

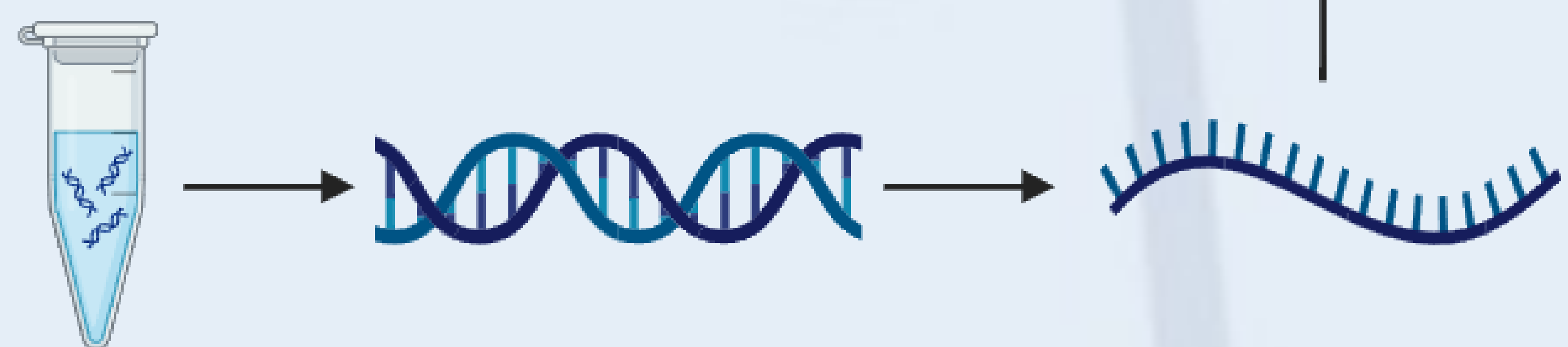
Typering van *Streptococcus pneumoniae* met behulp van real-time multiplex PCR

Laetitia Luca, Kurt Beuselinck, Katrien Bruyninckx - Centrum voor Moleculaire Diagnostiek

Inleiding

Streptococcus pneumoniae kan voor lage luchtweginfecties met hoge mortaliteit zorgen. De belangrijkste virulentiefactor van de pneumokok is de polysaccharide capsule die voor verschillende serotypes zorgt. In 2007 wordt het eerste pneumokokken conjugaat vaccin (PCV) op de markt gebracht.

In 2022 werd een nieuw PCV op de markt gebracht die bescherming biedt tegen 20 types pneumokokken. In dit onderzoek wordt er nagegaan of de typering hiervan uitgevoerd kan worden met negen real time multiplex 'polymerase chain reaction' (PCR) reacties met 27 primer/probe sets.



Figuur 1: verloop van real-time PCR gebruikmakend van het principe van de Taqman-probe.

Methode

Extractie en verdunningsreeks

Vooraleer de PCR ingezet kan worden dient het desoxyribonucleïnezuur (DNA) eerst geëxtraheerd te worden. Gedurende de extractie wordt een labo-eigen zeehondenvirus als interne controle (ZICD) meegenomen. Op deze manier kunnen afwijkingen (minder goede extracties) en eventuele fouten gedetecteerd worden.

Er wordt vervolgens een verdunningsreeks van de extracten gemaakt en gepipetteerd om de PCR-efficiëntie te kunnen berekenen. Voor het maken van de verdunningen wordt een diluent gebruikt waar een plasmide van de ZICD aan werd toegevoegd. De verdunningen van de extracten beginnen op 10^{-2} en worden verder 1/10 verdund tot de verdunning 10^{-6} wordt bereikt. De PCR-mix wordt gemaakt met een eindconcentratie van $0,25 \mu\text{M}$ 'forward' en 'reverse' primer en $0,20 \mu\text{M}$ probe.

Duplex PCR

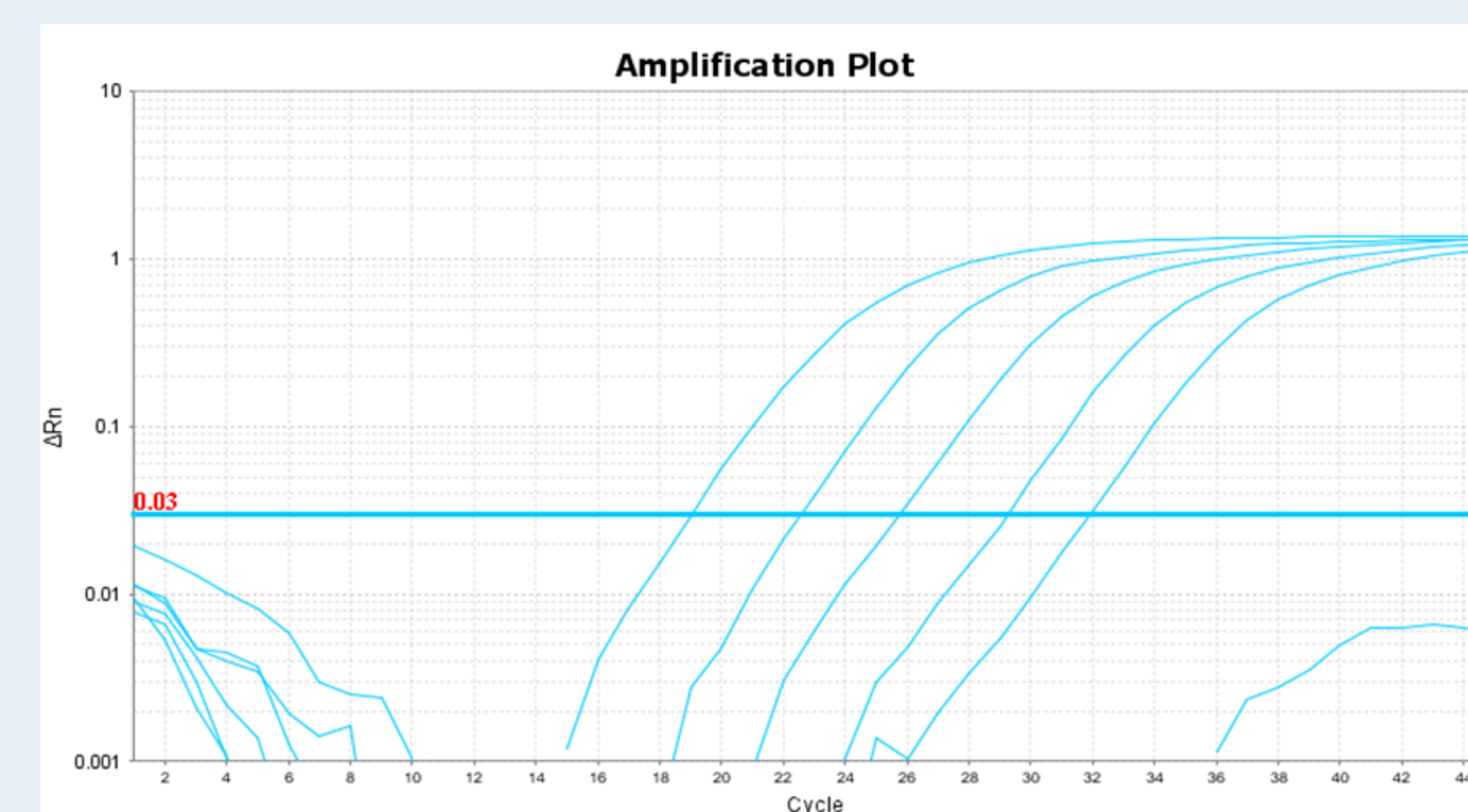
Na het voorbereidend werk worden de PCR platen ingezet. Eerst zullen alle pneumokokken ingezet worden op duplex (met ZICD) real-time PCR om voor elk individueel serotype de performantie van de PCR na te kijken. Ook wordt er telkens op de 10^{-2} verdunning een algemene pneumokokken PCR ('autolysin encoding' gen (lytA-gen)) uitgevoerd als referentie voor de aanwezige hoeveelheid pneumokokken DNA.

Multiplex PCR

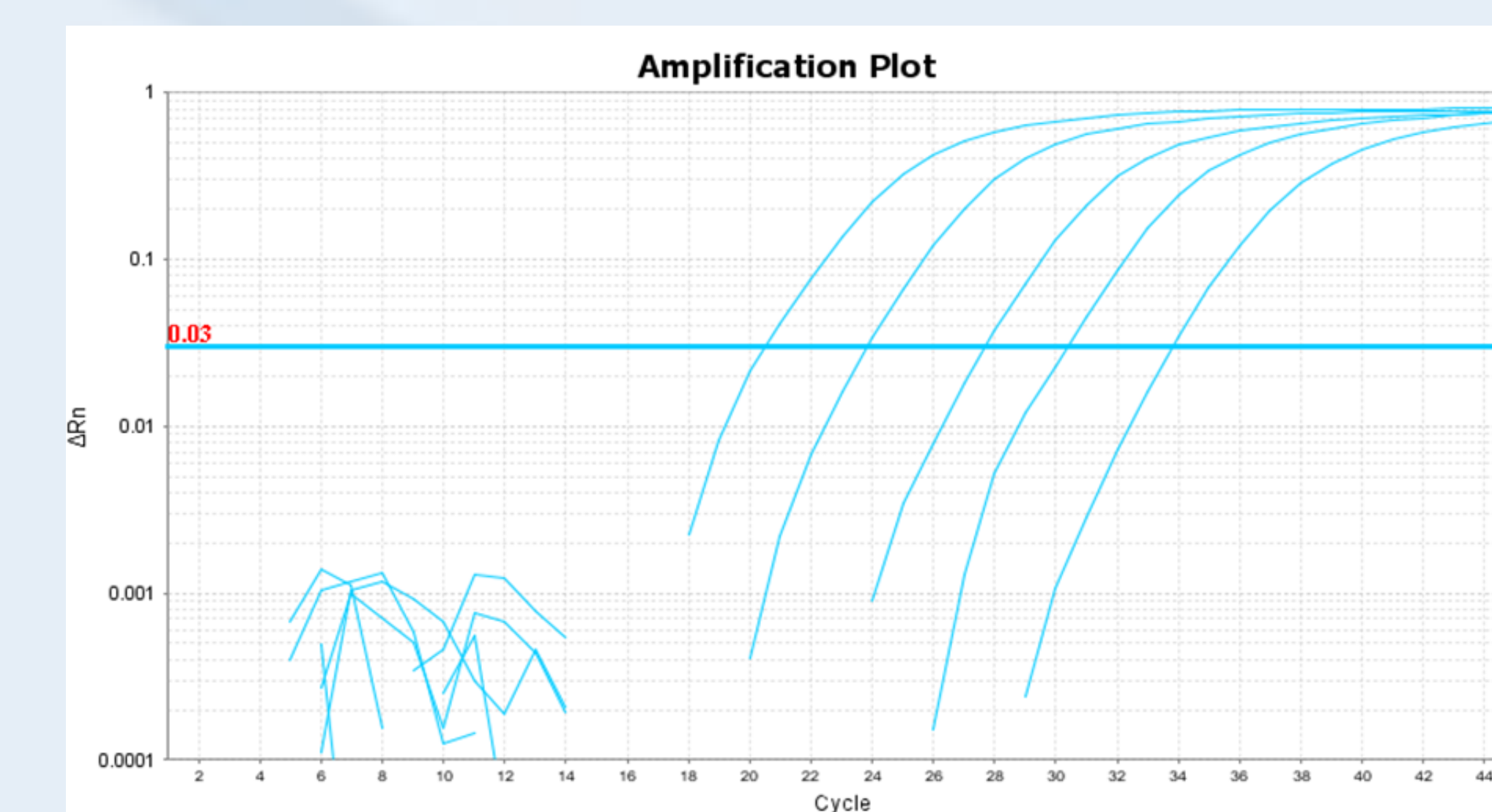
Na het meten van de duplex PCR voor elk serotype wordt de multiplex PCR ingezet. Hiervoor worden de primers en de probes volgens bijstaande tabel samengevoegd. De PP-mixen worden gemaakt opdat deze dezelfde primer- en probeconcentratie bevatten als voor de duplex PCR. Hier zijn echter een aantal uitzonderingen op.

Resultaten

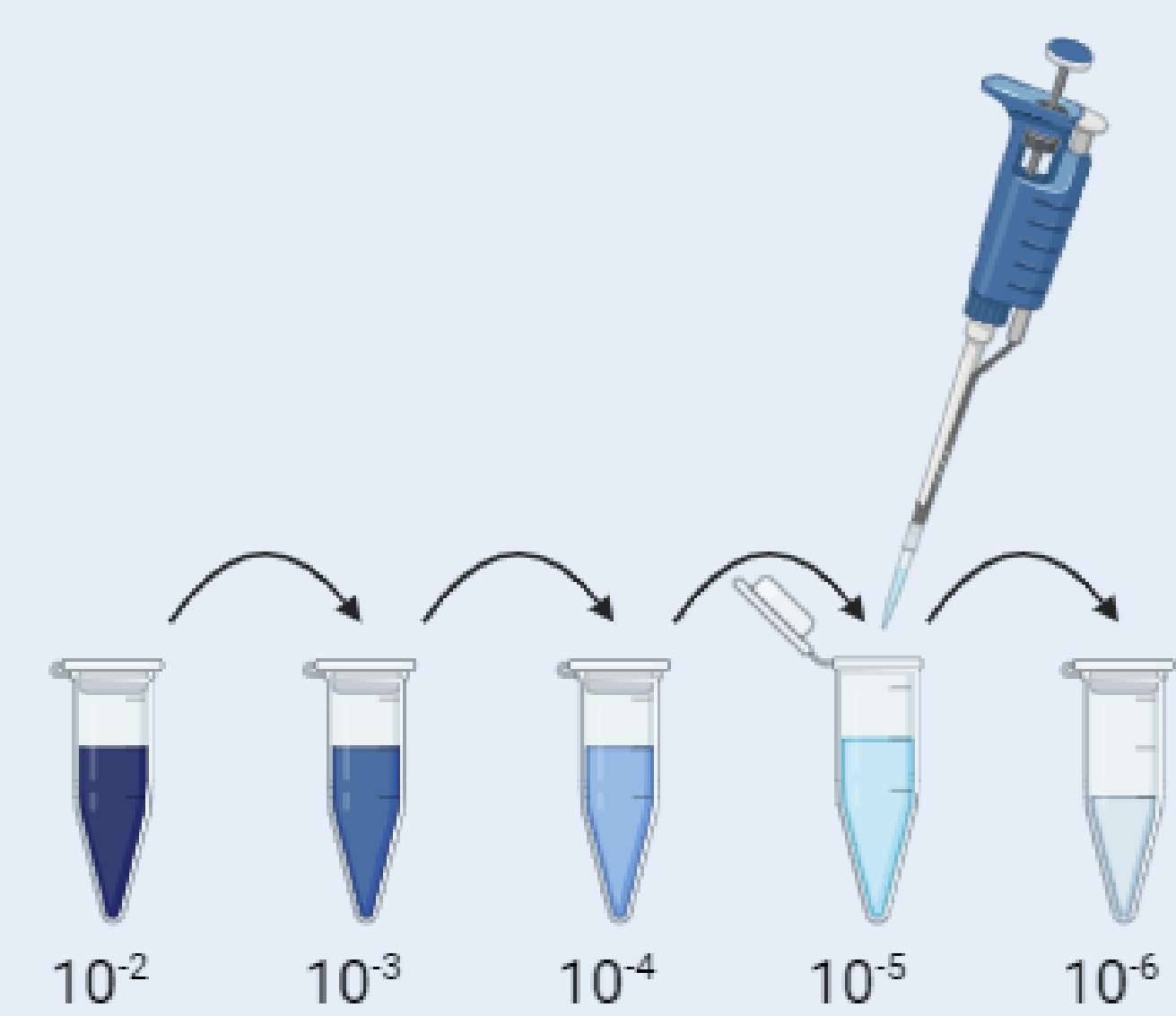
Voor het evalueren van de resultaten van zowel de duplex als multiplex real-time PCR worden drie methoden gebruikt. Zo zal eerst de PCR-efficiëntie van de duplex PCR vergeleken worden met deze van de multiplex PCR. Vervolgens wordt eveneens de 'cycle threshold' (Ct-waarde) van deze PCR's naast elkaar gelegd en beoordeeld. Tenslotte wordt er gekeken naar het resultaat van de lytA op de 10^{-2} verdunning en deze van de serotype specifieke PP-mix.



Figuur 3: Amplificatie plot van de duplex PCR reactie, resultaat voor parameter PN-12F44 op serotype 12F.



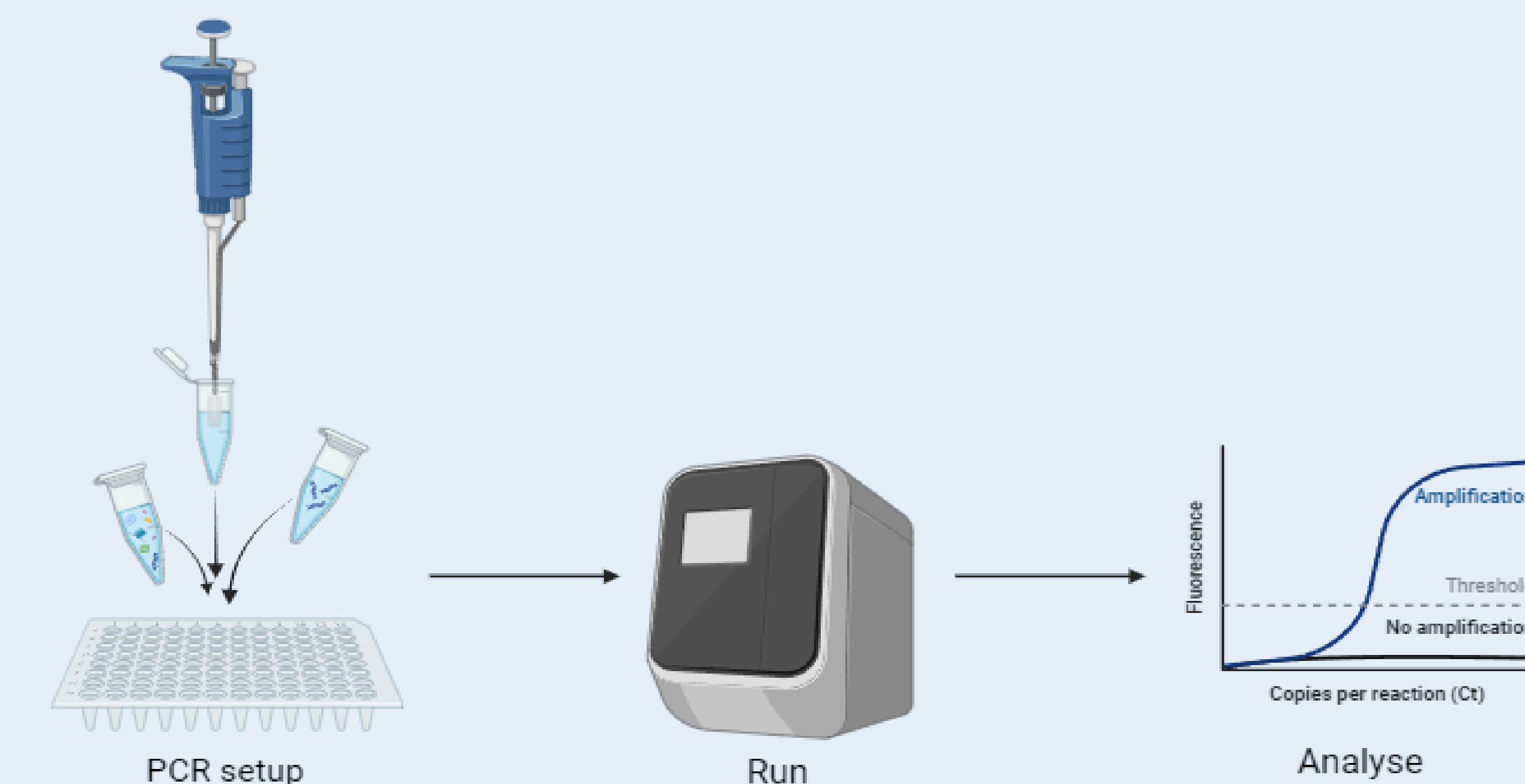
Figuur 4: Amplificatie plot van reactie 1 van de multiplex PCR, resultaat voor parameter PN-12F44 op serotype 12F.



Figuur 2: De verdunningsreeks startend van een 10^{-2} verdunning tot en 10^{-6}

Tabel 1: Verdeling van de primer en probe mixen over de 9 multiplex reacties.

Reactie	PP-mix	Reactie	PP-mix	Reactie	PP-mix
1	3	4	4	7	15BC
	9VA		10A		18CB
	12F		19F		33AF
2	19A	5	1	8	22AF
	8		14		22A
	11		23F		22F
3	6AB	6	5	9	6
	6BD		7AF		23A
	6CD		24		23B
					lytA



Figuur 5: Overzicht van de methode voor het inzetten van real-time PCR met behulp van de QuantStudio Dx

Conclusie

Uit het onderzoek wordt geconcludeerd dat de resultaten verkregen met de multiplex PCR reacties voldoende overeen komen met deze van de duplex PCR. Ook de Ct-waarden van de lytA PCR komen overeen met deze van de specifieke PP-mixen. Echter zal verder onderzoek nodig zijn waarbij alle verschillende serotypes op alle negen real-time multiplex reacties worden gemeten om interferentie of kruisreacties uit te sluiten. Indien hier vals positieven worden waargenomen kan men verder onderzoeken hoe de sensitiviteit van deze mixen verhoogd kunnen worden, opdat de test optimaal werkt om vervolgens in de routine te kunnen implementeren.

Referenties

[1]Velusamy S, Tran T, Mongkolrattanothai T, Walker H, McGee L, Beall B. Expanded sequential quadriplex real-time polymerase chain reaction (PCR) for identifying pneumococcal serotypes, penicillin susceptibility, and resistance markers. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2020 Jun;97(2):115037. [2]Pimenta FC, Roundtree A, Soysal A, Bakir M, du Plessis M, Wolter N, et al. Sequential triplex real-time PCR assay for detecting 21 pneumococcal capsular serotypes that account for a high global disease burden. *J Clin Microbiol.* 2013 Feb;51(2):647–52. [3]Stefanie Desmet. *Streptococcus pneumoniae* in conjugate vaccine period. 2022. [4]Biomérieux. NUCLESENS easyMAG. 2023. [5]Thermo Fisher Scientific. QuantStudio Dx Real-Time PCR Systems. 2024.