PCR diagnostika infekcí

Tomáš Freiburger

Centrum kardiiovaskulární a transplantační chirurgie, Brno

Souhrn

Základním kamenem laboratorní diagnostiky etiologie infekčních nemocí jsou postupy založené na kultivaci mikroorganismů. Stále více se však i v běžné klinické praxi uplatňují molekulárně biologické, na kultivaci nezávislé metody detekce mikroorganismů, které jsou důležitým doplňkem konvenčních postupů a v některých případech se již staly zlatým diagnostickým standardem. Nejčastěji jsou používány metody založené na polymerázové řetězové reakci (PCR – polymerase chain reaction).

Klíčová slova: molekulárně genetická detekce mikroorganismů – polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR diagnosis of infectious diseases

Summary

The practices based on microbe cultivation are the corner stone of laboratory diagnostics of infectious diseases etiology. However, cultivation-independent molecular methods for microorganism detection are increasingly being used in a routine clinical setting as an important complement to the conventional procedures and, in some cases, they have already become the golden diagnostic standard. The PCR-based methods are used the most frequently.

Key words: molecular genetic detection of microorganisms – polymerase chain reaction (PCR)

Úvod

V genetické laboratoři Centra kardiiovaskulární a transplantační chirurgie v Brně používáme molekulárně genetické metody detekce mikrobů působících infekční komplikace zejména u imunokompromitovaných pacientů po transplantaci orgánů, u pacientů s infekční endokarditidou, bakteriální meningitidou, tkáňovými abscesy či septickou artritidou. Přínos těchto metod budu na úvod krátce demonstrovat na 2 případech z klinické praxe.

Kazuistika 1

Muž ve věku 33 let s artralgiemi trvajícími několik měsíců byl akutně přijat na neurologii pro bolest hlavy trvající 5 dní, subfebrilie až febrilie, změněné chování v posledních 2 dnech a bolesti levé horní končetiny [1]. Laboratorně byla zaznamenána leukocytóza, CRP 190 mg/l. V likvoru bylo zaznamenáno jen lehké zmnožení buněčných elementů (segmentů a lymfocytů), jeho kultivační vyšetření nezachytilo žádné infekční agens. Vyšetření mozku pomocí CT i MRI ukázalo mnohočetná drobná ischemická ložiska. Cévní uzávěr levé horní končetiny si vyžádal akutní embolektomii. Následné transezofageální ultrasonografické vyšetření srdce prokázalo aortální regurgitaci 3.–4. stupně, vegetaci o velikosti 15 × 21 mm na bikuspidální aortální chlopni a také malou vegetaci na mitrální chlopni. Přes čtyřnásobnou negativitu hemokultur byla splněna modifikovaná Duke krité-

ria [2] pro jistou diagnózu infekční endokarditidy. Pacient byl léčen kombinací vankomycinu a ciprofloxacinu, přesto byla nutná opakovaná embolektomie na levé horní končetině a chirurgická náhrada aortální i mitrální chlopně. Mikrobiologické kultivační vyšetření vegetací bylo negativní, molekulárně genetické vyšetření metodou širokospektré amplifikace genu *16s rDNA* pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR – polymerase chain reaction) a následného sekvenování ukázalo přítomnost genomu *Tropheryma whipplei* ve vzorku. *Tropheryma whipplei* je grampozitivní tyčka, která může být vzácně příčinou infekční endokarditidy a kterou nelze běžnými kultivačními technikami prokázat. Po stanovení diagnózy byl pacientovi podáván kotrimoxazol po dobu 3 týdnů a následně trimetoprim 6 měsíců. Po 1 roce od operace byl pacient bez obtíží, jen s lehkou reziduální dysartrií.

Kazuistika 2

Muž ve věku 63 let byl přijat pro 1 měsíc trvající klidovou dušnost a známky kardiální dekompenzace, v osobní anamnéze diabetes mellitus 2. typu a hypertenze [3]. Při přijetí byl krevní tlak 96/30 mm Hg, byla přítomna tachykardie, systolický šelest, laboratorně mírná leukocytóza a hladina CRP 34 mg/l. Transezofageální ultrasonografické vyšetření ukázalo mobilní element velikosti 5 × 20 mm na trojčipé částečně destruované aortální chlopni a závaž-

nou aortální regurgitaci. Z hemokultur byly po 4denní kultivaci hlášeny gramnegativní tyčky sice bez možnosti dalšího určení, ale antibiotická citlivost mohla být stanovena. Na základě Duke kritérií byla postavena diagnóza jisté infekční endokarditidy, pacient byl léčen ampicilinem se sulbaktamem. 20. den hospitalizace došlo k akutní kardiální dekompenzaci a bylo nezbytné provést chirurgickou náhradu aortální chlopně společně s anuloplastikou trikuspidální chlopně. Kultivační vyšetření srdeční tkáně bylo negativní, molekulárně genetickým vyšetřením pomocí širokospektré PCR a sekvenování byl prokázán mikrob *Cardiobacterium valvarum* ze skupiny HACEK, vzácně popisovaný jako příčina infekční endokarditidy. Pacient byl poté léčen cefotaximem i.v. po dobu 4 týdnů, prvních 10 dní v kombinaci s gentamicinem, po propuštění pak další 4 týdny perorálně cefuroximem. Po 1 roce byl stav velmi uspokojivý, bez reziduí, klasifikován ve třídě NYHA I.

Výhody a limity molekulární detekce patogenů

V obou uvedených případech bylo vyšetření metodou PCR jedinou cestou vedoucí k určení etiologie infekčního onemocnění. Skutečně jsme svědky trendu, podle něhož se molekulárně genetické metody detekce patogenů stále více stávají součástí rutinní mikrobiologické diagnostiky [4]. Rozhodně nenahrazují konvenční postupy založené na kultivaci, ale často mohou být jejich vhodným a důležitým doplňkem. Jsou založeny na detekci mikrobiálních nukleových kyselin, a nejsou tedy závislé na viabilitě patogenních mikroorganismů. Uplatňují se zejména v situacích, v nichž jsou klasické mikrobiologické techniky méně spolehlivé, nejsou dostatečně senzitivní či specifické, nebo jsou příliš zdoluhavé. Molekulární metody umožňují rychlou detekci i takových mikrobů, jejichž kultivace je obtížná nebo nemožná, popřípadě se nedaří v důsledku současně podávané antibiotické terapie. V diagnostice virových infekcí umožňují kvantitativní stanovení virové nálože ve vyšetřovaném vzorku, což má význam z hlediska volby optimální terapie, stanovení prognózy onemocnění a monitorování odpovědi na podávanou léčbu. Pochopitelně i molekulární metody mají svá omezení. Limitacemi jsou riziko falešně pozitivních i falešně negativních výsledků, nemožnost stanovení citlivosti na antimikrobiální léčbu a vyšší náklady na vyšetření. Riziko laboratorní kontaminace i přítomnosti nežádoucích inhibitorů analýzy lze ovšem podstatně snížit dodržením správných pracovních postupů a zařazením odpovídajících kontrolních vzorků. V každém případě je nutné zdůraznit, že interpretace pozitivních výsledků musí být velmi obezřetná a musí odrážet klinický stav pacienta a povahu konkrétního identifikovaného mikroorganismu ve vztahu k vyšetřovanému klinickému materiálu.

Postup a metody molekulárně genetické detekce mikroorganismů

Klíčovou procedurou úspěšné molekulární detekce patogenů je izolace kvalitní mikrobiální DNA, resp. RNA z bio-

logického materiálu. Na ni navazuje některá z metod analýzy nukleových kyselin. Nejrozšířenější jsou metody amplifikace cílové sekvence mikrobiálního genomu pomocí PCR nebo jejich modifikací.

PCR zajistí zmnožení úseku mikrobiální DNA, který je ohraničen specificky navázanými krátkými oligonukleotidovými primery. Amplifikovaný produkt je vizualizován po elektroforéze na agarózovém či polyakrylamidovém gelu, případně s využitím kolorimetrických nebo fluorescenčních technik. Reverzní PCR (RT-PCR) je modifikace, kdy vstupním templátem je RNA, která je nejdříve pomocí reverzní transkriptázy přepsána do cDNA. RT-PCR se používá např. k detekci RNA virů. Citlivější variantou PCR je dvoukolová, tzv. nested PCR. Kvantifikace vstupního počtu kopií mikrobiálního genomu se nejčastěji provádí pomocí PCR v reálném čase.

V rutinní diagnostice se využívá především specifická PCR, která je zaměřena na konkrétní etiologické agens, např. *Mycobacterium tuberculosis*, *Aspergillus* spp. či virus hepatitidy C. K amplifikaci dochází pouze tehdy, je-li ve vzorku přítomna DNA (RNA) příslušného patogenu. Naproti tomu metodou univerzální (šírokospektré) PCR může být amplifikována DNA jakékoliv bakterie či houby, protože primery jsou navrženy do konzervovaných částí genomu, které jsou společné všem bakteriím, resp. houbám. Oblasti amplifikované DNA ležící mezi primery přitom vykazují mezirodovou i mezidruhovou variabilitu. Produkt PCR je podroben sekvenční reakci, určená sekvence je porovnána s databází dosud publikovaných sekvencí a na základě analýzy homologie je stanoven daný patogen. Tímto přístupem byly detekovány i někteří noví původci infekčních onemocnění, např. *Tropheryma whipplei*. Specifická reakce vykazuje ve srovnání s univerzální PCR vyšší senzitivitu a menší riziko kontaminace a je vhodná v situacích, v nichž nás zajímá konkrétní agens nebo pátráme v relativně úzkém okruhu patogenů. Pomocí univerzální PCR může být v jednom vyšetření detekován jakýkoliv patogen včetně velmi vzácných druhů. Pro specifickou detekci celé řady patogenů jsou již dostupné komerční standardizované soupravy, širokospektrá PCR zatím nebyla pro širší využití validována, ačkoliv její přínos v řadě aplikací byl již jednoznačně prokázán.

Praktické využití a význam molekulární detekce patogenů

Virové infekce

Největší přínos mají metody molekulární detekce patogenů v klinické virologii, protože jsou rychlejší a často i citlivější než tradiční diagnostické postupy. Uplatňují se zde více než v bakteriologii, protože kultivace virů jsou náročné a nákladné, testování citlivosti na antivirotika se rutinně neprovádí a možnosti kvantifikace jsou u klasických metod limitovány. V případě enterovirových a herpetických meningoencefalitid vyvolaných lidským virem herpes simplex nebo infekcí HCV se molekulární metody již staly zlatým diagnostickým standardem. Běžně se molekulární přístup využívá také v diagnostice infekcí virem hepatitidy B (HBV), HIV, u imunokompromitovaných pa-

cientů cytomegalovirem (CMV) a virem Epsteina-Barrové (EBV), ale také u infekcí lidskými papillomaviry (HPV), parvovirem B19 a řadou dalších. Nejčastější metodou je PCR, resp. RT-PCR u RNA virů, nejrozšířenější technika kvantifikace virové nálože je PCR v reálném čase. Kvantifikace je velmi důležitá pro určení prognózy onemocnění. U pacientů po transplantacích se na základě počtu detekovaných kopií CMV rozhoduje o nasazení preemptivní antivirové léčby. Virová nálož je také velmi efektivním prostředkem ke sledování účinnosti antivirové terapie.

Bakteriální infekce

Molekulární detekce bakteriální DNA má největší význam u patogenů, u nichž je kultivace velmi obtížná, ne-li nemožná (např. *Tropheryma whipplei*, *Bartonella* sp.), které jsou náročné na transportní podmínky, během transportu hynou nebo přežívají v malém počtu a v kultivačních médiích jsou přerůstány kontaminující flórou (např. *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*), dále těch, u nichž je průkaz klasickými technikami časově náročný (např. *Mycobacterium tuberculosis*) nebo u nichž kultivace není úspěšná z důvodu probíhající antimikrobiální léčby. Použití specifické PCR je racionální v těch klinických situacích, v nichž potřebujeme potvrdit či vyloučit jeden nebo několik málo konkrétních patogenů, přičemž výsledek je k dispozici během několika hodin, zatímco v ostatních případech je efektivnější aplikovat univerzální PCR. Jako cílová sekvence je v tomto případě nejčastěji používán gen kódující podjednotku 16S ribozomální RNA (16S rDNA). Přínos univerzálního přístupu byl prokázán zejména při vyšetřeních srdeční tkáně u chirurgicky léčených pacientů s infekční endokarditidou, likvoru u pacientů s meningitidou, kloubních punktátů u pacientů s infekčními komplikacemi po umělých náhradách kloubů, tkáňových abscesů, ale také při analýzách čistých bakteriálních kultur, pokud klasická fenotypizace nevede k určení patogenu. Omezeně je zatím molekulární detekce využitelná u septických stavů.

Mykotické infekce

Molekulární detekce kvasinkové a plísňové DNA má největší význam u imunokompromitovaných pacientů, zejména neutropenických, u nichž invazivní mykotické infekce znamenají život ohrožující komplikace, které mají velmi rychlý začátek i průběh, a jejichž úspěšné zvládnutí je kriticky závislé na včasném podání antimykotických léků. Konvenční metody mají četné limitace. Přímá mikroskopie je velmi rychlá, ale senzitivita je nízká a možnost rodového rozlišení je omezená. Histologické vyšetření vyžaduje invazivní zákrok, který může být problematický z hlediska lokalizace infekčního ložiska nebo u trombocytopenických pacientů, a přesná identifikace patogenu tímto přístupem zpravidla také není možná. Kultivace poskytne výsledek za 1 týden až 1 měsíc a požadovaná informace tak přichází s velkým zpožděním. Klinické projevy jsou často nespecifické, přínosné ale může být radiologické vyšetření, které odhalí aspergilózu v časném (i pozdním) stadiu, změny v CT obraze s vysokým rozlišením

jsou velmi charakteristické. Důležitou informaci mohou poskytnout sérologická vyšetření přítomnosti specifických antigenů, mannanu u kvasinkových infekcí, galaktomannanu u aspergilózy a β -D-glukanu u všech mykóz s výjimkou infekcí zygomycetami a kryptokoky. Metody založené na PCR překlenují mnohá z uvedených omezení. Jsou velmi senzitivní i specifické a výsledek je znám do několika hodin v případě specifického vyšetření a do 1–2 dní u panfungálních analýz. Interpretace pozitivních výsledků však musí být obzvláště obezřetná s ohledem na riziko kontaminace nebo detekce agens, která pouze kolonizují organismus hostitele. Optimální se v diagnostice invazivních mykotických infekcí jeví kombinace více přístupů, např. PCR a sérologických metod stanovení antigenemie a její dynamiky. Metody specifické detekce se využívají zejména pro stanovení infekcí *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Cryptococcus neoformans* a *Pneumocystis jiroveci*, které jsou nejčastější. Univerzální (panfungální) PCR je nejčastěji zaměřena na oblasti DNA zvané ITS I a ITS II, lokalizované mezi geny kódujícími podjednotky 18S, 5.8S a 26S ribozomální DNA. Problémem molekulární detekce mykotických infekcí je dosud nedostatečná standardizace metod a také jejich cena.

Závěr

Metody molekulární detekce patogenů v žádném případě nenahrazují klasické kultivační techniky, ale mohou znamenat jejich důležité doplnění a v některých klinických situacích mohou již dnes hrát zásadní roli. Lze předpokládat, že využitím nových technologií budou možnosti diagnostiky patogenů, včetně určení rezistencí k antimikrobiální léčbě, dále narůstat. Detekce dalších genetických faktorů jak na straně mikrobu, tak na straně hostitele, bude v budoucnu pravděpodobně přispívat k přesnějšímu odhadu prognózy infekčních onemocnění a stanovení optimálního léčebného postupu.

Literatura

1. Kolek M, Žaloudíková B, Freiberger T et al. Infekční endokarditida aortální a mitrální chlopně vyvolaná *Tropheryma whipplei* při nepřítomnosti gastrointestinálních projevů Whippleovy choroby – kazuistika. *Klin Mikrobiol Infekc Lek* 2007; 13(5): 212–215.
2. Li JS, Sexton DJ, Mick N et al. Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis. *Clin Infect Dis* 2000; 30(4): 633–638. Dostupné z DOI: <<https://doi.org/10.1086/313753>>.
3. Vaněrková M, Žaloudíková B, Němcová E et al. Detection of *Cardiobacterium valvarum* in a patient with aortic valve infective endocarditis by broad-range PCR. *J Med Microbiol* 2010; 59(Pt 2): 231–234. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.012948-0>>.
4. Freiberger T. Molekulární detekce patogenů. In: Souček M et al (ed). *Vnitřní lékařství*. Grada: Praha-Brno 2011: 52–54. ISBN 978–80–247–2110–1. 978–80–904731–0–2 a 978–80–210–5418–9.

doc. MUDr. Tomáš Freiberger, Ph.D.

✉ tomfre@cktch.cz

Centrum kardiovaskulární a transplantační chirurgie, Brno
www.cktch.cz

Doručeno do redakce 26. 7. 2017

Přijato po recenzi 15. 8. 2017