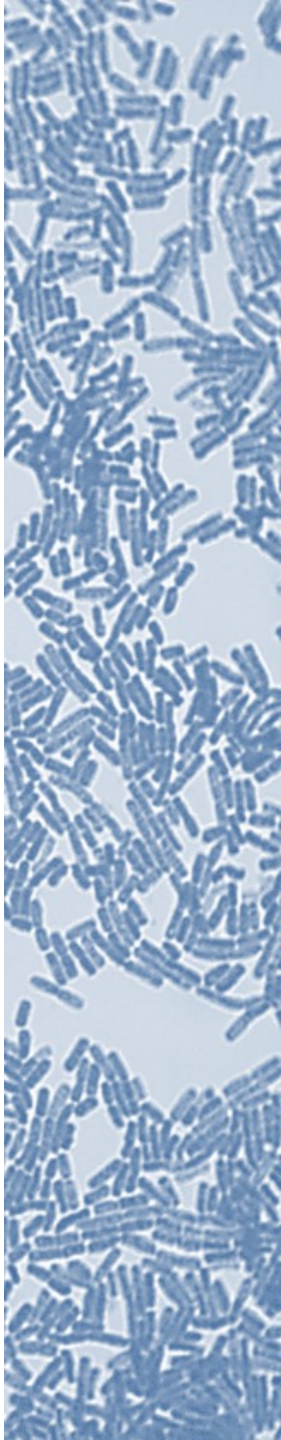
Detekce rezistence k antibiotikům – přehled laboratorních metod

RNDr. Hana Prátová, Ph.D.

pratova.hana@gmail.com

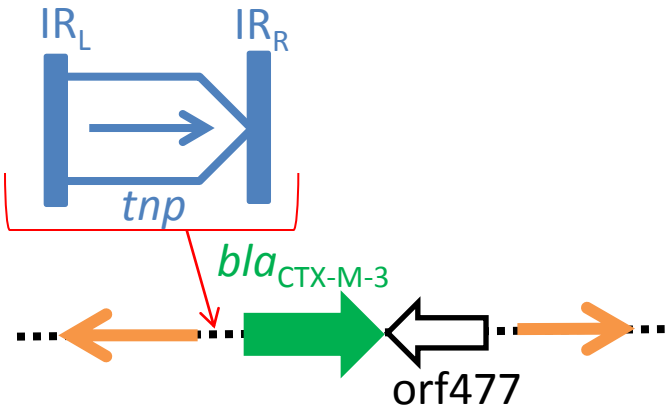


Testování citlivosti bakterií k antibiotikům

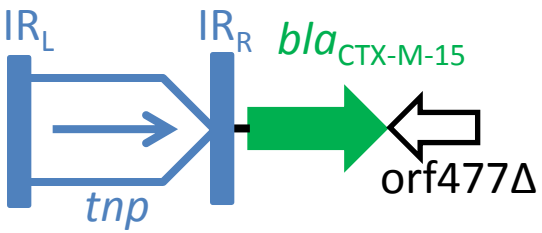
- S **rozvojem** a **rozšířením** rezistence k antibiotikům u bakteriálních patogenů vzrůstá potřeba rutinního testování citlivosti klinických izolátů → nastavení správné léčby
- Rozvoj rezistence – zachycení genů rezistence mobilními elementy, přenos genů mezi různými molekulami DNA a přestavby molekul DNA
- Rozšíření rezistence – přenos genů rezistence v populacích bakterií pomocí plazmidů, konjugativních transpozonů, aj.

IS*Ecp1*

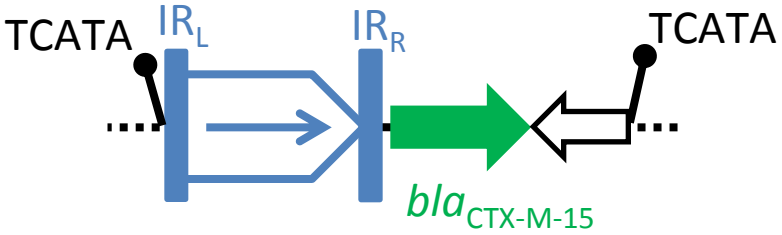
Kluyvera ascorbata
(chromozom)



IS*Ecp1*-*bla*$_{CTX-M-15}$-orf477Δ
(transpoziční jednotka)



pJIE113 (IncI1 plazmid)
E. coli, Sydney
pKDO1 (IncFII$_K$ plazmid)
K. pneumoniae, Brno



In vitro metody detekce rezistence k antibiotikům

Fenotypové metody

- Difúzní metody:
  - Disková difúzní metoda
  - E-test
- Diluční metody:
  - bujónová
  - agarová
- Testy pro detekci specifických mechanizmů rezistence

Molekulární metody

- Genotypové metody:
  - PCR
  - Real-time PCR
  - DNA-DNA hybridizace
  - Sangerovo sekvenování
  - Nová (a třetí) generace sekvenování
- Hmotnostní spektrometrie

Serologické metody

- Aglutinační testy

Detekce rezistence musí být prováděna u čistých bakteriálních kultur!

Výhody a nevýhody fenotypových a molekulárních metod

Fenotypové metody

Výhody:

- Nižší náklady
- Jednoduchost provedení
- Pro mnoho patogenů již nastavená interpretační kritéria (!ale pro některé chybí!)
- Nižší specifita – umožňuje zachytit i doposud nepopsané mechanizmy rezistence/mechanizmy rezistence zajištěné různými geny
- Fenotypová citlivost – kritérium využívané při výběru léčby

Nevýhody:

- Časová náročnost → zdržení cílené léčby

Molekulární metody

Výhody:

- Rychlost
- Vysoká specificita – detekce konkrétního mechanizmu rezistence

Nevýhody:

- Falešně pozitivní výsledek:
  - Detekce deletovaných/nefunkčních genů – izolát může být fenotypově citlivý
- Falešně negativní výsledek
  - Detekce pouze popsaných mechanizmů rezistence
- Vyšší náklady
- Vyšší kvalifikace pracovníků

Genotypové metody

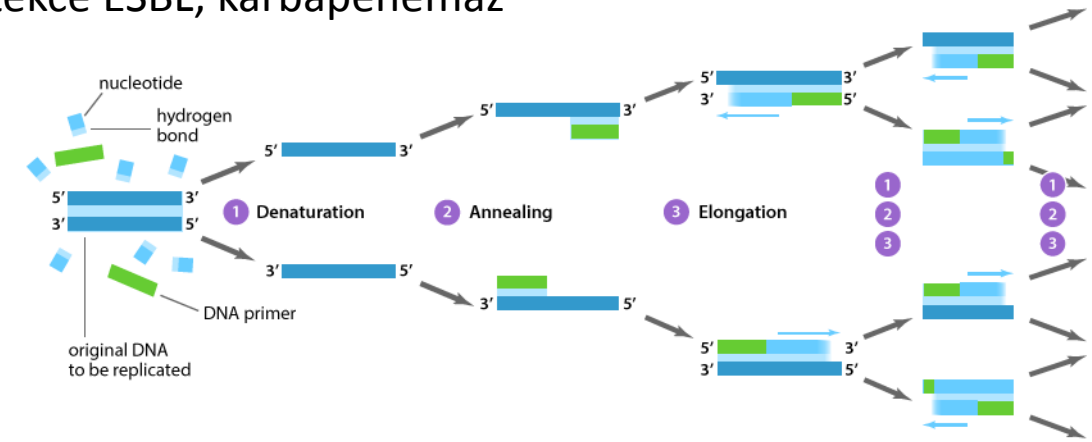
- **Výhody:** Rychlost získání výsledku, možný průkaz přímo v klinickém vzorku bez nutnosti kultivace (ale to neplatí o všech)
- **Nevýhody:** získání falešně negativního výsledku – detekce pouze známých mechanizmů rezistence; získání falešně pozitivního výsledku – detekce nefunkčních/deletovaných genů, které by se neuplatnily při použití daného léčiva

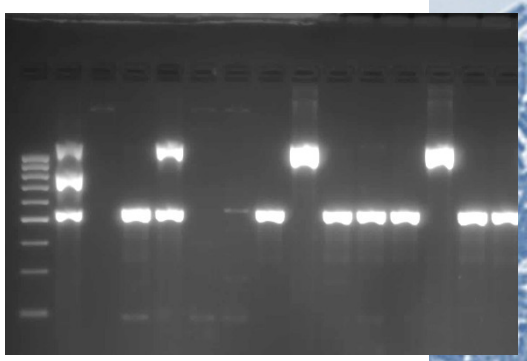
- PCR a elektroforéza
- real-time PCR = kvantitativní PCR (qPCR)
- DNA-DNA hybridizace - microarraye
- Sangerovo sekvenování
- Metody nové (a třetí) generace sekvenování

Konvenční PCR

- Založena na principu replikace DNA, amplifikace úseku DNA ohraničeného primery
- Vyhodnocení pomocí gelové elektroforézy – separace molekul DNA podle velikosti v elektrickém poli

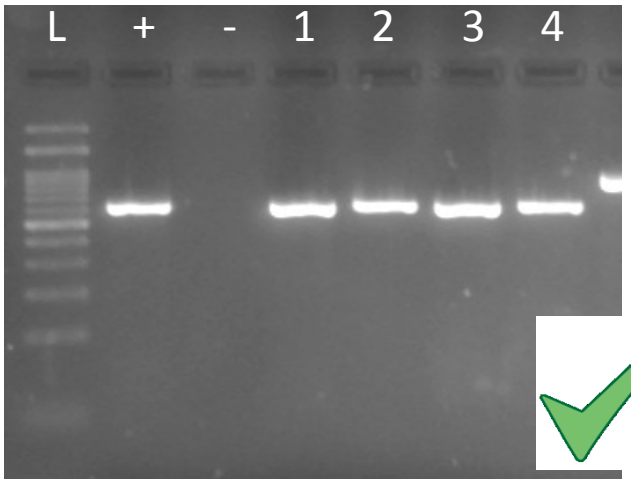
- simplexní PCR – detekce pouze 1 genu, význam např. při detekci nových případů při nemocniční epidemii
  - Na simplexní PCR může navazovat restrikční štěpení amplikonu – průkaz mutací v amplikonu, nebo Sangerovo sekvenování
- multiplexní PCR – detekce většího počtu genů, podmínky:
  - Vysoká specifita primerů, primery se nesmí navzájem vyvazovat, identické podmínky reakce pro všechny dílčí reakce, rozdílné velikosti jednotlivých amplikonů
  - Detekce ESBL, karbapenemáz





Hodnocení elektroforetogramů

Simplexní PCR

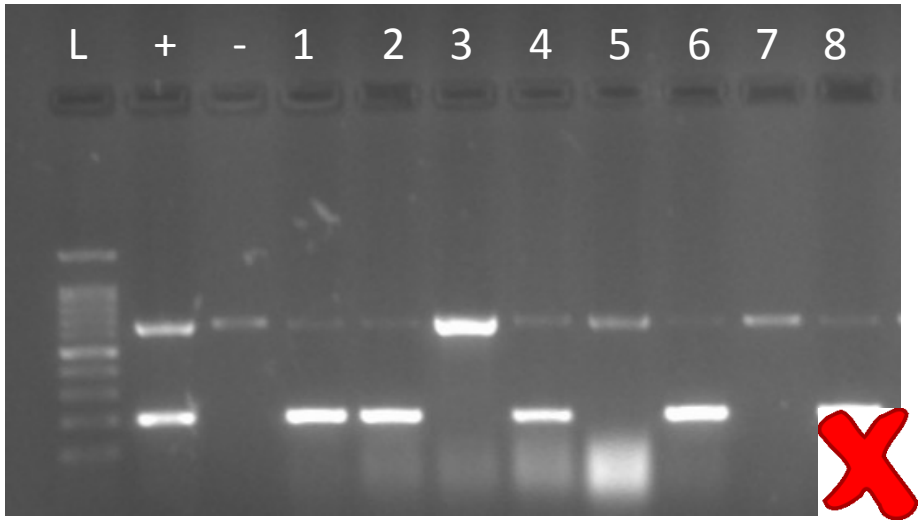


+ … Pozitivní kontrola – do každého řádku! – důkaz, že reakce proběhla standardně

- … Negativní kontrola – stačí do jedné komůrky gelu – důkaz, že nejsou kontaminované komponenty PCR směsi

L … Hmotnostní standard – fragmenty DNA o definované délce – do každého řádku! – pro odečet velikostí amplikonů

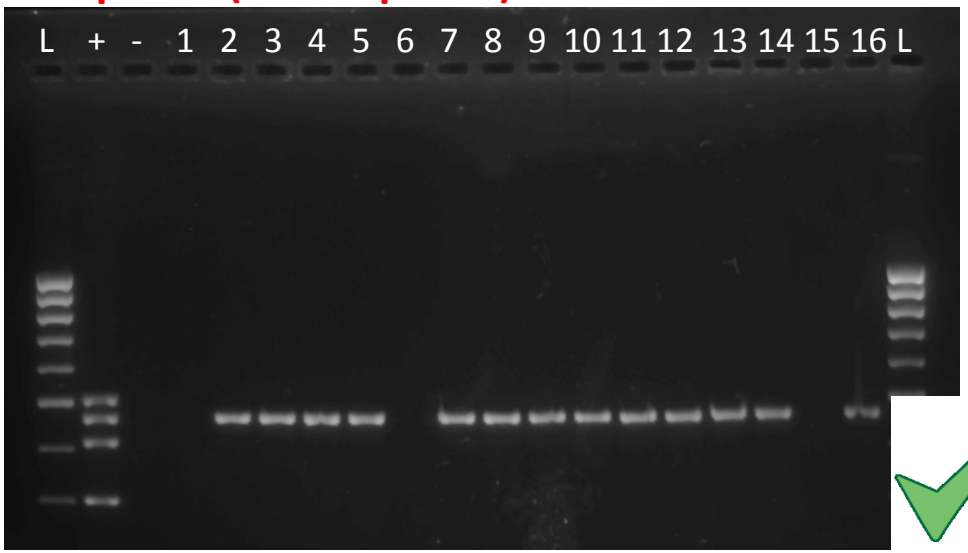
Multiplexní (duplexní) PCR



Kontaminace negativní kontroly! → použít novou PCR vodu, novou PCR směs, otestování stávajících primerů a případně příprava nových primerů

Hodnocení elektroforetogramů

Multiplexní (kvadruplexní) PCR

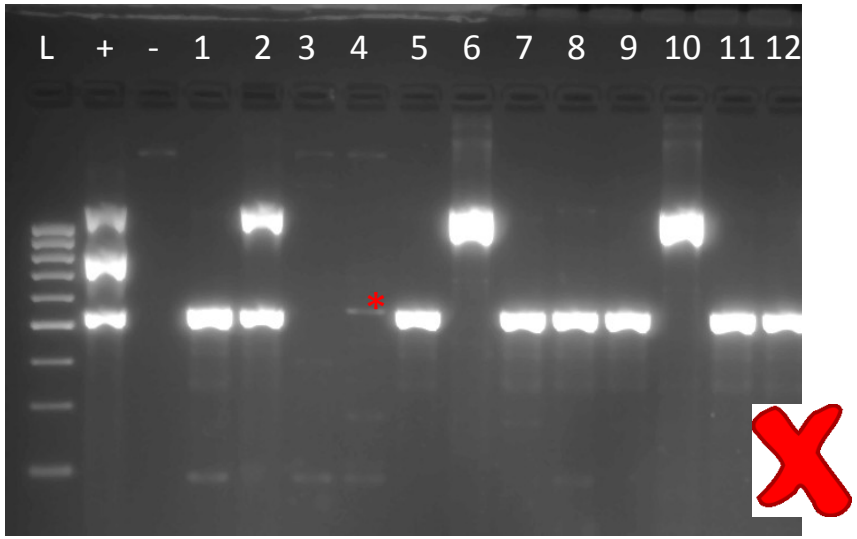


+ … Pozitivní kontrola – do každého řádku!

- … Negativní kontrola – stačí do jedné komůrky gelu

L ….Hmotnostní standard – fragmenty o definované délce – do každého řádku!

Multiplexní (kvadruplexní) PCR

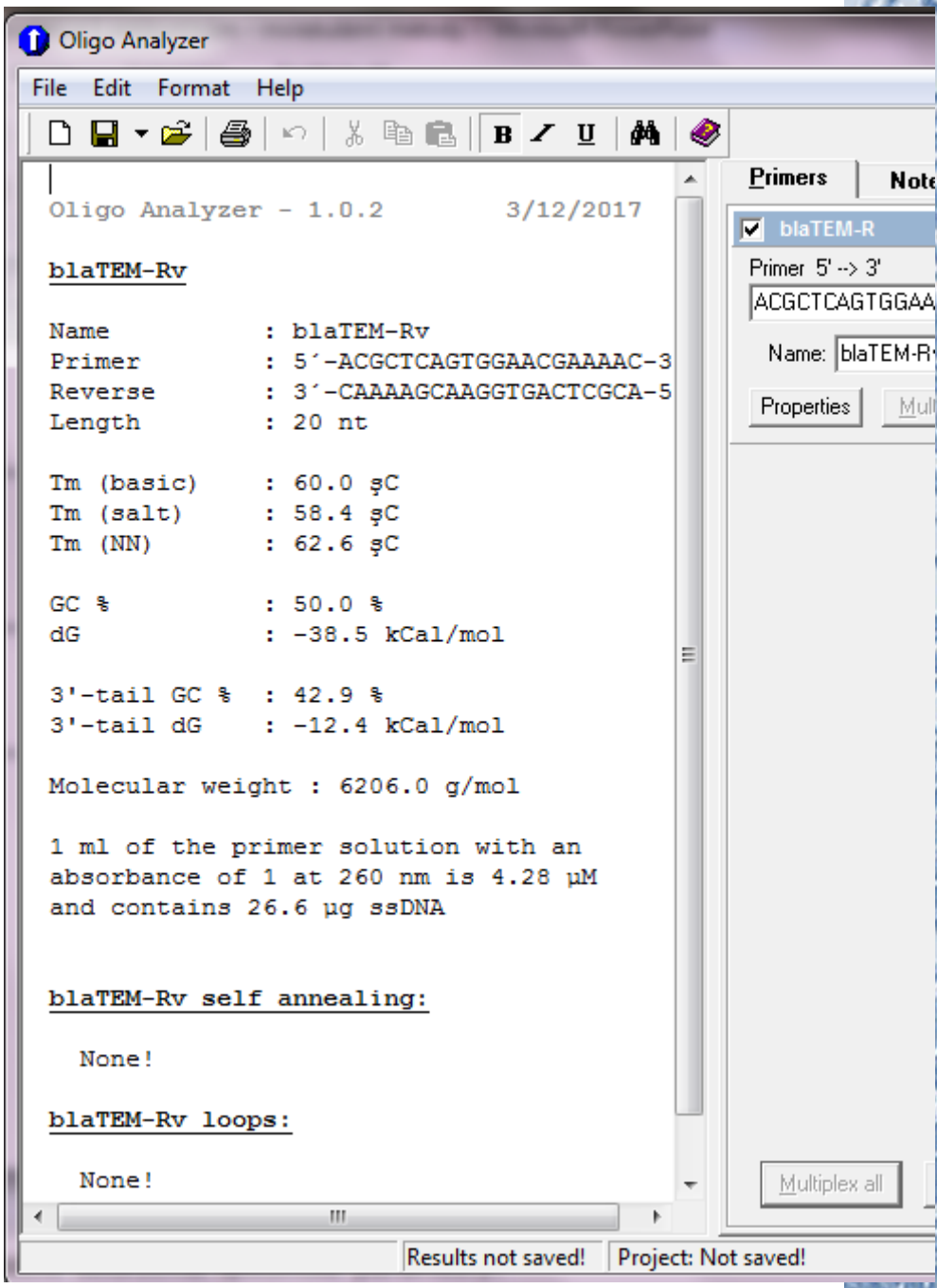


Kvadruplexní reakce … pouze 3 kontroly – dobrá amplifikace, u 4. genu – možná falešná negativita → ověření interakce primerů, příprava nových primerů a pozitivní kontroly, optimalizace PCR, rozdělení na duplexní/simplexní reakce, aj.

*Kontaminace izolátu – nutné přečištění kultury!!

Optimalizace PCR

- optimalizace parametrů reakce: optimalizace PCR směsi/volba komerční PCR směsi, design primerů, teplota připojení primerů, počet cyklů, čistota DNA, …
- PCR Toubleshooting Guide: např. https://www.neb.com/tools-and-resources/troubleshooting-guides/pcr-troubleshooting-guide
- Software/on-line nástroje pro návrh primerů:
  - OligoAnalyzer
  - Primer BLAST: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome - automatický návrh primerů, vhodnější je manuální návrh
  - Primer3: http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/ - automatický návrh primerů
- Primery pro detekci AMR – EURL AMR: https://www.eurl-ar.eu/CustomerData/Files/Folders/25-resourcer/459_primerliste-til-web-07-11-2018.pdf



Výhody a nevýhody PCR

Výhody:

- Získání výsledku - < 4 h – 24 h (v případě navazujících testů)
- Jednoduché provedení
- Relativně nízké náklady
- Možnost optimalizací multiplexních reakcí

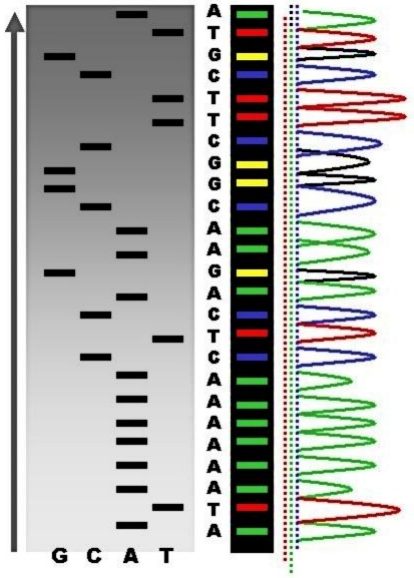
Nevýhody:

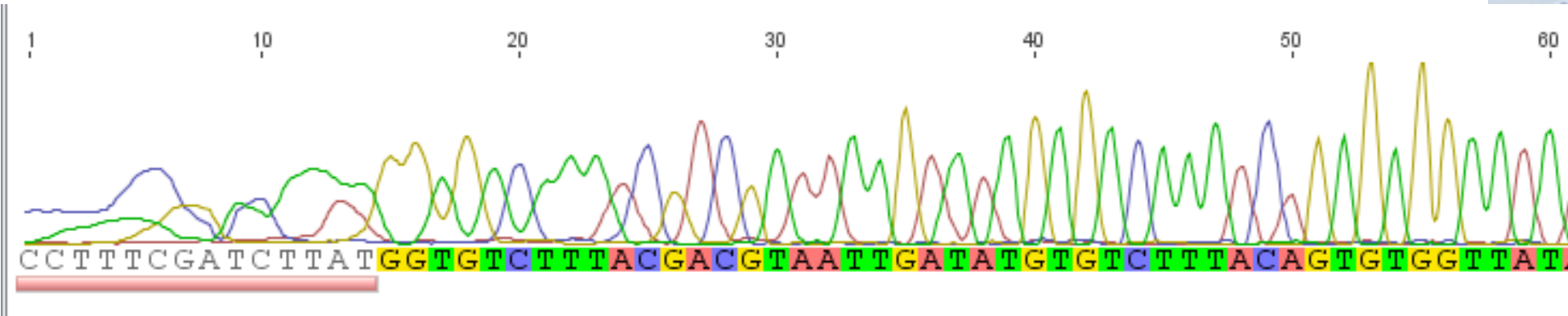
- Relativně vysoká koncentrace cílové sekvence – nutná předchozí kultivace a izolace DNA (ale! možnost provést colony PCR)
- Snížení citlivosti PCR - přítomnost inhibitorů PCR v klinických vzorcích (hemoglobin/heparin v krvi; soli kys. močové v moči, polysacharidy ve stolici apod.)

Sangerovo sekvenování

- Využívá procesu replikace, která je předčasně ukončena pomocí dideoxynukleotidů (ddNTP), každý ddNTP je označen fluorescenční značkou, separace různě dlouhých amplikonů probíhá pomocí kapilární elektroforézy

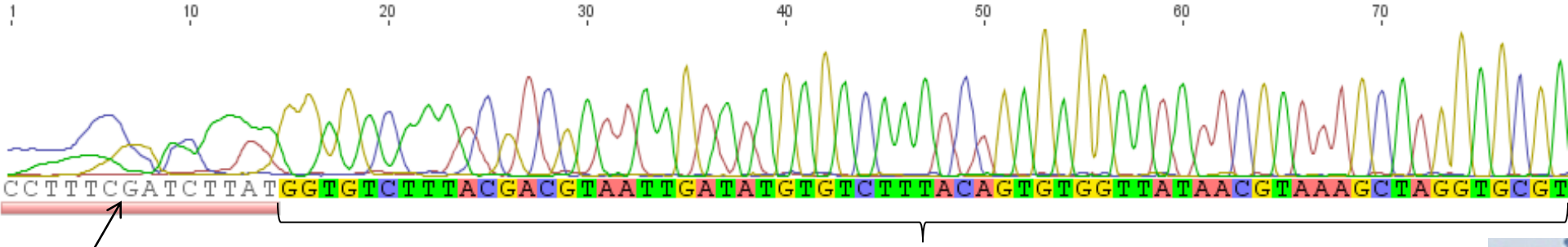
  - Jak hodnotit sekvenci?
    - Pomocí software: Chromas – vizualizace sekvencí; MEGA – alignment sekvencí; Geneious
    - Hodnotíme kvalitu sekvence a délku sekvence (Chromas/Geneious) – pozor na překrývající se píky --- známka kontaminace/více variant v jedné buněčné linii
    - „trimujeme“ konec sekvence (v některých případech není třeba) – odmažeme/zakryjeme nejasnou sekvenci





Sangerovo sekvenování - vyhodnocení

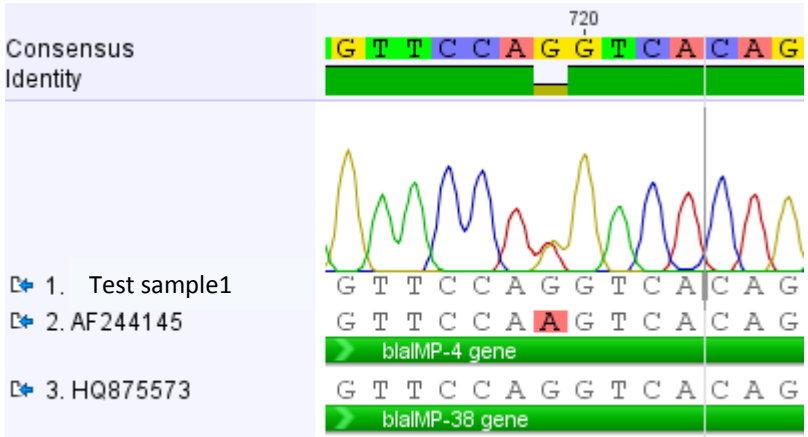
- Hodnověrná je sekvence od oblasti, kde nejsou překrývající se píky (ideálně odečítání od 50. nt)
- Délka chromatogramu 500 – 1000 bp



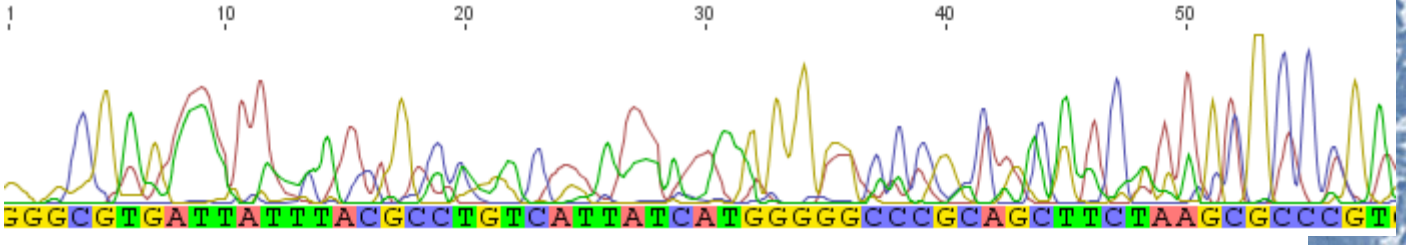
„trimování“ nehodnotitelné sekvence (růžový proužek)

Sekvence dobré kvality – ostré píky, nízká úroveň pozadí

směsné píky – kontaminace kultury/více kopií genu



Nehodnotitelná sekvence → nutné opakování sekvenace



Sangerovo sekvenování - vyhodnocení

- Jak určujeme alely genů rezistence?

Příklad enterobakterie:

- Pro základní orientaci předběžně určíme, o jakou cílovou sekvenci se jedná pomocí nástroje BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)

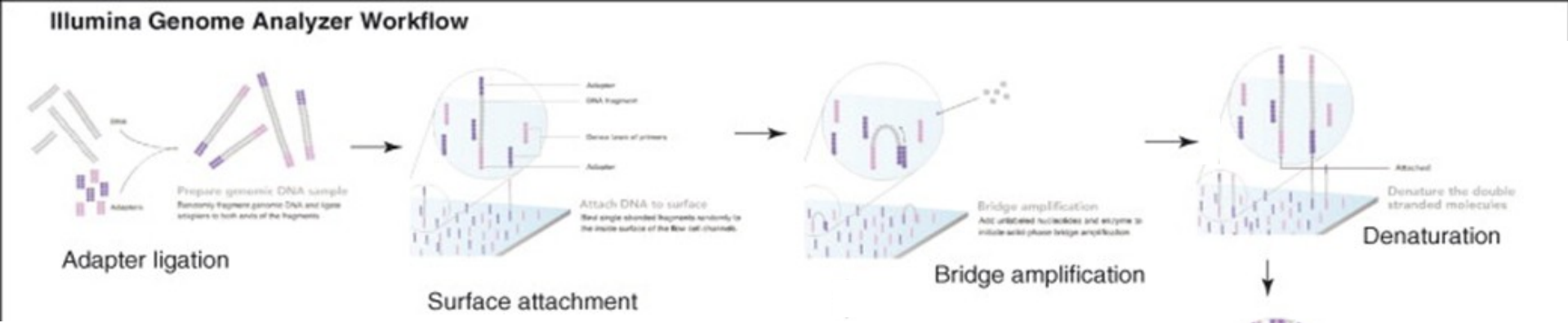
  nebo ResFinder (https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/)
- vyhledáme referenční sekvence... Tyto databáze poskytnou Accession Numbers v GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/):
  - Geny beta-laktamáz: http://www.lahey.org/Studies/
  - Geny PMQR: http://www.lahey.org/qnrStudies/
  - Geny *tet* a MLS: http://faculty.washington.edu/marilynr/
  - Integrony: http://integrall.bio.ua.pt/
  - Geny rezistence: http://ardb.cbcb.umd.edu/
- Porovnáme získanou sekvenci s referenční sekvencí pomocí software/on-line nástrojů: BLAST/MEGA/Geneious
- Pro správné určení alely je nutné porovnat tzv. „single-locus variants“ – tj. alely, které se od sebe liší pouze v jednom nukleotidu

Druhá/Nová generace sekvenování (NGS)

- Oproti Sangerovu sekvenování umožňují rozsáhlé paralelní analýzy, mají vysokou výkonnost a relativně nízkou cenu
- Zachytí různé cílové geny a umožňuje subtypizovat varianty genů
- Vyhledávání genů rezistence pomocí databází a bioinformatických přístupů, je možné provést opětovnou analýzu sekvencí po aktualizaci příslušných databází (*mcr-1*)
- Současné nevýhody pro rutinní diagnostické použití NGS:
  - Chybí „uživatelsky přátelské“ bioinformatické platformy

- 3 kroky: - příprava knihovny (náhodná fragmentace DNA a její označení)
  - Amplifikace fragmentů DNA = knihovny pomocí specifické PCR
  - Sekvenace - detekce světla/fluorescence/změny pH

- Různé technologie a přístupy:
  - 454 GS Junior/FLX (Roche) - založena na pyrosekvenování
  - **MiSeq/NextSeq (Illumina)** - nejvyšší výkonnost, nejméně chyb
  - SOLiD (Life Technologies) - Sequencing by Oligo Ligation Detection
  - Ion Torrent PGM (Life Technologies)

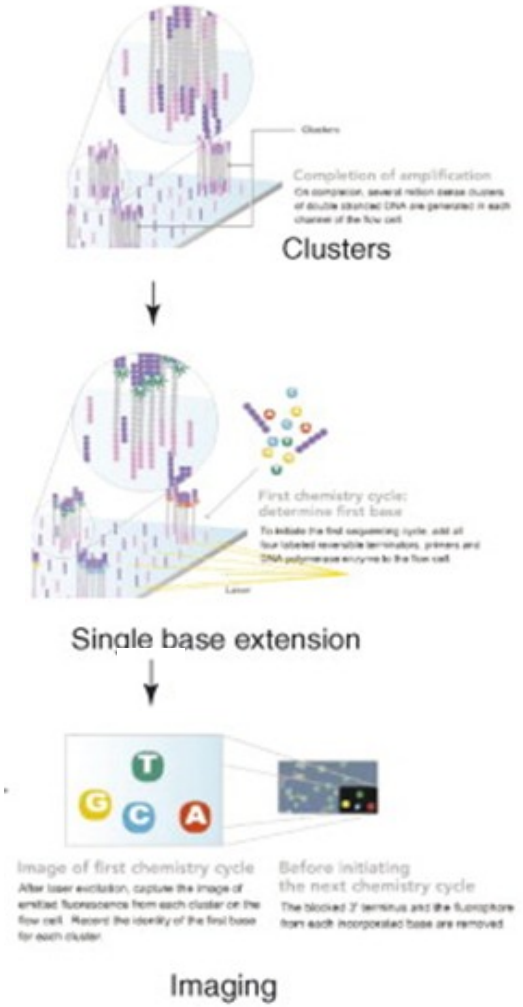


Illumina

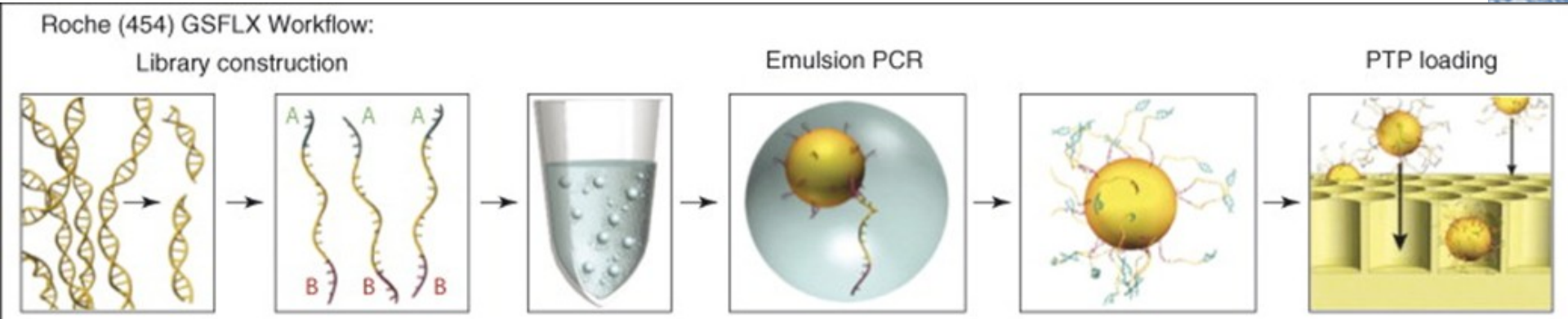
- Knihovna s adaptory je denaturována a navázána na speciální destičku (flowcell)
- „Bridge-amplification“
- Vytvoření skupin s identickou sekvencí DNA

- Sekvenování syntézou DNA - reverzibilní terminace amplifikace:
- Čtyři druhy NTs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) označené fluorescenční značkou detekovanou v reálném čase, fluorescenční značka ukončuje polymerizaci, po detekci je odštěpena, dochází k regeneraci 3‘-OH skupiny

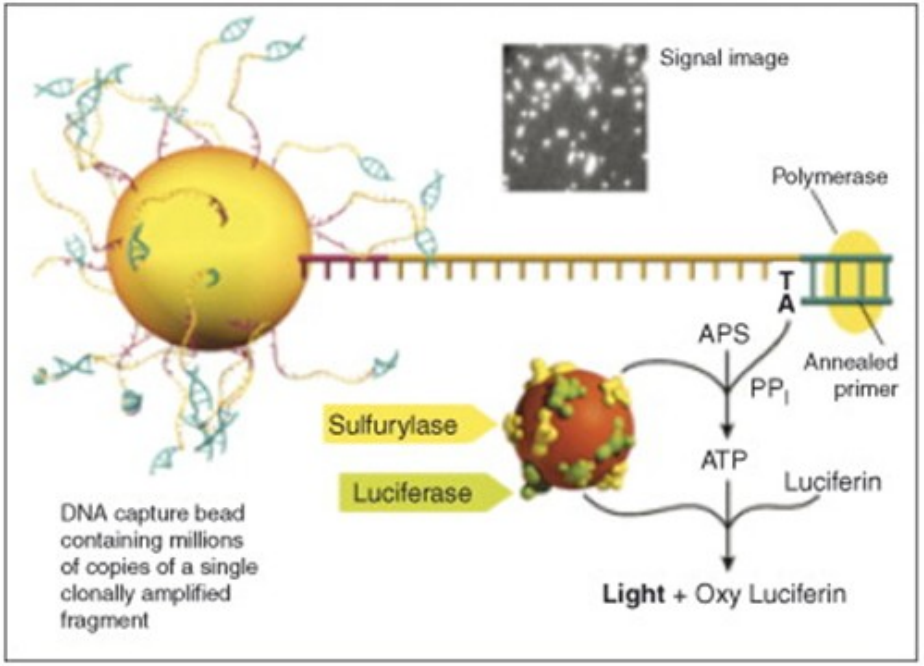
- Nízká cena, vysoká přesnost, relativně malá pracnost



Metoda 454 – nejstarší metoda NGS



- Detekce světla při syntéze DNA (uvolnění PP_i při začlenění NT)
- Velice pracné laboratorní zpracování
- Relativně vyšší cena/vzorek
- Časté chyby v homopolymerních oblastech
- V současné době už není podporována

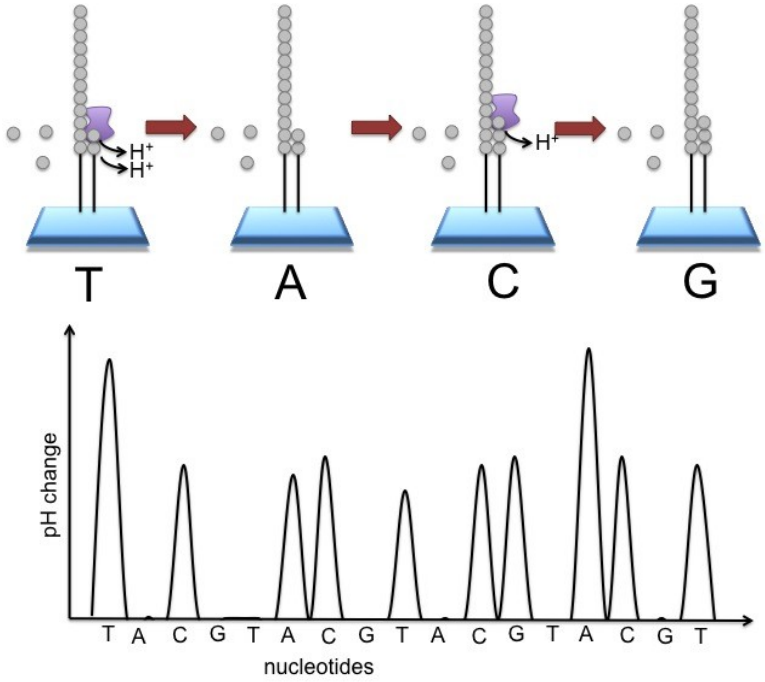


Pyrosequencing reaction

TRENDS in Genetics

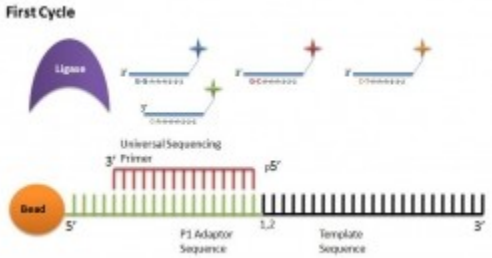
Ion Torrent

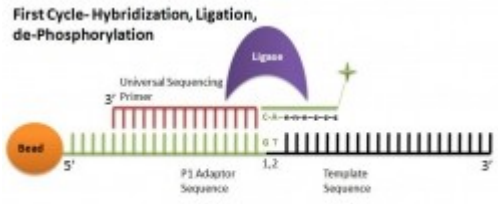
- Sekvenování na polovodičovém čipu
- Když je nukleotid inkorporován do řetězce DNA polymerázou – uvolní se proton --- měří se změna pH
- Vyšší rychlost, nižší cena, menší velikost sekvenátoru, příprava vzorku je 6-8 hodin
- Chyby v homopolymerních oblastech
- Tato technologie se uplatnila při epidemiologickém šetření epidemie vyvolané *Escherichia coli* O104:H4 v roce 2011 v Německu

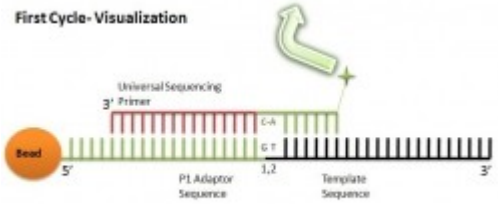


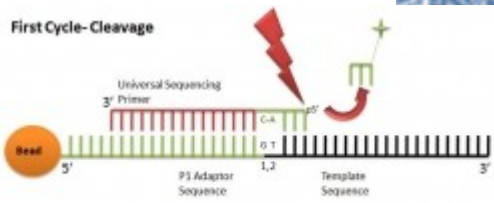
SOLiD - Sequencing by Oligo Ligation Detection

- Odvozená od schopnosti DNA ligázy detekovat a inkorporovat báze specifickým způsobem
- Knihovny jsou sekvenovány pomocí ligace sond
- Sondy obsahují ligační místo (2 báze na 3‘ konci sondy), restrikční místo, fluorescenční značku
- Fragmenty DNA navázané na kuličky jsou amplifikovány pomocí emulzní PCR
- Sonda komplementární k templátu je ligována k primeru, fluorescenční značka je odštěpena a detekována. Poté se opakují ligace s novými sondami. V druhém kole sekvenace je produkt prvního kola sekvenace odstraněn, k adaptorům se váže nový primer komplementární k sekvenci adaptoru o 1 nt směrem ke kuličce, opakují se ligace
- Sekvence je dedukována po několika cyklech (vysoká přesnost metody)









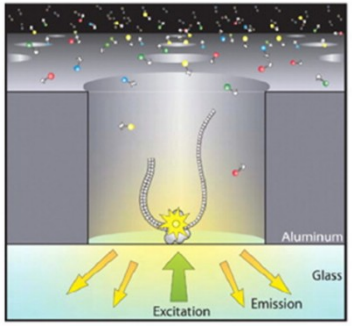
- Nevýhody: krátké ready, 7 dní pro provedení, náročné na zpracování dat, aj.

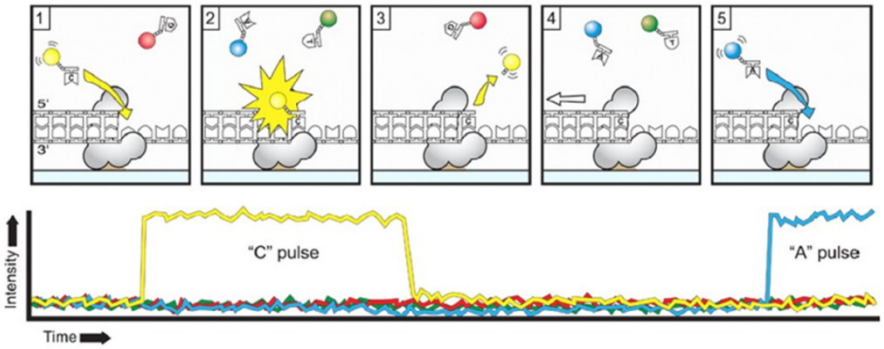
Třetí generace sekvenování

- Ve srovnání s novou generací sekvenování:
  - Sekvenace jedné molekuly DNA - nevyžaduje PCR před sekvenováním
  - Signál je zachycován v reálném čase
  - V současné době – vyšší chybovost než NGS

„Single-molecule real-time“ (SMRT) - Pacific Bioscience – 1 molekula ssDNA – templát; během reakce polymeráza inkorporuje NT, odštěpí jeho fluorescenční značku, signál je zaznamenán kamerou (formát videa)

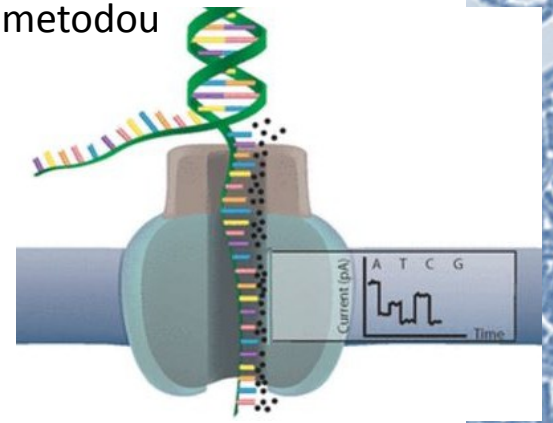
- Příprava vzorku 4-6 hodin místo několika dní (jako je u nové gen. sekv.), run trvá 1 den
- Délka readů vyšší (1300 bp) ve srovnání s NGS





„Nanopore sequencing“

- Nanopor = biopor s nanoprůměrem, který se vyskytuje v proteinovém kanálku ve dvojvrstvě fosfolipidů, která usnadňuje výměnu iontů
- Vložení vlákna ssDNA skrze α-hemolysinový por v transmembránovém kanálku
- Každý dNMP charakteristicky mění tok iontů, tok iontů je obnoven potom, co je nukleotid vytěsněn
- Změna toku iontů je detekována elektrofyziologickou metodou



Real-time PCR – kvantitativní PCR (qPCR)

- Umožňuje kvantifikaci amplikonu v reálném čase prostřednictvím detekce a kvantifikace fluorescenčního signálu
- Nutná optimalizace podmínek a kinetiky reakce
- V prvních cyklech je fluorescenční signál nízký
- Kvantifikační cyklus (Cq/CT) – bod, při kterém se zvýší intenzita fluorescenčního signálu nad limit detekce (reakce vstupuje do exponenciální fáze), intenzita fluorescenčního signálu proporcionálně koresponduje se vstupním množstvím templátové DNA ve vzorku
- Absolutní kvantifikace:
  - Srovnání amplifikace cílové sekvence se standardem o známé koncentraci (kalibrační křivka)
  - Stanovení počtu kopií dané sekvence v genomu, porovnání množství DNA ve dvou vzorcích
- Relativní kvantifikace:
  - mRNA – templát (RT-PCR – qPCR s reverzní transkriptázou)
  - Stanovení úrovně exprese cílové sekvence srovnané s konstantně exprimovaným genem

Real-time PCR – kvantitativní PCR (qPCR)

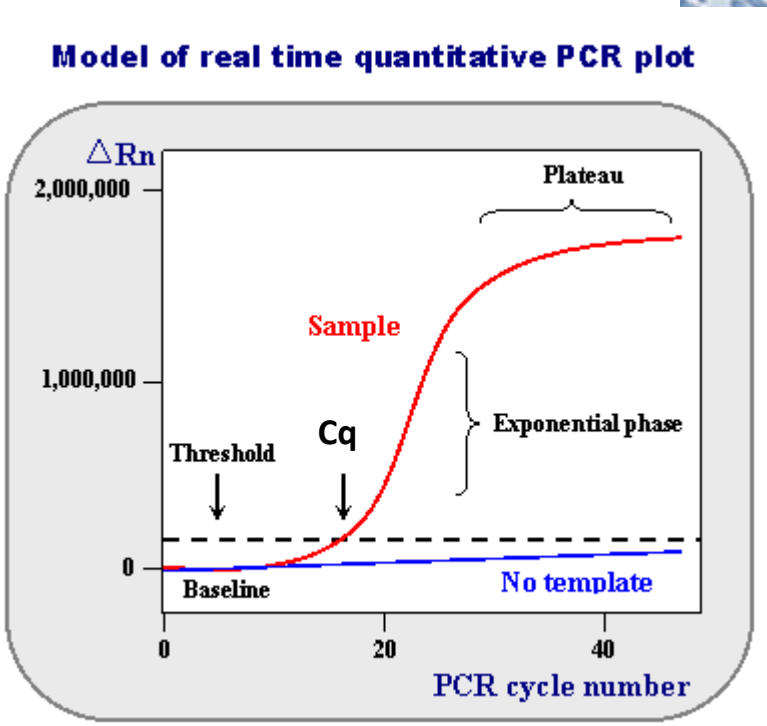
Nomenclature commonly used in real time quantitative PCR:

Baseline is defined as PCR cycles in which a reporter fluorescent signal is accumulating but is beneath the limits of detection of the instrument.

ΔRn is an increment of fluorescent signal at each time point. The ΔRn values are plotted versus the cycle number.

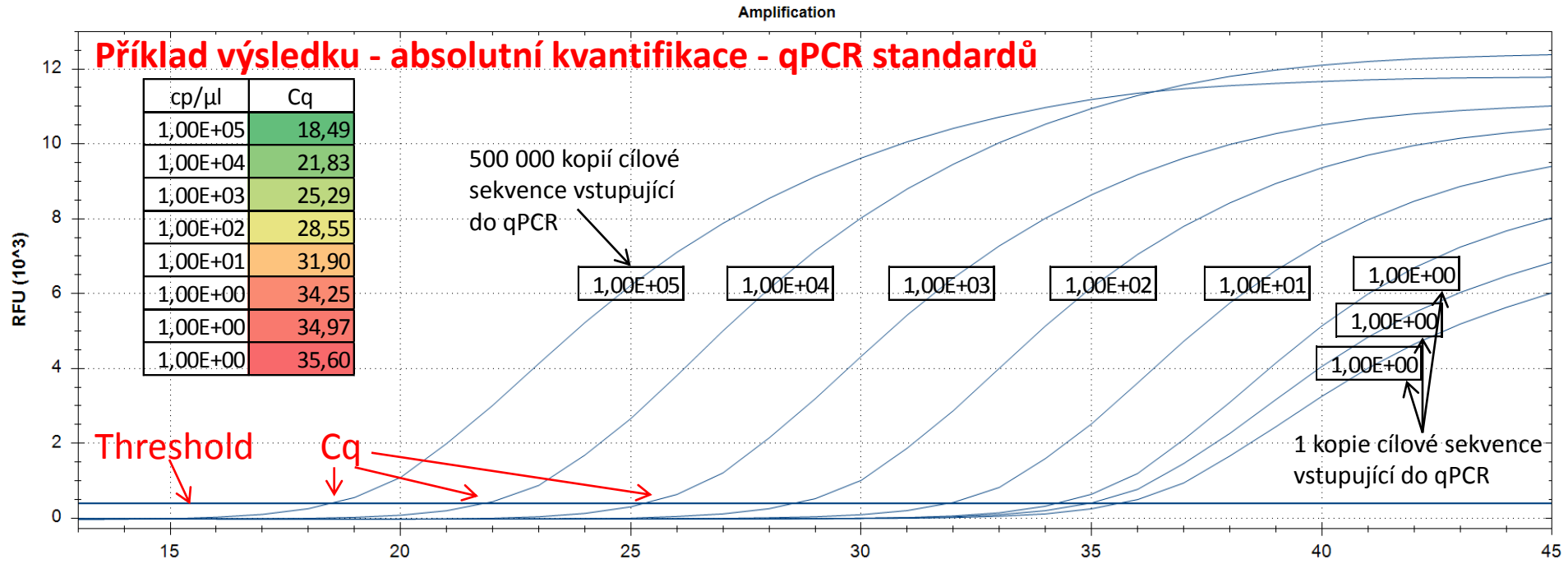
Threshold is an arbitrary level of fluorescence chosen on the basis of the baseline variability. A signal that is detected above the threshold is considered a real signal that can be used to define the threshold cycle (CT) = quantification cycle (**Cq**) for a sample. Threshold can be adjusted for each experiment so that it is in the region of exponential amplification across all plots.

Cq is defined as the fractional PCR cycle number at which the reporter fluorescence is greater than the threshold. The Cq is a basic principle of real time PCR and is an essential component in producing accurate and reproducible data.



Příklad výsledku - absolutní kvantifikace - qPCR standardů

cp/µl	Cq
1,00E+05	18,49
1,00E+04	21,83
1,00E+03	25,29
1,00E+02	28,55
1,00E+01	31,90
1,00E+00	34,25
1,00E+00	34,97
1,00E+00	35,60



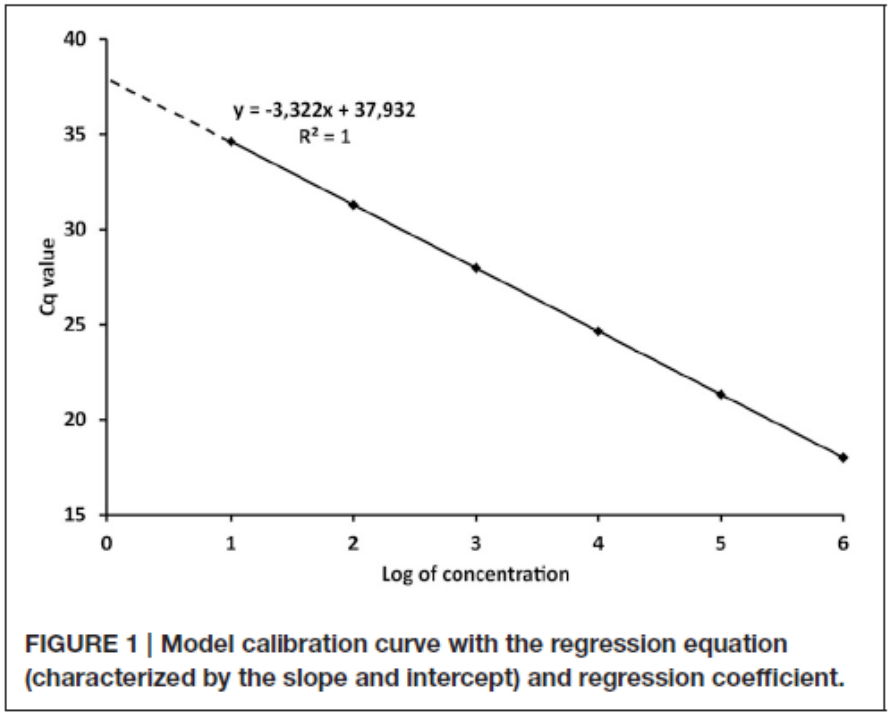
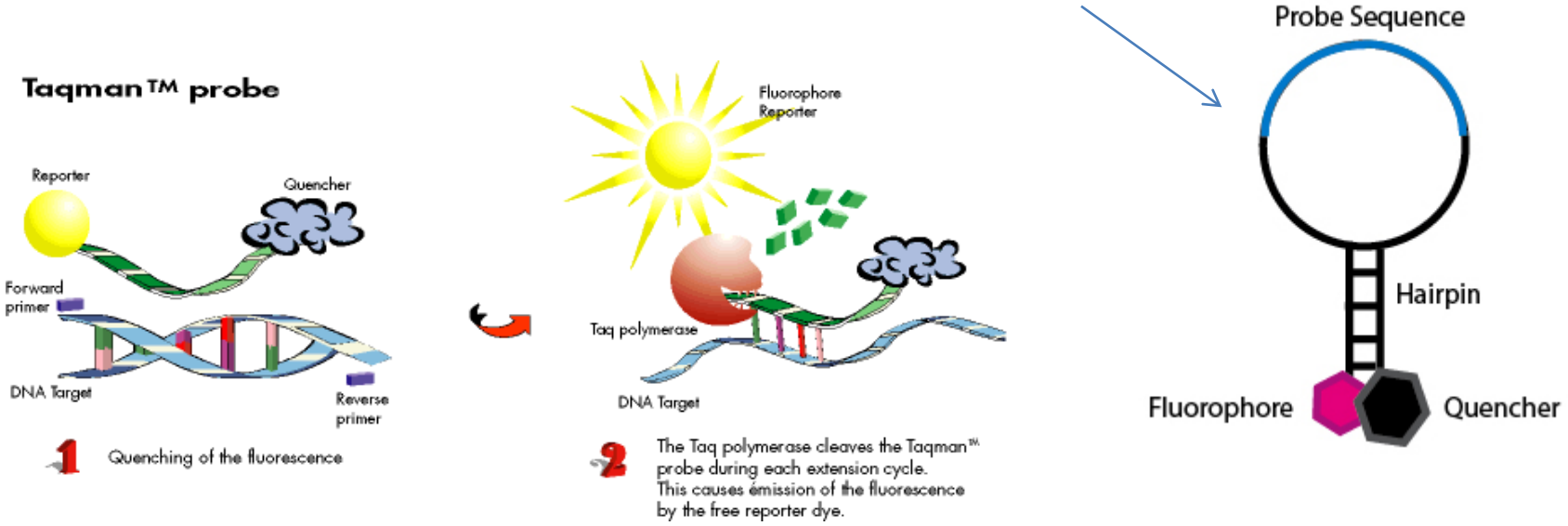


FIGURE 1 | Model calibration curve with the regression equation (characterized by the slope and intercept) and regression coefficient.

Real-time PCR – kvantitativní PCR (qPCR)

- Monitoring fluorescence:
  - Obecná – interkalační barvivo (SYBR Green, FAM, Cal Fluor Red, Hex,…)
  - Specifická – sondy TaqMan (fluorofor na 5‘ konci, „zhášeč“ = „quencher“ na 3‘ konci) – hybridizují se specifickou sekvencí, poté *Taq* polymeráza díky své exonukleázové aktivitě odštěpí fluorofor a oddělí ho od „zhášeče“--- emise fluorescenčního signálu
  - Specifická – sondy HYB – nesou dvě různé fluorescenční značky
  - Specifická – sondy tzv. „molecular beacons“ - v přítomnosti homologní sekvence za vhodné Tm dojde k oddělení zhášeče a fluoroforu



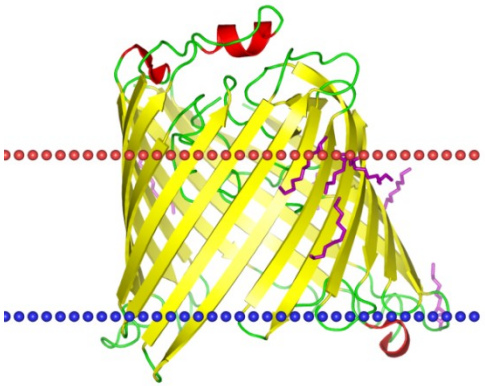
Real-time PCR – příklady aplikace

- „in-house“ vs. komerční qPCR

Simplexní qPCR

- Rozlišení alel:
  - Enterobakterie: *bla*$_{SHV}$ /*bla*$_{TEM}$ – rodina beta-laktamáz zahrnující úzkospektré i širokospektré beta-laktamázy
  - Enterobakterie: *bla*$_{CTX-M}$ – ESBL, rozlišení variant (TaqMan sondy) – rychlejší, nevyžaduje elfo, ani sekvenaci
  - Pomocí qPCR: odlišení variant genů; počet kopií genu – zhodnocení efektu mobilního genetického elementu
- Nízký detekční limit - detekce genů přímo z klinického vzorku (moči/stolice) – některé z těchto metod nižší detekční limit než kultivační metody

- Kvantifikace exprese genů porinů OmpK35 a OmpK36 u *Klebsiella pneumoniae* rezistentní ke karbapenemům[2]



Multiplexní qPCR - možné rozlišit více genů v reakci podle různých Tm (např. detekce druhu patogena a jeho genů rezistence – detekce MRSA)

[1]Naas, T. et al. AAC 2011, 55: 4038–4043.
[2]Landman, D. et al. JMM 2009;58:1303–1308.

Real-time PCR – výhody a nevýhody

Výhody:

- Rychlost (nevyžaduje elektroforézu/sekvenování v některých případech)
- Vysoká senzitivita (sondy TaqMan/HYB) – umožňuje rozlišit cílovou sekvenci/různé cílové sekvence v multiplexní reakci

Nevýhody:

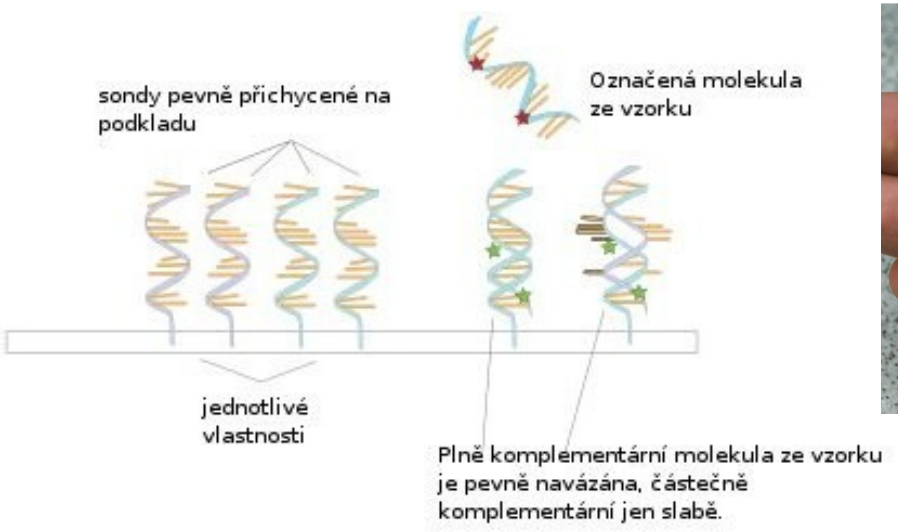
- Interkalační barviva se mohou včlenit mezi dimery primerů – v diagnostice se využívají téměř výlučně sondy pro detekci cílové sekvence

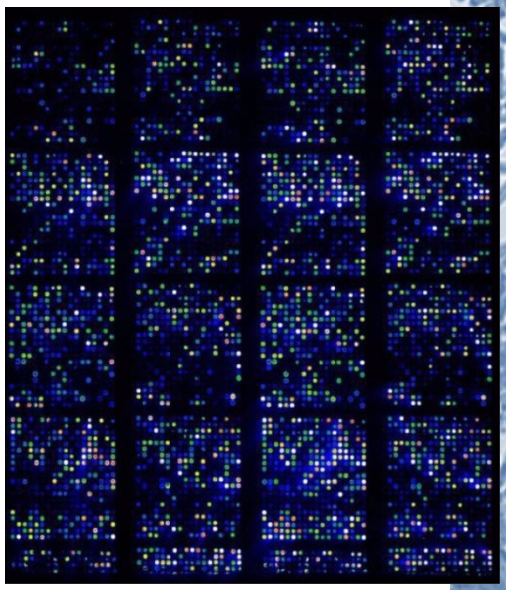
„In-house“ qPCR

- Nutná optimalizace – nutno brát v úvahu Tm primerů i sond
- horší reproducibilita (pro dobrou reproducibilitu nutnost standardizace přípravy DNA, správná interpretace dat)

DNA microarray/DNA čipy

- metoda založena na DNA-DNA hybridizaci
- Simultánní identifikace a částečná charakterizace velkého množství genů (>1000)
- Sondy specificky navázané a imobilizované na pevném povrchu DNA čipu
- Analyzovaný vzorek DNA je fluorescenčně označen, v případě, že se vyskytuje ve vzorku sekvence komplementární k sondě – hybridizace
- Detekce fluorescenčního signálu – získání velkého množství dat – bioinformatická analýza
- „in-house“/komerčně vyráběné





DNA microarray/DNA čipy

- Souběžná identifikace bakteriálního druhu izolátu a jeho profilu rezistence
- **Příklad -** CapitalBio DNA microarray pro detekci *M. tuberculosis* a jeho profilu rezistence:
  - Identifikace: oligonukleotidové sondy navržené pro 16S rRNA *M. tuberculosis*
  - Stanovení profilu genů rezistence: oligonukleotidové sondy pro detekci mutací v *rpoB* (rezistence k rifampicinu), *inhA* a katG (rezistence k izoniazidu)

Výhody:

- Velká analytická kapacita
- Detekce důležitých SNPs – detekce alel
- Screening velkého počtu izolátů
- Jednoduchost provedení

Nevýhody

- Relativně nižší rychlost (6-8 h vč. extrakce DNA)
- Možnost zkřížených reakcí
- Detekce známých/zahrnutých genů
- Relativně vyšší cena

Hmotnostní spektrometrie – MALDI - TOF

- „Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectroscopy“
- Pro detekci mechanizmů rezistence zatím omezené použití
- Aplikace:
  - Identifikace samotného antibiotika a produkty jeho modifikace/degradace
  - Detekce proteinů zodpovědných za rezistenci – nutná částečná purifikace proteinů

Příklad: Identifikace beta-laktamů a jejich degradačních produktů

- bakteriální kultura je inkubována s beta-laktamy, kultura je centrifugována a supernatant je analyzován
- Detekce jediného mechanizmu rezistence - produkce beta-laktamáz, pro odhalení jiných mechanizmů je nutné zvolit jinou metodiku MALDI-TOF

- **Výhody:** rychlost, nízké provozní náklady
- **Nevýhody:** vysoká pořizovací cena hmotnostního spektrometru, v současné době omezené aplikace, není vyjasněna specifita a senzitivita MALDI-TOF u enzymů s nižší afinitou, nebo malou katalytickou aktivitou

Serologické metody - Aglutinační test

- Založeny na aglutinaci suspenze mikročástic obalených specifickými protilátkami
- Vhodné pro rychlý screening rezistence u kolonií čisté kultury, pokud je hledaný mechanizmus rezistence spojený s jedním antigenem exprimovaným na povrchu buněk
  - detekce MRSA - tzv. „penicillin binding protein 2a“ (PBP-2a)
- Vysoká specifita, spíše nižší citlivost z různých vzorků
- Nevhodné pro screening komplexních profilů rezistence spojené se strukturně odlišnými enzymy (ESBL/karbapenemázy)

Další možné metody detekce rezistence

- „PCR/Electrospray Ionization Mass Spectrometry“ (PCR/ESI MS)
- Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)
- Flow cytometrie
- Denaturační vysokoúčinná kapalinová chromatografie (dHPLC)
- „Microchip gel electrophoresis“
- „FilmArray“
- Technologie Luminex xMAP

- ....a řada dalších….

Díky za pozornost!