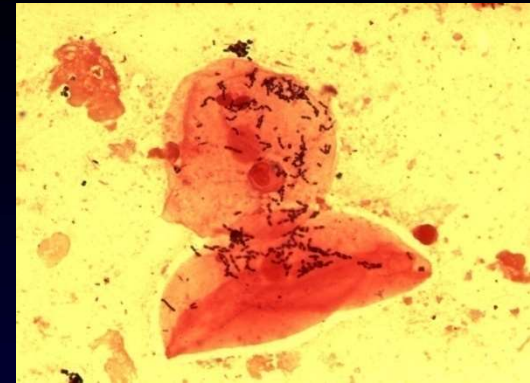


# Molekulární mikrobiologie



Pavel Dřevínek

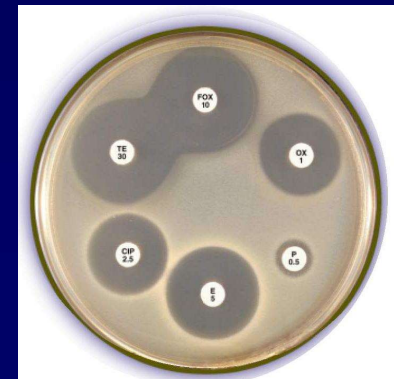
Ústav lékařské mikrobiologie  
2. LF UK a FN Motol



# Tradiční mikrobiologie

mikroskopie  
kultivace, ID a testování citlivosti na ATB  
detekce antigenu

sérologie a protilátky

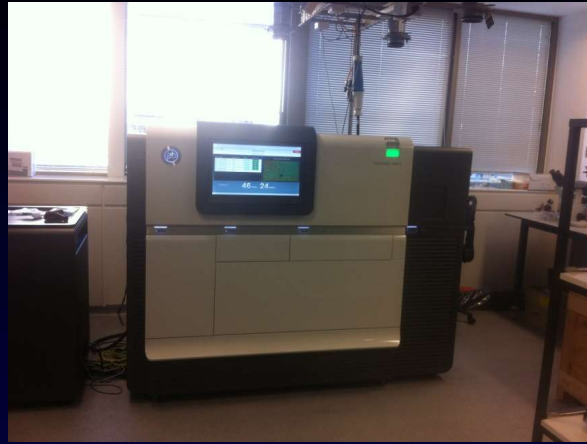
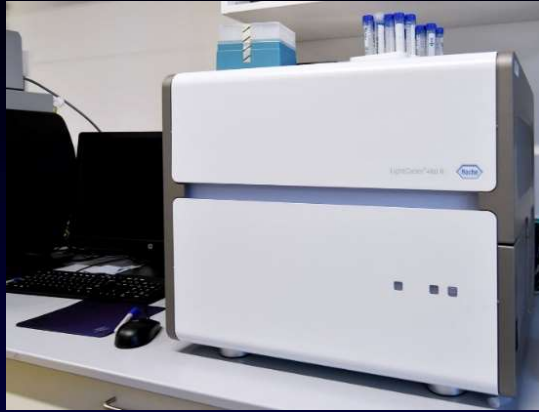




Ústav lékařské mikrobiologie  
2. LF UK a FN Motol

VČERA

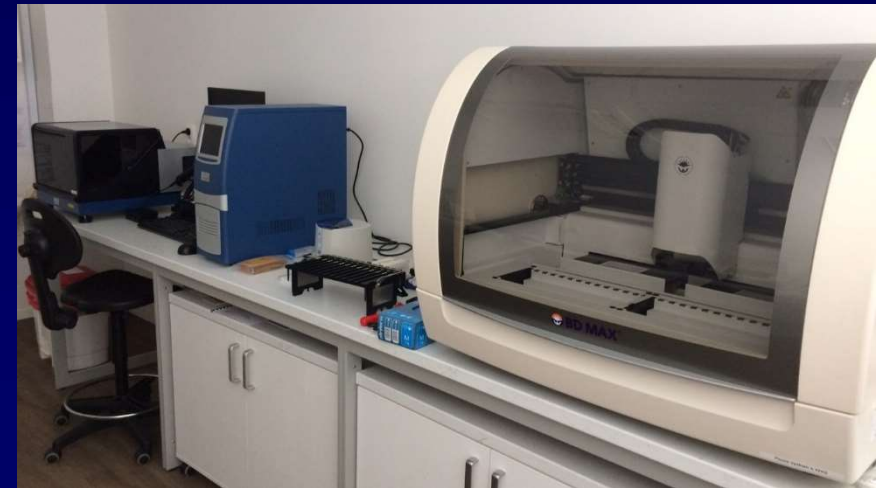




# Molekulární mikrobiologie

Analýza DNA či RNA pro účely:

- diagnostiky
- epidemiologie
- detekce genů virulence
- detekce genů rezistence



# Detekce DNA či RNA z důvodu diagnostického

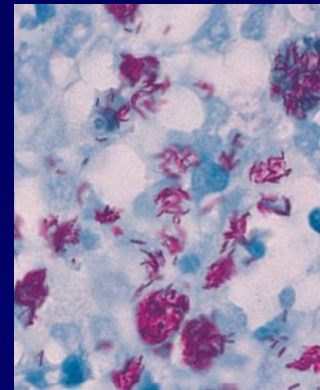
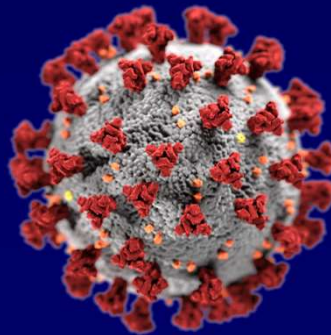
## Výhody

Diagnostika kultivačně negativních infekčních stavů

- záchyt nekultivovatelných agens, pomalu rostoucích, "náročných"
- při podávané antibiotické léčbě
- vysoká senzitivita metody

Rychlost provedení

Kvantifikace (určení virové nálože)



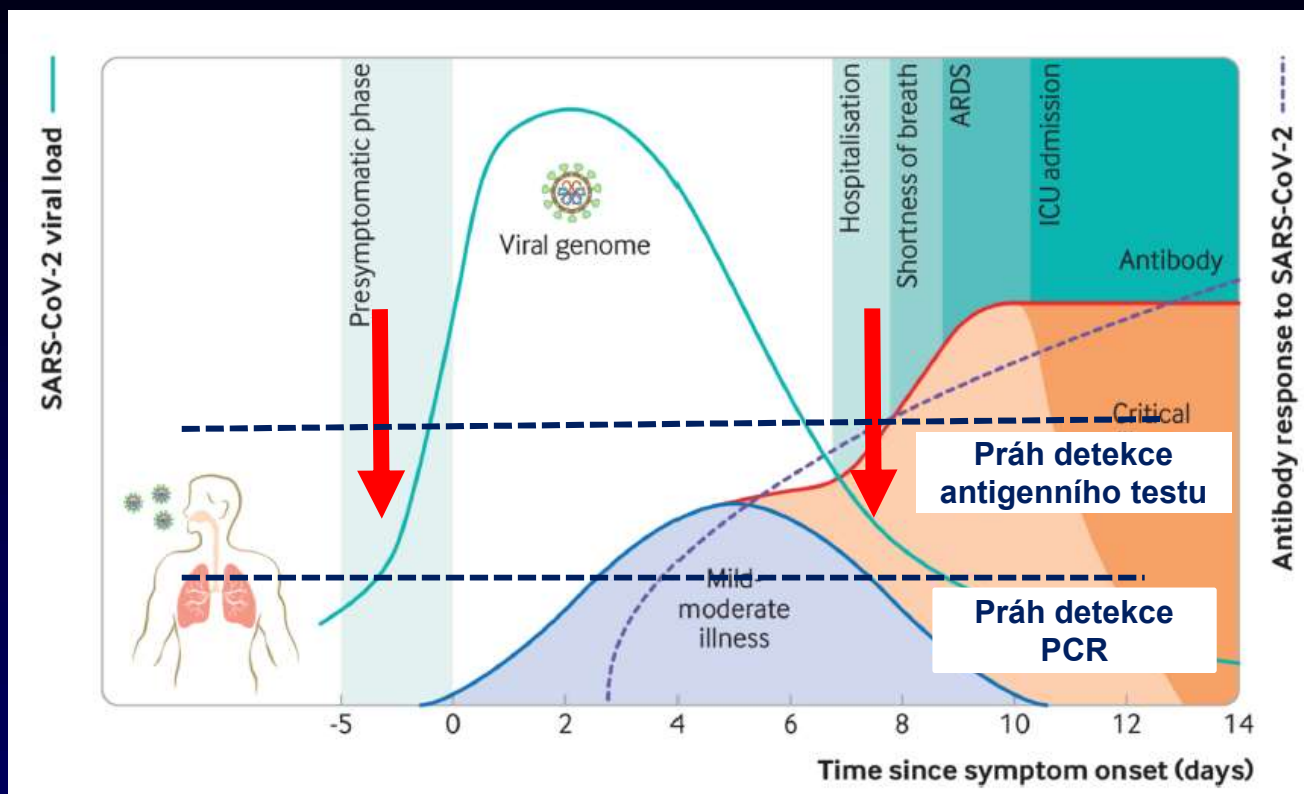
## Detekce DNA či RNA z důvodu diagnostického

### Nevýhody

nástrahy v interpretaci, na první pohled neviditelné:

- pochází detekovaná DNA ze živého agens?
- pozitivní výsledek: artefakt, kontaminace, kolonizace či patogen?

## PCR a jeho "falešná pozitivita"



- PCR díky své citlivosti může zachytit jedince, který se stane infekční o pár chvil později, antigenní test ho nezachytí
- pacient neinfekční, tj. pokud lze vyloučit, že se pacient nenachází v úvodní fázi infekce

## DNA diagnostika



na předem zvolený jeden  
mikroorganismus  
(patogen-specifické vyšetření)



na předem zvolené mikroorganismy  
(patogen-specifické vyšetření  
v multiplexu; syndromová PCR)

- otevřený systém
- uzavřený systém (využitelný jako POCT; point-of-care testování)



## DNA diagnostika



na předem zvolený jeden  
mikroorganismus  
(patogen-specifické vyšetření)

Otevřený systém:

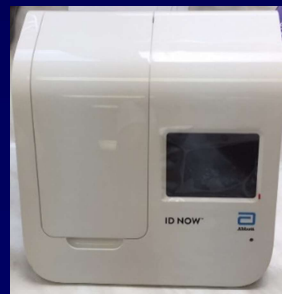
- SARS-CoV-2
- *Bordetella pertussis*
- EBV (kvantifikace)
- PVL

## DNA diagnostika

na předem zvolený jeden  
mikroorganismus  
(patogen-specifické vyšetření)

Uzavřený systém:

- SARS-CoV-2
- RSV
- chřipka
- *M. tuberculosis*



do 15 minut



za 80 minut

## DNA diagnostika



na předem zvolený jeden  
mikroorganismus  
(patogen-specifické vyšetření)



na předem zvolené mikroorganismy  
(patogen-specifické vyšetření  
v multiplexu; syndromová PCR)

Otevřený systém:



### Respirační infekce virové

chřipka A včetně typizace  
chřipka B  
RSV  
rhinoviry  
enteroviry  
viry parainfluenzy  
adenoviry  
parechovirus  
bocavirus  
metapneumovirus  
koronaviry sezónní  
SARS-CoV-2

### Respirační infekce atypické

*Mycoplasma pneumoniae*  
*Chlamydia pneumoniae*  
*Chlamydia psittaci*  
*Legionella pneumophila*  
*Pneumocystis jirovecii*  
*Cryptococcus neoformans*

### Střevní infekce

*Salmonella*  
*Campylobacter*  
*Shigella/ E. coli (EIEC)*  
*Shiga toxin (EHEC)*  
*Clostridium difficile (toxin A,B)*  
*Aeromonas*  
*Yersinia*  
Sapovirus  
Rotavirus  
Norovirus  
Adenovirus  
Astrovirus  
*Giardia intestinalis*  
*Cryptosporidium spp.*  
*Entamoeba histolytica*

### Sexuálně přenosná onemocnění

*Neisseria gonorrhoeae*  
*Chlamydia trachomatis*  
*Mycoplasma genitalium*  
*Mycoplasma hominis*  
*Ureaplasma urealyticum*  
*Ureaplasma parvum*  
*Trichomonas vaginalis*

## DNA diagnostika

na předem zvolený jeden  
mikroorganismus  
(patogen-specifické vyšetření)



na předem zvolené mikroorganismy  
(patogen-specifické vyšetření  
v multiplexu; syndromová PCR)

Uzavřený systém:

### Respirační infekce virové

chřipka A  
chřipka B  
RSV  
SARS-CoV-2



za 60 minut





## Meningitidy

*S. pneumoniae*

*N. meningitidis*

*H. influenzae*

*S. agalactiae*

*E. coli*

*L. monocytogenes*

enteroviry

HSV1

HSV2

VZV

CMV

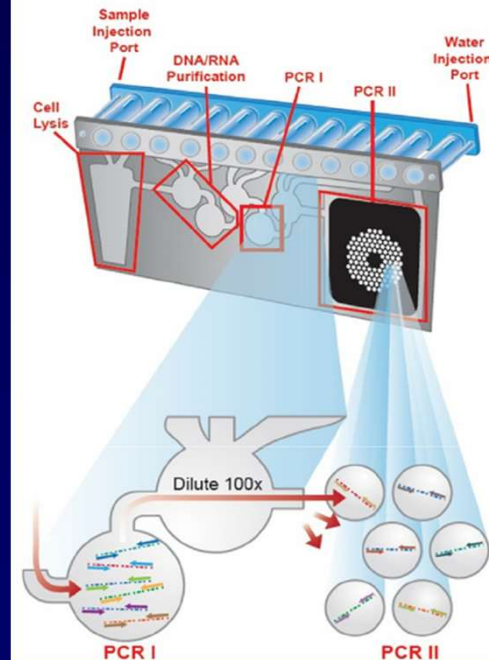
HHV6

parechovirus

*Cryptococcus neoformans*



### The FilmArray Pouch



## Pneumonie

chřipka A	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
chřipka B	<i>Klebsiella oxytoca</i>
RSV	<i>Klebsiella aerogenes</i>
rhinoviry/enteroviry	<i>Moraxella catarrhalis</i>
viry parainfluenzy	<i>Serratia marcescens</i>
adenoviry	<i>Staphylococcus aureus</i>
metapneumovirus	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
koronaviry sezónní	<i>Streptococcus pyogenes</i>
SARS-CoV-2	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	
<i>Legionella pneumophila</i>	CTX-M
<i>Acinetobacter baumannii</i>	IMP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KPC
<i>Enterobacter cloacae</i>	NDM
<i>Proteus spp.</i>	VIM
<i>Escherichia coli</i>	OXA-45-like
<i>Haemophilus influenzae</i>	mecA/C a MREJ



## DNA diagnostika

```
graph TD; A[DNA diagnostika] --> B[na předem zvolený jeden mikroorganismus (patogen-specifické vyšetření)]; A --> C[na kterýkoliv mikroorganismus (širokospektré vyšetření)];
```

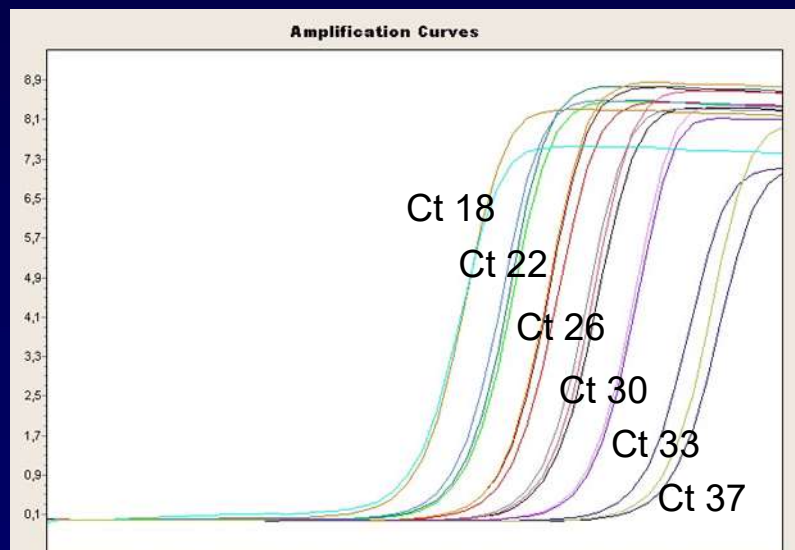
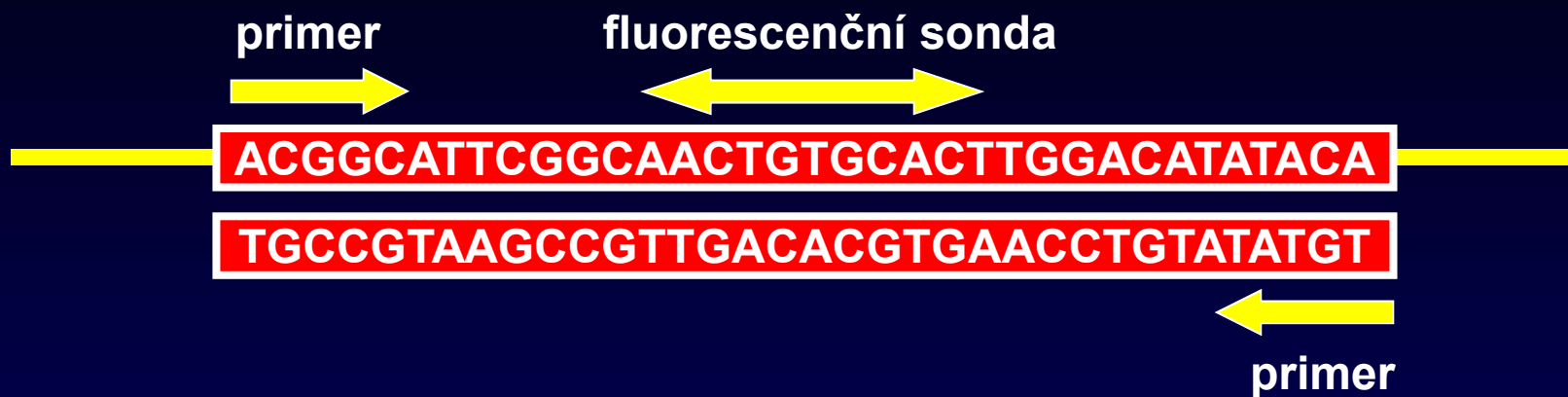
na předem zvolený jeden  
mikroorganismus  
(patogen-specifické vyšetření)

na kterýkoliv  
mikroorganismus  
(širokospektré vyšetření)

Pracovní kuchařka:

jak si vlastně "rozchodit" PCR tak, aby dělalo to, co si přejeme, že má dělat

detekce zaměřena na nukleotidovou sekvenci



Hodnota Ct = cyklus PCR,  
kdy začíná narůstat PCR signál

čím je Ct hodnota nižší, tím více je  
detekovaného agens ve vzorku



## Má pacient černý kašel?

(potřeba detekovat bordetelu, ostatní mikroorganismy mě nezajímají)

DNA diagnostika

```
graph TD; A[DNA diagnostika] --> B[na předem zvolený mikroorganismus (patogen-specifické vyšetření)];
```

na předem zvolený  
mikroorganismus  
(patogen-specifické vyšetření)

cílová sekvence pro primery musí být unikátní pro bordetelu



**Infekční endokarditida. Co je příčinou?**  
(potřeba detekovat kteroukoliv bakterii,  
protože kterákoli bakterie může způsobit endokarditidu)

DNA diagnostika



na kterýkoliv mikroorganismus  
(širokospektré vyšetření)

cílová sekvence pro primery je přítomna u všech bakterií

TGCCGTAA



stafylokok

ACGGCATT | CGGCAACTGTGCACTTGGACA | TATACA

streptokok

ACGGCATT | CGGCAACTGTGCACTTGGACA | TATACA

enterokok

ACGGCATT | CGGCAACTGTGCACTTGGACA | TATACA

Situace A

cílová sekvence pro primery je přítomna u všech bakterií

TGCCGTAA



stafylokok

ACGGCATT | CGGCAACTGTGCACTTGGACA | TATACA

streptokok

ACGGCATT | TCGATTACTGTACACTTGCCAT | TATACA

enterokok

ACGGCATT | CGTCCACAGTGCACTTGGACA | TATACA

Situace B



PCR pozitivita

+ sekvenace

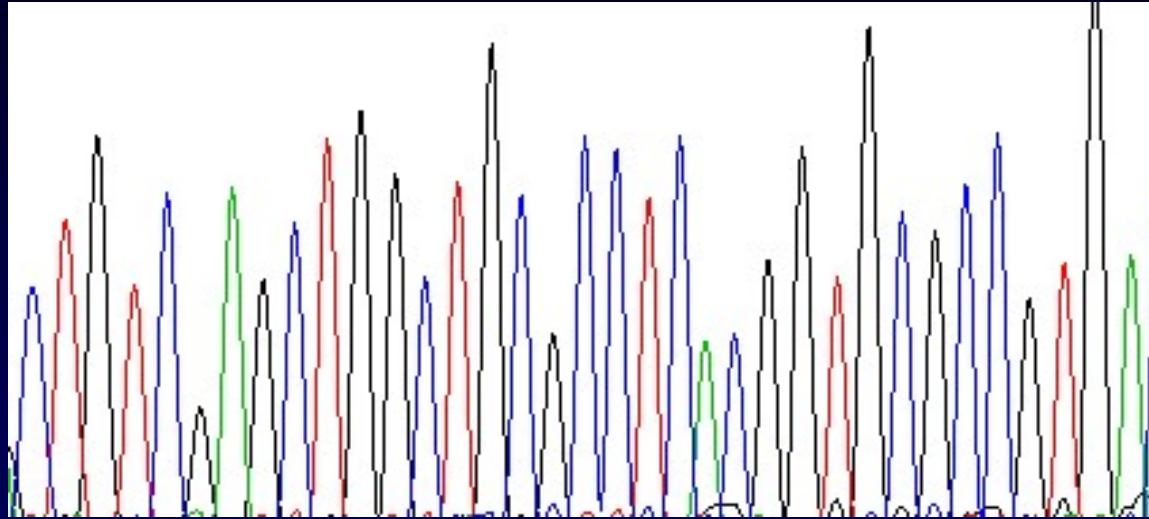
DETEKCE bakterie,  
ale které vlastně?

IDENTIFIKACE  
konkrétní bakterie

## Výsledek sekvenace PCR produktu:

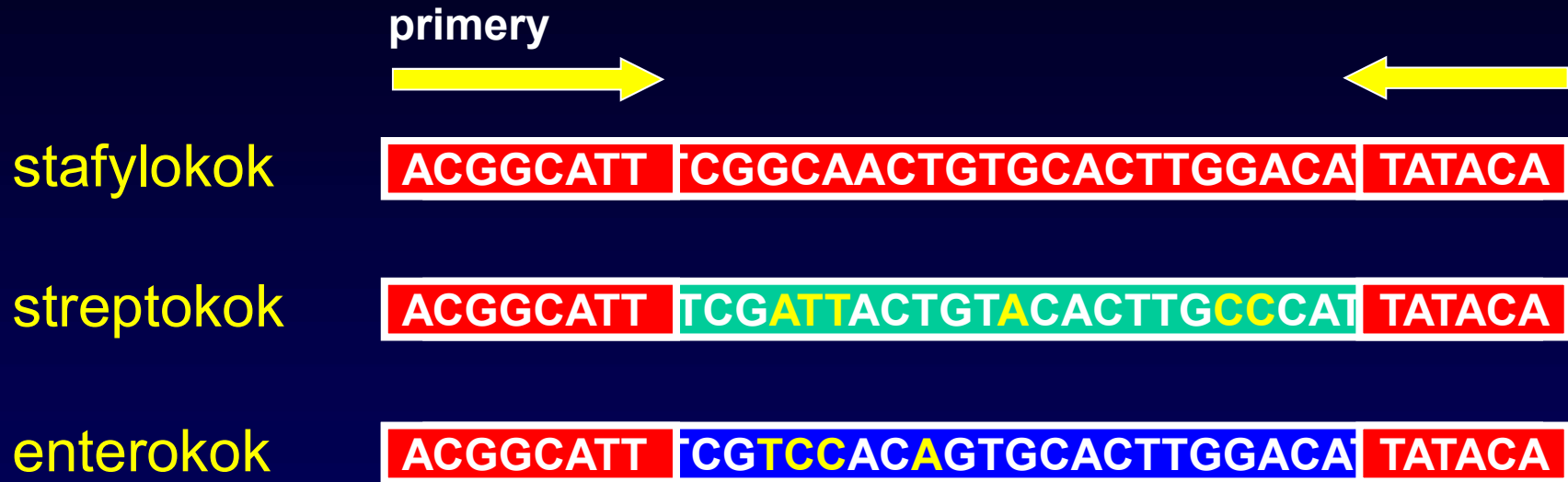
CTGTCGAGCTGGCTTGGCGCCTTCACGGTGCGCCGTGAC

→ *S. aureus*



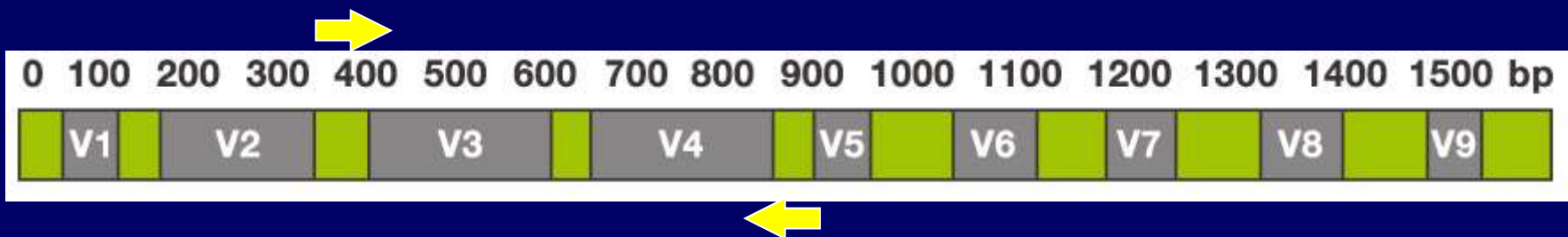
C T G A

cílová sekvence pro primery je přítomna u všech bakterií

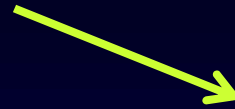


situace B !

gen pro 16S rRNA



DNA diagnostika

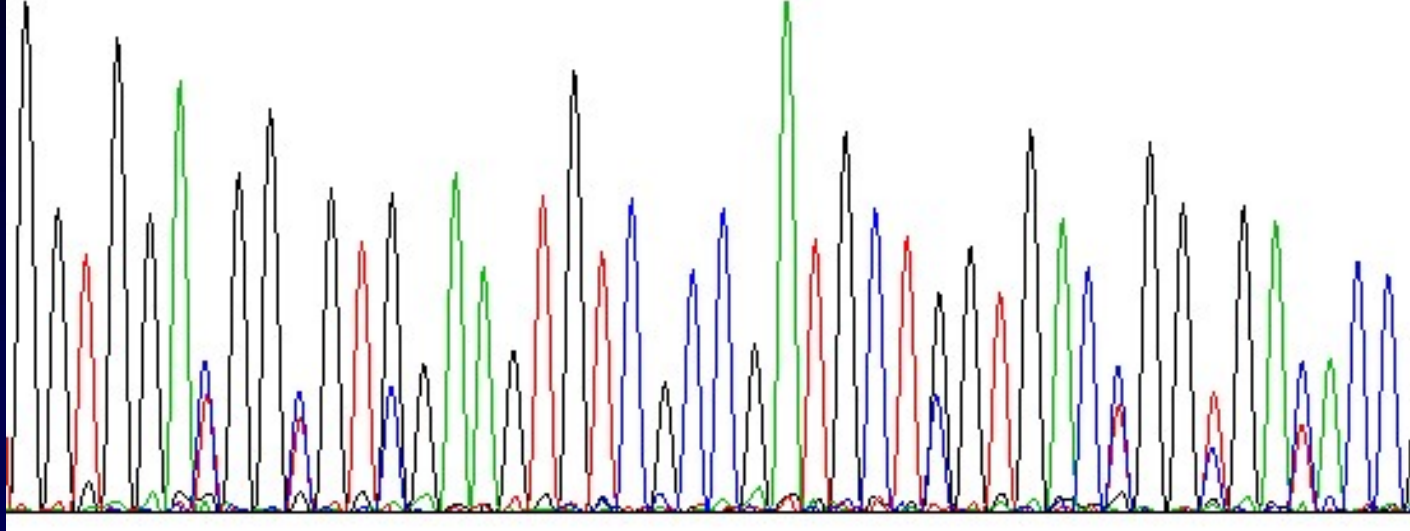


na kterýkoliv  
mikroorganismus  
(širokospektré vyšetření)

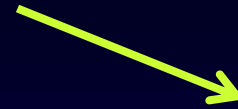
- z primárně sterilního materiálu

.... jinak se stane tohle:

G G T G G A N G G N G T N G A A G T G T C G C C G A T G C T S G T G A C N G G N G A N A C C



## DNA diagnostika



na všechny  
mikroorganismy  
(metagenomika)

### Metoda

Masivně paralelní sekvenování  
(NGS)

na kterýkoliv  
mikroorganismus  
(širokospektré vyšetření)

### Metoda

PCR genu pro 16S rRNA  
a Sangerovo sekvenování

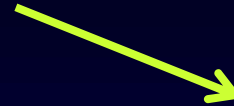
## Závěr

- Klinická mikrobiologie využívá možnosti molekulární genetiky v každodenní diagnostické praxi z důvodu:
  - rychlosti vyšetření
  - citlivosti, specificity
  - detekce nekultivovatelných agens
  - detekce při současně podávané ATB léčbě
- Infekční diagnostika
  - široká škála patogen specifických PCR
  - v nabídce i panbakteriální PCR

vzorek  
krve







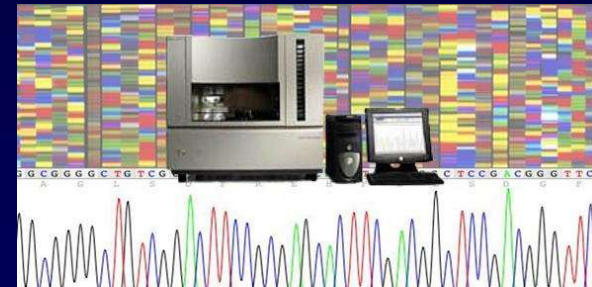
na předem zvolené  
mikroorganismy

na kterýkokoliv  
mikroorganismus



### Infekce krevního řečiště

*Escherichia coli*  
*Staphylococcus aureus*  
*Klebsiella pneumoniae*  
*Acinetobacter baumannii*  
*Pseudomonas aeruginosa*  
*Enterococcus faecium*



### PCR genu pro 16S rRNA a Sangerovo sekvenování

*S. aureus*, *S. lugdunensis*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. intermedius*, *S. mitis*, *L. monocytogenes*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. coli*, *S. enterica*, *E. cloacae*, *P. stuartii*, *M. morgani*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *C. jejuni*, *C. foetus*, *N. meningitidis*, *B. fragilis*, *P. gingivalis*, *F. necrophorum*, *P. micros*, *F. magna*, .....

## Závěr

- Klinická mikrobiologie využívá možnosti molekulární genetiky v každodenní diagnostické praxi z důvodu:
  - rychlosti vyšetření
  - citlivosti, specificity
  - detekce nekultivovatelných agens
  - detekce při současně podávané ATB léčbě
- Infekční diagnostika
  - široká škála patogen specifických PCR
  - v nabídce i panbakteriální PCR
- Interpretace výstupů je nutná; založená na znalostech mikrobiologie a dané technologie

## Automatizace provozu (diagnostiky založené na kultivaci)

