

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Vanja MEJAČ (STRNIŠA)

**UPORABNOST PCR TESTA SEEPLEX® PNEUMOBACTER
ACE DETECTION ZA UGOTAVLJANJE BAKTERIJSKIH
POVZROČITELJEV OKUŽB DIHAL**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EVALUATION OF SEEPLEX® PNEUMOBACTER ACE
DETECTION MULTIPLEX PCR KIT FOR THE DETECTION OF
RESPIRATORY BACTERIAL PATHOGENS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za respiratorno mikrobiologijo na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik.

Študijska komisija univerzitetnega študija biologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Nino Gunde Cimerman, za somentorico dr. Viktorijo Tomič in za recenzentko doc. dr. Polono Zalar.

Mentorica: prof. dr. Nina Gunde Cimerman

Somentorica: dr. Viktorija Tomič

Recenzentka: doc. dr. Polona Zalar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Marjanca Starčič Erjavec

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članice: prof. dr. Nina Gunde Cimerman

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

dr. Viktorija Tomič

Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Laboratorij za respiratorno mikrobiologijo

doc. dr. Polona Zalar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 25.9.2012

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana Vanja Mejač se strinjam z objavo biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Vanja Mejač

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Dn
DK	UDK 616.2(043.2)=163.6
KG	atipični in tipični povzročitelji pljučnic/izmeček/izolacija DNA/kvantifikacija DNA/verižna reakcija s polimerazo/elektroforeza/identifikacija bakterij
AV	MEJAČ (STRNIŠA), Vanja
SA	GUNDE CIMERMAN, Nina (mentorica)/ TOMIČ, Viktorija (somentorica)/ ZALAR, Polona (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2012
IN	UPORABNOST PCR TESTA SEEPLEX® PNEUMOBACTER ACE DETECTION ZA UGOTAVLJANJE BAKTERIJSKIH POVZROČITELJEV OKUŽB DIHAL
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIII, 68 str., 4 pregl., 16 sl., 1 pril., 118 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Najpogosteji povzročitelj zunajbolnišnične pljučnice (ZBP) je bakterija <i>Streptococcus pneumoniae</i> , sledi <i>Haemophilus influenzae</i> . Pnevmostiki so vodilni povzročitelji številnih bolezni dihal, bakteriemije in sepse ter so vzrok umrljivosti po celi svetu. Verižna reakcija s polimerazo (PCR), nam je lahko v pomoč pri ugotavljanju povzročiteljev pljučnic, za kar so metode klasične bakteriologije in virologije dolgotrajne in počasne. Namen diplomskega dela je bil preizkusiti uporabnost komercialnega PCR testa Seeplex® PneumoBacter ACE Detection. V kliničnih vzorcih, večinoma v izmečku, smo dokazovali prisotnost DNA tipičnih in atipičnih povzročiteljev pljučnic. Med 101 analizanimi vzorci DNA nismo zasledili nobenega primera okužbe z bakterijami <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Legionella pneumophila</i> , <i>Bordetella pertussis</i> in <i>Chlamydophila pneumoniae</i> , zato ne moremo sklepati o zanesljivosti PCR testa Seeplex®. V nadaljevanju smo se osredotočili na zanesljivost metode pri identifikaciji bakterije <i>S. pneumoniae</i> in razlikovanje te vrste od drugih zelenečih streptokokov. 19 naključno izbranih izolatov smo identificirali z uporabo BD BBL Crystal™ Identification Systems, nato pa nanesli na agarozni gel in primerjali s pozitivno kontrolo testa Seeplex®. Pozitivni rezultati testa so bili dodatno preverjeni s specifičnim testom GenProbe® AccuProbe <i>S. pneumoniae</i> . Lahko sklepamo, da test Seeplex® ni dovolj specifična metoda za potrjevanje prisotnosti bakterije <i>S. pneumoniae</i> v vzorcu, saj smo dobili tudi lažno pozitivne rezultate. Zaradi težavne in/ali dolgotrajnejše gojitve drugih bakterij je metoda hkratne PCR zelo primerna za časovno ustrezno diagnostiko bolnikov z ZBP v akutni fazni bolezni. Izvedba testa hkratne PCR Seeplex® je enostavna, hitra in ponovljiva.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN	Dn
DC	UDC 616.2(043.2)=163.6
CX	respiratory bacterial pathogens/sputum/isolation of DNA/quantification/polymerase chain reaction/electrophoresis/detection/evaluation of method
AU	MEJAČ (STRNIŠA), Vanja
AA	GUNDE CIMERMAN, Nina (supervisor)/ TOMIČ, Viktorija (supervisor)/ ZALAR, Polona (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY	2012
TI	EVALUATION OF SEEPLEX® PNEUMOBACTER ACE DETECTION MULTIPLEX PCR KIT FOR THE DETECTION OF RESPIRATORY BACTERIAL PATHOGENS
DT	Graduation thesis (University studies)
NO	XIII, 68 p., 4 tab., 16 fig., 1 ann., 118 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	<p>Pneumococci are major cause of bacterial disease in humans, including pneumonia, meningitis, bronchitis, sinusitis, otitis media, peritonitis, bacteraemia, sepsis and are cause of death worldwide. In cases when classical methods of bacteriology and virology take too much time to identify causes of pneumonia we can use molecular method - PCR. The purpose of our study was to evaluate Seeplex® pneumobacter ACE detection multiplex PCR kit for the detection of respiratory bacterial pathogens. 101 samples of patients were tested.. Sputum represents the largest proportion of all samples (76 %). <i>Mycoplasma pneumoniae</i>, <i>Leguonella pneumophila</i>, <i>Bordetella pertussis</i> and <i>Chlamydophila pneumoniae</i> were not detected among all 101 DNA samples, so we cannot confirm reliability of the PCR test Seeplex®. In the following thesis, we focused on the reliability of the identification of <i>S. pneumoniae</i> and distinguish this type from other <i>Streptococcus</i> viridans group. 19 randomly selected isolates of <i>Streptococcus</i> viridans group were selected and identified with BD BBL Crystal™ Identification Systems Gram-Positive ID Kit. We applied isolates on agarose gel and compared with a positive control test Seeplex®. Positive result analysis of amplified PCR product was tested by specific GenProbe® AccuProbe <i>S. pneumoniae</i> test - only one positive result was recorded. From the results we can conclude that the Seeplex® test is not sufficiently specific method for the confirmation of the presence of <i>S. pneumoniae</i> in the sample, as the results proved also false positive. Because of difficult and/or longer cultivation of some other bacteria, multiplex PCR method is very suitable for the timely diagnosis of patients with community-acquired pneumonia in the acute phase of illness. Implementation of multiplex PCR Seeplex® test is easy, fast and repeatable.</p>

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII

1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA.....	3
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 <i>Legionella pneumophila</i>	4
2.1.1 Taksonomska uvrstitev.....	4
2.1.2 Morfologija in zgradba.....	4
2.1.3 Patogeneza	4
2.1.4 Bolezen in klinični znaki.....	5
2.1.5 Laboratorijska diagnostika	6
2.1.5.1 Kultura	6
2.1.5.2 Neposredna imunofluorescenza (<i>angl.</i> direct immunofluorescence – DIF).....	7
2.1.5.3 Dokaz topnega antigena v urinu.....	7
2.1.5.4 Serološke metode	8
2.1.5.5 Molekularne metode – verižna reakcija s polimerazo (PCR)	8
2.2 <i>Chlamydophila pneumoniae</i>	9
2.2.1 Taksonomska uvrstitev.....	9
2.2.2 Morfologija in zgradba.....	9
2.2.3 Patogeneza	9
2.2.4 Bolezen in klinični znaki.....	10

2.2.5	Laboratorijska diagnostika	11
2.2.5.1	Serološke metode	11
2.2.5.2	Imunološke metode – imunohistokemija	12
2.2.5.3	Molekularne metode – verižna reakcija s polimerazo (PCR)	12
2.3	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	13
2.3.1	Taksonomska uvrstitev	13
2.3.2	Morfologija in zgradba	13
2.3.3	Patogeneza	14
2.3.4	Bolezen in klinični znaki	15
2.3.5	Laboratorijska diagnostika	15
2.3.5.1	Kultura	16
2.3.5.2	Serološke metode	16
2.3.5.3	Molekularne metode - verižna reakcija s polimerazo (PCR)	16
2.4	<i>Bordetella pertussis</i>	17
2.4.1	Taksonomska uvrstitev	17
2.4.2	Morfologija in zgradba	17
2.4.3	Patogeneza	17
2.4.4	Bolezen in klinični znaki	18
2.4.5	Laboratorijska diagnostika	18
2.4.5.1	Kultura	18
2.4.5.2	Serološke metode	19
2.4.5.3	Molekularne metode – verižna reakcija s polimerazo (PCR)	19
2.5	<i>Haemophilus influenzae</i>	20
2.5.1	Taksonomska uvrstitev	20
2.5.2	Morfologija in zgradba	20
2.5.3	Patogeneza	21
2.5.4	Bolezen in klinični znaki	21
2.5.5	Laboratorijska diagnostika	22
2.5.5.1	Kultura	22
2.5.5.2	Mikroskopija	22

2.5.5.3	Imunološke metode	22
2.5.5.4	Molekularne metode – verižna reakcija s polimerazo (PCR)	23
2.6	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	24
2.6.1	Taksonomska uvrstitev	24
2.6.2	Morfologija in zgradba	24
2.6.3	Patogeneza	25
2.6.4	Bolezen in klinični znaki	25
2.6.5	Laboratorijska diagnostika	26
2.6.5.1	Mikroskopija	26
2.6.5.2	Dokaz topnega antigena v urinu.....	26
2.6.5.3	Molekularne metode – verižna reakcija s polimerazo (PCR)	27
2.6.6	Podobnost <i>S. pneumoniae</i> z drugimi streptokoki	27
2.7	VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR).....	28
2.7.1	Zgodovina PCR	28
2.7.2	Razvoj PCR-metode in začetne težave	28
2.7.3	Cikel PCR-reakcije	29
2.7.4	Prednosti PCR-metode	30
2.7.5	Slabosti PCR-metode	31
2.7.6	PCR v realnem času	32
2.7.7	Hkratna PCR (multiplex PCR)	33
3	MATERIAL IN METODE	35
3.1	MATERIAL	35
3.1.1	Zbiranje in shranjevanje kužnin	35
3.1.2	Laboratorijski pribor in oprema	35
3.1.3	Raztopine in reagenti (vse Seegen, S. Korea).....	35
3.2	METODE	36
3.2.1	Obdelava in priprava izmečka za molekularno diagnostiko atipičnih pljučnic	36
3.2.2	Izolacija nukleinskih kislin.....	36
3.2.3	Kvantifikacija nukleinskih kislin oz. proteinov.....	37
3.2.4	Seeplex® PneumoBacter ACE detection.....	38
3.2.4.1	Priprava osnovne zmesi za PCR	38

3.2.4.2	Agarozna gelska elektroforeza.....	39
3.2.5	BD BBL Crystal™ Identification Systems, Gram-Positive ID Kit (BD, ZDA) .	39
3.2.6	GenProbe® AccuProbe <i>Streptococcus pneumoniae</i> (Gen-Probe, San Diego, California, USA).....	40
4	REZULTATI	41
4.1	STRUKTURA PRIDOBLEJENIH VZORCEV (TIP, IZOLACIJA DNA, GOSTOTA).....	41
4.2	KVANTIFIKACIJA NUKLEINSKIH KISLIN OZ. PROTEINOV S QUBIT™ FLUOROMETROM	42
4.3	PCR-METODA - SEEPLEX® PNEUMOBACTER ACE DETECTION	43
4.4	REZULTATI AGAROZNE GELSKE ELEKTROFOREZE	44
4.5	BD BBL CRYSTAL™ IDENTIFICATION SYSTEMS, GRAM-POSITIVE ID KIT	48
4.6	GenProbe® AccuPROBE <i>Streptococcus pneumoniae</i>	50
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	52
5.1	RAZPRAVA	52
5.2	SKLEPI	56
6	POVZETEK.....	57
7	VIRI.....	59
	ZAHVALA	
	PRILOGA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Razmerje delovne raztopine in vzorca.....	37
Preglednica 2: Sestava osnovne zmesi za PCR	38
Preglednica 3: PCR-program.....	39
Preglednica 4: Rezultati PCR na agaroznem gelu	44

KAZALO SLIK

Slika 1: Življenjski krog bakterije <i>Legionella pneumophila</i> v praživali in v človeškem makrofagu (Fields, 2002)	5
Slika 2: Izgled kolonije bakterije <i>Legionella pneumophila</i> na gojišču BCYE (EMLab P&K)	6
Slika 3: Test za dokazovanje topnega antiga v urinu (BinaxNOW <i>Legionella</i>).....	7
Slika 4: Življenjski krog bakterije <i>Chlamydophila pneumoniae</i> in izgled elementarnih - EB in retikularnih teles - RB (Nature Reviews Microbiology).....	10
Slika 5: Tvorba tesnih stikov med bakterijo <i>Mycoplasma pneumoniae</i> in gostiteljskim epitelom (J. L. Jordan in D. C. Krause, 2004).....	14
Slika 6: Celice bakterije <i>Bordetella pertussis</i> pod elektronskim mikroskopom (povečava 5000×)	17
Slika 7: Izgled kolonij <i>Haemophilus influenzae</i> na krvnem agarju z dodanimi rastnimi hormoni (microbiologyinpictures.com)	21
Slika 8: Hemoliza <i>Streptococcus pneumoniae</i> na krvnem agarju (microbelibrary.org).....	25
Slika 9: Potek verižne reakcije s polimerazo (flmnh.ufl.edu)	30
Slika 10: Potek kvantifikacije nukleinskih kislin (po navodilih proizvajalca Invitrogen) ..	38
Slika 11: Delež vzorcev posamezne kužnine [%]	41
Slika 12: Izmerjene koncentracija DNA v vzorcu [ng/ml]	42
Slika 13: Agarozni gel, ki predstavlja značilne pozicije fragmentov v odvisnosti od velikosti fragmenta DNA v vzorcu	43
Slika 14: Grafična predstavitev rezultatov odčitavanja na agarzonem gelu.....	47
Slika 15: Primer identifikacije streptokokov z metodo BD BBL Crystal™ Identification System	48
Slika 16:Primer izpisa pri izvajanju metode GenProbe® AccuProbe <i>Streptococcus pneumoniae</i>	50

KAZALO PRILOG

Priloga A: Nabor vzorcev, tipi kužnin in gostota DNA v vzorcu

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AE	pufer
ATPaza	adenozintrifosfataza
AW2	pufer
<i>B. pertussis</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
bp	bazni par
BYCE	<i>angl.</i> buffered charcoal yeast extract
<i>C. pneumoniae</i>	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>
DIF	neposredna imunofluorescencija (<i>angl.</i> direct immunofluorescence)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dsDNA	dvostransna deoksiribonukleinska kislina
EB	elementarno telesce (<i>angl.</i> elementary body)
EIA	enzimski-imunski test (<i>angl.</i> enzyme immunoassay)
FHA	nitasti hemaglutinin
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
HEp-2	celične linije
HIB	<i>Haemophilus influenzae</i> serotip B
Hyl	hialuronat liaza
IFA	posredna fluorescencija protiteles (<i>angl.</i> indirect fluorescent antibody assay)
IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IHC	imunohistokemijske metode (<i>angl.</i> immunohistochemistry)
KA	krvi agar
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
MIF	mikroimunofluorescenca
<i>M. pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> odporen proti antibiotiku meticilinu (<i>angl.</i> methicillin resistant <i>S. aureus</i>)
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid

NALC	N-acetil L-cistein
NanA, NanB	neuroaminidaza
<i>P. pentosaceus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
PBS	fosfatni pufer
PCR	verižna reakcija s polimerazo (<i>angl.</i> polymerase chain reaction)
PRN	pertaktin
PsaA	površinski antigen A
PT	pertusis toksin
Pyl	pneumolizin
QF	izmerjena vrednost
RB	retikularno telesce (<i>angl.</i> reticulate body)
RLU	relativna enota luminiscence (<i>angl.</i> relative luminescence unit)
RNA	ribonukleinska kislina
RVK	reakcija vezave komplementa
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>S. intermedius</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>S. oralis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. sanguis group</i>	<i>Streptococcus sanguis group</i>
TSA	<i>angl.</i> tryptase soy agar
V	faktor V
X	faktor X
ZBP	zunajbolnišnična pljučnica

1 UVOD

Večina bakterij živi s človekom v ravnovesju, od nekaterih imamo celo koristi. Med škodljivimi bakterijami pa ločimo take, ki povzročijo bolezen samo ob določenih pogojih in druge, ki praviloma vedno povzročijo okužbo.

Protimikrobna zdravila so pomembno prispevala k napredku medicine in premagovanju kužnih bolezni. Od njihove uvedbe v 40-ih letih prejšnjega stoletja do danes so bistveno znižala obolenost in smrtnost bolnikov. Zaradi njihove nesmotrne in pretirane uporabe pa se je med mikroorganizmi pojavila odpornost proti protimikrobnim zdravilom. Mikroorganizmi lahko razvijejo odpornost proti posamičnemu protimikrobnemu zdravilu, proti skupini sorodnih protimikrobnih zdravil ali proti večim skupinam protimikrobnih zdravil (European Centre for Disease Prevention and Control, 2010).

Antibiotiki, znani tudi kot protimikrobna zdravila, so zdravila, ki lahko ubijejo bakterije ali zaustavijo njihovo rast in s tem ozdravijo okužbe pri ljudeh, živalih in včasih tudi pri rastlinah. Prekomerna in neustrezna raba antibiotikov ne samo pospešuje razvoj odpornih mikroorganizmov, ampak tudi posledično povečuje obolenost in smrtnost, toksičnost antibiotikov, podaljšuje bolnišnično zdravljenje bolnikov in zvišuje stroške zdravljenja (Tunger in sod., 2000). Da bi zmanjšali širjenje odpornosti bakterij proti antibiotikom je najpomembnejše vedeti, ali gre v resnici za okužbo in ali je določeno bolezen mogoče ozdraviti z antibiotikom, poznati moramo povzročitelja okužbe ter njegovo občutljivost za antibiotike. Povzročitelja okužbe in občutljivost bakterij za antibiotike lahko ugotovljamo s klasično bakteriološko diagnostiko s pomočjo gojenja. Posledično lahko s pridobljenimi podatki izberemo najprimernejši antibiotik za zdravljenje. Pomembno je, da bolnik vedno zaužije predpisane odmerke zdravila v predpisanih časovnih intervalih, ne glede na to, ali se po prvih odmerkih počuti bolje, in da nikoli ne zaužije antibiotikov, ki so bili predpisani nekomu drugemu (European Centre for Disease Prevention and Control, 2010). Pogosti vzroki za neustrezno rabo antibiotikov v bolnišnicah so premajhna uporaba diagnostičnih testov in neupoštevanje navodil za omejevanje bolnišničnih okužb (Guven, 2003).

Bakterijske povzročitelje okužb lahko določimo tudi z uporabo molekularnih metod, ki se vse bolj uveljavljajo v diagnostičnih mikrobioloških laboratorijih. Ena takih metod je

verižna reakcija s polimerazo (*angl. polymerase chain reaction - PCR*), s katero lahko v kratkem času sintetiziramo veliko število kopij DNA. Bistvena prednost molekularnih pred klasičnimi tehnikami identifikacije z ustaljenimi postopki gojenja bakterij je ta, da zadostuje že zelo majhna količina DNA v vzorcu. PCR-metoda nam je v pomoč pri ugotavljanju povzročiteljev atipičnih in virusnih pljučnic, za katere so metode klasične bakteriologije in virologije dolgotrajne in počasne. Nekaterih bakterijskih povzročiteljev namreč ne moremo gojiti na običajnih gojiščih, oziroma je njihovo gojenje dolgotrajno. PCR-metoda nam omogoča etiološko diagnostiko v začetni fazи bolezni (Mušič in Tomič, 1999; Template in sod., 2005; Korošec in sod., 2004). Poleg tega je PCR dovolj občutljiva metoda in ponovljiva, z njo pa zmanjšamo tudi verjetnost človeške napake.

Okužbe dihal se uvrščajo med najpogosteja obolenja. Čeprav zunajbolnišnično pljučnico (ZBP) lahko povzročajo številni povzročitelji, večino primerov ZBP povzroči le omejeno število mikroorganizmov. Najpogosteji povzročitelj je bakterija *Streptococcus pneumoniae* (40–68 % primerov), sledi *Haemophilus influenzae* (5–10 %), manj pogosti povzročitelji so *Mycoplasma pneumoniae*, virusi, legionele, *Chlamydophila pneumoniae*, aerobni, po Gramu negativni bacili, *Staphylococcus aureus* in proti meticilinu odporen *S. aureus* domačega okolja (*angl.methicillin-resistant S. aureus - MRSA*). V do 25 % primerih ostane povzročitelj okužbe nepojasnen (Höffken in sod, 2009; Forgie, 2009). Pnevmostiki so vodilni povzročitelji bakterijske pljučnice, gnojnega meningitisa, bronhitisa, vnetja obnosnih votlin, vnetja srednjega ušesa, peritonitisa, bakteriemije in sepse ter so najpogosteji vzrok umrljivosti po celi svetu (Fine in sod., 1996).

1.1 NAMEN DELA

Z našo raziskavo želimo ugotoviti uporabnost komercialnega PCR-testa Seeplex® PneumoBacter ACE Detection (Seegen, J. Koreja) za dokazovanje prisotnosti tipičnih in atipičnih povzročiteljev pljučnice. Želeli smo ugotoviti, ali je metoda zanesljiva, dovolj občutljiva in specifična za identifikacijo *S. pneumoniae* in razlikovanje te vrste od drugih zelenečih streptokokov. Želimo tudi ugotoviti, kakšne so prednosti hkratne PCR-metode v primerjavi z rutinskimi laboratorijskimi metodami določanja respiratornih patogenov.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- a) PCR-metoda Seeplex® PneumoBacter ACE Detection za diagnosticiranje tipičnih in atipičnih povzročiteljev pljučnice je specifična in občutljiva metoda za diagnostiko okužb dihal.
- b) Z metodo Seeplex® PneumoBacter ACE Detection lahko razlikujemo med patogeni: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* in *Bordetella pertussis*.
- c) PCR-metoda Seeplex® PneumoBacter ACE Detection je vrstno specifična za *S. pneumoniae*.

2 PREGLED OBJAV

V nadaljevanju so najprej izpostavljeni atipični povzročitelji, *Bordetella pertussis* in nazadnje tipična povzročitelja pljučnice.

2.1 *Legionella pneumophila*

Vrsta *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) je takoj za pnevmokoki druga najpogostejsa povzročiteljica pljučnice. Glavni rezervoar bakterije *L. pneumophila* v okolju je voda. Do okužbe privede vdihavanje aerosola iz okuženega vodnega vira, na primer klimatske naprave ali vodovoda. Prenos okužbe s človeka na človeka ni dokazan (Fields in sod., 2002).

2.1.1 Taksonomska uvrstitev

Bakterija *Legionella* kot edini rod sodi v družino *Legionellaceae*, red *Legionellales*, razred gama proteobakterije, deblo *Proteobacteria*, to pa v domeno *Bacteria* (Benson in Fields, 1998; Fry in sod., 1991). V družini *Legionellaceae* poznamo 48 vrst, ki zajemajo 70 različnih serotipov. Približno 80 % dokazanih okužb z legionelo povzroča *L. pneumophila* serotip 1 (Benson in Fields, 1998).

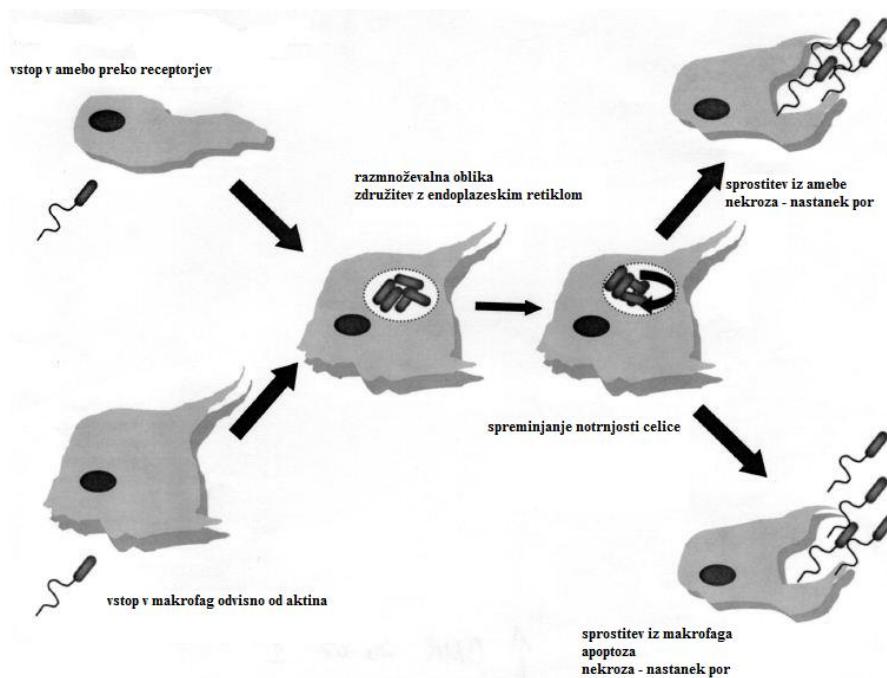
2.1.2 Morfologija in zgradba

L. pneumophila je majhen, aeroben, po Gramu negativen bacil, ne tvori spor in se premika s pomočjo enega ali več polarnih ali subpolarnih bičkov. Legionele so vitke, pleomorfne oblike, merijo 0,3–0,9 µm v širino in 2 µm v dolžino (Fields in sod., 2002). Večina legionel proizvaja β-laktamazo in utekočinja želatino, vir ogljika zanje pa predstavlja presnova aminokislin. Legionele so katalaza, nitratna redukcija in ureaza negativne (Pine in sod., 1979).

2.1.3 Patogeneza

Dva poglavitna dejavnika patogenosti bakterije *L. pneumophila* sta specifičen življenjski krog bakterije in virulentni dejavniki, ki ga omogočajo. Če poznamo gen, ki je odgovoren za virulentni dejavnik, lahko prisotnost gena zaznamo z molekularnimi metodami. Za legionele je značilno, da se razmnožujejo znotrajcelično, tako v praživalih kot tudi v celicah sesalcev. Raziskovalec Horwitz in sodelavci so že v 80ih letih razjasnili potek

razmnoževanja bakterije *L. pneumophila* v človeškem fagocitu. Opisali so, kako bakterija vstopi v fagocit s fagocitozo, in tvori unikaten fagosom. Nastali fagosom se ne zlige z lizosomom in niti ne zakisa svoje notranjosti, spremeni se membrana, zato tudi ne sledi običajni endosomalni poti (Horwitz, 1983 in 1984). Bakterija je znotraj celice zaščitena pred neugodnim zunanjim okoljem, predvsem pred imunskim odzivom gostitelja. V zadnji fazici, ko pride do propada gostiteljske celice, se legionele iz fagocita sprostijo v procesu apoptoze oziroma nekroze. Sprostitev patogena iz makrofagnih in alveolarnih epitelialnih celic predstavlja začetno fazo okužbe z legionelo. Življenjski krog bakterije *L. pneumophila* prikazuje slika 1.



Slika 1: Življenjski krog bakterije *Legionella pneumophila* v praživali in v človeškem makrofagu (Fields, 2002)

2.1.4 Bolezen in klinični znaki

Bakterija *L. pneumophila* povzroča sporadične, epidemične zunajbolnišnične in bolnišnične okužbe. Klinična slika je neznačilna, diagnostični testi pa so omejeni. Na okužbo z bakterijo *L. pneumophila* posumimo pri bolniku s težko pljučnico, ki jo spreminja istočasna prizadetost drugih organskih sistemov. Na rentgenogramu prsnih organov je pogost alveolarni tip infiltrata. Med laboratorijskimi izvidi najdemo, poleg povišanih vnetnih parametrov, pogosto tudi patološke jetrne teste in elektrolitske motnje, zlasti

hiponatremijo (Fields in sod., 2002). Izbruhi okužb z legionelo se pojavljajo pozno poleti in jeseni. Okužbe brez vidnih simptomov so redke. Najbolj pogoste so okužbe pljuč, ki se izražajo kot gripi podobna bolezen (vročica Pontiac), oziroma pljučnica (Legionarska bolezen). Legionarska bolezen je pljučnica, ki brez zdravljenja z antibiotiki hitro napreduje. Inkubacija traja 2–10 dni. Smrtnost je velika tudi pri ljudeh, ki so bili pred bolezni popolnoma zdravi. Pontiaška vročica je po epidemioloških posebnostih podobna legionarski bolezni. Razlika je v širjenju okužbe, saj se pri vročici Pontiac okužijo skoraj vsi, ki pridejo v stik z bakterijo. Bolezen ni smrtno nevarna. Pontiaška vročica premine sama po sebi brez antibiotičnega zdravljenja (Murry in sod., 2009).

2.1.5 Laboratorijska diagnostika

Bakterijo *L. pneumophila* lahko izoliramo iz vzorca krvi, pljučnega tkiva, zgornjih dihalnih poti, izmečka in bronhoalveolarne izpirke ter blata (Edelstein, 1987). Barvanje legionel po Gramu ni dovolj kontrastno, ker gre za majhne, komaj razpoznave intracelularne bakterije. Pomagali bi si lahko z nespecifičnim Dieterle srebrnim barvilom, vendar je ta način barvanja bolj uporaben v histologiji za barvanje okuženih tkiv. Zato pri diagnostiki okužbe z *L. pneumophila* najpogosteje uporabljam gojitev na gojišču, encimskoimunske metode, serološke metode in vedno pogosteje tudi molekularne metode.

2.1.5.1 Kultura

Dokaz bakterije *L. pneumophila* v kulti na gojišču BCYE (*angl. buffered charcoal yeast extract*) je zlati standard in najbolj specifičen diagnostični postopek. Zaradi dodanega oglja je gojišče črne barve, v gojišču je prisotna tudi aminokislina L-cistein in železove soli (Fields, 1992). Najbolj optimalna temperatura za razmnoževanje je 35 °C, kjer *L. pneumophila* v 3 do 5ih dneh oblikuje drobne kolonije, ki so po videzu podobne delcem brušenega stekla (Fields in sod., 2002). Izgled kolonij je prikazan na sliki 2. Za potrebe zgodnjega ciljanega zdravljenja je ta način detekcije predolgotrajen, občutljivost zaznavanja nizkih



Slika 2: Izgled kolonije bakterije *Legionella pneumophila* na gojišču BCYE (EMLab P&K)

koncentracij bakterije, prisotne v bolnikovih dihalih, pa nizka.

2.1.5.2 Neposredna imunofluorescensa (angl. direct immunofluorescence – DIF)

Neposredna fluorescensa z uporabo poliklonskih protiteles je bila prva metoda za dokazovanje legionel v pljučnem tkivu in izločkih dihal. Z DIF-metodo označevanja lahko zaznamo legionelo v izločkih dihal še par dni po tem, ko je bolnik že pričel s protimikrobnim zdravljenjem. Zaradi tehnično zahtevnega postopka priprave poliklonskih protiteles, ki fluorescirajo, lahko z DIF-metodo določimo le omejeno število serotipov bakterije *L. pneumophila* in drugih vrst legionel. Kadar uporabljam poliklonska protiteesa, pogosto naletimo na lažne pozitivne rezultate, do katerih pride zaradi navzkrižnih reakcij z drugimi bakterijami (Orrison in sod., 1983). Kadar sumimo, da povzročitelj ni *L. pneumophila* oziroma gre za preučevanje epidemije, je priporočljivo, da zaradi navzkrižnih reakcij v diagnostiki ne uporabljam poliklonskih protiteles (Maiwald in sod., 1998). Bolj specifična so monoklonska protiteesa, ki reagirajo z zunanjemembrano bakterije *L. pneumophila* in lahko z njimi potrdimo prisotnost bakterije tudi v kliničnih vzorcih.

2.1.5.3 Dokaz topnega antiga v urinu

Rezultate testov za dokazovanje antiga bakterije *L. pneumophila* v urinu dobimo v zelo kratkem času. Metoda tako omogoča zgodnjo diagnozo okužbe in začetek ustreznega protimikrobnega zdravljenja (Kashuba in Ballow, 1996). Dokaz topnega antiga v urinu je zelo občutljiva in tudi specifična metoda. Test je pozitiven le v primeru okužbe z *L. pneumophila* serotipa 1, ki ga določa specifični lipopolisaharidni antigen. Kljub temu test veliko doprinese k diagnostiki v kliničnih laboratorijih, saj je *L. pneumophila* serotipa 1 vzrok bolezni v 80–90 % okužb z legionelami. Antigen legionele v urinu je mogoče zaznati tudi



Slika 3: Test za dokazovanje topnega antiga v urinu (BinaxNOW Legionella)

po 1 mesecu, v vzorcu pa se ob dolgotrajnem in napačnem shranjevanju razgradi. Zaradi neustreznega shranjevanja lahko dobimo lažno negativne rezultate (Fields in sod., 2002; Murdoch, 2003). Komercialno dostopen test, ki ga uporablajo v Laboratoriju za respiratorno mikrobiologijo Bolnišnice Golnik, prikazuje slika 3.

2.1.5.4 Serološke metode

Bakterijo *L. pneumophila* serotipa 1 pogosto določamo z uporabo encimskoimunskega testa (*angl. enzyme immunoassay - EIA*) ali s posrednim imunofluorescenčnim testom (*angl. indirect immunofluorescent antibody assay - IFA*). Serološke metode imajo visoko specifičnost in občutljivost. Izvedba posameznih testov je sorazmerno enostavna. Za pozitivni rezultat velja titer $\geq 1:256$ ali štirikratni porast titra v parnem serumu. Pri legionelah dokazanih v kulturi lahko štirikratni porast titra pričakujemo le pri 70–80 % bolnikov, do serokonverzije pa lahko pride tudi šele dva meseca po pričetku bolezni (Fields in sod., 2002; Murdoch, 2003). Serološke metode niso primerne za diagnostiko bolnikov v akutni fazi bolezni, so pa dobre za epidemiološke namene.

2.1.5.5 Molekularne metode – verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Dokaz zgodnje faze okužbe z bakterijo *L. pneumophila* je bistven v nadaljnem zdravljenju bolezni in okrevanju bolnika. Uvajanje tehnike pomnoževanja nukleniskih kislin prinaša nove možnosti za hitro ugotavljanje povzročitelja okužbe. V zgodnji fazi okužbe je PCR-metoda s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi vsaj tako uporabna kot določanje antigena legionele v urinu (Eržen in sod., 2007). Z obema metodama lovimo vrh koncentracije antigena bakterije *L. pneumophila*, ki je pogosto med petim in desetim dnem po začetku bolezni (Lindsay in sod., 2004). PCR-metoda za legionele še ni popolnoma standardizirana in jo uporablajo le v nekaterih laboratorijih. Pri standardizaciji postopka protimikrobno zdravljenje pomembno vpliva na kakovost kužnin iz dihal. Če je protimikrobno zdravljenje ustrezno in bakterije v kužninah ne preživijo, jih kljub temu lahko zaznamo s PCR-metodo. Pri dokazu povzročitelja v kužninah, pridobljenih iz spodnjih dihal, ima PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za bakterijo *L. pneumophila* večjo ali vsaj enako občutljivost kot kultura (Jaulhac in sod., 1992).

2.2 *Chlamydophila pneumoniae*

Chlamydophila pneumoniae (*C. pneumoniae*) je patogena bakterija, ki povzroča akutne okužbe dihal in je povzročiteljica 6 do 34 % doma pridobljenih pljučnic, faringitisa in bronhitisa (Orr in sod., 1996). Človek je edini poznan rezervoar. Bakterija se prenaša s človeka na človeka preko aerosola z respiratornimi izločki.

2.2.1 Taksonomska uvrstitev

Po Gramu negativno bakterijo *C. pneumoniae* (ali staro poimenovanje: *Chlamydia pneumoniae*) uvrščamo v družino *Chlamydiaceae*, red *Chlamydiales* (Everett, 2000). Bakterijo *C. pneumoniae* so prvič opisali kot novo vrsto rodu *Chlamydia* pred dobrimi dvajsetimi leti (Grayston in sod., 1989), ter jo premestili v rod *Chlamydophila* leta 1999 (Everett in sod., 1999). Rod *Chlamydophila* vsebuje kar tri vrste, ki lahko okužijo človeka: *Chlamydophila trachomatis* (*C. trachomatis*), *Chlamydophila psittaci* (*C. psittaci*) in *C. pneumoniae*.

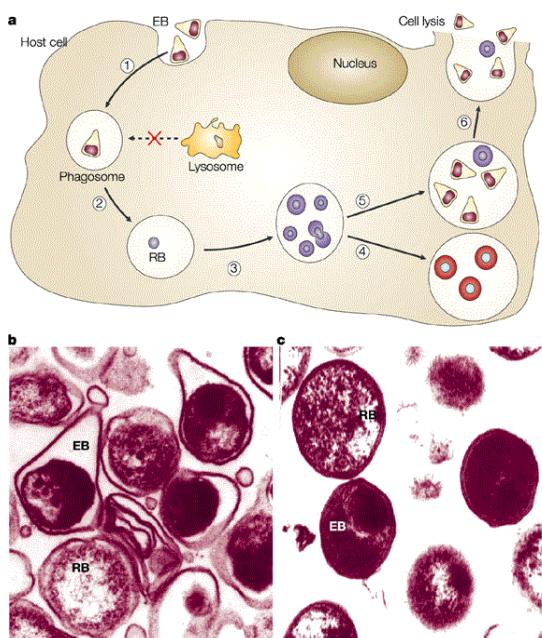
2.2.2 Morfologija in zgradba

C. pneumoniae je bakterija velikosti 0,2–1 µm in je obvezni znotrajcelični parazit, ki ima edinstven razvojni krog (Peeling in sod., 1996). Prav zaradi te lastnosti je bila pogosto napačno uvrščena med viruse. Kasneje so ugotovili, da ima *C. pneumoniae* obe vrsti nukleinskih kislin – DNA in RNA, celično steno, ki je podobna po Gramu negativnim bakterijam in da se razmnožuje tudi zunaj gostitelja – z delitvijo (Schachter, 1978). Posebnost bakterije *C. pneumoniae* je tudi, da v svoji celični steni ne vsebuje peptidoglikana, kljub temu da ima bakterija gene za skoraj popolno sintezo peptidoglikana, vključno s penicilin vezavnimi proteini (Rockey in sod., 2000).

2.2.3 Patogeneza

Bakterija *C. pneumoniae* ima edinstveni razvojni krog, kjer se pojavljata dve funkcionalno in morfološko popolnoma različni oblici in je prikazan na sliki 4. Med gostitelji prehaja bakterija v obliki elementarnega telesca, biološko neaktivnega stanja, ki je podobno kot spore kos neugodnim razmeram v okolju. Ko pride elementarno telesce v pljuča, s fagocitozo preide v celice in ostane v znotrajcelični vakuoli, imenovani inkluzija.

Fagosom prepreči zlitje z lizosomom in tako se klamidije izognejo razgradnji (Keše, 2002). V inkluziji se nato elementarno telesce pretvori v retikularno telesce. Retikularno telesce je



Slika 4: Življenjski krog bakterije *Chlamydophila pneumoniae* in izgled elementarnih - EB in retikularnih teles - RB (Nature Reviews Microbiology)

znotrajcelična oblika organizma in je večje od elementarnega. Znotraj endosoma je retikularno telesce sposobno razmnoževanja - cepitve. Retikularno telesce je metabolno aktivna, a neinfektivna oblika (Moulder, 1993). Po namnožitvi retikularnih teles, se del le-teh preobrazi nazaj v elementarna telesca, ki se sprostijo iz celice, kar navadno povzroči smrt gostiteljske celice. Elementarna telesca okuži druge celice v neposredni okolici ali pa se izloči in preko aerosola okuži drugega gostitelja (Kuo in sod., 1995).

2.2.4 Bolezen in klinični znaki

Bakterija *C. pneumoniae* se lahko razmnožuje v endotelnih celicah, gladkih mišičnih celicah, makrofagih in limfocitih. Povezujemo jo z akutnimi kot tudi kroničnimi boleznimi. Okužbe dihal z bakterijo *C. pneumoniae* povezujemo s pojavom pljučnice in bronhitisa. Pljučnica je navadno dvostopenjska, prične se s hripavastjo in faringitisom, nato pa nadaljuje v milejšo obliko bolezni s stalnim suhim kašeljem, brez povišane telesne temeprature. Kadar se okužba razvije v resno obliko pljučnice, na primer pri starostnikih, je potrebno bolnišnično zdravljenje (Kuo in sod., 1995). Okužbe dihalnih poti najpogosteje prizadenejo le eno pljučno krilo in jih glede na klinično sliko težko razlikujemo od okužb, ki jih povzročijo drugi atipični povzročitelji in respiratorni virusi. Bakterijo *C. pneumoniae* povezujejo tudi z nastanjem vnetnih plakov v krvožilju, z aterosklerozo, vendar natančna vloga organizma v tem procesu še ni razjasnjena (Saikku in sod., 1992; Thom in sod., 1992).

2.2.5 Laboratorijska diagnostika

Ker je *C. pneumoniae* obligatno intracelularna bakterija, za potrebe gojenja potrebujemo gostiteljske evkariotske celice – celične kulture. Organizem ne raste v celičnih linijah, ki jih navadno uporabljamo za izolacijo *C. trachomatis*, ampak na HEp-2 celičnih linijah, uporaba teh pa je v kliničnih in raziskovalnih laboratorijih dokaj redka. Za določanje bakterij *C. pneumoniae* v kužinah lahko uporabljamo serološke, imunološke in molekularne metode.

2.2.5.1 Serološke metode

Serološke metode, ki bi v celoti zagotavljala odkrivanje okuže s *C. pneumoniae*, ni. Reakcija vezave komplementa (RVK), imunofluorescencija celičnih inkluzij in encimskoimunski testi (angl. enzyme immunoassay - EIA) niso najbolj optimalne izbire diagnostičnih metod. Pri metodi RVK lahko pride do navzkrižnih reakcij med različnimi vrstami klamidij in nekaterimi vrstami enterobakterij. Občutljivost metode je nizka pri ponavlajočih okužbah, reagenti pa pogosto niso na voljo. Metoda imunofluorescence inkluzij je dosegljiva v obliki komercialnih testov, vendar ti niso vrstno specifični (Wang, 1999). Metoda EIA je še najbolj obetavna. Obstaja več komercialnih testov, vendar občutljivost in specifičnost testov nista najboljši (Kutlin in sod., 1997). V mikrobioloških laboratorijih se najpogosteje uporablja mikroimunofluorescencija (angl. microimmunofluorescence - MIF) kot "zlati standard" za identifikacijo akutne okužbe z bakterijo *C. pneumoniae*, saj je metoda MIF označena kot trenutno najbolj specifična in najobčutljivejša. Na objektna stekelca so nanešena in vezana prečiščena elementarna telesca treh vrst klamidij: *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* in *C. psittaci*. Elementarna telesca morajo biti dobro očiščena in obdelana, ker s tem zmanjšamo možnost navzkrižnih reakcij. S testom MIF določamo vrstno specifična protitelesa, ki se vežejo na beljakovine zunanje membrane. S pomočjo MIF dokazujemo prisotnost protiteles IgA, IgG in IgM in glede na porast posamezih protiteles ugotavljamo okužbo s *C. pneumoniae*. Za potrjeno akutno okužbo velja 4-kratni porast titra protiteles IgG ali titer protiteles IgM $\geq 1:16$ v parnih serumih, ki so odvzeti v razmiku 4 do 8 tednov. Za možno akutno okužbo pa velja titer protiteles IgG $\geq 1:512$ (Dowell in sod., 2001). Kot pri bakteriji *L. pneumophila* serološke metode ne uporabljamo za diagnostiko akutno bolnih ampak za epidemiološke namene.

2.2.5.2 Imunološke metode – imunohistokemija

S pomočjo imunohistokemijske metode (*angl. immunohistochemistry – IHC*) lahko natančno določimo lokacijo *C. pneumoniae*. Navadno so za okužbo z bakterijo dovetni makrofagi, endotelne celice in celice gladkega mišičevja (Kuo in Campbell, 2000).

2.2.5.3 Molekularne metode – verižna reakcija s polimerazo (PCR)

PCR-metoda s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za določanje bakterije *C. pneumoniae* je bila še pred kratkim redko uporabljeni v laboratorijski praksi. Za molekularno diagnostiko potrebujemo primeren vzorec, kot npr. bris žrela, bronhoalveolarni izpirek, izmeček ali celo košček tkiva. Molekularna diagnostika – PCR-metoda, je najbolj obetavni hitri test za diagnostiko bakterije *C. pneumoniae*, vendar je v veliko laboratorijih v fazi testiranja (Nolte, 2008). V študiji, ki primerja PCR-metodo s serološkimi testi, je PCR sicer manj občutljiva, a bolj specifična metoda (Hvidsten in sod., 2009).

2.3 *Mycoplasma pneumoniae*

Mycoplasma pneumoniae (*M. pneumoniae*) je humani patogen, ki povzroča bolezni dihal nepovezano z letnim časom. Zaradi drugih povzročiteljev (npr. *S. pneumoniae* in virusi), ki so v prevladi med zimo, je pojav okužb z *M. pneumoniae* izrazitejši poleti in jeseni. Epidemije atipičnih pljučnic, ki jih povzroča *M. pneumoniae* se pojavljajo na vsakih 4 do 8 let. Okužba z bakterijo *M. pneumoniae* je pogostejša pri šoloobveznih otrocih v starosti 5–15 let, vendar se lahko s kapljičnim prenosom razširi na vse starostne skupine (Murray in sod., 2009).

2.3.1 Taksonomska uvrstitev

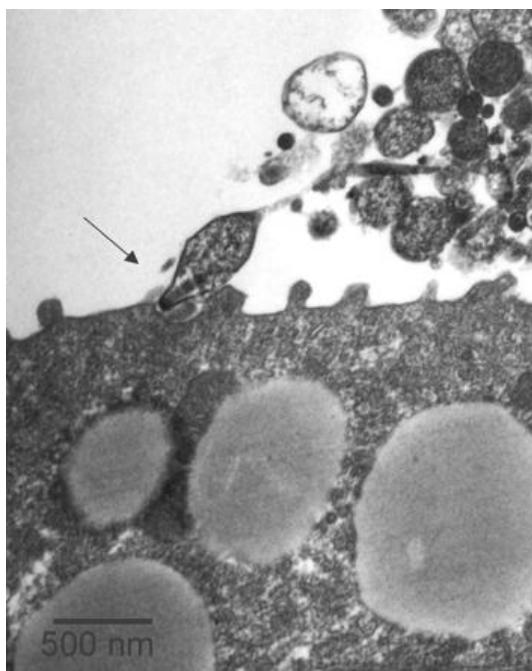
M. pneumoniae pripada družini *Mycoplasmataceae*, redu *Mycoplasmataceae*, razredu *Mollicutes*, ki je uvrščen v deblo *Firmicutes*, to pa v domeno *Bacteria* (Johansson in Pettersson, 2002). Ime razreda *Mollicutes* izvira iz latinskih besed *mollis* – mehek in *cutis* – koža, kar predstavlja glavno značilnost razreda – odsotnost celične stene.

2.3.2 Morfologija in zgradba

Mikoplazme so najmanjši živeči mikroorganizmi, ki so zmožni samostojne rasti in samostojnega podvojevanja DNA, kar jih ločuje od virusov. Za razliko od drugih bakterij, mikoplazme nimajo celične stene. Oblika mikoplazem variira od pleomorfne 0,2–0,3 µm velike okrogle oblike do ovalne oblike široke 0,1–0,2 µm in dolge 1–2 µm. *M. pneumoniae* hruškaste oblike je sposobna polzenja po mokrih površinah. Mnoge oblike mikoplazem lahko prehajajo filtre z 0,45 µm mrežo, ki odstranjujejo bakterije, zato se je sprva predvidevalo, da so ti mikroorganizmi virusi. Mikoplazemske celice so, kljub temu da nimajo celične stene, tipično prokariontske; sestavljeni so iz celične membrane, ki vsebuje sterole za večjo trdnost, ribosomov in krožne dvostranske molekule DNA (Murray in sod., 2009; Razin in Oliver, 1961). Za rast nujno potrebujejo holesterol, ki ga same ne sintetizirajo, pomemben pa je za fluidnost membrane. Vir holesterola so membrane gostiteljevih celic. Zaradi odsotnosti celične stene je *M. pneumoniae* občutljiva za osmotski šok in detergente. Odporna je proti penicilinom, cefalosporinom, vankomicinu in drugim antibiotikom, ki delujejo na sintezo celične stene, saj ta bakterija celične stene nima in tako s takšnimi antibiotiki ne moremo omejevati razmnoževanja te bakterije (Ihan, Avšič, 2000).

2.3.3 Patogeneza

Mikoplazme so primarno patogene bakterije, ki jih najdemo na sluznicah. Parazitski odnos in tesne povezave z gostiteljivimi epitelnimi celicami v dihalnih poteh, spolovilih in sečilih omogočajo preživetje bakterije. *M. pneumoniae* povzroča 10–20 % primerov zunajbolnišničnih pljučnic (Loens, Goossens, 2003). Bakterija *M. pneumoniae* se prenaša med gostitelji preko kužnih kapljic oz. aerosola. V nosni votlini pride najrej v stik s celicami nosne in nato žrelne sluznice, sledi sluznica spodnjih dihal in mononuklearne celice (Marolt-Gominšček in Radšel-Medvešček, 2002). *M. pneumoniae* se veže na epitelne celice s površinskimi proteini P1 preko receptorske vezave in se po vezavi na podlago začne množiti. Tesni stiki bakteriji omogočajo uspešno kljubovanje obrambnim mehanizmom mukociliarnega epitela - "čiščenju". Na mestu pritrditve kolonije bakterije *M. pneumoniae* proizvajajo snovi s citotoksičnim učinkom (Talkington in sod., 2001).



Slika 5: Tvorba tesnih stikov med bakterijo *Mycoplasma pneumoniae* in gostiteljskim epitelom (J. L. Jordan in D. C. Krause, 2004)

Mikoplazme veljajo za zunajcelične patogene, vendar v zadnjih letih znanstveniki ugotavljajo, da se lahko nekatere vrste mikoplazem zlijejo z gostiteljevo celico, kar pa ni videti kot tipična fagocitoza. Ta pojav prikazuje slika 5. Ugotovitve niti niso tako presenetljive, ker mikoplazme nimajo rigidne celične stene in tako lažje tvorijo tesnejše stike v primerjavi z nekaterimi drugimi bakterijskimi vrstami (Rottem, 2002). Znotrajcelični obstoj bakterije *M. pneumoniae* omogoči vzpostavitev latentnih oziroma kroničnih okužb, ker se bakterija uspešno izogiba imunskemu sistemu gostitelja, lažje preči mukozno pregrado in dostopa do notranjih tkiv. Ta lastnost predstavlja številne težave pri zdravljenju in izkoreninjenju mikoplazem v kliničnem okolju (Talkington in sod., 2001; Rottem, 2002).

2.3.4 Bolezen in klinični znaki

Prvi namigi na atipičnega povzročitelja pljučnice so se začeli pojavljati, ko se v nekaterih primerih domnevna pnevmokokna pljučnica ni odzvala na zdravljenje s sulfonamidi ali penicilinom. Kasneje se je izkazalo, da bi bila lahko povzročiteljica pljučnice bakterija *M. pneumoniae*. Ker takrat še ni bila znana natančna etiologija bolezni, sta se med zdravniki in širšo javnostjo uveljavila izraza atipična pljučnica oziroma "walking pneumonia".

Bakterija *M. pneumoniae* lahko povzroča vnetje žrela, traheobronhitis, akutna poslabšanja astme in pljučnico. Znaki bolezni se postopoma razvijajo v obdobju nekaj dni, nato pa lahko vztrajajo več tednov do mesecev. Najpogosteji znaki bolezni so boleče grlo, hripavost, rahlo povišana telesna temperatura, kašelj, ki je lahko na začetku bolj suh, nato pa z večjimi količinami sluzi, glavobol, mrzlica, bolečine v ušesih in splošno slabo počutje (Talkington in sod., 2001). Bolniki pogosto izpostavijo bolečine v prsnem košu zaradi pogostega in dolgotrajnega kašljanja, ki je podobno oslovskemu kašlju (Clyde, 1979). Pri otrocih mlajših od 5 let je dokaj redko, da bi se nahod in piskanje v pljučih razvilo v pljučnico, medtem ko je pri otrocih med petim in petnajstim letom starosti verjetnejše, da se razvije bronhopneumonia, ki lahko zahteva tudi bolnišnično oskrbo (Ferwerda in sod., 2001). Pri odraslih poteka okužba z bakterijo *M. pneumoniae* povečini asimptomatsko ali kot blaga oblika pljučnice, pri starejših osebah pa je lahko bakterija pomemben vzrok za hudo pljučnico in bolnišnično zdravljenje.

2.3.5 Laboratorijska diagnostika

Mikoplazme se po Gramu barvajo negativno, vendar si na splošno z mikroskopijo težko pomagamo, ker zaradi odsotnosti celične stene mikroskopski preparati niso dovolj kontrastni. Poleg gojenja bi med neposredne metode dokazovanja *M. pneumoniae* lahko vključili tudi dokazovanje specifičnih antigenov in nukleinskih kislin. Za posredno dokazovanje bakterije *M. pneumoniae* si pomagamo z ugotavljanjem specifičnih protiteles v serumu bolnika.

2.3.5.1 Kultura

Izolacija bakterij *M. pneumoniae* iz dihal in drugih delov telesa je zahteven in drag postopek. Gojišča, na katerih rastejo bakterije, so draga in imajo kompleksno sestavo, pogosto so obogatena z živalskim serumom, poleg tega pa je rast kolonij na gojišču počasna in lahko traja nekaj tednov. Gojišča pogosto preraštejo bakterije normalne flore zgornjih dihal, kar dodatno prispeva k neprimernosti gojenja za diagnosticiranje okužb z bakterijo *M. pneumonia*. Kolonije se vraščajo v gojišče in imajo značilno obliko, podobno ocvrtemu jajcu. Kultura je redko uporabljena metoda v rutinski diagnostiki (Waites, Talkington, 2004).

2.3.5.2 Serološke metode

Dokazovanje okužb z bakterijo *M. pneumoniae* se navezuje na opazno močno povišano tvorbo protiteles. Viri navajajo, da je priporočljivo hkratno spremeljanje protiteles IgG in IgM v parnih serumih v razmaku 2–3 tednov, da z gotovostjo potrdimo okužbo (Thacker in Talkington, 2000). Kadar se titer protiteles poveča štirikratno ali več, lahko sklepamo na trenutno ali nedavno okužbo. Razne izjeme in odstopanja, kot so pozen dvig titra protiteles IgG in pomanjkanje protiteles IgM, otežijo dokazovanje okužbe z bakterijo *M. pneumoniae* z uporabo seroloških metod (Razin, 2002). Za diagnostiko akutno bolnih ne uporabljamo serološke diagnostike, ima pa večji pomen v epidemioloških raziskavah.

2.3.5.3 Molekularne metode - verižna reakcija s polimerazo (PCR)

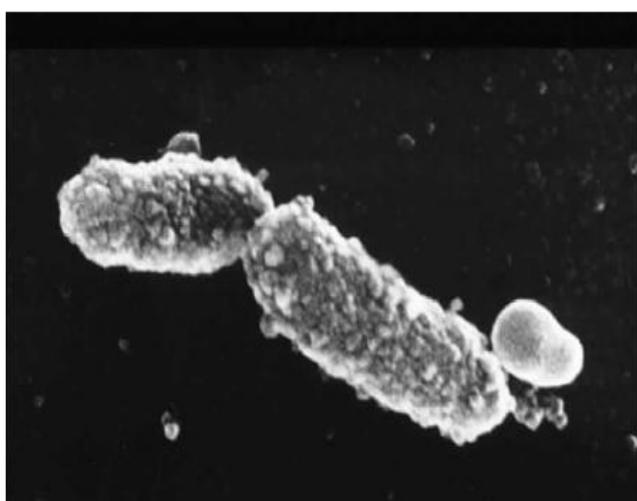
Razvoj molekularnih metod, kot je PCR-test s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi, je zmanjšal pomen bakterijskih kultur za dokazovanje bakterije *M. pneumoniae*. Za diagnostiko s PCR lahko uporabimo vse kužnine vključno z brisom žrela. Sedanja uporaba PCR-metode je različica postopka z začetnimi oligonukleotidi za gen encima ATPaze, ki ga je opisal Bernet leta 1989 (Bernet in sod., 1989). Druga uporabljenia zaporedja v PCR so tudi del zaporedaja gena za P1-adhezin in ohranjene regije podenote 16S rRNA (Kong in sod., 2000). Metoda je zelo občutljiva zaradi velikega števila podvojenih rRNA na posamezno celico mikoplazme. Metoda je uspešna tako pri dokazovanju živilih bakterij *M. pneumoniae* v kliničnih vzorcih, kot že mutiranih ali odmrlih bakterij (Daxboeck in sod., 2003).

2.4 *Bordetella pertussis*

2.4.1 Taksonomska uvrstitev

Po Gramu negativno bakterijo *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*) uvrščamo v družino *Alcaligenaceae*, red *Burkholderiales*, razred beta proteobakterije (Bergery in sod., 1932).

2.4.2 Morfologija in zgradba



Slika 6: Celice bakterije *Bordetella pertussis* pod elektronским mikroskopom (povečava 5000×)

Bordetela je izredno majhna bakterija velikosti $0,2\text{--}0,5 \times 1 \mu\text{m}$, po Gramu negativna in ima obliko kokobacila. *B. pertussis* je striktno aerobna, ima oksidazo in je ureaza, nitraza, citrat negativna. Zgradbo bakterije pod elektronskim mikroskopom prikazuje slika 6. Zaradi posebnih prehranskih potreb jo gojimo na gojišču Bordet-Gangou ali na agarju BCYE z dodanim cefaleksinom. Kolonije so majhne s perlastim leskom, na agarju

BCYE pa opazimo kolonije kot majhne kapljice s kovinskim leskom. Poleg genoma bakterije *Bordetella bronchiseptica* in *Bordetella parapertussis* je sekvenciran tudi celoten genom bakterije *B. pertussis* (Parkhill in sod., 2003).

2.4.3 Patogeneza

Bakterija *B. pertussis* je striktni humani patogen, ki povzroča obolenje dihal znano kot oslovski kašelj oziroma pertusis. Bolezen se razširja preko aerosola s človeka na človeka. Druge vrste bordetel so primarno živalski patogeni, ki lahko občasno povzročijo obolenja pri človeku. Oslovski kašelj je kljub obveznem cepljenju v otroštvu še vedno razširjen po celi svetu. Okužbi z bakterijo *B. pertussis* so najpogosteje podvrženi otroci do enega leta, lahko pa ugotovimo bolezen tudi pri starejših otrocih in odraslih. Če bakterije prodrejo do pljuč, povzročijo pljučnico. S toksini, ki jih izločajo lahko ciliarni epitel tudi uničijo. Bakterija se veže specifično na migetalčni epitel dihalnih poti, kjer sintetizira

toksin, ki paralizira migetalke. Migetalčno dvigalo je tako onemogočeno, kar povzroči nabiranje goste sluzi (Centers for Disease Control and Prevention, 2011). *B. pertussis* sintetizira raznolike adhezine, fimbrije in toksine. Nitasti hemaglutinin, pertaktin, pertusis toksin, toksin adenilat ciklaza, dermatonekrotični toksin, trahealni citotoksin in pertusis lipopolisaharid so povezani s pritrjanjem bakterije na podlago in kolonizacijo, končni rezultat pa je patogenost bakterije (Crowcroft in Peabody, 2006).

2.4.4 Bolezen in klinični znaki

Bolezen traja dlje časa in jo, po kolonizaciji dihalnih poti, razdelimo v tri faze. Prva je kataralna faza, ki obsega 7–21 dni. V tej fazici so simptomi podobni prehladu z rahlo povišano telesno temperaturo ter občasnim blagim kašljanjem, ki se stopnjuje. Paroksizmalna faza traja 1–6 tednov ali celo dalj časa in jo označuje resno, hudo kašljanje in značilen izcedek med kašljanjem. Simptomi paroksizmalne faze se lahko stopnjujejo v cianozo, bruhanje, izčrpanost in se lahko konča s smrtno v primeru novorojenčkov. V zadnji fazi – konvalescenci se kašelj v 2–4 tednih počasi umiri in bolnik postopoma okreva (Wood in McIntyre, 2008).

2.4.5 Laboratorijska diagnostika

2.4.5.1 Kultura

Zlati standard potrjevanja okužb z bakterijo *B. pertussis* je gojitev na gojišču Bordet-Gengou ali agarju Regan-Lowe (koralni agar) in specifično dokazovanje z neposredno imunofluorescenco. Specifičnost testa s časom počasi upada zaradi odziva imunskega sistema. Tri tedne po začetku kašlja je namreč občutljivost kulture bakterije *B. pertussis* le še 1–3 % (Kretsinger in sod., 2006). Kulture bakerije *B. pertussis* uporabljam, ker nam omogočajo tipizacijo vrste *Bordetella* in določanje odpornosti proti antibiotikom. *B. pertussis* raste počasi na vseh gojiščih kljub ugodni temperaturi (35–37 °C). Potrebna sta 2–6 dni, da na gojišču opazimo značilne majhne kolonije s perlastim leskom. Občutljivost kulture je zmanjšana v odvisnosti od tipa kliničnega vzorca (najprimernejši je nazofaringealni izperek), metode zbiranja in uporabe različnih neustreznih vrst brisov, ki lahko zavirajo rast bakterije (Crowcroft in Peabody, 2006).

2.4.5.2 Serološke metode

V času okužbe se poveča količina protiteles proti različnim antigenom, kot so pertusis toksin (PT), pertaktin (PRN), nitasti hemaglutinin (FHA), fimbrijski proteini ter bakteriji v celoti. Pri več kot 90 % bolnikov, okuženih z bakterijo *B. pertussis*, je v vzorcih opazen upad vsebnosti protiteles proti-PT IgG in proti-FHA IgG, v 30-60 % okuženih proti-PRN IgG, v 20-40 % okuženih proti-PRN IgA, v 20-40 % okuženih proti-PT IgA ter nazadnje v 30-50 % okuženih anti-FHA IgA (Müller, 1997). Občutljivost in specifičnost seroloških metod je v primerjavi z uporabo PCR ali kulturami manjša (Wood in McIntyre, 2008). Prednost seroloških metod je zaznavanje okuženosti z *B. pertussis* tudi v poznih stadijih bolezni.

2.4.5.3 Molekularne metode – verižna reakcija s polimerazo (PCR)

PCR-metoda s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za bakterijo *B. pertussis* je 2–3 × občutljivejša od kulture, kadar imajo okuženi že 3 tedne vidne znake bolezni oziroma so le ti že pričeli s protimikrobnjo terapijo (Bamberger in Srugo, 2008; Liveano in sod, 2002). Standardne PCR-metode, ki bi jo uporabljali vsi klinični laboratoriji, ni. Obstaja preko 100 različic PCR-protokola, ki se razlikujejo v tehnikah čiščenja DNA, izbranih začetnih oligonukleotidih, reakcijskih pogojih in načinu prikazovanja PCR-produktov (Kretsinger in sod., 2006). Specifičnost PCR-metode se lahko zmanjša, ker je odvisna od možnih kontaminacij vzorcev v laboratoriju ali med zbiranjem vzorca. Pri bolnikih s prisotnostjo bakterije *Bordetella holmesii* v zgornjih dihalnih poteh lahko dobimo tudi lažno pozitivne rezultate PCR preiskave (Halperin, 2007). Uporabnost PCR se pokaže tudi pri okuženih dojenčkih, kjer si težko pomagamo s serološkimi metodami, saj še nimajo popolnoma razvitega imunskega sistema. Poleg tega dobimo s pomočjo PCR-metode s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi hitrejše rezultate kot s kulturo (Wood in McIntyre, 2008).

2.5 *Haemophilus influenzae*

Grški pomen besede "haemophilus" je ljubiti kri. Ime je bakterija dobila, ker dobro raste na gojiščih z dodano krvjo. Ime "influenzae" pa izhaja iz napačnih domnev v preteklosti, da je bakterija povzročiteljica gripe. *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) je del običajne žrelne flore, pa tudi patogen, ki lahko povzroči pljučnico in druge okužbe dihal ter meningitis.

2.5.1 Taksonomska uvrstitev

Bakterijo *H. influenzae* uvrščamo v družino *Pasteurellaceae*, red *Pasteurellales*, razred gama proteobakterije in deblo *Proteobacteria*.

2.5.2 Morfologija in zgradba

Celice *H. influenzae* so po Gramu negativni majhni paličasti kokobacili, velikosti $0,2\text{--}0,3 \times 1,0\text{--}2,0 \mu\text{m}$. Nekateri so pleomorfne oblike in so negiblivi. V celični steni je prisoten lipopolisaharidni sloj z endotoksinskim delovanjem. Zaradi specifičnih polisaharidnih kapsul razvrščamo bakterijo *H. influenzae* v 6 serotipov (A do F). Poleg tega obstajajo tudi sevi *H. influenzae* brez kapsule.

Vsi tipi bakterije *Haemophilus* so fakultativni anaerobi (Murray in sod., 2003). Gojimo jih na obogatenem gojišču, ki vsebuje bistvena rastna faktorja: hemin (imenovan tudi faktor X) in nikotinamid adenin dinukleotid (NAD, faktor V), ki ima vlogo koencima (Murray in sod, 2003; Jawetz, 1991). Med segrevanjem krvnega agarja uničimo inhibitorje faktorja V, krvni serum pa potemni zato zaradi značilne temne barve gojišče imenujemo čokoladni agar. Paziti moramo, da s previsokimi temperaturami ne uničimo faktorja V. Kolonije so gladke in prosojne, zrastejo v 24–48 urah in so velike 1 mm (Jawetz, 1991). Izgled kolonij bakterije *H. influenzae* na čokoladnem agarju prikazuje slika 7.



Slika 7: Izgled kolonij *Haemophilus influenzae* na krvnem agarju z dodanimi rastnimi hormoni (microbiologyinpictures.com)

2.5.3 Patogeneza

Okužba z bakterijo *H. influenzae* se prenaša kapljično, preko aerosola. Kolonizacija zgornjih dihal poškoduje dihalni epitel in bakterija lahko čezenj in preko endotelnih celic pride v kri. Okužba se razširi v ostale organe, če v krvi nimamo ustreznih protiteles proti določenim proteinom polisaharidne kapsule (Murray in sod., 2009). Poglavitni dejavniki patogenosti bakterije *H. influenzae* so peptidoglikan, lipooligosaharidi, proteini zunanje membrane, fimbrije in različni pritrjevalni proteini – adhezini. Sevi brez kapsule so redkejši vzrok invazivnih okužb. Pogostost in razširjenost okužb je vse manjša zaradi dostopnega cepiva proti bakteriji *H. influenzae* tipa B – HIB.

2.5.4 Bolezen in klinični znaki

Okužbe z bakterijo *H. influenzae* se pojavljajo pri dojenčkih, otrocih in odraslih. Bakterija *H. influenzae* tipa B v večini primerov povzroča bakteriemijo in akutni bakterijski meningitis, občasno pa tudi epiglotitis (obstruktivni laringitis), celulitis, osteomielitis in okužbe sklepov. Sevi bakterije *H. influenzae* brez kapsule (netipabilni) so odgovorni za vnetja ušes in sinusov pri otrocih, povezani so z okužbo dihal ter pljučnicami pri dojenčkih, otrocih in odraslih. Bolezenski znaki se širijo lokalno in se začnejo v zgornjih

dihalnih poteh: vnetje ušes, sinusitis, nazofaringitis. Nato sledi vnetje spodnjih dihalnih poti v obliki bronhitisa in pljučnice. V hujših primerih se lahko okužba razširi v bakteremijo, kar pogosto povzroči vnetje sklepov ali meningitis (Todar, 2011).

2.5.5 Laboratorijska diagonostika

2.5.5.1 Kultura

Bakterijo *H. influenzae* je dokaj lahko gojiti na obogatenem čokoladnem agarju z dodanimi rastnimi faktorji, kjer po 24-ih urah zrastejo 1–2 mm velike gladke in motne kolonije. Velikokrat opazimo na krvnem agarju kolonije, ko spremljajo kolonije bakterije *S. aureus* (pojav imenujemo satelitni fenomen). Ko stafilokoki lizirajo eritrocite, s tem omogočajo sproščanje faktorja X in V v gojišče, kar omogoča rast bakteriji *H. influenzae*. Kolonije so sicer v tem primeru manjše, ker so v krvi še vedno aktivni inhibitorji faktorja V. Pri izdelavi krvnih hranilnih tekočih gojišč je težko zagotoviti najbolj optimalne koncentracije faktorjev X in V, ker se sevi med sabo malenkostno razlikujejo. Hitrost rasti kolonij bakterije *H. influenzae* je zaradi razmerja rastnih faktorjev nekoliko počasnejša od pričakovane. Načeloma kolonije rastejo bolje na gojiščih, ki jih inkubiramo anaerobno, ker v takem okolju za rast ne potrebujejo faktorja X (Murray in sod., 2009).

2.5.5.2 Mikroskopija

Mikroskopija je dovolj specifična in občutljiva metoda za ugotavljanje prisotnosti bakterij *H. influenzae*. Po Gramu negativne palčke so lahko v obliki kokobacilov do pleomorfnih filamentov. Metoda je uporabna za hitro določanje pri več kot 80 % bolnikih z nezdravljenim hemofilusnim meningitisom, pri artritisu in boleznih dihalnih poti (Murray in sod., 2009).

2.5.5.3 Imunološke metode

H. influenzae tipa B lahko določimo z imunološkimi testi na podlagi PRP-antigena, prisotnega v kapsuli. Eden takih je aglutinacijski test, kjer v primeru prisotnosti PRP-antigena pride do tvorbe skupkov. Test ima omejeno uporabnost, ker je zelo specifičen in z njim lahko potrdimo le bakterijo *H. influenzae* tipa B, ki pa se pojavlja vedno bolj poredko zaradi precepljenosti prebivalstva. Metoda je občutljivejša od kulture za odkrivanje bakterije *H. influenzae* (Kennedy in sod., 2007), ker temelji na dokazovanju

antigenov. Rezultati so tako bolj točni, ne glede na uporabo antibiotikov. Aglutinacijska metoda je hitrejša od gojenja kultur, vendar pa z njo ne moremo preverjati odpornosti bakterije proti antibiotikom.

2.5.5.4 Molekularne metode – verižna reakcija s polimerazo (PCR)

PCR-metoda s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za bakterijo *H. influenzae* je bolj specifična in občutljiva od imunoloških metod in kultur. Pomanjkljivost metode se kaže v tem, da ne moremo z gotovostjo trditi, ali gre pri pozitivnih rezultatih dejansko za povzročitelja okužbe ali le za prisotnost bakterije *H. influenzae* v dihalnih poteh, kjer je le del običajne flore. Podobno kot pri *S. pneumoniae* domnevamo, da je koncentracija bakterij med okužbo večja (Smith, 1976). PCR-testi se ne uporablajo rutinsko v kliničnih okoljih.

2.6 *Streptococcus pneumoniae*

Bakterijo *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) sta izolirala že Pasteur in Steinberg pred več kot 100 leti. Vse od takrat so boljšemu razumevanju patogenosti bakterije, odpornosti proti antibiotikom in imunoprofilakse, povezane s cepivi, namenjene mnoge molekularnogenetske raziskave. Kljub temu so pnevmokokne bolezni še vedno med glavnimi povzročitelji obolevnosti in smrtnosti.

2.6.1 Taksonomska uvrstitev

Bakterijo *S. pneumoniae* uvrščamo v družino *Streptococcaceae*, red *Lactobacillales*, razred *Bacili* in deblo *Firmicutes* (Vos in sod., 2009). Zaradi tvorbe nepopolne hemolize na krvnem agarju (KA) je v skupini α -hemolitičnih ali zelenečih streptokokov (Murray in sod., 2003). Znotraj skupine je identificiranih več kot 30 vrst in podvrst, večina pa je organizirana v pet podskupin. Klasifikacijska shema skupine je klinično pomembna, saj pripadniki določene skupine povzročajo posamezen sklop bolezni. *S. pneumoniae*, poleg *Streptococcus mitis* (*S. mitis*) in *Streptococcus oralis* (*S. oralis*), uvrščamo v skupino "Mitis" in so odgovorni za povzročitev subakutnega endokarditisa, sepse pri nevtropeničnih bolnikih, pljučnice in meningitisa.

2.6.2 Morfologija in zgradba

Pnevmonoki so Gram pozitivni koki, ki se običajno pojavljajo v parih kot diplokoki, lahko pa jih zasledimo tudi posamično ali v krajsih verižicah (Ihan, 2002). Celice v premeru merijo od 0,5–1,25 μm in imajo obliko vrha sulice (Tuomanen, 2006). Bakterijo *S. pneumoniae* v večini primerov obdaja polisaharidna kapsula, kar vpliva tudi na morfologijo kolonij. Kolonije obdane s kapsulo so okrogle oblike, gladke, svetleče in izbočene. (Murray in sod. 2009). Sevi nekaterih serotipov tvorijo velike sluzaste kolonije, ki jih prikazuje slika 8 (Tuomanen, 2006). V pnevmokokni kulturi običajno zrastejo tudi posamezne bakterije, ki ne izdelujejo polisaharidne kapsule in tvorijo manjše, suhe, hrapave kolonije ploščatega videza (Murray in sod., 2009). Pomembni komponenti celične stene sta teihoična kislina in specifičen fosfoholin, ki ima pomembno regulatorno vlogo pri hidrolizi celice. Med celično delitvijo mora biti fosfoholin prisoten pri aktivaciji pnevmokoknega avtolizina. Bakterija *S. pneumoniae* dobro uspeva na KA, inkubiranem pri temperaturi 37 °C od 24–48 ur, in še bolj optimalno v atmosferi s 5 % ogljikovega dioksida



Slika 8: Hemoliza *Streptococcus pneumoniae* na krvnem agarju (microbelibrary.org)

(Murray in sod., 2009; Tuomanen, 2006). Encim, ki razgrajuje hemoglobin, je pnevmolizin. Pnevmonoki nimajo encima katalaze in fermentirajo glukozo do mlečne kisline, ki nastaja kot primarni stranski produkt. Gojišče z visoko koncentracijo glukoze ni najboljša izbira, saj koncentracija mlečne kisline hitro doseže nivo, ko postane toksična. Pnevmonoki potrebujejo za rast gojišče, obogateno z dodatkom krvi, ki kot vir katalaze nevtralizira nakopičen vodikov peroksid. Brez zunanjega vira katalaze, se vodikov peroksid kopiči in tako zavira bakterijsko rast (Murray in sod., 2009).

2.6.3 Patogeneza

Patogeni dejavniki bakterije *S. pneumoniae*, ki jih povezujemo z nastankom in potekom bolezni, so najpogostje določeni proteini in encimi izraženi na površini po Gramu pozitivnih bakterij. Ti dejavniki so v neposrednem stiku z gostiteljevim tkivom in njegovim obrambnim mehanizmom. V preteklosti je bilo največ pozornosti namenjene raziskovanju polisaharidne kapsule, kajti znano je bilo, da so sevi brez kapsule občutljivejši in neodporni proti obrambnim mehanizmom gostitelja. V novejši zgodovini so raziskave usmerili tudi v druge pomembne proteine bakterije *S. pneumoniae*, kot so: hialuronat liaza (Hyl), pneumolizin (Pyl), dve neuraminidazi (NanA in NanB), večinoma tudi avtolizin (LytA), holin vezavni protein A (CbpA), pnevmkokni površinski antigen A (PsaA) in pnevmkokni površinski protein A (PspA). Vse proteine lahko tudi uporabimo za pripravo učinkovitih cepiv (Jedrzejas, 2001).

2.6.4 Bolezen in klinični znaki

Pnevmonokne okužbe se pojavljajo po vsem svetu in so pogosteje v zimskem času in zgodnji pomladi. Okužba z bakterijo *S. pneumoniae* se kaže najpogosteje s pljučnico, ki jo spremlja huda mrzlica in povišana telesna temperatura, hud kašelj in gnojni izmeček (lahko

s primesjo krvi). Bakterija povzroča tudi vnetje možganskih ovojnic - meningitis, ki ga spremljajo hud glavobol, vročina in sepsa. Meningitis je huda okužba z znatno smrtnostjo, ki lahko pusti resne posledice na živčnem sistemu preživelih. V primeru zelo oslabljenega imunskega odziva bolnika, privedejo okužbe do bakteriemije, ki lahko spremlja meningitis, pljučnico in tudi nekatere druge hujše okužbe z bakterijo *S. pneumoniae* (Murray in sod., 2009).

2.6.5 Laboratorijska diagnostika

Pri pljučnicah, ki jih povzroča *S. pneumoniae*, pogosto ne uspemo potrditi povzročitelja zaradi omejitev konvencionalnih diagnostičnih testov in metod. Prisotnost bakterije v izmečku lahko predstavlja le kolonizacijo žrela, kar pa ne pomeni, da je koncentracija patogena dovolj velika za povzročitev bolezni (Murdoch, 2004). Kot najprimernejše metode za dokazovanje bakterije *S. pneumoniae* bi izpostavili mikroskopijo, antigensko detekcijo in molekularne metode.

2.6.5.1 Mikroskopija

Barvanje vzorca izmečka po Gramu je najhitrejša metoda diagnosticiranja pnevmokokne pljučnice in meningitisa. Pod mikroskopom se jasno razloči značilno oblikovane po Gramu pozitivne koke, ki se kažejo kot diplokoki. Kapsula, ki obdaja diplokoke, je pod mikroskopom vidna le pri sluznih pnevmokokih, ki pa so redki. Lahko so lažno obarvani tudi kot po Gramu negativni, kar je pogost pojav pri starih kulturah ali pri bolnikih, ki so bili že zdravljeni z antibiotiki. Bakterijo *S. pneumoniae* je možno določiti tudi z reakcijo nabrekanja. V tem testu kulturo bakterij zmešamo s polivalentnimi antikapsulnimi protitelesi in jo pregledamo pod mikroskopom. Obroč reaktivnosti okrog *S. pneumoniae* je znak pozitivne reakcije.

2.6.5.2 Dokaz topnega antigena v urinu

V urinu se izloča pnevmokokni polisaharid C, ki ga lahko zaznamo s pomočjo komercialnih imunskih testov. Občutljivost testa zagotavlja ustrezne rezultate pri 70 % bolnikov s pnevmokokno pljučnico. Test ni priporočljiv za otroke, saj je specifičnost testa pri njih nižja.

2.6.5.3 Molekularne metode – verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Način diagnostike s PCR-metodo s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za *S. pneumoniae* je bil do sedaj ocenjen z večih zornih kotov. Preučevali so krvne vzorce (kri, serum ali plazma) in izmečke tako odraslih kot tudi otrok (Roson in sod., 2004, Dowell in sod., 2001). Kljub enakim protokolom v večini študij so bili rezultati zelo različni – vzroki še niso pojasnjeni. Predmet nekaterih študij PCR je samo dokazovanje prisotnosti *S. pneumoniae* v vzorcih iz dihalnih poti. Slabost PCR-metode je, da ne loči med patogeno kolonizacijo in običajno floro ustne votline in zgornjih dihalnih poti – lahko dobimo lažno pozitivne rezultate. Težave pri PCR-metodi povzroča tudi gen za pnevmolizin, tarča PCR, ki naj bi bil specifičen za *S. pneumoniae*. Zadnje raziskave so namreč našle gena za pnevmolizin in avtolizin tudi pri drugih streptokokih skupine viridans, ki so v bližnjem sorodstvu, kot npr. pri *S. mitis* (Whatmore in sod., 2000). Ugotovitve so ključnega pomena za izboljšanje in povečanje specifičnosti PCR-metod za dokazovanje *S. pneumoniae*. V veliko pomoč nam je PCR v realnem času, ki na podlagi značilnosti in specifičnosti vsake vrste razlikuje med *S. pneumoniae*, *S. oralis* in *S. mitis* (Sheppard in sod., 2004).

2.6.6 Podobnost *S. pneumoniae* z drugimi streptokoki

Dve transformirajoči skupini zelenečih streptokokov, *S. mitis* in *S. oralis*, sta v bližnjem sorodstvu s *S. pneumoniae*. Zaradi podobnosti je bila identifikacija vedno težavna (Whiley and Beighton, 1998). Zaporedje nukleotidov 16S rRNA, ki pripada *S. mitis* in *S. oralis*, je 99 % identično zaporedju *S. pneumoniae* (Kawamura in sod., 1995). Ker se vse omenjene bakterije pojavljajo v ustni votlini, oportunistično patogena bakterija *S. pneumoniae* občasno, *S. mitis* in *S. oralis* pa ves čas, je zelo pomembno, da jih znamo identificirati in razločevati med sabo, saj je od vrste streptokoka odvisno zdravljenje (Whatmore in sod., 2000).

2.7 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR)

2.7.1 Zgodovina PCR

Verižna reakcija s polimerazo (*angl. polymerase chain reaction, PCR*) je metoda, s katero lahko v kratkem času "*in vitro*" pomnožimo določen odsek DNA do velikega števila kopij. Razvoj PCR je povzročil velik napredok v molekularni biologiji, poleg tega pa se je metoda izkazala za enostavno za uporabo (Gibbs, 1990). Kary Mullis in raziskovalci Kit Corporation so v 80-ih letih oblikovali metodo, s katero so lahko omogočili in ustavili delovanje encima polimeraze na točno določenih mestih enojne DNA verige. Odkritje je že nakazovalo na eksponentno pomnoževanje specifičnih odsekov DNA v laboratoriju (Mullis, 1986, 1987, 1990). Pomnoževanje DNA v laboratoriju je poenostavilo mnogo standardiziranih postopkov kloniranja, analiziranja in spreminjanja nukleinskih kislin, ki so bili sinonim za sila zahteven in dolgotrajen postopek (Arnheim and Erlich, 1992). Metoda je postala popularna na področju molekularne biologije, saj je bilo od leta 1985, ko je bilo objavljeno prvo poročilo, pa do 1992 objavljenih več kot 5000 znanstvenih člankov na to temo (Arnheim, 1992).

2.7.2 Razvoj PCR-metode in začetne težave

Gobind Khorana je leta 1971 prvi opisal temeljno načelo pomnoževanja določenega dela DNA z uporabo dveh začetnih oligonukleotidov. Sinteza začetnih oligonukleotidov in čistost encima polimeraze sta omejevala napredek v razoju PCR-metode (Kleppe, 1971). Nato je leta 1983 dr. Kary Mullis zasnoval PCR. Po ustreznih rezultatih in potrditvi hipoteze se je začela množična uporaba PCR-metode kot osnovne tehnike v molekularni biologiji (Mullis, 1990). V izvornem Mullisovem PCR so polimerazo uporabljali "*in vitro*" – v kontroliranih pogojih okolja izven organizma. Dvoverižno DNA so razklenili v dve enojni verigi s segrevanjem na 96 °C. DNA-polimeraza bakterije *E. coli* je bila pri tej visoki temperaturi uničena, zato so jo morali nadomestiti po ogrevalni fazи vsakega cikla. Mullisov PCR ni bil optimalen, saj je zahteval veliko časa, velike količine DNA-polimeraze in nenehno pozornost v celotnem procesu PCR.

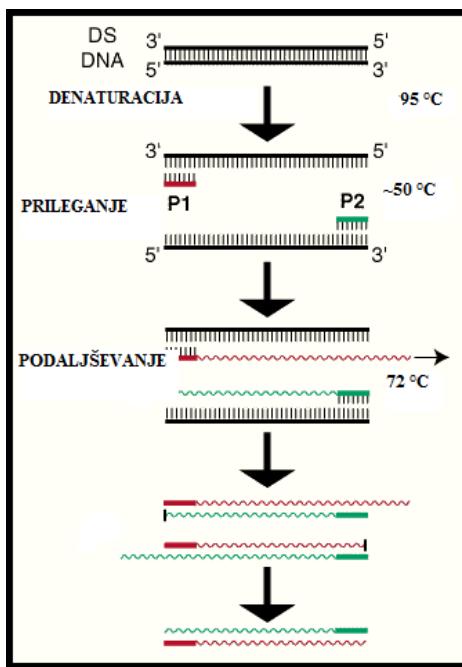
2.7.3 Cikel PCR-reakcije

Raziskovanje mehanizma pomnoževanja DNA je razkrilo tako enostavnost, kot tudi elegantnost PCR-metode. Za izvedbo je pomembna pravilna izbira začetnih oligonukleotidov, ki se vežejo na začetek in konec specifičnega odseka DNA, ki ga želimo pomožiti.

Reakcijska zmes vsebuje:

- DNA, ki služi kot matrica
- dva začetna oligonukleotida, ki z visoko zmogljivostjo in specifičnostjo omogočajo pomnožitev želenega odseka DNA v vzorcu
- deoksinukleotid trifosfate, ki predstavljajo gradnike za nove verige DNA
- magnezijeve ione
- reakcijski pufer in
- termostabilno DNA-polimerazo.

Verižna reakcija s polimerazo je sestavljena iz treh stopenj, od katerih vsaka poteka pri specifični temperaturi. Ker se te stopnje ponavljajo ena za drugo, rečemo da je reakcija ciklična. Najprej segrevamo - denaturiramo dvoverižno DNA pri temperaturi višji od 90 °C, nato sledi ohlajanje - prileganje začetnih oligonukleotidov pri temperaturi 50–75 °C. Zadnjo stopnjo predstavlja sinteza komplementarnega zaporedja verige DNA pri temperaturi 72–78 °C s pomočjo polimeraze. Običajno se v eni PCR-reakciji zvrsti od 30 do 40 ciklov. Končni rezultat je eksponentno povečanje skupne količine DNA, ki je zaporedje nukleotidov med začetnimi oligonukleotidi. Na koncu je izkupiček reakcije 2^n kopij DNA, kjer je n število ciklov (Arnheim, 1992; Gibbs, 1990). Shematski potek vseh PCR-stopenj prikazuje slika 9. Nastale pomnožke, ki jih dobimo pri klasični različici izvedbe PCR, najpogosteje spremljamo s pomočjo gelske elektroforeze in barvanjem z etidijevim bromidom.



Slika 9: Potek verižne reakcije s polimerazo (fimnh.ufl.edu)

2.7.4 Prednosti PCR-metode

Časovni okvir

S pomočjo PCR lahko izvedemo kloniranje DNA v relativno kratkem času, v nekaj urah. Reakcijo sestavlja približno 30–40 ciklov, od katerih vsak vsebuje denaturacijo, sintezo in pomnoževanje v 3–5 minutnem intervalu. Pomnoževanje se vrši v napravi za PCR. Tehnično bolj izpopolnjene naprave za PCR celo omogočajo različne temperaturne gradiente znotraj reakcije in lahko hkrati teče več korakov pomnoževanja. Za primerjavo lahko vzamemo celično osnovano kloniranje DNA, ki navadno vzame več tednov. Korak sinteze začetnih oligonukleotidov je danes poenostavljen s pomočjo napredne računalniške programske opreme za projektiranje le teh in hitre komercialne ali akademske sinteze. Ko enkrat vzpostavimo optimalne pogoje, katere dosežemo s spremenjanjem temperature, koncentracije ionov in začetnih oligonukleotidov, je večkratno ponavljanje reakcije preprosto (Arnheim, 1992; Gibbs, 1990, Erlich s sod., 1991; Strachan, 1999).

Občutljivost

PCR-metoda omogoča pomnožitev zaporedja DNA, četudi imamo opravka z DNA iz ene same celice (Li in sod., 1988). Zagotovljena občutljivost metode je povod za mnogo novih

metod preučevanja molekularne patogeneze, velik napredek številnih aplikacij v forenzični znanosti, napredek in hitre analize v genetski diagnostiki na podlagi enega spermija in razvoj preučevanja paleontologije, kjer lahko vzorci vsebujejo minimalno količino DNA. Prav zaradi velike občutljivosti PCR-metode, moramo paziti, da vzorca ne kontaminiramo, saj se lahko tudi majhna količina tuje DNA v procesu pomnoži (Arnheim, 1992; Gibbs, 1990, Erlich in sod., 1991; Strachan, 1999).

Robustnost

Za matrično DNA v PCR-pomnoževanju je primeren širok spekter nukleinskih kislin. Pomnožene je bilo že veliko očiščene DNA različnih vrst in iz različnih virov. PCR-metoda omogoča pomnoževanje DNA celo v primerih, ko je DNA degenerirana in izolacijo iz medijs, ki so običajno problematični. Robustnost PCR veliko pripomore k študijam molekularne antropologije in paleontologije, genetski material pa lahko dobimo iz arheoloških ostankov vzorcev tkiv, tkiv fiksiranih v parafinu, kar ima pomembno vlogo v molekularni patologiji in nekaterih genetskih študijah. Skupni izkupiček in uspešnost PCR-metode je seveda večja, če je dovolj kvalitetne DNA (Arnheim, 1992; Gibbs, 1992, Erlich s sod., 1991; Strachan, 1999).

2.7.5 Slabosti PCR-metode

Kljub izjemni priljubljenosti ima PCR-metoda tudi določene omejitve. Pri pripravi začetnih oligonukleotidov, ki omogočajo selektivno pomnoževanje določenega zaporedja DNA, je potrebno še predzaporedje, ki je komplementarno dejanskemu DNA-zaporedju iz celice. Tako končni rezultat PCR-reakcije ni vedno samo DNA-segment, ki ga želimo pomnožiti. Čeprav s PCR-metodo lahko podvojimo cel genom, to ni primerljivo s kloniranjem celične DNA, ki nam omogoči ločitev vsakega posameznega DNA-klona in ustvarjanje knjižnice genomske DNA. Če primerjamo dejanski izkupiček PCR in eksponentni teoretični izplen, ugotovimo, da sistem ne dosega maksimalnih potencialnih zmožnosti in da prihaja v procesu do izgub. Po vsakem ciklu PCR-reakcije je manj ustreznegata materiala za podvojitev. Nekatere matrične DNA že od samega začetka postopka niso primerne zaradi prekinjenih ali okvarjenih DNA-verig. Matrične DNA se poškodujejo tudi med čiščenjem substrata ali med ogrevalno fazo PCR-reakcije. Količina potrebnih encimov se proti koncu reakcije zmanjšuje, kar dodatno upočasni določene

aktivnosti. Zadnji razlog, zakaj PCR-reakcija ne more doseči maksimalnega izplena, je naraščanje koncentracije DNA v mediju do skrajnih meja, kar sproži tekmovalnost med začetnimi oligonukleotidi, matrično DNA, originalno in podvojeno DNA-verigo (Arnheim in Erlich, 1992; Gibbs, 1990; Erlich in sod., 1991).

Očitna, vendar za namene DNA kloniranja tudi uporabna, slabost PCR-metode je velikostni razred DNA-zaporedja, ki ga je še mogoče pomnožiti. Za razliko od kloniranja celične DNA, pri katerem lahko računamo na 2 Mb velika DNA-zaporedja, so zaporedja, pridobljene s PCR-metodo manjša, dolga od 0,1–5 kb. Običajno so vrednosti bližje spodnji meji, kot pa zgornji. Manjše odseke je sicer možno dopolniti s PCR-metodo, vendar je težje doseči učinkovito ojačanje in željeno dolžino vijačnice, ker moramo modificirati standardne pogoje in vpeljati sistem z dvema polimerazama. Druga DNA-polimeraza je polimeraza, ki ima 3'-5' endonukleazno aktivnost in služi kot mehanizem preverjanja pravilnosti podvajanja (Strachan in Read, 1999).

2.7.6 PCR v realnem času

V primerjavi s klasično PCR-metodo, je PCR v realnem času izboljšana različica (Mackay, 2004). PCR-tehnika v realnem času temelji na merjenju fluorescence med PCR-reakcijo. Delež emitirane fluorescence je sorazmeren količini nastalega PCR-produkta in omogoča sprotno spremljanje PCR-reakcije. Sistem PCR v realnem času beleži rezultate v obliki krivulje, iz katere lahko razberemo eksponentno fazo reakcije, kar pa je predpogoj, da lahko izračunamo točno število kopij na začetku reakcije (Klein, 2002). PCR v realnem času je kvantitativna metoda, s pomočjo katere lahko merimo količino cDNA ali mRNA v vzorcu. Za to obliko PCR lahko za vzorec uporabimo tkivo, celično kulturo ali posamezno celico. Metoda se pogosto uporablja za spremljanje izražanja mRNA (število kopij mRNA) v odvisnosti od različnih pogojev okolja. S PCR v realnem času lahko primerjamo kontrolne neokužene vzorce z okuženimi vzorci in nato opazujemo, kakšno je izražanje genov glede na patogene dejavnike. Ker ima metoda dovolj visoko občutljivost, se uporablja tudi pri določanju patogenov, kot so virusi v krv (Higuchi in sod., 1992; Higuchi in sod., 1993). PCR v realnem času je zelo občutljiva in natančna metoda, poleg tega pa ni potrebnih post-PCR korakov, da pridemo do vidnih rezultatov. Zaradi praktičnega

spremljanja in beleženja rezultov sproti, se lahko izognemo navzkrižnim kontaminacijam PCR-produktov.

Ker je raziskovalcem pogosto onemogočeno, da bi pridobili veliko količino vzorca, je PCR v realnem času zelo dobrodošel, saj lahko pomnožimo tudi mRNA iz majhnega vzorca ali posamezne celice. Zaradi izjemne občutljivosti metode moramo biti previdnejši pri pripravi vzorcev, saj lahko pomnoževanje genetskega materiala, ki je posledica kontaminacije, vodi v lažno pozitivne rezultate. Kot slabosti PCR v realnem času bi omenili, da se spremembe genetskega materiala s številom ciklov povečujejo. Kadar skušamo preoblikovati rezultate podane v obliki krivulje v linearne vrednosti, so opazna odstopanja. Poleg tega pa lahko prihaja do prekrivanja emisijskih spektrov.

2.7.7 Hkratna PCR (multiplex PCR)

Hkratna PCR-metoda je v današnjem času zelo razširjena, ker lahko v enem samem PCR-postopku pomnožimo več tarčnih DNA. S hkratno PCR ugotavljamo prisotnost več kot enega tarčnega zaporedja, vsakega od njih pomnožujemo z zanj specifičnim parom začetnih oligonukleotidov v reakcijski zmesi (Persson in sod., 2005).

Metoda veliko doprinese k praktičnosti PCR-metode, saj v laboratoriju prihrani veliko časa in napora. Hkratno PCR delimo na dve kategoriji - prva je enotarčna (*angl. single template*) PCR, ko uporabljam več začetnih oligonukleotidov na enem tarčnem zaporedju, ker želimo pomnožiti točno določen specifičen odsek DNA-verige. Druga pa je večtarčna (*angl. multiple template*) PCR, ko želimo pomnožiti več tarčnih zaporedij in uporabljam za vsako tarčno zaporedje po en par začetnih oligonukleotidov v isti reakcijski mikrocentrifugirki. Multiple template PCR je bolj tvegana metoda, saj lahko pride med začetni oligonukleotidi do navzkrižne hibridizacije in tako zgrešijo prvotno tarčno zaporedje (Priemer Biosoft, 2011).

Za uspešno hkratno PCR-reakcijo, torej specifično podvajanje in velik izkoristek, je bistvenega pomen kreiranje začetnih oligonukleotidov. Ti morajo biti primerno kratki, velikosti od 18–22 nukleotidov. Uporabljam lahko začetne oligonukleotide s podobno temperaturo tališča, oziroma razlika med temperaturami tališča ne sme biti večja od

3–5 °C. Zelo pomembna je njihova specifičnost, ker je v eni reakcijski zmesi več tarčnih zaporedij in začetni oligonukleotidi ne smejo tvoriti dimerov, ker to vodi v neuspešno pomnoževanje (Henegariu in sod., 1997).

Prednosti hkratne PCR je večja kontrola in s tem izogib lažno negativnih oz. lažno pozitivnih rezultatov, ki jih lahko povzroči kontaminacija vzorca. Vsak PCR-pomnožek vsebuje interno kontrolo vseh ostalih pomnoževalnih fragmentov. S to metodo smo učinkovitejši, saj skrajšamo čas za pripravo, ki bi ga potrebovali za več posameznih PCR in znižamo stroške z bolj razumno uporabo encimov polimeraz in matrične DNA. Matrične DNA so kvalitetnejše, ker morajo biti v zmesi, v kateri se pomnožuje več tarčnih zaporedij tudi učinkovitejše. Metodo hkratne PCR uporabljam za identifikacijo patogenov, visokoprepustno SNP-genotipizacijo, mutacijske analize, analize delecij genov, kvantifikacijo matrične DNA, povezovalne analize, detekcije RNA in forenzične študije (Tataa Biocenter, 2009).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Zbiranje in shranjevanje kužnin

Uporabili smo klinične vzorce bolnikov hospitaliziranih na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik v času med 22. 3. in 14. 4. 2010. Preden smo iz vzorcev izolirali DNA, smo jih hranili v hladilniku pri 4 °C. Nato smo iz vzorcev v roku 1–3 dni izolirali DNA in jo shranili pri –70 °C.

3.1.2 Laboratorijski pribor in oprema

- topotni stresalnik mikrotubic Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- centrifuga MiniSpin (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- stresalnik Mixmate (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- avtomatske pipete (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- sterilni nastavki za pipete (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- stojalo za mikrocentrifugirke (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- sterilne mikrocentrifugirke (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- mikrokolone (QIAamp Spin Column) in 2 ml zbiralne epruvete (QIAGEN, Venlo, Netherlands)
- testne epruvete Gen-Probe (San Diego, California, USA)
- zaščitna mikrobiološka komora SMBC 183AV ([ISKRA PIO D. O. O.](#), Slovenija)
- BBL Crystal GP kit (BD, ZDA)
- sterilni bombažni brisi
- steleničke z zamaški
- BBL Crystal čitalec (BD, ZDA)

3.1.3 Raztopine in reagenti (vse Seegen, S. Korea)

- Pufri: ATL, A; AW1, AW2, AE
- Proteinaza K
- Etanol

- Reagent 1 (Lysis Reagent)
- Reagent 2 (Hybridization Buffer)
- Reagent 3 (Selection Reagent)
- Inokulacijska tekočina

3.2 METODE

3.2.1 Obdelava in priprava izmečka za molekularno diagnostiko atipičnih pljučnic

Vsak vzorec kužnine smo prelili s toliko raztopine NALC (N-acetil L-cistein) (hranjene pri 2–8 °C), kot je bilo vzorca. Nato smo vorteksirali, dokler ni postal vzorec homogen oziroma tekoč brez sluzi. Homogeniziran vzorec smo prenesli v 2 ml mikrocentrifugirke in centrifugirali 10 minut pri $4293 \times g$. Po končanem centrifugiranju smo supernatant zavrgli, oborino pa sprali s 0,01M raztopino fosfatnega pufra (PBS). Znova smo centrifugirali 10 minut pri $4293 \times g$ in odpipetirali supernatant. Oborini smo dodali cca. 1,5 ml PBS pufra in vorteksirali. Tako smo še tretjič centrifugirali 10 minut pri $4293 \times g$. Supernatant smo zavrgli, vzorec (oborina) pa je bil tako pripravljen za izolacijo nukleinskih kislin.

3.2.2 Izolacija nukleinskih kislin

QIAamp DNA Mini Kit

Izolacijo nukleinskih kislin smo izvedli v pred-amplifikacijskem delu.

Pripravljeno oborino smo resuspendirali v 180 µl pufra Buffer ATL, ki smo ga predhodno segreli na 56 °C. Dodali smo 20 µl Proteinaze K, vorteksirali ter inkubirali pri 56 °C preko noči oz. najmanj 3 ure. Po inkubaciji smo vzorec centrifugirali kratek čas in dodali 200 µl Buffer AL (predogret na 56 °C), večkrat premešali po 15 sekund na vorteksu, nato inkubirali 10 minut pri 70 °C in centrifugirali za kratek čas. Potem smo dodali 200 µl 96–100 % etanola. Vzorec smo vorteksirali in na kratko centrifugirali. Vsebino (tudi precipitat) smo prenesli v kolono za izolacijo DNA - QIAamp Spin Column. Centrifugirali smo 1 min pri $4293 \times g$, nato smo zbiralno mikrocentrifugirko zavrgli in jo nadomestili s čisto. V mikrocentrifugirko z membrano (kolono) smo dodali 500 µl Buffer AW1 in znova centrifugirali 1 min pri $4293 \times g$. Zbiralno mikrocentrifugirko smo zavrgli in jo nadomestili s čisto. Nato smo v mikrocentrifugirko z membrano (kolono) dodali 500 µl Buffer AW2 in centrifugirali 3 min pri $13148 \times g$. Kolono smo po centrifugiranju prenesli

v 1,5 ml mikrocentrifugirko, zbiralno mikrocentrifugirko z zbrano tekočino pa zavrgli. Nato smo dodali 200 µl Buffer AE v vsako kolono (nanos pufra neposredno na sredino membrane), inkubirali 1 minuto pri sobni temperaturi in centrifugirali 1 minuto pri 4293 × g. Dobljeni vzorec izolirane DNA smo shranili pri temperaturi –20 °C.

3.2.3 Kvantifikacija nukleinskih kislin oz. proteinov

Vse reagente smo pred uporabo ogreli na sobno temperaturo. Za kvantifikacijo nukleinskih kislin s testom Quanti-iT™ smo uporabili 0,5 ml mikrocentrifugirke in 2 standarda za kalibracijo (STANDARD 1 in STANDARD 2). Najprej smo naredili delovno raztopino Quanti-iT™. Reagent Quanti-iT™ smo redčili s pufom Quanti-iT™ v razmerju 1:200. Nato smo si pripravili testne mikrocentrifugirke. Delovno raztopino smo razporedili po mikrocentrifugirkah, za standarde po 190 µl in po 180–199 µl za vzorce, kar je prikazano v preglednici 1.

Preglednica 1: Razmerje delovne raztopine in vzorca

	standard	vzorec
volumen delovne raztopine	190 µl	180–199 µl
volumen standarda	10 µl	/
volumen vzorca	/	1–20 µl
skupni volumen v mikrocentrifugirki	200 µl	200 µl

Mikrocentrifugirke smo dopolnili s standardoma in vzorci, nato smo jih vorteksirali 2–3 s, in jih inkubirali pri sobni temperaturi 1 minuto. Mikrocentrifugirki s standardi smo vstavili v fluorometer, nato še vse vzorce in odčitali vrednosti. Celoten postopek je shematsko prikazan na sliki 10. Odčitane vrednosti smo pomnožili z redčitvenim faktorjem.

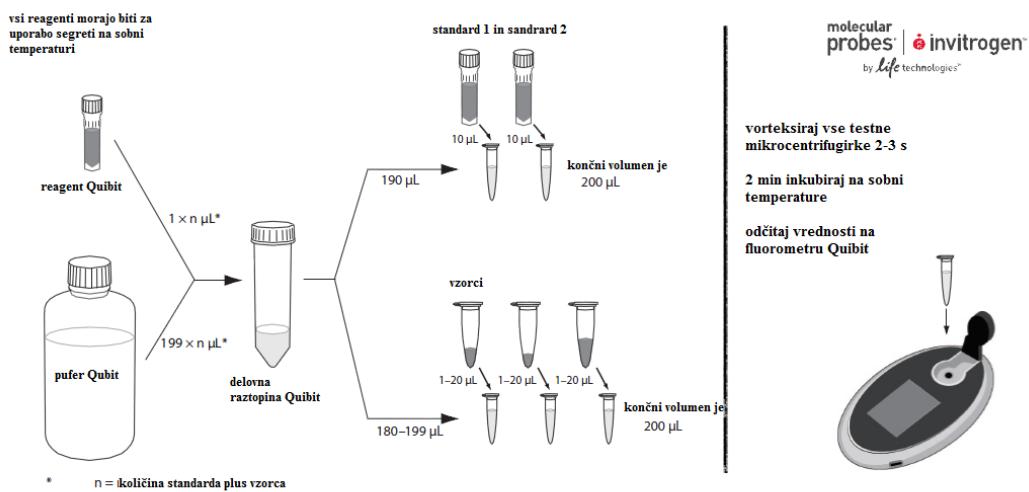
Uporabili smo formulo:

$$\text{koncentracija DNA} = \frac{QF \times 200}{x} \left[\frac{\text{ng}}{\text{ml}} \right] \text{ vzorca}$$

QF: izmerjena vrednost

X: količina vzorca DNA (1–20 µl)

Slika 10: Potek kvantifikacije nukleinskih kislin (po navodilih proizvajalca Invitrogen)



3.2.4 Seeplex® PneumoBacter ACE detection

3.2.4.1 Priprava osnovne zmesi za PCR

Za pripravo osnovne zmesi za PCR smo uporabili določeno razmerje reagentov, ki je prikazano v preglednici 2.

Preglednica 2: Sestava osnovne zmesi za PCR

4 µl	5× PB ACE PM
3 µl	8-Mop Solution
10 µl	2× Multiplex Master Mix
17 µl	Skupni volumen osnovne zmesi za PCR

K vsaki seriji vzorcev smo vključili tudi negativno in pozitivno kontrolo. Postopek smo izvajali v zaščitni komori v čisti sobi. 17 µl zmesi smo dodali 3 µl izolirane DNA vzorca. Skupni volumen je znašal 20 µl. Mikrocentrifugirke smo prestavili v napravo za PCR in zagnali PCR-program reakcije, ki je prikazan v preglednici 3.

Preglednica 3: PCR-program

del programa	število ponovitev	temperatura	trajanje
1	1	94°C	15 min
2	40	94 °C 60 °C 72 °C	0,5 min 1,5 min 1,5 min
3	1	72 °C	10 min

3.2.4.2 Agarozna gelska elektroforeza

10 µL PCR-produkta smo nanesli na 2 % agarozni gel. Najprej smo nanesli 10 µL 100 bp lestvice. Sledil je nanos negativne kontrole, nato 7 vzorcev in kot zadnja je bila pozitivna kontrola testa Seeplex® PneumoBacter. Elektroforeza je potekala 30 minut.

3.2.5 BD BBL Crystal™ Identification Systems, Gram-Positive ID Kit (BD, ZDA)

BBL Crystal system se uporablja za identifikacijo po Gramu pozitivnih bakterij v 24-ih urah. Uporabimo lahko bakterijske kolonije z gojišča TSA (*angl. Trypticase Soy Agar*) s 5 % ovčje krvi. Pri tej metodi ne smemo uporabiti gojišč, ki vsebujejo eskulin. Bakterijska kultura naj ne bi bila starejša kot 18–24 ur, razen za počasi rastoče organizme je sprejemljiva tudi 48-urna kultura.

Vzeli smo stekleničko BBL Crystal GP kit z inokulacijsko tekočino. S sterilnim bombažnim brisom smo pobrali nekaj kolonij enake morfologije in jih suspendirali v inokulacijski tekočini. Stekleničko smo nato zaprli z zamaškom in vsebino vorteksirali 10–15 sekund. Dobljena motnost suspenzije mora ustrezati 0,5 McFarlanda. Vzeli smo škatlico testnega seta in na stranici označili naš vzorec. Celotno vsebino stekleničke z inokulacijsko tekočino smo zlili v tarčno mesto testne škatlice. Škatlico smo nato prijeli z obema rokama in previdno z nagibanjem prelili inokulacijsko tekočino do konca kanala in nazaj do tarčnega mesta, kjer ostane presežek tekočine. Pokrov smo obrnili tako, da je bila nalepka nad tarčnim mestom in ga potisnili navzdol dokler nismo začutili upora in slišali klika. Škatlice smo nato inkubirali z "obrazom" navzdol (nalepka je bila spodaj) v inkubatorju brez CO₂. Inkubirali smo 18–24 ur pri 35 °C.

Po končani inkubaciji smo rezultate testov odčitali na posebnem čitalcu BBL Crystal. Škatlico smo namestili na čitalec z "obrazom" navzdol. Za interpretacijo rezultatov smo uporabili kartico barvnih reakcij. Stolpce od E do J smo odčitali s pomočjo navadne svetlobe. Stolpce A do D smo odčitali s pomočjo UV svetlobe v čitalcu. Pozitivni so bili testi s fluorescentnim substratom, ki so fluorescirali močneje kot negativna kontrola v kupoli 4A. Vsak rezultat je številčno ovrednoten. Ko smo posamezne rezultate v stolpcih sešteli, smo dobili številčno kodo. Kodo smo nato vnesli v računalniški program in dobili identifikacijo izolata.

3.2.6 GenProbe® AccuProbe *Streptococcus pneumoniae* (Gen-Probe, San Diego, California, USA)

Metodo smo uporabili za hitro identifikacijo, ker temelji na detekciji odseka RNA specifičnega za bakterijo *S. pneumoniae*. Uporabili smo kulture alfa hemolitičnih streptokokov, ki so porasli na 5 % krvnemu agarju. Kultura ni bila starejša od 48 ur.

50 µl reagenta 1 (Lysis Reagent) smo odpitetirali v testno epruveto (Probe Reagent Tubes). Nato smo 1 mm kolonijo ali več manjših kolonij suspendirali v reagent 1 in homogenizirali na vorteksu. Dodali smo še 50 µl reagenta 2 (Hybridization Buffer) in homogenizirali. Po 15-min segrevanja v termobloku pri 60 °C smo dodali 300 µl reagenta 3 (Selection Reagent) in znova homogenizirali na vorteksu. Inkubirali smo 5 min v termobloku pri 60 °C in nato pustili na sobni temperaturi vsaj 5 min, največ pa 1 uro.

Rezultat smo odčitali na luminometru. Za negativno kontrolo smo uporabili vzorec s samimi reagentom, brez biološkega materiala = manj kot 20,000 RLU (angl. relative luminiscence units). Pozitivna kontrola je bila bakterija *S. pneumoniae*, ATCC 3340 = več kot 50,000 RLU.

4 REZULTATI

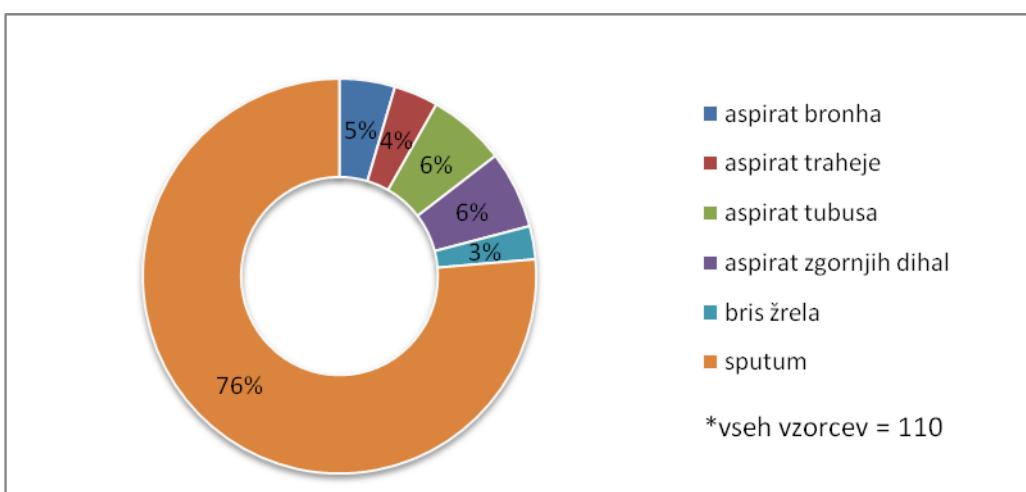
Eksperimentalni del naloge je bil opravljen v obdobju od marca 2010 do junija 2010. Delo je potekalo v Laboratoriju za respiratorno mikrobiologijo na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik. V skladu s cilji naloge smo preverili uporabnost komercialnega PCR testa Seeplex® PneumoBacter ACE Detection (Seegen, J. Koreja) za diagnosticiranje bakterijskih povzročiteljev bolezni dihal. Ugotovljali smo, če je komercialni PCR-test dovolj občutljiva in specifična metoda za identifikacijo *S. pneumoniae* in če razlikuje to vrsto od drugih zelenečih streptokokov. Hkrati pa smo komercialni PCR-test primerjali z drugimi rutinskimi testi v diagnostičnem laboratoriju.

4.1 STRUKTURA PRIDOBLEJENIH VZORCEV (TIP, IZOLACIJA DNA, GOSTOTA)

Skupno smo pridobili 110 vzorcev kužnin, ki smo jih odvzeli 101 bolniku, od tega je bilo 47 bolnikov ženskega spola in 54 moškega spola.

Uporabili smo različne kužnine in sicer:

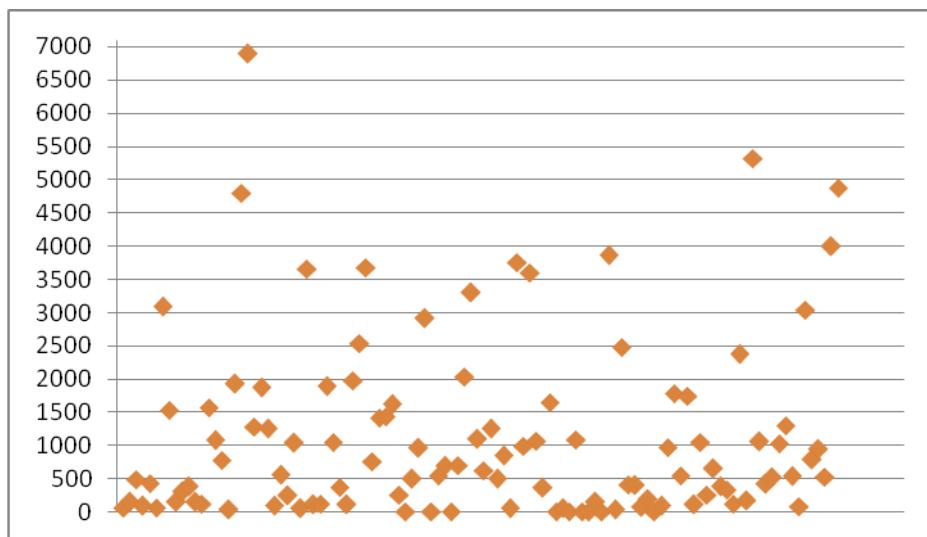
- izmeček
- aspirat bronha
- aspirat traheje
- aspirat tubusa
- aspirat zgornjih dihal
- bris žrela



Slika 11: Delež vzorcev posamezne kužnine [%]

Največji delež med kužninami je predstavljal izmeček – 84 vzorcev (76 %). Aspirati bronha, traheje, tubusa in zgornjih dihal so predstavljali od 4–6 % primerkov kužnine, bris žrela smo odvzeli v treh primerih.

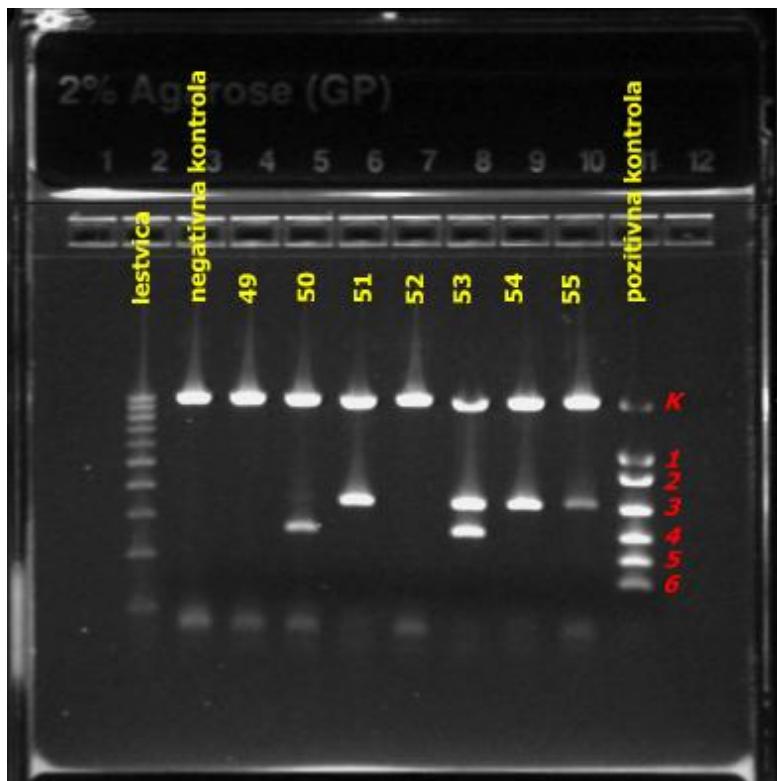
4.2 KVANTIFIKACIJA NUKLEINSKIH KISLIN OZ. PROTEINOV S QUBIT™ FLUOROMETROM



Slika 12: Izmerjene koncentracije DNA v vzorcu [ng/ml]

Izmerjene koncentracije DNA v kužinah so variirale od manj kot 10 ng/ml pa do največ 6900 ng/ml. Manjše koncentracije od 10 ng/ml z metodo kvantifikacije nukleinskih kislin z Qubit™ fluorometrom ne moremo zaznati, zato tudi rezultate elektroforeze ne moremo primerno interpretirati. V devetih primerih (3 izpirki bronha, 3 izmečki, 2 aspirata tubusa in 1 aspirat traheje) je bila izmerjena koncentracija DNA izven merljivega območja, kar predstavlja 8 % vseh izmerjenih koncentracij DNA. Teh vzorcev v nadaljnji obdelavi podatkov nismo upoštevali. Kot je razvidno iz grafa, so rezultati z veliko koncentracijo, več kot 4000 ng/ml, zelo redki, sej jih predstavlja le 5 meritev. Največ rezultatov izmerjene kvantitete DNA je bilo med 60–4000 ng/ml, kar predstavlja 86 % izmerjenih vrednosti. Izmerjena koncentracija DNA v vzorcu lahko variira tudi zaradi natančnosti postopka izolacije.

4.3 PCR-METODA - SEEPLEX® PNEUMOBACTER ACE DETECTION



	Velikost [bp]
K – interna kontrola	1000
1 – <i>M. pneumoniae</i>	583
2 – <i>L. pneumophila</i>	472
3 – <i>S. pneumoniae</i>	349
4 – <i>H. influenzae</i>	259
5 – <i>B. pertussis</i>	201
6 – <i>C. pneumoniae</i>	154

Slika 13: Agarozni gel, ki predstavlja značilne pozicije fragmentov v odvisnosti od velikosti fragmenta DNA v vzorecu

Pomnoženo DNA kužnine smo nanesli na agarozni gel. Zaradi boljše preglednosti rezultatov, na pozicijah 1 in 12 nismo nanašali vzorcev oziroma kontrol. Na gel smo na pozicijo 2 nanesli standard lestvice [bp], nato so sledili še nanosi: negativna kontrola, 7 DNA-vzorcev in kot zadnja - pozitivna kontrola. Pozitivna in negativna kontrola sta bili sestavni del testa Seeplex® PneumoBacter ACE Detection. Vzorce smo primerjali s pozitivno kontrolo in tako iz slike PCR-produkta na agaroznem gelu odčitali rezultate, ki so podani v spodnji preglednici (pregl. 4).

4.4 REZULTATI AGAROZNE GELSKE ELEKTROFOREZE

Rezultate gelske elektroforeze za vse vzorce, vključene v raziskavo, prikazuje preglednica 4.

Preglednica 4: Rezultati PCR na agaroznem gelu

Št. vzorca	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
1	-	-	-	+	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	+	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	+	-	-	-
11	-	-	+	-	-	-
12	-	-	+	-	-	-
13	-	-	+	+	-	-
14	-	-	-	+	-	-
15	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-
17	-	-	+	+	-	-
18	-	-	+	-	-	-
19	-	-	-	+	-	-
20	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	+	-	-
22	-	-	+	+	-	-
23	-	-	+	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-
25	-	-	+	+	-	-
26	-	-	-	+	-	-
27	-	-	+	+	-	-
28	-	-	+	+	-	-
29	-	-	-	+	-	-
30	-	-	+	+	-	-
31	-	-	-	+	-	-
32	-	-	-	-	-	-

se nadaljuje

nadaljevanje

št. vzorca	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
33	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	+	-	-
35	-	-	+	+	-	-
36	-	-	-	+	-	-
37	-	-	+	+	-	-
38	-	-	+	+	-	-
39	-	-	+	+	-	-
40	-	-	+	+	-	-
41	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	+	-	-
43	-	-	-	-	-	-
44*	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-
46	-	-	+	+	-	-
47	-	-	+	+	-	-
48*	-	-	+	+	-	-
49	-	-	-	-	-	-
50	-	-	+	-	-	-
51*	-	-	-	+	-	-
52	-	-	-	-	-	-
53	-	-	+	+	-	-
54	-	-	-	+	-	-
55	-	-	-	+	-	-
56	-	-	-	+	-	-
57	-	-	-	-	-	-
58	-	-	+	-	-	-
59	-	-	+	+	-	-
60	-	-	-	-	-	-
61	-	-	-	+	-	-
62	-	-	-	-	-	-
63	-	-	+	+	-	-
64	-	-	-	-	-	-
65	-	-	-	-	-	-
66	-	-	-	+	-	-
67*	-	-	-	-	-	-
68	-	-	-	-	-	-
69*	-	-	-	-	-	-
70	-	-	+	-	-	-
71*	-	-	-	-	-	-
72*	-	-	-	-	-	-
73	-	-	-	-	-	-

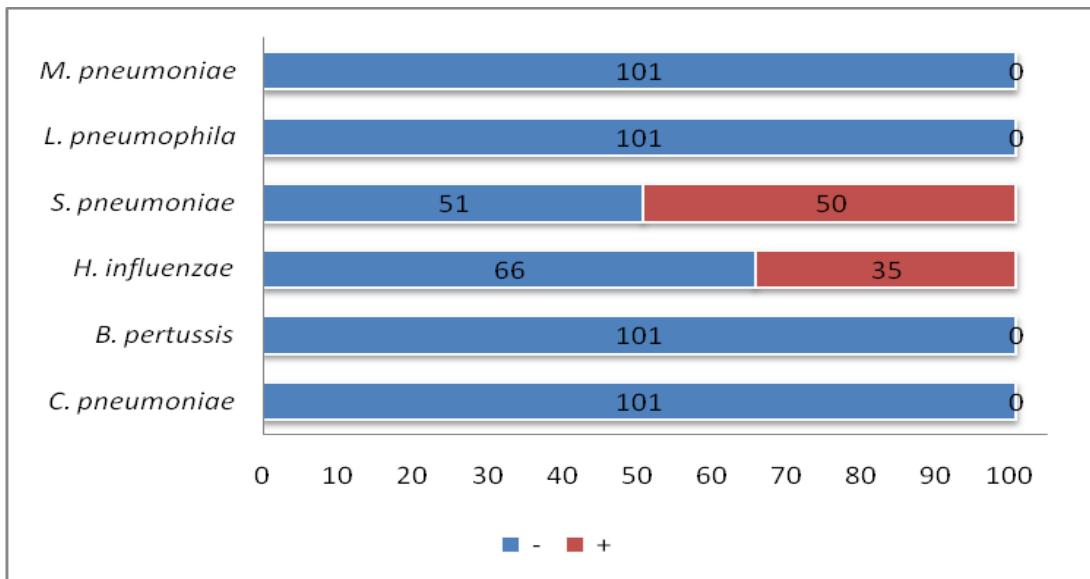
se nadaljuje

nadaljevanje

št. vzorca	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
74*	-	-	-	-	-	-
75	-	-	+	+	-	-
76	-	-	-	+	-	-
77	-	-	+	+	-	-
78	-	-	-	-	-	-
79	-	-	-	-	-	-
80	-	-	-	+	-	-
81	-	-	-	-	-	-
82*	-	-	-	-	-	-
83	-	-	-	-	-	-
84	-	-	-	-	-	-
85	-	-	+	-	-	-
86	-	-	-	-	-	-
87	-	-	+	+	-	-
88	-	-	-	+	-	-
89	-	-	-	-	-	-
90	-	-	-	-	-	-
91	-	-	-	-	-	-
92	-	-	+	-	-	-
93	-	-	-	-	-	-
94	-	-	-	+	-	-
95	-	-	+	+	-	-
96	-	-	+	+	-	-
97	-	-	-	-	-	-
98	-	-	-	-	-	-
99	-	-	-	+	-	-
100	-	-	+	+	-	-
101	-	-	+	+	-	-
102	-	-	-	-	-	-
103	-	-	-	-	-	-
104	-	-	-	-	-	-
105	-	-	-	+	-	-
106	-	-	-	+	-	-
107	-	-	+	-	-	-
108	-	-	-	+	-	-
109	-	-	-	+	-	-
110	-	-	-	+	-	-

Opomba: z * označeni vzorci imajo izmerjeno koncentracijo DNA manj kot 10 ng/ml

Rezultati podani v tabeli so predstavljeni tudi grafično na sliki 14.

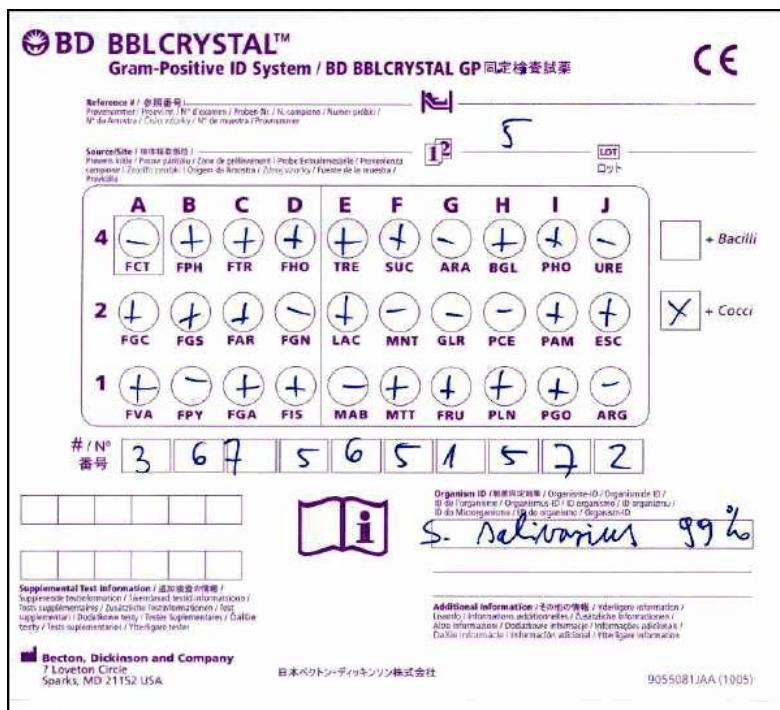


Slika 14: Grafična predstavitev rezultatov odčitavanja na agarzonem gelu

Med 101 analiziranimi DNA-vzorci nismo zasledili prisotnosti bakterij *M. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *B. pertussis* in *C. pneumoniae*. Vzorce z nizko koncentracijo DNA (<10 ng/ml) nismo vključili v grafično predstavitev. Petintrideset vzorcev je vsebovalo DNA bakterije *H. influenzae* in predstavlja 36,7 % vseh predstavljenih DNA-vzorcev bakterije *S. pneumoniae* smo potrdili v 50-ih primerih (49,5 %). Prisotnost DNA obeh bakterij *H. influenzae* in *S. pneumoniae* smo potrdili v 24-ih primerih, kar ustreza 23,7 % vseh rezultatov.

4.5 BD BBL CRYSTAL™ IDENTIFICATION SYSTEMS, GRAM-POSITIVE ID KIT

Z namenom, da bi preverili specifičnost uporabljenega hkratnega PCR testa, smo izbrali 19 naključnih gojišč krvnega agarja, poraščenih z alfa-hemolitičnimi streptokoki, ki so porasli iz vzorcev spodnjih dihal. Vrsto bakterije smo določili s pomočjo BD BBL Crystal™ Identification Systems, Gram-Positive ID Kit. Odčitek testa prikazuje slika 15.



Slika 15: Primer identifikacije streptokokov z metodo BD BBL Crystal™ Identification System

Preglednica 5 prikazuje končne identifikacije naključno izbranih α -hemolitičnih kolonij na naključno izbranih ploščah krvnega agarja. Vse vzorce z bakterijsko DNA smo nato nanesli tudi na agarozni gel in primerjali s pozitivno kontrolo testa Seeplex® PneumoBacter ACE Detection. Pozitivni rezultat se je izrazil v obliki lise pri velikosti 349 bp – kar sovpada z značilnim DNA-fragmentom bakterije *S. pneumoniae*.

Preglednica 5: Predstavitev rezultatov identifikacije streptokokov z uporabo BD BBL CrystalTM Identification System in preverjenimi z metodo Seeplex[®] PneumoBacter ACE Detection

št. vzorca	BD BBL Crystal TM Identification Systems, Gram-Positive ID Kit	zanesljivost podatka	pozitiven rezultat <i>S. pneumoniae</i> testa Seeplex [®] PneumoBacter ACE Detection
1.	<i>S. vestibularis</i>		-
2.	<i>S. mitis</i>	68 %	-
3.	<i>Pediococcus pentosaccus</i>	74 %	+
4.	<i>S. sanguis group</i>	71 %	+
5.	<i>S. salivarius</i>	99 %	-
6.	<i>S. sanguis,</i> <i>S. pneumoniae</i>	47 %, 52 %	-
7.	<i>S. oralis</i>	81 %	+
8.	<i>S. sanguis group</i>	66 %	-
9.	<i>S. oralis</i>	74 %	+
10.	<i>S. intermedius</i>		+
11.	<i>Pediococcus pentosaccus,</i> <i>S. sanguis</i>	71 %, 17 %	+
12.	<i>S. intermedius</i>	75 %	-
13.	<i>S. parasanguinis</i>	99 %	-
14.	<i>S. oralis</i>	96 %	+
15.	<i>S. intermedius,</i> <i>S. oralis</i>	63 %, 31 %	-
16.	<i>S. intermedius,</i> <i>S. oralis</i>	63 %, 31 %	+
17.	<i>S. sanguis</i>	95 %	-
18.	<i>S. vestibularis</i>	99 %	-
19.	<i>S. oralis</i>	81 %	-

Pozitivni rezultati so pripadali bakterijam identificiranim pod zaporedimi številkami 3 (*Pediococcus pentosaceus* (*P. pentosaceus*)), 4 (*Streptococcus sanguis group* (*S. sanguis group*)), 7 (*S. oralis*), 9 (*S. oralis*), 10 (*Streptococcus intermedius* (*S. intermedius*)), 11 (*P. pentosaceus*, *Streptococcus sanguis*), 14 (*S. oralis*) in 16 (*S. intermedius*, *S. oralis*). Dodatno smo preverili 7 posameznih rezultatov, torej vse naštete z izjemo bakterije *P. pentosaceus*, s specifičnim testom GenProbe[®] AccuProbe *Streptococcus pneumoniae*.

4.6 GenProbe® AccuPROBE *Streptococcus pneumoniae*

Rezultati hibridizacijskega testa AccuProbe *Streptococcus pneumoniae* so izraženi v RLU (angl. relative luminescence units). Glede na navodila proizvajalca testa ima pozitiven rezultat vrednost > 50.000 RLU. Način izpisa rezultatov prikazuje slika 16, medtem ko so v preglednici 6 navedeni rezultati hibridizacijskega testa za 7 vzorcev z neujemajočimi se rezultati.

REPORTING THRESHOLDS:

SAMPLE	REPL.	RLU	FLAG
1	1	519	NEG
2	1	819025	POS
3	1	2083	NEG
4	1	2471	NEG
5	1	2430	NEG
6	1	556066	POS

*** ABORT ***

Slika 16: Primer izpisa pri izvajanjtu metode GenProbe® AccuProbe *Streptococcus pneumoniae*

Preglednica 6: Rezultati preverjanja prisotnosti DNA *S. pneumoniae*

št. vzorca	BD BBL Crystal™ Identification Systems, Gram- Positive ID Kit	pozitiven rezultat testa GenProbe® AccuProbe za <i>S. pneumoniae</i>
4.	<i>S. sanguis group</i>	-
7.	<i>S. oralis</i>	-
9.	<i>S. oralis</i>	-
10.	<i>S. intermedius</i>	+
11.	<i>P. pentosaceus, S. sangius</i>	-
14.	<i>S. oralis</i>	-
16.	<i>S. intermedius, S. oralis</i>	-

Prisotnost DNA bakterije *S. pneumoniae* je bila z metodo GenProbe® AccuProbe potrjena le v vzorcu številka 10. Izolat iz omenjenega vzorca je bil identificiran z uporabo BD BBL Crystal™ GP ID kit kot *S. intermedius*, vendar z neznano zanesljivostjo podatka.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Okužbe dihal uvrščajo med napogostejša obolenja. Najpogostejši povzročitelj ZBP je bakterija *S. pneumoniae* (40-68 % primerov), sledi *H. influenzae* (5-10 %), manj pogosto jo povzročajo *M. pneumoniae*, virusi, legionele, *C. pneumoniae*, aerobni, po Gramu negativni bacili, *S. aureus* in proti meticilinu odporen *S. aureus* domačega okolja. Do 25 % primerov ostane povzročitelj okužbe nepojasnen (Höffken in sod., 2009; Forgie, 2009). Pnevmoniki so vodilni povzročitelji bakterijske pljučnice, gnojnega meningitisa, bronhitisa, vnetja obnosnih votlin, vnetja srednjega ušesa, peritonitisa, bakteriemije in sepse ter so vzrok umrljivosti po celem svetu (Fine in sod., 1996).

Molekularne metode se vse bolj uveljavljajo v diagnostičnih mikrobioloških laboratorijih. Ena takih metod je verižna reakcija s polimerazo (PCR) z za določen mikroorganizem specifičnimi začetnimi oligonukleotidi, ki nam je lahko v pomoč tudi pri ugotavljanju povzročiteljev atipičnih in virusnih pljučnic, za katere so metode klasične bakteriologije in virologije dolgotrajne in počasne. Nekatere bakterijske povzročitelje namreč ne moremo gojiti na običajnih gojiščih, oziroma je njihovo gojenje dolgotrajno. PCR-metoda nam omogoča etiološko diagnostiko v začetni fazи bolezni (Mušič in Tomič, 1999; Template in sod., 2005; Korošec in sod., 2004).

Namen diplomskega dela je bil preizkusiti uporabnost komercialnega PCR-testa Seeplex[®] PneumoBacter ACE Detection (Seegen, J. Koreja). V kliničnih vzorcih, odvzetih v času med 22. 3. in 14. 4. 2010, smo dokazovali prisotnost DNA tipičnih in atipičnih povzročiteljev pljučnic.

Največji delež med kužninami je predstavljal izmeček – 84 vzorcev (76 %). Aspirati bronha, traheje, tubusa in zgornjih dihal so predstavljali od 4–6 % primerkov kužnine, bris žrela smo odvzeli v treh primerih. Osredotočili smo se na izmečke, saj je to kužnina, ki jo je relativno enostavno pridobiti in je primerna za mikrobiološko diagnostiko bakterijskih okužb spodnjih dihalnih poti (Loens in sod., 2009). Žal ne moremo vedno ločiti ali so bakterije, katerih DNA smo izolirali resnično tiste, ki povzročijo bolezen, ali so le del

običajne flore ustne votline in zgornjih dihal (Jørn in sod., 2005). Rezultate podkrepiti tudi preglednica 7, ki navaja gostoto in kolonizacijo površine človeškega telesa.

Preglednica 7: Gostota in pojavljanje bakterij na površini telesa

bakterija	nosna votlina	žrelo	usta
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	++	++	++
<i>Staphylococcus aureus</i> *	+	+	+
<i>Streptococcus mitis</i>		+	++
<i>Streptococcus salivarius</i>		++	++
<i>Streptococcus mutans</i> *		+	++
<i>Enterococcus faecalis</i> *		+/-	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i> *	+/-	+	+
<i>Streptococcus pyogenes</i> *		+	+
<i>Neisseria sp.</i>	+	++	+
<i>Neisseria meningitidis</i> *	+	++	+
<i>Enterobacteriaceae</i> *(<i>Escherichia coli</i>)	+/-	+/-	+
<i>Proteus sp.</i>	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *		+/-	+/-
<i>Haemophilus influenzae</i> *	+	+	+
<i>Lactobacillus sp.</i>		+	++
<i>Clostridium sp.</i> *			+/-
Corynebacteria	++	+	+
Mycobacteria	+/-	+/-	
Actinomycetes		+	+
Spirochetes		+	++
Mycoplasmas	+	+	

++ = skoraj 100 %; + = pogosto (približno 25 %); +/- = redko (manj kot 5 %); * = potencialni patogen

V tabeli so odbeljeno označani patogeni, ki so omenjeni v diplomski nalogi.

Izmerjene koncentracije DNA v kužninah so variirale od manj kot 10 ng/ml pa do največ 6900 ng/ml. Manjše koncentracije od 10 ng/ml z metodo kvantifikacije nukleinskih kislin z Qubit™ fluorometrom ne moremo zaznati. Metoda ima specifično območje delovanja in za koncentracije DNA, nižje od 10 ng/ml, ni kvalificirana (www.invitrogen.com). Pridobljene rezultate elektroforeze vzorcev, ki ne presegajo spodnje mejne koncentracije DNA v vzorcu, ne moremo primerno interpretirati. V devetih primerih (3 izpirki bronha,

3 izmečeki, 2 aspirata tubusa in 1 aspirat traheje) je bila izmerjena koncentracija DNA izven merljivega območja, kar predstavlja 8 % vseh izmerjenih koncentracije DNA. Izmerjena koncentracija DNA v vzorcu variira zaradi natančnosti postopka izolacije in kvalitete samega vzorca.

Med 101 analiziranimi DNA-vzorci nismo zasledili nobenega primera okužbe z bakterijami *M. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *B. pertussis* in *C. pneumoniae*, zato ne moremo sklepati o zanesljivosti PCR-testa Seeplex® PneumoBacter za ugotavljanje atipičnih povzročiteljev pljučnic. Hospitalizacije zaradi ZBP, ki bi jo povzročile atypične bakterije (izjema je *L. pneumophila*) so redkejše, zato je bilo možno pričakovati, da v danem obdobju vzorčenja ne bomo ujeli vzorcev bolnikov z atypično pljučnico.

V nadaljevanju diplomske naloge smo se osredotočili na zanesljivost metode pri identifikaciji bakterije *S. pneumoniae* in razlikovanje te vrste od drugih zelenečih streptokokov. 19 naključnih izolatov zelenečih streptokokov, izoliranih iz izmečkov bolnikov, smo določili z uporabo BD BBL Crystal™ Identification Systems, Gram-Positive ID Kit, nato pa nanesli na agarozni gel in primerjali s pozitivno kontrolo testa Seeplex® PneumoBacter ACE Detection. Pozitivni rezultat se je izrazil v obliki lise pri velikosti 349 bp – kar sovpada z značilno velikostjo DNA-fragmenta bakterije *S. pneumoniae*.

Pozitivni rezultati testa Seeplex® PneumoBacter ACE Detection so pripadali bakterijam identificiranimi pod zaporedimi številkami 3 (*P. pentosaceus*), 4 (*S. sanguis group*), 7 (*S. oralis*), 9 (*S. oralis*), 10 (*S. intermedius*), 11 (*P. pentosaceus*, *S. sangius*), 14 (*S. oralis*) in 16 (*S. intermedius*, *S. oralis*). Vseh 7 pozitivnih rezultatov, z izjemo bakterije *P. pentosaceus*, smo dodatno preverili s specifičnim testom za določanje bakterije *S. pneumoniae* - GenProbe® AccuProbe *Streptococcus pneumoniae*. Prisotnost DNA bakterije *S. pneumoniae* je bila z metodo GenProbe® AccuProbe *Streptococcus pneumoniae* potrjena le v vzorcu številka 10.

Iz rezultatov lahko sklepamo, da test Seeplex® PneumoBacter ACE detection ni dovolj specifična metoda za potrjevanje prisotnosti bakterije *S. pneumoniae* v vzorcu, saj so se

rezultati izkazali kot lažno pozitivni. Vzork lahko iščemo v podobnosti in sorodstvu med večimi vrstami zelenečih streptokokov. Dve transformirajoči skupini zelenečih streptokokov, *S. mitis* in *S. oralis*, sta v bližnjem sorodstvu z bakterijo *S. pneumoniae*. Zaradi podobnosti je bila identifikacija vedno težavna (Whiley and Beighton, 1998). Zaporedje nukleotidov 16S rRNA, ki je značilno za *S. mitis* in *S. oralis*, je v 99 % identično zaporedju *S. pneumoniae* (Kawamura in sod., 1995). Ker se vse omenjene bakterije pojavljajo v ustni votlini, oportunistično patogena bakterija *S. pneumoniae* občasno, *S. mitis* in *S. oralis* pa skoraj vedno, je zelo pomembno, da jih znamo identificirati in razločevati med sabo, saj je od vrste streptokoka odvisno zdravljenje (Whatmore in sod., 2000).

5.2 SKLEPI

- Zaradi težavnega in/ali dolgotrajnejšega gojenja bakterij *M. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *B. pertussis* in *C. pneumonia* je metoda hkratne verižne reakcije s polimerazo (PCR) zelo primerna za časovno ustrezno diagnostiko bolnikov z zunajbolnišnično pljučnico (ZBP) v akutni fazni bolezni.
- Izvedba testa hkratne PCR Seeplex® PneumoBacter ACE detection je enostavna, hitra in ponovljiva.
- Izmeček je kužnina, ki jo pridobimo relativno enostavno in je primerna za klasično bakteriološko diagnostiko bakterijskih okužb spodnjih dihalnih poti kot, tudi za metodo hkratne PCR.
- Metoda hkratne PCR Seeplex® PneumoBacter ACE detection ni zadosti specifična metoda za potrjevanje prisotnosti bakterije *S. pneumoniae* v vzorcu. PCR-metoda Seeplex® PneumoBacter ACE Detection ni vrstno specifična za *S. pneumoniae*.
- Med 101 analiziranimi DNA-vzorci nismo zasledili nobenega primera okužb z bakterijami *M. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *B. pertussis* in *C. pneumonia*, zato ne moremo sklepati o zanesljivosti PCR-testa Seeplex® PnemoBacter za ugotavljanje atipičnih povzročiteljev pljučnic.

6 POVZETEK

Zaradi nesmotrne in pretirane uporabe protimikrobnih zdravil, se je med mikroorganizmi pojavila odpornost proti tem zdravilom. Da bi zmanjšali širjenje odpornosti bakterij proti antibiotikom, je najpomembnejše vedeti, ali gre v resnici za okužbo, poznati moramo povzročitelja in občutljivost teh bakterij za antibiotike. Povzročitelja okužbe in občutljivost bakterij za antibiotike lahko ugotovljamo s klasično bakteriološko diagnostiko s pomočjo gojenja. Bakterijske povzročitelje okužb lahko določimo tudi z uporabo molekularnih metod, ki se vse bolj uveljavljajo v diagnostičnih mikrobioloških laboratorijih. Ena takih metod je verižna reakcija s polimerazo (*angl. polymerase chain reaction - PCR*), s katero lahko v kratkem času s specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki pomnožimo veliko število kopij željene DNA.

Najpogostejši povzročitelj ZBP je bakterija *S. pneumoniae* (40-68 % primerov), sledi *H. influenzae* (5-10 %), manj pogosto pa jo povzročajo *M. pneumoniae*, virusi, legionele, *C. pneumoniae*, aerobni, po Gramu negativni bacili, *S. aureus* in proti meticilinu odporen *S. aureus* domačega okolja (*angl. methicillin-resistant S. aureus - MRSA*).

Z našo raziskavo smo želeli ugotoviti uporabnost komercialnega PCR-testa Seeplex® PneumoBacter ACE Detection (Seegen, J. Koreja) za dokazovanje prisotnosti tipičnih in atipičnih povzročiteljev pljučnice. Pomembno nam je bilo, ali je metoda zanesljiva, dovolj občutljiva in specifična za identifikacijo *S. pneumoniae* in razlikovanje te vrste od drugih zelenečih streptokokov. Zanimalo nas je, kakšne so prednosti hkratne PCR-metode v primerjavi z rutinskimi laboratorijskimi metodami določanja respiratornih patogenov.

Iz 110 vzocev kužnin smo izolirali nukleinske kisline. Osamitev smo izvedli s pomočjo QIAGEN - QIAamp DNA Mini Kit. Vsaki kužnini smo izmerili koncentracijo DNA s fluorometrom Qubit™, rezultati pa so variirali od manj kot 10 ng/ml pa do največ 6900 ng/ml. V devetih primerih je bila izmerjena koncentracija DNA izven merljivega območja, kar predstavlja 8 % vseh izmerjenih koncentracije DNA. Za pomnoževanje in za dokazovanje DNA povzročiteljev pljučnic smo uporabili test Seeplex® PneumoBacter ACE detection. PCR-produkt smo nato nanesli na 2 % agarozni gel in zagnali postopek

elektroforeze. Med 101 analiziranimi DNA-vzorci nismo zasledili nobenega primera okužbe z bakterijami *M. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *B. pertussis* in *C. pneumoniae*.

Osredotočili smo se na zanesljivost metode pri identifikaciji bakterije *S. pneumoniae* in razlikovanje te vrste od drugih zelenečih streptokokov. Vrsto naključno izbranih izolatov zelenečih streptokokov smo določili s pomočjo BD BBL Crystal™ Identification Systems, Gram-Positive ID Kit. Rezultate smo primerjali s pozitivno kontrolo testa Seeplex® PneumoBacter ACE Detection – ali je kaj sovpadalo z značilno velikostjo DNA-fragmenta bakterije *S. pneumoniae*. Pozitivne rezultate testa Seeplex® PneumoBacter ACE Detection smo dodatno preverili s specifičnim testom za določanje bakterije *S. pneumoniae* - GenProbe® AccuProbe *Streptococcus pneumoniae*. Prisotnost DNA bakterije *S. pneumoniae* je bila z metodo GenProbe® AccuProbe *Streptococcus pneumoniae* potrjena le v vzorcu številka 10.

Iz rezultatov sklepamo, da test Seeplex® PneumoBacter ACE detection ni zadost specifična metoda za potrjevanje prisotnosti bakterije *S. pneumoniae* v vzorcu, saj so se nekateri rezultati izkazali kot lažno pozitivni. Dve transformirajoči skupini zelenečih streptokokov – *S. mitis* in *S. oralis*, sta v bližnjem sorodstvu z bakterijo *S. pneumoniae*, zato je bila identifikacija vedno težavna. Metoda PCR Seeplex® PneumoBacter ACE Detection torej tudi ni vrstno specifična za *S. pneumoniae*. Zaradi težavnega in/ali dolgotrajnejšega gojenja bakterij *M. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *B. pertussis* in *C. pneumonia* pa je metoda hkratne PCR zelo primerna za časovno ustrezno diagnostiko bolnikov z ZBP v akutni fazi bolezni. Izvedba testa hkratne PCR Seeplex® PneumoBacter ACE detection je enostavna, hitra in ponovljiva.

7 VIRI

- Armheim N.; Erlich H. 1992. Polymerase Chain Reaction Strategy. Annual review of Biochemistry, VOL. 61. XIV1992: 131-156.
- Bamberger E. S., Srugo I. 2008. What is new in pertussis? European Journal of Pediatrics, 167: 133-139
- Benson R. F., Fields B. S. 1998. Classification of the genus *Legionella*. Seminars in Respiratory Infections, 13: 90-99
- Berger D. H. in sod., 1932. In: Berger's Manual of Determinative Bacteriology
- Bernet C., Garret M., de Barbeyrac B., Bebear C., Bonnet J. 1989. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by using the polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology, 27: 2492-2496
- Campbell L. A., Kuo C. 2004. *Chlamydia pneumoniae*—an infectious risk factor for atherosclerosis. Nature Reviews Microbiology, 2: 23-32,
<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v2/n1/images/nrmicro796-f1.gif> (14. Sept. 2011)
- Campbell S. G., Marrie T. J., Anstey R., Dickinson G., Ackroyd-Stolarz S. 2003. Contribution of blood cultures to the clinical management of adult patients admitted to the hospital with community-acquired pneumonia: a prospective observation study. Chest, 123: 1142-1150
- Clyde W. A. Jr. 1979. *Mycoplasma pneumoniae* infections of man. V: The mycoplasmas II. Human and animal mycoplasmas, vol. II. Tully J.G., Whitcomb R.F. (eds). New York, Academic Press: 275-306
- Crowcroft S. N., Pebody R. G. 2006. Recent developments in pertussis. Lancet, 367: 1926-1936
- Daxboeck F., Krause R., Wenisch C. 2003. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. Clinical Microbiology and Infection, 9:263-273
- DNA Amplification. 2005. Cowrie Genetis Database Project.
<http://www.flmnh.ufl.edu/cowries/amplify.html> (15. Mar. 2012)
- Dowell S. F., Garman R. L., Liu G., Levine O. S., Yang Y. H. 2001. Evaluation of Binax NOW, an assay for the detection of pneumococcal antigen in urine samples, preformed among pediatric patients. Clinical Infectious Diseases, 32: 824-825
- Dowell S. F., Peeling R. W., Boman J., Carlone G. M., Fields B. S., Guarner J., Hammerschlag M. R., Jackson L. A., Kuo C. C., Maass M., Messmer T. O., Talkington D. F., Tondella M. L., Zaki S. R., *C. pneumoniae* Workshop Participants. 2001. Standardizing *Chlamydia pneumoniae* Assays: Recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and

- the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). Clinical Infectious Diseases, 33, 4: 492-503
- Edelstein P. H. 1987. The laboratory diagnosis of Legionnaires' disease. Seminars in Respiratory Infections, 2: 235-241
- Erlich H. A., Gelfand D., Sninsky J. J. 1991. Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction. Science, 252, 5013, 1643-1651
- Eržen R., Korošec P., Šilar M., Košnik M. 2007. Vpliv protimikrobnega zdravljenja na občutljivost tehnike PCR pri okužbah z *Legionello pneumophilo* – prikaz treh primerov. Zdravniški vestnik, 76: 95-100
- European Centre for Disease Prevention and Control. 2011. <http://www.ecdc.europa.eu/en/> (8. Oct. 2011)
- Everett K. D., Bush R. M., Andersen A. A. 1999. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. International Journal of Systematic Bacteriology 49: 415–440
- Everett K. D. 2000. *Chlamydia* and *Chlamydiales*: more than meets the eye. Veterinary Microbiology, 75, 2: 109-126
- Ferwerda A., Moll H. A., de Groot R. 2001. Respiratory tract infections by *Mycoplasma pneumoniae* in children: a review of diagnostic and therapeutic measures. European Journal of pediatrics, 160: 483-491
- Fields B. S. 1992. Procedures for the recovery of *Legionella* from the environment, vol. 2. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta
- Fields B. S., Benson R. F., Besser R. E. 2002. *Legionella* and Legionnaires` disease: 25 years of investigation. Clinical Microbiology Reviews, 15: 506-526
- Fine M. J., Smith M. A., Carson C. A., Mutha S. S., Sankey S. S., Weissfeld L. A., Kapoor W. N. 1996. Prognosis and outcomes of patients with community-acquired pneumonia. The Journal of American Medical Association, 275: 134-141
- Forgie S., Marrie T. J. 2009. Healthcare-associated atypical pneumoniae. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine; 30: 67-85
- Fry N. K., Warwick S., Saunders N. A., Embley T. M. 1991. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family *Legionellaceae*. Journal of General Microbiology, 137: 1215-1222

- Gibbs R. A. 1990. DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction. *Analytical Chemistry*, 62: 1202-1214
- Grayston J. T., Kuo C. C., Campbell L. A., Wang S. P. 1989. *Chlamydia pneumoniae* sp. for *Chlamydia* sp. strain TWAR. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39: 88-90
- Guven G. S., Uzon O. 2003. Principles of goof use of antibiotics in hospital. *Journal of Hospital Infection*, 53: 91-96
- Haemophilus influenzae* type B (HiB). 2005. World Health Organization.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs294/en/> (28. Mar. 2011)
- Haemophilus influenzae*. 2011. Microbiology in Pictures.
<http://www.microbiologyinpictures.com/haemophilus%20influenzae.html> (5. Feb. 2012)
- Haemophilus influenzae*. 2011. Microbiology in Pictures.
<http://www.microbiologyinpictures.com/haemophilus%20influenzae.html> (22. Nov. 2011)
- Halperin S. 2007. The control of pertussis – 2007 and beyond. *The New England Journal of Medicine*, 356: 110-113
- Henegariu O., Heerema N. A., Dlouhy S. R., Vance G. H., Vogt P. H. 1997. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *BioTechniques*, 23: 504-511
- Higuchi R., Dollinger G., Walsh P. S., Griffith R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, 10: 413–417
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. 1993. Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11: 1026–1030
- History and Development of the Polymerase Chain Reaction (PCR). 2011. Molecular Station. <http://www.molecularstation.com/pcr/history-of-pcr/> (15. Mar. 2011)
- Höffken G., Lorenz J., Kern W., Welte T., Bauer T., Dalhoff K., Dietrich E., Ewig S., Gastmeier P., Grabein B., Halle E., Kolditz M., Marre R.; Sitter H. 2009. Epidemiologie, Diagnostik, antimikrobielle Therapie und Management von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbenen unteren Atemwegsinfektionen sowie ambulant erworbener Pneumonie – Update 2009 (Teil I). *Pneumologie* 2009, 63: 549-577
- Horwitz M. A. 1983. The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 158: 2108-2126

- Horwitz M. A. 1984. Phagocytosis the Legionnaires'disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell*, 36: 27-33
- Horwitz M. A., Silverstein S. C. 1980. Legionnaire's' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiplies intracellularly in human monocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, 66: 441-450
- Hvidsten D., Halvorsen D. S., Berdal B. P., Gutteberg T. J. 2009. *Chlamydophila pneumoniae* diagnostics: importance of methodology in relation to timing of sampling. *Clinical Microbiology and Infection*, Jan 2009, 15(1): 42-49
- Ihan A. 2002. Pnevmonokok. V: Medicinska bakteriologijo z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 155-158
- Ihan A., Avšič – Županc T. 2000. Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo, Medicinski razgledi, Ljubljana, 2000: 329-332
- Jaulhac B., Nowicki M., Bornstein N., Meunier O., Prevost G., Piemont Y., Fleurette J., Monteil H. 1992. Detection of *Legionella spp.* In brnochoaleveolar lavage fluids by DNA amplification. *Journal of Clinical Micorbiology*, 30: 920-924
- Jawetz, Malnick & Adelberg's. 1991. Medical microbiology, 18th ed, Appleton& Lange, East Norwalk; 237-239
- Jedrzejas M. J. 2001. Pneumococcal virulence factors: Structure and function. *Microbiology and molecular biology reviews*. June 2001:187-207
- Johansson K. E., Pettersson B. 2002. Taxonomy od Mollicutes. V: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Rasin S., Herrman R. (eds.). New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 1-30
- Jordan J. J. (2000) Real-time detection of PCR products and microbiology. *New Technologies for Life Sciences: A Trends Guide*, 61-66
- Jørn A., Pater B. J., Stokes L. N., Olsen I., Dewhurst F. E. 2005. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, nov 2005, 43, 5721-5723
- Kashuba A. D., Ballow C. H. 1996. Legionella urinary antigen testing: potential impact on diagnosis and antibiotic therapy. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 24: 129-139
- Kawamura Y., Hou X.-G., Sultana F., Miura H., Ezaki T. 1995. Determination of 16S rRNA sequence of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45: 406-408

- Kennedy W. A., Chang S. J., Purdy K., Le T., Kilgore P. E., Kim J. S., Anh D. D., Huong P. L., Dong B. Q., Tan D. M., Clemens J. D., Ward J. I. 2007. Incidence of bacterial meningitis in Asia using enhanced CSF testing: polymerase chain reaction, latex agglutination and culture. *Epidemiology and Infection*, 135 (7): 1217–26
- Keše D. 2002. Klamidije. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 321-328
- Klein D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular medicine*, 8, 6: 257-260
- Kleppe K. E., Khorana H. G. 1971 *Journal of Molecular Biology* 56, 341-346
- Kong F., Gordon S., Gilbert G. L. 2000. Rapid-cycle PCR for detection and typing of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 4256-4259
- Korošec P., Eržen R., Šilar M., Košnik M. 2004. PCR for detection of atypical pathogens causing pneumonia. In: Zidarn M., Košnik M., Zdolšek S., (ur.) Book of abstracts of the 3rd Slovenian congress of pneumology and allergology and 1st Slovenian congress of respiratory nursing. 2004, Portorož, Slovenija. str 23
- Kretsinger K., Broder K. R., Cortese M. M. 2006. Preventing tetanus, diphtheria and pertussis among adults: use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and acellular pertussis vaccine recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) and recommendation of ACIP, supported by the Healthcare, for use of Tdap among health-care personnel. *MMWR Recommendations Report*, 55(RR-17): 1-37
- Kuo C. C., Campbell L. 2000. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in arterial tissues. *Journal of Infectious Diseases*, 181, Suppl 3: S432-S436
- Kuo C. C., Jackson L. A., Campbell L. A., Grayston J. T. 1995. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clinical Microbiology Reviews*, 8: 451-461
- Kutlin A., Tsumura N., Emre U., Roblin P. M., Hammerschlag M. R. 1997. Evaluation of *Chlamydia* immunoglobulin M (IgM), IgG, and IgA rELISAs Medac for diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 4: 213-216
- Legionella* Lab Services for Legionella Water Testing in Colling Towers and Water Systems. 2011. EMLab P&K.
http://www.emlab.com/s/services/legionella_testing_lab.html (14. Sept. 2011)

Legionella/Legionnaires' Disease. 2011. Alegre.

<http://www.binaxnow.com/legionella.aspx> (14. Sept. 2011)

Lievano F. A., Reynolds M. A., Waring A. L. 2002. Issues associated with and recommendations for using PCR to detect outbreaks of pertussis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 2801-2805

Lindsay D. S., Abraham W. H., Findlay W., Christie P., Johnston F., Edwards G. F. 2004. Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods. *Journal of Medical Microbiology*, 53: 183-187

Loens K., Goossens H. 2003. Molecular diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 4915-23

Loens K., Van Heirstraeten L., Malhotra-Kumar S., Goossens H., Ieven M. 2009. Optimal Sampling Sites and Methods for Detection of Pathogens Possibly Causing Community-Acquired Lower Respiratory Tract Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, January 2009, 47(1): 21–31

Mainwald M., Helbig J. H., Luck P. C. 1998. Laboratory methods for the diagnosis of Legionella infections. *Journal of Microbiological Methods*, 33: 59-79

Marolt-Gomišček M., Radšel-Medvešček A. 2002. Infekcijske bolezni. Ljubljana, Tangram: 235-8

Mackay I. M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10: 190–212

Moulder J. W. 1993. Why is *Clamydia* sensitive to penicillin in the absence of peptidoglycan? *Infectious Agents and Diseases*, 2: 97-99

Müller F. M. C., Hoppe J. E., Wirsing von König C. H. 1997. Laboratory diagnosis of pertussis: state of the art in 1997. *Journal of Clinical Microbiology*; 35: 2435-2443

Mullis K. B., Falloona F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155: 335-50

Mullis K. B., Falloona F. A., Scharf S., Saiki R. K., Horn G., Erlich H. A. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *ColdSpringHarbor Symposia on Quantitative Biology*, 1986

Mullis, K. B. 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*, April 1990

Multiplex PCR. 2011. Premier Biosoft.

http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/multiplex-pcr.html (8. Apr. 2011)

Multiplex PCR. 2009. Tataa Biocenter.

[www.etseq.urv.es_cdmedics_intranet_vse__q=system_files_Multiplex PCR and real time PCR course 20090220.pdf](http://www.etseq.urv.es_cdmedics_intranet_vse__q=system_files_Multiplex%20PCR%20and%20real%20time%20PCR%20course%20090220.pdf)

Murdoch D. R. 2003. Diagnosis of Legionella infection. Clinical Infectious Diseases, 36: 64-69

Murdoch D. R. 2004. Molecular genetic methods in the diagnosis of lower respiratory tract infections. APMIS, 112: 713-727

Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Pfaller M. A., Yolken R. H. 2003. Manual of Clinical Microbiology, 8th Ed. Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Pfaller M. A., Yolken R. H., (eds.) American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.: 623 – 632

Murray P. R., Rosenthal K. S., Kobayashi G. S., Pfaller M. A. 2009. *Streptococcus*. V: Medical microbiology. 6th ed. Murray P. R., Rosenthal K. S., Kobayashi G. S., Pfaller M. A. (eds.). St. Luis, Mosby: 237-257

Mušič E., Tomič V. 1999. Mikrobiološka analiza kužnin pri pljučnicah in možne napake. In: Dragaš A. Z., Fišer J., Prinčič D., (ur). Zbornik strokovnega srečanja Mikrobiološka analiza kužnin. Združenje za infektologijo in Sekcija za klinično mikrobiologijo in hospitalno higieno pri SZD, Nova Gorica 1999: 165-72

Nolte F. S. 2008. Molecular diagnostics for detection of bacterial and viral pathogens in community-acquired pneumonia. Clinical Infectious Diseases, 47, 3: S123-6

Orr P. H., Peeling R. W., Fast M., Brunka J., Duckworth H., Harding G. K. M., Nicolle L. E. 1996. Serological study of responses to selected pathogens causing respiratory tract infection in the institutionalized elderly. Clinical Infectious Diseases, 23: 1240-5

Orrison L. H., Bibb W. F., Cherry W. B., Thacker L. 1983. Determination of antigenic relationships among legionellae and non-legionellae by direct fluorescent-antibody and immunodiffusion tests. Journal of Clinical Microbiology, 17: 332-337

Parkhill J., Sebaihia M., Preston A., Murphy L. D., Thomson N., Harris D. E., Holden M. T., Churcher C. M., Bentley S. D., Mungall K. L., Cerdeño-Tárraga A. M., Temple L., James K., Harris B., Quail M. A., Achtman M., Atkin R., Baker S., Basham D., Bason N., Cherevach I., Chillingworth T., Collins M., Cronin A., Davis P., Doggett J., Feltwell T., Goble A., Hamlin N., Hauser H., Holroyd S., Jagels K., Leather S., Moule S., Norberczak H., O'Neil S., Ormond D., Price C., Rabbinowitsch E., Rutter S., Sanders M., Saunders D., Seeger K., Sharp S., Simmonds M., Skelton J., Squares R., Squares S., Stevens K., Unwin L., Whitehead S., Barrell B. G., Maskell D. J. 2003. Comparative analysis if the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. Nature Genetics, 35: 32-40

- Peeling R. W., Brunham R. C. 1996. Chlamydia as pathogens: new species and new issues. Emerging Infectious Diseases journal, 2: 307-19
- Persson K., Hamby K., Uguzzoli L. A. 2005. Four-color multiplex reverse transcription polymerase chain reaction-Overcoming its limitations. Analytical Biochemistry, 344: 33-42
- Pertussis (Whooping Cough). 2010. Centers for Disease Control and Prevention (26. Avg. 2010) <http://www.cdc.gov/pertussis/about/index.html> (16. Nov. 2011)
- Pine L., George J. R., Reeves M. W., Harrell W. K. 1979. Development of a chemically defined liquid medium for growth of *Legionella pneumophila*. Journal of Clinical Microbiology, 9: 615-626
- Quibit Fluorometric Quantitation. 2012. Life technologies. www.invitrogen.com/qubit (16. Apr. 2012)
- Razin S. 2002. Diagnosis of mycoplasmal infections. V. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Razin S. and Herrmann R. (ed.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, N.Y. p. 531-544
- Razin S., Oliver O. 1961. Morphogenesis of mycoplasma and bacterial L-form colonies. Journal of General Microbiology, 24: 225-237
- Rockey D. D., Lenart J., Stephens R. S. 2000. Genome sequencing and our understanding of chlamydiae. Infection and Immunity, 68: 5473-5479
- Roson B., Fernandez-Sabe N., Carratala J., Verdaguer R., Dorca J., Manresa F., Gudiol F. 2004. Contribution of an urinary antigen assay (Binax NOW) to the early diagnosis of pneumococcal pneumonia. Clinical Infectious Diseases, 38: 222-226
- Rottem S. 2002. Invasion of mycoplasmas into and fusion with host cells. V. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Razin S. and Herrmann R. (eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, N.Y. 391-402
- Saikku P., Leinonen M., Tenkanen L. 1992. *Chlamydia pneumoniae* infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki heart study. Annals of Internal medicine, 116: 273-278
- Schachter J. 1978. Chlamydial infection (first of three parts). New England Journal of Medicine, 298, 8: 428-435
- Sheppard C. L., Harrison T. G., Morris R., Hogan A., George R. C. 2004. Autolysin-targeted LightCycler assay including internal process control for detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in clinical samples. Journal of Medical Microbiology, 53: 189-195

- Smith A. L. 1976. Antibiotics and invasive *Haemophilus influenzae*. New England Journal of Medicine, 10, 294: 1329-1331
- Strachan T., Read A. P. 1999. Human Molecular Genetics 2. John Wiley & Sons Inc. Chapter 6 Section 1.
- Streptococcus pneumoniae*. 2011. American Society for Microbiology. Microbe Library.
<http://www.microbelibrary.org/images/atlas-bld/streptococcus%20pneumoniae%20fig17.jpg> (14. Sept. 2011)
- Talkington D. F., Waites K. B., Schwartz S. B., Besser R. E. 2001. Emerging from obscurity: understanding pulmonary and extrapulmonary syndromes, pathogenesis, and epidemiology of human *Mycoplasma pneumoniae* infections. V. Emerging Infections 5. American Society for Microbiology. Scheld W. M., Craig W. A., Hughes J. M. (eds.). Washington, D.C. 57-84
- Templete K. E., Schelting S. A., van den Eeden W. C., Graffelman A. W., van den Broek P. J., Class E. C. 2005. Improved diagnosis of the etiology of community-acquired pneumonia with real-time polymerase chain reaction. Clinical Infectious Diseases, 41: 345-51
- Thacker W. L., Talkington D. F. 2000. Analysis of complement fixation and commercial enzyme immunoassays for detection of antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* in human serum. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 7: 778-780
- Thom D. H., Grayston J. T., Siscovick D. S. 1992. Association of prior infection with *Chlamydia pneumoniae* and angiographically demonstrated coronary artery disease. JAMA, 268: 68-72
- Todar K. 2008. Todar's online Textbook of Bacteriology. *Haemophilus influenzae* and Hib meningitis. 2011. <http://www.textbookofbacteriology.net/haemophilus.html> (22. Nov. 2011)
- Todar K. 2008. Todar's online Textbook of Bacteriology.
http://textbookofbacteriology.net/kt_toc.html (16. Apr. 2012)
- Todar K. *Haemophilus influenzae* and Hib meningitis. 2011.
<http://textbookofbacteriology.net/haemophilus.html> (22. Nov. 2011)
- Tong C., Sillis M. 1993: Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia psittaci* in sputum samples by PCR. Journal of Clinical Pathology, 46: 313-317
- Tünger Ö., Dinç G., Özbakkaloglu B., Atman Ü. C., Algün Ü. 2000. Evaluation of rational antibiotic use. International Journal of Antimicrobial Agents, 15: 131-5
- Tuomanen E. 2006. *Streptococcus pneumoniae*. V: The prokaryotes. 3th ed. A handbook on the biology of bacteria. Vol. 4. Bacteria: firmicutes, Cyanobacteria. Dworkin M.,

Falkow S., Rosenber E., Schleifer K. H., Stackebrandt E. (eds.). New York,
Springer: 149-162

Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H.,
Whitman W. B. 2009. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 3: The
Firmicutes. 2nd ed. New York. Springer: 1450

Waits K. B., Talkington D. F. 2004. *Mycoplasma pneumoniae* and Its Role as a Human
Pathogen. Clinical Microbiology Reviews, 17, 4: 697-728

Wang S. 1999. Serology for *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). V. *Chlamydia pneumoniae*:
the lung and the heart. Allegra L., Blasi F. (eds.). Milano: Springer-Verlag Italia:
16-23

Whatmore A. M., Efstratiou A., Pickerill A. P., Broughton K., Woodard G., Sturgeon D.,
George R., Dowson C. G. 2000. Genetic relationships between clinical isolates of
Streptococcus pneumoniae, *Streptococcus oralis* and *Streptococcus mitis*;
characterization of atypical pneumococci and organisms allied to *S. mitis* harboring
S. pneumoniae virulence factorencoding genes. Infection and Immunity, 68: 1374-
1382

Whiley R. A., Beighton D. 1998. Current classification of the oral streptococci. Oral
Microbiology and Immunology, 13: 195-216

Wood N., McIntyre P. 2008. Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management
and prevention. Paediatric respiratory reviews, 9: 201-212

ZAHVALA

Zahvaljujem se dr. Viktoriji Tomič in prof. dr. Nini Gunde Cimerman, ki sta mi omogočili opravljanje diplomske naloge pod njunim mentorstvem in mi nudili vso strokovno pomoč pri pisanju.

Zahvaljujem se doc. dr. Polni Zalar za hitro in natančno recenzijo diplomske naloge.

Zahvaljujem se prof. dr. Marjanci Starčič Erjavec za prijaznost in potrežljivost pri dogovarjanju datuma zagovora.

Najlepša hvala vsem sodelavkam in sodelavcu v Laboratoriju za respiratorno mikrobiologijo na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik.

Hvala možu in staršem za podporo, ki ste mi jo nudili. Vztrajno in z voljo sem le prišla do cilja.

Zahvala gre tudi prijateljem in sošolcem za pomoč pri študiju, nastajanju naloge, veliko dobre volje in smeha.

PRILOGA

Priloga A: Nabor vzorcev, tipi kužnin in gostota DNA v vzorcu

št. vzorca	tip kužnine	konz. [ng/ml]
1	Izmeček	67,4
2	Izmeček	161
3	Izmeček	491
4	Izmeček	98,2
5	aspirat traheje	434
6	Izmeček	70,8
7	aspirat tubusa	3090
8	aspirat zg. dihal	1540
9	Izmeček	156
10	Izmeček	309
11	Izmeček	387
12	Izmeček	161
13	Izmeček	130,8
14	Izmeček	1574
15	Izmeček	1080
16	Izmeček	784
17	Izmeček	44
18	Izmeček	1936
19	Izmeček	4800
20	Izmeček	6900
21	Izmeček	1290
22	Izmeček	1870
23	Izmeček	1258
24	aspirat traheje	99,4
25	Izmeček	566
26	Izmeček	248
27	Izmeček	1046
28	Izmeček	63,6
29	aspirat zg. dihal	3660
30	aspirat zg. dihal	117
31	aspirat tubusa	128,4
32	Izmeček	1896
33	aspirat tubusa	1054
34	Izmeček	380
35	Izmeček	116
36	Izmeček	1984
37	Izmeček	2540
38	Izmeček	3680

št. vzorca	tip kužnine	konz. [ng/ml]
39	Izmeček	764
40	Izmeček	1420
41	Izmeček	1444
42	Izmeček	1620
43	aspirat tubusa	264
44	aspirat bronha	<10
45	Izmeček	506
46	Izmeček	964
47	Izmeček	2920
48	Izmeček	<10
49	Izmeček	550
50	Izmeček	700
51	Izmeček	<10
52	Izmeček	704
53	Izmeček	2040
54	Izmeček	3300
55	Izmeček	1102
56	Izmeček	630
57	Izmeček	1258
58	Izmeček	502
59	bris žrela	848
60	aspirat zg. dihal	64
61	Izmeček	3760
62	Izmeček	994
63	Izmeček	3600
64	Izmeček	1076
65	aspirat traheje	374
66	Izmeček	1652
67	aspirat tubusa	<10
68	Izmeček	56
69	Izmeček	<10
70	Izmeček	1090
71	aspirat traheje	<10
72	aspirat tubusa	<10
73	Izmeček	151,6
74	aspirat bronha	<10
75	Izmeček	3860
76	Izmeček	41
77	Izmeček	2480
78	Izmeček	420
79	Izmeček	404
80	aspirat zg. dihal	84,2
81	aspirat bronha	197
82	aspirat bronha	<10
83	Izmeček	100,8
84	Izmeček	976

št. vzorca	tip kužnine	konc. [ng/ml]
85	aspirat tubusa	1792
86	aspirat zg. dihal	554
87	Izmeček	1748
88	Izmeček	117,6
89	Izmeček	1058
90	aspirat bronha	264
91	Izmeček	660
92	Izmeček	390
93	Izmeček	342
94	Izmeček	124
95	Izmeček	2380
96	Izmeček	174,2
97	Izmeček	5320
98	Izmeček	1060
99	Izmeček	424
100	Izmeček	524
101	Izmeček	1038
102	Izmeček	1304
103	Izmeček	544
104	aspirat zg. dihal	88,2
105	Izmeček	3040
106	Izmeček	792
107	Izmeček	952
108	Izmeček	530
109	bris žrela	4000
110	bris žrela	4880