

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Vanja ŠKUFGA

**PRIMERJAVA KLASIČNIH IN MOLEKULARNIH METOD ZA  
DIAGNOSTIKO GNOJNEGA MENINGITISA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**COMPARISON OF CLASSICAL AND MOLECULAR METHODS  
FOR DIAGNOSTICS OF ACUTE BACTERIAL MENINGITIS**

GRADIATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Manica Müller Premru, za somentorico dr. Tjašo Cerar in za recenzentko prof. dr. Eva Ružić Sabljic.

Mentorica: prof. dr. Manica Müller Premru

Somentorica: dr. Tjaša Cerar

Recenzentka: prof. dr. Eva Ružić Sabljic

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur Bertok  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Manica Müller Premru  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: dr. Tjaša Cerar  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Eva Ružić Sabljic  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Vanja Škufca

**KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA**

- ŠD Dn  
 DK UDK 579.61.083:616.831.9-002:577.2.083(043)=163.6  
 KG infekcijske bolezni/meningitis/bakterijski meningitis/diagnostične metode/  
 določanje bakterij/*Neisseria meningitidis*/*Streptococcus pneumoniae*/*Haemophilus influenzae*/PCR v realnem času/LightCycler/StepOnePlus  
 AV ŠKUFCA, Vanja  
 SA MÜLLER PREMUR, Manica (mentorica)/CERAR, Tjaša (somentorica)/RUŽIĆ  
 SABLJIĆ, Eva (recenzentka)  
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija  
 mikrobiologije  
 LI 2011  
 IN PRIMERJAVA KLASIČNIH IN MOLEKULARNIH METOD ZA  
 DIAGNOSTIKO GNOJNEGA MENINGITISA  
 TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
 OP XIV, 58 str., 15 pregl., 18 sl., 44 vir.  
 IJ sl  
 JI sl/en  
 AI Patogene bakterije *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* in  
*Haemophilus influenzae* so najpogostejši povzročitelji gnojnega meningitisa. To je  
 okužba, ki nastane zaradi vdora bakterij v sicer sterilni predel možganskih ovojnic.  
 Zaradi bakterijskega meningitisa lahko nastanejo trajne nevrološke posledice, v  
 nekaterih primerih tudi smrt. Laboratorijska diagnostika temelji na metodi  
 neposrednega gramskega razmaza in kultivacije ter osamitvi bakterij iz vzorcev  
 likvorja, vendar je ta metoda zamudna, saj traja tudi 24 ur in več. Poleg tega lahko z  
 metodo kultivacije zgrešimo primere okužb, kjer so bolniki že prejeli antibiotike  
 pred odvzemom likvorja. Z uvedbo metode PCR v realnem času smo želeli skrajšati  
 čas dokazovanja omenjenih bakterij iz vzorca likvorja na 2-3 ure in dokazati  
 povzročitelja tudi v primerih, ko je bila metoda kultivacije negativna zaradi  
 antibiotične terapije. Skrajšan čas dokazovanja bakterij bi lahko zmanjšal posledice  
 okužbe. V nalogi smo predpostavili, da je molekularna metoda PCR v realnem  
 času bolj občutljiva od kultivacije in da bomo z njo dokazali več povzročiteljev  
 gnojnega meningitisa. V raziskavo smo vključili 87 vzorcev likvorja, ki so bili  
 odvzeti 66 različnim bolnikom. Klasično metodo smo izvedli z neposrednim  
 razmazom in s kultivacijo vzorcev likvorja na obogatenih gojiščih. Izolacijo  
 bakterijske DNA smo izvedli z avtomatsko aparaturo MagNa Pure Compact. Za  
 izvedbo protokola PCR v realnem času smo uporabili aparaturo LightCycler, kjer  
 smo dokazovali gena *ply* (*S. pneumoniae*) in *porA* (*N. meningitidis*) z uporabo  
 poznanih začetnih oligonukleotidov, in StepOnePlus za dokazovanje povzročiteljev  
 s komercialnim kitom EuSepScreen. Ugotovili smo, da je molekularna metoda PCR  
 v realnem času hitrejša in bolj občutljiva od metode kultivacije, in da z njo  
 dokažemo povzročitelje tudi pri bolnikih z antibiotično terapijo, uvedeno pred  
 odvzemom likvorja.

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

- DN Dn
- DC UDC 579.61.083:616.831.9-002:577.2.083(043)=163.6
- CX infective diseases/meningitis/bacterial meningitis/detection methods/bacteria  
detection/*Neisseria meningitidis*/*Streptococcus pneumoniae*/*Haemophilus influenzae*/real-time PCR/LightCycler/StepOnePlus
- AU ŠKUFCA, Vanja
- AA MÜLLER PREMUR, Manica (supervisor)/CERAR, Tjaša (co-advisor)/RUŽIČ  
SABLJIČ, Eva (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in  
Microbiology
- PY 2011
- TI COMPARISON OF CLASSICAL AND MOLECULAR METHODS FOR  
DIAGNOSTICS OF ACUTE BACTERIAL MENINGITIS
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XIV, 58 p., 15 tab., 18 fig., 44 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Pathogenic bacteria *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* account for most cases of bacterial meningitis. Infection is the results of pathogen dissemination from nasopharynx and its invasion of meninges. As a consequence of meningitis permanent neurological damages or even death can appear. Laboratory diagnosis of bacterial meningitis is based on gram stain and cultivation and isolation of bacteria from cerebrospinal fluid (CSF), however it is time-consuming (cultivation can last 24 hours and more) and can be negative in the case of antibiotic treatment before CSF examination. Faster detection could prevent or at least numerous consequences of the infection. In the present study we presumed better sensitivity of real-time PCR compared to the cultivation. In the study, 87 CSF specimen from 66 different patients were included. CSF samples were cultivated on enriched media. DNA from CSF was isolated using automated isolation system MagNa Pure Compact Instrument. For molecular detection two real-time systems were used, LightCycler using in house protocol for the detection of *ply* (*S. pneumoniae*) and *porA* (*N. meningitidis*) genes, and StepOnePlus using for commercial available kit EuSepScreen. We concluded that real-time PCR is faster and more sensitive in comparison to cultivation and also enables the pathogen detection in the case of antibiotic treatment before CSF examination.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>XI</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>XIII</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XIV</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 BAKTERIJSKI MENINGITIS .....	3
2.1.1 Patogeneza bakterijskega meningitisa .....	3
2.1.2 Likvor .....	3
2.1.3 Bakterijski povzročitelji .....	4
2.1.4 Epidemiologija bakterijskega meningitisa .....	6
2.1.5 Simptomi in posledice .....	6
2.1.6 Zdravljenje bakterijskega meningitisa .....	7
2.2 LASTNOSTI BAKTERIJ <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> IN <i>Haemophilus influenzae</i> .....	9
2.2.1 <i>Neisseria meningitidis</i> .....	9
2.2.1.1 Opis bakterije .....	9
2.2.1.2 Epidemiologija .....	9
2.2.1.3 Patogenost bakterije .....	10
2.2.1.4 Zdravljenje in preprečevanje okužbe .....	11
2.2.2 <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	12

2.2.2.1 Opis bakterije.....	12
2.2.2.2 Epidemiologija .....	12
2.2.2.3 Patogenost bakterije.....	13
2.2.2.4 Zdravljenje in zaščita pred okužbo.....	13
<b>2.2.3 <i>Haemophilus influenzae</i> .....</b>	<b>14</b>
2.2.3.1 Opis bakterije.....	14
2.2.3.2 Epidemiologija .....	14
2.2.3.3 Patogenost bakterije.....	15
2.2.3.4 Zdravljenje in zaščita pred okužbo.....	16
<b>2.3 MIKROBIOLOŠKA DIAGNOSTIKA BAKTERIJSKEGA MENINGITISA.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3.1 Odvzem in transport kužnin .....</b>	<b>16</b>
<b>2.3.2 Postopki v laboratoriju .....</b>	<b>17</b>
2.3.2.1 Makroskopski izgled likvorja in neposredna mikroskopska preiskava.....	17
2.3.2.2 Klasična metoda diagnostike.....	17
2.3.2.3 Molekularne preiskave .....	18
<b>2.4 IZOLACIJA BAKTERIJSKE DNA.....</b>	<b>19</b>
<b>2.4.1 Avtomatska izolacija.....</b>	<b>19</b>
<b>2.5 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU.....</b>	<b>21</b>
<b>2.5.1 Sistem LightCycler.....</b>	<b>21</b>
<b>2.5.2 Metode zaznavanja pomnoženih produktov pri RT-PCR .....</b>	<b>22</b>
2.5.2.1 Nespecifične metode zaznavanja pomnoženih produktov.....	22
2.5.2.2 Specifične metode zaznavanja pomnoženih produktov.....	23
2.5.2.3 Analiza podatkov pri RT-PCR .....	24
<b>3 MATERIAL IN METODE.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1 MATERIAL.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1.1 Vzorci .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1.2 Laboratorijska drobna oprema in aparature.....</b>	<b>26</b>

3.2 METODE.....	27
<b>3.2.1. Mikroskopski preparat in klasična metoda kultivacije.....</b>	<b>27</b>
3.2.1.1. Neposredni mikroskopski preparat pobarvan po Gramu.....	27
3.2.1.2 Gojišča in pogoji inkubacije.....	29
3.2.1.3 Identifikacija bakterijskih kultur.....	30
<b>3.2.2 Avtomatska izolacija bakterijske DNA.....</b>	<b>34</b>
3.2.2.1 Priprava vzorca.....	34
3.2.2.2 Izolacija z aparaturo MagNA Pure Compact Instrument.....	34
<b>3.2.3 »In house« metoda PCR v realnem času na aparaturi LightCycler 2.0 (Roche, Nemčija).....</b>	<b>35</b>
3.2.3.1. Začetni oligonukleotidi.....	35
3.2.3.2. Priprava reakcijske mešanice.....	36
3.2.3.3 Pogoji protokola PCR v realnem času na aparaturi LightCycler.....	37
<b>3.2.4. PCR v realnem času z uporabo komercialnega kita na aparaturi StepOnePlus.....</b>	<b>38</b>
3.2.4.1. Komercialni kit EuSepScreen.....	38
3.2.4.2 Pogoji protokola na aparaturi StepOnePlus.....	38
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>40</b>
4.1 VZORCI.....	40
4.2 DOKAZOVANJE BAKTERIJ V LIKVORJU.....	41
<b>4.2.1 Mikroskopski preparat in klasična metoda kultivacije.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2.2 Metoda PCR v realnem času z uporabo začetnih oligonukleotidov na aparaturi LightCycler.....</b>	<b>42</b>
<b>4.2.3 Metoda PCR v realnem času na aparaturi StepOnePlus z uporabo komercialnega kita.....</b>	<b>45</b>
4.3 PRIMERJAVA METOD.....	46
<b>4.3.1 Primerjava metod PCR v realnem času in metode kultivacije.....</b>	<b>46</b>
4.4. OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST.....	48

<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>49</b>
5.1 RAZPRAVA .....	49
5.2 SKLEPI .....	53
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>54</b>
<b>7 VIRI .....</b>	<b>56</b>

**ZAHVALA**

**PRILOGE**



**KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica 1: Povzročitelji gnojnega meningitisa glede na starost in poškodbo oz. operacijo (Müller Premru in Pirš, 2009: 10).....	4
Preglednica 2: Izkustveno zdravljenje gnojnega meningitisa (Čižman, 2009: 19) .....	8
Preglednica 3: Gojišča, inokulacija, pogoji in trajanje inkubacije likvorja (Müller-Premru, 2008: 4).....	29
Preglednica 4: Identifikacijski kriteriji za najpogostejše bakterijske povzročitelje gnojnega meningitisa. ....	30
Preglednica 5: Koraki avtomatske izolacije DNA z MagNA Pure Compact Instrument-om. ....	35
Preglednica 6: Zaporedje začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje gena <i>ply</i> . ....	36
Preglednica 7: Zaporedje začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje gena <i>porA</i> . ....	36
Preglednica 8: Temperaturno-časovni protokol reakcije PCR v realnem času na aparaturi LightCycler.....	37
Preglednica 9: Temperaturno-časovni protokol reakcije PCR v realnem času na aparaturi StepOnePlus. ....	39
Preglednica 10: Bakterijske vrste, izolirane iz vzorcev likvorja in število bolnikov. ....	42
Preglednica 11: Primerjava števila bolnikov s pozitivnim gramskim razmazom in s pozitivno metodo kultivacije za bakteriji <i>Streptococcus pneumoniae</i> in <i>Neisseria meningitidis</i> . ....	42

Preglednica 12: Ujemanje rezultatov metode kultivacije in dveh molekularnih metod PCR v realnem času za dokazovanje bakterij <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> in <i>Haemophilus influenzae</i> iz vzorcev likvorja.....	46
Preglednica 13: Ujemanje rezultatov dokazovanja bakterije <i>Streptococcus pneumoniae</i> z metodo kultivacije in molekularnima metodama PCR v realnem času.....	47
Preglednica 14: Ujemanje rezultatov dokazovanja bakterije <i>Neisseria meningitidis</i> z metodo kultivacije in molekularnima metodama PCR v realnem času.....	48
Preglednica 15: Izračun občutljivosti in specifičnosti metode kultivacije, ko za standard določimo metodo PCR v realnem času .....	48

**KAZALO SLIK**

Slika 1: Možgani obdani z gnojnim likvorjem (rumeno siva prevleka okoli možganov pod dvignjeno trdo ovojnico), ki je posledica bakterijskega meningitisa (Edwing, 2006).....	5
Slika 2: Satelitni fenomen – rast <i>Haemophilus influenzae</i> ob stafilokokni črti.....	18
Slika 3: Aparatura MagNa Pure Compact Instrument (Roche, 2011a).....	20
Slika 4: Princip delovanja SYBR green I (slika levo) in TaqMan sonde (slika desno) pri metodi PCR v realnem času (Valasek in Repa, 2005: 153).....	24
Slika 5: Pomnoževanje tarčnega zaporedja z metodo PCR v realnem času (Arko, 2004: 217).....	25
Slika 6: Moten likvor pri gnojnem meningitisu (srednja epruveta).....	28
Slika 7: <i>Neisseria meningitidis</i> v mikroskopskem preparatu likvorja obarvanem po Gramu. .....	29
Slika 8: <i>Streptococcus pneumoniae</i> v kužnini likvorja (Buxton, 2007).....	29
Slika 9: Alfa hemoliza bakterije <i>Streptococcus pneumoniae</i> na krvnem agarju (Buxton, 2005).....	31
Slika 10: Pozitiven oksidazni test.....	32
Slika 11: Alfa hemoliza na krvnem agarju in občutljivost <i>Streptococcus pneumoniae</i> na optohin (Todar, 2011).....	33
Slika 12: Test Api NH za identifikacijo bakterij iz rodov <i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i> in <i>Moraxella</i> (BioMerieux, 2011).....	33

Slika 13: Koraki izolacije molekule DNA z avtomatskim procesorjem MagNA Pure Compact Instrument (Roche, 2011a).....	35
Slika 14: Določitev povzročiteljev bakterijskega meningitisa v vzorcih številka 32 do 44 ter pozitivna in negativna kontrola.....	1
Slika 15: Določitev povzročiteljev bakterijskega meningitisa v vzorcih številka 32 do 44 ter pozitivna in negativna kontrola .....	43
Slika 16: Rezultati določitve talilnih krivulj in temperature tališča za vzorce številka 32 do 44 .....	44
Slika 17: Rezultati PCR določitve povzročiteljev bakterijskega meningitisa v vzorcih likvorja številka 1 do 8 s komercialnim kitom. ....	46
Slika 18: Primerjava števila bolnikov ob okužbi s posamezno bakterijo glede na metodo detekcije.....	47

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Rezultati metode kultivacije, neposrednega mikroskopskega preparata in molekularnih metod PCR v realnem času, vključno s spolom, starostjo, videzom likvorja in prejeti antibiotični terapiji pri bolnikih

**SEZNAM OKRAJŠAV**

Ct	fluorescenčni prag (angl. threshold cycle)
CSF	cerebrospinalna tekočina ali likvor (angl. cerebrospinal fluid)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	2'-deksinukleozid trifosfat
dsDNA	dvovijačna DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FRET	fluorescenčna resonančna energija (ang. fluorescence resonance energy)
IDSA	Infectious Diseases Society of America
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
MgCl <sub>2</sub>	magnezijev klorid
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
PCR	verižna reakcija s polimerazo PCR
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
RNA	ribonukleinska kislina
<i>S. agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tm	temperatura tališča

## 1 UVOD

Gnojni meningitis je redka, vendar akutna, življenje ogrožajoča bakterijska okužba, ki jo v 80 % povzročata bakteriji *Streptococcus pneumoniae* in *Neisseria meningitidis*. Najpogostejši je pri otrocih do 4. leta starosti in pri starostnikih (Tunkel in Scheld, 2005). Če ga ne zdravimo pravočasno, je smrtnost bolnikov visoka in pogosto nastanejo zapleti, zato meningitis predstavlja velik problem v sodobni medicini (Čižman, 2009). Med pogoste povzročitelje sodi tudi bakterija *Haemophilus influenzae* tipa b. V zadnjih 30 letih je ta povzročitelj prevladoval s 45 %, sledila sta *S. pneumoniae* z 18 % in *N. meningitidis* s 14 %. Po uvedbi cepljenja proti *H. influenzae* tip b v razvitem delu sveta se je incidenca gnojnega meningitisa, povzročene s to bakterijo, zmanjšala (Müller Premru in Pirš, 2009). Izraz gnojni meningitis se nanaša na število levkocitov v likvorju, ki je znatno povečano pri večini, ne pa pri vseh gnojnih meningitisih. Hkrati je povišana koncentracija beljakovin in znižana koncentracija glukoze v likvorju (Forbes in sod., 2007). Danes več kot 80 % primerov bakterijskega meningitisa povzročata bakteriji *S. pneumoniae* in *N. meningitidis* (Deutch in sod., 2008).

Infekcije osrednjega živčevja so bolezni, pri katerih sta hitra diagnostika in zdravljenje odločilnega pomena (Dubos in sod., 2008). Za mikrobiološko diagnostiko je primerna kužnina s punkcijo pridobljena cerebrospinalna tekočina (likvor), ki jo zasejemo na obogateno gojišče in naredimo neposredni razmaz za barvanje po Gramu. Za potrditev diagnoze je potrebno iz vzorcev likvorja z metodo kultivacije izolirati povzročitelja, kar nam omogoča tudi izdelavo antibiograma (Ihan, 2002c). Ker gre za zamudno metodo, saj metoda kultivacije traja 24 ur in več, in ker je pri bolnikih, ki že dobivajo antibiotike, kultura pogosto negativna, se v zadnjem času za dokazovanje povzročiteljev uveljavljajo tudi molekularne metode, kot je PCR v realnem času. Z no želimo skrajšati čas za detekcijo povzročiteljev gnojnega meningitisa in povečati občutljivost detekcije povzročiteljev, predvsem *S. pneumoniae* in *N. meningitidis* (Deutch in sod., 2008). Molekularne metode za detekcijo bakterij v likvorju so pomembne za dokazovanje okužb pri bolnikih, kjer bakterij ne dokažemo z neposrednim gramskim razmazom ali s kulturo, še posebej pa pri bolnikih, ki so pred odvzemom kužnin že prejeli antibiotike (Tunkel in sod., 2004).

## 1.1 NAMEN DELA

V diplomski nalogi smo z uvedbo molekularnih metod želeli skrajšati čas za detekcijo povzročiteljev gnojnega meningitisa in povečati občutljivost detekcije povzročiteljev, predvsem *S. pneumoniae* in *N. meningitidis*. Predpostavili smo, da bo molekularna metoda PCR v realnem času hitrejša in bolj občutljiva od metode kultivacije likvorja na obogatenih gojiščih ter od neposrednega mikroskopskega pregleda gramskih razmazov. Pričakovali smo tudi, da bomo z metodo PCR v realnem času dokazali povzročitelje v vzorcih likvorja, ki so bili odvzeti po uvedbi antibiotične terapije, in v katerih z metodo kultivacije nismo dokazali bakterijskega povzročitelja.

Tako smo v naši nalogi za določitev povzročiteljev bakterijskega gnojnega meningitisa primerjali metodo kultivacije vzorcev likvorja z molekularno metodo PCR v realnem času. Metodo PCR v realnem času smo izvedli na dva različna načina: z »in house« metodo s poznanimi začetnimi oligonukleotidi za pomnoževanje genov *ply* in za dokazovanje *S. pneumoniae* in *porA* za dokazovanje bakterije *N. meningitidis* na aparaturi LightCycler ter s komercialnim kitom EuSepScreen (Eurospital, Italija) na aparaturi StepOnePlus. Predpostavili smo, da ne bo razlik med rezultati molekularnih metod.

Pri molekularnih metodah smo uporabili delno zaprte sisteme, s čimer smo zmanjšali možnost kontaminacije vzorcev ali pojav lažnih rezultatov.



## **2 PREGLED OBJAV**

### **2.1 BAKTERIJSKI MENINGITIS**

#### **2.1.1 Patogeneza bakterijskega meningitisa**

Bakterijski meningitis je redka, vendar akutna, življenje ogrožajoča bakterijska okužba, ki se najpogosteje pojavlja pri otrocih do 4. leta starosti in pri starostnikih. Če ga ne zdravimo pravočasno je smrtnost visoka in nastanejo zapleti (Tunkel in Scheld, 2005). O gnojnem meningitisu govorimo, če je povzročitelj iz vrste piogenih bakterij (Čižman, 2009). Krvno-možganska pregrada, ki jo sestavljajo horioidni pleksus, arahnoidea in endotel kapilar, je pomemben obrambni mehanizem osrednjega živčevja pred nastankom okužbe. Kapilare osrednjega živčevja se razlikujejo od kapilar v drugih delih telesa. Tesne povezave med endotelnimi celicami kapilar so slabo prepustne in ščitijo osrednje živčevje pred mikroorganizmi in strupenimi snovmi. Ker so pri novorojenčkih in majhnih otrocih do 4. leta še slabo razvite, obenem pa tudi še nimajo zadostne količine protiteles, je pri njih meningitis pogostejši kot pri starejših (Forbes in sod., 2007). Mikroorganizmi lahko vstopijo v osrednje živčevje na različne načine: najpogosteje hematogeno (bakterije najdemo tudi v krvi), redkeje pa z neposrednim širjenjem iz tkiv in neposredno vzdolž živcev (Müller Premru in Pirš, 2009) ter v zvezi s poškodbami in operativnimi posegi. Bakterijski meningitis se pojavi pri 1-20 % poškodovancev z zmerno ali hudo poškodbo glave in pri 5 % bolnikov po večjem nevrokirurškem posegu (Matos in sod., 2009).

#### **2.1.2 Likvor**

Cerebrospinalna tekočina ali likvor je kužnina, ki je najlažje dostopna mikrobiološki preiskavi prisotnosti patogenih bakterij. Likvor je tekočina, ki znotraj mehkih možganskih ovojníc (leptomening) obdaja možganovino in jo ščiti pred mehanskimi poškodbami, prinaša esencialne metabolite in odstranjuje škodljive snovi (Forbes in sod., 2007). Izdelujejo ga resice horioidnega pleteža v tretjem in četrtem možganskem prekatu, tekočina se premika iz notranjosti možganov v subarahnoidalni prostor in preko arahnoidalnih resic prehaja v kri (Ihan, 2002b). Je s hranili bogato okolje, zato se

mikroorganizmi, ki so sposobni preiti čez krvno-možgansko pregrado, lahko v njem uspešno razmnožujejo (Müller Premru in Pirš, 2009).

Za mikrobiološko diagnostiko je potrebno z lumbalno punkcijo aseptično odvzeti najmanj 1 ml likvorja in ga takoj transportirati v laboratorij pri sobni temperaturi (Müller Premru in Pirš, 2009). O bakterijskem meningitisu govorimo, kadar ugotovimo, da je v likvorju nad 1000 vnetnih celic, predvsem nevtrofilcev, da je koncentracija glukoze zmanjšana, koncentracija beljakovin povečana, in ko je v kužnini dokazan povzročitelj (Forbes in sod., 2007).

### 2.1.3 Bakterijski povzročitelji

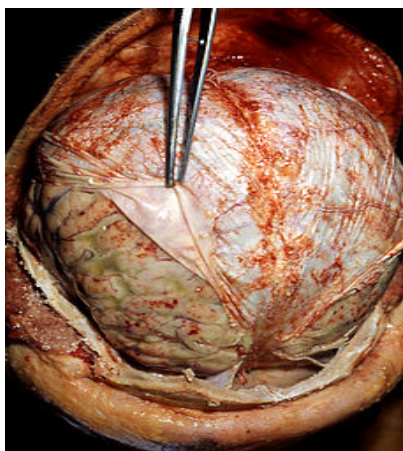
Novorojenčki se najpogosteje okužijo med porodom z bakterijami iz porodnega kanala: streptokoki skupine B (*Streptococcus agalactiae*), *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* in klamidijami. Otroške meningitise povzročajo predvsem *H. influenzae* tipa b, *N. meningitidis* in *S. pneumoniae*. Prav tako so ti povzročitelji tudi najpogostejši povzročitelji meningitisa pri odraslih. Povzročitelji bakterijskega meningitisa v posameznem starostnem obdobju so prikazani v preglednici 1. Gre predvsem za otroško bolezen, saj je med obolelimi več kot 90 % otrok starih manj kot 5 let. *S. pneumoniae* povzroča meningitise pri ljudeh vseh starosti, nekoliko bolj so ogroženi starostniki (Ihan, 2002b).

Preglednica 1: Povzročitelji gnojnega meningitisa glede na starost in poškodbo oz. operacijo (Müller Premru in Pirš, 2009: 10).

Starost	Najpogosteje izolirane bakterije
Novorojenčki in dojenčki	<i>S. agalactiae</i> , <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>
< 23 mesecev	<i>S. agalactiae</i> , <i>E. coli</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>N. meningitidis</i>
2 - 50 let	<i>S. pneumoniae</i> , <i>N. meningitidis</i>
> 50 let	<i>S. pneumoniae</i> , <i>N. meningitidis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , aerobni po Gramu negativni bacili
Po poškodbi ali nevrokirurških posegih	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , aerobni po Gramu negativni bacili, <i>S. pneumoniae</i>

Patogene bakterije *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* in *H. influenzae* so se sposobne pritrditi na endotelij v kapilarah možganskih ovojnic z adhezini (pilusi, kapsula, lipoteihoična kislina) in okvariti pregrado. V subarahnoidni prostor lahko vstopijo tudi s fagociti ali v vakuolah endotelnih celic. Povzročajo vnetje in izločanje citokinov, kar dodatno okvari pregrado, tako da lahko v likvor vstopijo nevtrofilci, albumin in druge plazemske beljakovine. Imunski sistem na okužbo je upočasnen, ker krvno–možganska pregrada preprečuje vstop protitelesom in komplementu. Za uspešno zdravljenje meningitisa moramo uporabiti antibiotike, ki prehajajo pregrado v večjih odmerkih (Struthers in Westrand, 2003). Slika 1 prikazuje možgane človeka, obdane z gnojnim likvorjem, ki je posledica gnojnega meningitisa.

Nastanek meningitisa je pogosto povezan z respiratorno okužbo (virusi), ki oslabi imunski sistem bolnika, v kombinaciji z dejavniki, ki zmanjšujejo odpornost organizma (alkoholizem, sladkorna bolezen, imunosupresivno zdravljenje). Meningitis lahko nastane tudi kot posledica sepse ali poškodbe glave. V tem primeru je lahko povzročitelj katera koli bakterija, ki pride v likvor (Ihan, 2002b). Vse pogostejši so v bolnišnici pridobljeni gnojni meningitisi, po poškodbah in nevrokirurških operacijah, ki pri odraslih bolnikih predstavljajo kar 40 % primerov (Müller Premru in Pirš, 2009).



Slika 1: Možgani obdani z gnojnim likvorjem (rumeno siva prevleka okoli možganov pod dvignjeno trdo ovojnico), ki je posledica bakterijskega meningitisa (Edwing, 2006)

Od leta 2005 do 2008 so na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani pri 20 bolnikih iz likvorja, odvzetega z lumbalno punkcijo, izolirali *S. pneumoniae*, pri 15 *N. meningitidis* in pri 3 bolnikih *H. influenzae* tipa b. Pogosto se iz vzorcev likvorja izolirali tudi koagulaza negativne stafilokoke, ki so najverjetneje kontaminanti (Müller Premru in Pirš, 2009).

#### **2.1.4 Epidemiologija bakterijskega meningitisa**

Najvišjo pojavnost imajo invazivne pnevmokokne okužbe. Pojavnost med letoma 2004 in 2008 je bila med 7,4 in 7,8 na 100.000 prebivalcev. Zaradi bakterijskega meningitisa, zlasti pnevmokoknega, vsako leto v Sloveniji tudi kdo umre. V obdobju med 2004 in 2008 je umrlo 5 bolnikov (Kraigher, 2009). V zadnjih 30 letih je prevladoval *H. influenzae* s 45 %, sledila sta *S. pneumoniae* z 18 % in *N. meningitidis* s 14 %. Po uvedbi cepljenja proti *H. influenzae* tipa b se je v ZDA in drugje incidenca gnojnega meningitisa zmanjšala, najpogostejši je postal *S. pneumoniae* s 47 %, sledi *N. meningitidis* s 25 % (Swartz, 2009). V Sloveniji je bilo v letu 2005 prijavljenih 63 primerov gnojnega meningitisa (18 *S. pneumoniae* in 17 *N. meningitidis*), v letu 2006 52 primerov (13 *S. pneumoniae* in 11 *N. meningitidis*), v letu 2007 44 (6 *S. pneumoniae* in 23 *N. meningitidis*) in letu 2008 60 primerov (10 *S. pneumoniae* in 25 *N. meningitidis*). V letu 2008 je bila stopnja obolevnosti 45,9 na 100.000 prebivalcev v starostni skupini manj kot 1 leto, v starostni skupini 1 do 4 leta 8,3 in v višjih starostnih skupinah manj (Kraigher in sod., 2008).

Po Zakonu o nalezljivih boleznih je obvezna prijava meningitisa po povzročiteljih. Pri nas so najbolj zanesljivi podatki o okužbah z invazivnimi bakterijami (*S. pneumoniae*, *N. meningitidis* in *H. influenzae*), saj poteka dosledna serotipizacija vseh izolatov na državnem nivoju (Kraigher, 2009). To je zelo pomembno zaradi pravočasne odločitve o morebitni zaščiti s cepivom. Pomembno je tudi zaradi primerjave serotipov, ki krožijo, s tistimi, ki so prisotni v cepivih. S tem zaznavamo spremembe v molekularni epidemiologiji omenjenih invazivnih bakterij in ocenjujejo pokritost sevov s cepivi (Paragi in sod., 2003).

#### **2.1.5 Simptomi in posledice**

Za akutni, gnojni bakterijski meningitis je značilen moten likvor. Klinična slika gnojnega meningitisa je odvisna od starosti bolnika in trajanja bolezni. Pri novorojencih so klinični

znaki malo specifični. Pri starejših otrocih je vročina najpogostejši simptom (pri 94 % bolnikov), ki se ji pri dojenčkih pridruži razdražljivost in motnje zavesti in pri šolskih otrocih glavobol in otrplost tilnika (Čižman, 2009). Ihan (2002b) navaja, da se začne z nenadno visoko vročino, glavobolom, otrdelim vratom, bruhanjem in nevrološkimi izpadi. Posledice so epileptični napadi (20 do 30 % zbolelih), gluhost (10 %) in nekatere druge nevrološke motnje (Hoffman in Weber, 2009). Zgodnja prepoznavna boleznin in zgodnje antibiotično zdravljenje sta ključnega pomena za nadaljnji potek bakterijskega meningitisa in usodo bolnika (Čižman, 2009).

Smrtnost zaradi bakterijskega meningitisa je pred uporabo antibiotikov znašala 90 %, z antibiotičnim zdravljenjem pa se je zmanjšala na 3 do 30 %. Zbolevanje se je znatno zmanjšalo s cepljenjem (cepivo proti *H. influenzae* tipa b), ki je bilo v Sloveniji uvedeno leta 2000 za vse otroke do 5. leta starosti (Čižman, 2009). Swartz (2004) navaja, da je bila v začetku 20. stoletja smrtnost zaradi s hemofilusi in pnevmokoki povzročene meningitisa skoraj 100 %, zaradi meningokoknega meningitisa pa 70 %. Po letu 1930 so za zdravljenje uvedli sulfonamide, zato se je smrtnost zaradi meningokoknega meningitisa zmanjšala na 5 – 15 %, zaradi hemofilusnega pa na 22 %. Smrtnost pri pnevmokoknem meningitisu je bila še vedno od 45 do 95 %, dokler ga niso začeli zdraviti s penicilinom in se je zmanjšala na 20 %.

### **2.1.6 Zdravljenje bakterijskega meningitisa**

Zdravljenje bakterijskega meningitisa vključuje antibiotično zdravljenje, ki je sprva izkustveno, nato usmerjeno in simptomatsko. Antibiotično izkustveno zdravljenje je odvisno od starosti bolnika in od osnovne bolezni. Pri novorojencih cefalosporinom 3. generacije vedno priključimo ampicilin, ki deluje na *L. monocytogenes* in enterokoke. Enako začetno zdravljenje kot pri novorojencih priporočajo tudi pri odraslih nad 60 let. Pri večjih otrocih in odraslih do 60 let začnemo zdravljenje samo z enim antibiotikom (preglednica 2). Z antibiotičnim zdravljenjem moramo začeti v 30 minutah po sprejemu v bolnišnico (Isaacs, 2007).

Preglednica 2: Izkustveno zdravljenje gnojnega meningitisa (Čižman, 2009: 19)

Starost	Verjetni povzročitelji	Antibiotik
Novorojenček 0-28 dni in odrasli > 60let	<i>S. agalactiae</i> , <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i>	cefotaksim + ampicilin
Dojenčki 1 - 3 mesece	<i>S. agalactiae</i> , <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>N. meningitidis</i> , <i>S pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i>	cefotaksim ali cetriakson + ampicilin (+ vankomicin*)
Dojenčki > 3 mesece + otroci in odrasli do 60 let	<i>N. meningitidis</i> , <i>S pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i>	cefotaksim ali cetriakson (+ vankomicin*)

\* v državah, kjer se pojavlja *S. pneumoniae*, odporen na cefalosporine 3. generacije

Cilj antibiotičnega zdravljenja je čimprejšnja sterilizacija likvorja. Vedno izberemo baktericidni antibiotik z dobrim prodiranjem skozi krvno-možgansko pregrado, ker naj bi dosegel v likvorju koncentracijo, ki je 10-20-krat višja od minimalne baktericidne koncentracije (Hoffman in Weber, 2009). Pri pnevmokokih, ki so odporni na penicilin in cefalosporine 3. generacije, ne dosežemo baktericidnih koncentracij v likvorskem prostoru. Ti pnevmokoki so občutljivi na vankomicin. Prav tako je rifampicin visoko učinkovit proti večini pnevmokokov, ki so odporni na penicilin, vendar ga zaradi hitrega razvoja odpornosti ne morejo uporabljati samega, zato ga vedno kombinirajo z vankomicinom. Priporočila o trajanju antibiotičnega zdravljenja še vedno niso enotna. Trajanje je odvisno od izolirane bakterije in starosti bolnika. Najpogosteje priporočajo 5-7 dnevno zdravljenje pri meningokoknem meningitisu, 7-10 dni pri meningitisu, ki ga povzroča *H. influenzae*, če poteka brez zapletov, za meningitis, ki ga povzroča *S. pneumoniae*, naj traja zdravljenje 10-14 dni. Bakterijski meningitis brez dokazane etiologije naj bi zdravili 10-14 dni (Čižman in Beović, 2007).

## 2.2 LASTNOSTI BAKTERIJ *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* IN *Haemophilus influenzae*

### 2.2.1 *Neisseria meningitidis*

#### 2.2.1.1 Opis bakterije

*Neisseria meningitidis* je po Gramu negativna bakterija, ki se praviloma ureja v pare (diplokok), lahko pa tudi v tetrade ali manjše skupke. V paru sta koka obrnjena s konkavno stranjo drug proti drugem in spominjata na kavino zrno. Je aerobna, negibljiva bakterija, ki ne dela spor ter ima encima oksidazo in katalazo. Ima kapsulo in na osnovi kapsularnih antigenov jo delimo v 13 seroloških skupin, med katerimi so za humano medicino najpomembnejše skupine A, B, C, Y in W 135. Največje svetovne epidemije sta povzročila serotipa A in C, medtem ko v Sloveniji in drugje v Evropi prevladuje serotip B (Poljak, 2002). Bakterija je ena izmed pomembnejših povzročiteljev meningitisa, smrtnih primerov seps in septikemije v sicer zdravih posameznikih (Kesanopoulos in sod., 2005).

*N. meningitidis* je prvi izoliral Weichselbauma leta 1887 iz likvorja bolnika z gnojnim meningitisom. Bakterija ne raste na navadnih gojiščih, dobro raste na obogatenih gojiščih, kot sta čokoladni in krvni agar. Po inokulaciji gojišča inkubiramo pri temperaturi 35°C do 37 °C in v atmosferi 5 do 10 % CO<sub>2</sub> (Poljak, 2002).

#### 2.2.1.2 Epidemiologija

Okužbe z bakterijo *N. meningitidis* se pojavljajo večinoma pozimi in spomladi, pretežno sporadično, vendar lahko tudi epidemično. Ena največjih epidemij je bila leta 1974 v Braziliji, ko je zbolelo več kot 15.000 ljudi. Epidemije se pojavljajo v valovih, približno na 10 let. Najpogosteje nastanejo v zaprtih kolektivih (vrtci, šole, vojašnice). Ocenjena možnost okužbe zaradi stika z bolnikom v družini ali v vzgojno-varstveni ustanovi je 500- do 800-krat večja kot v splošni populaciji (Poljak, 2002). Incidenca okužb z meningokoki v razvitih državah je 1/100.000 prebivalcev, v okoljih, kjer potekajo epidemično, npr. v podsaharski Afriki, pa tudi do 1000/100.000. Serološka skupina A povzroča največjo incidenco bolezni. Tudi serološka skupina C povzroča epidemije in lokalne izbruhe, prisotna je po celem svetu, pogosta je pri mladih odraslih. Serološka

skupina B, ki predstavlja 68 % primerov v Evropi, pri nas pa 84,7 %, se ne širi tako hitro, lahko pa dalj časa ostane v populaciji (Stephens in sod., 2007).

Edini naravni gostitelj te bakterije je človek bodisi kot asimptomatični nosilec bakterije na sluznici nosnega dela žrela (klicenosec) ali kot bolnik. Okužba se lahko širi posredno ali neposredno, in sicer kapljično ali aerogeno. Zbolevalo predvsem otroci med 1. in 4. letom starosti, vendar je v zadnjem času vse več obolelih tudi v starostni skupini 5 do 19 let. Približno 1 do 15 % zdravih ljudi je asimptomatičnih nosilcev meningokoka v neendemičnem obdobju. V času epidemij število klicenoscev naraste tudi do 70 %. Meningokokni meningitis je huda bolezen z 8 do 10 % smrtnostjo in pogostimi trajnimi posledicami, kot so gluhost, pareze možganskih živcev, hemiplegija in krči (Poljak, 2002). Meningitis ali bakteriemija nastane v 1 do 2 tednih po okužbi (Müller Premru in Pirš, 2009).

#### 2.2.1.3 Patogenost bakterije

Glavni virulentni dejavnik bakterije *N. meningitidis* je kapsula, ki bakterijo ščiti pred fagocitozo. Zaščitna protitelesa nastanejo po preboleli asimptomatični ali klinično izraženi okužbi ali po cepljenju. Dodatni dejavnik virulence so še endotoksini v celični steni, pilusi in beljakovine zunanje celične membrane, ki delujejo kot adhezini in omogočajo pritrnitev bakterije na epitelijske celice nosnega dela žrela. (Poljak, 2002). Kapsula bakterijo ščiti pred izsušitvijo, ji omogoča širjenje med ljudmi, pritrjanje na epitel nosno-žrelnega prostora, prepreči fagocitozo, opsonizacijo in s komplemetom posredovano baktericidno ubijanje. Izražanje kapsule *in vivo* se lahko spreminja, kar je pomembno za virulenco. Možen je tudi preklop kapsule, npr. iz serološke skupine B v serološko skupino C in obratno, kar je posledica transformacije in horizontalne izmenjave DNA kapsularnega operona (Müller Premru in Pirš, 2009). Bakterije iz zgornjih dihal potujejo v spodnja dihalna, nato vdrejo v epitelij ali potujejo v krvni obtok in se od tam razširijo tudi v možgane (Tzeng in Stephens, 2000).

Bakterijski meningitis nastane hematogeno in napreduje v štirih fazah (Tzeng in Stephens, 2000; Poljak, 2002):



- V 1. fazi se meningokoki naselijo v zgornja dihala gostitelja, in sicer v celice nosno-žrelnega epitelija vstopijo v fagocitnih vakuolah. Izognejo se humoralnemu imunskemu mehanizmu in preživijo znotraj mononuklearnih levkocitov.
- V 2. fazi bakterije vstopijo v krvni obtok, nastane bakteriemija. Preživetje in pomnoževanje bakterije v krvi je odvisno od obrambe bakterije pred humoralnim in fagocitnim odzivom gostitelja. V veliko primerih gre za prehodne vdore bakterije v kri, kar klinično ni prepoznano. Razmnoževanje bakterij je povezano s sistemskim odzivom vnetnih citokinov.
- V 3. fazi bakterije vstopijo v osrednje živčevje skozi kapilarno steno ali horioidni pletež. Zaradi pomanjkljive humoralne obrambe in zmanjšane aktivnosti levkocitov v subarahnoidnem prostoru se bakterije v likvorju pomnožujejo in njihovo število se poveča. Med obrambo se iz bakterij sproščajo številne snovi, predvsem lipopolisaharidi, ki spodbujajo celice k izdelovanju citokinov in proteolitičnih snovi.
- V 4. fazi pride do vnetja možganskih ovojnic in možganskega tkiva zaradi preživetja in razmnoževanja bakterije *N. meningitidis*. Prestopanje beljakovin in makromolekul iz krvi v likvor omogočajo vnetni citokini, ki povečajo prepustnost krvno-možganske pregrade. Nastane vazogeni edem in sočasno se sproži koagulacija. Nastane tromboza žilja z zmanjšano prekrvavitvijo možganskega tkiva, kar vodi do pomanjkanja kisika v možganskih celicah, okvare celic in možganov.

#### 2.2.1.4 Zdravljenje in preprečevanje okužbe

Poljak (2002) navaja, da je penicilin G prvo izbirno zdravilo za zdravljenje okužb z bakterijo *N. meningitidis*. Bakterija lahko proti penicilinu razvije odpornost, zaradi sprememb na genih za penicilin vezoče beljakovine ali zaradi mehanizma izločanja betalaktamaze iz celice (Müller Premru in Pirš, 2009). Za zdravljenje okužb s sevi, ki so razvili odpornost, uporabljamo cefalosporine 3. generacije ali kloramfenikol. Širjenje okužb preprečujemo z dvodnevni preventivni dajanjem rifampicina vsem osebam, ki so prišle v tesen stik z bolnikom (v družini ali vzgojno-varstvenih ustanovah) (Poljak, 2002).

Za preprečevanje okužb so na voljo tudi monovalentna in polivalentna cepiva za aktivno imunizacijo. Cepiva vsebujejo prečiščene kapsularne polisaharide serološke skupine A in C (monovalentni cepivi A in C ter bivalentno cepivo A + C) in tudi serološke skupine Y in W135 (polivalentno cepivo A + C + Y + W135). Cepivo dajemo samo v enem odmerku. Zaščita je serotipsko specifična in traja vsaj 3 leta. Zaradi slabe imunogenosti ni učinkovitega cepiva iz kapsularnih polisaharidov serološke skupine B. Vzrok za slabo imunogenost je najverjetneje antigenska podobnost polisaharidov serološke skupine B in oligosaharidov v novorojenčkovem možganskem tkivu (Poljak, 2002).

### **2.2.2 *Streptococcus pneumoniae***

#### 2.2.2.1 Opis bakterije

Bakterija *Streptococcus pneumoniae* je po Gramu pozitiven kok, ki ga v kulturah zasledimo v paru kot diplokok. Bakterije imajo polisaharidno kapsulo, na podlagi katere ločimo več kot 80 kapsularnih tipov. Kapsula varuje bakterijsko celico pred fagocitnimi celicami in opsonizacijo ter omejuje dostop protitelesom do drugih površinskih sestavin. Dobro uspevajo na krvnem agarju, vendar boljše pri povišani koncentraciji CO<sub>2</sub> (5–10 %). Na krvnem agarju delajo pas alfa hemolize in zrastejo kot gladke, svetleče bakterijske kolonije. Pomemben test pri identifikaciji je optohinski test, kajti *S. pneumoniae* z razliko od drugih streptokokov, ne raste v prisotnosti optohina (Ihan, 2002c).

#### 2.2.2.2 Epidemiologija

Bakterija je del normalne mikrobne flore nosno-žrelne sluznice pri približno 20–40 % zdravih otrok in 5–10 % zdravih odraslih (Razonable in Keating, 2004). Najdemo jo tudi v zgornjih dihalih številnih živalskih vrst. V zunanjem okolju hitro propadejo. *S. pneumoniae* je najpogostejši povzročitelj bakterijskih pljučnic (60 %) in drugi najpogostejši povzročitelj bakterijskega gnojnega meningitisa. Za razvoj bolezni je pomembna zmanjšana gostiteljeva odpornost in za širjenje bolezni so pomembnejši zdravi prenašalci kot bolniki. Razširjajo se kapljično in s slino, naseljujejo nosno-žrelno sluznico in bolezen nastane pri masivnem lokalnem ali sistemskem razsoju bakterij, ki ga spremlja vnetje (Ihan, 2002c). Za okužbo so dovzetni predvsem posamezniki z boleznimi dihal,

zastrupljeni z alkoholom ali zdravili ter osebe z okvarjenim imunskim sistemom (Razonabla in Keating, 2004).

### 2.2.2.3 Patogenost bakterije

Glavni virulentni dejavnik pri bakteriji *S. pneumoniae* je kapsula, ki bakterije ščiti pred fagocitozo. Preprečuje opsonizacijo, povezano s komplementom in interakcijo vezanega komplementa z receptorji na fagocitih. Kapsula hkrati omogoča elektrostatski odboj med negativno nabitimi polisaharidi kapsule in fagociti. Preprečuje vezavo krožečih protiteles iz krvi z virulenčnimi beljakovinami celične stene. Ne izločajo eksotoksinov, tvorijo pa znotrajcelični pnevmolizin, ki ovira celično kemotakso, fagocitozo in tvorbo protiteles. Tvorijo tudi hialuronidazo in nevraminidazo. Klinična bolezen nastane zaradi čezmernega razmnoževanja in širjenja bakterij iz nosno-žrelnega prostora v obnosne votline, srednje uho ali pljuča. Mikrobi lahko preidejo tudi v kri in povzročajo sepso in meningitis (Ihan, 2002c). Ne celični površini ima holin vezočo beljakovino CbpA (pomembna za adherenco na celice pljučnega epitela), pnevmokokni površinski protein PspA in površinski adhezin PsaA. Ima tudi številne regulacijske dejavnike. Invazivne okužbe, sepso in meningitis, lahko povzročijo samo sevi s kapsulo, pri nas so najpogostejši serotipi 1, 14, 19 in 23. Bakteriemija nastane večinoma v sklopu pljučnice, 8 % bolnikov z bakteriemijo razvije meningitis. Meningitis lahko nastane tudi z neposrednim širjenjem bakterij iz srednjega ušesa, bradavičnika, obnosnih votlin ali po poškodbi (Müller Premru in Pirš, 2009).

Razonable in Keating (2004) navajata, da je *S. pneumoniae* s 47 % najpogostejši povzročitelj meningitisa. Smrtnost med mladimi in starejšimi je ostala precej visoka kljub uporabi učinkovitih antibiotikov (Hiramatsu in sod., 2004). Zaradi okužb s to bakterijo vsako leto umre več kot milijon otrok, mlajših od 5 let (Fritzell, 2002).

### 2.2.2.4 Zdravljenje in zaščita pred okužbo

Penicilin je vedno prvo izbirno zdravilo za zdravljenje okužb z bakterijo *S. pneumoniae*, vendar so se začeli pojavljati sevi, ki so odporni proti penicilinu. Zato je potrebno izdelati antibiogram in zdraviti na podlagi le tega (Ihan, 2002c). Pogosto se uporabljajo tudi makrolidi. Leta 1967 so opisali prvi sev z zmanjšano občutljivostjo na penicilin. Odpornost *S. pneumoniae* na penicilin in makrolide je hitro postala svetovni problem (Hiramatsu in

sod., 2004). Pnevmonokoki so razvili mehanizem odpornosti za spremembe na genih za penicilin vezoče beljakovine. Tako je bilo pri nas leta 2007 nizko ali visoko odpornih proti penicilinu 17 % invazivnih izolatov *S. pneumoniae*. Delež odpornih izolatov je bil večji pri otrocih kot pri odraslih (Müller Premru in Pirš, 2009).

Pri ljudeh z zmanjšano odpornostjo je najboljši način boja proti okužbi z bakterijo *S. pneumoniae* cepljenje. Na razpolago je pnevmokokno cepivo, ki vsebuje 23 kapsularnih antigenov bakterije (Ihan, 2002c). Müller Premru in Pirš (2009) navajata, da cepivo ne zaščiti proti vsem serotipom in ni dovolj imunogeno pri otrocih, mlajših od dveh let, in pri odraslih, starejših od 60 let.

### **2.2.3 *Haemophilus influenzae***

#### 2.2.3.1 Opis bakterije

*Haemophilus influenzae* je majhen, po Gramu negativen, pleomorfen in negibljiv bacil. Je obvezni znotrajcelični parazit, zlasti na sluznicah pri ljudeh in živalih. Zunaj gostitelja ne preživi, ker se je prilagodil na izrabljanje kompleksnih molekul iz gostiteljevih tkiv. Zato v laboratoriju uspevajo na gojiščih z dodatkom krvi – od tod rodovno ime bakterije. Bacil je leta 1892 odkril R. F. Pfeiffer med pandemijo gripe iz sputuma bolnika (Ihan, 2002a).

Bakterija ne raste na preprostih gojiščih, ker za svojo rast potrebuje faktor X (hemin) in faktor V (NAD = nikotinamid adenin dinukleotid). Kužnino inokuliramo na čokoladni ali krvi agar s stafilokoki (satelitni fenomen) in inkubiramo v 5 do 10 % CO<sub>2</sub>. Na gojišču ob stafilokokni črti zrastejo gladke in prosojne kolonije (Tunkel in Scheld, 2005).

#### 2.2.3.2 Epidemiologija

Epidemiološko so pomembni sevi *H. influenzae* s kapsulo (zlasti kapsularni tip b), ki se širijo kapljično s človeka na človeka. Invazivno okužbo preprečujejo protitelesa, zato je okužba redka v prvih 3 mesecih življenja (materina protitelesa) in po 4. letu starosti, ko večina ljudi že ustvari lastna protitelesa. *H. influenzae* je najpogostejši povzročitelj bakterijskega meningitisa pri otrocih od 6. meseca do 4. leta starosti (Ihan, 2002a). Do leta 2000 je bila omenjena bakterija najpogostejši povzročitelj gnojnega meningitisa pri otrocih

od enega meseca do dveh let. Po uvedbi rutinskega cepljenja proti *H. influenzae* tipa b je pojavnost upadla in po letu 2001 ni več prijav meningitisa, povzročena s *H. influenzae* tipa b pri otrocih do petih let starosti (Kraigher, 2009). Cepivo ne prepreči naselitve mikrobov v žrelu, vendar pa zelo zmanjša pojavljanje meningitisa. Stiki z obolelimi niso nevarni za odrasle, so pa nevarni za necepljene otroke do 4. leta starosti. V tem primeru je priporočljiva profilaksa z antibiotiki (McCormick in Molyneux, 2011).

### 2.2.3.3 Patogenost bakterije

*H. influenzae* je del respiratorne mikrobne flore pri več kot polovici zdravih otrok in približno tretjini zdravih odraslih. Bakterija ne izloča eksotoksinov, poglaviti mehanizem patogenosti je vnetna reakcija na prisotnost bakterij v tkivu. Klinična bolezen nastane zaradi širjenja mikrobov iz nosno-žrelnega prostora v obnosno votline, srednje uho, mehka tkiva ali pljuča. Bakterije se lahko širijo tudi po krvi in skozi možganske pregrade vdrejo v možgane, kjer povzročajo meningitis (Ihan, 2002a).

Leta 1950 je Pittman razrešil vprašanje, zakaj *H. influenzae* kot sicer neškodljiv komenzal občasno povzroča hude bolezni. Odkril je, da imajo nekateri sevi kapsulo, ki ščiti pred fagocitozo in omogoča širjenje bakterij na mesta, kjer potem povzročijo vnetje in bolezen. Velika večina sevov, ki se del respiratorne flore, nima kapsule. Med sevi s kapsulo je s serološkimi metodami mogoče razlikovati 6 kapsularnih tipov (a – f), skoraj vse hude, invazivne infekcije so povezane s kapsularnim tipom b. Pri okužbi najprej pride do kolonizacije epitelija. Bakterije se s proteini pritrdijo na gostiteljske celice. Bakterije vdrejo v nosno sluznico s pomočjo transcitoze. Sevi *H. influenzae*, ki se izognejo komplementnemu sistemu in fagocitozi, se pomnožujejo v krvnem obtoku in povzročajo invazivne bolezni. K patogenosti prispeva tudi polisaharid, ki je komponenta celične stene bakterije. Biološka aktivnost lipopolisaharida je podobna aktivnosti drugih, po Gramu negativnih endotoksinov. Številni proteini zunanje membrane so pomembne komponente patogenosti in imunosti. Pilusi posredujejo povezavo med bakterijami *H. influenzae* tipa b in celicami respiratornega trakta človeka (Schleiss, 2005).

#### 2.2.3.4 Zdravljenje in zaščita pred okužbo

Zdravljenje začnemo z ampicilinom, če *H. influenzae* ne izloča laktamaze beta in s cefalosporini 3. generacije, če bakterija izloča laktamazo beta. Družinski člani bolnika, ki ima meningitis povzročen s *H. influenzae*, naj prejemajo 4 dni rifampcin, če je v družini otrok do 4. leta starosti (Ihan, 2002a). Razvili so cepivo proti okužbam s to bakterijo. Polisaharidi kapsule so vezani na nosilno beljakovino, s tem so dosegli večjo imonogenost in vzbuditev imunskega spomina. Očiščeno kapsularno polisaharidno cepivo učinkovito prepreči meningitis (Pokorn, 2002). Vsa registrirana cepiva so varna, cepimo otroke, stare od 2. meseca do 5. leta, starejše otroke in odrasle pa v primeru oslabiljene imunske odpornosti (Ihan, 2002a).

### 2.3 MIKROBIOLOŠKA DIAGNOSTIKA BAKTERIJSKEGA MENINGITISA

#### 2.3.1 Odvzem in transport kužnin

Osnovna kužnina za mikrobiološko diagnostiko meningitisa je cerebrospinalna tekočina ali likvor. Pomemben je tudi odvzem krvi za hemokulturo, zlasti kadar obstaja sum na sepsu (Poljak, 2002). V likvorju je običajno malo bakterij, zato je potrebno za preiskavo v sterilno stekleničko odvzeti vsaj 1 ml likvorja. Razen epruvete za mikrobiološke preiskave odvezamo likvor še za biokemične preiskave in za določitev števila celic. Likvor je potrebno odvzeti pred uvedbo antibiotičnega zdravljenja. Takoj, najbolje v 15 minutah, ga prenesemo v laboratorij pri temperaturi od 25 do 37 °C. Če ne upoštevamo navedenih transportnih pogojev, bakterije propadejo. Pravilnemu odvzemu likvorja je treba posvetiti več pozornosti, da se izognemo kontaminacijam. Pri sumu na gnojni meningitis odvezamo tudi hemokulture, bris žrela, postržke morebitnih kožnih eflorescenc in druge vzorce. Ponovni pregled likvorja je smiseln le pri bolnikih, ki se jim stanje ne izboljša po 48 urah antibiotičnega zdravljenja (Müller Premru in Pirš, 2009).

### 2.3.2 Postopki v laboratoriju

#### 2.3.2.1 Makroskopski izgled likvorja in neposredna mikroskopska preiskava

V laboratoriju ocenimo makroskopski izgled likvorja (bister, moten, krvav ali rumen) (Müller Premru in Pirš, 2009). Pri gnojnem meningitisu je likvor običajno moten, povečano je število levkocitov (1000-5000/ $\mu$ l, več kot 60-80 % prevlada nevtrofilcev), koncentracija beljakovin je povišana nad 0,45g/l, koncentracija glukoze je znižana pod 2,5nmol/l oziroma je razmerje med koncentracijo glukoze v likvorju in serumu manj kot 0,4 (Thomson, 2007)

Za neposredno mikroskopsko preiskavo pripravimo neposredni gramski razmaz in razmaz pobarvan z akridin oranžem. S pipetiranjem naneseemo 1-2 kapljici likvorja na sterilna objektna stekelca, naredimo razmaz, ga pobarvamo in fiksiramo (Müller Premru in Pirš, 2009). Občutljivost neposrednega gramskega razmaza je od 60 do 95 %, specifičnost več kot 97 %. Pozitiven izvid je odvisen od števila bakterij v likvorju in od vrste povzročitelja. Pri  $< 10^3$  CFU/ml likvorja je rezultat pozitiven v 25 %, medtem ko je pri  $> 10^5$  CFU/ml pozitivnih več kot 97 % razmazov. Preiskava je najbolj občutljiva, kadar je povzročitelj *S. pneumoniae* (90 %), sledi *H. influenzae* (86 %) in *N. meningitidis* (75 %) (Tunkel in Scheld, 2005).

#### 2.3.2.2 Klasična metoda diagnostike

Osamitev bakterij *N. meningitidis*, *H. influenzae* in *S. pneumoniae* iz vzorcev likvorja je najpogostejša metoda dokazovanja v laboratorijski diagnostiki. Za osamitev povzročiteljev likvor cepimo v komori za sterilno delo v tioglikolatni bujon, na krvni agar s stafilokokno črto in na čokoladni agar. Gojišča inkubiramo v termostatu z zvišano koncentracijo CO<sub>2</sub> (od 5 do 10 %). Priporočena inkubacija je 4 dni. Občutljivost kulture je približno 85 % pri bolnikih, ki še niso prejeli antibiotika, pri ostalih pa manj. Podatki o rasti in o neposredni občutljivosti na antibiotike so na voljo v 24 urah. Iz likvorja identificiramo vse mikroorganizme do vrste (Fuglsang-Damgaard in sod., 2008).

Gladke, alfa-hemolitične kolonije po gramu pozitivnih kokov na krvnem agarju opredelimo kot streptokoke s katalazno reakcijo ali z mikroskopskim preparatom.

Pomemben test za identifikacijo *S. pneumoniae* je optohinski test, kajti pnevmokoki v nasprotju z drugimi streptokoki ne rastejo v navzočnosti optohina (Ihan, 2002c).

Kužnino za dokaz *N. meningitidis* gojimo na čokoladnem ali krvnem agarju pri 37 °C in v atmosferi s 5–10 % CO<sub>2</sub>. Metoda kultivacije je pogosto negativna, še posebno pri bolnikih, ki jim je bila uvedena antibiotična terapija pred odvzemom kužnine (Kesanopoulos in sod., 2005). V gramskem razmazu likvorja pričakujemo veliko število po Gramu negativnih diplokokov. Vse vrste rodu *Neisseria* izdelujejo katalazo in oksidazo (Poljak, 2002). Identifikacija temelji na biokemičnih lastnostih bakterije *N. meningitidis*, ki jih izvedemo s testom Api-NH (BioMerieux, Francija) (Cvitković Špik, 2008).

*H. influenzae* potrebuje za svojo rast faktor X in faktor V. Bakterija raste na čokoladnem ali krvnem agarju s stafilokoki ob dodatku 5–10 % CO<sub>2</sub>. Gladke, prosojne kolonije opredelimo kot *H. influenzae* (Ihan, 2002a). Bakterija ima encima katalazo in oksidazo, identifikacijo pa potrdimo z biokemičnimi lastnostmi, jih izvedemo s testom Api-NH (BioMerieux, Francija) (Cvitković Špik, 2008).



Slika 2: Satelitni fenomen – rast *Haemophilus influenzae* ob stafilokokni črti (Hogan, 2009)

### 2.3.2.3 Molekularne preiskave

Dokazovanje in identifikacija bakterij z molekularnimi metodami predstavlja obetavno diagnostično metodo za opredeljevanje povzročiteljev okužb osrednjega živčevja. Smernice Infectious Diseases Society of Amerika (IDSA) za zdravljenje bakterijskega meningitisa iz leta 2004 prav tako omenjajo PCR kot dopolnilno metodo, zlasti v primeru negativnega gramskega razmaza pri bolniku s klinično diagnozo gnojnega meningitisa (Tunkel in sod., 2004). Kesanopoulos in sod. (2005) navajajo, da je PCR v realnem času



občutljivejša in hitrejša metoda od osamitve bakterij in neposredne mikroskopije ter dokaže povzročitelja tudi v primerih, ko je kultura negativna. Klasična diagnostika je dolgotrajna metoda, ki velikokrat daje nejasne rezultate. Hiter dokaz povzročitelja pa je pogoj za uspešno terapijo in zgodnjo postavitve diagnoze (Tunkel in sod., 2004).

Za hitro diagnostiko bakterijskih okužb osrednjega živčevja je primeren specifični PCR za glavne povzročitelje gnojnega meningitisa. Specifični PCR se izvaja z uporabo visoko specifičnih začetnih oligonukleotidov za izbrane povzročitelje (Deutch in sod., 2007). V vseh primerih gre za nestandardizirane metode, poleg tega pa se za posamezne bakterije uporablja različne začetne oligonukleotide (Chiba in sod., 2009). Za dokaz prisotnosti *S. pneumoniae* se večinoma dokazuje prisotnost gena za pnevmolizin (*ply*) ali gena, ki kodira avtolizin (*lytA*). Za *N. meningitidis* pa se dokazuje predvsem prisotnost genov za proteine zunanje membrane (*nspA*, *crtA*, *porA*). Prednost specifičnega PCR je hitrost dokazovanja specifičnega povzročitelja (2 do 3 ure po prejemu vzorca v laboratorij), kar prispeva k boljši obravnavi bolnika. S specifičnim PCR nebi dokazali vseh povzročiteljev, zato bi bilo potrebno pri bolnišničnih bolnikih, kadar povzročitelja ne izoliramo, potrebno pomnoževanje konzervativnega dela gena za 16S podenoto ribosomske RNA (Müller Premru in Pirš, 2009).

Z drugo metodo, pri kateri pomnožujemo konzervativni del gena za 16S podenoto ribosomske RNA (t.i. broad-range PCR) in izvedemo analizo sekvence, lahko identificiramo večino bakterijskih vrst, vendar je ta metoda relativno počasna, odvisno od metode sekveniranja. Tako identificiramo večino vrst, vendar s tovrstno preiskavo zajamemo tudi kontaminante. Dodatna pomanjkljivost te metode je tudi nizka občutljivost in višja cena preiskave (Chiba in sod., 2009).

## 2.4 IZOLACIJA BAKTERIJSKE DNA

### 2.4.1 Avtomatska izolacija

Ročne metode izolacije molekule DNA so pogosto dolgotrajne, zahtevajo veliko ročnega dela in aktivno udeležbo laboratorijskega osebja. Postopek izolacije molekule DNA je zelo

občutljiv in je možnost kontaminacije velika. Zato so razvili aparaturu, ki omogoča popolnoma avtomatizirano izolacijo nukleinskih kislin in zaradi zaprtosti sistema zmanjša možnost kontaminacij.

Aparatura MagNa Pure Compact System (Roche, Nemčija) omogoča izjemno hitro, enostavno in popolnoma avtomatizirano izolacijo celotne DNA in RNA iz različnih vzorcev, tudi iz likvorja. Princip izolacije molekule DNA z avtomatsko aparaturu MagNa Pure Compact System temelji na selektivni adsorpciji DNA na steklene kroglice, pri čemer uporabljamo komplet MagNa Pure Compact Nucleid Acid Isolation Kit I (Roche, Nemčija). Homogenizacija mikroorganizmov in stabilizacija molekule DNA je klasična. Vzorcju najprej dodamo MagNa Pure Bacterial Lysis Buffer (Roche, Nemčija) in proteinazo K (Roche, Nemčija) ter inkubiramo pri temperaturi 65 °C, nadaljni postopek izvedemo po navodilih proizvajalca (Roche, 2011a). Izolirana molekula DNA se lahko nato pomnoži v aparaturi LightCycler (Roche, Nemčija).



Slika 3: Aparatura MagNa Pure Compact Instrument (Roche, 2011a)

Sistem MagNa Pure Compact Instrument je razdeljen v posamezna delavna področja. Na začetku postopka izolacije aparatura vzorcju doda določeno količino raztopine pufra in vanj prenese magnetne kroglice. Suspenzijo meša, inkubira in izvede magnetno ločevanje ter tako omogoči, da se DNA veže na silikonsko površino magnetnih kroglic. Z dodatkom pufrov odstrani nevezane substance, kot so proteini, celične membrane in zaviralci PCR reakcije. Pri povišani temperaturi ob dodatku elucijskega pufra sprosti očiščeno molekulo DNA, ki jo prenese v elucijske epruvete in jo tam shrani (Roche, 2011a). Čisto molekulo

DNA se lahko takoj uporabi ali pa se shrani v zamrzovalnik pri  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Izolacija DNA iz do osmih vzorcev je končana v 28 minutah.

## 2.5 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času temelji na metodi verižne reakcije s polimerazo (PCR), ki jo je razvil Kery Mullis v osemdesetih letih prejšnjega stoletja. Specifični del DNA lahko pomnožimo z DNA polimerazo ter specifičnimi začetnimi oligonukleotidi, naredimo lahko več kot milijardo kopij. DNA polimerazi, ki se običajno uporabljata sta termostabilna encima polimerazi DNA *Taq* in *Pfu* (Valasek in Repa, 2005).

PCR reakcijo in PCR v realnem času sestavljajo trije glavni koraki, ki običajno potekajo v 40 ciklih (Invitrogen, 2008). 1. denaturacija, kjer razklenemo dvoverižno DNA v dve verigi s povišanjem temperature na  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 2. prileganje začetnih oligonukleotidov, kjer reakcijsko zmes ohladimo, da se začetni oligonukleotidi lahko vežejo na enoverižno matrico. Temperatura prileganja je  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  nižja od temperature taljenja začetnih oligonukleotidov ( $T_m$ ); 3. podaljševanje, kjer DNA polimeraza sintetizira novo verigo in nastane dvoverižna DNA. Aktivnost DNA polimeraze je pri  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  optimalna. Hitrost nastajanja nove verige je 100 baznih parov na sekundo.

V vsakem ciklu imamo teoretično dvakrat več produkta kot v predhodnem ciklu. V realnosti to ne drži, ker se po nekaj ciklih med reakcijo reagenti porabijo in reakcija doseže plato. Z metodo PCR v realnem času merimo produkt v eksponentni fazi, ko je pomnoževanje DNA še učinkovito. Pomnoženo količino DNA merimo v vsakem ciklu s pomočjo fluorescenčnih barvil (Valasek in Repa, 2005). Metoda PCR v realnem času tako združuje podvajanje DNA in detekcijo pomnoženih produktov, zato za detekcijo produkta ni več potrebna gelska elektroforeza.

### 2.5.1 Sistem LightCycler

LightCycler (Roche, Nemčija) je sistem za kvalitativni in kvantitativni PCR. Osnovni namen sistema je skrajšati čas pridobivanja produktov PCR in njihovo analizo. Kombinira fluorescentno tehnologijo z izredno hitrim menjavanjem toplote. Sistem LightCycler je

prvi sistem, ki uporabniku omogoča analizo v realnem času in je uporaben za diagnostiko povzročiteljev infekcijskih bolezni. Kvantifikacija dobljenih rezultatov je natančnejša, ker sistem omogoča vpogled v posamezne stopnje PCR. Za celotno izvedbo protokola na aparaturi LightCycler je potrebno 30-40 minut. Naenkrat lahko z aparaturo LightCycler analiziramo do 32 vzorcev. Kapilare so postavljene v vložek, ki deluje kot zaprt kapilarni sistem (Deutch in sod., 2007). Tako se zmanjša možnost lažno pozitivnih rezultatov in kontaminacij s pridelki PCR predhodnih reakcij.

LightCycler je zaprt sistem, v katerem potekajo vse stopnje PCR reakcije – denaturacija dvovertične DNA, vezava začetnih oligonukleotidov, podaljševanje verige in analiza rezultatov na podlagi oddane fluorescence. Pri vseh stopnjah je temperatura ključni dejavnik. Sistem je zasnovan tako, da omogoča hitro spreminjanje temperature s segretim in ohlajenim zrakom. Opisani postopek je mnogo hitrejši od termalnih blokov pri klasičnem PCR, saj zrak skoraj nima mase in sistemu omogoči segrevanje do 20 °C/sekundo. Reakcija PCR v realnem času se izvaja v posebno oblikovanih kapilarah, v katere lahko damo 20 µl vzorca. Kapilare imajo veliko razmerje med površino in prostornino, kar omogoča vzpostavitev ravnotežja med zrakom in vzorcem. Opisani lastnosti določata dolžino cikla PCR, ki traja 30 sekund, celoten postopek 30-40 ciklov pa traja od 20 do 30 minut (Roche, 2011b).

Količina pridelkov PCR se meri na podlagi oddane fluorescence, kjer je intenziteta signala premo-sorazmerna s količino pridelka PCR. Optične lastnosti kapilar so optimalno prilagojene merjenju fluorescence. Aparatura meri fluorescenco enkrat v vsakem ciklu PCR, kar omogoča nadzor celotnega poteka reakcije in vmesni pogled rezultatov.

## **2.5.2 Metode zaznavanja pomnoženih produktov pri RT-PCR**

### **2.5.2.1 Nespecifične metode zaznavanja pomnoženih produktov**

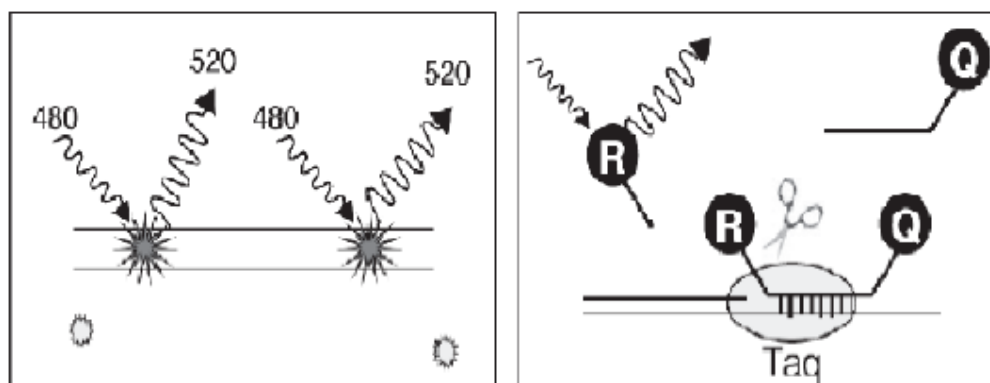
Interkalirajoča barvila so najbolj običajna metoda za detekcijo pomnožene DNA. Absorbirajo svetlobo nižje valovne dolžine in oddajajo svetlobo višje valovne dolžine. Njihova fluorescenca se močno poveča pri vezavi na dvovijačno DNA (dsDNA). Intenziteta signala je odvisna od prisotne količine dsDNA, več kot jo je, večja je fluorescenca. Metoda s fluorescentnimi barvili je nespecifična, ker se barvilo veže na

dsDNA neodvisno od nukleotidnega zaporedja produkta (Invitrogen, 2008). Na začetku se je uporabljal etidijev bromid, vendar ga je kmalu zamenjalo barvilo SYBR green I, ker ima večjo afiniteto do dsDNA. SYBR green I se veže na mali jarek DNA in oddaja tisočkrat večjo fluorescenco kot v raztopini. Večjo specifičnost metode se zagotovi z analizo disociacijske krivulje pomnoženega produkta in določitvijo tališč produkta. V primeru več tališč produkta, pomnoževanje ni bilo specifično in pri reakciji se je pomnoževalo več amplikonov (Valasek in Repa, 2004). Prednost nespecifične metode je enostavnost načrtovanja sond in poskusa. Razen dragih aparatov so materialni stroški nizki.

Z uporabo fluorescentnega barvila SYBR green I je specifičnost metode veliko manjša kot pri specifičnih metodah, saj zaznamo tudi dimere oligonukleotidnih začetnikov in nespecifične produkte (Arko, 2004).

#### 2.5.2.2 Specifične metode zaznavanja pomnoženih produktov

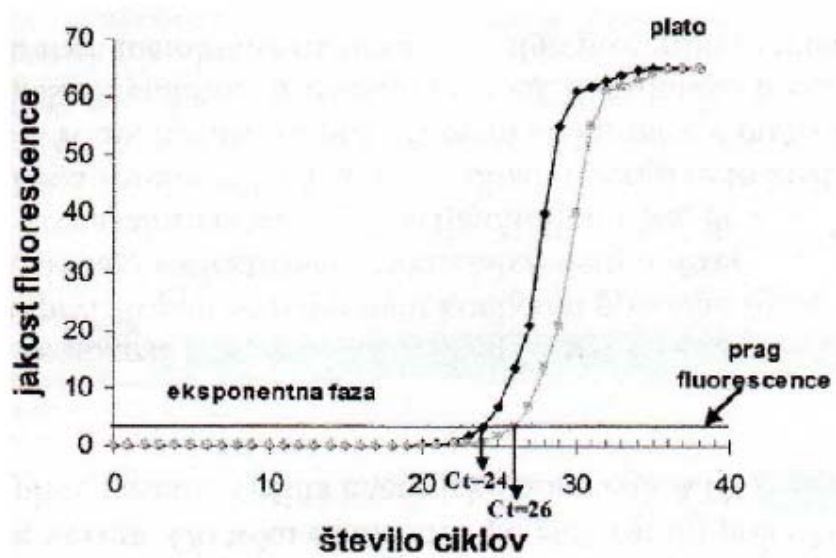
Pri specifičnih metodah zaznavanja imamo poleg dveh začetnih oligonukleotidov v reakciji še sondo, ki se komplementarno veže s tarčnim zaporedjem med oba začetna oligonukleotida. Sonde so specifične za določeno zaporedje in imajo 5' in 3' konca označena s fluorescentnima barviloma. Na enem koncu ima sonda poročevalec (ang. reporter), na drugem pa dušilec (ang. quencher). Ob vezavi sonde na tarčno zaporedje sta fluorescentni barvili blizu skupaj in dušilec lahko absorbira poročevalski signal. Pojav imenujemo prenos fluorescentne resonančne energije (FRET, ang. fluorescence resonance energy). Energija se prenese od donorskega (poročevalec) k akceptorskemu (dušilec) fluoroforu (Valasek in Repa, 2005). Vzbujena akceptorska označena molekula oddaja svetlobo pri daljši valovni dolžini kot nevezana donorska molekula in intenziteta svetlobe, ki jo akceptorska molekula oddaja, je sorazmerna količini tarčne DNA, nastale med reakcijo PCR (Arko, 2004). Med podaljševanjem verige polimeraza DNA z nukleazno aktivnostjo 5' hidrolizira sondo. Barvili sta nato v raztopini dovolj oddaljeni, da dušilec ne absorbira elektromagnetnega valovanja poročevalca. Poročevalski signal lahko tako z detektorji zaznamo in izmerimo. Natančnost metode s hibridiziranimi sondami (npr. TaqMan) in SYBR green I metode je podobna, prva metoda pa je bistveno bolj specifična saj izmerimo samo količino produkta sekvenčno specifičnega podvojevanja (Valasek in Repa, 2005).



Slika 4: Princip delovanja SYBR green I (slika levo) in TaqMan sonde (slika desno) pri metodi PCR v realnem času (Valasek in Repa, 2005: 153)

### 2.5.2.3 Analiza podatkov pri RT-PCR

V analizah rezultatov, pridobljenih s PCR v realnem času, pozitivno reakcijo detektiramo s kopičenjem fluorescenčnega signala. Prag je količina signala, ki kaže na statistično značilno povečanje signala glede na signal bazne linije. Običajno ga instrumenti redno nastavijo na vrednost, ki je desetkrat večja od standardne deviacije vrednosti fluorescence v bazni liniji. Lahko pa je nastavljena ročno na poljubno vrednost. Fluorescenčni prag (ang. treshold cycle,  $C_t$ ) je cikel, pri katerem fluorescenca doseže nastavljeni prag. Vrednost  $C_t$  je obratno-sorazmerna začetni količini DNA. To pomeni, da nižja kot je vrednost  $C_t$ , več nukleinske kisline je v vzorcu (slika 5). Pri 40 ciklih pomnoževanja vrednosti  $C_t$ , ki so manjše od 29 pomenijo močno pozitivno reakcijo z veliko prisotne tarčne nukleinske kisline; vrednosti med 30 in 35 pomenijo pozitivno reakcijo z zmerno količino tarčne nukleinske kisline; medtem ko vrednosti med 35 in 40 pomenijo šibko reakcijo, ki lahko nakazuje zelo nizko količino tarčne nukleinske kisline ali celo kontaminiran vzorec (Invitrogen, 2008).



Slika 5: Graf pomnoževanja tarčnega zaporedja z metodo PCR v realnem času (Arko, 2004: 217)

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Vzorci

V raziskavo smo vključili 87 vzorcev likvorja bolnikov iz različnih klinik, ki so bili poslani v diagnostiko na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Vzorci so bili odvzeti 66 različnim bolnikom, nekaterim je bil likvor odvzet večkrat v času zbiranja vzorcev. Bolnikom je bil likvor odvzet ob sumu na bakterijski gnojni meningitis ali zaradi preventivnega odvzema, predvsem pri bolnikih z zmanjšano imunsko odpornostjo. Ob odvzemu likvorja je 23 bolnikov že dobivalo antibiotike. Vzorce smo zbirali od februarja 2010 do septembra 2010 in jih diagnosticirali s klasično metodo kultivacije in molekularnima metodama PCR realnem času. »In house« metoda je bila izvedena na aparaturi LightCycler, s katero smo dokazovali *S. pneumoniae* in *N. meningitidis*, z uporabo začetnih oligonukleotidov, komercialna metoda PCR v realnem času pa na aparaturi StepOnePlus z uporabo komercialnega kita EuSepScreen, ki pomnožuje gene bakterij *N. meningitidis*, *H. influenzae* in *S. pneumoniae*.

Vsi vzorci so bili takoj po sprejemu v Sprejemni sobi Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo preneseni v laboratorij, kjer smo en del vzorca zasejali na gojišča in kultivirali, drugi del pa shranili v skrinji (-70 °C) do izolacije DNA in molekularne diagnostike.

##### 3.1.2 Laboratorijska drobna oprema in aparature

- Pipete v merilnem območju 2-20 µl, 10-100 µl in 50-200 µl (Eppendorf, Nemčija)
- Nastavki za pipete
- Odlagalna posoda
- Mikroskop Nikon E600
- Varnostna komora 2. stopnje (Iskra pio)



- Inkubator za bakterijske kulture, aerobni in CO<sub>2</sub>
- Komercialni test APiNH (BioMerieux, Francija)
- Mešalo vorteks
- Centrifuga (Eppendorf, Nemčija)
- Eppendorfove epruvice
- Aparatura za avtomatsko izolacijo DNA MagNa Pure Compact System (Roche, Nemčija)
- Kapilare volumna 20 µl (Roche Nemčija)
- Aparatura za RT-PCR, LightCycler (Roche, Nemčija)
- StepOnePlus™ aparatura za izvedbo RT-PCR (Applied Biosystem, Kalifornija, ZDA)

Za delo s tako patogenimi bakterijami kot so *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* in *H. influenzae* se je potrebno zavedati tudi varnostnega vidika dela v laboratoriju. Zato smo pri delu uporabili vso zaščitno opremo: zaščitno haljo, rokavice, očala in masko z elastiko. Delo je bilo izvedeno v komori 2. stopnje za varno izvedbo dela, po končanem delu pa smo tudi vse uporabljene površine temeljito razkužili s 70 % etanolom. Odpadke, ki so bili v stiku s kužninami smo odlagali v zato namenjene odlagalnike, ki so bili kasneje avtoklavirani.

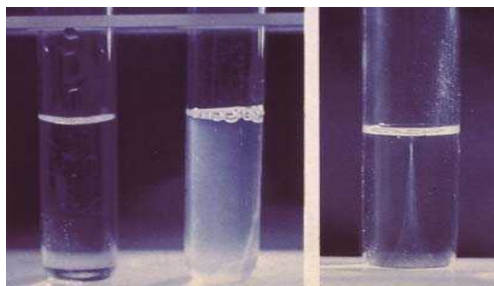
## 3.2 METODE

### 3.2.1. Mikroskopski preparat in klasična metoda kultivacije

#### 3.2.1.1. Neposredni mikroskopski preparat pobarvan po Gramu

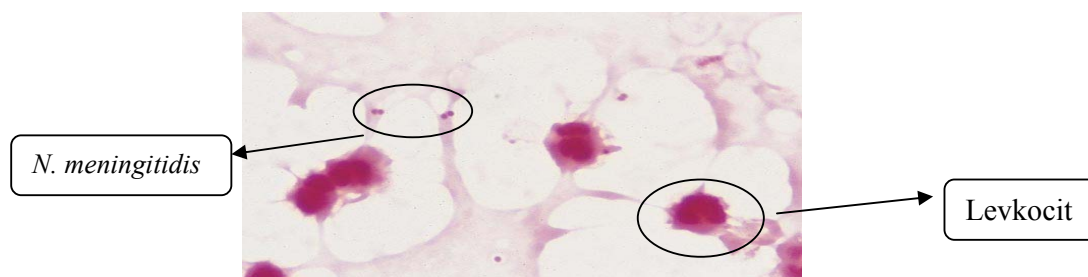
Mikrobiološka preiskava likvorja na bakterije je nujna preiskava. Po prejemu vzorca likvorja v laboratorij, smo ocenili njegov videz in količino, kajti v preiskavo naj bi dobili

vsaj 1 ml likvorja v sterilni epruveti z navojem. Pri gnojnem meningitisu je običajno likvor moten, ker je v njem poleg bakterij veliko levkocitov (slika 6). Iz vzorca smo naredili neposredni mikroskopski preparat, ga fiksirali z metanolom ter ga pobarvali po Gramu. Preparat smo naredili tako, da smo na objektno stekelce z označenim centrom, ki smo ga s pinceto vzeli iz kadičke z etanolom in ga obžgali v plamenu – nanесли eno kapljico likvorja, ga posušili na grelcu pri 60 °C in fiksirali z 100 % metanolom ter obarvali po Gramu. Mikroskopirali smo s svetlobnim mikroskopom Nikon E600, z imerzijskim objektivom s 1000-kratno povečavo. Značilnosti mikroskopskega preparata (morfologija in razporeditev ter obarvanost bakterij) so nam podale začetno orientacijo o vrsti povzročitelja.

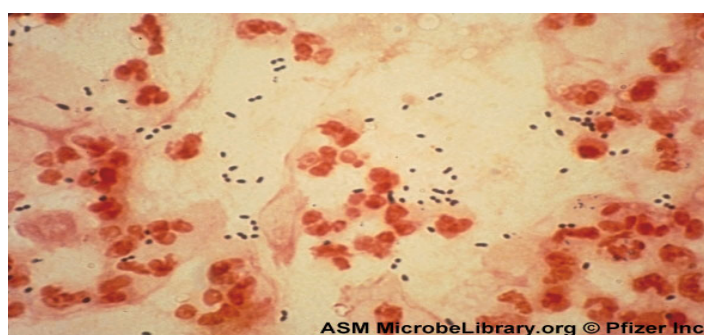


Slika 6: Moten likvor pri gnojnem meningitisu (srednja epruveta)

Najpogostejši povzročitelji gnojenega meningitisa so piogene bakterije *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* in *H. influenzae*. Bakterije *N. meningitidis* so po Gramu negativni koki, ki se praviloma urejajo v pare (diplokokci) in spominjajo na kavino zrno. Lahko se uredijo tudi v tetrade ali manjše skupke (Poljak, 2002) (slika 7). Bakterije *S. pneumoniae* so po Gramu pozitivni koki, ki so v kulturah večinoma kot kapsulirani diplokokci, v kužninah tudi kot posamezni koki ali kratke verižice (Ihan, 2002c) (slika 8). *H. influenzae* so majhni, pleomorfni in po Gramu negativni bacili (Ihan, 2002a) (slika 8).



Slika 7: *Neisseria meningitidis* v mikroskopskem preparatu likvorja obarvanem po Gramu (vidni so tudi levkociti).



Slika 8: *Streptococcus pneumoniae* v kužnini likvorja (Buxton, 2007).

### 3.2.1.2 Gojišča in pogoji inkubacije

Prejeti likvor smo inokulirali v tekoča gojišča (Tioglikolatni in Tarozzi bujon) in na trdna gojišča (krvni, čokoladni in Schaedler agar) kot prikazuje preglednica 3.

Preglednica 3: Gojišča, inokulacija, pogoji in trajanje inkubacije likvorja (Mueller-Premru, 2008: 4)

Standardna gojišča	Količina inokulirane kužnine	Inkubacija		Trajanje inkubacije (dni)
		T (°C)	Atmosfera	
Tioglikolatni bujon	vsaj 2 kapljici	35-37	Aerobna	4
Tarozzi bujon	vsaj 2 kapljici	35-37	Aerobna	4
Krvni agar*	vsaj 2 kapljici	35-37	Aerobna	4
Čokoladni agar	vsaj 2 kapljici	35-37	5 – 10 % CO <sub>2</sub>	4
Schaedler agar	vsaj 2 kapljici	35-37	Anaerobna	2

\*Na krvni agar po inokulaciji likvorja zasejemo kulturo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (stafilokokna črta) za ugotavljanje satelitnega fenomena.

### 3.2.1.3 Identifikacija bakterijskih kultur

Pri pozitivnih likvorjih smo po 24 urni inkubaciji kulture na gojiščih identificirali do nivoja vrste, da bi ugotovili povzročitelja meningitisa. Identifikacijo smo usmerili na vrste bakterij, ki so najpogostejše povzročiteljice gnojnega meningitisa: *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* in *H. influenzae*.

Prvo informacijo pri identifikaciji nam je podal gramski razmaz, ki je prikazal morfologijo in obarvanost bakterij. Značilna rast in prisotnost hemolize na inokuliranih gojiščih sta naslednja koraka identifikacije. Kulturam smo določili prisotnost encimov katalaze in oksidaze, nato pa smo naredili še nadaljnje teste za identifikacijo vrste, in sicer optohinski test za dokaz *S. pneumoniae* in komercialni test Api NH (BioMerieux, Francija) za dokaz *N. meningitidis* in *H. influenzae*.

V tabeli 4 so navedeni identifikacijski kriteriji in pričakovani rezultati za najpogostejše bakterijske povzročitelje gnojnega meningitisa.

Tabela 4: Identifikacijski kriteriji za najpogostejše bakterijske povzročitelje gnojnega meningitisa.

	<i>N. meningitidis</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>H. influenzae</i>
Gram	Po Gramu negativni diplokokki	Po Gramu pozitivni diplokokki	Po Gramu negativni, pleomorfni bacili
Rast na krvnem agarju	Sivkaste, svetleče, rahlo izbočene kolonije	Gladke, drobne kolonije	Prosojne kolonije; rast ob <i>Staphylococcus aureus</i>
Hemoliza na krvnem agarju	Nima hemolize	Alfa hemoliza	Nima hemolize
Test oksidaze	Pozitivno	Negativno	Pozitivno
Test katalaze	Pozitivno	Negativno	Pozitivno
Specifični testi	Komercialni test Api NH	Pozitiven optohinski test	Komercialni test Api NH

Identifikacijski testi:

#### Hemoliza na krvnem agarju

Z izrazom hemoliza označujemo lizo živalskih eritrocitov, ki so prisotni v krvnem agarju, z ekstracelularnimi hemolizini, ki jih producirajo nekatere bakterijske vrste. Prisotnost

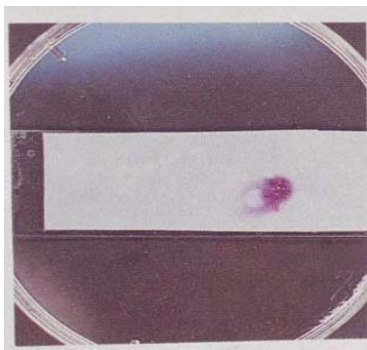
hemolizinov ugotavljamo tako, da kulturo nacepimo na ploščo krvnega agarja in inkubiramo na 35–37 °C. Po inkubaciji opazujemo cone lize okrog kolonij. Ločimo tri tipe hemolize: alfa, beta in gama hemoliza. Alfa hemolizo, nepopolno uničenje eritrocitov, opazimo kot zelenkasto rjavo območje okrog kolonij. Beta hemolizo, popolno lizo eritrocitov, opazimo kot območje zbistritve okrog kolonij. Če hemolize ni in gojišče okoli kolonij ostane nespremenjeno, to označimo kot gama hemolizo. *S. pneumoniae* ima alfa hemolizo (slika 9), *N. meningitidis* in *H. influenzae* pa nimata hemolize (gama hemoliza).



Slika 9: Alfa hemoliza bakterije *Streptococcus pneumoniae* na krvnem agarju (Buxton, 2005).

### Test določanja oksidaze

S tem testom določamo prisotnost oz. odsotnost aktivnosti citokrom c oksidaze pri bakterijah in nam je v pomoč pri identifikaciji. Aktivnost je odvisna od prisotnosti intracelularnega citokrom oksidaznega sistema, ki katalizira oksidacijo citokroma c z molekularnim kisikom, ki služi kot terminalni akceptor elektronov. Pri testu uporabljamo oksidazni reagent (tetrametil-p-fenilendiamin-dihidroklorid), ki je v reducirani obliki brezbarven, v oksidirani obliki pa vijolične barve (Križan – Hergouth, 2008). Test izvedemo tako, da na sterilno objektno stekelce naneseemo filter papir, nanj 1-2 kapljici brezbarvnega oksidaznega reagenta in nato s plastično cepilno zanko (pri kovinskih zankah lahko pride do lažno pozitivnega rezultata) bakterijsko kulturo. Opazujemo spremembo barve v vijolično (slika 10), rezultat odčitamo po 10 do 30 sekundah. Od iskanih bakterij imata oksidazo *N. meningitidis* in *H. influenzae*.



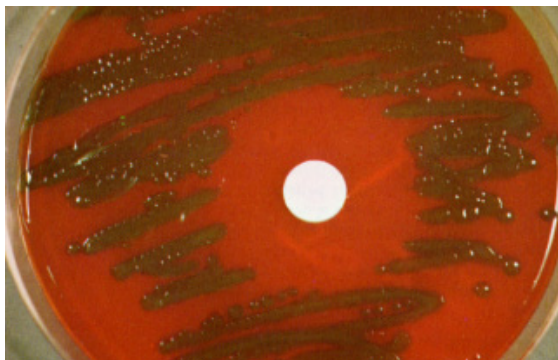
Slika 10: Pozitiven oksidazni test

### Test določanja katalaze

Katalaza je encim, ki ga sintetizirajo nekatere bakterije, in hidrolizira vodikov peroksid v vodo in kisik, kar opazimo kot nastajanje mehurčkov. Za izvedbo testa potrebujemo 1 kapljico 3 % vodikovega peroksida ( $H_2O_2$ ), ki ga naneseemo na objektno stekelce s kulturo. V primeru prisotnosti encima katalaze pride do sproščanja mehurčkov. Bakteriji *N. meningitidis* in *H. influenzae* imata katalazo, *S. pneumoniae* katalaze nima.

### Optohinski test

Optohinski test uporabljamo za ločevanje *S. pneumoniae*, ki je za optohin (etilhidrokuprein hidroklorid) občutljiv, od ostalih alfa hemolitičnih streptokokov. S tem testom testiramo stabilnost membrane bakterijske celice, *S. pneumoniae* je v prisotnosti optohina podvržen lizi zaradi sprememb v površinski napetosti. Test izvedemo tako, da sev alfa hemolitičnega streptokoka inokuliramo na krvni agar in na sredino gostega nanosa položimo optohinski disk 5g (Oxoid), kulturo inkubiramo 18–24 ur na 35 °C v 5 %  $CO_2$  in nato izmerimo cono inhibicije. Če je cona inhibicije večja od 5 mm od roba diska, je testirani sev *S. pneumoniae*.



Slika 11: Alfa hemoliza na krvnem agarju in občutljivost *Streptococcus pneumoniae* na optohin (Todar, 2011).

### Komercialni test Api NH

Test Api NH (slika 12) uporabljamo za identifikacijo bakterij iz rodov *Neisseria* in *Haemophilus*, identifikacija temelji na osnovi njihovih biokemičnih lastnosti. V testu uporabljamo testne ploščice z 10 vdolbinicami, ki vsebujejo dehidrirane testne substrate, kamor inokuliramo bakterijsko kulturo. Testi si sledijo v naslednjem vrstnem redu: detekcija penicilinaze, fermentacija glukoze, fruktoze, maltoze in saharoze ter encimske reakcije ureaza, lipaza, alkalna fosfataza in beta galaktozidaza. V prvih 7 vdolbinic prenesemo po 50 µl bakterijske kulture in dodamo približno 100 µl mineralnega olja, v zadnje 3 vdolbinice pa približno po 150 µl bakterijske suspenzije. Pri izvedbi testa je pomembno, da pripravimo homogeno bakterijsko suspenzijo gostote 4 McFarland standarda. Ploščice inkubiramo 2 uri na 37 °C pri aerobnih pogojih in nato rezultate posameznih testov – spremembo barve substratov – sladkorjev in aminokislin, nekaterih brez, drugih z dodatkom indikatorja vrednotimo s pomočjo identifikacijske baze podatkov. V vdolbinici 8 in 9 damo 1 kapljo ZYM B reagenta in v vdolbinico 10 1 kapljo JAMES reagenta. ApiNH je namenjen izključno identifikaciji bakterijskih vrst iz rodov *Neisseria*, *Haemophilus* in *Moraxella catarrhalis*.



Slika 12: Test Api NH za identifikacijo bakterij iz rodov *Neisseria*, *Haemophilus* in *Moraxella* (BioMerieux, 2011)

### 3.2.2 Avtomatska izolacija bakterijske DNA

Pri avtomatski izolaciji bakterijske DNA iz vzorcev likvorja smo uporabili komplet MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I in aparaturo MagNA Pure Compact Instrument (Roche, Nemčija). Izolacija nukleinskih kislin poteka s pomočjo magnetnih delcev v kombinaciji z ustreznimi pufri, ki omogočajo hitro in učinkovito izolacijo nukleinske kisline neposredno iz celic. Tako dobimo ustrezno izolirano nukleinsko kislino, ki se med izolacijo imobilizira na površino steklenih magnetnih kroglic. Komplet vsebuje tri vrste pufrov za spiranje nevezanih delcev, kot so odstranjevalci soli, proteini in inhibitorji reakcije PCR. Nukleinska kislina se po izolaciji izpere s steklenih magnetnih kroglic. Postopek izolacije DNA z avtomatskim procesorjem MagNA Pure Compact Instrument je bolj natančno podan na sliki 13 in v tabeli 5.

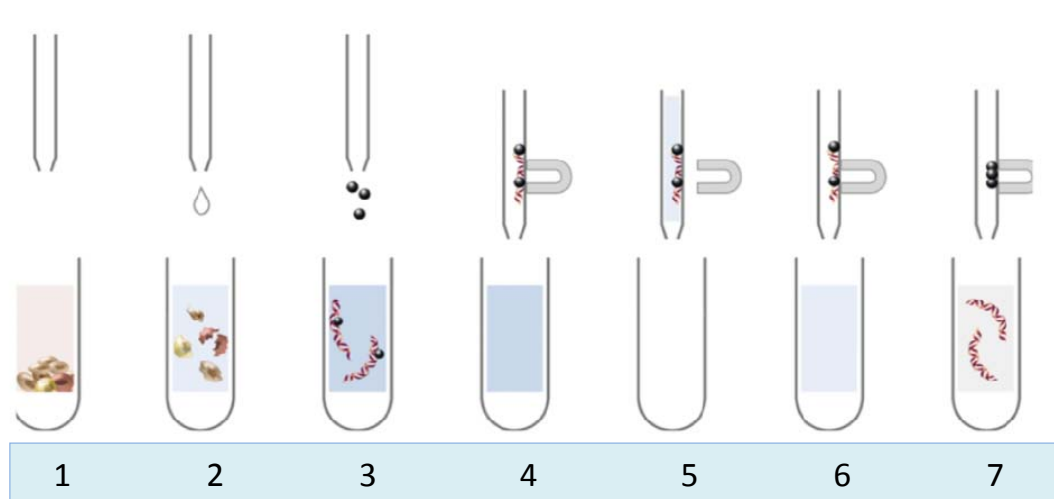
#### 3.2.2.1 Priprava vzorca

Vzorec za avtomatsko izolacijo DNA smo pripravili tako, da smo odpipetirali 300  $\mu$ l likvorja in dodali 180  $\mu$ l MagNA Pure Bacterial Lysis Buffer (BLB, Roche, Nemčija). Vse skupaj smo premešali in dodali 20  $\mu$ l proteinaze K (Roche, Nemčija), ki je omogočila razgradnjo proteinov. Nastalo mešanico smo inkubirali 10 minut na 65 °C in nato 10 minut na 95 °C. Po inkubaciji smo mešanico ohladili in 410  $\mu$ l mešanice prenesli v aparaturo MagNA Pure Compact Instrument.

#### 3.2.2.2 Izolacija z aparaturo MagNA Pure Compact Instrument

Aparaturo MagNA Pure Compact Instrument smo vključili in v tubico za vzorec odpipetirali 410  $\mu$ l liziranega vzorca. V aparaturo smo vstavili nastavke za pipetiranje, kartuše, ki smo jih močno pretresli, da so se magnetni delci homogenizirali in stajali z elucijskimi epruvetkami. Izbrali smo ustrezen protokol »DNA\_Bacterial«, in izbrali elucijski volumen, 100  $\mu$ l. Magnetne kroglice so vezale DNA, nato se je DNA eluirala v elucijske epruvete. Izolirano nukleinsko kislino smo shranili na -20 °C. Z aparaturo MagNA Pure Compact Instrument lahko naenkrat izoliramo nukleinsko kislino iz osmih vzorcev, izolacija pa je trajala približno 30 minut.





Slika 13: Koraki izolacije molekule DNA avtomatskim procesorjem MagNA Pure Compact Instrument (Roche, 2011a).

Preglednica 5: Koraki avtomatske izolacije DNA z MagNA Pure Compact Instrument-om.

Korak izolacije	Opis postopka
1	V epruvetko odpipetiramo vzorčni material (likvor).
2	Vzorcu sta dodana pufer za lizo in vezavo, ter proteinaza K. DNA je sproščena, proteini se denaturirajo.
3	Sproščena DNA se veže na površino magnetnih kroglic.
4	Magnetne kroglice z vezano DNA se ločijo od preostale razgrajene vsebine.
5	Večkratno spiranje magnetnih kroglic. Odstranijo se nevezani proteini, celične membrane in inhibitorji PCR reakcije.
6	Magnetni delci z DNA se ločijo od pufera, ki vsebuje ostanke vzorca.
7	Očiščena DNA se iz magnetnih kroglic eluira pri 70 °C v elucijske epruvete. Kroglice ostanejo v nastavkih za pipete in se zavržejo.

### 3.2.3 »In house« metoda PCR v realnem času na aparaturi LightCycler 2.0 (Roche, Nemčija)

#### 3.2.3.1. Začetni oligonukleotidi

Začetne oligonukleotide za reakcijo so proizvedli v podjetju Tib Molbiol (Berlin, Nemčija). Za detekcijo DNA *S. pneumoniae* smo uporabili gen za pneumolizin (*ply*), za

detekcijo DNA *N. meningitidis* pa gen za porin A1 (*porA*) (Deutch in sod., 2007). Iz začetne koncentracije 5  $\mu\text{M}$  smo pripravili 0,5  $\mu\text{M}$  koncentracijo začetnih oligonukleotidov. Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov za dokazovanje in pomnoževanje genov *ply* in *porA* so prikazani v preglednicah 6 in 7.

Preglednica 6: Zaporedje začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje gena *ply*.

Ime	Nukleotidno zaporedje
Začetni oligonukleotid 1 ( <i>ply</i> FW)	5 – ACTCTTCTTGCGGTTGATCG – 3
Začetni oligonukleotid 2 ( <i>ply</i> RV)	5 – TGAGCCGTTATTTTTTCATACTG – 3

Preglednica 7: Zaporedje začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje gena *porA*.

Ime	Nukleotidno zaporedje
Začetni oligonukleotid 1 ( <i>porA</i> FW)	5 - GGCGAAATCAAAGCCGGCGT – 3
Začetni oligonukleotid 2 ( <i>porA</i> RV)	5 – TAAAGCCGATAAACGAGCCGAAAT – 3

### 3.2.3.2. Priprava reakcijske mešanice

Reakcijsko mešanico smo pripravili po navodilih proizvajalca LightCycler<sup>R</sup> FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I (Roche, Nemčija). Komplet vsebuje temperaturno obstojno FastStart Taq DNA-polimerazo, mešanico dNTP, MgCl<sub>2</sub> in SYBR Green fluorescenčno barvilo, ki se vgradi v dvojno DNA vijačnico. Prednost kompleta je, da se DNA-polimeraza aktivira med postopkom razdvajanja DNA pri 95 °C, tako se izognemo nespecifičnim produktom, ki bi lahko nastali ob aktivaciji encima pri nižjih temperaturah.

Skupni volumen reakcijske mešanice za pomnoževanje vsakega vzorca je znašal 18  $\mu\text{l}$  in je vseboval:

- 10  $\mu\text{l}$  mešanice LightCycler<sup>R</sup> FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I (Roche, Nemčija)
- 4  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O brez DNA/RNA za PCR reakcijo
- 2  $\mu\text{l}$  začetnega oligonukleotida 1 (FW, 0,5 $\mu\text{M}$ )
- 2  $\mu\text{l}$  začetnega oligonukleotida 2 (RV, 0,5 $\mu\text{M}$ ).

Za vsak vzorec smo pripravili dve različni reakcijski mešanici z različnimi začetnimi oligonukleotidi, saj smo na aparaturi LightCycler z metodo PCR v realnem času določali dve različni bakteriji (*S. pneumoniae* in *N. meningitidis*). Nastalo mešanico smo nanесли v ohlajene kapilare, dodali 2  $\mu$ l izolirane DNA in kapilare zaprli. Končni volumen v kapilari je znašal 20  $\mu$ l, kapilare smo centrifugirali in jih namestili v aparat LightCycler. Naenkrat smo lahko preiskali 13 vzorcev likvorja. V vsako reakcijo smo vključili negativno kontrolo, kamor smo namesto vzorca dodali 2  $\mu$ l H<sub>2</sub>O in pozitivni kontroli, kamor smo dodali 2  $\mu$ l DNA iz celic čiste kulture ustrezne bakterije. Poleg tega smo pripravili še kontrolo reagentov, pri kateri reakcijski mešanici nismo dodali ničesar in v kapilaro nanесли le 18  $\mu$ l pripravljene mešanice.

### 3.2.3.3 Pogoji protokola PCR v realnem času na aparaturi LightCycler

Reakcija PCR v realnem času je potekala v treh korakih. 1. preinkubacija, aktivacija encima FastStart DNA-polimeraza, je potekala 10 minut pri temperaturi 95 °C. 2. nato smo izvedli pomnoževanje genov *ply* in *porA* s 40-kratnim ponavljanjem temperaturnega cikla pri naslednjih pogojih: denaturacija tarčne DNA je potekalo 10 sekund pri temperaturi 95 °C, pripenjanje začetnih oligonukleotidov na komplementarna mesta tarčne DNA in podaljševanje verige DNA 60 sekund pri 72 °C. 3. hlajenje rotorja in termalnega bloka aparature LightCycler je potekalo 30 sekund pri 40 °C (Deutch in sod., 2007). Temperaturno-časovni protokol reakcije PCR v realnem času je prikazan v preglednici 8. V stopnji prileganja začetnih oligonukleotidov na tarčno DNA programska oprema aparature LightCycler izmeri vrednost fluorescence - v dvojno vijačno DNA vezanega barvila - pri posameznem vzorcu, kar spremljamo na zaslonu računalnika kot krivuljo. Hitrost spreminjanja temperature v aparaturi je v vseh stopnjah 20 °C /s.

Preglednica 8: Temperaturno-časovni protokol reakcije PCR v realnem času na aparaturi LightCycler.

		Število ciklov	Temperatura (°C)	Čas (s)
<b>Preinkubacija</b>		1	95	600
<b>Pomnoževanje ustreznega gena</b>	Denaturacija	40	95	10
	Vezava in podaljševanje zač. oligonukleotidov		72	60
<b>Hlajenje</b>		1	40	30

### 3.2.4. PCR v realnem času z uporabo komercialnega kita na aparaturi StepOnePlus

#### 3.2.4.1. Komercialni kit EuSepScreen

Komercialni kit EuSepScreen, proizvajalca Eurospital (Italija), je namenjen dokazovanju bakterij *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* in *H. influenzae* tipa b ter adenovirusa iz kliničnih vzorcev primarno sterilnih mest. Vsak komplet vsebuje po osem testnih tub, posamezne reakcijske mešanice, katere sestava ni poznana, označenih s posamezno barvo. V kompletu so tri različne reakcijske mešanice, in sicer Mix 1 za dokazovanje *N. meningitidis* in *S. pneumoniae*, Mix 2 za dokazovanje *H. influenzae* in adenovirusa ter Mix 3 za zaznavo človeške genomske DNA, natančneje beta-globina, ki služi kot kontrola pomnoževanja DNA.

Pri vsaki testni tubi je bilo potrebno predreti zaščitno folijo in dodati 37,5 µl reagenta A ter 62,5 µl univerzalnega PCR Master Mix-a. V naslednji stopnji smo na mikrotitersko ploščico nanesti 20 µl nastale mešanice in v vsako vdolbinico dodali 5 µl vzorca. Za negativno kontrolo smo namesto vzorca dodali 5 µl H<sub>2</sub>O, za pozitivno kontrolo pa kompletu priloženo mešanico DNA (liofilizirano) vseh iskanih bakterij. Tako je vsaka vdolbinica na mikrotiterski ploščici vsebovala 25 µl reakcijske mešanice in vzorca. Podatkov o zaporedju začetnih oligonukleotidov, uporabljene polimeraze in barvila, ki oddaja signal, proizvajalec v navodilih za delo ni navedel in do teh podatkov se ne da priti zaradi poslovne tajnosti.

#### 3.2.4.2 Pogoji protokola na aparaturi StepOnePlus

Na mikrotitersko ploščico smo lahko hkrati nanesti 28 vzorcev izolirane DNA iz likvorja ter negativno in pozitivno kontrolo. Ploščico smo centrifugirali in vstavili v aparaturo StepOnePlus<sup>TM</sup> Instrument (Applied Biosystems, Kalifornija, ZDA), nastavili filter za detekcijo signala na 520 in 550 nm in pogoje protokola (tabela 9). Sistem je zaznal pomnoženo DNA *N. meningitidis* in adenovirusov pri valovni dolžini 520 nm, pomnoženo DNA *S. pneumoniae* in *H. influenzae* pa pri 550 nm. Na računalniškem zaslonu smo lahko opazovali oddani signal pri določeni valovni dolžini.

Tabela 9: Temperaturno-časovni protokol reakcije PCR v realnem času na aparaturi StepOnePlus.

<b>Korak</b>	<b>Število ciklov</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Čas (s)</b>
1	1	50	120
2	1	95	600
3	45	95	15
4		60	60

## 4 REZULTATI

V diplomski nalogi smo primerjali metodo kultivacije z dvema molekularnima metodama PCR v realnem času za dokazovanje povzročiteljev gnojnega bakterijskega meningitisa. PCR v realnem času smo izvedli na aparaturi LightCycler z uporabo začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje genov *ply* pri *S. pneumoniae* in *porA* pri *N. meningitidis* ter na aparaturi StepOnePlus, kjer smo uporabili komercialni kit EuSepScreen, za pomnoževanje DNA bakterij *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* in *H. influenzae*.

### 4.1 VZORCI

Prisotnost bakterij *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* in *H. influenzae* smo dokazovali v 87 vzorcih likvorja, odvzetih s punkcijo cerebrospinalne tekočine, ki mora biti opravljena na način, ki onemogoča okuženje odvzetega vzorca. Vzorci so pripadali 66 različnim bolnikom. Med preiskovanci je bilo 37 oseb moškega spola (56 %) in 29 oseb ženskega spola (44 %). Preiskovanci so bili vseh starosti, od novorojenčkov, starih 1 mesec ali manj, do starostnikov, starejših od 65 let.

Prejetim vzorcem likvorja smo ocenili videz, kajti motnost likvorja je znak gnojnega meningitisa. Likvor je bil: bister, krvav, moten ali rumene barve. Od devetih vzorcev, v katerih je bila v likvorju z metodo PCR v realnem času dokazana bakterija *S. pneumoniae*, je bil likvor pri šestih bolnikih moten, pri dveh krvav in pri enem bolniku rumen. Likvorju, v katerem je bila s PCR v realnem času dokazana bakterija *N. meningitidis* (pri 4 bolnikih), je bil pri dveh bolnikih bister, pri enem bolniku moten, pri enem bolniku pa nimamo podatka. Od vseh 66 bolnikov, je bil likvor videti moten pri 11 bolnikih. Pri štirih bolnikih je bil likvor moten, iz vzorca likvorja pa povzročitelja nismo dokazali niti z metodo kultivacije, niti z metodo PCR v realnem času.

## 4.2 DOKAZOVANJE BAKTERIJ V LIKVORJU

### 4.2.1 Mikroskopski preparat in klasična metoda kultivacije

Iz vzorcev smo naredili neposredne mikroskopske preparate in jih pobarvali po Gramu ter vzorce nacepili na obogatena gojišča. Bakterije smo izolirali iz likvorja pri 25 od 66 bolnikov, od tega pri treh *N. meningitidis*, pri osmih *S. pneumoniae*, *H. influenzae* nismo izolirali iz nobenega vzorca. Pri ostalih bolnikih smo izolirali druge, redkejše vrste ali pa kontaminante. Pri 41 bolnikih bakterij iz likvorja nismo izolirali. Preglednica 10 prikazuje bakterijske vrste, ki so bile z metodo kultivacije izolirane iz vzorcev likvorja. Pri enem bolniku so bile izolirane glive. Razvidno je, da je najpogostejši povzročitelj bakterijskega gnojnega meningitisa, dokazan z metodo kultivacije, bakterija *S. pneumoniae*. Sledi ji *Staphylococcus epidermidis*, ki je v večini primerov kontaminant likvorja iz človeške kožne flore, zaradi nepravilnega odvzema likvorja (enako tudi *Streptococcus mitis* in *Streptococcus sanguinis*). Tretja po pogostosti je bakterija *N. meningitidis*. Bakterija *H. influenzae* ni bila z metodo kultivacije izolirana iz nobenega vzorca. Pri molekularnih metodah diagnostike bakterijskega gnojnega meningitisa smo se omejili na diagnostiko najpogostejših in najnevarnejših povzročiteljev, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* in *H. influenzae*.

Neposredni mikroskopski preparat pobarvan po Gramu nam pokaže morfologijo in obarvanost celic, ki so prisotne v kužnini. Pomembno pri preiskavi likvorja je prisotnost levkocitov v kužnini, zato vedno ocenimo tudi prisotnost levkocitov v neposrednem mikroskopskem preparatu. Preglednica 11 prikazuje primerjavo števila bolnikov s pozitivnim neposrednim mikroskopskim preparatom in pozitivno metodo kultivacije za bakteriji *S. pneumoniae* in *N. meningitidis*. Iz preglednice vidimo, da je mikroskopski preparat manj občutljiv, saj z njim odkrijemo manj povzročiteljev bakterijskega gnojnega meningitisa kot z metodo kultivacije. Metodo neposrednega mikroskopskega preparata se uporablja zato, ker je hitra in nam da informacije o povzročitelju, dokončna diagnoza pa temelji na kultivaciji in identifikaciji povzročitelja.

Preglednica 10: Baterijske vrste, izolirane iz vzorcev likvorja in število bolnikov.

Bakterije	Število bolnikov
<i>Neisseria meningitidis</i>	3
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	8
<i>Haemophilus influenzae</i>	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6
<i>Streptococcus mitis</i>	1
<i>Streptococcus sanguinis</i>	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	2
<i>Proteus mirabilis</i>	1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1
Glive	1
<b>Skupaj</b>	<b>25</b>
Negativna izolacija	41
<b>Skupno število bolnikov</b>	<b>66</b>

Preglednica 11: Primerjava števila bolnikov s pozitivnim neposrednim razmazom pobarvanem po Gramu in s pozitivno metodo kulture za bakteriji *S. pneumoniae* in *N. meningitidis*.

	Barvanje po Gramu	Metoda kulture
<i>S. pneumoniae</i>	8	8
<i>N. meningitidis</i>	1	3

#### 4.2.2 Metoda PCR v realnem času z uporabo začetnih oligonukleotidov na aparaturi LightCycler

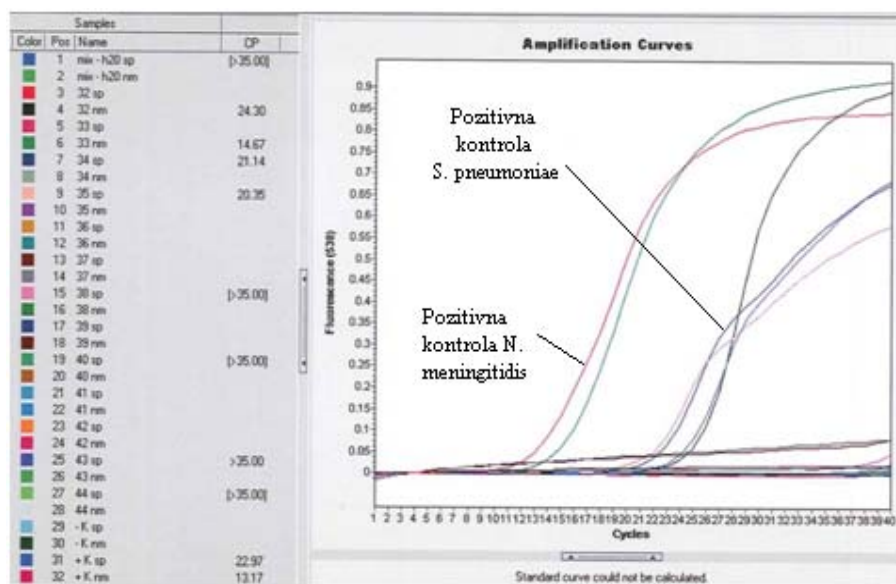
Iz vzorcev likvorja smo izolirali celokupno DNA in izvedli metodo PCR v realnem času na aparaturi LightCycler. Za vsak klinični vzorec smo izvedli dva protokola metode PCR v realnem času za dokaz dveh različnih povzročiteljev bakterijskega meningitisa, *S. pneumoniae* in *N. meningitidis*.

Pri PCR v realnem času smo dobili 4 vzorce pozitivne na *N. meningitidis* in 9 na *S. pneumoniae*.

Slika 14 prikazuje rezultate krivulj pomnoževanja protokola RT-PCR za vzorce številka 32 do 44 ter pozitivno in negativno kontrolo. Rdeča krivulja predstavlja pozitivno kontrolo za bakterijo *N. meningitidis*, črna in zelena krivulja (vzorca številka 32 in 33) pa predstavljata

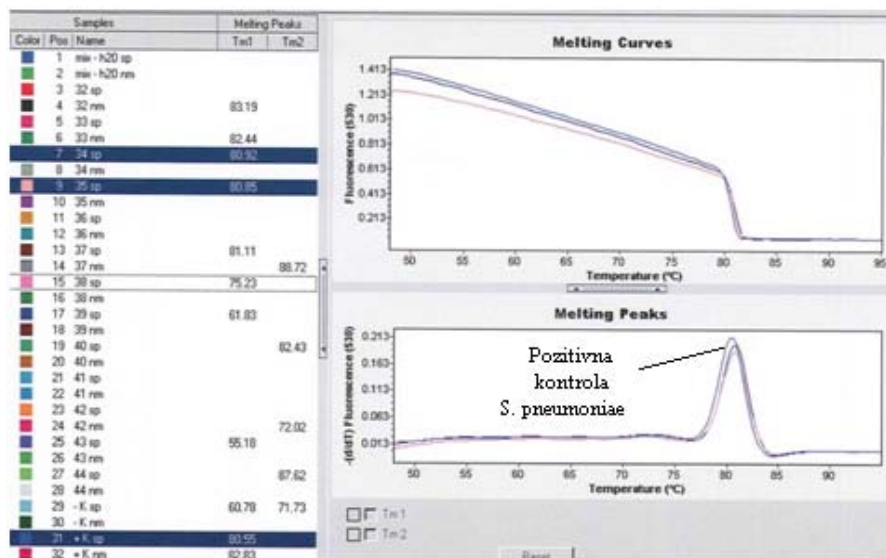


pozitivna vzorca za *N. meningitidis*. Temno modra krivulja predstavlja pozitivno kontrolo za *S. pneumoniae*, opazimo pa tudi dva pozitivna vzorca, in sicer vzorec pod številko 34 in 35. Vsi ostali vzorci so negativni, ker je fluorescenca skozi vseh 40 ciklov protokola ostala nespremenjena. Pri nekaterih vzorcih je prišlo do nespecifičnega pomnoževanja pri 35 ciklu ali še kasneje. V teh primerih ni prišlo do pomnoževanja genov *ply* ali *porA*, zato so vsi ti vzorci negativni za bakteriji *S. pneumoniae* in *N. meningitidis*.

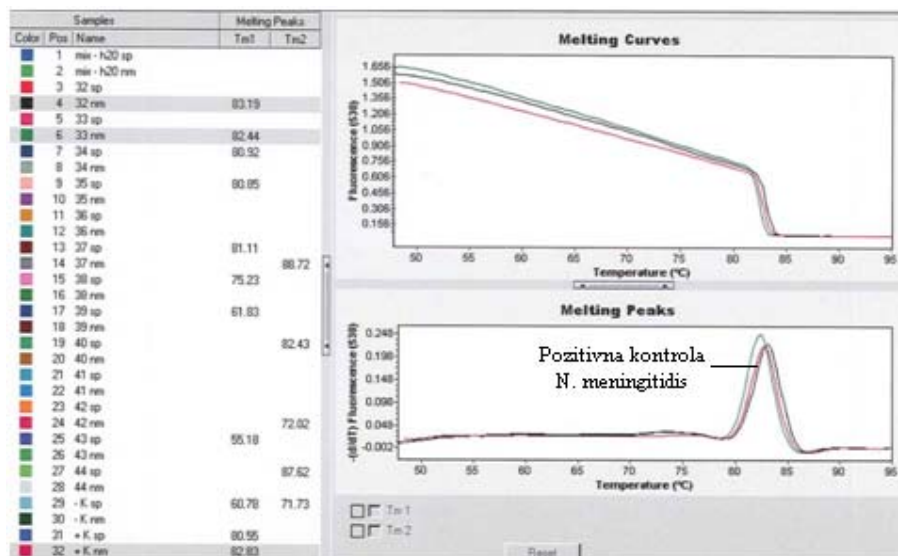


Slika 14: Določitev povzročiteljev bakterijskega meningitisa v vzorcih številka 32 do 44 ter pozitivna in negativna kontrola (rdeča krivulja – pozitivna kontrola *N. meningitidis*, modra krivulja – pozitivna kontrola *S. pneumoniae*, črna in zelena krivulja – vzorec št. 32 in 33, modra in roza krivulja - vzorec št. 34 in 35)

Slika 15 prikazuje talilne temperature za pozitivno kontrolo bakterije *S. pneumoniae* in dva vzorca (številka 34 in 35), ki sta pozitivna za iskano bakterijo. Pri obeh vzorcih je talilna temperatura 80 °C, kot pri pozitivni kontroli. Slika 16 prikazuje talilno temperaturo za pozitivno kontrolo bakterije *N. meningitidis* (rdeča krivulja) in dva pozitivna vzorca za iskano bakterijo (številka 32 in 33). Pri obeh vzorcih je talilna temperatura 82 °C kot pri pozitivni kontroli.



Slika 15: Rezultati določitve talilnih krivulj in temperature tališča za vzorce številka 32 do 44 (vzorec številka 34 in 35 imata  $T_m = 80^\circ\text{C}$  in sta pozitivna vzorca za bakterijo *S. pneumoniae*)



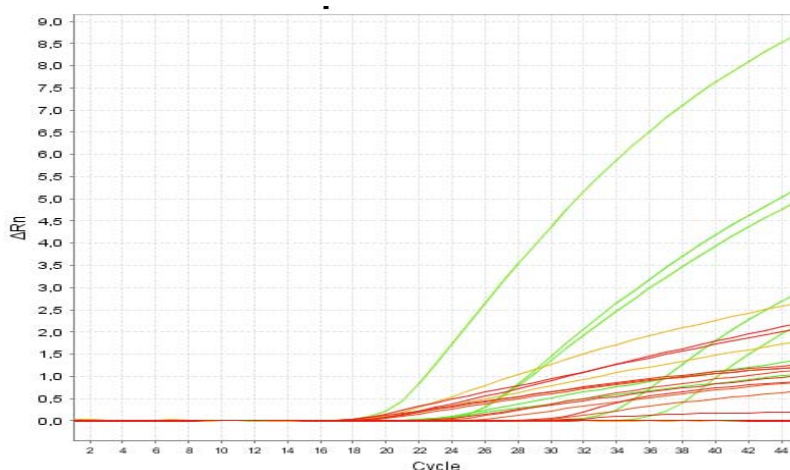
Slika 16: Rezultati določitve talilnih krivulj in temperature tališča za vzorce številka 32 do 44 (vzorec številka 32 in 33 imata  $T_m = 83^\circ\text{C}$  ter  $82^\circ\text{C}$  in sta pozitivna vzorca za bakterijo *N. meningitidis*)

### 4.2.3 Metoda PCR v realnem času na aparaturi StepOnePlus z uporabo komercialnega kita

Iz vzorcev likvorja smo izolirali DNA in izvedli metodo PCR v realnem času na aparaturi StepOnePlus z uporabo komercialnega kita EuSepScreen, za dokazovanje povzročiteljev bakterijskega meningitisa, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* in *H. influenzae*. Slika 17 prikazuje rezultate določitve povzročiteljev meningitisa v vzorcih likvorja številka 1 do 8. Na sliki so prikazani cikli reakcije pri katerih se je fluorescenca vzorca spremenila (dvignila) in jakost fluorescence pri posameznem vzorcu. Rdeče krivulje prikazujejo dvig fluorescence za povzročitelja *S. pneumoniae* in *N. meningitidis*, rumene krivulje dvig fluorescence ob pomnoževanje DNA *H. influenzae* in adenovirusov, zelene krivulje pa dvig fluorescence ob pomnoževanju gena za beta-globin. V našem diplomskem delu smo se omejili na rezultate za bakterijske povzročitelje meningitisa, tako da nas rezultati o pomnoževanju adenovirusnih genov, kar omogoča omenjeni komercialni kit, niso zanimali.

Z uporabo računalniškega sistema smo določili »crossing point«  $C_T$ , ki predstavlja zaporedni cikel pri katerem fluorescenca barvila prvič preseže izračunano stopnjo ozadja fluorescence.  $C_T$  pozitivnega vzorca se mora ujemati s  $C_T$ -jem pozitivne kontrole za posamezno bakterijo.

Pri vzorcih št. 31, 32 in 33 smo z uporabo komercialnega kita dobili rezultate, da so v likvorju prisotni tako bakterija *S. pneumoniae* kot tudi *N. meningitidis*. Z metodo kultivacije in metodo RT-PCR na aparaturi LightCycler smo v vseh treh vzorcih dokazali bakterijo *N. meningitidis* in malo verjetno je, da bi bila v likvorju prisotna oba povzročitelja. Vse pozitivne vzorce smo dokazovali ponovno in rezultati pri omenjenih treh vzorcih so se ponovili kot v prvem primeru, prisotna naj bi bila oba povzročitelja, *S. pneumoniae* in *N. meningitidis*.



Slika 17: Rezultati PCR določitve povzročiteljev bakterijskega meningitisa v vzorcih likvorja številka 1 do 8 s komercialnim kitom (rdeče krivulje – *S. pneumoniae* in *N. meningitidis*, rumene krivulje – *H. influenzae* in adenovirus, zelene krivulje – beta-globin)

#### 4.3 PRIMERJAVA METOD

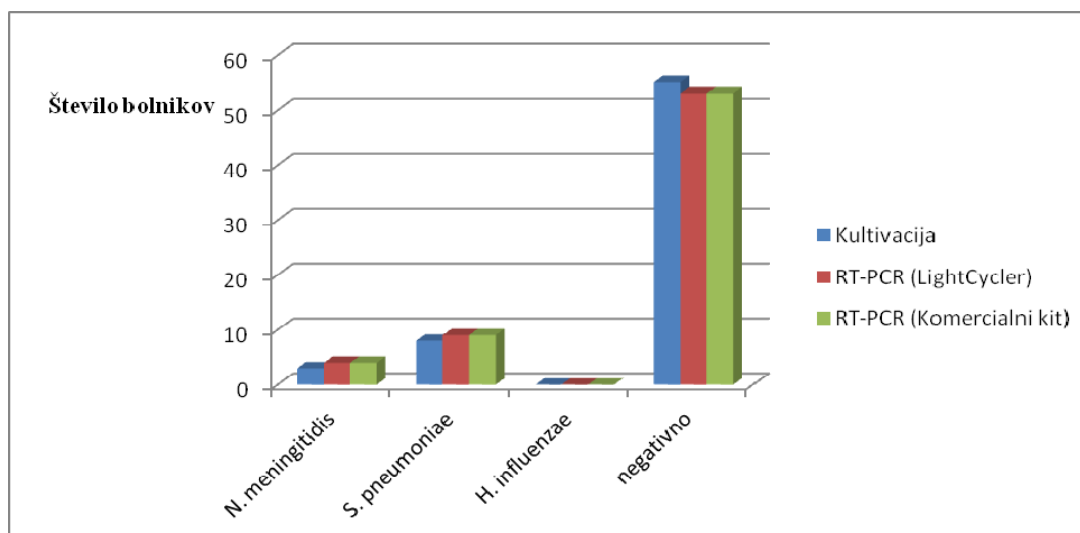
##### 4.3.1 Primerjava metod PCR v realnem času in metode kultivacije

Primerjali smo metodo kultivacije in obe molekularni metodi PCR v realnem času v vzorcih likvorja. Iz preglednice 12 in slike 18 je razvidno, da smo bakterijo *N. meningitidis* z metodo kultivacije dokazali pri 3 (4,5 %) bolnikih, z molekularnima metodama pa pri 4 (6,1 %) bolnikih. Bakterijo *S. pneumoniae* smo z metodo kultivacije dokazali pri 8 (12,1 %) bolnikih, z molekularnima metodama pa pri 9 (13,6 %) bolnikih (če ne upoštevamo vzorcev številka 31, 32 in 33).

Preglednica 12: Ujemanje rezultatov metode kultivacije in dveh molekularnih metod PCR v realnem času za dokazovanje bakterij *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* in *H. influenzae* iz vzorcev likvorja.

Bakterija	Pozitivna kultivacija	PCR v realnem času (LightCycler)	PCR v realnem času (Komericalni kit)
<i>N. meningitidis</i>	3	4	4
<i>S. pneumoniae</i>	8	9	9 (+3)
<i>H. influenzae</i>	0	NP	0

NP – nimamo podatka, ker metode nismo delali za bakterijo *H. influenzae*



Slika 18: Primerjava števila bolnikov ob okužbi s posamezno bakterijo glede na metodo detekcije.

V preglednici 13 je prikazano ujemanje med metodama PCR v realnem času in metodo kultivacije za bakterijo *S. pneumoniae*. Z molekularno metodo PCR v realnem času smo določili bakterijo pri 9 bolnikih, z metodo kultivacije pa pri 8 bolnikih. Rezultati obeh metod se ujemajo pri 65 bolnikih, ki jim je bil odvzet likvor, neujemanje se kaže le pri 1 bolniku.

Preglednica 13: Ujemanje rezultatov dokazovanja bakterije *Streptococcus pneumoniae* z metodo kultivacije in molekularnima metodama PCR v realnem času.

		Metoda kultivacije		Št. bolnikov skupaj
		ni <i>S. pneumoniae</i>	je <i>S. pneumoniae</i>	
Metoda PCR v realnem času	ni <i>S. pneumoniae</i>	57	0	57
	je <i>S. pneumoniae</i>	1	8	9
Št. bolnikov skupaj		58	8	<b>66</b>

V preglednici 14 je prikazano ujemanje med metodama PCR v realnem času in metodo kultivacije za bakterijo *N. meningitidis*. Z molekularno metodo PCR v realnem času smo določili bakterijo pri 4 bolnikih, z metodo kultivacije pa pri 3 bolnikih. Rezultati obeh metod se ujemajo pri 65 bolnikih, razlikujejo se le pri 1 bolniku.

Preglednica 14: Ujemanje rezultatov dokazovanja bakterije *Neisseria meningitidis* z metodo kultivacije in molekularnima metodama PCR v realnem času.

		Metoda kultivacije		Št. bolnikov skupaj
		ni <i>N. meningitidis</i>	je <i>N. meningitidis</i>	
Metoda PCR v realnem času	ni <i>N. meningitidis</i>	62	0	62
	je <i>N. meningitidis</i>	1	3	4
Št. bolnikov skupaj		63	3	<b>66</b>

#### 4.4. OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST

Za metodo kultivacije smo izračunali diagnostično občutljivost in specifičnost testa po spodaj navedenih formulah (Gordis, 2004).

$$\text{Občutljivost} = \text{št. resnično pozitivnih} / (\text{št. resnično pozitivnih} + \text{št. lažno negativnih}) \quad (1)$$

$$\text{Specifičnost} = \text{št. resnično negativnih} / (\text{št. resnično negativnih} + \text{št. lažno pozitivnih}) \quad (2)$$

Preglednica 15: Izračun občutljivosti in specifičnosti metode kultivacije, ko za standard določimo metodo PCR v realnem času

Dokazovanje	OBČUTLJIVOST METODE (%)	SPECIFIČNOST METODE (%)
bakterije <i>S. pneumoniae</i>	88,8	100
bakterije <i>N. meningitidis</i>	75,0	100

Preglednica 15 prikazuje izračun občutljivosti in specifičnosti metode kultivacije, ko za standard določimo metodo PCR v realnem času. Občutljivost za detekcijo bakterije *S. pneumoniae* znaša 88,8 %, za detekcijo bakterije *N. meningitidis* pa 75 %. Specifičnost je v obeh primerih 100 %.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Redna diagnostika dokazovanja povzročiteljev bakterijskega meningitisa zajema neposredno mikroskopijo po gramu pobarvanega vzorca in metodo kultivacije. Uvedba molekularne metode za dokaz najpogostejših povzročiteljev bakterijskega meningitisa *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* in *H. influenzae* v redno diagnostično dejavnost bi pomenila velik korak v smeri hitrejšega in občutljivejšega načina dokazovanja bakterijskega meningitisa povzročenega z omenjenimi bakterijami. Skrajšan čas preiskave z 24 ur ali več na 2-3 ure bi omogočil hitrejše zdravljenje in zmanjšal posledice. Skrajšal bi se tudi čas hospitalizacije bolnikov in nepotrebne dolge antibiotične terapije.

### 5.1 RAZPRAVA

*S. pneumoniae*, *N. meningitidis* in *H. influenzae* tipa b so najpogostejši povzročitelji bakterijskega meningitisa. Okužbe se pojavljajo tako v razvitem svetu (Evropa, Amerika in drugod), posebno pa v nerazvitem svetu (Afrika), kjer za posledicami okužb z bakterijo *N. meningitidis* umre veliko ljudi (Tzeng in Stephens, 2000). V Sloveniji je bakterijski meningitis povzročen s *S. pneumoniae* pogostejši od meningitisa povzročenega z *N. meningitidis*. Po uvedbi obveznega cepljenja proti *H. influenzae* tipa b leta 2001 se je število teh meningitisov zelo zmanjšalo (Kraigher, 2009).

Glavno nalogo pri dokazovanju okužb osrednjega živčevja ima laboratorijska mikrobiološka diagnostika. V zadnjem času se v neposredni diagnostiki uveljavlja tudi metoda PCR v realnem času, ki temelji na pomnoževanju značilnih genov bakterij. Ta metoda je občutljivejša od osamitve bakterij (Deutch in sod., 2008). Metoda PCR v realnem času ima številne prednosti, saj je zaradi zaprtosti sistema možnost kontaminacij manjša in tudi čas, potreben za zaključek analize, precej krajši. Pomembna pomanjkljivost PCR v realnem času je dejstvo, da dokazujemo samo prisotnost DNA posameznih izbranih povzročiteljev, ki sicer predstavljajo najpogostejše povzročitelje gnojnega meningitisa, pridobljenega v domačem okolju (Tunkel in sod., 2004). V diplomski nalogi smo z metodo PCR v realnem času na aparaturi LightCycler pomnoževali gen *ply* za dokaz *S. pneumoniae* in *porA* za dokaz *N. meningitidis*. Z uporabo komercialnega kita na

aparaturi StepOnePlus pa smo dokazovali povzročitelje *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* in *H. influenzae*. Ostalih manj pogostih povzročiteljev s tema metodama PCR v realnem času ne moremo dokazati.

Metoda kultivacije je za diagnostiko gnojnega meningitisa težavna, kajti ob neprimernem transportu likvorja (neustrezna temperatura in predolg čas prenosa) do laboratorija, bakterijske celice propadejo in okužbe ne dokažemo. Prav tako je pomembno, da je bolniku likvor odvzet pred uvedbo antibiotične terapije, da povzročitelj v likvorju preživi in lahko zraste na obogatenih gojiščih, na katere vzorce v laboratoriju cepimo. Pri odvzemu likvorja je potrebno paziti tudi na čim bolj aseptičen odzem, da ne pride do kontaminacij. Na te dejavnike mikrobiološke diagnostike v laboratoriju ne moremo nikakor vplivati, na to morajo biti pozorne klinike, ki likvor z lumbalno punkcijo odvzamejo in ga transportirajo do laboratorija, laboratorij jih lahko na ta dejstva samo opozori.

Motnost likvorja je eden od prvih sumov na gnojni meningitis, povzročen z bakterijami *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* in *H. influenzae*. Zato je potrebno izgled likvorja v laboratoriju oceniti. V naši diplomski nalogi je bil likvor moten pri 11 bolnikih (16,6 %) od 66 bolnikov. Pri 4 bolnikih, kljub motnosti likvorja, povzročitelja nismo dokazali niti z metodo kultivacije niti z molekularno metodo PCR v realnem času. V likvorju pri 7 bolnikih pa je bil iskani povzročitelj dokazan. Motnost likvorja pri negativnih vzorcih je lahko posledica prisotnosti katerega drugega povzročitelja meningitisa, ki ga s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi metodo z PCR v realnem času ne zaznamo, z metodo kultivacije pa ne pridemo do rezultatov, ker lahko bolniki že prejemajo antibiotike pred odvzemom likvorja. Vsi 4 bolniki, ki so imeli moten likvor in v likvorju ni bil dokazan noben povzročitelj, so pred odvzemom že prejemali antibiotik.

Z metodo kultivacije je bil povzročitelj dokazan pri 25 bolnikih, od tega je bila pri 8 bolnikih izolirana bakterija, ki je del normalne flore kože človeka (*S. epidermidis*, *S. mitis*, *S. sanuginis*). V teh primerih je šlo verjetno za kontaminacijo likvorja s kožno floro, lahko pa je prišlo do okužbe likvorja zaradi poškodbe glave ali nevrokirurškega posega, zato se je potrebno ob izolaciji teh povzročiteljev posvetovati s klinikom o klinični diagnozi bolnika. V diplomski nalogi smo metodo kultivacije primerjali tudi z neposrednim



mikroskopskim preparatom pobarvanim po Gramu. Dobili smo rezultate, da je metoda kultivacije in neposrednega mikroskopskega preparata enako občutljiva za dokazovanje *S. pneumoniae*, medtem ko je za dokazovanje *N. meningitidis* občutljivost neposrednega mikroskopskega preparata nižja od metode kultivacije (z neposrednim mikroskopskim preparatom smo odkrili povzročitelja le pri enem bolniku, z metodo kultivacije pa pri 3 bolnikih). Bakterija *H. influenzae* ni bila izolirana iz nobenega vzorca likvorja (zaradi obveznega cepljenja otrok proti *H. influenzae* tipa b od leta 2001 dalje). Prednost metode neposrednega mikroskopskega preparata v primerjavi z metodo kultivacije je čas dokazovanja povzročitelja, saj mikroskopski preparat pogledamo takoj po prejemu vzorca v laboratorij, slabost pa je nizka občutljivost metode.

Z metodo PCR v realnem času smo dokazali *S. pneumoniae* pri 9 bolnikih, z metodo kultivacije pa pri 8 bolnikih. Izračunali smo diagnostično občutljivost metode kultivacije, če za standard vzamemo PCR v realnem času in prišli do rezultatov, da občutljivost znaša 88,8 %, specifičnost pa 100 %. Občutljivost metode PCR v realnem času za dokaz *S. pneumoniae* je višja kot občutljivost metode kultivacije. *N. meningitidis* smo z metodo PCR v realnem času dokazali pri 4 bolnikih, z metodo kultivacije pa pri 3 bolnikih. Občutljivost metode kultivacije znaša 75 %, specifičnost pa 100 %. Višja občutljivost metode PCR v realnem času je posledica dajanja antibiotikov bolnikom pred odvzemom likvorja, zato bakterijske celice že propadejo in jih z metodo kultivacije ne moremo dokazati. Pri enem bolniku, kjer ni bilo ujemanja med metodo kultivacije in metodo PCR v realnem času za dokaz *S. pneumoniae* (kultivacija je bila negativna, metoda PCR v realnem času pa pozitivna), imamo podatek, da je bolnik prejemal antibiotično terapijo pred odvzemom likvorja. Za drugega bolnika, kjer je prišlo do neujemanja rezultatov med metodama, pa podatka o prejemanju antibiotikov nimamo, tako da ne moremo vedeti kaj je razlog negativni izolaciji. Prednost metode PCR v realnem času v primerjavi z metodo kultivacije je zagotovo večja občutljivost metode in skrajšan čas dokazovanja povzročitelja v likvorju iz 24 ur ali več na 2-3 ure. Pomanjkljivost metode PCR v realnem času pa je v tem, da ne moremo dokazati vseh povzročiteljev, vendar le specifične, za katere imamo pripravljene začetne oligonukleotide. Če bi želeli dokazati vse bakterijske vrste, ki so prisotne v likvorju, bi morali uporabiti t.i. broad-range PCR, kjer pomnožujemo konzervativni del gena za 16S podenoto ribosomske RNA in izvedemo analizo sekvence.

Vendar je ta metoda relativno počasna, z njo zajamemo tudi vse kontaminante likvorja, dodatna pomanjkljivost pa je tudi višja cena preiskave.

Deutch in sod. (2009) navajajo, da so s specifično metodo PCR v realnem času gen za pnevmolizin (*ply*) dokazali tudi v 1 od 5 primerov likvorjev, ki so imeli prisotno bakterijo *Streptococcus mitis*. Tudi v naši diplomski nalogi smo iz enega vzorca z metodo kultivacije izolirali *S. mitis*, vendar gena *ply* s PCR v realnem času nismo dokazali.

Iz rezultatov primerjav metode PCR v realnem času izvedene na dva različna načina je razvidno, da med molekularnima metodama PCR v realnem času ni razlike, glede na to, ali smo uporabili začetne oligonukleotide za poznane gene (*ply* in *porA*), ali smo uporabili komercialni kit EuSepScreen, ki pomnožuje nepoznane gene pri *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* in *H. influenzae*. Oba povzročitelja sta bila dokazana v vzorcih številka 31, 32 in 33, vendar pri teh vzorcih sklepamo, da je prišlo do napake ali kontaminacije vzorca, ker je malo mogoče, da bi imel bolnik okužbo z bakterijo *S. pneumoniae* in *N. meningitidis* hkrati. Pri obeh postopkih PCR v realnem času smo za bakterijo *N. meningitidis* dobili primerljive rezultate, bakterija je bila dokazana pri štirih bolnikih tako z uporabo poznanih začetnih oligonukleotidov, kot tudi z uporabo komercialnega kita. Za bakterijo *S. pneumoniae* smo prav tako dobili primerljive rezultate obeh postopkov pri 9 bolnikih. Do dvojno pozitivnih rezultatov je prišlo v treh vzorcih likvorja, kjer je bila z metodo kultivacije in z metodo PCR v realnem času na aparaturi LightCycler dokazana bakterija *N. meningitidis*, z uporabo komercialnega kita pa sta bili v vseh treh vzorcih dokazani tako *N. meningitidis* in *S. pneumoniae*. Oba molekularna postopka PCR v realnem času smo za vse pozitivne vzorce ponovili in dobili enake rezultate v obeh primerih. Zaradi teh rezultatov smo se obrnili tudi na proizvajalca komercialnega kita (Eurospital, Italija), ki je napako pripisoval aparaturi StepOnePlus na kateri smo dokazovanje povzročiteljev izvedli. Do neskladja med rezultati je lahko prišlo tudi zaradi kontaminacije vzorcev med pipetiranjem, malo pa je mogoče, da bi bila realno dokazana dva različna povzročitelja iz vzorca likvorja.

## 5.2 SKLEPI

Uvedba antibiotične terapije pred odvzemom likvorja in neprimeren transport vzorca do laboratorija zmanjšata možnost dokaza bakterijskega povzročitelja z metodo kultivacije, ker bakterijske celice zaradi delovanja antibiotika ali neprimernih pogojev transporta propadejo.

Molekularna metoda PCR v realnem času omogoča hitrejšo in občutljivejšo diagnostiko bakterijskega meningitisa, kot metoda kultivacije. Dokazovanje odseka DNA skupaj z osamitvijo bakterijske celokupne DNA iz likvorja in izvedbo PCR v realnem času traja 2-3 ure. Tako hitra diagnostika bi bolnikom lahko preprečila hudo obliko bolezni in zmanjšala posledice.

Z metodo PCR v realnem času smo potrdili rezultate neposrednega mikroskopskega preparata in metode kultivacije, poleg tega pa smo določili povzročitelja bakterijskega meningitisa tudi v vzorcih, ki jih je metoda kultivacije zgrešila.

Prednost metode PCR v realnem času je v tem, da pomnoževanje in dokazovanje genov *ply* in *porA* poteka hkrati v zaprti reakcijski posodi in zato ni potrebe po ločeni stopnji dokazovanja nastalih pridelkov PCR, kot je to nujno pri klasičnem PCR. Zmanjšamo tudi možnost kontaminacije reakcije s pridelki PCR predhodne reakcije.

Med obema načinoma metode PCR v realnem času («in house» metoda s poznanimi začetnimi oligonukleotidi in uporaba komercialnega kita) je prišlo do razlik, saj se rezultati pri 3 bolnikih ne ujemajo. Sklepamo, da je prišlo pri PCR v realnem času z uporabo komercialnega kita do kontaminacije vzorcev ali pa je prišlo do napake pri nastavitvah aparature StepOnePlus.

Potrdili smo, da je metoda PCR v realnem času res zlati standard v diagnostiki bakterijskega meningitisa, povzročenega z bakterijami *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* in *H. influenzae*, saj je njena prednost visoka občutljivost in razmeroma kratek čas do rezultata.

## 6 POVZETEK

Bakterije *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* in *Haemophilus influenzae* so najpogostejši povzročitelji bakterijskega meningitisa tako pri otrocih do 4. leta kot pri starostnikih. Bakterije prodrejo v sicer sterilno telesno tekočino, likvor, kjer se razmnožujejo in lahko povzročijo trajne nevrološke posledice ali tudi smrt. Vse tri patogene bakterije imajo polisaharidno kapsulo, ki jih varuje pred fagocitozo in podobno patogenezo nastanka okužbe. 80 % bakterijskih meningitisov povzročata bakteriji *S. pneumoniae* in *N. meningitidis*, incidenca meningitisov, ki jih povzroča bakterija *H. influenzae* pa se je od uvedbe obveznega cepljenja za otroke v razvitem svetu, zmanjšala (Čižman, 2009).

Zanesljiva in hitra laboratorijska diagnostika ima pomembno vlogo pri zdravljenju bakterijskega meningitisa, saj je nujna za začetek ustreznega zdravljenja in izkoreninjenja vira bolezni. Diagnostika temelji na osamitvi povzročitelja iz ustreznih kužnin, kar traja 24 ur in več, kar je za tako resna obolenja predolgo. Hitra diagnostika bi omogočila boljši izhod bolezni oz. zmanjševanje njenih posledic. V zadnjem času se v diagnostiki bakterijskega meningitisa, ki ga povzročajo bakterije *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* in *H. influenzae* vse bolj uveljavlja metoda PCR v realnem času. Ta metoda je občutljivejša in hitrejša od osamitve bakterij iz kužnine ali neposredne mikroskopije (Kesanopoulos in sod., 2005).

V diplomski nalogi smo izvedli in primerjali klasično metodo kultivacije likvorja na obogatenih gojiščih in molekularno metodo PCR v realnem času, ki smo jo izvedli na dva različna načina. Z aparaturo LightCycler smo pomnoževali gena *ply* (*S. pneumoniae*) in *porA* (*N. meningitidis*), na aparaturi StepOnePlus pa smo izvedli PCR v realnem času s komercialnim kitom EuSepScreen, ki pomnožuje nepoznane gene *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* in *H. influenzae*. Uvedba molekularne metode PCR v realnem času v redno diagnostiko bi pomenila velik korak v smeri hitrejšega in občutljivejšega načina dokazovanja okužb osrednjega živčevja z omenjenimi povzročitelji ter zmanjšala možnost trajnih nevroloških posledic ali celo smrti.

V raziskavo smo vključili 87 vzorcev likvorja, ki so pripadali 66 različnim bolnikom. Vzorce smo obarvali po Gramu in jih neposredno mikroskopirali, inokulirali na obogatena gojišča in izvedli molekularno metodo PCR v realnem času na dva različna načina. Metoda PCR v realnem času je dala boljše rezultate od metode kulture in neposredne mikroskopije, saj smo v nekaterih primerih, predvsem pri bolnikih, ki so že dobivali antibiotike, dokazali bakterijsko DNA, kljub negativnim rezultatom izolacije in neposredne mikroskopije. Zato je molekularna metoda PCR v realnem času ustrežnejša od klasične metode kulture, predvsem pri bolnikih, ki imajo uvedeno antibiotično terapijo že pred odvzemom likvorja.

## 7 VIRI

Arko B. 2004. Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. Farmaceutski vestnik, 55: 215-220

Biomerieux. 2011. About ApiNH/ID 32. Marcy l'Etoile, Biomerieux Clinical Diagnostics: 1str.

<http://www.biomerieux-diagnostics.com/> (maj 2011)

Buxton R. 2005. Blood agar plates and hemolysis: *Streptococcus* and other catalase negative Gram-positive cocci. Washington, American Society for Microbiology: 1str.

<http://archive.microbelibrary.org/microbelibrary/files/ccImages/Articleimages/Atlas-Bld/Streptococcus%20pneumoniae%20fig11.jpg> (maj 2011)

Buxton R. 2007. Examination of Gram Stains of Spinal Fluid—Bacterial Meningitis. Washington, American Society for Microbiology: 1str.

<http://archive.microbelibrary.org/asmonly/details.asp?id=2420> (junij 2011)

Cvitković Špik V. 2008. API NH: navodila za uporabo. Ljubljana, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo: 3 str.

Chiba N., Murayama S.Y., Morozumi M. 2009. Rapid detection of eight causative pathogens for the diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR. Journal of Infection and Chemotherapy, 15: 92-98

Čižman M. 2009. Gnojni meningitis – klinika in zdravljenje. Medicinski razgledi, 48: 17-21

Čižman M., Beović B. 2007. Kako predpisujemo protimikrobna zdravila v bolnišnicah? Ljubljana, Sekcija za kemoterapijo: 144 str.

Deutch S., Moller J.K., Ostergard L. 2008. Combined assay for two-hour identification of *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* and comcomitant detection of 16S

ribosomal DNA in cerebrospinal fluid by real-time PCR. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 40: 607-614

Dubos F., De La Rocque F., Levy C. 2008. Sensitivity of bacterial meningitis score in 889 children with bacterial meningitis. *Journal of Pediatrics*, 152: 378-382

Edwing E.P. 2006. Pneumococcal meningitis in an alcoholic head opened at autopsy revealing purulent inflammation of leptomeninges beneath reflected dura. Atlanta, Centers for Disease Control and Prevention: 1str.

<http://phil.cdc.gov/phil/quicksearch.asp> (maj 2011)

Forbes B.A., Sahm D.F., Weissfeld A.S. 2007. *Bailey and Scott's diagnostic microbiology*. 12<sup>th</sup> ed. St. Luis, Mosby: 822-831

Fritzell B. 2002. Epidemiology of invasive pneumococcal disease in Europe. *Current Therapeutic Research*, 63, Suppl. A: A3-A9

Fuglsang-Damgaard D., Pedersen G., Schonheyder H.C. 2008. Positive blood cultures and diagnosis of bacterial meningitis in cases with negative culture in of cerebrospinal fluid. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 40: 229-233

Gordis L. 2004. *Epidemiology*. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia, Elsevier: 335 str.

Hiramatsu K., Ohama M., Mijajima Y., Kishi K., Mizunoe S., Tokimatsu I., Nagai H., Kadota J., Saikawa T., Nasu M. 2004. Antimicrobial susceptibilities and analysis of genes related to penicilin or macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24: 125-129

Hoffman O., Weber R.J. 2009. Pathophysiology and treatment of bacterial meningitis. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 2: 102-412

Hogan G. 2009. *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus*: Satellite growth on blood agar. Washington, American Society of Microbiology, Microbeworld: 1str

<http://www.microbeworld.org/> (junij 2011)

Ihan A. 2002a. Patogene bakterije: Hemofilusi. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.) Ljubljana, Medicinski razgledi: 167-170

Ihan A. 2002b. Meningitisi. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.) Ljubljana, Medicinski razgledi: 383-385

Ihan A. 2002c. Patogene bakterije: Pnevmonokok. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.) Ljubljana, Medicinski razgledi: 155-158

Invitrogen. 2008. Real-time PCR from theory to practice. Carlsbad, Invitrogen: 37 str.

<http://tools.invitrogen.com/content.cfm?pageid=12257> (maj 2011)

Isaacs D. 2007. Evidence – based pediatric infectious diseases. Sydney, BMJI Books, Blackwell Publishing: 132-155

Kesanopoulos K., Tzanakaki G., Levidiotou S., Blackwell C., Kremastinou J. 2005. Evaluation of touch-down real-time PCR based on SYBR Green I fluorescent dye for the detection of *Neisseria meningitidis* in clinical samples. Immunology and Medical Microbiology, 43: 419-424

Kraigher A. 2009. Epidemiologija okužb osrednjega živčevja v Sloveniji. Medicinski razgledi, 48: 3-6

Kraigher A., Sočan M., Paragi M. 2008. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2007. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 19-22

Križan – Hergouth V. 2008. BMK-24: Test prisotnosti oksidaze. Ljubljana, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo: 2 str.

Matos B., Müller Premru M., Pirš M. 2009. Bakterijski meningitis v zvezi s poškodbami in operativnimi posegi. Medicinski razgledi, 48: 39-44

McCormick D.W., Molyneux E.M. 2011. Bacterial meningitis and *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine, Malawi. Emerging Infectious Diseases, 17: 688-690



Menaker J., Martin I.B.K., Hirshon J.M. 2005. Marked evaluation of cerebrospinal fluid white blood cell count: an unusual case of *Streptococcus pneumoniae* meningitis, differential diagnosis, and a brief review of current epidemiology and treatment recommendations. *Journal of Emergency Medicine*, 29: 37-41

Müller Premru M., Pirš M. 2009. Gnojni meningitis – povzročitelji in diagnostika. *Medicinski razgledi*, 48: 8-15

Müller Premru M. 2008. SOP-P HEM-2: preiskava likvorja. Ljubljana, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo: 6 str.

Paragi M., Kolman J., Kraigher A. 2003. Possibility of application of new pneumococcal conjugate vaccines in children in Slovenia. *Vaccine*, 21: 4708-4714

Pokorn M. 2002. Konjugirana pnevmokokna in meningokokna cepiva. *Slovenska pediatrija*, 9: 168-172

Poljak M. 2002. Patogene bakterije. Najserije in moraksele. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.) Ljubljana, *Medicinski razgledi*: 159-164

Razonable R.R., Keating M.R. 2004. Meningitis. Omaha, Mayo Clinic College of Medicine, Department of Medicine: 48 str.

<http://emedicine.medscape.com/article/232915-overview> (maj 2011)

Roche Diagnostics. 2011a. Automated sample preparation. Mannheim, Roche Diagnostics: 1str.

<https://www.roche-applied-science.com/sis/automated/index.jsp> (maj 2011)

Roche. 2011b. LightCycler real-time PCR systems. Mannheim, Roche Diagnostics: 1str.

<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/index.jsp> (maj 2011)

Stephens D.S., Greenwood B., Brandtzaeg P. 2007. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. *Lancet*, 369: 2196 – 2210

Struthers J.K., Westran R.P. 2003. Clinical bacteriology. Washington, ASM Press: 115-128

Swartz M.N. 2004. Bacterial meningitidis – a view of the past 90 years. New England Journal of Medicine, 351: 1826-1828

Thomson R.B. 2007. Specimen collection, transport and processing: bacteriology. V: Manual of clinical microbiology. Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H. (eds.). 9<sup>th</sup> ed. Washington, American Society for Microbiology: 291-333

Todar K. 2011. *Streptococcus pneumoniae* A mucoid strain on blood agar showing alpha hemolysis (green zone surrounding colonies). Note the zone of inhibition around a filter paper disc impregnated with optochin. Wisconsin, Online Textbook of Bacteriology: 1str <http://www.textbookofbacteriology.net/> (junij 2011)

Tunkel A.R., Hartman B.J., Kaplan S.J. 2004. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. IDSA Guidelines. Clinical Infectious Diseases, 39: 1267-1284

Tunkel A.R., Scheld W.M. 2005. Acute meningitis. V: Principles and practice of infectious diseases. Mandel G.L., Bennett J.E., Dolin R. (eds.). 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Elsevier: 1083-1132

Tzeng Y.L., Stephens D.S. 2000, Epidemiology and pathogenesis of *Neisseria meningitidis*. Microbes and Infection, 16: 687-700

Valasek M. A., Repa J.J. 2005. The power of real-time PCR. Advances in Physiology Education, 29: 151-159

## **ZAHVALA**

## PRILOGE

Priloga A: Rezultati metode kulture, neposrednega mikroskopskega preparata in molekularnih metod PCR v realnem času, vključno s spolom, starostjo, videzom likvorja in prejeti antibiotični terapiji pri bolnikih

Št. vzorca	Spol	Starost	Videz likvorja	Gram	Antibiotična terapija	Metoda kulture	PCR v realnem času (LightCycler)	PCR v realnem času (Komerčni kit)
1	M	2L 10m	BISTER	/	NE	<i>N. meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i>
2 *	M	62L	KRVAV	G+ diplokokci, levkociti	NE	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>
3	M	56L	MOTEN	G+ diplokokci	/	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>
4	M	52L	MOTEN	G+ diplokokci	DA	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>
5**	M	80L	MOTEN	/	NE	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>
6	M	72L	MOTEN	G+ diplokokci	/	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>
7***	Ž	76L	KRVAV	/	DA	<i>S.epidermidis</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>
8****	Ž	2L 4m	BISTER	/, levkociti	NE	<i>S.epidermidis</i>	NEG	NEG
9	M	42L	NP	/	NE	<i>S.epidermidis</i>	NEG	NEG
10	M	59L	KRVAV	/	/	<i>S.epidermidis</i>	NEG	NEG
11	M	59L	MOTEN	/, levkociti	DA	<i>S.aureus</i>	NEG	NEG
12	Ž	68L	BISTER	/, levkociti	NE	<i>S.aureus</i>	NEG	NEG
13	M	1L 9m	BISTER	/, levkociti	/	Glive	NEG	NEG
14	Ž	56L	KRVAV	/	DA	<i>Proteus mirabilis</i>	NEG	NEG
15*****	M	60L	RUMEN	/	DA	NEG	NEG	NEG
16*****	Ž	4L 10m	KRVAV	/	NE	NEG	NEG	NEG
17	Ž	42L	RUMEN	/	NE	NEG	NEG	NEG
18	M	56L	RUMEN	G+ diplokokci, levkociti	NE	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>
19	Ž	NP	NP	/	NE	NEG	NEG	NEG

Nadaljevanje Priloga A: Rezultati metode kultivacije, neposrednega mikroskopskega preparata in molekularnih metod PCR v realnem času, vključno s spolom, starostjo, videzom likvorja in prejeti antibiotični terapiji pri bolnikih

Št. vzorca	Spol	Starost	Videz likvorja	Gram	Antibiotična terapija	Metoda kultivacije	PCR v realnem času (LightCycler)	PCR v realnem času (Komerčni kit)
20*****	Ž	NP	NP	/	NE	NEG	NEG	NEG
21	M	NP	NP	/	NE	NEG	NEG	NEG
22	M	NP	NP	NP	NP	NEG	<i>N. meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> ( <i>S. pneumoniae</i> )
23	M	1L 7m	BISTER	/	NE	<i>N. meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> ( <i>S. pneumoniae</i> )
24	M	5m	MOTEN	G+ diplokoki	NE	<i>N. meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> ( <i>S. pneumoniae</i> )
25	Ž	38L	MOTEN	G+ diplokoki	NE	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>
26	Ž	54L	MOTEN	G+ diplokoki, levkociti	NP	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>
27	Ž	1m	KRVAV	/	DA	NEG	NEG	NEG
28*****	M	5L	KRVAV	/, levkociti	NP	<i>Streptococcus pyogenes</i>	NEG	NEG
29	Ž	1m	MOTEN	/	DA	<i>Klebsiella oxytoca</i>	NEG	NEG
30	M	50l	KRVAV	/	DA	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NEG	NEG
31	Ž	3m	BISTER	/	DA	<i>Staphylococcus sanguinis</i>	NEG	NEG
32	Ž	3m	BISTER	/	DA	<i>Streptococcus mitis</i>	NEG	NEG
33	Ž	68L	BISTER	/, levkociti	DA	NEG	NEG	NEG
34	M	3m	BISTER	/	NP	NEG	NEG	NEG
35	M	1m	NP	/	NP	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NEG	NEG
36*****	Ž	1m	KRVAV	G+ koki	DA	NEG	NEG	NEG
37	Ž	1m	RUMEN	/, levkociti	DA	NEG	NEG	NEG
38	M	60L	RUMEN	/	DA	NEG	NEG	NEG
39	M	9m	KRVAV	/, levkociti	NP	NEG	NEG	NEG

Škufca V. Primerjava klasičnih in molekularnih metod za diagnostiko gnojnega meningitisa.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2011

Nadaljevanje Priloga A: Rezultati metode kultivacije, neposrednega mikroskopskega preparata in molekularnih metod PCR v realnem času, vključno s spolom, starostjo, videzom likvorja in prejeti antibiotični terapiji pri bolnikih

Št. vzorca	Spol	Starost	Videz likvorja	Gram	Antibiotična terapija	Metoda kultivacije	PCR v realnem času (LightCycler)	PCR v realnem času (Komerčni kit)
40*****	M	43L	KRVAV	/	NE	NEG	NEG	NEG
41	M	64L	BISTER	levkociti	NP	NEG	NEG	NEG
42	M	76L	RUMEN	/	NE	NEG	NEG	NEG
43	M	49L	BISTER	/, levkociti	DA	NEG	NEG	NEG
44	M	74L	BISTER	/	NE	NEG	NEG	NEG
45	Ž	1L 3m	BISTER	/	NP	NEG	NEG	NEG
46	Ž	23L	BISTER	/	NP	NEG	NEG	NEG
47	Ž	59L	BISTER	/, levkociti	NP	NEG	NEG	NEG
48	M	1m	RUMEN	/, levkociti	NP	NEG	NEG	NEG
49	Ž	1m	BISTER	/	NP	NEG	NEG	NEG
50	M	1m	BISTER	/	DA	NEG	NEG	NEG
51	M	2L 1m	BISTER	/	DA	NEG	NEG	NEG
52	Ž	58L	BISTER	/	NE	NEG	NEG	NEG
53****	M	56L	RUMEN	/	NP	NEG	NEG	NEG
54	Ž	72L	KRVAV	/	NP	NEG	NEG	NEG
55*****	Ž	49L	KRVAV	/	DA	NEG	NEG	NEG
56	Ž	12L	BISTER	/	NE	NEG	NEG	NEG
57	Ž	58L	BISTER	/	DA	NEG	NEG	NEG
58	M	54L	BISTER	/	NP	NEG	NEG	NEG
59	M	1m	RUMEN	/	NP	NEG	NEG	NEG
60	Ž	1m	KRVAV	/	NP	NEG	NEG	NEG
61	M	31L	RUMEN	/	DA	NEG	NEG	NEG

Nadaljevanje Priloga A: Rezultati metode kultivacije, neposrednega mikroskopskega preparata in molekularnih metod PCR v realnem času, vključno s spolom, starostjo, videzom likvorja in prejeti antibiotični terapiji pri bolnikih

Št. vzorca	Spol	Starost	Videz likvorja	Gram	Antibiotična terapija	Metoda kultivacije	PCR v realnem času (LightCycler)	PCR v realnem času (Komerčni kit)
61	M	31L	RUMEN	/	DA	NEG	NEG	NEG
62	Ž	66L	RUMEN	/	DA	NEG	NEG	NEG
63	Ž	8L	MOTEN	/	NP	NEG	NEG	NEG
64	M	1m	BISTER	/	NP	NEG	NEG	NEG
65	M	1m	KRVAV	/, levkociti	NP	NEG	NEG	NEG
66	M	35L	BISTER	/	DA	NEG	NEG	NEG

NP – nimamo podatka, L – leta starosti, m – meseci starosti (mesece smo upoštevali samo pri otrocih do 5. leta starosti)

\*pacient je imel 2 vzorca likvorja, pri obeh vzorcih je bila izolirana in molekularno dokazana bakterija *S. pneumoniae*.

\*\*pacient je imel 2 vzorca likvorja, v prvem vzorcu je bila izolirana in molekularno dokazana bakterija *S. pneumniae*, v drugem vzorcu je bila izolacija že negativna, z molekularno diagnostiko pa je bila še dokazana *S. pneumoniae*.

\*\*\* pacient je imel 2 vzorca likvorja, pri obeh je bila izolacija negativna, molekularna diagnostika pa je v obeh primerih dokazala *S. pneumoniae*.

\*\*\*\*pacient je imel 4 vzorce likvorja, v vseh primerih je šlo za negativno izolacijo in molekularno diagnostiko.

\*\*\*\*\* pacient je imel 2 vzorca likvorja, v vseh primerih je šlo za negativno izolacijo in molekularno diagnostiko.

\*\*\*\*\*pacient je imel 5 vzorcev likvorja, v vseh primerih je šlo za negativno izolacijo in molekularno diagnostiko.

\*\*\*\*\*pacient je imel 3 vzorce likvorja, v vseh primerih je šlo za negativno izolacijo in molekularno diagnostiko.

Škufca V. Primerjava klasičnih in molekularnih metod za diagnostiko gnojnega meningitisa.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2011

---