

## MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA INFEKTIVNIH BOLESTI U PEDIJATRIJSKIH BOLESNIKA

SNJEŽANA ŽIDOVEC LEPEJ, MARIJA GUŽVINEC\*

*U suvremenoj dijagnostici infekcijskih bolesti djece primjenjuju se brojne molekularne metode zbog iznimno visoke osjetljivosti, specifičnosti, visokog stupnja standardizacije i automatizacije testiranja kao i brzine testiranja. Molekularni testovi najčešće se primjenjuju za određivanje etiologije infektivne bolesti, praćenje tijeka bolesti u pojedinih bolesnika te uspješnosti antimikrobnog liječenja kao i za analizu rezistencije patogena na antimikrobne lijekove. U kliničkoj praksi najčešće se primjenjuju metode lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu, metode hibridizacije te populacijsko sekvenciranje nukleinskih kiselina.*

Deskriptori: INFEKTIVNE BOLESTI, MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA, DNA, RNA

### Uvod

Suvremena dijagnostika infekcijskih bolesti djece uključuje primjenu brojnih metoda molekularne dijagnostike (1).

U ovom će radu biti opisane nove spoznaje o primjeni molekularnih metoda u kliničkoj dijagnostici infektivnih bolesti djece s posebnim naglaskom na molekularnu dijagnostiku sepse, detekciju i analizu sekvence gena za 16S rRNA, detekciju uzročnika bakterijskog meningitisa, detekciju infekcija središnjeg živčanog sustava (SŽS) primjenom integriranih i multiplex testova, dijagnostiku respiratornih infekcija, infekcija citomegalovirusom (CMV) i virusom Epstein-Barr (EBV), infekciju virusom humane imunodeficijencije tipa 1 (HIV-1) te virusima hepatitisa kao i nove spoznaje o primjeni molekularnih metoda za dijagnostiku infekcije virusom Zika (ZIKV).

### Molekularna dijagnostika sepse

Na poboljšanje ishoda liječenja sepsi nesumnjivo najveći utjecaj imaju molekularni testovi koji detektiraju bakterijske patogene direktno iz pune krvi. Jedan od najvećih problema vezanih uz takve testove je osjetljivost, budući da u podlozi bakterijemije može biti i manje od 1 CFU (eng. colony forming unit) bakterija u mililitru krvi (2). Primjeri ovakvih testova su LightCycler SeptiFast (Roche Diagnostics) i MagicPlex Sepsis Test (Seegene). LightCycler SeptiFast test koristi multiplex PCR za detekciju do 25 patogena i mecA gena iz pune krvi u roku 6-8 sati (3). U radu iz 2015. rezultati metaanalize pokazali su značajnu heterogenost i varijabilnu kvalitetu među 41 studijom dijagnostičke vrijednosti LightCycler SeptiFast testa (4). Koristeći hemokulturu kao standard, ukupno je analizirano 7727 pacijenata širokog raspona dobi sa 10.493 epizode suspektne sepse, kod kojih je medijan pozitiviteta hemokulture bio 17%. Udruženi podaci pokazali su osjetljivost LightCycler SeptiFast testa od 68% i specifičnost 86% (4). MagicPlex Sepsis Test-om radi se probir do 90 patogena i 3 markera rezistencije te se identificira 21 bakterijska i 6 fungalnih vrsta u roku od otprilike 7 sati (5). Carrara i suradnici usporedili su učinko-

vitost ovog testa sa hemokulturama na uzorku od 267 pacijenata (6). U njihovoj studiji specifičnost MagicPlex Sepsis Test-a pokazala se visokom (92%), ali je osjetljivost bila niskih 65% (6).

Mnogo je veći broj komercijalnih multiplex PCR testova za detekciju i identifikaciju uzročnika iz pozitivne hemokulture. FilmArray Blood Culture Identification Panel (BCID; bioMérieux Clinical Diagnostics) može identificirati 24 etiološka uzročnika sepse (8 Gram pozitivnih, 11 Gram negativnih i 5 gljivica) i tri gena rezistencije na antibiotike (mecA, vanA/B, blaKPC) iz pozitivnih bočica hemokulture u roku od 1 sata. Dijagnostička vrijednost ovog testa ispitivana je u većem broju istraživanja (7-9). Salimnia i sur. proveli su ispitivanje koje je uključivalo 8 centara, a u kojem su utvrđivali osjetljivost i specifičnost ovog testa u usporedbi sa standardnim fenotipskim metodama identifikacije (8). U studiju je bilo uključeno 1568 kliničkih uzoraka pozitivnih hemokultura, od kojih je u 1382 (88,1%) detektiran barem jedan uzročnik BCID testom, a u 81 uzorku (5,86%) detektirani su višestruki uzročnici. Ostali uzorci uglavnom su sadržavali mikroorganizme koji nisu uključeni u paletu ovog testa. Osjetljivost i specifičnost detekcije gena rezistencije bile su 100% za vanA/B i blaKPC, a za

\*Klinika za infektivne bolesti  
"Dr. Fran Mihaljević", Zagreb

Adresa za dopisivanje:  
Doc. dr. sc. Snježana Židovec Lepej  
Odjel za imunološku i molekularnu dijagnostiku  
Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević"  
10000 Zagreb, Mirogojska 8  
E-mail: snjezana.zidovec.lepej@bfm.hr

mecA 98,4% i 98,3% (8). Southern i sur. ispitali su kliničku učinkovitost BCID testa na 146 pozitivnih hemokultura (138 monomikrobnih i 8 polimikrobnih) u usporedbi s bakterijskom kulturom (7). Osjetljivost BCID testa bila je 80,4% za sve mikroorganizme detektirane kulturom, dok je za one obuhvaćene BCID paletom bila 94,6%. Specifičnost testa bila je 100% (7). Saito i sur. usporedili su izvedbu FilmArray BCID testa sa detekcijom i identifikacijom uzročnika pomoću masene spektrofotometrije (MALDI-TOF), i pokazalo se da BCID test daje rezultate usporedive s MALDI-TOF dijagnostikom (9). Navedene studije pokazale su da je FilmArray BCID test brz i pouzdan u detekciji učestalih uzročnika sepsa, te se rezultati dobiveni ovim testom mogu upotrijebiti kao baza za odlučivanje o antimikrobnoj terapiji (8, 9).

#### Detekcija i analiza sekvence gena za 16S rRNA (tzv. "broad-range PCR" ili "16S PCR")

16S ribosomska RNA (16S rRNA) dio je male podjedinice ribosoma prokariota. Gen koji kodira 16S rRNA (skraćeno: 16S rDNA) prisutan je u svim bakterijskim vrstama u varijabilnom broju kopija (10). Sastoji se od konzerviranih i varijabilnih regija, što teoretski omogućuje detekciju i identifikaciju bilo koje bakterijske vrste iz kliničkog uzorka putem amplifikacije i određivanja sekvence 16S rDNA te usporedbe dobivenih sekvenci s bazama podataka (11). Ova metoda ima nekoliko ograničenja, između ostalog to su visoka cijena budući da uključuje sekvenciranje, trajanje (1 do 2 dana) te visok rizik od kontaminacije zbog ubikvitarnosti bakterijske DNA u okolini (11, 12). Također, u rutinskom mikrobiološkom laboratoriju pomoću ove metode moguća je identifikacija uzročnika samo mono-mikrobnih infekcija (12).

U dijagnostici meningitisa, s obzirom na potrebu za hitnim terapijskim intervencijama, velik je doprinos 16S rDNA PCR-a i to posebno u sljedećim situacijama: kada je pacijent primio prethodnu antimikrobnu terapiju, i/ili kada je mikroskopski nalaz cerebrospinalnog likvora negativan, i/ili kada nema porasta bakterijske kulture (13-15). Prednost

je 16S rDNA pretrage detekcija uzročnika u atipičnim slučajevima kada nije dostupna nikakva prethodna dijagnostička orijentacija (12). Primjerice, 16S PCR omogućio je povezivanje *Bartonella henselae* sa bacilarnom angiomatozom te *Tropheryma whipplei* sa Whippleovom bolesti (10, 16). Ovdje također izdvajamo primjer novorođenčeta koje je 2016. godine uspješno liječeno u Jedinici za intenzivno liječenje djece pri Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević" zbog gnojnog meningitisa, a čiji je uzročnik *Clostridium neonatale* dokazan iz likvora 16S rDNA metodom, dok je kultivacija bila neuspješna (17).

Veliki je doprinos ove metode i u dijagnostici endokarditisa (12). U 2,5 do 31% endokarditisa hemokulture ostanu sterilne, a Greub i sur. su pokazali da u 23% takvih slučajeva 16S rDNA PCR i sekvenciranje na uzorcima srčanih zalistaka omogućuje etiološku dijagnozu (18, 19). Međutim, 16S rDNA PCR iz pune krvi kod pacijenata koji imaju sterilne hemokulture i koji nisu podvrgnuti operaciji (odnosno uzorci tkiva zalistaka nisu dostupni) ne može doprinijeti dijagnostici endokarditisa zbog premale osjetljivosti ove metode kada se radi iz krvi (18).

16S rDNA PCR omogućio je napredak u dijagnostici infekcija kostiju i zglobova, uzrokovanih sa *Kingella kingae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Mycoplasma* spp. i anaerobnim bakterijama (20, 21). Nadalje, u studiji koju su proveli Fursted i sur. 16S rDNA PCR omogućio je postavljanje dijagnoze u 44% slučajeva spondilodiscitisa kada su kulture ostale negativne (najčešće zbog teško uzgojivih uzročnika) (22).

Unatoč navedenim brojnim ograničenjima, ova je molekularna tehnika u zadnjih 25 godina postala esencijalni dio bakteriološke dijagnostike u kliničkim laboratorijima mnogih bolnica (12). Naravno, 16S rDNA PCR ne bi trebao biti samostalna dijagnostička metoda, već dio šire dijagnostičke strategije u kojoj je ključna komunikacija između laboratorijskih djelatnika i kliničara te uzima u obzir kliničku prezentaciju svakog pojedinog pacijenta.

#### Detekcija uzročnika bakterijskog meningitisa

*Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* i *Listeria monocytogenes*, vodeći bakterijski uzročnici meningitisa, dio su palete većine komercijalnih sindromskih testova koji se baziraju na multipleks PCR tehnologiji ili hibridizaciji nukleinskih kiselina (3, 4). Međutim, zbog visoke cijene takvih testova mnogi klinički laboratoriji koriste tzv. "in-house" metode. Najčešće se radi o PCR testovima u stvarnom vremenu (eng. "real-time PCR") kojima se direktno iz likvora u vrlo kratkom vremenu (2-3 sata) detektiraju geni visoko specifični za navedene uzročnike, također i u slučajevima kada je pacijent primio prethodnu antimikrobnu terapiju (23-26).

Visoko specifični ciljani geni koji se najčešće koriste za detekciju ova 3 uzročnika su pneumokokni gen za faktor virulencije autolizin, *lytA*, meningokokni protein vanjske membrane *ctrA* te *hlyA* gen za *L. monocytogenes* (26-28). Testovi se mogu izvoditi za svakog uzročnika pojedinačno, ali i kombinirati u tzv. multiplekse. Navest ćemo primjer "in-house" testa koji uključuje detekciju čak 8 uzročnika bakterijskog meningitisa, uključujući meningokoka, pneumokoka, *L. monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae* i *Haemophilus influenzae* (24). Ispitivana je učinkovitost testa na uzorcima likvora 150 novorođenčadi i djece te 18 odraslih pacijenata, a rezultati su uspoređeni sa rezultatima kultivacije. Granica detekcije ovih patogena bila je od 5 do 28 kopija po testu, a nespecifičnih pozitivnih rezultata nije bilo (24). Real-time PCR-om patogen je dokazan u 72,0% uzoraka, dok je kultivacija bila uspješna kod samo 48,2% (rezultati su bili potpuno podudarni). Očekivano, kod pacijenata s prethodnom antimikrobnom terapijom stopa detekcije PCR-om bila je značajno veća u usporedbi s kulturom ( $\chi^2=18,3182$ ;  $P=0,0000$ ) (24).

#### Dijagnostika SŽS infekcija primjenom integriranih i multiplex molekularnih testova

U brzom dijagnostici SŽS infekcija koriste se PCR testovi u stvarnom vremenu u potpuno integriranom analitič-

kom sustavu koji omogućuju brzo testiranje pojedinačnih prioritetnih uzoraka. U praksi se najčešće koriste testovi za enterovirusne RNA te DNA herpes simplex virusa 1 i 2 (HSV-1/2) u CSF-u. Ciljna struktura testova za detekciju enterovirusne RNA nalazi se u 5' netranslatirajućoj regiji genoma (tzv. panenterovirusni testovi) dok je ciljna sekvenca za detekciju HSV-1/2 dio gena za virusnu DNA polimerazu (29).

Personalizirana molekularna dijagnostika SŽS infekcija uključuje i primjenu multiplex integriranih molekularnih testova za analizu pojedinačnih uzoraka CSF-a tj. testova koji su dizajnirani za dijagnostiku kliničkih sindroma. FilmArray Encephalitis/Meningitis Panel prvi je test ovog tipa tehnologije koji je dobio odobrenje Food and Drugs Administration i široko se primjenjuje u kliničkoj praksi. Navedeni test omogućuje molekularnu detekciju 14 patogena (CMV, enterovirusni, HSV-1, HSV-2, humani herpes virus 6, humani parehiovirusi, varicella zoster virus, Escherichia coli K1, Haemophilus influenzae, Listeria monocytogenes, Neisseria meningitidis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae i Cryptococcus neoformans/gattii) za ukupno 60 minuta.

Leber i sur. su 2016. g. objavili rezultate multicentrične evaluacije FilmArray Encephalitis/Meningitis panela koja je provedena na ukupno 1560 prospektivno prikupljenih uzoraka CSF-a (30). Rezultate FilmArray panela usporedili su s metodom kultivacije (za bakterijske uzročnike) i rutinskim molekularnim metodama (za viruse i Cryptococcus) te pokazali 100% podudarnost rezultata za 9 od 14 analiziranih mikroorganizama. Postotak podudarnosti rutinskih metoda i FilmArray-a bio je nešto niži za detekciju enterovirusne RNA (95,7%) i DNA HHV-6 (85,7%), a specifičnost FilmArray panela iznosila je ukupno 99,2%.

Primjena FilmArray Encephalitis/Meningitis panela zasebno je validirana i u pedijatrijskoj populaciji. Graf i sur. su 2017. g. usporedili rezultate testiranja FilmArray panela i rutinskih dijagnostičkih metoda (kultivacija i PCR) ukupno 133 uzoraka CSF-a pedijatrijskih

bolesnika (31). Postotak podudarnosti testiranja 67 uzoraka CSF-a koji su bili pozitivni temeljem metoda rutinske dijagnostike i FilmArray panela iznosila je 92,5%, dok je podudarnost testiranja 66 prethodno negativnih uzoraka iznosila 96,2%.

Duff i sur. (2018.) su analizirali i ekonomski učinak primjene FilmArray panela u usporedbi s rutinskom dijagnostikom te pokazali da je nova strategija testiranja ekonomski povoljnija (32). Messacar i sur. (2016.) pokazali su da primjena FilmArray panela skraćuje vrijeme do utvrđivanje etiologije SŽS infekcije za ukupno 10,3 h te omogućuje racionalniju primjenu antimikrobnih lijekova, posebice aciklovira (33). Dosađajni rezultati analitičke, kliničke i ekonomske evaluacije FilmArray panela pokazuju da je njegova primjena u kliničkoj praksi opravdana.

#### Molekularna dijagnostika respiratornih patogena

Suvremena dijagnostika respiratornih virusa temelji se na multiplex PCR testovima. Osnovni panel za dijagnostiku respiratornih virusa najčešće uključuje dijagnostiku respiratornog sincicijskog virusa (RSV) te virusa influence tipa A i B. Kompleksniji respiratorni paneli omogućuju i detekciju humanog metapneumovirusa (hMPV), virusa parainfluence tipa 1-3 te adenovirusa. FilmArray Respiratory Panel primjer je molekularnog testa koji omogućuje istovremenu molekularnu detekciju 20 patogena (adenovirusa, coronavirusa 229E, HKU1, NL63 i OC43, hMPV-a, rinovirusa, enterovirusa, virusa influence tipa A, A/H1, A/H1-2009, A/H3 i B, virusa parainfluence tipa 1-4, RSV-a, Bordetella pertussis, Chlamydomphila pneumoniae i Mycoplasma pneumoniae u nazofaringealnim obriscima ili aspiratima).

Huang i sur. (2017.) su objavili rezultate metaanalize usporedbe FilmArray respiratornog panela s dva respiratorna panela koji se često koriste u kliničkoj praksi (Nanosphere Verigene RV+ test i Hologic Gen-Probe Prodesse paneli) (34). U meta-analizu su bili uključeni rezultati 20 istraživanja s ukupno 5 510 respiratornih uzoraka te je obuhvatila 5

virusa koji su zajednički u sva tri panela: virus influence tipa A i B, RSV, hMPV i adenovirusi. Rezultati ove analize pokazali su vrlo visok stupanj preciznosti sva tri panela (area under the receiver operating characteristic curve iznosio je >0,98 osim za adenoviruse). Huang i sur. (2017.) zaključili su da primjena bilo kojeg od tri navedena respiratorna panela može značajno pridonijeti brzoj etiološkoj dijagnostici respiratornih infekcija te racionalnoj uporabi antimikrobnih lijekova.

Osim respiratornih panela koji detektiraju veliki broj patogena, u praksi se vrlo često koriste i integrirani PCR testovi za prioritetno testiranje respiratornih uzoraka bolesnika s teškom kliničkom slikom. Cohen i sur. (2018.) usporedili su rezultate primjene molekularne detekcije virusa influence tipa A i B te RSV-a u uzorcima obrisaka nazofarinksa primjenom integriranog PCR testa Xpert Flu+RSV test i Prodesse ProFlu testa kao point-of-care testova (35). Rezultati ovog istraživanja pokazali su visoku razinu podudarnosti u detekciji RNA virusa influence tipa A (100%) i B (100%) te RSV-a (99,6%) te dokazali da se integrirani PCR testovi mogu uspješno koristiti kao point-of-care test za brzu dijagnostiku (oko 60 min.) važnih respiratornih patogena.

Većina standardiziranih molekularnih respiratornih panela ne uključuje dijagnostiku infekcije s B. pertussis i B. parapertussis već se u dijagnostici koriste zasebni PCR testovi u stvarnom vremenu koji pokazuju vrlo visok stupanj osjetljivosti (97% vs. 58% u odnosu na metodu kultivacije), posebno u bolesnika kod kojih respiratorni simptomi traju kraće od 2 tjedna (36). Potreba uvođenja multiplex PCR testova koji uz B. pertussis i B. parapertussis mogu detektirati i B. holmesii te eventualno B. bronchiseptica za sada je još uvijek kontroverzno pitanje. Pitett i sur. (2014.) su retrospektivno testirali 196 uzoraka nazofarinska molekularnim testom koji detektira sve klinički značajne Bordetella spp. i nisu otkrili infekciju s B. holmesii te zaključili da uvođenje proširenog testiranja u Švicarskoj za sada nije opravdano (37). Ovaj primjer još jednom potvrđuje potrebu provođenja nacionalnih epidemio-

loških studija prije značajnijih promjena strategija molekularnog testiranja respiratornih patogena.

#### Dijagnostika CMV i EBV infekcije

U kliničkoj dijagnostici za potrebe kvantifikacija CMV DNA najčešće se koriste automatizirani kvantitativni PCR testovi u stvarnom vremenu koji su optimizirani za testiranje većeg broja uzoraka, najčešće urina, plazme, pune krvi, CSF-a, amnijske tekućine i Guthrieovih kartica (38). Granica detekcije PCR testova u stvarnom vremenu za kvantifikaciju CMV DNA najčešće iznosi oko 150 kopija po mL no pitanje klinički značajne viremije (posebice kao indikacije za antivirusno liječenje) potrebno je razmotriti zasebno za svaki molekularni test i za različite skupine bolesnika.

Kvantifikacija CMV DNA koristi se pri dokazivanju virusne replikacije u trudnica sa serološki dokazanom primarnom CMV infekcijom (testiranje urina i plazme). Određivanje broja kopija CMV DNA u amnijskoj tekućini (amniocenteza nakon 21-22 tjedna gestacije) omogućuje procjenu mogućeg prijenosa virusa s majke na dijete. Delforge i sur. (2017.) su analizirali CMV DNA u 150 uzoraka urina i 114 uzoraka krvi 150 trudnica sa serološki dokazanom primarnom CMV infekcijom (39). Postotak prijenosa CMV s majke na dijete iznosio je 36,7% (55/150), a dokazana je i značajna povezanost između prisutnosti CMV DNA u krvi majke te infekcije novorođenčeta. CMV virurija bila je statistički značajno veća u trudnica čija su djeca bila u konačnici zaražena CMV-om. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da kvantifikacija CMV DNA u trudnica s primarnom infekcijom ovim virusom omogućuju identifikaciju trudnica s povećanim rizikom od prijenosa infekcije na dijete.

Posebno značajna indikacija za kvantifikaciju CMV DNA je i dijagnoza kongenitalne infekcije ovim virusom tijekom prva tri tjedna života kao i dijagnoza perinatalne infekcije ovim virusom pri čemu se kao biološki uzorak najčešće koristi urin (40, 41).

Molekularne metode, posebice kvantifikacija EBV DNA metodom PCR-a u stvarnom vremenu, važan su dio dijagnostike EBV infekcije. EBV viremija važan je prediktor pojave post-transplantacijske limfoproliferativne bolesti (eng. post-transplant lymphoproliferative disease, PTLTD).

U istraživanju Colombini i sur. (2017.) u pedijatrijskih bolesnika s transplantiranim bubregom, primarna EBV otkrivena je u 50 od 103 (48,5%) prethodno seronegativna bolesnika bolesnika dok je reaktivacija EBV infekcije detektirana je u 40 od 201 seropozitivnih bolesnika (19,9%) (42). Visoka EBV viremija (definirana kao viremija iznad medijana broja kopija EBV DNA u koorti, >59,909 kopija/mL) bila je statistički značajan i neovisan prediktor razvoja PTLTD-a.

San Juan i sur. (2015.) analizirali su učestalost dijagnostičke primjene praćenja EBV viremije u 669 centara za transplantaciju solidnih organa u 35 Europske zemalja te utvrdili da se u 85,9% centara kvantifikacija EBV DNA koristi kao rutinska dijagnostička metoda te da se u 77,4% centara koristi i kao kriterij za pre-emptivno liječenje bolesnika s visokom viremijom (najčešće smanjenjem imunosupresije ili rituximabom) (43).

#### Dijagnostika infekcije sa ZIKV

Epidemija virusom Zika tijekom 2015. i 2016. g. kao i dokazi o povezanosti kongenitalne infekcije ovim virusom s fetalnim abnormalnostima, mikrocefalijom, neurološkim komplikacijama te sindromom Guillain-Barré potaknuli su razvoj novih molekularnih metoda za dokazivanje infekcije ovim virusom. Dijagnostika akutne infekcije temelji se na detekciji ZIKV RNA metodom PCR-a u stvarnom vremenu (44).

St. George i sur (2017.) usporedili su uspješnost detekcije ZIKV RNA PCR testom u stvarnom vremenu u uzorcima urina i seruma trudnica, novorođenčadi, osoba s GBS-om te osoba koje su putovale u endemska područja (45). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je period viremije tijekom ZIKV bolesti

relativno kratak te da se ZIKV RNA najčešće uspješno može detektirati unutar prvih 10 dana od infekcije te da je urin optimalni biološki uzorak za testiranje u usporedbi s testiranjem seruma te serološkim testovima. Eppes i sur. (2017.) pokazali da ZIKV perzistira i do 81 dan u uzorcima pune krvi te do 73 dana u serumu te se puna krv i preporučuje kao biološki uzorak izbora za dokazivanje infekcije u asimptomatskih osoba (46).

Biološki uzorci koji se najčešće koriste u dijagnostici infekcije virusom Zika su serum, umbilikalna krv, urin, obrisak nazofarinksa, slina, uzorci tkiva mozga, amnijska tekućina, CSF i uzorci placent. Sekvenciranje NS5, NS3, i E gena ZIKV primjenjuje se za potvrdu infekcije u klinički značajnim slučajevima kao i u epidemiološke svrhe.

#### Dijagnostika HIV-1 infekcije te infekcije virusima hepatitisa

Testovi za kvantifikaciju HIV-1 RNA i detekciju HIV-1 DNA osnovna su metoda za dijagnostiku zaraze HIV-om u novorođenčadi i djece mlađe od 18 mjeseci kod kojih postoji podatak o perinatalnoj ili postnatalnoj ekspoziciji. HIV-1 RNA i DNA testovi klinički su jednakovrijedni, osim za detekciju non-B subtipova HIV-a gdje se preporučuje HIV-1 RNA. Testiranje se preporučuje neposredno nakon rođenja te 14-21 dana nakon rođenja, u dobi od 1-2 mjeseca te u razdoblju od 4-6 mjeseci. Definitivno isključivanje zaraze HIV-om (u djece koja nisu dojena) temelji se na 2 ili više negativna molekularna testa (jedan test učinjen u dobi  $\geq 1$  mjeseci a drugi u dobi  $\geq 4$  mjeseci) (47).

U dijagnostičkom praćenju pedijatrijske HBV infekcije kinetika virusne replikacije procjenjuje se kvantifikacijom HBV DNA u serumu primjenom PCR-a u stvarnom vremenu te se, u posebnim okolnostima, može analizirati i rezistencije virusa na analoge nukleozida. Intenzivno se istražuje i dijagnostička primjenjivost novih biomarkera HBV infekcije, posebice surogatnih biomarkera aktivnosti cccDNA HBV-a (engl. covalently closed circular DNA, cccDNA) poput HBV RNA (48).

Molekularne metoda koje se koriste u dijagnostičkoj obradi infekcije virusom hepatitisa C (hepatitis C virus, HCV) su kvantifikacija HCV RNA koja se koristi za dokazivanje virusne replikacije, genotipizacija HCV-a te određivanje rezistencije HCV-a na antivirusne lijekove uključujući inhibitore proteaze, polimeraze te NS5A proteina (49).

NOVČANA POTPORA/FUNDING

Nema/None

ETIČKO ODOBRENJE/ETHICAL APPROVAL

Nije potrebno/None

SUKOB INTERESA/CONFLICT OF INTEREST

Autori su popunili *the Unified Competing Interest form* na [www.icmje.org/coi\\_disclosure.pdf](http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf) (*dostupno na zahtjev*) obrazac i izjavljuju: nemaju potporu niti jedne organizacije za objavljeni rad; nemaju financijsku potporu niti jedne organizacije koja bi mogla imati interes za objavu ovog rada u posljednje 3 godine; nemaju drugih veza ili aktivnosti koje bi mogle utjecati na objavljeni rad./ *All authors have completed the Unified Competing Interest form at www.icmje.org/coi\_disclosure.pdf (available on request from the corresponding author) and declare: no support from any organization for the submitted work; no financial relationships with any organizations that might have an interest in the submitted work in the previous 3 years; no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.*

LITERATURA

- Židovec Lepej S. Molekularna dijagnostika infektivnih bolesti. *Paediatr Croat.* 2011; 55 (1): 43-50.
- Jonsson B, Nyberg A, Henning C. Theoretical aspects of detection of bacteraemia as a function of the volume of blood cultured. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* 1993; 101: 595-601.
- Riedel S, Carroll KC. Laboratory detection of sepsis: biomarkers and molecular approaches. *Clin Lab Med.* 2013; 33: 413-37.
- Dark P, Blackwood B, Gates S et al. Accuracy of LightCycler® SeptiFast for the detection and identification of pathogens in the blood of patients with suspected sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med.* 2015; 41: 21-33.
- Loonen AJM, Wolffs PFG, Bruggeman CA, van den Brule AJC. Developments for improved diagnosis of bacterial bloodstream infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014; 33: 1687-702.
- Carrara L, Navarro F, Turbau M et al. Molecular diagnosis of bloodstream infections with a new dual-priming oligonucleotide-based multiplex PCR assay. *J Med Microbiol.* 2013; 62: 1673-9.
- Southern TR, VanSchooneveld TC, Bannister DL et al. Implementation and performance of the BioFire FilmArray® Blood Culture Identification panel with antimicrobial treatment recommendations for bloodstream infections at a midwestern academic tertiary hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015; 81: 96-101.
- Salimnia H, Fairfax MR, Lephart PR et al. Evaluation of the FilmArray Blood Culture Identification Panel: Results of a Multicenter Controlled Trial. *J Clin Microbiol.* 2016; 54: 687-98.
- Saito K, Endo S, Katsumi M et al. Evaluation of the FilmArray Blood Culture Identification Panel in Detecting Pathogenic Microorganisms from Positive Blood Cultures: the First Clinical Report in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2017.
- Petti CA. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clin Infect Dis.* 2007; 44: 1108-14.
- Clarridge JE. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17: 840-62.
- Renvoisé A, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V, Aubry A. Broad-range PCR: past, present, or future of bacteriology? *Med Mal Infect.* 2013; 43: 322-30.
- Schuurman T, de Boer RF, Kooistra-Smid AMD, van Zwet AA. Prospective study of use of PCR amplification and sequencing of 16S ribosomal DNA from cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis in a clinical setting. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 734-40.
- Welinder-Olsson C, Dotevall L, Hogevis H et al. Comparison of broad-range bacterial PCR and culture of cerebrospinal fluid for diagnosis of community-acquired bacterial meningitis. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13: 879-86.
- Srinivasan L, Pisapia JM, Shah SS, Halpern CH, Harris MC. Can broad-range 16S ribosomal ribonucleic acid gene polymerase chain reactions improve the diagnosis of bacterial meningitis? A systematic review and meta-analysis. *Ann Emerg Med.* 2012; 60: 609-20.
- Relman DA, Loutit JS, Schmidt TM, Falkow S, Tompkins LS. The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens. *N Engl J Med.* 1990; 323: 1573-80.
- Krajcar N, Roglić S, Kalaba A, Gužvinec M, Knezović I, Tešović G. Clostridium neonatale kao uzročnik novorođenačkog meningitisa: prikaz slučaja. *Knjiga sažetaka CROCMID 2016. Poreč, Hrvatska;* 2016.
- Fournier P-E, Thuny F, Richet H et al. Comprehensive diagnostic strategy for blood culture-negative endocarditis: a prospective study of 819 new cases. *Clin Infect Dis.* 2010; 51: 131-40.
- Greub G, Lepidi H, Rovey C et al. Diagnosis of infectious endocarditis in patients undergoing valve surgery. *Am J Med.* 2005; 118: 230-8.
- Fenollar F, Roux V, Stein A, Drancourt M, Raoult D. Analysis of 525 samples to determine the usefulness of PCR amplification and sequencing of the 16S rRNA gene for diagnosis of bone and joint infections. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 1018-28.
- Fenollar F, Lévy P-Y, Raoult D. Usefulness of broad-range PCR for the diagnosis of osteoarthicular infections. *Curr Opin Rheumatol.* 2008; 20: 463-70.
- Fuursted K, Arpi M, Lindblad BE, Pedersen LN. Broad-range PCR as a supplement to culture for detection of bacterial pathogens in patients with a clinically diagnosed spinal infection. *Scand J Infect Dis.* 2008; 40: 772-7.
- Wagner K, Springer B, Pires VP, Keller PM. Pathogen Identification by Multiplex LightMix Real-Time PCR Assay in Patients with Meningitis and Culture-Negative Cerebrospinal Fluid Specimens. *J Clin Microbiol.* 2018; 56: 01492-17.
- Chiba N, Murayama SY, Morozumi M et al. Rapid detection of eight causative pathogens for the diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR. *J Infect Chemother.* 2009; 15: 92-8.
- Favaro M, Savini V, Favalli C, Fontana C. A multi-target real-time PCR assay for rapid identification of meningitis-associated microorganisms. *Mol Biotechnol.* 2013; 53: 74-9.
- Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarski EB. Simultaneous detection of Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, and Streptococcus pneumoniae in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 1553-8.
- Messmer TO, Sampson JS, Stinson A, Wong B, Carlone GM, Facklam RR. Comparison of four polymerase chain reaction assays for specificity in the identification of Streptococcus pneumoniae. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004; 49: 249-54.
- Nogva HK, Rudi K, Naterstad K, Holck A, Lillehaug D. Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of Listeria monocytogenes in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66: 4266-71.
- Giulieri SG, Chapuis-Taillard C, Manuel O et al. Rapid detection of enterovirus in cerebrospinal fluid by a fully-automated PCR assay is associated with improved management of aseptic meningitis in adult patients. *J Clin Virol.* 2015; 62: 58-62.

30. Leber AL, Everhart K, Balada-Llasat J-M et al. Multicenter Evaluation of BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel for Detection of Bacteria, Viruses, and Yeast in Cerebrospinal Fluid Specimens. *J Clin Microbiol.* 2016; 54: 2251-61.
31. Graf EH, Farquharson MV, Cárdenas AM. Comparative evaluation of the FilmArray meningitis/encephalitis molecular panel in a pediatric population. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017; 87: 92-4.
32. Duff S, Hasbun R, Ginocchio CC, Balada-Llasat J-M, Zimmer L, Bozzette SA. Economic analysis of rapid multiplex polymerase chain reaction testing for meningitis/encephalitis in pediatric patients. *Future Microbiol.* 2018.
33. Messacar K, Breazeale G, Robinson CC, Dominguez SR. Potential clinical impact of the film array meningitis encephalitis panel in children with suspected central nervous system infections. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016; 86: 118-20.
34. Huang H-S, Tsai C-L, Chang J, Hsu T-C, Lin S, Lee C-C. Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection: systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2017.
35. Cohen DM, Kline J, May LS et al. Accurate PCR Detection of Influenza A/B and Respiratory Syncytial Viruses by Use of Cepheid Xpert Flu+RSV Xpress Assay in Point-of-Care Settings: Comparison to Prodesse ProFlu. *J Clin Microbiol.* 2018; 56: 01237-17.
36. Leber AL. Pertussis: relevant species and diagnostic update. *Clin Lab Med.* 2014; 34: 237-55.
37. Pittet LF, Emonet S, François P et al. Diagnosis of whooping cough in Switzerland: differentiating Bordetella pertussis from Bordetella holmesii by polymerase chain reaction. *PLoS One.* 2014; 9: 88936.
38. Czader M, Post K, Cheng L. Detection of cytomegalovirus infection by quantitative polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2013; 999: 257-71.
39. Delforge ML, Costa E, Brancart F et al. Presence of Cytomegalovirus in urine and blood of pregnant women with primary infection might be associated with fetal infection. *J Clin Virol.* 2017; 90: 14-7.
40. Rawlinson WD, Boppana SB, Fowler KB et al. Congenital cytomegalovirus infection in pregnancy and the neonate: consensus recommendations for prevention, diagnosis, and therapy. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17: 177-88.
41. Saldan A, Forner G, Mengoli C, Gussetti N, Palù G, Abate D. Testing for Cytomegalovirus in Pregnancy. *J Clin Microbiol.* 2017; 55: 693-702.
42. Colombini E, Guzzo I, Morolli F et al. Viral load of EBV DNAemia is a predictor of EBV-related post-transplant lymphoproliferative disorders in pediatric renal transplant recipients. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* 2017; 32: 1433-42.
43. San-Juan R, Manuel O, Hirsch HH et al. Current preventive strategies and management of Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disease in solid organ transplantation in Europe. Results of the ESGICH Questionnaire-based Cross-sectional Survey. *Clin Microbiol Infect.* 2015; 21: 1-9.
44. Metsky HC, Matranga CB, Wohl S et al. Zika virus evolution and spread in the Americas. *Nature.* 2017; 546: 411-5.
45. St George K, Sohi IS, Dufort EM, Dean AB, White JL, Limberger R et al. Zika Virus Testing Considerations: Lessons Learned from the First 80 Real-Time Reverse Transcription-PCR-Positive Cases Diagnosed in New York State. *J Clin Microbiol.* 2017; 55: 535-44.
46. Eppes C, Rac M, Dunn J et al. Testing for Zika virus infection in pregnancy: key concepts to deal with an emerging epidemic. *Am J Obstet Gynecol.* 2017; 216: 209-25.
47. Panel on Antiretroviral Therapy and Medical Management of Children Living with HIV. In: Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Pediatric HIV Infection. <https://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/pediatricguidelines.pdf>.
48. European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2017; 67: 370-98.
49. Židovec Lepej S, Vince A. Molekularna dijagnostika u eri liječenja hepatitisa C novim lijekovima. *Medix.* 2016; 22: 141-7.

### Summary

#### MOLECULAR DIAGNOSTICS OF INFECTIOUS DISEASES IN PEDIATRIC PATIENTS

Snježana Židovec Lepej, Marija Gužvinec

*State-of-the-art molecular diagnostics of infectious diseases includes the use of a variety of molecular methods due to their superior sensitivity, specificity, standardization, automation as well as speed. Molecular assays are most frequently used for the determination of infectious diseases etiology, monitoring of disease course and treatment outcome in individual patients as well as determination of antimicrobial resistance. The most frequently used molecular methods in clinical practice include real-time polymerase chain reaction, nucleic acid hybridization and population-based sequencing.*

Descriptors: INFECTIOUS DISEASES, MOLECULAR DIAGNOSTICS, DNA, RNA

Primljeno/Received: 7. 3. 2018.

Prihvaćeno/Accepted: 3. 4. 2018.