

Akut Bakteriyel Menenjit Tanısı ve *Neisseria meningitidis* Serogruplandırmasında Gerçek Zamanlı Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Optimizasyonu

Optimization of Real-Time Multiplex Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of Acute Bacterial Meningitis and *Neisseria meningitidis* Serogrouping

Dilek GÜLDEMİR¹, Meral TURAN², Zekiye BAKKALOĞLU¹,
Selin NAR ÖTGÜN², Rıza DURMAZ³

¹ Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı, Ankara.

¹ General Directorate of Public Health Turkey, Department of Microbiology Reference Laboratories, National Molecular Microbiology Reference Laboratory, Ankara, Turkey.

² Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarı, Ankara.

² General Directorate of Public Health Turkey, Department of Microbiology Reference Laboratories, National Respiratory Pathogens Reference Laboratory, Ankara, Turkey.

³ Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

³ Yıldırım Beyazıt University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 31.01.2018 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 22.03.2018

ÖZ

Akut bakteriyel menenjitlerin %80-85'inden *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* ve *Haemophilus influenzae* tip B sorumlu olup, ülkemizde bu etkenlere bağlı bakteriyel menenjitlerin bildirimi zorunludur. Son yıllarda ülkemizdeki hastalık kontrol programları özellikle bu üç etkene yönelmiştir. Menenjite yol açan etkeni belirlemek korunma/kontrol önlemleri, tedavi rejimi, hastalığın şiddeti ve seyri hakkında öngörüde bulunabilmek açısından önem taşımaktadır. Meningokoksik menenjitin hızlı tanısı özellikle hayati öneme sahiptir. Ayrıca, toplumdaki *N.meningitidis* serogruplarının belirlenmesi, uygulanacak aşı tipi ve kombinasyonuna karar verilmesi açısından da önem arz etmektedir. Bu çalışma, klinik örneklerde hızlı, güvenilir bir şekilde enfeksiyon etkenini belirlemek ve serogrup tayini yapmak üzere gerçek zamanlı multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-multipleks PCR) yöntemini optimize etmek amacıyla yapılmıştır. Bu çalışmada *N.meningitidis*, *H.influenzae* ve *S.pneumoniae*'nın birlikte (NHS

miks) araştırılmasına ve *N.meningitidis*'in serogruplandırılmasına (BCY miks ve AWW miks) yönelik üç Rt-multipleks PCR testi laboratuvarımızda optimize ve standardize edilmiştir. Rt-multipleks PCR yönteminin duyarlılığı, standart bakteri suşları ve simülasyon çalışmalarıyla araştırılmıştır. Temmuz 2012-Mayıs 2014 tarihleri arasında "Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı (UMMRL)"na gönderilen akut bakteriyel menenjit şüpheli 41'i beyin omurilik sıvısı (BOS) olmak üzere 43 hastaya ait örnek (BOS, serum ve klinik izolat) ve altı adet nazofarengeal sürüntü izolatı bu çalışmaya dahil edilmiştir. Tüm örnekler Rt-multipleks PCR testleriyle incelenmiştir. İzolatlar hem konvansiyonel hem de Rt-multipleks PCR yöntemiyle çalışılmıştır. Oksidaz, katalaz testi, Gram boyama, API-NH ve spesifik antiserumlarla aglütinasyon testleri Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Optimize ve standardize edilen Rt-multipleks PCR yönteminin bakteri saptama limitinin 10^2 cfu/ml olduğu tespit edilmiştir. Bu dilüsyondaki "threshold cycle (TC)" değerinin yaklaşık 35 olduğu hesaplanmıştır. BOS örneklerinden 14'ünde NHS miks ile *N.meningitidis* saptanmış ancak, bunlardan 10 tanesi BCY miks ve AWW miks ile tiplendirilebilmiştir. Serogruplaması yapılan 10 klinik örneğin 8 (%80)'i serogrup B, 1 (%10)'i serogrup A, 1 (%10)'i serogrup W135X olarak belirlenmiştir. Rt-multipleks PCR testleri ile izolatların tümünün (altı nazofarengeal izolat ve bir klinik izolat) *N.meningitidis* serogrup B olduğu saptanmış ve konvansiyonel yöntemlerle de doğrulanmıştır. TC değeri > 35 olan BOS örnekleri tiplendirilememiştir. Rt-multipleks PCR yönteminin NHS'ye bağlı akut bakteriyel menenjitin doğrudan klinik örnekten yapılacak tanısında ve *N.meningitidis*'in serogruplandırılmasında hızlı ve güvenilir bir test olduğu belirlenmiştir. Hızlı tanı hastalığın tedavisi ve kontrolü açısından, etkenin serogruplandırılması ise korunma/kontrol ve aşı politikaları açısından önem arz etmektedir.

Anahtar sözcükler: Gerçek zamanlı multipleks polimeraz zincir reaksiyonu; akut bakteriyel menenjit; *Neisseria meningitidis* serogrup tayini.

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae, *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* type B are responsible for about 80-85% of acute bacterial meningitis cases among adults and in our country it is mandatory to report bacterial meningitis cases caused by these agents. In recent years, disease control programs have focused especially on these three pathogens in our country. It is very important to know the causative agent of meningitis for prevention/control measures, choice of treatment regimen, and prediction of the severity and the course of the disease. Rapid diagnosis of meningococcal meningitis is especially vital. In addition, the identification of *N.meningitidis* serogroups in the community is also important for the decision of the type and combination of vaccine to be administered. The aim of this study was to optimize the real-time multiplex polymerase chain reaction (Rt-multiplex PCR) for the diagnosis of the disease and serogrouping of *N.meningitidis* in clinical samples in a direct, quick and reliable way. In this study, three Rt-multiplex PCR assays were optimized and standardized for the detection of *N.meningitidis*, *H.influenzae* and *S.pneumoniae* (NHS mix) and for the serogrouping of *N.meningitidis* (BCY mix and AWW mix) in our laboratory. Sensitivity of the Rt-multiplex PCR method was detected by reference strains and simulation studies. Forty three samples (41 cerebrospinal fluid (CSF), 1 serum and 1 clinical isolate) with the suspicion of acute bacterial meningitis and six nasopharyngeal isolates sent to National Reference Laboratory for Molecular Microbiology between July 2012-May 2014 were included in the present study. All samples were examined with the Rt-multiplex PCR methods. Clinical isolates were studied by both conventional and Rt-multiplex PCR methods. Oxidase, catalase test, Gram stain, API-NH and agglutination tests with specific antisera were performed in the National Respiratory Pathogens Reference Laboratory. The detection limit of the method, which was optimized and standardized in our laboratory was determined as 10^2 cfu/ml. The CT (threshold cycle) value in this dilution was detected approximately as 35. *N.meningitidis* was detected in 14 of the 41 CSF samples by the NHS mix. However, only 10 of the positive samples could be typed with BCY mix and AWW mix. Eight (80%) of them were serogroup B, one of each was (10%) serogroup A and serogroup W135, respectively. All the isolates (six nasopharyngeal and one clinical specimen) were identified as *N.meningitidis* serogroup B by Rt-multiplex PCR and the isolates were also confirmed by conventional methods. The CSF specimens with CT value > 35 could not be typed. We concluded that the Rt-multiplex PCR method is a rapid and reliable test for the direct

diagnosis of acute bacterial meningitis due to NHS and serogrouping of *N.meningitidis*. Rapid diagnosis plays an important role for the treatment and control of the disease, and serogrouping of the agent plays an important role in terms of prevention/control and vaccination policies.

Keywords: Real-time multiplex polymerase chain reaction; acute bacterial meningitis, *Neisseria meningitidis* serogrouping.

GİRİŞ

Akut bakteriyel menenjitlerin %80-85'inden *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* ve *Haemophilus influenzae* tip B (Hib) sorumlu olmakla birlikte etkenlerin görülme sıklığı yaşa göre değişim göstermektedir. Yenidoğanlarda grup B streptokoklar, bebek ve çocuklarda Hib, erişkinlerde *S.pneumoniae* ve *N.meningitidis* en sık görülen etkenlerdir. Bununla beraber uygulamaya konulan etkili aşılama politikalarıyla menenjit epidemiyolojisi oldukça değişmiş, örneğin bebeklik çağına Hib aşılması yapılan ülkelerde bu etkene bağlı menenjitler azalırken, *S.pneumoniae* en sık görülen etken haline gelmiştir^{1,2}.

Akut bakteriyel menenjitler, özellikle bebek ve yaşlılarda en önemli mortalite ve morbidite nedenleri arasında yer almaktadır. Hastalığın insidansı gelişmiş ülkelerde 2.6-6/100.000 arasında iken, gelişmekte olan ülkelerde bu oranın yaklaşık 10 kat daha fazla olduğu tahmin edilmektedir. İnsidans giderek azalmakla birlikte, her yıl dünya genelinde yaklaşık 100.000 çocuk akut bakteriyel menenjitten ölmekte, hayatta kalanların yaklaşık %20'sinde ise nörolojik defisit, mental retardasyon, işitme bozukluğu gibi önemli sekeller ortaya çıkmaktadır^{3,4}.

Menenjit oluşturan bakteriyel etkenler genellikle solunum yoluyla bulaşırken, nazofarengeal kolonizasyona neden olmaktadır. Asemptomatik taşıyıcılık hastalığın yayılmasında önemlidir. Meningokoksik menenjit epidemiler şeklinde görülmekte ve en iyi tedavi koşullarında bile hastalığın mortalite oranı %10-15 arasında değişmektedir⁵. Özellikle meningokoksik menenjit tanısının hızla konulması ve gerektiğinde hastanın yakın çevresine ve ilgili sağlık personeline profilaksi uygulanması hastalığın yayılmasını önleme açısından hayati role sahiptir.

Ülkemizde *N.meningitidis*, *H.influenzae* ve *S.pneumoniae*'ya bağlı bakteriyel menenjitlerin bildirimi zorunludur. Bu nedenle ülkemizdeki hastalık kontrol programları özellikle bu üç etkene yönelik gerçekleştirilmektedir⁶. Menenjite yol açan etkeni saptamak alınacak korunma/kontrol önlemlerini belirlemede, tedavi rejiminin seçiminde, hastalığın şiddeti ve seyri hakkında öngörude bulunabilmek açısından önemlidir. *N.meningitidis* serogruplarının belirlenmesi ise toplumda uygulanacak olan aşı tipi ve kombinasyonuna karar verilmesi açısından önem arz etmektedir. Bu çalışma, klinik örneklerde akut bakteriyel menenjit olgularının büyük kısmından sorumlu olan *N.meningitidis*, *H.influenzae* ve *S.pneumoniae* etkenlerinin saptanması ve BOS'da *N.meningitidis* saptanması halinde etkeni serogruplandırmaya yönelik Rt-multipleks PCR testlerini optimize etmek amacıyla yapılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada *N.meningitidis*, *H.influenzae* ve *S.pneumoniae*'nin saptanmasına ve *N.meningitidis*'in serogruplandırılmasına yönelik üç Rt-multipleks PCR testi, Wang ve arkadaşlarının⁷ 2012 yılında tarif ettikleri çalışmanın modifiye edilen şekliyle laboratuvarımızda optimize ve standardize edildi. (i) NHS Rt-multipleks PCR testi (NHS miks): *N.meningitidis*, *H.influenzae* ve *S.pneumoniae*'yi, (ii) BCY Rt-multipleks PCR testi (BCY miks): *N.meningitidis* serogrup B, C ve Y'yi, (iii) AWX Rt-multipleks PCR testi (AWX miks): *N.meningitidis* serogrup A, W135 ve X'i saptamak amacıyla geliştirildi. Testte internal kontrol olarak *gapdh* (int) [Human *gapdh* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) gene] kullanıldı. NHS, BCY ve AWX Rt-multipleks PCR testlerinin optimizasyonu için kullanılan primer/problar, hedef gen bölgeleri ve referans suşlar Tablo I'de verilmiştir.

Referans Suşlardan DNA İzolasyonu ve NHS, BCY ve AWX Miks DNA'larının Hazırlanması

S.pneumoniae izolatları %5 koyun kanlı agar besiyerine, *N.meningitidis* ve *H.influenzae* izolatları ise %10 at kanlı çikolata agar besiyerine ekildi. Plaklar %5-10 CO₂'li ortamda 37°C'lik etüvde 16-18 saat üremeye bırakıldı. Üreyen bakterilerden 1 ml serum fizyolojik içerisinde yoğunluğu 1 McFarland olacak şekilde bakteri süspansiyonları hazırlandı. Kaynatma yöntemiyle bakteriler lize edildi⁸. İlk etapta referans suşlardan elde edilen DNA'lar, Rt-multipleks PCR testlerinin optimizasyonu için ayrı ayrı kullanıldı. Daha sonra bu DNA'lar karıştırılarak miks DNA'lar elde edildi. Bu miks DNA'lar hem testlerin optimizasyonunda ve standardizasyonunda hem de pozitif kontrol olarak klinik örneklerin değerlendirilmesinde kullanıldı.

Rt-Multipleks PCR Yönteminin Optimizasyonu

Wang ve arkadaşlarının 2012 yılında tarif ettikleri çalışmaları⁷ ve "Centers for Disease Control and Prevention (CDC)"ın konu ile ilgili önerileri⁹ dikkate alınarak testte kullanılacak primer/problar seçildi. Toplam reaksiyon hacmi 25 µl olup, her bir primer/probdan son konsantrasyonda 0.1-0.9 µM olacak şekilde QuantiTect Multiplex PCR NoRox Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) içerisine ilave edilmesine karar verildi. Ardından Qiagen Rotor-Gene Q cihazında, 95°C 15 dakika ilk denatürasyonu takiben, 50 döngü 94°C'de 60 saniye denatürasyon ve 60°C'de 90 saniye bağlanma şeklinde amplifikasyon basamakları optimize edildi. Bu amplifikasyon döngüleri her üç Rt-multipleks PCR testinde de aynı şekilde kullanıma uygun hale getirilerek tek cihazda aynı anda birden fazla reaksiyonun gerçekleştirilmesi sağlandı.

Duyarlılık Çalışması

Üretilen standart bakteri suşlarının taze pasajlarından birkaç koloni seçilerek %0.85'lik NaCl içerisinde McFarland No: 1 yoğunluğunda bakteri süspansiyonları hazırlandı ve 1 x 10⁻¹-10⁻⁹ arası logaritmik dilüsyonları yapıldı. Her bir dilüsyon tüpünden 50 µl alınarak *N.meningitidis* ve *H.influenzae* için çikolata agar besiyerine, *S.pneumoniae* için %5 koyun

Tablo I. Rt-Multipleks PCR Yönteminde Kullanılan Primer/Problar ve Hedef Gen Bölgeleri

Testler	Hedef gen bölgesi*	Primer/Prob	5'-3' oligonükleotit dizisi**	Referans suş***
NHS Rt-multipleks testi (NHS miks)	ctrA (Nm)	F753	TGTGTTCCGCTATACGCCATT	<i>N.meningitidis</i> CDC kod M5179
		R846	GCCATATTCACACGATATACC	
		Pb820i(FAM)	AACCTTGAGCAA" T" CCATTTATCCTGAC-GTTCT	
	hpd (Hi)	hpdF729	AGATTGGAAGAAACACAAGAAAAAGA	<i>H.influenzae</i> ATCC 10211
		hpdR819	CACCATCGGCATATTTAACCCT	
		hpdPbr762i(Hex)	AAACATCCAATCG" T" AATTATAGTTTAC-CCAATAACCC	
	lytA (Sp)	F373	ACGCAATCTAGCAGATGAAGCA	<i>S.pneumoniae</i> ATCC 49619
		R424	TCGTGCGTTTTAATCCAGCT	
		Pb400 (Cy5)	TGCCGAAAACGC" T" TGATACAGGGAG	
BCY Rt-multipleks PCR testi (BCY miks)	synD (NmB)	F737	GCTACCCCATTTTCAGATGATTTGT	NmB- <i>N.meningitidis</i> CDC kod M5179
		R882	ACCAGCCGAGGGTTTATTTCTAC	
		Pb839i (Cy5)	AAGAGATGGGYAACAAAC " T" ATGTAAT-GTCTTTATTT	
	synE (NmC)	F478	CCCTGAGTATGCGAAAAAATT	NmC- <i>N.meningitidis</i> CDC kod M3045
		R551	TGCTAATCCCGCTGAATG	
		Pb495i (FAM)	TTTCAATGC" T" AATGAATACCAC-CGTTTTTTTGC	
	synF (NmY)	F787	TCCGAGCAGGAAATTTATGAGAATAC	NmY- <i>N.meningitidis</i> CDC kod M2578
		R929	TTGCTAAAATCATTCGCTCCATAT	
		Pb1099i (Hex)	TATGGTG" T" ACGATATCCCTATCCTTG-CCTATAAT	
AWX Rt-multipleks testi (AWX miks)	sacB (NmA)	F2531	AAAATTCAATGGGTATATCACGAAGA	NmA- <i>N.meningitidis</i> CDC kod M7060
		R2624	ATATGGTGCAAGCTGGTTTCAATAG	
		PB2591i (Hex)	CTAAAAG" T" AGGAAGGGCACTTTGTGG-CATAAT	
	synG (NmW135)	F857	TATTTATGGAAGGCATGGTGTATG	NmW135- <i>N.meningitidis</i> CDC kod M7034
		R964	TTGCCATTCCAGAAATATCACC	
		Pb907i (FAM)	AAATATGGAGCGAA" T" GATTACAGTAAC-TATAATGAA	
	xcbB (NmX)	F173	TGTCCCCAACCGTTTATTGG	NmX- <i>N.meningitidis</i> CDC kod M8210
		R237	TGCTGCTATCATAGCCGCC	
		Pb196 (Cy5)	TGTTTGCCCA" T" GAATGCGCGG	

* Yöntemin optimizasyonunda kullanılan hedef gen bölgeleri. ctrA (Nm): *N.meningitidis* ctrA (capsule transport gene), hpd (Hi): *H.influenzae* hpd (protein D gene), lytA (Sp): *S.pneumoniae* lytA (autolysin gene), synD (NmB): *N.meningitidis* serogrup B synD (capsule biosynthesis gene D), synE (NmC): *N.meningitidis* serogrup C synE (capsule biosynthesis gene E), synF (NmY): *N.meningitidis* serogrup Y synF (capsule biosynthesis gene F), sacB (NmA): *N.meningitidis* serogrup A sacB (capsule polymerase sacB), synG (NmW135): *N.meningitidis* serogrup W135 synG (capsule biosynthesis gene G), xcbB (NmX): *N.meningitidis* serogrup X xcbB (capsule polymerase xcbB).

** Testte kullanılan primer/problar 7 nolu kaynaktan alınmıştır.

*** Yöntemin optimizasyonunda kullanılan standart suşlar.

kanlı agar besiyerine ekim yapıldı ve ayrıca 100'er µl alınarak kaynatma yöntemiyle DNA ekstraksiyonları yapıldı⁸. Plaklar uygun şartlarda (37°C, %5 CO₂, mikroaerofilik, nemli ortamda 24 saat) üretildi. Kalıp DNA'lar ise test gününe kadar -20°C'de saklandı. Elde edilen logaritmik dilüsyonlar ile Rt-multipleks PCR yapılarak testin saptama limiti test edildi.

Duyarlılık Simülasyon Çalışması

Simülasyon çalışması klinik örnek olan BOS ile yapıldı. Konsantrasyonu 10², 10³ ve 10⁴ cfu/ml olan bakteri süspansiyonlarından 100'er µl alınarak 400 µl NHS içermeyen BOS örneğiyle karıştırıldı ve 500 µl simüle BOS örneği elde edildi. BOS örneklerinden, CDC'nin ilgili protokolünden uyarladığımız yöntemle göre 3000 ünite/ml olacak şekilde mutanolysin (Sigma Aldrich, ABD) ve 30 mg/ml olacak şekilde hiyalüronidaz (Sigma Aldrich, ABD) kullanılarak DNA'lar ekstrakte edildi⁹. Ardından Rt-multipleks PCR gerçekleştirildi.

Laboratuvarımıza Gelen Klinik Örneklerde Yöntemin Test Edilmesi

Bu çalışmaya, Temmuz 2012-Mayıs 2014 tarihleri arasında laboratuvarımıza gönderilen akut bakteriyel menenjit şüpheli 41'i BOS olmak üzere 43 hastaya ait klinik örnek (BOS, serum) ve kan kültürü ile araştırma amaçlı gönderilen altı adet nazofarengeal sürüntü izolatu dahil edildi. Klinik örneklerde *N.meningitidis*, *H.influenzae* ve *S.pneumoniae*'ya bağlı akut bakteriyel menenjit taraması istemiyle "Daire Başkanlığımız Numune Kabul Birimi"ne gelen, kültürde örneğin alınmasının üzerinden uzun süre geçmiş olması, uygun transport besiyerinde gönderilmemesi gibi nedenlerle etkenin üretilme olasılığı mümkün görünmeyen ve örnek miktarı farklı testlerin çalışılması için yetersiz olan BOS (n= 41) ve serum (n= 1) örnekleri laboratuvarımıza gönderildi. Akut bakteriyel menenjit şüpheli örnekler laboratuvarımıza gelir gelmez hemen incelemeye alınırken, nazofarengeal altı izolatu toplu halde çalışıldı.

Klinik örnekler⁹ ve izolatlardan⁸ DNA izolasyonu yapıldı. Toplam 49 örnek, laboratuvarımızda optimize ettiğimiz Rt-multipleks PCR ile incelendi. İzolatlar hem konvansiyonel yöntemle hem de Rt-multipleks PCR yöntemiyle çalışıldı. Sıvı besiyeri ortamında gönderilen *N.meningitidis* izolatları %10 at kanlı çikolata besiyerine ekilerek, 37°C'de 16-18 saat nemli ve %5-10 CO₂'li ortamda üremeye bırakıldı.

Üreyen kolonilerden;

(i) Kaynatma yöntemi ile ekstraksiyonun ardından Rt-multipleks PCR ile amplifikasyon yapıldı.

(ii) Konvansiyonel olarak; oksidaz, katalaz, Gram boyama, API-NH, özgül antiserumlarla aglütinasyon testleri çalışıldı.

Akreditasyon

Türk Akreditasyon Kurumu tarafından TS EN ISO 15189-Tıbbi Laboratuvarlar-Kalite ve Yeterlilik İçin Özel Şartlar Standardına göre, NHS Rt-multipleks testi "*S.pneumoniae*, *H.influenzae*, *N.meningitidis* saptanması" test/parametre adı ve standart çalışma prosedürü (SÇP) kod numarası "SÇP 05/MRLDB.06" ile, BCY Rt-multipleks PCR testi ve AWW Rt-multipleks testleri "*N.meningitidis* serogrup tayini test/parametre" adı ve "SÇP 06/MRLDB.06" kod numarası ile akredite edildi (Akreditasyon No: AB-0024-TL)¹⁰.

BULGULAR

Laboratuvarımızda optimize ve standardize ettiğimiz Rt-multipleks PCR yönteminin duyarlılık sonucunun Wang ve arkadaşlarının 2012 yılında yapmış oldukları çalışmanın⁷ duyarlılık sonucuyla benzer olduğu saptanmıştır. *N.meningitidis* için testin saptama limiti 40 cfu/ml olup; bu 1 bakteri/reaksiyon karışımı [(bak)/reak] olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç, aynı zamanda PCR yöntemi reaksiyon tüpünde bir adet bakterinin saptanabildiği teorisini de doğrulamaktadır.

Tablo II. Rt-Multipleks PCR Yönteminin Duyarlılığının Değerlendirilmesi

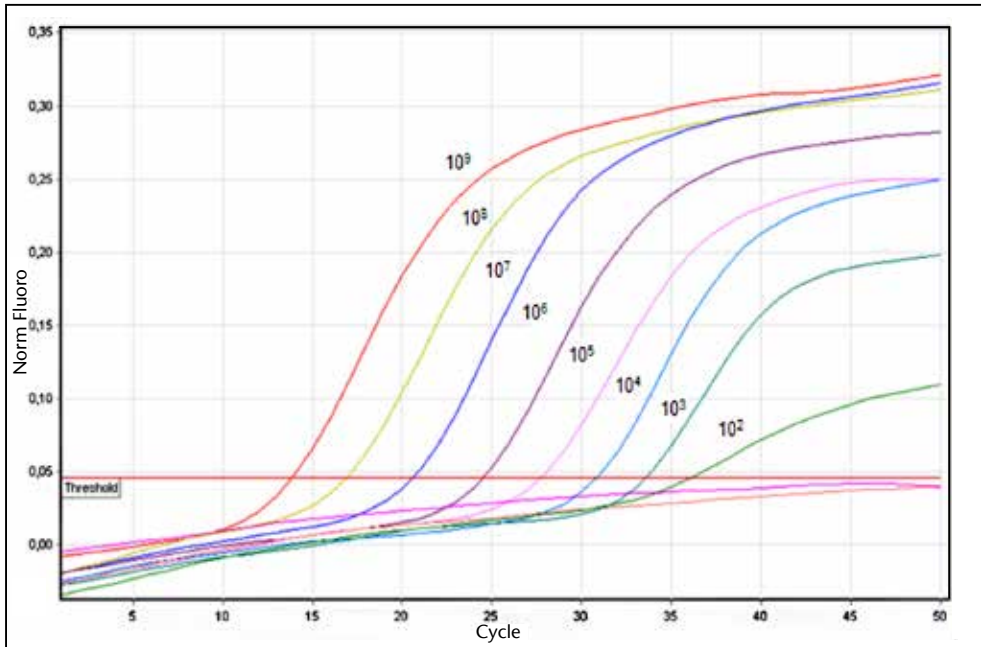
No	Dilüsyon oranı	Bakteri yoğunluğu (cfu/ml)*	Kültürdeki koloni sayısı ile Rt-multipleks PCR sonuçlarının karşılaştırılması		
			Koloni sayısı (cfu/ml)	Standart bakteri suşları ile elde edilen CT aralığı	BOS simülasyon çalışması ile elde edilen CT aralığı
1	1	10 ⁹	> 10 ⁵	13.32-14.34	-
2	10 ⁻¹	10 ⁸	> 10 ⁵	16.35-17.42	-
3	10 ⁻²	10 ⁷	> 10 ⁵	20.04-21.12	-
4	10 ⁻³	10 ⁶	> 10 ⁵	23.97-24.85	-
5	10 ⁻⁴	10 ⁵	≈ 10 ⁵	27.23-28.32	-
6	10 ⁻⁵	10 ⁴	≈ 10 ⁴	30.35-31.15	31.32-32.50
7	10 ⁻⁶	10 ³	≈ 10 ³	33.11-34.07	33.30-34.80
8	10 ⁻⁷	10 ²	≈ 10 ²	34.66-35.52	34.75-35.67
9	10 ⁻⁸	10 ¹	-	-	-
10	10 ⁻⁹	1	-	-	-

* Rt-multipleks PCR testinin duyarlılığı *N.meningitidis*, *H.influenzae* ve *S.pneumoniae*'nin 1x10⁻¹-10⁻⁹ cfu/ml arası azalan logaritmik dilüsyonlar ile ayrı setler halinde test edilmiştir.

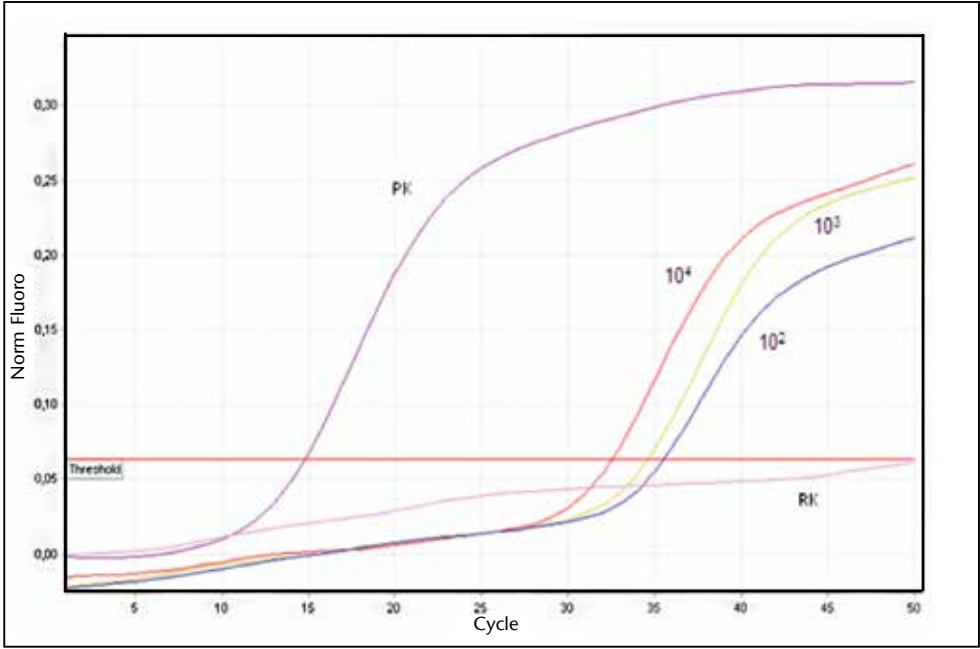
Hazırlanan bakteri dilüsyonlarından yapılan kültürlerin üreme sonuçlarına göre her bir dilüsyondaki bakteri sayıları doğrulanmıştır. 1-8 arası dilüsyonlardan ekstrakte edilen kalıp DNA'lar ile gerçekleştirilen Rt-multipleks PCR sonucu azalan titrasyonlarda pozitiflik saptanmış olup, yöntemin saptama limiti 10^2 cfu/ml olarak tespit edilmiştir (Tablo II). Yaptığımız çalışmalara örnek olarak, NmB-*N.meningitidis* CDC kod M5179 suşunun 10^{-1} - 10^{-9} cfu/ml arası logaritmik olarak azalan dilüsyonları ile yapılan duyarlılık çalışmasında elde edilen CT değerleri Şekil 1'de gösterilmiş, saptama limiti 10^2 cfu/ml'deki CT değerinin yaklaşık 35 olduğu hesaplanmıştır.

Temsili nitelikteki BOS örnekleri ile yapılan Rt-multipleks deneyinde, testin saptama limitinin 10^2 cfu/ml olduğu, matris etkisinin duyarlılık üzerine olumsuz etkisinin olmadığı gözlenmiştir (Şekil 2).

Klinik örneklerin NHS miks ile test edilmesi sonucunda, 14 BOS örneğinde (14/41) *N.meningitidis* saptanırken, hiçbirinde *S.pneumoniae* ve *H.influenzae* tespit edilmemiştir. Yapılan çalışmada *N.meningitidis* pozitif BOS örneklerinin CT değerlerinin 17.75-40.42 arasında olduğu gözlenmiştir. CT değerinin 35'in üzerinde saptanması durumunda, test tekrarlanarak sonuç hastanın kliniği ile birlikte yeniden değerlendirilmiştir. Bu hastaların dördü *N.meningitidis* açısından pozitif olarak yorumlanmıştır. Hastaların klinik takip sonuçlarına göre, BOS'un geç dönemde alınmış olduğu ve/veya antibiyotik kullanımının etkisiyle CT değerinin yükseldiği anlaşılmıştır.



Şekil 1. NmB-*Neisseria meningitidis* CDC kod M5179 suşunun 10^9 - 10^1 cfu/ml arası logaritmik dilüsyonları ile yapılan duyarlılık çalışması. Şekilde, yöntemin saptama limitinin 10^2 cfu/ml olarak tespit edildiği görülmektedir. 10^1 cfu/ml bakteri dilüsyonu threshold çizgisinin hemen altında ve bakteri içermeyen reaksiyon kontrol eğrisiyle paralel seyretmektedir.



Şekil 2. Simüle BOS örnekleri ile yapılan Rt-multipleks deneyinde testin saptama limiti. 10^2 , 10^3 ve 10^4 : 10^2 , 10^3 ve 10^4 cfu/ml bakteri dilüsyonları ile hazırlanan simüle BOS örnekleri. PK: Pozitif Kontrol. RK: Bakteri içermeyen reaksiyon kontrol.

BCY miks ve AWX miks ile *N.meningitidis* saptanan BOS örnekleri incelendiğinde 10 tanesinin serogrup spesifik primerler ile reaksiyon verdiği gözlenmiştir; bunların 8 (%80)'i serogrup B, 1 (%10)'i serogrup A, 1 (%10)'i serogrup W135 olarak saptanmıştır. Geriye kalan ve CT değeri 35'in üzerinde olan dört BOS örneği serogruplandırılamamıştır (NT). Ayrıca Rt-multipleks PCR testleri (NHS, BCY ve AWX miks) ile çalışmaya alınan izolatların tümünün [nazofarengeal sürüntü izolatu ($n=6$) ve kan kültürü izolatu ($n=1$)] *N.meningitidis* serogrup B olduğu saptanmıştır. Bu izolatlar USYPRL'de çikolata agar besiyerinde üretildikten sonra, oksidaz katalaz ve NH API (Biomeriux, Fransa) ile tanımlanmış ve *N.meningitidis*'e özgül antiserum (Becton Dickinson, ABD) ile serogrup B olarak tiplendirilmiştir.

TARTIŞMA

Bilindiği üzere gerçek zamanlı PCR hızlı ve güvenilir bir tanı aracıdır. Yöntem, yüksek duyarlılığı sayesinde bir yandan laboratuvar tanı kapasitesinin artırılmasını sağlarken, sekans spesifik florojenik oligonükleotit problemler sayesinde çoklu DNA hedeflerinin özgül olarak saptanabilmesine olanak sağlamaktadır. Bu sayede, Rt-multipleks PCR ile tek bir reaksiyonda çoklu etken taramasını, özellikle BOS gibi klinik örneğin sınırlı olduğu ve menenjit gibi hayatı ve toplum sağlığını tehdit eden enfeksiyonlarda yapabilmek mümkün olabilmektedir. Akut bakteriyel menenjit tanısında kültür halen "altın standart" olmakla birlikte enfeksiyonların çoğundan sorumlu olan NHS'nin üretilmesi ve kültür ile tanı ko-

nulmasının zaman alıcı olması gibi zorluklar nedeniyle BOS örneğinde doğrudan etkeni tanımlayabilmek zorunlu hale gelmiştir. Bu çalışmada, klinik örneklerde hızlı, güvenilir bir şekilde hastalığın tanısını koymak ve serogrup tayini yapmak üzere laboratuvarımızda “in-house Rt-multipleks PCR” yöntemini optimize etmek amacıyla üç farklı miks (NHS, BCY ve AWX) tasarlanmıştır.

Akut bakteriyel menenjit tanısına yönelik Rt-multipleks PCR yönteminde önceleri *N.meningitidis* *ctrA*, *H.influenzae* *bexA* ve *S.pneumoniae* *lytA* genleri hedef alınmıştır¹¹. Ancak, *bexA* tabanlı testler sadece kapsüllü olan *H.influenzae* izolatlarını tespit edebilmekte, tiplendirilemeyen izolatları tespit edememektedir. Ek olarak, *S.pneumoniae* tanısında *lytA* geninin *ply* geninden daha özgül bir hedef bölge olduğu gösterilmiştir¹². Daha sonraki çalışmalarda geliştirilen Rt-multipleks testlerinde, hem tiplendirilebilen hem de tiplendirilemeyen *H.influenzae* izolatlarını tespit etmek amacıyla protein D (*hpd*) geni ve *S.pneumoniae* *lytA* geni hedef bölge olarak seçilmiştir^{12,13,14}. Bu çalışmalarda *ctrA* geni *N.meningitidis* için hedef gen bölgesi olarak seçilmiştir. *CtrA* tabanlı Rt-multipleks PCR testi kapsüllü *N.meningitidis* izolatlarının birçoğunu saptamak için uygun bir test olmasına rağmen, *ctrA* geni taşımayan kapsülsüz izolatların tespitinde veya bu gende önemli varyasyonlar olması durumunda yetersiz kaldığı gözlenmiştir^{15,16,17}. Son çalışmalarda *N.meningitidis* *sodC* geninin hedef olarak kullanıldığı Rt-multipleks PCR yönteminin, hem tiplendirilebilen kapsüllü izolatların hem de daha çok nazofarengeal taşıyıcılık araştırmalarında karşımıza çıkan ve tiplendirilemeyen kapsülsüz izolatların tanımlanmasında yararlı olabileceği belirtilmekte olup, bu konudaki araştırmalar devam etmektedir^{18,19,20}.

Bir menenjit hastasından alınan BOS örneğinde bakteri sayısı genelde 10^3 - 10^5 cfu/ml'nin üzerinde saptanmaktadır²¹. Bu çalışmada yöntemin saptama limiti 10^2 cfu/ml olarak tespit edilmiş olup, NHS Rt-multipleks PCR'nin duyarlılığı akut bakteriyel menenjitin %80-85'inden sorumlu olan bu üç etkenin BOS ve diğer steril vücut sıvılarında saptanabilmesi için yeterli olduğu gözlenmiştir. Bakteri saptama sınırlarımız 10^2 cfu/ml değeri için, Rt-multipleks PCR'nin sınır değeri (CT, threshold cycle) yaklaşık 35 olarak hesaplanmıştır. CDC Rt-multipleks PCR test sonucunda CT değerinin 35-40 arası bulunması durumunda BOS örneğinin seyreltilerek testin tekrar edilmesini önermektedir⁹. Çalışmamızda sınırlı sayıda hastada elde ettiğimiz > 35 CT değeri, bu gibi durumlarda test tekrarının önemini göstermiştir. Söz konusu durumlarda elde edilen pozitif sonuç konfirme edilememiş, dolayısıyla yanlış pozitifliğin rapor edilmesi önlenmiştir. Bazı hastalarda ise testin ikinci tekrarda da pozitif sonuç verdiği gözlenmiştir. Bilindiği üzere, numunenin alınmasından önce antibiyotik tedavisine başlanmış olması, örneğin uygunsuz şartlarda transportu veya saklanması gibi faktörler DNA'nın yıkımına yol açabilmektedir. Bu gibi durumlarda sonuçlar, klinik veriler ve diğer laboratuvar bulguları ile birlikte dikkatli bir şekilde yorumlanmalıdır.

Toplumdaki *N.meningitidis* serogruplarının belirlenmesi uygulanacak olan aşı tipi ve kombinasyonuna karar verilmesi açısından önem arz etmektedir. On iki serogrubu olan *N.meningitidis*'in en sık görülen serogrupları A, B, C, Y, X ve W135'tir. *N.meningitidis*

serogrup A epidemilerin çoğundan sorumlu tutulurken, serogrup B, C ve Y daha çok sporadik olgulardan sorumludur. Serogrup B ve C Amerika ve Avrupa'da en yaygın görülen serogrupları oluşturmaktadır. Türkiye'de ise 1982 yılında en sık saptanan serogrup B iken, 2005 yılında yapılan aktif süveyans çalışmalarında W135'in %42.7, B'nin %31.1, Y ve A serogruplarının sırasıyla %2.2 ve %0.7 oranında olduğu saptanmıştır²². Türkiye'de 2007-2009 yıllarında serogrup A ve B'nin az düzeyde arttığı, W135'in ise azaldığı tespit edilirken; serogrup W135 prevalansındaki değişikliğin Hac epidemisine bağlı olduğu bildirilmiştir²³. 2010 yılındaki bir çalışmada ise ülkemizde serogrup B'ye bağlı meningokokal hastalık prevalansının %35'e yükseldiği ve serogrup W135 prevalansının azaldığı bildirilmiştir²⁴. Bu çalışmada optimize ettiğimiz yöntem ile her ne kadar sınırlı sayıda BOS örneği test edilmiş olsa da, elde edilen veriler *N.meningitidis* serogrup B'nin yaygınlaşmasına işaret etmektedir.

Laboratuvar tanı kapasitesini artırmaya yönelik bir "in-house" Rt multipleks PCR testi tasarlar; özgül, duyarlı, hızlı ve güvenilir sonuç verebilmek hedeflenmelidir. Bu çalışmada optimize edilen Rt-multipleks PCR yönteminin NHS'ye bağlı akut bakteriyel menenjitin doğrudan tanısında ve *N.meningitidis*'in tiplendirmesinde hızlı ve güvenilir bir test olduğu düşüncesindeyiz. Hızlı tanı, hastalığın tedavisi ve kontrolü açısından, etkenin serogruplandırılması ise korunma/kontrol ve aşı politikaları açısından önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Tunkel AR, Scheld WM. Acute meningitis, pp: 1083-1126. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principle and Practice of Infectious Diseases. 2005, 6th ed. Churchill-Livingstone, Philadelphia, USA.
2. Rantakallio P, Leskinen M, von Wendt L. Incidence and prognosis of central nervous system infections in a birth cohort of 12.000 children. Scand J Infect Dis 1986; 18(4): 287-94.
3. Tunkel AR, Approach to the patient with central nervous system infection, pp: 1079-1083. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principle and Practice of Infectious Diseases. 2005, 6th ed. Churchill-Livingstone, Philadelphia, USA.
4. Bilukha OO, Rosenstein N; National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention and control of meningococcal disease. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep 54(RR-7): 1-21.
5. Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM. Meningococcal disease. N Engl J Med 2001; 344(18): 1378-88.
6. Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Süveyans ve Laboratuvar Rehberi, Sağlık Bakanlığı 2005, Ankara. <http://www.saglik.gov.tr/extras/dokuman/data/index.htm>
7. Wang X, Theodore MJ, Mair R, et al. Clinical validation of multiplex real-time PCR assays for detection of bacterial meningitis pathogens. J Clin Microbiol 2012; 50(3): 702-8.
8. Dashti AA, Jadaon MM, Abdulsamad AM, Dashti HM. Heat treatment of bacteria: a simple method of DNA extraction for molecular techniques. Kuwait Med J 2009; 41 (2): 117-22.
9. CDC: Chapter 10: PCR for Detection and characterization of bacterial meningitis pathogens: *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae*. Available from: <https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt10-pcr.pdf>
10. T.C. Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı, Akreditasyon Sertifikası Eki, Akreditasyon No: AB-0024-TL, Revizyon No: 02, Tarih: 10 Kasım 2017. <http://www.turkak.org.tr/pdf/AB0024TL.pdf>

11. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. J Clin Microbiol 2001; 39(4): 1553-8.
12. Carvalho Mda G, Tondella ML, McCaustland K, et al. Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA. J Clin Microbiol 2007; 45(8): 2460-6.
13. CDC. 2010. Streptococcus laboratory protocols. <http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/protocols.htm>.
14. Wang X, Mair R, Hatcher C, et al. Detection of bacterial pathogens in Mongolia meningitis surveillance with a new real-time PCR assay to detect *Haemophilus influenzae*. Int J Med Microbiol 2011; 301(4): 303-9.
15. Cavrini F, Liguori G, Andreoli A, Sambri V. Multiple nucleotide substitutions in the *Neisseria meningitidis* serogroup C *ctrA* gene cause false-negative detection by real-time PCR. J Clin Microbiol 2010; 48(8): 3016-8.
16. Claus H, Maiden MC, Maag R, Froesch M, Vogel U. Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport. Microbiology 2002; 148(Pt 6): 1813-9.
17. Dolan-Livengood JM, Miller YK, Martin LE, Urwin R, Stephens DS. Genetic basis for nongroupable *Neisseria meningitidis*. J Infect Dis 2003; 187(10): 1616-28.
18. Dolan Thomas J, Hatcher CP, Satterfield DA, et al. *sodC*-based real-time PCR for detection of *Neisseria meningitidis*. PLoS One 2011; 6(5): e19361.
19. Higa FT, Fukasawa LO, Gonçalves MG, et al. Use of *sodC* versus *ctrA* for real-time polymerase chain reaction-based detection of *Neisseria meningitidis* in sterile body fluids. Mem Inst Oswaldo Cruz 2013; 108(2): 246-7.
20. Rojas E, Hoyos J, Oldfield NJ, et al. Optimization of molecular approaches to genogroup *Neisseria meningitidis* carriage isolates and implications for monitoring the impact of new serogroup B vaccines. PLoS One 2015; 10(7): e0132140.
21. La Scole LJ Jr, Dryja D. Quantitation of bacteria in cerebrospinal fluid and blood of children with meningitis and its diagnostic significance. J Clin Microbiol 1984; 19(2): 187-90.
22. Dinleyici EC, Ceyhan M. The dynamic and changing epidemiology of meningococcal disease at the country-based level: the experience in Turkey. Expert Rev Vaccines 2012; 11(5): 515-8.
23. Ceyhan M, Yildirim I, Balmer P, et al. A prospective study of etiology of childhood acute bacterial meningitis, Turkey. Emerg Infect Dis 2008; 14(7): 1089-96.
24. Ceyhan M, Celik M, Demir ET, Gurbuz V, Aycan AE, Unal S. Acquisition of meningococcal serogroup W-135 carriage in Turkish Hajj pilgrims who had received the quadrivalent meningococcal polysaccharide vaccine. Clin Vaccine Immunol 2013; 20(1): 66-8.