(69)

Zastosowanie metody łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) w diagnostyce zakażeń wnętrza gałki ocznej

Application of polymerase chain reaction method (PCR) in diagnosis of endophthalmitis

Marek Gerkowicz[1], Małgorzata Pietraś-Trzpiel[1], Maria Kozioł-Montewka[2], Ewa Kosior-Jarecka[2], Małgorzata Latalska[1], Jolanta Paluch-Oleś[2]

[1] Z II Kliniki Okulistyki Akademii Medycznej w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Marek Gerkowicz
[2] Z Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej Akademii Medycznej w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Maria Kozioł-Montewka

Summary:

Purpose: The goal of this study is to determine the usefulness of the PCR method in the diagnosis of endophthalmitis.
Materials and methods: 30 clinical specimens 18 AH and 12 VF were obtained from 20 eyes with the clinical diagnosis of endophthalmitis. These included: 14 cases after cataract surgery, 1 case post trabeculectomy, 2 cases after penetrating traumas, and 3 cases after endogenous endophthalmitis. The same samples were analysed using 2 different methods: 1. conventional microbiological techniques (microscopy and diagnostic culture) and 2. PCR directed at 16S rDNA using universal primers.
Results: In the aqueous humor the causative pathogen was identified in one case (5,2%) by using diagnostic culture compared with seven cases (39%) by using PCR methods. In the vitreous samples the pathogen was identified in one case (9%) by using conventional method compared with five cases (50%) by using PCR. Microscopic preparation was difficult to evaluate in all samples.
Conclusions: PCR performed on aqueous humor and vitreous fluid is a reliable tool for diagnosis of causative organism particularly in smear and culture negative specimens. By using universal primers we are able to detect the presence of pathogen in case of endophthalmitis and than potentially by using DNA probe hybridization to determine the species of the bacteria. The discrimination between infection or non-infection endophthalmitis plays the main role in a succesful therapy.

Słowa kluczowe: zakażenia wnętrza gałki ocznej, PCR.
Key words: endophthalmitis, PCR.

Zapalenia wnętrza gałki ocznej, pomimo że występują stosunkowo rzadko (0,07-0,4% po operacji zaćmy), mogą powodować destrukcję gałki ocznej i prowadzić do znacznego pogorszenia widzenia (1). Ze względu na istniejące ryzyko niezbędna jest szybka i skuteczna diagnostyka, a następnie włączenie terapii celowanej. Materiał do badań mikrobiologicznych stanowi ciecz wodnista lub/ i ciało szkliste – pobierane w warunkach sali operacyjnej. Wyniki pozytywne otrzymywane z użyciem metod konwencjonalnych uzyskiwane są w 0-72%. (1, 2, 3). Długi czas oczekiwania na wynik tego badania, od 2 do 30 dni, nie pozwala na zastosowanie celowanego antybiotyku. Mnogość wyników ujemnych otrzymywanych z użyciem konwencjonalnych metod mikrobiologicznych, brak standardów metod hodowli oraz zbyt długi czas oczekiwania na wynik badania skłoniły nas do zastosowania nowej metody diagnostycznej – łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Udowodnienie infekcyjnego tła choroby staje się koniecznością w dobie narastającej oporności bakterii na wiele antybiotyków i chemioterapeutyków.

Jeżeli chodzi o konwencjonalną diagnostykę zapalnych schorzeń okulistycznych, największy problem stanowi niewielka ilość materiału dostarczana do badań – średnio 50 μl płynu z komory przedniej i 100-200 μl ciała szklistego. Russel i wsp. zauważyli, że w przypadku podostrych zapaleń wnętrza gałki ocznej drobnoustroje są obecne zazwyczaj w małej ilości, co dodatkowo utrudnia identyfikację drobnoustrojów (4).

Użycie metod biologii molekularnej pozwala na szybką i skuteczną diagnostykę trudnych przypadków zapaleń wnętrza gałki ocznej. Ze względu na duże dylematy diagnostyczne w przypadku zakażeń gałki ocznej rozróżnienie na podstawie objawów klinicznych zapalenia infekcyjnego od reakcji nadwrażliwości często bywa bardzo trudne, zwłaszcza w przypadkach słabo reagujących na leki steroidowe podawane miejscowo czy ogólnie, a próby wprowadzania nowych środków farmakologicznych często przynoszą pacjentowi więcej szkody niż korzyści. Sama diagnoza kliniczna może być opóźniona, ponieważ pacjent czasami nie odczuwa pogorszenia widzenia, bólu, powieki nie są obrzęknięte, a pierwsze subtelne objawy, takie jak: wzmożona tyndalizacja w komorze przedniej, obecność niewielkiej ilości włóknika, śladowy wysięk w ciele szklistym, mogą być zauważone jedynie podczas wnikliwego badania. Oczywisty jest fakt, że profilaktyka, diagnostyka i terapia zakażeń wnętrza gałki ocznej przeżywają w obecnym czasie renesans właśnie dzięki rozwojowi metod amplifikacji.

Przydatność łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) w diagnostyce zakażeń wnętrza gałki ocznej potwierdzona jest licznymi badaniami na całym świecie (4, 5). Metoda opiera się na zwielokrotnieniu charakterystycznej dla wielu bakterii sekwencji przy udziale termostabilnej polimerazy. Proces przebiega cyklicznie w różnych zakresach temperatur optymalnych dla cyklu denaturacji, anielingu, elongacji. Elongację każdorazowo poprzedza dobudowywanie primera specyficznego dla namnażanej sekwencji. Zastosowanie uniwersalnego startera, skutecznego w przypadku bakterii Gram(+), jak i Gram(–), wykrywającego wysoce konserwatywny i powtarzalny odcinek 16s rybosomalnego DNA, jest jednym ze sposobów identyfikacji bakterii z próbek klinicznych. Otrzymanie zamplifikowanego fragmentu 16s rybosomalnego DNA jest właściwie wstępem do dalszej diagnostyki. Zamplifikowany fragment wymaga sekwencjonowania w celu ustalenia gatunku bakterii, który spowodował infekcję. Jest to proces dość trudny do wykonania, wymagający dodatkowych nakładów, sprzętu i wykwalifikowanego personelu. Można również stosować techniki hybrydyzacyjne w celu identyfikacji czynnika patogennego jako tańszej alternatywy w diagnostyce zakażeń oka.

Celem naszej pracy było porównanie wyników uzyskiwanych z użyciem konwencjonalnych metod mikrobiologicznych z wynikami uzyskiwanymi za pomocą techniki PCR z użyciem uniwersalnego primera bakteryjnego.

Materiał i metody

Badaniami objęto 30 próbek otrzymanych od 20 pacjentów leczonych w II Klinice Okulistyki AM w Lublinie, u których podejrzewano infekcyjne zapalenie wnętrza gałki ocznej. 14 chorych było po operacji zaćmy, 1 po operacji przeciwjaskrowej (trabekulektomii), u 2 chorych podejrzewano endogenne zapalenie wnętrza gałki ocznej, u 3 zaś – zapalenie wnętrza gałki ocznej po urazie. U 10 chorych wykonano operację zaćmy metodą zewnątrztorebkowego usunięcia zmętniałej soczewki (ECCE), a u 4 chorych – metodą fakoemulsyfikacji. W przypadku 2 urazów oka usunięto zaćmę pourazową metodą zewnątrztorebkową. W 7 przypadkach zaćmy były powikłane współistniejącą cukrzycą, wysoką krótkowzrocznością bądź też były wynikiem urazu. Jeżeli chodzi o pochodzenie próbek w 18 przypadkach był to materiał z komory przedniej, natomiast 12 próbek stanowił materiał otrzymany z ciała szklistego. Różnica ta wynika z tego, że nie u wszystkich pacjentów istniała możliwość pobrania obu materiałów. 13 przypadków pooperacyjnego zapalenia gałki ocznej zaklasyfikowanych zostało jako ostre, występowały one od 2. do 14. doby po operacji, średnio w 8. dobie. 2 przypadki zaklasyfikowane zostały jako zapalenia przewlekłe i występowały w 15. i 23. dniu po operacji.

U wszystkich chorych wykonano w warunkach sali operacyjnej diagnostyczną biopsję komory przedniej. Płyn z przedniej komory pobierano igłą insulinówką w ilości 50-100 μl, ciało szkliste w ilości 100-200 μl, na początku witrektomii przez *pars plana*, strzykawką podłączoną do linii aspiracyjnej.

Wśród pacjentów z zapaleniem wnętrza gałki ocznej było 16 mężczyzn i 4 kobiety. Wiek chorych wahał się w granicach od 24 do 80 lat, średnio 54,5 roku.

Otrzymany materiał podzielono: z części sporządzano preparat bezpośredni, barwiony metodą Grama; część posiano na bulion cukrowy, tioglikolan sodowy, Agar Columbia w warunkach tlenowych i beztlenowych, podłoże Sabourauda, Mc Conkeya, Chapmana; z pozostałej części zaś wyizolowano DNA i pozostawiono do dalszej diagnostyki metodą PCR za pomocą primera uniwersalnego.

Izolację DNA, która jest krytycznym momentem, jeżeli chodzi o diagnostykę metodą amplifikacji, przeprowadzono dwoma metodami według protokołów izolacji podanych przez firmę DNA-Gdańsk. Pierwsza metoda izolacji, przeprowadzona z użyciem zestawu Genomic Mini, opierała się na zdolności wiązania soli chaotropowych w wysokich stężeniach do złóż krzemionkowych. Druga, przeprowadzona z użyciem zestawu Sherlock do izolacji DNA ze śladów biologicznych, opierała się na wykorzystaniu unikalnych membran jonowowymiennych, wiążących DNA niezwykle efektywnie. Otrzymane DNA zawieszano w 50 μl jałowej wody redestylowanej i pozostawiano w lodówce do dalszej diagnostyki.

Diagnostykę metodą PCR przeprowadziliśmy z użyciem starterów uniwersalnych dla bakteryjnego, rybosomalnego DNA bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich. Sekwencja pierwszego startera: 5'-ggcggcgcctaaacatgcaagt-3', była komplementarna dla konserwatywnego odcinka 46-66 par zasad 16s rybosomalnego DNA *E. coli*, sekwencja drugiego zaś: 5'gacaaccatgcacacctgt-3' – dla fragmentu 1044-1067 par zasad 16s rybosomalnego DNA *E. coli*. Końcowy produkt amplifikacji miał wielkość 1024 pz.

Wyniki

We wszystkich przypadkach obraz mikroskopowy był niemożliwy do jednoznacznej oceny, ponieważ z pobranego materiału otrzymano małą ilość bakterii. Po wybarwieniu obraz w mikroskopie nie dawał charakterystycznych układów, które jednoznacznie określiłyby dany rodzaj drobnoustroju. W przypadku posiewów otrzymano 2 (6,6%) wyniki pozytywne. W tych dwóch przypadkach został zidentyfikowany *Staphylococcus epidermidis*.

Rodzaj materiału Type of the sample	Hodowle bakteryjne (+) Diagnostic culture (+)	PCR-primer uniwersalny(+) PCR-universal primer (+)
Ciecz wodnista Aqueous humor	1 (5,2%)	7 (38%)
Ciało szkliste Vitreous fluid	1 (9%)	6 (50%)

Tab. I. Porównanie wyników badań uzyskanych z hodowli bakteryjnych z wynikami uzyskanymi z użyciem techniki PCR.
Tab. I. The bacteriological results compared with the PCR results.

Metodą PCR za pomocą primerów uniwersalnych stwierdzono obecność bakterii w 13 przypadkach, co stanowi ogółem 43,3%. Porównanie wyników badań uzyskanych z użyciem konwencjonalnych metod diagnostyki mikrobiologicznej w porównaniu z wynikami uzyskanymi z użyciem techniki PCR przedstawia tabela I. Tabela II przedstawia wyniki w zależności od techniki izolacji DNA.

ISSN 0023-2157 Index 362646

Metoda izolacji DNA Techniques of isolation of DNA	Liczba próbek poddanych izolacji Number of the samples	Liczba pozytywnych wyników PCR PCR positive results
Izolacja zestawem Genomic Mini Isolation using Genomic Mini	18 (60%)	3 (16%)
Izolacja zestawem Sherlock Isolation using Sherlock	12 (40%)	10 (83%)

Tab. II. Porównanie wyników uzyskanych z użyciem techniki PCR w zależności od metody izolacji DNA.
Tab. II. The results of the PCR according to the techniques of isolation of DNA.

Dyskusja

Rozwój metod amplifikacji DNA wytycza nowe kierunki służące rozwiązaniu wielu problemów, również obecnych w diagnostyce okulistycznej. Dzięki próbkom DNA mamy możliwość nie tyko uzyskania określonych sekwencji, ale również powielenia ich. W wielu przypadkach otrzymane geny mogą mówić nam o patogenności czy wirulencji szukanych organizmów. Możemy określić nie tylko geny oporności na antybiotyki, ale również funkcjonalny produkt genu odpowiedzialnego za oporność na dany antybiotyk (6). Metoda PCR jest również z powodzeniem stosowana w mikrobiologii, szczególnie w przypadkach, w których klasyczne metody wykrywania i identyfikacji drobnoustrojów narzucają pewne ograniczenia, takie jak: słaba czułość, wyniki fałszywie pozytywne, niska żywotność organizmu, trudności w hodowli, czas wzrostu drobnoustrojów. Najpowszechniej metodę PCR stosuje się do identyfikacji mikroorganizmów w materiale klinicznym. Ma to szczególne znaczenie w przypadku drobnoustrojów wolno rosnących, trudnych w hodowli *in vitro* lub nierosnących na pożywkach sztucznych bądź w przypadku występowania mikroorganizmów w próbce klinicznej w bardzo małej ilości, wewnątrzkomórkowo lub w przypadku adhezji bakterii do stałych powierzchni, takich jak np. sztuczna soczewka, torebka tylna (5).

Wśród wszystkich posiewów, pomimo postępowania zgodnego ze standardami diagnostyki mikrobiologicznej, uzyskaliśmy tylko dwa wyniki dodatnie, jeden pochodzący z komory przedniej, drugi z ciała szklistego, co stanowiło tylko 6,6% (7). Dodatkowo należy zauważyć, że w przypadku drugiego posiewu, gdzie materiał pochodził z płynu z komory przedniej, wynik nie korelował z wynikiem PCR, który w przypadku tej próbki pozostał ujemny. Może to świadczyć o kontaminacji albo o zgubieniu materiału genetycznego podczas izolacji DNA. Jak podaje piśmiennictwo, dodatnie wyniki posiewów w zależności od badanego materiału otrzymywano w 0-40% (1) w przypadku płynu z komory przedniej, a do 79% w przypadku próbek pochodzących z ciała szklistego (4). Materiał był pobierany i dostarczany do badań w ciągu dwóch godzin. Czas trwania hodowli wynosił 48-72 godzin dla bakterii beztlenowych i 5-10 dni dla grzybów. Pozytywny wynik posiewu był uznawany za obiektywny, jeżeli ta sama bakteria rosła przynajmniej na dwóch pożywkach. Wielu autorów uważa, że czas oczekiwania na wynik posiewu powinien wynosić 5-30 dni (8). Jest to jedna z prawdopodobnych przyczyn, w wyniku której inni autorzy otrzymywali dużo więcej wyników dodatnich. Norweskie studia badań nad zakażeniami gałki ocznej zwracają uwagę na fakt, że otrzymane wyniki posiewów mogą być wynikiem kontaminacji, z drugiej strony jednak brak wzrostu może być wynikiem nieprawidłowej „obróbki" materiału lub nieodpowiednich metod hodowli. Sandvig i wsp. uważają, że w przypadku przedłużenia czasu hodowli możemy uzyskać szczepy o mniejszej wirulencji (2). Dyskusyjną sprawą jest jednak wartość diagnostyczna posiewu, na który czeka się 14-30 dni. Zwykle po tak długim czasie proces diagnostyczny i terapeutyczny jest w większości przypadków zakończony lepszym bądź gorszym wynikiem.

Na wynik posiewu również może mieć wpływ rodzaj materiału użytego do diagnostyki. W naszej pracy pochodził on w 40% z ciała szklistego, natomiast w 60% z płynu z komory przedniej. Kresloff i wsp. uważają, że aspiracja płynu z komory przedniej jest niewystarczająca, ponieważ w 57% daje wyniki posiewów ujemne (9). Barza i wsp. nie zauważyli takiej zależności (10).

Skuteczność metody PCR do identyfikacji bakterii przy podejrzeniu zapalenia wnętrza gałki ocznej jest określana na 94-98% w przypadku próbek pochodzących z ciała szklistego, natomiast na 78% w przypadku płynu z komory przedniej (1, 3). W naszej pracy zastosowaliśmy primery uniwersalne, służące do amplifikacji fragmentu DNA charakterystycznego dla wszystkich bakterii. Dodatni wynik PCR otrzymano w 43,3% próbek w porównaniu z metodami z hodowli 6,6% wyników dodatnich. Różnica pomiędzy skutecznością tradycyjnych metod mikrobiologicznych a metodą PCR wynosi 34%. Biorąc pod uwagę procentową liczbę wyników dodatnich otrzymanych w piśmiennictwie, uzyskaliśmy mniejszą liczbę wyników pozytywnych, jednakże zostały zachowane proporcje pomiędzy wynikami uzyskanymi z hodowli a wynikami otrzymanymi z użyciem metod amplifikacji. W cytowanych pracach skuteczność metody PCR podnosiła czułość od 30 do 76% (1, 3). Rozbieżności pomiędzy naszymi wynikami a cytowanymi w publikacjach mogą mieć kilka przyczyn: różne techniki izolacji DNA, zanieczyszczenie próbek klinicznych oraz obecność inhibitorów PCR w próbkach klinicznych, będących przyczyną otrzymywania wyników fałszywie dodatnich bądź fałszywie ujemnych, rodzaj materiału użytego do badań mikrobiologicznych oraz fakt, że nie wykonywaliśmy badania PCR z użyciem primerów uniwersalnych, charakterystycznych dla grzybów.

W medycynie praktycznej metoda PCR jest bardzo obiecująca, jeżeli chodzi o detekcję patogenów. Czułość i specyficzność metody PCR są bardzo wysokie, praktycznie nie do osiągnięcia przez metody konwencjonalne. Obecność w próbkach klinicznych 10-100 kopii komórek bakteryjnych, niekoniecznie żywych, jest wystarczająca do wykrycia patogenu. Nie można jednak bezkrytycznie ufać tej metodzie. Mimo że PCR wydaje się prawie idealnym testem diagnostycznym, posiada pewne wady. Wysoka czułość, która z jednej strony jest rozpatrywana w aspekcie pozytywnym, może dawać wyniki fałszywie pozytywne. Minimalne zanieczyszczenia w badanym materiale mogą dawać poważne za-

grożenia w przypadku wysokiej czułości metody, ponadto mogą zostać powielone, co mogłoby świadczyć, że są obecne w materiale w znacznej ilości. Dużym problemem jest również brak procedur standaryzujących, zwłaszcza technik izolacji DNA, co może dawać duże rozbieżności w czułości stosowanych metod. Stosując dwie różne metody izolacji w niniejszej pracy, w przypadku pierwszej metody uzyskaliśmy jedynie 15% wyników dodatnich, w przypadku drugiej zaś 83,3%, co potwierdza, że izolacja DNA jest momentem strategicznym w diagnostyce metodą PCR.

Wnioski

1. Otrzymane wyniki pozwalają nam stwierdzić, że skuteczność metody PCR uzasadnia celowość jej zastosowania w przypadku zakażeń wnętrza gałki ocznej.
2. Wszystkie wyniki reakcji PCR muszą być rozpatrywane w aspekcie klinicznym. Nie można zapominać, że zawsze wartość różnicującą ma obraz kliniczny choroby, który jest podstawą rozpoznania lekarskiego, a badania dodatkowe mają jedynie ułatwiać potwierdzenie diagnozy lekarskiej.

PIŚMIENNICTWO:

1. Lohmann Ch.L. et al.: *Improved detection of microorganism by polymerase chain reaction in delayed endophthalmitis after cataract surgery.* Ophthalmolol., 2000, 107 (6), 1047-1051.
2. Sandvig K.U. et al.: *Postoperative endophthalmitis: Estabilishment and results of a national registry.* J. Cataract Refract. Surg., 2003, 29, 1273-1280.
3. Anand A.R. et al.: *Use of polymerase chain reaction (PCR) and DNA probe hybridization to determine the Gram reaction of the infecting bacterium in the intraocular fluids of patients with endophthalmitis.* Journal of Infection, 2000, 41, 221-226.
4. Russel N., Van Gelder R.N.: *Applications of the polymerase chain reaction to diagnosis of ophthalmic disease.* Survey of Ophthalmology, 2001, 46, 248-258.
5. Okhravi N. et al.: *RELP-mediated detection and specification of bacterial species causing endophthalmitis.*
6. Dzierżanowska D., Kamińska W.: *Zastosowanie metod biologii molekularnej do wykrywania genów oporności na antybiotyki*. Antybiotykoterapia i zakażenia, 2003, 23-30.
7. Krasemann Ch.: *Pobieranie i transportowanie materiałów do badań mikrobiologicznych.* Medycyna Praktyczna, Kraków, 1995, 14.
8. Jackson T.L. et al.: *Endogenous bacterial endophthalmitis: A 17-year prospective series and review of 167 reported cases.* Survey of Ophthalmology, 2003, 48, 403-423.
9. Kresloff M.S. et al.: *Endophthalmitis*. Survey of Ophthalmology, 1998, 43, 193-223.
10. Barza M. et al.: *Evaluation of microbiological techniques in postoperative endophthalmitis in Endophthalmitis Vitrectomy Study; the Endophthalmitis Study Group*. Arch. Ophthalmol., 1997, 115, 1142-1150.

X Jubileuszowe Sympozjum Sekcji Zapobiegania Ślepocie i Rehabilitacji Słabowidzących, PTO, Warszawa, 5-6 listopada 2004 r.

Praca wpłynęła do Redakcji 10.05.2006 r. (862).
Zakwalifikowano do druku 20.07.2006 r.

Adres do korespondencji (Reprint requests to):
lek. med. Małgorzata Pietraś-Trzpiel
II Klinika Okulistyki Akademii Medycznej w Lublinie
Ul. Chmielna 1
20-079 Lublin

Kwartalnik medyczny OKULISTYKA
czasopisma KONTAKTOLOGIA i OPTYKA OKULISTYCZNA
www.okulistyka.com.pl

ISSN 0023-2157 Index 362646