proLékaře.cz | 22.11.2024

Nová metoda a schéma typizace *Streptococcus pneumoniae*

Vacková Zuzana, Klímová Martina, Kozáková Jana

Státní zdravotní ústav, Praha

SOUHRN

Cíl práce: Zavedení nové molekulární PCR metodiky pro účely typování kmenů *Streptococcus pneumoniae* v NRL pro streptokokové nákazy.
Materiál a metodika: Kmeny *Streptococcus pneumoniae* jsou zasílány do NRL z různých regionů České republiky. Běžně je identifikace a typizace založena na morfologii kmene, citlivosti k optochinu, rozpustnosti ve žluči, latexaglutinaci a Quellung reakci. Od roku 2012 byla použita nová multiplexová polymerázová řetězová reakce (mPCR). Proběhlo testování nové metody na 210 izolátech *S. pneumoniae* a na 8 izolátech příbuzných druhů *S. pseudopneumoniae, S. sanguinis* a *S. oralis.*
Výsledky: Nová mPCR metoda byla v NRL pro streptokokové nákazy aplikována do algoritmu identifikace a především typizace *S. pneumoniae.* Technika mPCR umožnila správně identifikovat a otypovat všechny kmeny pneumokoků zkoumaného souboru, naopak izoláty příbuzných druhů vykazovaly správnou negativní reakci. Metoda mPCR měla ve zkoumaném souboru 100% senzitivitu i specificitu. Ukázalo se, že PCR reakce je pro typování *S. pneumoniae* výborně použitelná metoda.
Závěr: Sérotypy a séroskupiny *S. pneumoniae* byly doposud rozlišovány pouze pomocí sérologické Quellung reakce, nyní došlo ke změně a novému zavedení mPCR reakce. Jedná se o molekulární metodu zlepšující a zpřesňující typizaci *S. pneumoniae.*

KLÍČOVÁ SLOVA

PCR typování *Streptococcus pneumoniae* – Quellung reakce – *Streptococcus pneumoniae*

SUMMARY

Vacková Zuzana, Klímová Martina, Kozáková Jana: A Novel Typing Method and Scheme for *Streptococcus pneumoniae*
Study aim: To introduce a novel molecular PCR method for the typing of *Streptococcus pneumonia* in the National Reference Laboratory (NRL) for Streptococcal Infections.
Material and Methods: Strains of *Streptococcus pneumoniae* are referred to the NRL from different regions of the Czech Republic. Generally, the identification and typing are based on strain morphology, optochin susceptibility, bile solubility, latex agglutination, and the Quellung reaction. Since 2012, a novel multiplex polymerase chain reaction (mPCR) assay has been introduced. The novel assay was tested on 210 *S. pneumoniae* isolates and 8 isolates of the related species *S. pseudopneumoniae, S. sanguinis,* and *S. oralis*.
Results: The NRL for Streptococcal Infections has included a novel mPCR assay in the algorithm of *S. pneumoniae* identification and typing. The mPCR assay was able to identify and type any pneumococcal strain from the study collection, with the isolates of the related species remaining negative. The mPCR assay showed 100% sensitivity and specificity in this study. The pCR appeared to be an excellent tool for *S. pneumoniae* typing.
Conclusion: Until recently, *S. pneumoniae* serotypes and serogroups were differentiated using a serological approach (Quellung reaction), but the NRL for Streptococcal Infections has switched to a novel mPCR assay. This molecular tool improves *S. pneumoniae* typing, making it more accurate.

KEYWORDS

PCR typing of *Streptococcus pneumoniae* – Quellung reaction – *Streptococcus pneumoniae*

Epidemiol. Mikrobiol. Imunol., 62, 2013, č. 2, s. 50–58

ÚVOD

Streptococcus pneumoniae patří celosvětově k nejvýznamnějším patogenům. Způsobuje pestrou škálu různých onemocnění, od nejzávažnějších invazivních onemocnění (IPO), jakými jsou meningitidy, bakterémie, sepse či pneumonie, až po život zpravidla neohrožující akutní otitidy či sinusitidy. Nejvyšší nemocnost IPO je pozorována u nejmenších dětí (do jednoho roku věku), u seniorů (nad 65 let věku), ale také vysoce rizikovou skupinu představují imuno-

proLékaře.cz | 22.11.2024

kompromitovaní pacienti a pacienti s chronickými kardiopulmonárními nemocemi [1].
Pneumokoky se řadí mezi grampozitivní bakterie, typicky se vyskytující ve formě diplokoků. Jejich hlavním faktorem virulence je pouzdro. Jedná se o pouzdro polysacharidové povahy, tvořené typově specifickými antigeny. Podle strukturální variability typově specifického polysacharidového pouzderného antigenu, se pneumokoky klasifikují do více než 90 sérotypů a 46 séroskupin [2]. Sérotypy můžeme podle složení pnemokokových vakcín označit na dvě skupiny, vakcinační a nevakcinační. Distribuce jednotlivých sérotypů je ovlivněna geografickou polohou, socioekonomickými podmínkami, věkem pacienta, klinickou formou onemocnění, ale i vakcinační strategií [3, 4, 5]. Při dlouhodobém používání konjugovaných vakcín se nesmí zapomínat i na problém fenoménu replacementu, kompetitivní náhrady sérotypů krytých vakcínou jinými, tzv. nevakcinačními pneumokokovými sérotypy.
Z mnoha důvodů je proto velice žádoucí neustále monitorovat a analyzovat zastoupení sérotypů u kmenů pneumokoků izolovaných z klinických materiálů pacientů. A právě i této problematice se NRL pro streptokokové nákazy (NRL/STR) již celou řadu let věnuje a snaží se novelizovat používané metodiky dle současně známých informací.
V tomto sdělení prezentujeme novou molekulární metodu PCR používanou v procesu identifikace, ale především typizace *S. pneumoniae* v NRL/STR. Tato metoda byla v průběhu roku 2012 NRL/STR testována a od roku 2013 zařazena do rutinního provozu laboratoře.

MATERIÁL A METODIKY

Kmeny

V období testování nové PCR metody byly použity kmeny *S. pneumoniae* napříč sérotypy (210 izolátů) z databáze IPO NRL/STR, *S. pseudopneumoniae* (2 izoláty), *S. sanguinis* (4 izoláty) a *S. oralis* (2 izoláty) ze sbírky NRL/STR. Celkem bylo tedy otestováno 218 izolátů. Jednalo se o kmeny získané z různých biologických vzorků – hemokultura (110 izolátů), likvor (24 izolátů), stěr z epidurálního prostoru (1 izolát), sputum (14 izolátů), bronchoalveolární laváž (10 izolátů), nazofaryngeální výtěr (31 izolátů), stěr ze středouší (9 izolátů), stěr z oka (2 izoláty), punktát (8 izolátů), aspirát (4 izoláty), absces (4 izoláty), stěr z rány (1 izolát).

Identifikace *Streptococcus pneumoniae*

Pro identifikaci species se používá několik testů. Po získání čisté kultury bakteriálního kmene na krevním agaru Columbia (COA) s optochinovým diskem je hodnocena morfologie kolonií. Pneumokoky jsou citlivé k optochinu v koncentraci, jenž neovlivní ostatní viridující streptokoky. Následuje Test rozpustnosti ve žluči, pneumokoky jsou lyzovány v 10% roztoku deoxycholátu sodného. Kombinací těchto metod zjistíme, zda se jedná o *S. pneumoniae*. V případě problémů či nejasností lze využít ještě další identifikační metody, jakými jsou např. latexaglutinace, reakce s pneumokokovým OMNI sérem, biochemická identifikace, mikroskopie, katalázový test, či molekulární metody (PCR, MLST).

Typizace *Streptococcus pneumoniae*

1. Sérotypizace

Quellung (Neufeldova) reakce je používána již od roku 1902 a doposud představuje zlatý standard [6]. Jedná se o sérologickou reakci mezi typovým pouzderným polysacharidovým antigenem pneumokoka a typově specifickou protilátkou v hyperimunním králičím komerčním antiséru. Existují poolová antiséra A–I (tab. 1) a pro případné finální dourčení faktorová antiséra (SSI Dánsko). Pozitivní reakce se projeví zvýrazněním pouzderného

Tabulka 1. Tabulka sérotypového složení poolových antisér pro Quellung reakce
Table 1. Table of serotype-specific antisera included in the pool for the Quellung reaction

Pool	Quellung sérotyp/séroskupina						
A	1	2	4	5	18		
B	3	6	8	19			
C	7	20	24	31	40		
D	9	11	16	36	37		
E	10	12	21	33	39		
F	17	22	27	32	41		
G	29	34	35	42	47		
H	13	14	15	23	28		
I	25	38	43	44	45	46	48

proLékaře.cz | 22.11.2024

materiálu – „bobtnání pouzdra“, které se pozoruje v nativním preparátu pod mikroskopem s fázovým kontrastem.

2. Genotypizace

Genotypizace představuje modernizaci metodiky typizace *S. pneumoniae* za použití polymerázové řetězové reakce, neboli PCR. NRL/STR vycházela při navrhování nové metodiky z principu metody PCR používané v THL, National Institute for Health and Welfare, Helsinky [7]. Následně došlo k modifikaci metody. Jedná se o molekulární metodu uspořádanou do schématu multiplexové reakce PCR (mPCR) s vyhodnocením na agarózové elektroforéze. Účelem této metody je detekce pneumokokových genů, v genomu bakterie, které jsou typické pro určitou kapsulu séroskupiny či sérotypu *S. pneumoniae*. PCR využívá specifických primerů pro dané geny podle CDC, The Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA [9]. Používané geny jsou kapsulární determinanty (geny: *cps*A, *wzy*, *cps*H, *cps*I, *cap*B, *wci*Y, *cps*K, *cps*G, *gal*U, *wci*P, *cps*O, *wci*, N*beta*, *wcw*L, *wer*G, *wzx*, *wci*L). Do multiplex PCR reakcí bylo dále ještě zařazeno testování cpsA genu pro molekulární identifikaci *S. pneumoniae* bez ohledu na séroskupinu či sérotyp.

Algoritmus používání mPCR reakce typující *S. pneumoniae*

V literatuře je popsán následující mechanismus typování *S. pneumoniae* [8]: Sestavení šesti mPCR reakcí podle prevalencí výskytu jednotlivých sérotypů. Každá mPCR obsahuje primery na šest sérotypů či séroskupin a vždy primery pro cpsA gen *S. pneumoniae*. S vlastním DNA vzorku se vždy začíná s testováním mPCR1 a pokračuje se postupně s dalšími mPCR reakcemi až do doby pozitivního nálezu, což může být i mPCR6. Po mPCR reakcích se podle potřeby provádí dourčení Quellung reakcí s faktorovými antiséry.

Tento mechanismus byl v NRL/STR otestován s výbornými výsledky. Nicméně se neukázal pro místní použití dostatečně efektivní, a proto došlo k následujícím úpravám: Bylo sestaveno devět různých mPCR reakcí podle složení poolových antisér pro Quellung reakci (tab. 2). Podle nich se také jednotlivé mPCR reakce nazvaly A–I. Jednotlivé mPCR se liší počtem primerů pro sérotypy či séroskupiny, od dvou do sedmi a taktéž vždy obsahují primery pro detekci cpsA genu. S vlastní DNA vzorku se použije mPCR označená písmenem podle poolového antiséra, se kterým kmen dává pozitivní Quellung reakci. Jedná se tedy pouze o předurčenou jednu mPCR reakci pro daný vzorek. V případě potřeby následuje dourčení Quellung reakcí s faktorovými antiséry.

Provedení mPCR rekce typující *S. pneumoniae*

Izolace DNA z bakteriálních kmenů *S. pneumoniae* se provádí pomocí Amp QIAGEN mini kit podle manuálu [10].

Obecné složení multiplexPCR reakcí (specifické složení jednotlivých typů A–I se liší):

2,5 µl (1x) 10x reakčního pufru k iTaq DNA polymeráze
2 µl $MgCl_2$
0,5 µl (0,2 mM) dNTP 10 mM
podle typu (10 µM) specifického primeru – forward
podle typu (10 µM) specifického primeru – reverse
0,4 µl iTaq DNA polymeráza
ad 25 µl PCR vody
K 2,5 µl izolované templátové DNA z vyšetřovaných vzorků se přidá po 22,5 µl master mixu do 0,2 ml PCR zkumavek.

Amplifikace DNA:

Cykly: 94 °C – 4 min
94 °C – 45 sec
54 °C – 45 sec
65 °C – 2:30 min } 35x (94 °C – 45 sec, 54 °C – 45 sec, 65 °C – 2:30 min)
65 °C – 10 min
4 °C

Tabulka 2. Tabulka sérotypového složení mPCR směsí pro PCR reakce
Table 2. Table of serotypes included in the mPCR mixes

Pool	mPCR sérotyp/séroskupina						
A	1	2	4	5	18A/B/C/F		
B	3	6A/B/C/D	6C/D	8	19A	19F	
C	7A/F	7C/B/40	20	24A/B/F	31		
D	9N/L	9V/A	11A/D	16F	37/33F/A		
E	10A	10F/C/33C	12F/A/44/46	21	33F/A/37	39	
F	17F	22F/A					
G	34	35A/C/42	35B	35F/47F			
H	13	14	15A/F	15B/C	23A	23B	23F
I	38/25F/A	12F/A/44/46					

proLékaře.cz | 22.11.2024

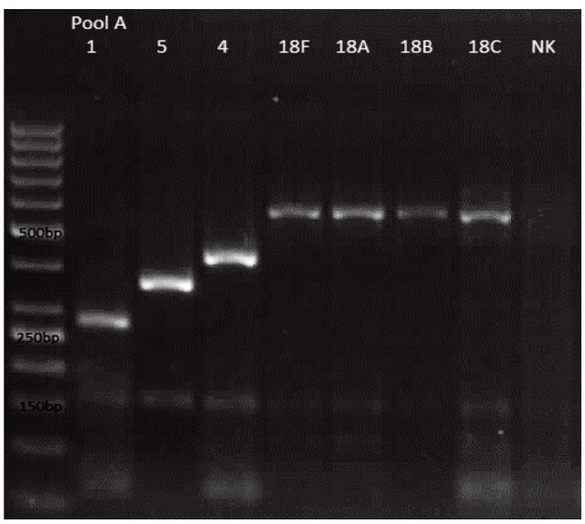
Elektroforéza produktu:
Používá se 2% agaróza připravená v 1krát koncentrovaném TBE pufru a obarvení je provedeno ethidium bromidem. Elektroforéza probíhá 120 min při 80 V. Následná vizualizace pomocí UV (330nm).
Hodnocení:
Jedná se o metodu s kvalitativním vyhodnocováním, které se provádí na základě znalosti a porovnávání velikostí amplifikovaných produktů vzorků, pozitivní kontroly (referenční kmeny zpracované stejně jako vzorek) a negativní kontroly (voda) s 50bp DNA Ladderem a jednotlivými pozitivními kontrolami v porovnání s uváděnými výsledky CDC, Atlanta,USA [8].

Nově navržený algoritmus identifikace a typování kmenů *S. pneumoniae* v NRL/STR

- kultivace + optochinový test
- test rozpustnosti ve žluči
- Quellung reakce s poolovými antiséry A–I
- izolace DNA
- mPCR A – I + elektroforetické vyhodnocení
- případné dourčení Quellung reakcí s faktorovými antiséry

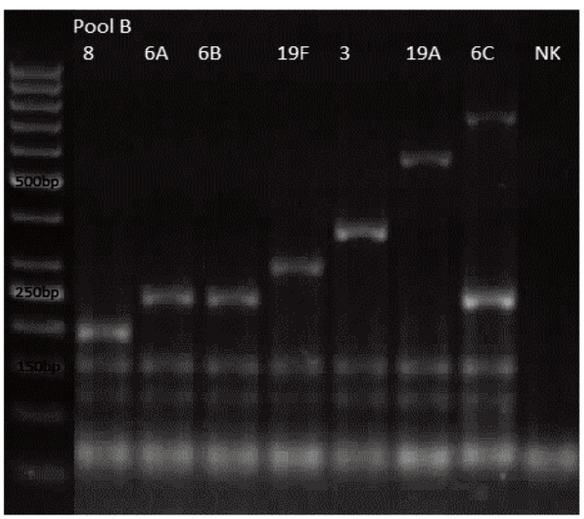
VÝSLEDKY A DISKUSE

Za použití výše popsaného nového algoritmu bylo testováno 210 kmenů *S. pneumoniae* všech dostupných sérotypů zaslaných do NRL/STR. Jednalo se o 66 sérotypů: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7A, 7B, 7C, 7F, 8, 9A, 9N, 9L, 9V, 10A, 10C, 10F, 11A, 11D, 12A, 12F, 13, 14, 15A, 15B, 15C, 15F, 16F, 17F, 18A, 18B, 18C, 18F, 19A, 19F, 20, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24A, 24B, 24F, 25A, 25F, 31, 33A, 33C, 33F, 34, 35A, 35B, 35C, 35F, 37, 38, 39, 40, 42, 44, 46, 47F. Dále bylo testováno 8 izolátů příbuzných streptokoků *S. pseudopneumoniae*, *S. sanguinis* a *S. oralis*.



Obr. 1. mPCR pool A
Dráha 1: 50bp DNA Ladder
Dráha 2: *S. pneumoniae* sérotyp 1 (280bp)
Dráha 3: *S. pneumoniae* sérotyp 5 (362bp)
Dráha 4: *S. pneumoniae* sérotyp 4 (430bp)
Dráha 5: *S. pneumoniae* sérotyp 18F (573bp)
Dráha 6: *S. pneumoniae* sérotyp 18A (573bp)
Dráha 7: *S. pneumoniae* sérotyp 18B (573bp)
Dráha 8: *S. pneumoniae* sérotyp 18C (573bp)
Dráha 9: negativní kontrola
Dráha 2–8: pozitivní produkt *cps*A (160bp)

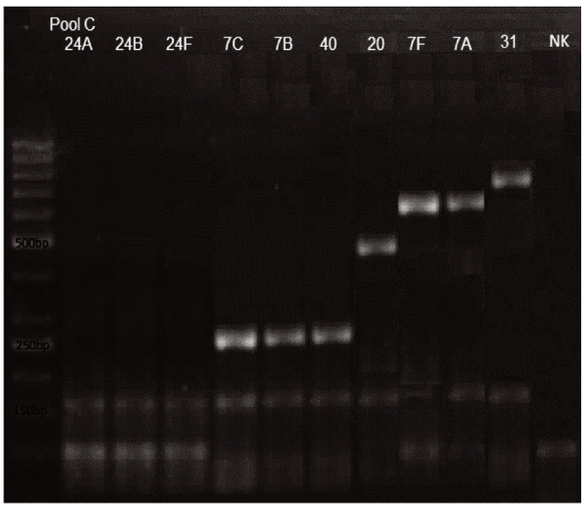
Fig. 1. mPCR pool A
Lane 1: 50bp DNA Ladder
Lane 2: *S. pneumoniae* serotype 1 (280bp)
Lane 3: *S. pneumoniae* serotype 5 (362bp)
Lane 4: *S. pneumoniae* serotype 4 (430bp)
Lane 5: *S. pneumoniae* serotype 18F (573bp)
Lane 6: *S. pneumoniae* serotype 18A (573bp)
Lane 7: *S. pneumoniae* serotype 18B (573bp)
Lane 8: *S. pneumoniae* serotype 18C (573bp)
Lane 9: negative control
Lanes 2–8: positive product *cps*A (160bp)



Obr. 2. mPCR pool B
Dráha 1: 50bp DNA Ladder
Dráha 2: *S. pneumoniae* sérotyp 8 (201bp)
Dráha 3: *S. pneumoniae* sérotyp 6A (250bp)
Dráha 4: *S. pneumoniae* sérotyp 6B (250bp)
Dráha 5: *S. pneumoniae* sérotyp 19F (304bp)
Dráha 6: *S. pneumoniae* sérotyp 3 (371bp)
Dráha 7: *S. pneumoniae* sérotyp 19A (566bp)
Dráha 8: *S. pneumoniae* sérotyp 6C (250bp, 727bp)
Dráha 9: negativní kontrola
Dráha 2–8: pozitivní produkt *cps*A (160bp)

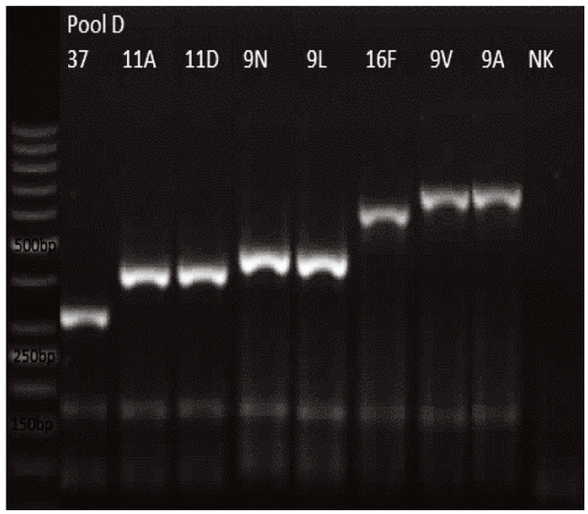
Fig. 2. mPCR pool B
Lane 1: 50bp DNA Ladder
Lane 2: *S. pneumoniae* serotype 8 (201bp)
Lane 3: *S. pneumoniae* serotype 6A (250bp)
Lane 4: *S. pneumoniae* serotype 6B (250bp)
Lane 5: *S. pneumoniae* serotype 19F (304bp)
Lane 6: *S. pneumoniae* serotype 3 (371bp)
Lane 7: *S. pneumoniae* serotype 19A (566bp)
Lane 8: *S. pneumoniae* serotype 6C (250bp, 727bp)
Lane 9: negative control
Lanes 2–8: positive product *cps*A (160bp)

proLékaře.cz | 22.11.2024



Obr. 3. mPCR pool C
Dráha 1: 50bp DNA Ladder
Dráha 2: *S. pneumoniae* sérotyp 24A (99bp)
Dráha 3: *S. pneumoniae* sérotyp 24B (99bp)
Dráha 4: *S. pneumoniae* sérotyp 24F (99bp)
Dráha 5: *S. pneumoniae* sérotyp 7C (260bp)
Dráha 6: *S. pneumoniae* sérotyp 7B (260bp)
Dráha 7: *S. pneumoniae* sérotyp 40 (260bp)
Dráha 8: *S. pneumoniae* sérotyp 20 (514bp)
Dráha 9: *S. pneumoniae* sérotyp 7A (599bp)
Dráha 10: *S. pneumoniae* sérotyp 7F (599bp)
Dráha 11: *S. pneumoniae* sérotyp 31 (701bp)
Dráha 12: negativní kontrola
Dráha 2–11: pozitivní produkt *cps*A (160bp)

Fig. 3. mPCR pool C
Lane 1: 50bp DNA Ladder
Lane 2: *S. pneumoniae* serotype 24A (99bp)
Lane 3: *S. pneumoniae* serotype 24B (99bp)
Lane 4: *S. pneumoniae* serotype 24F (99bp)
Lane 5: *S. pneumoniae* serotype 7C (260bp)
Lane 6: *S. pneumoniae* serotype 7B (260bp)
Lane 7: *S. pneumoniae* serotype 40 (260bp)
Lane 8: *S. pneumoniae* serotype 20 (514bp)
Lane 9: *S. pneumoniae* serotype 7A (599bp)
Lane 10: *S. pneumoniae* serotype 7F (599bp)
Lane 11: *S. pneumoniae* serotype 31 (701bp)
Lane 12: negative control
Lanes 2–11: positive product *cps*A (160bp)



Obr. 4. mPCR pool D
Dráha 1: 50bp DNA Ladder
Dráha 2: *S. pneumoniae* sérotyp 37 (338bp)
Dráha 3: *S. pneumoniae* sérotyp 11A (463bp)
Dráha 4: *S. pneumoniae* sérotyp 11D (463bp)
Dráha 5: *S. pneumoniae* sérotyp 9N (516bp)
Dráha 6: *S. pneumoniae* sérotyp 9L (516bp)
Dráha 7: *S. pneumoniae* sérotyp 16F (717bp)
Dráha 8: *S. pneumoniae* sérotyp 9V (816bp)
Dráha 9: *S. pneumoniae* sérotyp 9A (816bp)
Dráha 10: negativní kontrola
Dráha 2–9: pozitivní produkt *cps*A (160bp)

Fig. 4. mPCR pool D
Lane 1: 50bp DNA Ladder
Lane 2: *S. pneumoniae* serotype 37 (338bp)
Lane 3: *S. pneumoniae* serotype 11A (463bp)
Lane 4: *S. pneumoniae* serotype 11D (463bp)
Lane 5: *S. pneumoniae* serotype 9N (516bp)
Lane 6: *S. pneumoniae* serotype 9L (516bp)
Lane 7: *S. pneumoniae* serotype 16F (717bp)
Lane 8: *S. pneumoniae* serotype 9V (816bp)
Lane 9: *S. pneumoniae* serotype 9A (816bp)
Lane 10: negative control
Lanes 2–9: positive product *cps*A (160bp)

Novým výše popsaným mechanismem se podařilo správně identifikovat a typovat všechny kmeny *S. pneumonie* ve zkoumaném souboru (210 izolátů) při použití doposud známých primerů až po sérotyp (obr. 1–9: Elektroforetické hodnocení jednotlivých mPCR reakcí). Jediné dva sérotypy, na které jsou známé primery a nebyly otestovány, jsou sérotyp 2 a 6D, neboť NRL/STR nemá ve sbírce dostupné kmeny. Výsledky mPCR byly verifikovány Quellung reakcí. Kromě *S. pneumoniae* byly testovány i kmeny příbuzných streptokoků *S. pseudopneumoniae* (2 izoláty), *S. sanguinis* (4 izoláty) a *S. oralis* (2 izoláty), které naopak v mPCR metodě vykazovaly negativní výsledky (obr. 10), nebyl zde tedy problém s falešnou pozitivitou.

Pro PCR i Quellung metodu byly vypočteny hodnotící parametry podle následujících vzorců: senzitivita = a/(a + c), specificita = d/(b + d), pozitivní předpovědní hodnota = a/(a + b), negativní předpovědní hodnota = d/(c + d). Ve zkoumaném souboru 218 izolátů byly zjištěny následující parametry.

Pro multiplex PCR:
a) správná pozitivita 210 vzorků
b) falešná pozitivita 0 vzorků
c) falešná negativita 0 vzorků
d) správná negativita 8 vzorků
senzitivita = 1,000
specificita = 1,000
pozitivní předpovědní hodnota = 1,000
negativní předpovědní hodnota = 1,000

Inzerce A131009935 ▶

proLékaře.cz | 22.11.2024

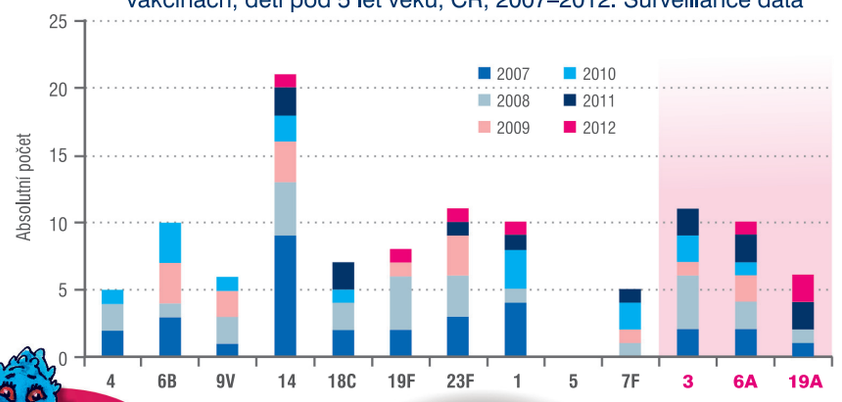
STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

Seznamte se...

sérotyp 19A

- V řadě zemí významná příčina invazivních pneumokokových onemocnění[1,2,3]
- Jako příčina IPO u dětí do 5 let zachycen i v ČR[4]
- Častá příčina akutních otitis media[1,5,6]
- Spojen s vyšší rezistencí na antibiotika, izolovány i multirezistentní formy[1,5,6]

Distribuce sérotypů *S. pneumoniae* zahrnutých v konjugovaných vakcínách, děti pod 5 let věku, ČR, 2007–2012. Surveillance data[4]



Graf adaptován dle publikovaných dat SZÚ, 2013.[4]

Prevenar 13 je jediná pneumokoková konjugovaná vakcína, která pokrývá sérotypy 3, 6A a 19A.[7,8]

Prevenar 13

Pneumokoková polysacharidová konjugovaná vakcína (13valentní, adsorbovaná)

Zkrácená informace o přípravku - Prevenar 13 injekční suspenze. Pneumokoková polysacharidová konjugovaná vakcína (13valentní, adsorbovaná). • **Léčivá látka:** Jedna dávka (0,5 ml) obsahuje: Pneumococcale polysaccharidum sérotypus 1*(2,2 µg), 3*(2,2 µg), 4*(2,2 µg), 5*(2,2 µg), 6A*(2,2 µg), 6B*(4,4 µg), 7F*(2,2 µg), 9V*(2,2 µg), 14*(2,2 µg), 18C*(2,2 µg), 19A*(2,2 µg), 19F*(2,2 µg), 23F*(2,2 µg). *Konjugován s nosným proteinem CRM_{197} a adsorbován na fosforečnan hlinitý (0,125 mg Hliníku). **Indikace:** Aktivní imunizace k prevenci invazivních onemocnění, pneumonie a akutní otitis media, vyvolaných *Streptococcus pneumoniae* u kojenců a dětí ve věku od 6 týdnů do 17 let. Aktivní imunizace k prevenci invazivních onemocnění způsobených *Streptococcus pneumoniae* u dospělých ve věku 50 let a starších. **Dávkování:** Kojenci ve věku 6 týdnů - 6 měsíců: Tři dávky po 0,5 ml s intervalem nejméně 1 měsíc mezi dávkami. První dávka se obvykle podává ve věku 2 měsíců. Čtvrtou dávku se doporučuje podat ve věku 11 až 15 měsíců. Dříve neočkovaní kojenci a děti ve věku ≥ 7 měsíců: *Kojenci ve věku 7 - 11 měsíců:* Dvě dávky po 0,5 ml s intervalem nejméně 1 měsíc mezi nimi. Třetí dávku se doporučuje podat ve druhém roce života. *Děti ve věku 12-23 měsíců:* Dvě dávky po 0,5 ml s intervalem nejméně 2 měsíce mezi nimi. *Děti ve věku 2 – 17 let:* Jedna samostatná dávka 0,5 ml. Očkovací schéma pro Prevenar 13 u kojenců a dětí dříve očkovaných přípravkem Prevenar (7valentní) (*Streptococcus pneumoniae* sérotypy 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F a 23F). *Malé děti (ve věku 12-59 měsíců) očkované přípravkem Prevenar (7valentní) v kompletním schématu:* Malé děti, které byly kompletně imunizované přípravkem Prevenar (7valentní), by měly dostat jednu dávku po 0,5 ml přípravku Prevenar 13, pro navození imunitní odpovědi vůči 6 dalším sérotypům. Tato dávka přípravku Prevenar 13 by měla být podána nejméně 8 týdnů po poslední dávce přípravku Prevenar (7valentní). *Děti ve věku 5 – 17 let:* Děti ve věku od 5 do 17 let mohou dostat jednu dávku přípravku Prevenar 13, pokud byly dříve očkovány jednou nebo více dávkami přípravku Prevenar. Tato dávka přípravku Prevenar 13 by měla být podána nejméně 8 týdnů po poslední dávce přípravku Prevenar (7valentní). *Dospělí ve věku 50 let a starší:* Jedna samostatná dávka. Potřeba revakcinace následnou dávkou přípravku Prevenar 13 nebyla stanovena. Bez ohledu na stav předchozí pneumokokové vakcinace, pokud je použití 23valentní pneumokokové polysacharidové vakcíny považováno za vhodné, Prevenar 13 by měl být podán jako první. **Způsob podání:** Vakcína se má podávat formou intramuskulární injekce. Přednostním místem podání je anterolaterální část stehna (musculus vastus lateralis) u kojenců nebo deltový sval horní části paže u malých dětí. **Kontraindikace:** Precitlivělost na léčivou látku nebo na kteroukoli pomocnou látku nebo na difterický toxoid. Podobně jako u jiných vakcín i aplikace přípravku Prevenar 13 má být odložena u jedinců trpících akutním závažným horečnatým onemocněním. Přítomnost mírné infekce jako je nachlazení, by ale neměla být příčinou oddálení očkování. **Zvláštní upozornění:** Prevenar 13 nesmí být aplikován intravaskulárně. Tato vakcína nesmí být podána jako intramuskulární injekce kojencům nebo dětem s trombocytopenií nebo s jinými poruchami koagulace, které jsou kontraindikací pro intramuskulární aplikaci, ale může být podána subkutánně v případě, že potenciální přínos jasně převáží nad rizikem podání. Prevenar 13 chrání pouze proti těm sérotypům *Streptococcus pneumoniae*, které vakcína obsahuje a nechrání proti jiným mikroorganizmům, které způsobují invazivní onemocnění, pneumonii nebo zánět středního ucha. Podobně jako jiné vakcíny nemůže ani Prevenar 13 ochránit všechny očkované jedince před pneumokokovým onemocněním. **Interakce:** Kojenci a děti ve věku 6 týdnů až 5 let: Prevenar 13 může být podáván současně s jinými dětskými vakcínami podle doporučených očkovacích schémat. Děti ve věku 6 – 17 let: V současné době nejsou k dispozici žádné údaje týkající se současného podávání s jinými vakcínami. Dospělí ve věku 50 let a starší: Přípravek Prevenar 13 může být podán současně se sezónní trivalentní inaktivovanou chřipkovou vakcínou (TIV). Různé injekční vakcíny musí být vždy podány každá do jiného místa očkování. **Těhotenství a kojení:** Neexistují údaje o použití pneumokokového 13valentního konjugátu u těhotných žen. Není známo, zda je pneumokokový 13valentní konjugát vylučován do mateřského mléka. **Nežádoucí účinky:** Mezi nejčastěji hlášené nežádoucí účinky u dětí patřily reakce v místě očkování, horečka, podrážděnost, nechutenství, zvýšená spavost a/nebo nespavost. U dospělých osob arthralgie, myalgie, bolesti hlavy, průjem, vyrážka, zimnice, nevolnost, zarudnutí v místě aplikace, indurace/otok v místě aplikace, bolest/přecitlivělost místa aplikace, omezená pohyblivost paže, snížení chuti k jídlu. **Předávkování:** Předávkování přípravkem Prevenar 13 není pravděpodobné vzhledem ke způsobu balení v předplněné injekční stříkačce. **Uchovávání:** Uchovávejte v chladničce (2– 8 °C). Chraňte před mrazem. Přípravek Prevenar 13 je stabilní při teplotách do 25°C po dobu 4 dnů. Na konci této doby má být přípravek použit nebo zlikvidován. **Balení:** 0,5 ml injekční suspenze v předplněné injekční stříkačce s pístovou zátkou a ochranným krytem hrotu. **Jméno a adresa držitele rozhodnutí o registraci:** Pfizer Ltd., Ramsgate Road, Sandwich, Kent, CT13 9NJ, Velká Británie. **Registrační čísla:** EU/1/09/590/001-6. **Datum poslední revize textu:** 21.3.2013. **Výdej léčivého přípravku** je vázán na lékařský předpis. **Přípravek Prevenar 13 je hrazen** z prostředků veřejného zdravotního pojištění pro děti splňující podmínky dané zákonem č.48/1997 Sb v aktuálním znění. U dospělých osob přípravek není hrazen. Před předepsáním se, prosím, seznamte s úplnou informací o přípravku.

Reference: 1. Dinleyici EC, Yargic ZA, Expert Review Vaccines 2009; 8(8), 977-986. **2.** van Gils EJM, Veenhoven RH, Hak E.et al. JAMA. 2010;304(10):1099- 1106. **3.** Kaplan SL, Barson WJ, Lin PL. et al.Pediatrics 2010;125:429–436. **4.** Kozáková J, Motlová J, Beneš Č. et al. Invazivní pneumokokové onemocnění v ČR v roce 2012.Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2013:22(3): 97-104. **5.** Fenoll A, Aguilar L, Vicioso MD et al. BMC Infectious Diseases 2011, 11:239. **6.** Dagan R, Givon-Lavi N, Leibovitz E et al. J. Infect. Dis.2009;199(6):776-85. **7.** SPC Prevenar 13. **8.** SPC Synflorix.

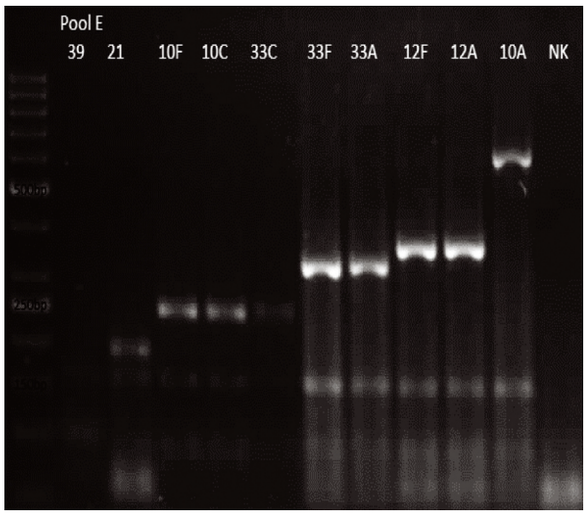
Pfizer, spol. s r.o., Stroupežnického 17, 150 00 Praha 5
tel.: +420 283 004 111, fax: +420 251 610 270, www.pfizer.cz

www.prevenar13.cz

Pfizer Pracujeme společně pro zdravější svět™ www.pfizer.cz

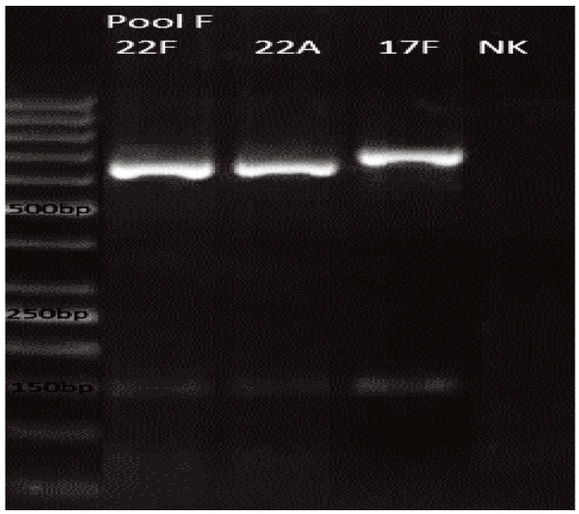
PRV-2013.01.054

proLékaře.cz | 22.11.2024



Obr. 5. mPCR pool E
Dráha 1: 50bp DNA Ladder
Dráha 2: *S. pneumoniae* sérotyp 39 (99bp)
Dráha 3: *S. pneumoniae* sérotyp 21 (192bp)
Dráha 4: *S. pneumoniae* sérotyp 10F (248bp)
Dráha 5: *S. pneumoniae* sérotyp 10C (248bp)
Dráha 6: *S. pneumoniae* sérotyp 33C (248bp)
Dráha 7: *S. pneumoniae* sérotyp 33F (338bp)
Dráha 8: *S. pneumoniae* sérotyp 33A (338bp)
Dráha 9: *S. pneumoniae* sérotyp 12F (376bp)
Dráha 10: *S. pneumoniae* sérotyp 12A (376bp)
Dráha 11: *S. pneumoniae* sérotyp 10A (628bp)
Dráha 12: negativní kontrola
Dráha 2–11: pozitivní produkt *cps*A (160bp)

Fig. 5. mPCR pool E
Lane 1: 50bp DNA Ladder
Lane 2: *S. pneumoniae* serotype 39 (99bp)
Lane 3: *S. pneumoniae* serotype 21 (192bp)
Lane 4: *S. pneumoniae* serotype 10F (248bp)
Lane 5: *S. pneumoniae* serotype 10C (248bp)
Lane 6: *S. pneumoniae* serotype 33C (248bp)
Lane 7: *S. pneumoniae* serotype 33F (338bp)
Lane 8: *S. pneumoniae* serotype 33A (338bp)
Lane 9: *S. pneumoniae* serotype 12F (376bp)
Lane 10: *S. pneumoniae* serotype 12A (376bp)
Lane 11: *S. pneumoniae* serotype 10A (628bp)
Lane 12: negative control
Lanes 2–11: positive product *cps*A (160bp)



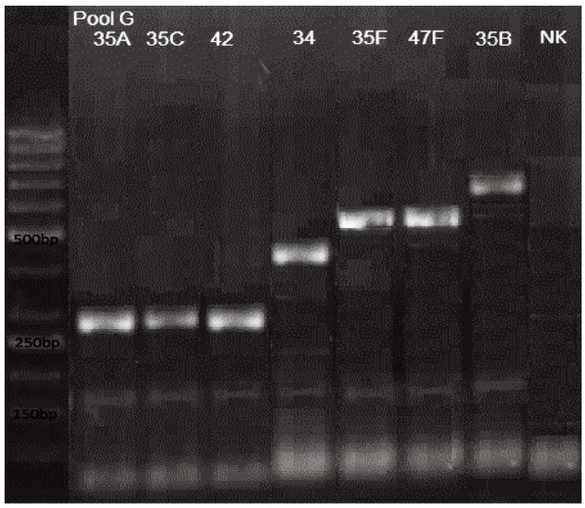
Obr. 6. mPCR pool F
Dráha 1: 50bp DNA Ladder
Dráha 2: *S. pneumoniae* sérotyp 22F (643bp)
Dráha 3: *S. pneumoniae* sérotyp 22A (643bp)
Dráha 4: *S. pneumoniae* sérotyp 17F (693bp)
Dráha 5: negativní kontrola
Dráha 2–4: pozitivní produkt *cps*A (160bp)

Fig. 6. mPCR pool F
LLane 1: 50bp DNA Ladder
Lane 2: *S. pneumoniae* serotype 22F (643bp)
Lane 3: *S. pneumoniae* serotype 22A (643bp)
Lane 4: *S. pneumoniae* serotype 17F (693bp)
Lane 5: negative control
Lanes 2–4: positive product *cps*A (160bp)

Pro Quellung reakci:
a) správná pozitivita 209 vzorků
b) falešná pozitivita 0 vzorků
c) falešná negativita 1 vzorek
d) správná negativita 8 vzorků
senzitivita = 0,995
specificita = 1,000
pozitivní předpovědní hodnota = 1,000
negativní předpovědní hodnota = 0,888

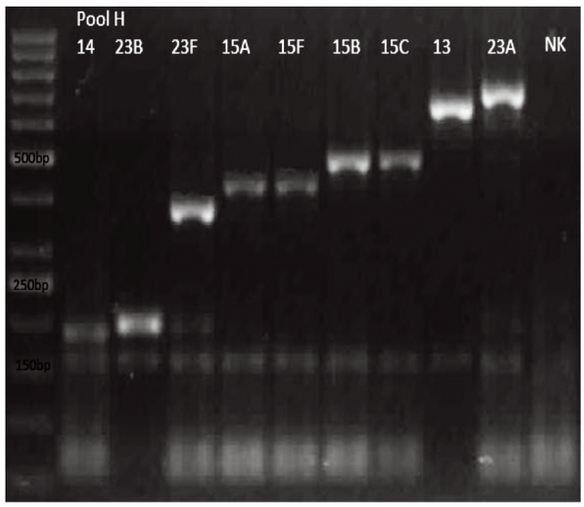
Doposud se při využívání sérologických typizačních metod uvádělo, že většina (98%) kmenů *S. pneumoniae* je typovatelných a malé procento (2%) kmenů je netypovatelných (NT), tzv. bezpouzderné varianty. Při testování popsaného souboru byl nalezen jeden izolát *S. pneumoniae* z hemokultury, jenž byl pomocí sérologické Quellung metody netypovatelný, ale pomocí PCR metody typovatelný. Výsledek PCR reakce byl pozitivní při použití primeru jak pro gen *cps*A identifikující *S. pneumoniae*, tak pro gen identifikující séroskupiny 33F/33A/37. V tomto případě nebylo možné přesnější určení faktorovými séry, jelikož se jedná opět o sérologickou Quellung metodu. Mohlo se tedy jednat o příklad kmene, který disponuje genem pro kapsulární antigen, ovšem má problém s expresí antigenu anebo jeho strukturou. Díky tomu není možnost využít sérologických metod založených na principu reakce antigenu s protilátkou. Molekulární metody založené na detekci genu je ovšem pro typizaci neopouzdřených kmenů možné použít. Lze tedy očekávat snížení počtu doposud netypovatelných kmenů *S. pneumoniae* při používání molekulárních metod, jako je PCR.
A s tím nepřímo souvisí také identifikace nových sérotypů *S. pneumoniae* těmito novými molekulárními metodikami, např. sérotyp 6D, který není identifikovatelný klasickou sérologickou metodou [11, 12].
Nevýhodou PCR metody je, že v současné době nejsou známé primery pro typizaci všech popsaných sérotypů *S. pneumoniae*. Dochází však v tomto směru k vývoji a aktualizaci seznamu popsaných primerů.

proLékaře.cz | 22.11.2024



Obr. 7. mPCR pool G
Dráha 1: 50bp DNA Ladder
Dráha 2: *S. pneumoniae* sérotyp 35A (280bp)
Dráha 3: *S. pneumoniae* sérotyp 35C (280bp)
Dráha 4: *S. pneumoniae* sérotyp 42 (280bp)
Dráha 5: *S. pneumoniae* sérotyp 34 (408bp)
Dráha 6: *S. pneumoniae* sérotyp 35F (517bp)
Dráha 7: *S. pneumoniae* sérotyp 47F (517bp)
Dráha 8: *S. pneumoniae* sérotyp 35B (677bp)
Dráha 9: negativní kontrola
Dráha 2–8: pozitivní produkt *cps*A (160bp)

Fig. 7. mPCR pool G
Lane 1: 50bp DNA Ladder
Lane 2: *S. pneumoniae* serotype 35A (280bp)
Lane 3: *S. pneumoniae* serotype 35C (280bp)
Lane 4: *S. pneumoniae* serotype 42 (280bp)
Lane 5: *S. pneumoniae* serotype 34 (408bp)
Lane 6: *S. pneumoniae* serotype 35F (517bp)
Lane 7: *S. pneumoniae* serotype 47F (517bp)
Lane 8: *S. pneumoniae* serotype 35B (677bp)
Lane 9: negative control
Lanes 2–8: positive product *cps*A (160bp)



Obr. 8. mPCR pool H
Dráha 1: 50bp DNA Ladder
Dráha 2: *S. pneumoniae* sérotyp 14 (189bp)
Dráha 3: *S. pneumoniae* sérotyp 23B (199bp)
Dráha 4: *S. pneumoniae* sérotyp 23F (384bp)
Dráha 5: *S. pneumoniae* sérotyp 15A (434bp)
Dráha 6: *S. pneumoniae* sérotyp 15F (434bp)
Dráha 7: *S. pneumoniae* sérotyp 15B (496bp)
Dráha 8: *S. pneumoniae* sérotyp 15C (496bp)
Dráha 9: *S. pneumoniae* sérotyp 13 (655bp)
Dráha 10: *S. pneumoniae* sérotyp 23A (722bp)
Dráha 11: negativní kontrola
Dráha 2–10: pozitivní produkt *cps*A (160bp)

Fig. 8. mPCR pool H
Lane 1: 50bp DNA Ladder
Lane 2: *S. pneumoniae* serotype 14 (189bp)
Lane 3: *S. pneumoniae* serotype 23B (199bp)
Lane 4: *S. pneumoniae* serotype 23F (384bp)
Lane 5: *S. pneumoniae* serotype 15A (434bp)
Lane 6: *S. pneumoniae* serotype 15F (434bp)
Lane 7: *S. pneumoniae* serotype 15B (496bp)
Lane 8: *S. pneumoniae* serotype 15C (496bp)
Lane 9: *S. pneumoniae* serotype 13 (655bp)
Lane 10: *S. pneumoniae* serotype 23A (722bp)
Lane 11: negative control
Lanes 2–10: positive product *cps*A (160bp)

ZÁVĚR

Zavedení multiplex PCR reakce do systému identifikace a především typizace *S. pneumoniae* se ukázalo jako velice přínosné. Doposud jedinou používanou metodou pro typizaci byla jen sérologická Quellung reakce. Je to sice zlatý standard, ale jedná se o metodu velice pracovně, časově a finančně nákladnou. Metoda mPCR umožňuje typování všech vakcinačních a i většiny nevakcinačních sérotypů *S. pneumoniae*. Jedná se o novou a moderní metodu s mnoha výhodami. Její velkou předností je časová nenáročnost a menší finanční nákladnost, především díky obrovské redukci potřeby antisér. V daném souboru izolátů předvedla nová mPCR 100% senzitivitu i specificitu.

V NRL/STR se výborně osvědčil modifikovaný algoritmus typování, kdy se po provedení Quellung reakce s poolovými antiséry A–I vybere pouze příslušná mPCR A–I reakce. Výsledný sérotyp se odečte buď přímo, nebo pokud mPCR reakce určí séroskupinu, dourčí se sérotyp Quellung reakcí s faktorovými antiséry.

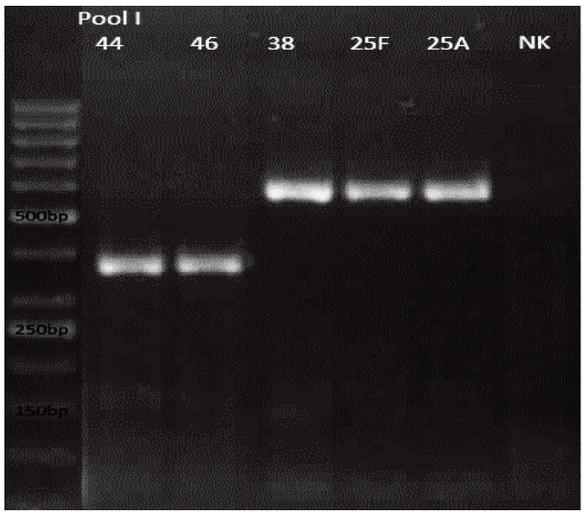
Kromě *S. pneumoniae* byly testovány i kmeny příbuzných streptokoků *S. pseudopneumoniae*, *S. sanguinis* a *S. oralis*, které naopak v mPCR metodě vykazovaly správně negativní výsledky a nebyl zjištěn problém s falešnou pozitivitou.

Literatura

1. **Motlová, J., Beneš, Č., Kozáková, J., Křížová, P.** Invazivní pneumokoková onemocnění v České republice v roce 2011. *Zprávy CEM*, 2012, 21, p. 51–58.

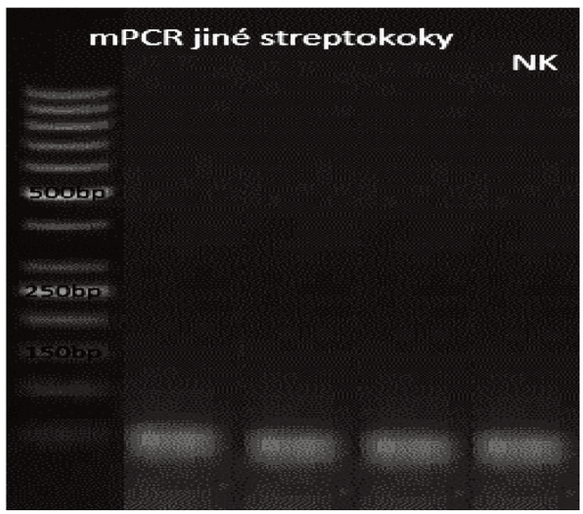
2. **Bratcher, P. E., Park, I. H., Hollingshead, S. K. & Nahm, M. H.** Production of a unique pneumococcal capsule serotype belonging to serogroup 6. *Microbiology*, 2009, 155, p. 576–583.

proLékaře.cz | 22.11.2024



Obr. 9 mPCR pool I
Dráha 1: 50bp DNA Ladder
Dráha 2: *S. pneumoniae* sérotyp 44 (376bp)
Dráha 3: *S. pneumoniae* sérotyp 46 (376bp)
Dráha 4: *S. pneumoniae* sérotyp 38 (574bp)
Dráha 5: *S. pneumoniae* sérotyp 25F (574bp)
Dráha 6: *S. pneumoniae* sérotyp 25A (574bp)
Dráha 7: negativní kontrola
Dráha 2–6: pozitivní produkt *cps*A (160bp)

Fig. 9. mPCR pool I
Lane 1: 50bp DNA Ladder
Lane 2: *S. pneumoniae* serotype 44 (376bp)
Lane 3: *S. pneumoniae* serotype 46 (376bp)
Lane 4: *S. pneumoniae* serotype 38 (574bp)
Lane 5: *S. pneumoniae* serotype 25F (574bp)
Lane 6: *S. pneumoniae* serotype 25A (574bp)
Lane 7: negative control
Lanes 2–6: positive product *cps*A (160bp)



Obr. 10. Příbuzné streptokoky
Dráha 1: 50bp DNA Ladder
Dráha 2: *S. pseudopneumoniae*
Dráha 3: *S. sanguinis*
Dráha 4: *S. oralis*
Dráha 5: negativní kontrola

Fig. 10. Related streptococci
Lane 1: 50bp DNA Ladder
Lane 2: *S. pseudopneumoniae*
Lane 3: *S. sanguinis*
Lane 4: *S. oralis*
Lane 5: negative control

3. **Zemlickova, H., Jakubu, V., Urbaskova, P., Motlova, J., Musilek, M., Adamkova, V.** Serotype-specific invasive disease potential of Streptococcus pneumoniae in Czech children. *J. Med. Microbiol.*, 2010, 59, p. 1079–1083.

4. **Motlova, J., Benes, C., Kriz, P.** Incidence of invasive pneumococcal disease in the Czech Republic and serotype coverage by vaccines, 1997–2006. *Epidemiol. Infect.*, 2009, 137, p. 562–569.

5. **Prymula, R., Motlova, J., Kriz, P.** Comparison of Streptococcus pneumoniae serotypes causing acute otitis media & invasive disease in young children in the Czech Republic. Indian. *J. Med. Res.*, 2004, 119, p. 168–170.

6. **Merrill, C. W, Gwaltney, J. M. Jr., Hendley, J. W., Sande, M. A.** Rapid identification of pneumococci. Gram stain vs. the quellung reaction. *N. Engl. J. Med.,* 1973, 288, p. 510–512.
Dostupné na www:
http://www.ssi.dk/English/SSI%20Diagnostica/Products%20from%20SSI%20Diagnostica/Antisera_antibodies/Pneumococcus%20antisera/Neufeld.aspx.

7. **Siira, L., Kaijalainen, T., Lambertsen, L., Nahm, M. H., Toropainen, M., Virolainen, A.** From Quellung to Multiplex PCR, and back when needed, in pneumococcal serotyping. *J. Clin. Microbiol.,* 2012, 50, p. 2727–2431.

8. **The Centers for Disease Control and Prevention** Specifické primery dle CDC, Atlanta, USA. Dostupné na www: http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/pcr.htm.

9. Manuál QIAamp DNA Mini Kit. Dostupné na www: http://www.qiagen.com/Products/Catalog/Sample-Technologies/DNA-Sample-Technologies/Genomic-DNA/QIAamp-DNA-Mini-Kit#technicalspecification.

10. **Bratcher, P. E., Kim, K. H., Kang, J. H., Hong, J. Y., Nahm, M. H.** Identification of natural pneumococcal isolates expressing serotype 6D by genetic, biochemical and serological characterization. *Microbiology,* 2010, 156, p. 555–560.

11. **Oftadeh, S., Satzke, C., Gilbert, G. L.** Identification of newly described Streptococcus pneumoniae serotype 6D by use of the Quellung reaction and PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2010, 48, p. 3378–3379.

Autoři děkují všem kolegům z laboratoří v ČR, kteří posílají kmeny do NRL pro streptokokové nákazy.

Do redakce došlo dne 2. 4. 2013.

Adresa pro korespondenci:
Mgr. Zuzana Vacková
SZÚ Praha
Šrobárova 48
100 42 Praha 10
e-mail: zuzana.vackova@szu.cz