Epidemiologie 3-010 12.8.2010 13:32 Str. 103
proLékaře.cz | 1.11.2026

Epidemiol. Mikrobiol. Imunol. 59, 2010, č. 3, s. 103–106

Aplikace metod molekulární genetiky v klinické mikrobiologii: zpráva z jednání Pracovní skupiny molekulární mikrobiologie – TIDE

Hrabák J.[1], Bunček M.[2], Dendis M.[3], Horváth R.[3, 9], Chroňáková A.[4], Libra A.[2], Nešvera J.[5], Pantůček R.[6], Piskunová N.[7], Plíšková L.[8], Růžička F.[9], Sauer P.[10], Sedláček I.[6], Trubač P.[7], Žampachová E.[7], Žemličková H.[11], Scharfen J.[12]

[1]Ústav mikrobiologie, Lékařská fakulta UK a Fakultní nemocnice v Plzni, Plzeň
[2]Generi Biotech, Hradec Králové
[3]GeneProof, a. s., Brno
[4]Ústav půdní biologie, Biologické centrum ČAV, České Budějovice
[5]Mikrobiologický ústav ČAV, Praha
[6]Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno
[7]Nemocnice České Budějovice, České Budějovice
[8]Lékařská fakulta UK a Fakultní nemocnice v Hradci Králové, Hradec Králové
[9]Mikrobiologický ústav FN u sv. Anny a LF MU, Brno
[10]Ústav mikrobiologie, Lékařská fakulta UP a Fakultní nemocnice v Olomouci, Olomouc
[11]Národní referenční laboratoř pro antibiotika, Státní zdravotní ústav v Praze, Praha
[12]Národní referenční laboratoř pro patogenní aktinomycety, Nemocnice Trutnov, Trutnov

SOUHRN

V poslední dekádě došlo k velkému rozmachu využití molekulárně-genetických metod v klinické mikrobiologii. Tyto metody přinášejí nové poznatky a přístupy v celé oblasti mikrobiologie – v taxonomii a identifikaci mikrobů, diagnostice infekčních agens, epidemiologii infekčních onemocnění a antibiotické rezistence. Předkládaný text nabízí závěry z jednání Pracovní skupiny molekulární mikrobiologie (PSMM-TIDE) v rámci 2. výročního zasedání Společnosti pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP.

Klíčová slova: **molekulární mikrobiologie – typizace – identifikace – taxonomie – PCR – klinická mikrobiologie.**

SUMMARY

Hrabák J., Bunček M., Dendis M., Horváth R., Chroňáková A., Libra A., Nešvera J., Pantůček R., Piskunová N., Plíšková L., Růžička F., Sauer P., Sedláček I., Trubač P., Žampachová E., Žemličková H., Scharfen J.: The Use of Molecular Genetics Techniques in Clinical Microbiology – Final Report from the Workshop of the Molecular Microbiology Working Group TIDE

In the last decade, there has been a rapid development in the use of molecular genetics methods in clinical microbiology. Novel technologies bring new knowledge and approaches to various disciplines of microbiology – taxonomy, identification of microbes, clinical diagnosis, epidemiology of infectious diseases and antibiotic resistance. This article summarizes the conclusions from the workshop of the Molecular Microbiology Working Group TIDE held during the Second Annual Meeting of the Society for Medical Microbiology of the J. E. Purkyne Czech Medical Association.

Key words: **molecular microbiology – typing – identification – taxonomy – PCR – clinical microbiology.**

Úvod

V poslední dekádě došlo k velkému rozmachu využití molekulárně-genetických metod v klinické mikrobiologii. Nejčastěji využívanou metodou je pravděpodobně polymerázová řetězová reakce (PCR) v různých uspořádáních – ať již v reálném čase, s analýzou velikosti produktu na agarózovém gelu, s vyhodnocením hybridizací výsledné-

Epidemiologie 3-010 12.8.2010 13:32 Str. 104
proLékaře.cz | 1.11.2026

ho produktu atp. Následně se do rutinní diagnostické praxe dostávají i „složitější“ metody, jakými jsou např. sekvenace DNA nebo *in situ* hybridizace.

Využití těchto metod pokrývá celé spektrum mikrobiologie – virologii, bakteriologii, mykologii a parazitologii. Přesto však nelze tento metodický přístup z mikrobiologické diagnostiky vytěsňovat a získané výsledky interpretovat bez obecné znalosti oboru klinické mikrobiologie jako celku. Lze zaznamenat, že je molekulárně-genetickým metodám přisuzována větší role, než je z obecně platných zákonitostí oboru možné. Jsou-li těmito metodami prokazovány obligátní patogeny, bývá interpretace výsledků snazší. Pokud však prokazujeme patogeny fakultativní, což reprezentuje převážnou část bakteriologické a mykologické diagnostiky, nemusí být interpretace výsledků snadná. Vždy je nutné vzít v úvahu, že se jedná o vzájemnou interakci dvou (případně více) živých organismů – mikrobiálního agens a hostitele.

Na 1. výročním zasedání Společnosti pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP, konaném ve dnech 19. a 20. června 2009, byl iniciován vznik pracovní skupiny, která se bude zabývat aplikací molekulárně-genetických metod v klinické mikrobiologii. Pracovní skupina molekulární mikrobiologie – TIDE (PSMM, Taxonomie, Identifikace, Diagnostika, Epidemiologie) byla ustavena na svém prvním zasedání dne 16. 9. 2009.

Tento dokument vznikl jako konsenzus z jednání PSMM-TIDE na 2. výročním zasedání Společnosti pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP ve dnech 19. a 20. února 2010 v Nemocnici Na Homolce.

Definice

Molekulární mikrobiologie je metodickým a nevyčlenitelným přístupem v rámci oboru klinické mikrobiologie a vychází ze základního dokumentu – Koncepce oboru (http://www.splm.cz/dokumenty/koncepce_oboru.pdf). Molekulárně-genetický přístup musí být řešen v rámci komplexního procesu diagnostiky etiologického agens infekčního onemocnění, zahrnující v sobě preanalytickou fázi, správné metodické provedení v analytické fázi a dále v postanalytické fázi interpretaci výsledku a návrh terapie v kontextu příslušného klinického případu jako celku. Dalším specifickým využitím molekulárně-genetických metod je typizace mikrobů pro epidemiologické účely.

Aplikace metod molekulární biologie v klinicko-mikrobiologické diagnostice

Metody detekce a analýzy nukleových kyselin (NK) se postupně zařazují mezi standardní mikrobiologické vyšetřovací metody. V diagnostice celé řady patogenních mikroorganismů jsou dokonce přínosnější než metody „tradiční“, popř. jsou i jediné v praxi reálně použitelné (např. v diagnostice chlamydií, mnohých virových agens). Zdravotnická veřejnost by tedy k těmto metodám měla přistupovat jako ke standardním a měla by být co nejobjektivněji informována o jejich optimálním využívání.

Pracovní skupina molekulární mikrobiologické diagnostiky (PSMM-TIDE) si dává za cíl přispět k technologické i interpretační standardizaci těchto diagnostických postupů v regionu. Jednotlivými cíly budou:

a) Problematika kontroly kvality a standardizace práce laboratoří: Zajištění srovnatelných kvalitních materiálních a personálních vstupů, mj. laboratorního materiálu, diagnostických kitů apod., a dále otázka kvalifikace pracovníků molekulárních diagnostických laboratoří v mikrobiologii. Vypracování konsenzuálních doporučení v podobě manuálů či standardních operačních postupů pro klinické laboratoře. Manuály se obecně a pro jednotlivá agens zaměří na potřeby laboratoří (Jak uchovávat vzorky před zpracováním a jak je archivovat; Jak zpracovávat vzorky před izolací NK; Jak izolovat NK a standardizovat výtěžek; Doporučení k „ekvivalentu vyšetřeného klinického materiálu“; Jaké metody analýzy NK použít?; Jaké jsou vhodné a nevhodné cílové sekvence s popisem konkrétních rizik nebo zvláštností, variability apod.; Specifická doporučení pro jednotlivá agens; Přehled možností externího hodnocení kvality a kvalitních referenčních laboratoří; Způsob přípravy naměřených dat pro prezentaci klinikům (uživatelům); Způsob interakce a spolupráce na interpretaci mezi mikrobiologem a uživatelem, apod.).

b) Problematika aplikační a interpretační: Vypracování konsenzuálních doporučení v podobě manuálů pro pracovníky laboratoří a pro klinické uživatele. Manuály se obecně, ale především konkrétně pro jednotlivé agens zaměří na potřeby a otázky klinických uživatelů (Co lze od těchto metod reálně očekávat?; Jak a kdy odebírat vzorky a jak zasílat do laboratoří?; S jakými jinými diagnostickými metodami je vhodné molekulárně-biologickou diagnostiku kombinovat?; Jak rozumět laboratorním výsledkům, tj. co je „normální hodnota“ a co je klinicky významné?; Jak interpretovat kvantitativní výsledky?; Jak hodnotit

Epidemiologie 3-010 12.8.2010 13:32 Str. 105
proLékaře.cz | 1.11.2026

kinetiku infekce měřenou metodami molekulárně-mikrobiologické diagnostiky?; Jaký je stávající stav poznání o asociaci laboratorních výsledků s klinickým stavem pacienta?).

Pracovní skupina sdružuje odborníky v oboru molekulární diagnostiky a zaměří se primárně na rutinní klinické aplikace. Pokusí se především v regionu ČR vytvořit co nejširší tým specialistů na jednotlivá agens a působit jako garant pro rutinní klinické užívání molekulárních biologických metod v klinické diagnostice.

Taxonomie a identifikace v bakteriologii pomocí analýzy DNA

Taxonomie si klade za cíl charakterizovat mikroorganismy a zařadit je určitým způsobem do taxonomických jednotek, tzv. taxonů, a to na základě průkazu jejich vlastností a vzájemného příbuzenského vztahu. Mikrobiologická taxonomie v sobě zahrnuje klasifikaci, nomenklaturu a identifikaci bakterií. Fenotypové vlastnosti doplněné o výsledky metod molekulární biologie studující genetickou příbuznost (DNA/DNA hybridizace, DNA/rRNA hybridizace, sekvenování genů pro rRNA a některé proteiny, PCR typizace) a také o chemotaxonomické údaje jsou nazývány jako fylogenetická klasifikace. Studium nukleových kyselin bylo poprvé aplikováno do problematiky (tehdy pouze bakteriální klasifikace) před více než 40 lety a stále zůstává jednou z hlavních technik u průkazu klinicky významných mikroorganismů. Tyto metody jsou zaměřeny buď na celkovou DNA (Mol %G + C, RFLP analýza, PFGE, velikost genomu, DNA-DNA hybridizace), nebo jen na určitý úsek DNA (ribotypizace, AFLP, PCR metody – ERIC-PCR, rep-PCR, tRNA-PCR, DNA sondy, DNA sekvenování, plazmidová DNA), a mohou umožnit rozdělení druhů do množství odlišných typů [8].

Nozologické jednotky již od dob Pasteura a Kocha jsou svázány se zařazením a pojmenováním mikroorganismu a s jeho průkazem (identifikací) v klinickém materiálu. Ke stanovení etiologie infekčního procesu byla vyvinuta zvláštní pravidla (Kochovy postuláty). I když tato pravidla byla v historii modifikována (virologie, priony), neustále je třeba tato pravidla dodržovat a kultivovat. Se samotnou identifikací a zejména s interpretací výsledku identifikace je třeba zacházet v širším kontextu znalosti primárních a potenciálních (oportunních) patogenů, znalosti rezidentní flóry člověka, znalosti patogenity a faktorů virulence organismů a dnes stále více znalosti stavu imunity pacienta. Zejména u imunodeficientních pacientů mohou vyvolávat onemocnění bakterie z prostředí, které běžným způsobem nelze identifikovat a příčinné souvislosti lze interpretovat s obtížemi (kontaminace).

Zdokonalení molekulárně-mikrobiologických metod, např. sekvenování, přineslo zpřesnění klasifikace a následně i identifikace z fylogenetického hlediska. Zároveň se však vynořily některé problémy pro obor lékařské mikrobiologie:

a) změny v nomenklatuře komplikují standardizované postupy v klinických laboratořích;
b) nemožnost identifikovat některá agens pomocí rutinních fenotypových metod;
c) nejasný vztah k etiologii onemocnění v případě molekulárně-genetického průkazu mikroorganismů v klinickém materiálu.

Uplatnění metodik molekulární typizace mikroorganismů vyžaduje neustále rozvíjet poznání v oblasti taxonomie a zároveň je nutné aplikaci těchto poznatků v oboru podrobit jasně definovaným pravidlům tam, kde tyto poznatky mají přímý dopad na zdraví a nemoc pacienta. Tomuto předpokladu odpovídá polyfázová taxonomie, což je taxonomie založená na kombinaci údajů získaných rozmanitými laboratorními technikami a obsahuje všechny dostupné genotypové, fenotypové a fylogenetické informace [1]. Pro plné pochopení příbuznosti mezi jednotlivými zástupci mikroorganismů je použití jen jedné metody nedostatečné a je vyžadován mnohostranný přístup – tzv. polyphasic approach. Tento přístup je nyní plně aplikován v bakteriologii při popisu nových druhů bakterií a archaeí; kompletní přehled všech validně publikovaných jmen je dostupný na adrese http://www.bacterio.cict.fr, přičemž tato databáze je měsíčně aktualizována.

Sekvenování DNA se v poslední době stává běžně dostupným na mnoha pracovištích molekulární mikrobiologie. Úkolem PSMM-TIDE v oblasti taxonomie a identifikace mikrobů bude podpora multioborového přístupu k této problematice a aplikace do rutinních mikrobiologických technik formou metodických doporučení.

Molekulární epidemiologie infekčních nemocí

Nástroje molekulárně-genetické analýzy přinesly přesnější pohled na typizaci bakterií, ať se již jedná o vyšetřování outbreaků, šíření antibiotické rezistence, popř. hledání zákonitostí v epidemicitě a patogenitě infekčních agens. Tyto metody v některých případech zcela nahradily starší fenotypizační přístupy, jako např. fagotypizace, biotypizace atp. To je způsobeno jejich vyšší diskriminační schopností. Přesto se však vždy jedná o pouhou aproximaci skutečného stavu – popis

Epidemiologie 3-010 12.8.2010 13:32 Str. 106
proLékaře.cz | 1.11.2026

omezeného počtu markerů, protože úplné výsledky pro srovnávání dvou mikrobů může přinést pouze stanovení kompletní sekvence genomů, které je např. u bakterií v rutinní praxi zatím neproveditelné. V roce 2007 bylo publikováno doporučení pro typizaci bakterií, které vypracovala Pracovní skupina epidemiologických markerů Evropské společnosti klinické mikrobiologie a infekčního lékařství (ESGEM-ESCMID) [2]. Toto doporučení považujeme za základní metodologii typizace bakterií, která může být aplikována v rutinní praxi.

Pracovní skupina molekulární mikrobiologie (PSMM-TIDE) sdružuje odborníky, kteří se zabývají praktickou aplikací různých molekulárně-typizačních metod, ať již na lokální úrovni epidemiologie nozokomiálních infekcí (nemocniční zařízení), tak i na úrovni výzkumné, v oblasti referenční činnosti, pokrývající spektrum grampozitivních i gramnegativních bakterií [3–6, 9]. Vzhledem k velké šíři používaných molekulárně-typizačních metod je vytvoření odborné skupiny, která bude garantovat praktické aplikace těchto metod, optimálním řešením pro oblast České republiky.

Nedílnou součástí molekulárně-epidemiologického vyšetření je interpretace výsledku. Ta musí být podpořena dokonalou znalostí principu používané metody. Vzhledem k tomu, že se v případě různých mikrobů používají různé typizační přístupy, existuje konsenzus PSMM-TIDE o využití stávajících center pro typizaci bakterií (např. NRL pro antibiotika, Poradenské centrum pro identifikaci a epidemiologii beta-laktamáz – projekt LF UK v Plzni, SZÚ a Nemocnice Na Homolce, Česká sbírka mikroorganismů atp.). Problematiku typizace nelze zaštítit jedním centrálním typizačním centrem.

Problémem využití molekulárně-epidemiologických metod na území ČR není technické zabezpečení laboratoří a praktické zvládnutí těchto metod, ale spíše interpretace a aplikace výsledků v prevenci nozokomiálních infekcí. Na tuto problematiku je nutné se v další činnosti PSMM-TIDE cíleně zaměřit.

Závěr

Molekulárně-genetické metody našly nezastupitelné místo v diagnostické praxi klinické mikrobiologie. Přesto je nutné jejich indikace a následné interpretace výsledků hodnotit se znalostí veškerých limitů těchto metod tak, jako je tomu v případě ostatních mikrobiologických technik. PSMM-TIDE si vytyčila za základní cíl být odborným garantem v aplikaci těchto metod v mikrobiologii – molekulární mikrobiologii. PSMM-TIDE vítá zapojení dalších odborníků z oblasti molekulární mikrobiologie do práce skupiny. Výsledkem by měla být metodická doporučení v oblasti molekulárně-mikrobiologické diagnostiky, taxonomie a identifikace za použití zmíněných metod a v problematice molekulární epidemiologie.

Literatura

1. **Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P. et al.** Polyphasic taxonomy, a konsensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.*, 1996, 60, p. 407–438.
2. **Van Belkum, A., Tassios, P. T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S. et al.** Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2007, 13, Suppl. 3, p. 1–46.
3. **Čekanová, L., Kolář, M., Chromá, M., Sauer, P. et al.** Prevalence of ESBL-positive bacteria in the community in the Czech Republic. *Medical Science Monitor*, 2009, 15, p. 202–206.
4. **Grundmann, H., Aanensen, D. M., van den Vijngaard, C. C., Spratt, B. G. et al.** Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. *PloS Med.*, 2010, 7, 1, p. e100215.
5. **Hrabák, J., Empel, J., Gniadkowski, M., Halbhuber, Z. et al.** CTX-M-15-producing Shigella sonnei from a Czech patient who traveled in Asia. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46, p. 2147–2148.
6. **Hrabák, J., Empel, J., Bergerová, T., Fajfrlík, K. et al.** International clones of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* with extended-spectrum -lactamases (ESBLs) in a Czech hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47, p. 3353–3357.
7. **Kolář, M., Sauer, P., Faber, E., Kohoutová, J. et al.** Prevalence and spread of Pseudomonas aeruginosa and Klebsiella pneumoniae strains in patients with hematological malignancies. *New Microbiologica*, 2009, 32, p. 67–76.
8. **Mariapia, V. M.** (Ed.). *Detection of Bacteria, Viruses, Parasites and Fungi.* Springer, 2010.
9. **Zemlickova, H., Urbaskova, P., Jakubu, V., Motlova, J. et al.** Clonal distribution of invasive pneumococci, Czech Republic 1996–2003. *Emerg. Infect. Dis., 2010, 16, p. 287–289.*

Do redakce došlo 10. 3. 2010.

Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D.
Ústav mikrobiologie
LF UK Praha a Fakultní nemocnice v Plzni
Dr. E. Beneše 13
305 99 Plzeň
e-mail: Jaroslav.Hrabak@lfp.cuni.cz