

**„Možná, že se vám zdá, že tady nikdo není.
Ale já ji tuším, tu bestií bakteriální!“**

Molekulární diagnostika

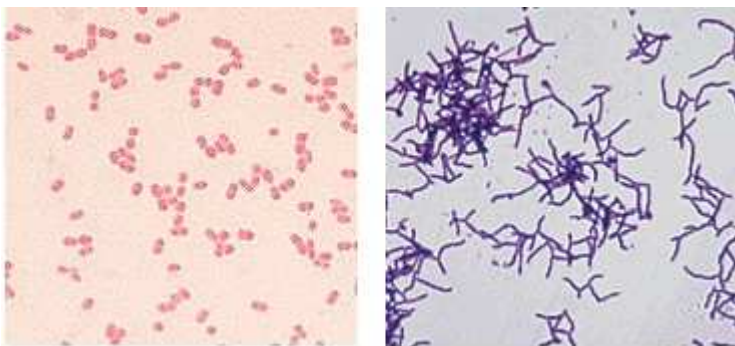
Její postavení v diagnostice infekčních stavů

MUDr. Martin Kolář
KAR FNKV

Odborná spolupráce: MUDr. Soňa Peková, PhD
laboratoř Chambon



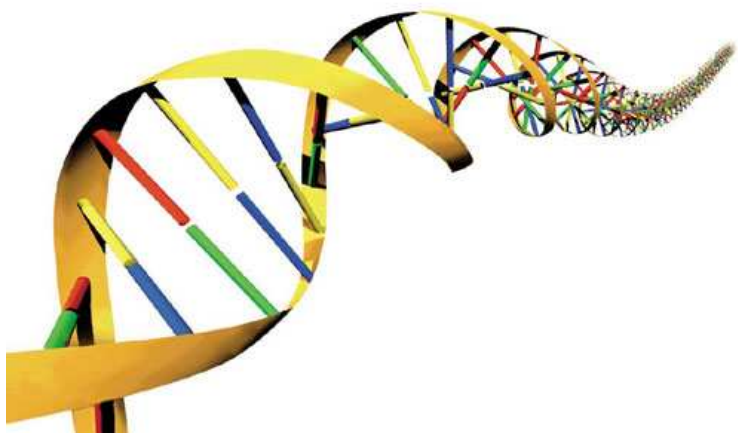
Metody mikrobiologické diagnostiky



- rychlé (minuty)
- levné
- hrubě orientační



- pomalé (dny – týdny)
- levné
- informuje o citlivosti k atb
- nezachytí všechny patogeny

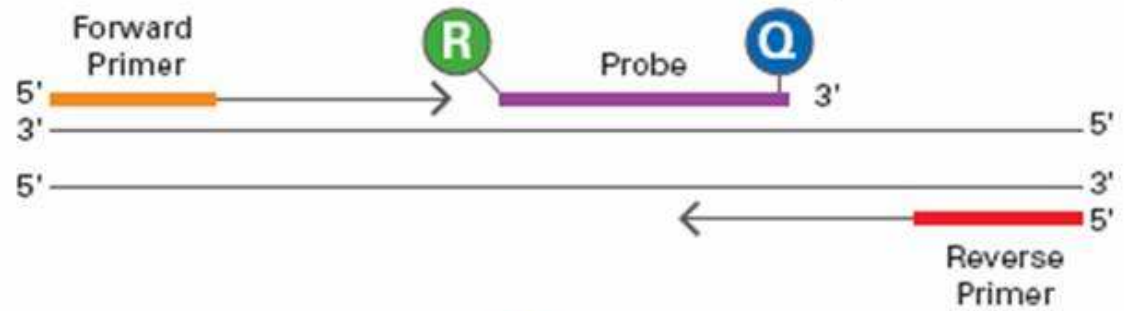


- rychlé (hodiny)
- drahé
- široké spektrum detekce
- neinformuje o citlivosti k atb

Kdo nese náklady?

Metodika molekulární diagnostiky

- polymerázová řetězová reakce (PCR)
 - Real Time PCR
 - umožňuje nejen kvalitativní, ale i kvantitativní stanovení
 - stanovuje přítomnost 16S nebo 18S rDNA
 - druhově specifické sekvence genomu, **nevyskytují** se bodové mutace
- patogen – specifické sondy
 - nyní asi 130 nejčastějších patogenů
- sekvenační dourčení patogena



*** Kompletní rozsah detekčních systémů:**

BactoPlexX:

G(-) : *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae/aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*

G(+) : *Staphylococcus aureus*, Koaguláza-negativní stafylokoky (*Staphylococcus epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. intermedius*, *S. xylosum*), *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* spp. (*Streptococcus agalactiae*, *S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. dysgalactiae*, *S. infantarius*, *S. intermedius*, *S. minor*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. oligofermentans*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*, *S. peroris*, *S. pseudopneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. thermophilus*, *S. viridans*), *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*

Pneumoplex: *Legionella pneumoniae*, *Legionella micdadei*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *Burkholderia* spp. (*Burkholderia cenocepacia*, *B. multivorans*, *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. ambifaria*, *B. gladioli*, *B. phenazinium*, *B. vietnamensis*)

Meningoplex: *Neisseria meningitidis*, *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*Borrelia burgdorferi*, *B. afzelii*, *B. garini*), *Haemophilus influenzae* (sérotyp A-F), *Fusobacterium nucleatum* (*Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum*, *F. nucleatum* subsp. *vincenti*, *F. nucleatum* subsp. *polymorphum*), *Listeria monocytogenes*

Uroplex: *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis*, *Morganella morganii*, *Trichomonas vaginalis*

Mycobacterium spp. se sekvenčním dourčením (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. ulcerans*, *M. goodii*, *M. scrofulaceum*, *M. bovis*, *M. mageritense*, *M. xenopi*, *M. kansasii*, *M. intracellulare*, *M. avium* subsp. *avium*, *M. fortuitum*)

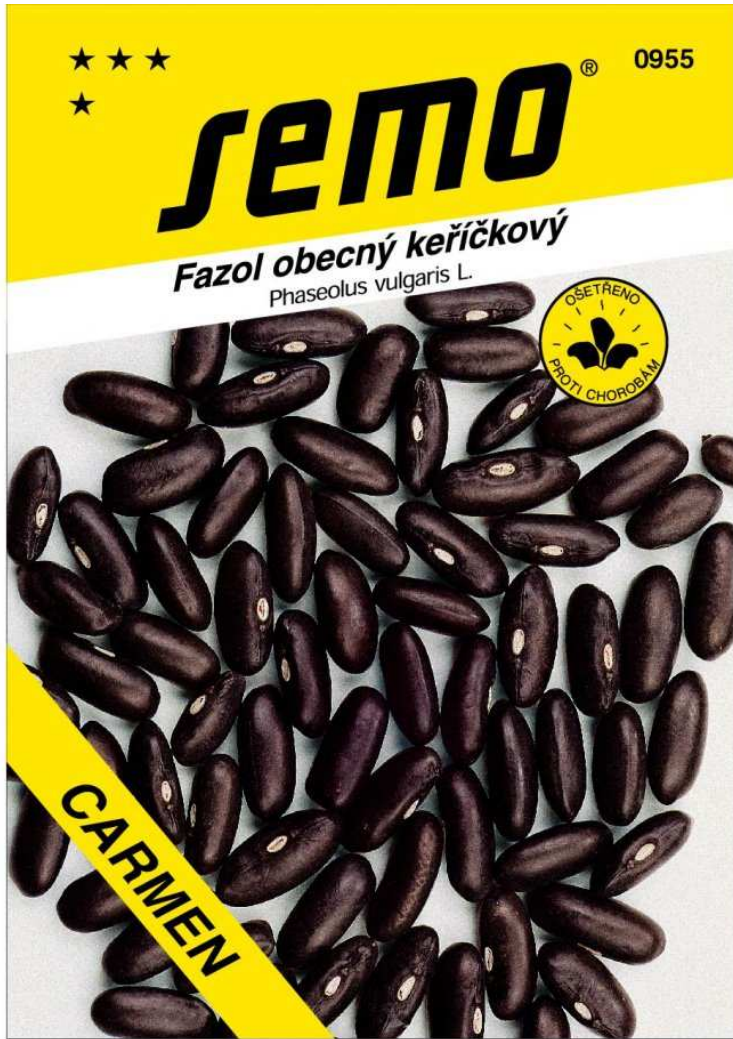
FungiPlexX: *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida inconspicua*, *Candida lusitanae*, *Candida (Pichia) fabianii*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida (Pichia) guilliermondii*, *Fusarium* spp., *Cladosporium cladosporioides*, *Pneumocystis jirovecii*, *Mucoraceae* (*Rhizopus microsporus*, *Rhizopus oryzae*, *Mucor plumbeus*, *Mucor indicus*), *Cryptococcus* spp. (*Cryptococcus aureus*, *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus neoformans*), *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus* spp. (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus ustus*, *Aspergillus cervinus*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*)

Výhody a nevýhody PCR

- VÝHODY 😊
 - rychlost
 - široké spektrum detekce
- NEVÝHODY 😞
 - dostupnost
 - náklady
 - neinformuje o citlivosti k atb

+/-

- nerozlišuje mezi DNA z živých a mrtvých mikroorganismů
- schopnost detekovat minimální množství DNA



=



Výsledky na KAR FNKV

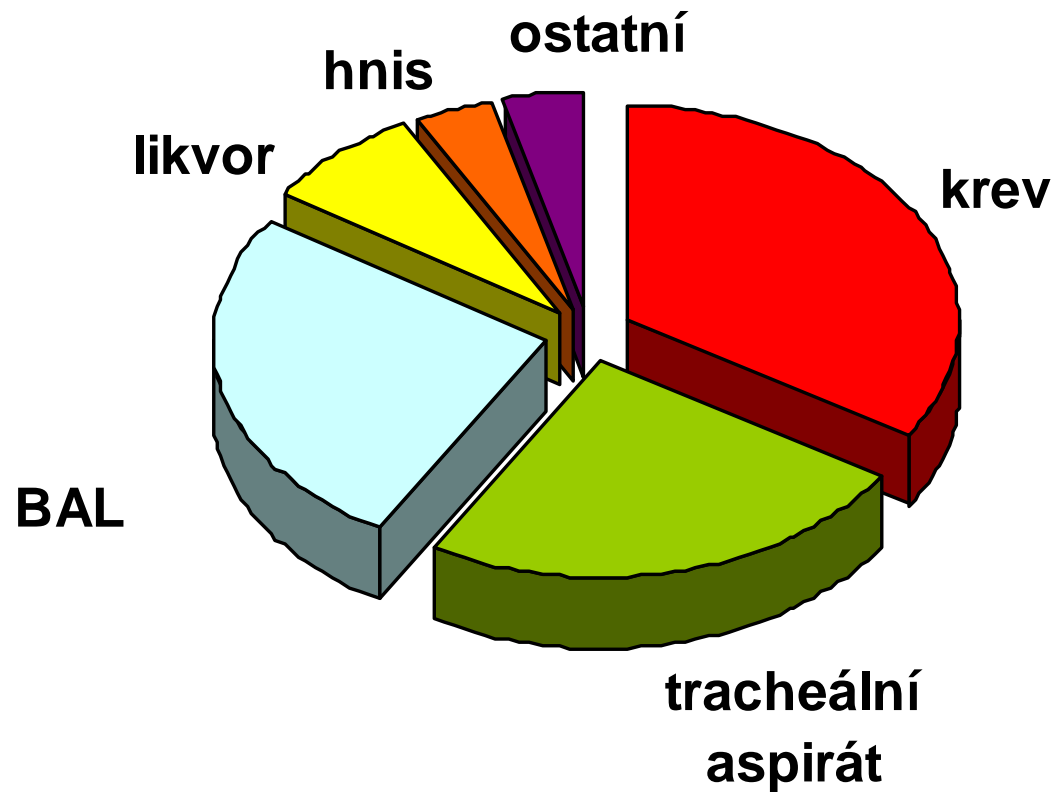


- období 02/2010 – 08/2010
- vzorky krve, tracheálního aspirátu, BAL, likvoru (a další...)
- pacienti v těžkém stavu, s neznámým zdrojem infekce, imunokompromitovaní

Výsledky na KAR FNKV

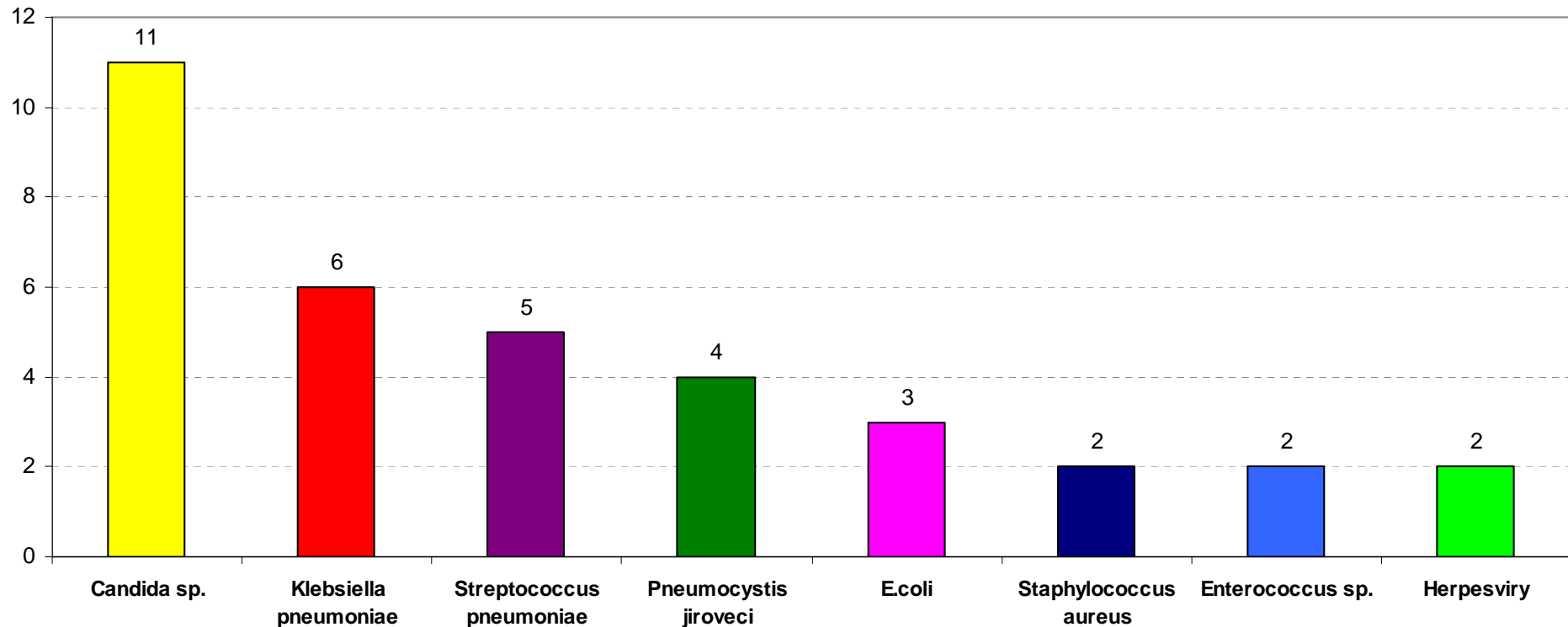


- celkem 77 vzorků od 38 pacientů



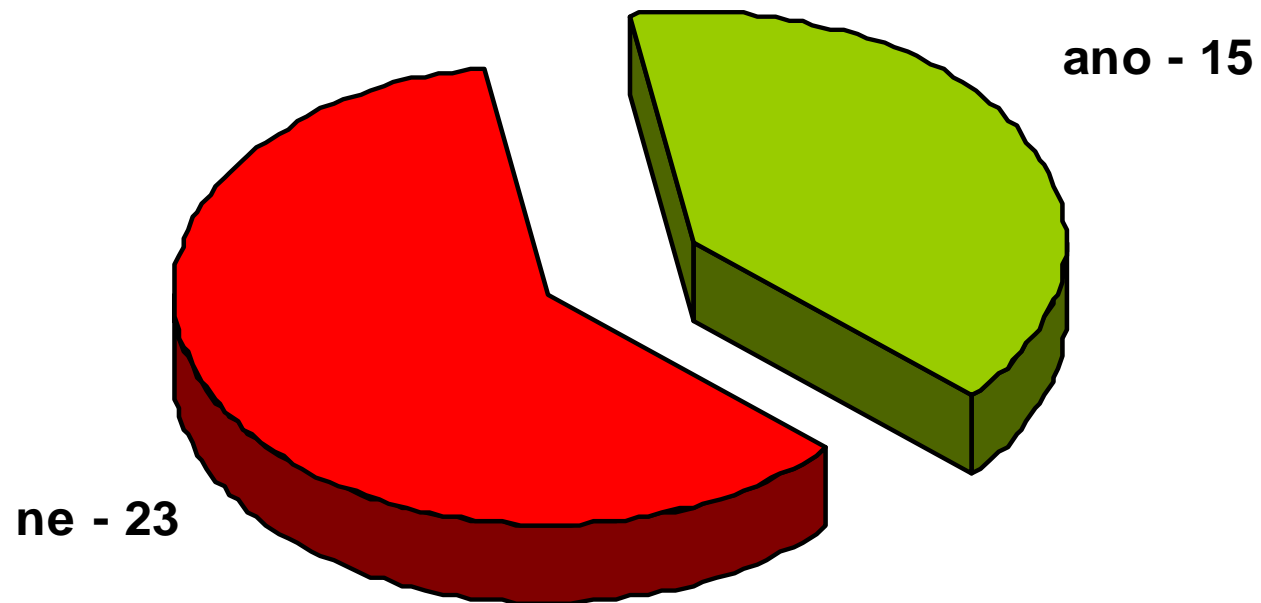
BAL	20	
tracheální aspirát	19	
krev	26	
likvor	6	
hnis	3	
ostatní	3	
moč		1
hrudní punktát		1
stěr z rány		1
celkem vzorků	77	

Nejčastější patogeny na KAR FNKV

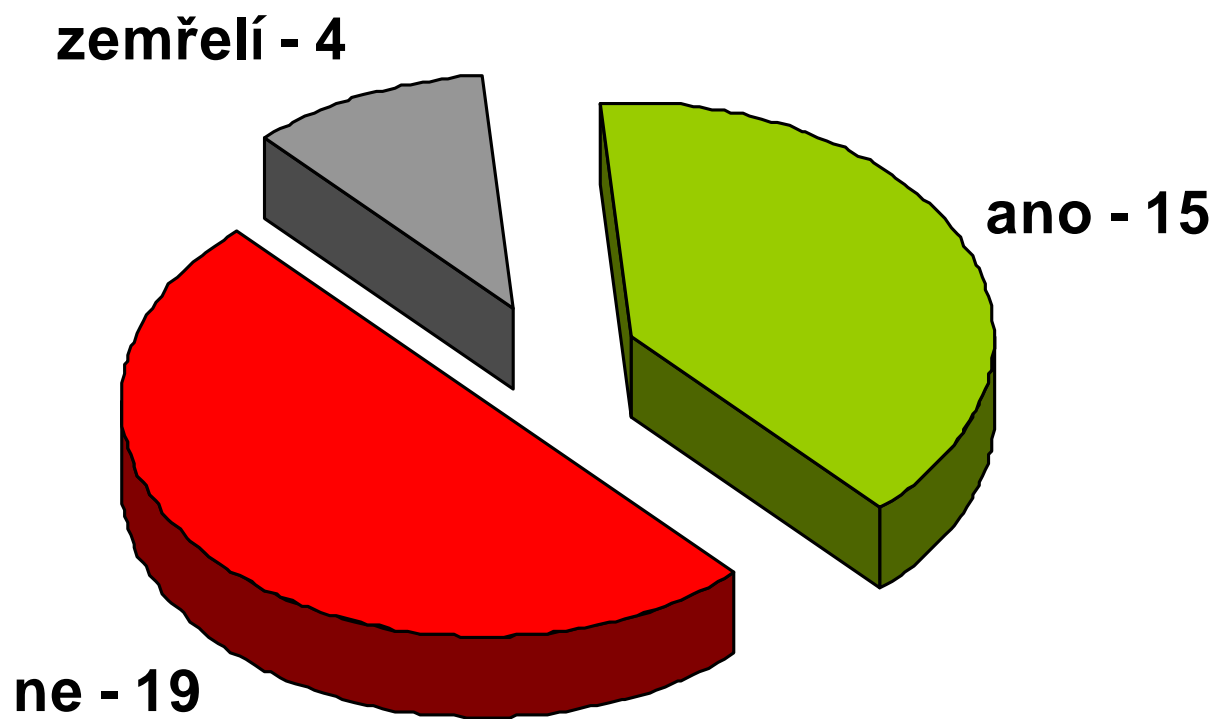


- další zastižené patogeny: Fusarium, Rhizopus, Aspergillus fumigatus, Alternaria alternata, Fusobacterium, Prevotella nigrescens

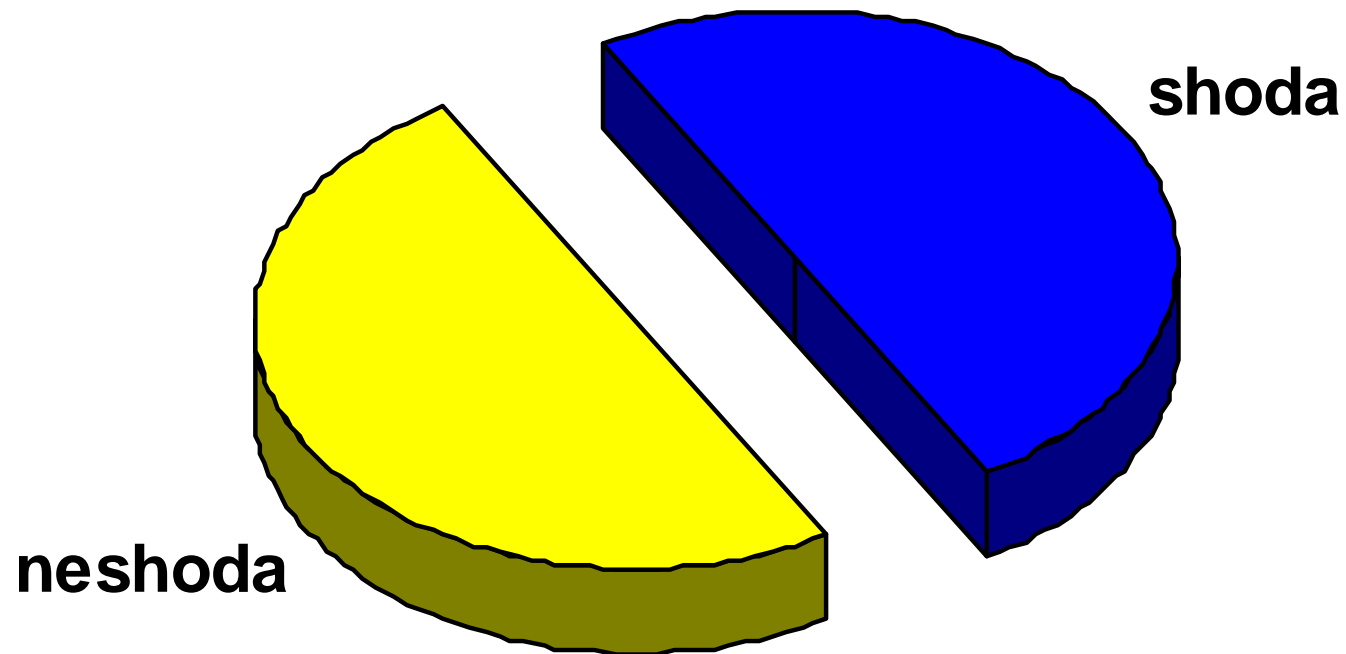
Změna atb na základě PCR



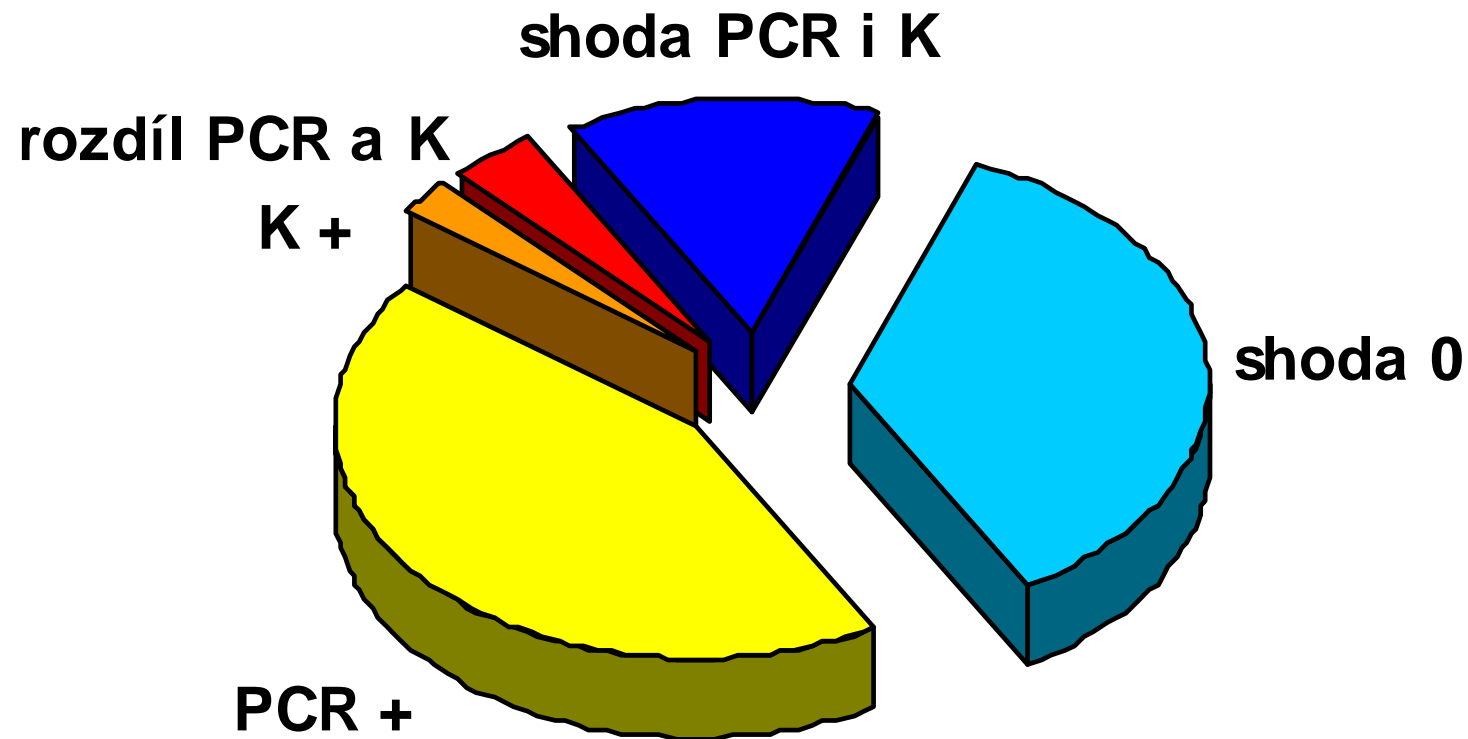
Změna atb na základě PCR



Shoda PCR s kultivačním nálezem



Shoda PCR s kultivačním nálezem



Kritické momenty

- interpretace výsledku
 - je to, co jsme našli, zároveň to, co jsme hledali?
- správná technika odběru
 - riziko kontaminace
 - výhoda kvantitativního stanovení při RT-PCR
- doprava
 - v laboratoři je víkendová služba
- ekonomické aspekty



Shrnutí

- PCR diagnostika usnadňuje správnou volbu atb a snižuje riziko plynoucí z neadekvátní atb terapie
- dominantní dg metoda v detekci obtížně kultivovatelných a nekultivovatelných patogenů
- nenahrazuje, ale doplňuje klasické kultivační vyšetření
- ke škodě věci není vyšetření prováděno ve spolupráci s klinickým mikrobiologem

**KILLS ALL
KNOWN
GERMS**



SEE FOR YOURSELF!