

# Indikace a interpretace výsledků molekulárně biologických metod

Martina Lengerová, Iva Kocmanová

# MB diagnostika je založena...

- na detekci nukleových kyselin mikroorganismů v klinickém vzorku – nejčastěji pomocí metody PCR
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- RNA – ribonukleová kyselina
  - u mikroorganismů jejichž genetická informace je kódována RNA (některé viry – např. HIV, virus chřipky, virus hepatitidy A, C, D, E)
  - v případě, že je mikroorganismus detekován na základě genové exprese – detekce mRNA

# MB vyšetření je obecně vhodné zejména v těchto případech:

Pokud jsou mikroorganismy:

- obtížně kultivovatelné, pomalu rostoucí
- vysoce infekční, jejichž kultivace je nebezpečná
- přítomné v klinickém vzorku ve velmi malém množství

Nebo pokud:

- máme omezené množství vzorku
- potřeba kvantifikovat virovou nebo bakteriální nálož

Nebo v případě speciálních vyšetření:

- testování citlivosti k (antibiotikům), antivirotikům nebo antimykotikům – průkaz bodových mutací v DNA (záměn v sekvenci DNA), které vedou k rezistenci

# Další možnosti použití MB metod v mikrobiologii

- **Identifikace**, tj. dourčení a taxonomické zařazení agens, které jsou již jako bakteriální/mykotická kultura
- **Epidemiologie - typizace** multirezistentních bakterií
- **Celogenomové sekvenování** – technicky snadné, ale složité vyhodnocení – zatím se nejeví jako budoucí univerzální řešení pro rutinní diagnostiku, spíše epidemiologii apod.
  - (Metagenomika?)

# Základní otázky při použití molekulárně biologických metod:

- Co?
  - Indikace k molekulárně biologickému vyšetření
- Jak a čím?
  - Standardizace
  - Kvalitativní vs. kvantitativní metody
  - Komerční vs. „in-house“ diagnostické soupravy
- Co pak s tím?
  - Interpretace výsledků

# Co?

- **Diferenciálně diagnostická rozvaha** – zacílení vyšetření na nejpravděpodobnější/nejzávažnější patogeny s ohledem na
  - **typ infekce**
  - **základní diagnózu a dosavadní léčbu pacienta (imunosuprese?)**
- PCR metody **nenahrazují kultivaci ani další metody** – informace získané z různých metod usnadňují konečnou interpretaci nálezu

# Co?

- **Viry** - PCR metody se používají **pro detekci i kvantifikaci**, často metoda volby
- **Kvasinky a plísně** – **kultivace** jsou často **zdlouhavé** a málo citlivé, **sérologie** ne zcela **specifická** a nebo není k dispozici (mukormycety, fusária)
- **Bakterie** – zejména **obtížně kultivovatelné** nebo **hrozí-li významná časová prodleva** (např. původci meningitidy), objasnění etiologie při zahájené ATB terapii (?)

# 2. Jak a čím?

## Rozdělení PCR metod

Podle  
možnosti  
kvantifikace

**Kvantitativní** – absolutní kvantifikace patogenů ve vzorku – nutno vyloučit inhibici PCR reakce

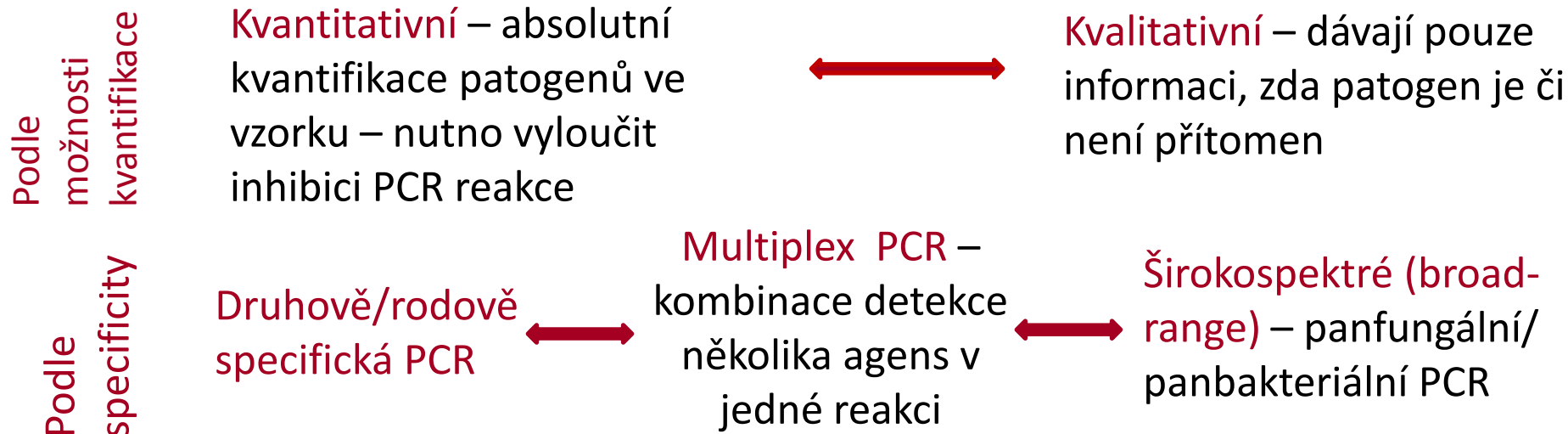


**Kvalitativní** – dávají pouze informaci, zda patogen je či není přítomen



# 2. Jak a čím?

## Rozdělení PCR metod



# 2. Jak a čím?

## Rozdělení PCR metod

Podle  
možnosti  
kvantifikace

**Kvantitativní** – absolutní kvantifikace patogenů ve vzorku – nutno vyloučit inhibici PCR reakce



**Kvalitativní** – dávají pouze informaci, zda patogen je či není přítomen

Podle  
specificity

**Druhově/rodově specifická PCR**



**Multiplex PCR** – kombinace detekce několika agens v jedné reakci



**Širokospektré (broad-range)** – panfungální/panbakteriální PCR

Přínos pro stanovení diagnózy

# 2. Jak a čím?

## Rozdělení PCR metod

Podle  
možnosti  
kvantifikace

**Kvantitativní** – absolutní kvantifikace patogenů ve vzorku – nutno vyloučit inhibici PCR reakce



**Kvalitativní** – dávají pouze informaci, zda patogen je či není přítomen

Podle  
specificity

**Druhově/rodově specifická PCR**



**Multiplex PCR** – kombinace detekce několika agens v jedné reakci



**Širokospektré (broad-range)** – panfungální/panbakteriální PCR

Přínos pro stanovení diagnózy

Testovaný  
materiál

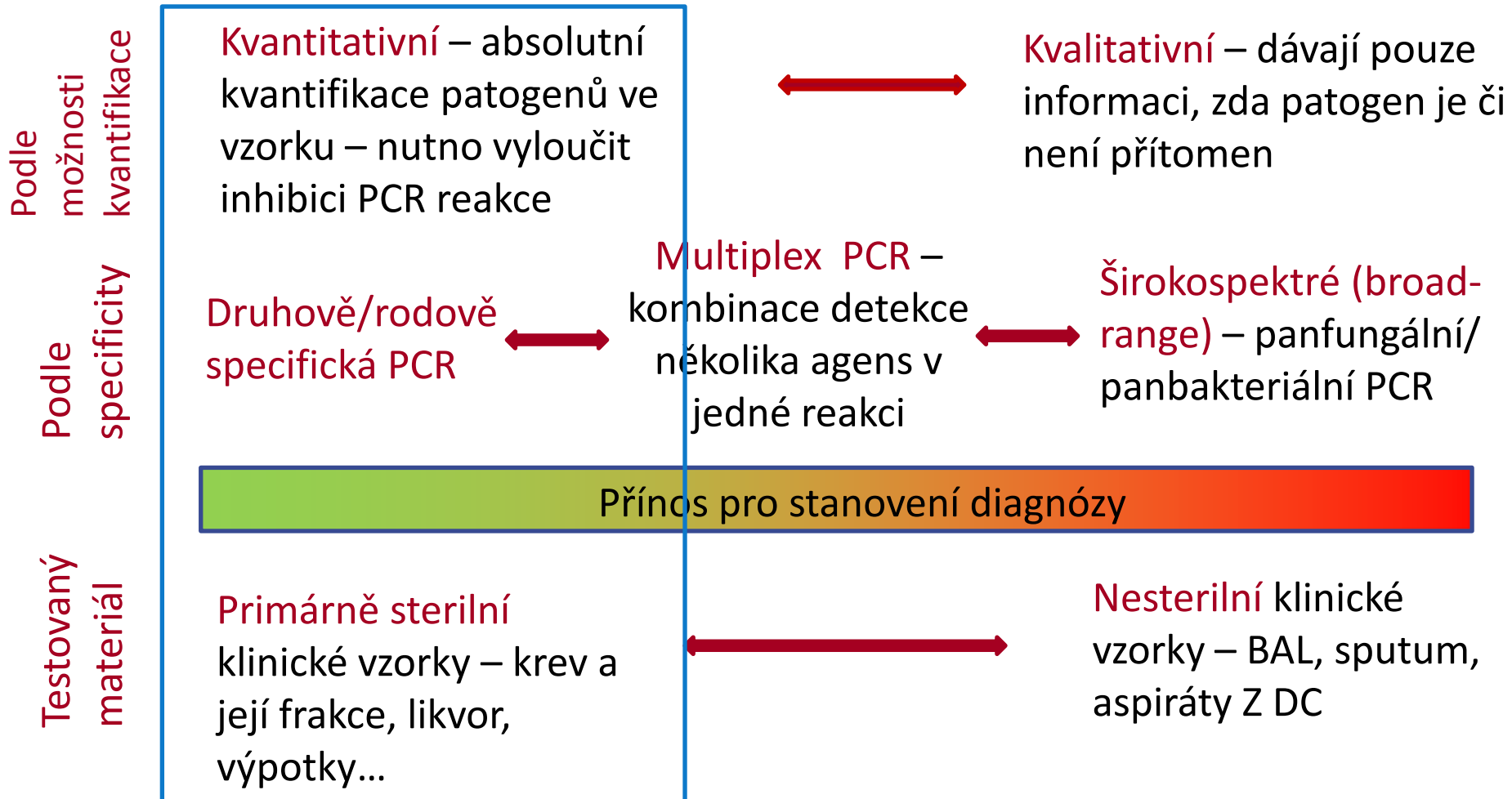
**Primárně sterilní** klinické vzorky – krev a její frakce, likvor, výpotky...



**Nesterilní** klinické vzorky – BAL, sputum, aspiráty Z DC

# 2. Jak a čím?

## Rozdělení PCR metod



## 2. Jak a čím?

Komerční diagnostické  
sety



„In-house“ diagnostické  
sety

- PRO

- Standardizace
- Uživatelsky přívětivé

- CON

- Cena
- Často nevhodná kombinace v sadě
- Neposkytují interpretaci nálezu

- PRO

- Cena
- Sestavy na míru

- CON

- Náročná validace
- Použití pouze ve specializovaných laboratořích
- Standardizace a „obhajitelnost“

# Výhody MB vyšetření - 1. rychlost

- PCR výsledek může být k dispozici i během několika málo hodin, ale...
  - laboratoř musí být opravdu blízko
  - týká se jen cílené detekce a kvantifikace – u broad-range metod nutná často sekvenace – prodleva až 48 hodin
  - pozor na pokroky v kultivaci - kombinace automatických kultivačních systémů a identifikace pomocí MALDI-TOF – identifikace z pozitivních hemokultur po krátkodobé kultivaci (4h)
- A hlavně - my nezávodíme :o), ale snažíme se maximálně efektivně získat relevantní výsledky, které potvrdí nebo vyloučí infekční etiologii při objasňování příčiny potíží pacienta – cena vs. výkon

# Výhody MB vyšetření - 2. vysoká citlivost

Ano, ale:

- Je 50 kopií JC viru/ml likvoru u imunokompromitovaného pacienta málo nebo moc?
- Nejasná **interpretace nízkých náloží** herpetických virů např. v bronchoalveolární laváži – reaktivace v souvislosti s mechanickou ventilací, souběžnou bakteriální infekcí atd.
- ...

# Úskalí interpretace výsledků molekulárně biologických vyšetření (laboratorní)

- Dostupnost ověřených **diagnostických souprav** – CE/IVD značka bohužel často není zárukou kvality
- **Genetická variabilita mikroorganismů** (může postihnout i komerční soupravy) – účast ve vhodných EHK
- **Ovlivnění výsledků** – kvalita vzorku, inhibice – komunikace lékař/laboratoř
- **Nejednotnost v jednotkách** používaných pro kvantifikaci (kopie/ml; kopie/PCR reakci; Ct hodnota)



# Úskalí interpretace výsledků molekulárně biologických vyšetření (klinická)

- Absence relevantních studií/doporučení – platí i mezinárodně
- Různé hladiny významné positivity u různých skupin pacientů komunikace lékař/laboratoř (+ možnost zacílit vyšetření...)
- Nesprávná/obtížná interpretace získaných výsledků – broad-range PCR
- Přehnaná očekávání indikujících lékařů – neexistují účinné „univerzální“ metody

# Závěrem

- MB metody mají své pevné postavení v diagnostice agens zmíněných v úvodu této přednášky
- Nelze je chápat jako univerzální nástroj pro detekci mikroorganismů v různých klinických materiálech – neefektivní testování vzorků na „všechno“. Žádná metoda neumí všechno.

**Děkuji za pozornost.**

Poděkování:

Mgr. Iva Kocmanová

Prof. MUDr. Zdeněk Ráčil, Ph.D.

Mgr. Pavlína Volfová, Ph.D.

