovljena. Pritom je samo u jednom uzorku PCR reakcija ostala negativna, što znači da je u tom uzorku utvrđena prisutnost inhibitora (slika 1). Osim *spikinga*, uzorci seruma su razrjeđivani *pooliranjem* u razrjeđenju 1:8,

kako bi se umanjilo djelovanje eventualno prisutnih inhibitora, kao što je opisano u literaturi, ali su svi uzorci seruma unatoč tome ostali PCR-negativni (slika 2)⁸.

PCR je bio pozitivan u uzorcima BAL-a u tri ispitanika. Sva tri ispitanika su prije bronhoskopske pretrage primala antimikrobne lijekove, a *spikingom* i *pooliranjem* inhibicija nije utvrđena niti u jednom uzorku BAL-a (slika 3).

RASPRAVA

U kliničkim uzorcima do sada je otkriven velik broj različitih PCR inhibitora, a inhibitorno mogu djelovati i različiti drugi čimbenici, kao što je to plastično laboratorijsko posuđe, puder s rukavica itd. Osobito veliki broj inhibitora otkriven je uzorcima krvi. Prve spoznaje o tome potječu iz forenzičke znanosti u kojoj su se s problemom inhibicije susreli prilikom analiziranja tragova krvi⁹. Najpoznatiji inhibitor u uzorcima krvi je hemoglobin čiji porfirinski prsten može inhibirati PCR reakciju vezivanjem *Taq* DNA polimeraze¹⁰. Inhibitorno mogu djelovati i leukocitna DNA, imunoglobulini G i antikoagulansi (heparin, EDTA). Antikoagulansi inhibitorno djeluju tako da kao kelirajući

agensi vežu Mg^{2+} , neophodan za aktivnost DNA polimeraze¹¹⁻¹³. Posebno je važno u ovom kontekstu naglasiti ulogu koju može imati humana DNA prisutna u ispitivanom uzorku. Naime, u kliničkim uzorcima se PCR reakcijom mala količina mikrobnе DNA mora otkriti u okruženju koje sadrži eukariotski genetički materijal. Humana DNA pri tome može interferirati sa PCR reakcijom. U uzorcima krvi humana leukocitna DNA može djelovati inhibitorno, tako da kompeticijom ometa vezivanje početnica za ciljanu sekvencu ili pak inhibitorno djelovanje može biti jednostavno posljedica otežane difuzije svih komponenti u reakcijskoj smjesi zbog prisutnosti dugih lanaca humane DNA¹⁴.

Prisutnost inhibitora PCR-a u uzorcima može se otkriti dodavanjem interne kontrole u svaki uzorak ili *spikingom*, odnosno ponavljanjem PCR reakcije na negativnim uzorcima nakon dodavanja male količine ciljane DNA u uzorak. Poznati su i postupci kojima se PCR inhibitori mogu ukloniti iz uzoraka ili im se djelovanje može umanjiti, o čemu treba voditi računa pri planiranju i izvođenju PCR-a na kliničkim uzorcima.

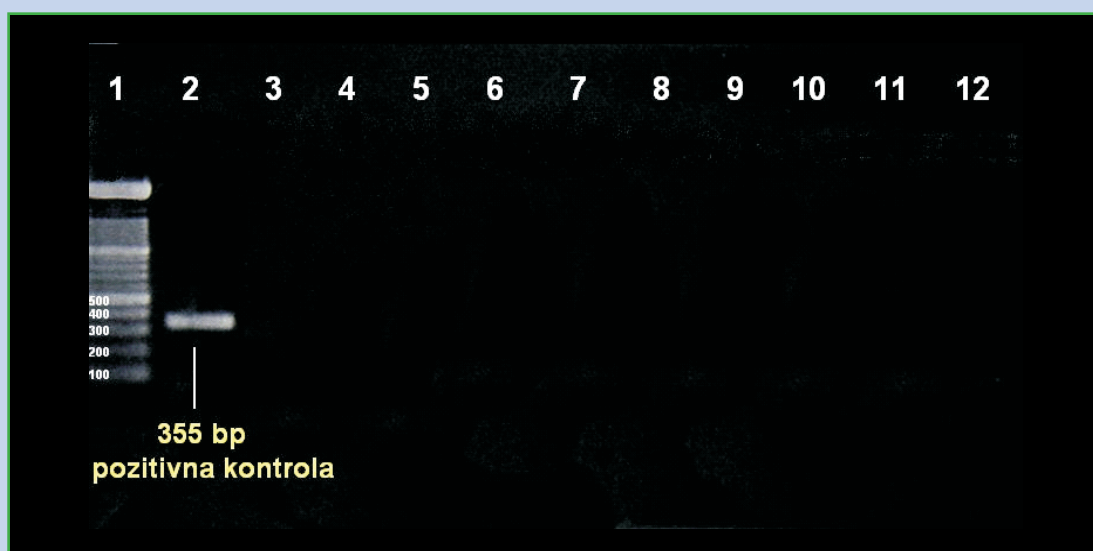


Slika 1. Elektroforeza u agarozu gela amplificiranih PCR produkata nakon što su u PCR-negativne uzorke seruma prije amplifikacije dodana 2 μ l pneumokokne DNA (*spiking*)

Stupac 1 – DNA molecular weight marker XIV (100-1500 bp); stupac 2 – pozitivna kontrola (pneumokokna DNA); stupci 3-8, 10, 11 – uzorci seruma bez prisutnih inhibitora; stupac 9 – uzorak seruma s prisutnim inhibitorima bez PCR produkta veličine 355 bp; stupac 12 – negativna kontrola (sterilna destilirana voda)

Figure 1 Electrophoresis in agarose gel of amplified PCR products after addition of 2 μ l of pneumococcal DNA in PCR-negative serum samples (*spiking*)

Lane 1 – DNA molecular weight marker XIV (100-1500 bp); lane 2 – positive control (pneumococcal DNA); lanes 3-8, 10, 11 – serum samples without inhibitors; lane 9 – serum sample with inhibitors/without PCR product of 355 bp; lane 12 – negative control (sterile distilled water)



Slika 2. Elektroforeza u agarozu gelu PCR-negativnih uzoraka seruma nakon razrjeđivanja *pooliranjem* – svi uzorci su ostali negativni
 Stupac 1 – DNA molecular weight marker XIV (100-1500 bp); stupac 2 – pozitivna kontrola (pneumokokna DNA); stupci 3-11 – PCR-negativni uzorci seruma nakon *pooliranja*; stupac 12 – negativna kontrola (sterilna destilirana voda)

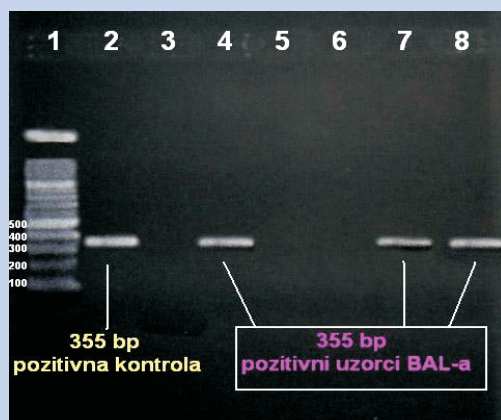
Figure 2. Electrophoresis in agarose gel of PCR negative serum samples after dilution by pooling – all samples remained negative

Lane 1 – DNA molecular weight marker XIV (100-1500 bp); lane 2 – positive control (pneumococcal DNA); lanes 3-11 – PCR-negative serum samples after *pooling*; lane 12 – negative control (sterile distilled water)

Osim uzoraka krvi, istaknuto mjesto među kliničkim uzorcima bogatim inhibitorima zauzimaju i uzorci iz respiratornog sustava (polisaharidi, krv, mukolitički agensi) i urogenitalnog sustava (urea)^{11,15,16}.

Određenim postupcima PCR inhibitori mogu se ukloniti iz kliničkih uzoraka ili se njihovo djelovanje može barem umanjiti. Uklanjanje inhibitora započinje izolacijom nukleinskih kiselina iz kliničkog uzorka. Izbor metode kojom će se izolacija raditi vrlo je važan. U istraživanjima se različite metode izolacije međusobno uspoređuju s ciljem da se za pojedinu vrstu kliničkih uzoraka utvrdi ona optimalna¹⁷. Djelovanje inhibitora može se umanjiti i optimizacijom uvjeta amplifikacije. Pritom važnu ulogu ima izbor DNA polimeraze i njena količina u reakciji. Pojedine DNA polimeraze međusobno se razlikuju s obzirom na svoju osjetljivost na PCR inhibitore. Kao facilitatori PCR reakcije djeluju bovini serumski albumin (BSA), betain i gp32^{11,12}. Djelovanje eventualno prisutnih inhibitora može se umanjiti i razrjeđivanjem uzoraka⁸.

Prisutnost inhibitora u nekom uzorku, odnosno je li PCR rezultat stvarno negativan ili je reakcija u njemu samo inhibirana, može se utvrditi na dva načina. Prvi način je dodavanje interne kontrole u svaki uzorak. Postoje različiti tipovi internih kontrola. Homologna ekstrinzična kontrola amplificira se istim početnicama kao i ciljana sekvenca, te se u uzorak dodaje u niskoj koncentraciji kako ne bi došlo do kompeticije s ciljanom sekvencom. Heterologna ekstrinzična kontrola za amplifikaciju zahtijeva dodatni par početnica. Heterologna intrinzična kontrola temelji se na amplifikaciji određenih skupina gena za koje se očekuje da su prisutni u svakom uzorku kao što su β -globinski geni i geni za γ -interferon. Treba napomenuti da se β -globinski geni ne preporučuju toliko za kontrolu inhibicije, koliko kao potvrda da je u uzorku prisutna humana DNA, odnosno stanični materijal, što je dokaz da je uzorak (npr. obrisak) adekvatno uzet^{18,19}. Drugi način za otkrivanje prisutnosti inhibitora jest tzv. *spiking*. Temelji se na ponavljanju PCR reakcije na negativnim uzorcima nakon dodavanja male količine ciljane DNA u



Slika 3. Elektroforeza na agarozu gelu amplificiranih PCR produkata u uzorcima BAL-a

Stupac 1 – DNA molecular weight marker XIV (100-1500 bp); stupac 2 – pozitivna kontrola (pneumokokna DNA); stupac 3 – negativna kontrola (sterilna destilirana voda); stupci 4, 7 i 8 – pozitivni uzorci BAL-a; stupci 5 i 6 – negativni uzorci BAL-a

Figure 3. Electrophoresis in agarose gel of amplified PCR products from BAL samples

Lane 1 – DNA molecular weight marker XIV (100-1500 bp); lane 2 – positive control (pneumococcal DNA); lane 3 – negative control (sterile distilled water); lanes 4, 7 and 8 – positive BAL samples; lanes 5 and 6 – negative BAL samples.

uzorak. Ako je PCR rezultat i sada negativan, to znači da su u uzorku prisutni inhibitori^{6,7}.

ZAKLJUČAK

U ovom istraživanju prisutnost inhibitora utvrđena je samo u jednom uzorku seruma, te se može zaključiti da inhibicija u uzorcima seruma i BAL-a ne utječe na rezultate PCR-a za *S. pneumoniae* kod bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom. Rezultati ovog istraživanja govore u prilog autorima koji smatraju da, za razliku od BAL-a, PCR na uzorcima seruma nije koristan u dijagnostici pneumokokne pneumonije.

Kao što kontaminacija može biti uzrok lažno-pozitivnih PCR rezultata, tako i inhibitori PCR reakcije mogu biti uzrok onih lažno-negativnih. Ovim istraživanjem željeli smo pokazati da pri planiranju i izvođenju PCR-a na kliničkim uzorcima treba misliti na sve čimbenike koji mogu inhibirati reakciju, pokušati ih otkriti, ukloniti ili barem umanjiti njihovo djelovanje, jer će samo tako PCR biti brza i osjetljiva dijagnostička metoda.

ZAHVALE

Istraživanje je dio znanstveno-istraživačkog projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa pod nazivom *Molekularna detekcija mikroorganizama: utjecaj na uporabu antimikrobnih lijekova*.

LITERATURA

1. Murdoch DR. Nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pneumonia. *Clin Infect Dis* 2003;36:1162-70.
2. Yang S, Lin S, Khalil A, Gaydos C, Nuemberger E, Juan G et al. Quantitative PCR assay using sputum samples for rapid diagnosis of pneumococcal pneumonia in adult emergency department patients. *J Clin Microbiol* 2005;43:3221-6.
3. Strålin K, Korsgaard J, Olcen P. Evaluation of a multiplex PCR for bacterial pathogens applied to bronchoalveolar lavage. *Eur Respir J* 2006;28:568-75.
4. Mareković I, Plečko V, Boras Z, Pavlović L, Budimir A, Bošnjak Z et al. Evaluation of PCR as rapid microbiological method in diagnosis of pneumococcal pneumonia. *Scand J Infect Dis*. In press 2008.
5. Dagan R, Shriker O, Hazan I, Leibovitz E, Greenberg D, Schlaffer F et al. Prospective study to determine clinical relevance of detection of pneumococcal DNA in sera of children by PCR. *J Clin Microbiol* 1998;36:669-73.
6. Murdoch Dr, Anderson TP, Beynon KA, Chua A, Fleming AM, Laing RTR et al. Evaluation of a PCR assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* in respiratory and nonrespiratory samples from adults with community-acquired pneumonia. *J Clin Microbiol* 2003;40:63-6.
7. Sheppard CL, Harrison TG, Morris R, Hogan A, George RC. Autolysin-targeted LightCycler assay including internal process control for detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in clinical samples. *J Med Microbiol* 2004;53:189-95.
8. Boman J, Gaydos CA, Quinn TC. Molecular diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol* 1999;37:3791-9.
9. Rådström P, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, Löfström C. Pre-PCR processing: Strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol Biotechnol* 2004;26:133-46.
10. Zhang Y, Isaacman DJ, Wadowsky RM, Rydquist-White J, Post JC, Ehrlich GD. Detection of *Streptococcus pneumoniae* in whole blood by PCR. *J Clin Microbiol* 1995;33:596-601.
11. Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:3741-51.
12. Al-Soud WA, Rådström P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol* 2001;39:485-93.
13. Al-Soud WA, Jönsson LJ, Rådström P. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J Clin Microbiol* 2000;38:345-50.
14. Morata P, Quiapo-Ortuno MI, de Dios Colmenero J. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol* 1998;36:2443-6.

15. Chernesky MA, Jang D, Sellors J, Lluinstra K, Chong S, Castriciano S et al. Urinary inhibitors of polymerase chain reaction and ligase chain reaction and testing of multiple specimens may contribute to lower assay sensitivities for diagnosing *Chlamydia trachomatis* infected women. *Mol Cell Probes* 1996;11:243-9.
16. Ieven M, Goossens H. Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:242-56.
17. Loens K, Bergs K, Ursi D, Goossens H, Ieven M. Evaluation of NucliSens easyMAG for automated nucleic acid extraction from various clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2007;45:421-5.
18. Ieven M. Currently used nucleic acid amplification tests for the detection of viruses and atypicals in acute respiratory infections. *J Clin Virol* 2007;40:259-76.
19. Loens K, Ursi D, Goossens H, Ieven M. Molecular diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 2003;41:4915-23.