

VYUŽITÍ METOD MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE V DIAGNOSTICE INFEKČÍ DĚTSKÉHO VĚKU

MUDr. Vlasta Štěpánová, PharmDr. Lenka Plíšková, Ing. Kateřina Hrochová

Ústav klinické mikrobiologie, Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice, Hradec Králové

Autoři v přehledném článku popisují význam a využití metod molekulární biologie, zejména polymerázové řetězové reakce, pro diagnostiku virových a bakteriálních infekcí v dětském věku.

Klíčová slova: metody molekulární biologie, polymerázová řetězová reakce, virové a bakteriální infekce v pediatrii.

APPLICATIONS OF THE METHODS OF MOLECULAR BIOLOGY IN THE DIAGNOSTICS OF INFECTIOUS DISEASES IN CHILDREN

Importance and the applications of the methods of molecular biology, especially polymerase chain reaction, for the diagnosis of viral and bacterial infections in children is described.

Key words: molecular biology methods, polymerase chain reaction, viral and bacterial infections in pediatry.

Úvod

Úloha virologické laboratoře se v posledních 10 až 15 letech dramaticky změnila. Rozšířilo se spektrum virologických diagnostických metod od klasické izolace virů přes imunochemické metody detekující virové antigeny a specifické protilátky k metodám molekulárně biologickým, které nám umožňují rozpoznat virový genom rychlými a citlivými reakcemi. Rovněž se rozšířilo spektrum virových infekcí, které je možné spolehlivě a přesně těmito metodami diagnostikovat a u některých i sledovat odpověď na léčbu antivirovými preparáty.

Molekulárně biologické metody nám umožňují detekovat a identifikovat viry, které není možné běžně izolovat na buněčných kulturách nebo prokazovat jejich antigeny v infikovaných buňkách (např. viry hepatitid C a G, lidské papilomaviry, parvovirus B19). Tyto metody jsou velmi rychlé a umožňují získat výsledek již za několik hodin. Proto získaly nezastupitelné místo v diagnostice závažných infekcí vyžadujících rychlé nasazení léčby např. detekce DNA herpetického viru (HSV DNA) z likvoru u herpetických infekcí centrálního nervového systému (CNS) nebo DNA cytomegaloviru (CMV DNA) u imunosuprimovaných pacientů po transplantaci orgánů). Tím, že amplifikační molekulárně biologické metody dokáží zmnožit nukleovou kyselinu, jsou velmi efektivní a mají význam pro analýzu takových vzorků, které obsahují jenom malé množství virových částic nebo bakterií, které by jinými metodami nebylo možné prokázat.

Molekulárně biologické metody se používají nejenom pro kvalitativní průkaz virové nebo bakteriální nukleové kyseliny ve vzorku (deoxyribonukleové – DNA nebo ribonukleové kyseliny – RNA), ale umožňují také stanovovat její kvantitu, což má velký význam pro sledování rozvoje virové infekce nebo odpovědi na léčbu antivirovými (např. u infekcí HIV, hepatitidy B a C, cytomegalovirové (CMV) infekce). S rozvojem léčby antivirovými preparáty dochází u některých virů ke vzniku rezistence. Zde nacházejí též uplatnění molekulárně biologické metody, které úsek genomu zodpovědný za přenos rezistence dokáží detekovat (např. rezistence na ganciclovir u CMV infekcí, na lamivudin u hepatitidy B nebo azidothymidin u HIV infekce).

V neposlední řadě tyto metody umožnily rozpoznat infekci některými virovými mutanty (např. mutanta viru hepatitidy B

netvořící HBeAg), které běžné sérologické reakce detekovat nemohou. (9, 11, 13)

Materiál a metodika

Molekulárně biologické metody řadíme mezi přímé diagnostické metody vedle mikroskopie, elektronové mikroskopie, izolace a kultivace, detekce antigenů. Komplexní diagnostika zahrnuje ještě nepřímé diagnostické metody založené na imunochemickém průkazu specifických protilátek.

Pomocí amplifikačních metod, nejčastěji polymerázové řetězové reakce (PCR), je vybraná část genomu viru nebo bakterie zmnožena do takového množství, které je možno detekovat dalšími technikami (elektroforézou či hybridizací). Molekulárně biologické techniky se v současnosti používají nejenom k průkazu či stanovení kvantity vyvolávajícího agens, ale umožňují přesně určit sekvence jednotlivých bází, identifikovat genotypy viru nebo bakterie, prokazovat mutace.

Spektrum molekulárně biologických metod používaných v laboratořích v České republice je různorodé, od metod neamplifikačních (např. hybridizačních) k metodám nejvíce používaným, které využívají amplifikaci nukleové kyseliny (např. PCR). Amplifikační metody jsou extrémně citlivé, různé techniky jsou založeny na různých metodách amplifikace (PCR; ligázová řetězová reakce – LCR; amplifikace RNA pomocí 3 enzymů – NASBA). Nejširší spektrum vyšetření, jimiž je možné identifikovat nukleovou kyselinu mikroorganismu (DNA nebo RNA), je v laboratořích, které vedle firemních souprav připravují své vlastní PCR, tzv. „in house“. Vzhledem k různorodosti používaných technik se stává stále více aktuální zavedení důsledné interní a externí kontroly kvality.

Správná volba biologického materiálu, ze kterého je možné nukleovou kyselinu pomocí molekulárně biologických metod detekovat, závisí na patogenetice infekčního onemocnění. Odebírá se nesrážlivá krev (EDTA), srážlivá krev, mozkomíšni mok, sekrety dýchacích cest, bronchoalveolární laváže, moč, amniotická tekutina, různé výtěry. Speciální techniku vyžadují detekce nukleové kyseliny in situ přímo v infikované tkáni. Protože stabilita nukleové kyseliny se může lišit v závislosti na typu mikrobiálního původce, na typu použitého antikoagulačního činidla, na době transportu, na teplotě bě-

hem transportu a uchování vzorku, je nutné dodržovat správná pravidla pro odběr, transport a uchování vzorků (4, 12).

Aplikace molekulárně biologických metod v diagnostice

Kongenitální infekce a infekce získané v novorozeneckém období jsou spojeny s infekcí ženy v průběhu těhotenství a v období kolem porodu. Mezi klasické kongenitální infekce patří onemocnění **zarděnkami**, zejména dojde-li k infekci ženy v průběhu prvního trimestru těhotenství. Běžně se užívá sérologická diagnostika – sérokonverze IgG protilátek a detekce specifických IgM protilátek v séru těhotné ženy svědčí pro tuto infekci. U novorozence s vrozenými zarděnkami můžeme na tkáňových kulturách izolovat virus z nasofaryngeálního sekretu nebo pomocí RT – PCR (reverzní transkripce s následnou amplifikací) detekujeme virovou RNA. Sérologické vyšetření detekuje specifické IgM protilátky v séru novorozence nebo již jen IgG, jejichž titr neklesá do negativy v průběhu několika měsíců tak jako u přenesených protilátek mateřských (12).

Diagnostika vrozené **cytomegalovirové (CMV) infekce** je založena na detekci následujících markerů aktivní infekce novorozence – izolaci viru z moče v prvních 3 týdnech života, průkazu CMV DNA v leukocytech periferní krve, eventuálně na průkazu CMV antigenu pp65 v leukocytech. Je možné detekovat přítomnost specifických IgG a IgM protilátek. Hladina virémie je vysoká zvláště u symptomatických infekcí. K symptomatické infekci dítěte dochází zejména u primární infekce matky během těhotenství, ta může být diagnostikována sérologicky a průkazem CMV DNA z plodové vody pomocí PCR (pozitivní izolace CMV z plodové vody se zdaří málokdy). Po porodu bývá CMV vylučován také mateřským mlékem. U novorozence se může CMV prokazovat i z dalších materiálů (např. z nasofaryngeálního sekretu) (3, 7, 8).

Parvovirus B 19, původce 5. dětské nemoci, může při infekci těhotné ženy způsobit hydrops plodu s následným úmrtím plodu, i když ve většině případů tato infekce proběhne bez dlouhotrvajících následků. Z plodové vody detekujeme DNA parvoviru B 19 pomocí PCR, sérologické vyšetření těhotné prokáže markery akutní parvovirové infekce. U novorozence prokazujeme přítomnost specifických IgM protilátek a neklesající titr specifických IgG (7).

Také parazit **Toxoplasma gondii** ohrožuje při akutní infekci těhotné ženy vyvíjející se plod. Včasná sérologická diagnostika této infekce (průkaz IgM, IgA a IgG protilátek) spolu s průkazem DNA *Toxoplasma gondii* a biologickým pokusem umožňuje včasné zahájení terapie těhotné ženy, a tím snižuje incidenci kongenitální **toxoplazmózy** (10, 15).

HIV infekce. Včasný průkaz HIV pozitivní matky je důležitý pro zahájení antiretrovirové terapie, která snižuje riziko infekce plodu. U novorozence prostý průkaz anti-HIV protilátek nestačí, komplexní laboratorní vyšetření zahrnující také molekulárně biologické metody detekující přítomnost nukleové kyseliny HIV (provirové DNA a virové RNA) provádí Národní referenční laboratoř pro AIDS Státního zdravotního ústavu v Praze (7).

Vertikální přenos viru **hepatitidy B (HBV)** je nejvýznamnější v oblastech s vysokou prevalencí této infekce. Průkaz HBV DNA pomocí PCR v krvi těhotné ženy doplňuje sérologické vy-

šetření, riziko vertikálního přenosu je zde vysoké (9). Co se týče vertikálního přenosu viru **hepatitidy C**, který není častý, závisí zřejmě na hladině virémie matky.

Primární infekce matky virem **herpes simplex typ 2 (HSV 2)** v době porodu je ohrožením pro novorozence zejména tím, že se HSV 2 vylučuje na čípku děložním. Přibližně 50 % novorozenců matek s primární infekcí HSV 2 je infikováno při průchodu porodními cestami. Tato infekce může být manifestní jako kožní nebo slizniční léze novorozence, v nejtěžším případě jako infekce CNS. U novorozence se suspektuální infekci CNS způsobenou HSV 2 je rychlá diagnostika založena na průkazu HSV 2 DNA z likvoru a z krve při virémii metodou PCR. Izolace HSV 2 z likvoru na buněčných kulturách se zdaří zřídka (1, 5, 7).

Zejména u nedonošených dětí, novorozenců a kojenčů hrozí přenos respiračních infekcí, mezi nejčastější patří infekce **respiračně syncytiálním virem (RSV)**. Metody jeho rychlého průkazu mají velký význam zejména pro včasné nasazení již dostupné antivirové terapie. Izolace RSV na buněčných kulturách je náročná a nebývá vždy úspěšná, vyšší citlivost mají rychlé imunochemické metody prokazující RSV antigen z aspirátů. Průkaz virové RNA z klinického vzorku pomocí RT-PCR má velký význam zejména u vzorků s malým množstvím viru. Pomocí PCR nebo i pomocí izolace viru na buněčných kulturách lze prokázat infekci **adenoviry** (12).

Také **Chlamydia trachomatis** a **Ureaplasma urealyticum** mohou způsobit infekce dolních dýchacích cest novorozence. Diagnostika se provádí pomocí PCR z aspirátů nebo nasofaryngeálních sekretů. Antigen *Chlamydia trachomatis* je možné také prokázat z aspirátů pomocí imunofluorescence. **Ureaplasma urealyticum** je možné prokázat kultivací na plně syntetických médiích. K diagnostice určitě pomůže současný průkaz *Chlamydia trachomatis* nebo *Ureaplasma urealyticum* z cervixu matky těmito metodami (7).

Dalšími častými patogeny tohoto období jsou bakterie. **Streptococcus agalactiae** je hlavním bakteriálním původcem novorozenecké meningitidy a sepse. Současně s kultivací a aglutinací antigenu z likvoru můžeme detekovat bakteriální DNA. **Escherichia coli** jako další patogen je v likvoru detekován stejným způsobem (14).

Mycobacterium bovis BCG, který vznikl pasážováním virulentního kmene *Mycobacterium bovis* v letech 1908–1921, se používá pro vakcinaci proti TBC. Po očkování novorozenců touto vakcínou může dojít ke vzniku postvakcinačních komplikací, zejména regionálních lymfadenitid a osteomyelitid. Z tohoto důvodu je důležité odlišit BCG kmen od ostatních členů *Mycobacterium tuberculosis* komplexu, s výhodou lze využít opět metodu PCR (19).

Spektrum virových a bakteriálních patogenů zodpovědných za infekce větších dětí je obdobné jako v dospělosti.

Diagnostika infekcí vyvolaných virem **HSV** a **CMV** byla již zmíněna. PCR může být důležitou diagnostickou metodou zejména u **primární infekce EBV** u malých dětí, které netvoří heterofilní protilátky a tvorba specifických protilátek je opožděná nebo u primární infekci chronicky probíhajících u imunodeficientních pacientů (20).

Co se týče použití PCR v diagnostice **virových respiračních infekcí** u větších dětí, bývá tato metodika vyhrazena těž-

ším případům. Průkaz RSV byl již zmíněn, pomocí PCR je možné detekovat ze vzorku také DNA adenovirů. Infekce způsobené *Chlamydia pneumoniae* a *Mycoplasma pneumoniae* je možné běžně diagnostikovat sérologicky pomocí průkazu specifických protilátek.

Diagnostika **virových infekcí CNS** v dětském věku je založena na velmi rychlém určení etiologického agens v likvoru metodou PCR, které umožňuje včasné nasazení specifické antivirové terapie. Pomocí tzv. multiplex PCR prokazuje DNA viru HSV 1 a 2, pomocí RT – PCR RNA enterovirů a pomocí PCR DNA adenovirů (5, 16).

U **bakteriálních infekcí CNS** současně s mikroskopií, kultivací a aglutinací antigenu z likvoru můžeme u vybraných původců detekovat specifickou bakteriální DNA. Použití PCR pro její průkaz má význam zejména u těch případů, kdy patogena neprokážeme klasickými metodami a cytologický nález v moku i ostatní laboratorní a klinické nálezy pro bakteriální zánět svědčí. Prokazuje bakteriální DNA následujících druhů – *Hemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* (14, 17, 18).

Průkaz **borreliových infekcí** pomocí PCR doplňuje ostatní laboratorní metody průkazu této infekce (sérologie, elektronová mikroskopie) v séru, likvoru a v moči (2).

Zásadní význam mají molekulárně biologické metody pro diagnostiku **virových hepatitid**. Virová hepatitida B je příkladem nutného komplexního diagnostického postupu mikrobiologického a molekulárně biologického. Interpretace nálezů sérologických markerů HBV (anti-HBe) selhává při infekci mutantou HBV netvořící HBeAg. PCR detekuje aktivní infekci pomocí průkazu HBV DNA i pomocí průkazu specifického změněného úseku HBV DNA. Monitorování hladiny

HBV DNA v séru pacientů s chronickou VHB léčených interferonem umožňuje sledovat odpověď pacientů na léčbu a zaznamenat eventuelní relaps onemocnění dříve, než je zaznamenán ostatními laboratorními vyšetřeními. PCR může také prokázat přítomnost mutanty HBV rezistentní na antivirotikum lamivudin – YMDD mutantu viru (9).

Molekulárně biologické metody se také plně uplatňují v diagnostice VHC. Sérologické vyšetření zahrnuje pouze možnost průkazu celkových protilátek, které nedokáží informovat o aktivitě infekce. RT – PCR prokazuje HCV RNA v séru, její hladinu a také genotyp HCV, jehož určení má určitý prognostický i epidemiologický význam (6).

Pouze RT – PCR dokáže detekovat nový virus hepatitidy G – HGV nebo jeden z posledních objevených virů TTV (Transfusion transmitted virus), které se přenášejí parenterálně. Klinický význam těchto nálezů zatím čeká na objasnění.

Závěr

Spektrum mikrobiálních agens detekovaných molekulárně biologickými metodami se rychle rozrůstá o další. Výhodou těchto metod je jejich specifita, vysoká citlivost a rychlost průkazu. Využívá se jich a bude se využívat i v budoucnosti při diagnostikování nekultivovatelných, vzácných a pomalu se množících patogenů, při rychlém diagnostikování nebezpečných a tzv. „emerging“ infekcí, hledání jejich zdrojů a šíření infekce. Kvantitativní molekulárně biologické metody umožňují monitorovat průběh odpovědi na antivirovou léčbu a rozpoznat vznik rezistence na ni. Tyto metody stále zvyšují svůj podíl také při přípravě nových vakcín. Staly se neoddělitelnou integrální součástí laboratorních vyšetřovacích metod v mikrobiologii.

Literatura

1. Ashley RL. Herpes Simplex Viruses Types 1 and 2. In: Lennette EH, et al. Laboratory Diagnosis of Viral Infections. Marcel Dekker Inc. New York 1999: 489–513.
2. Brettschneider S, Bruckbauer H, Klugbauer N, et al. Diagnostic Value of PCR for Detection of Borrelia burgdorferi in Skin Biopsy and Urine Samples from Patients with Skin Borreliosis. J Clin Microbiol 1998; 36 (9): 2658–2665.
3. Brytting M, Xu W, Wahren B, et al. Cytomegalovirus DNA Detection in Sera from Patients with Active Cytomegalovirus Infections. J Clin Microbiol 1992; 30 (8): 1937–1941.
4. Cann AJ. Principles of Molecular Virology, 2nd Ed., Academic Press San Diego, London 1997: 16–20.
5. Cassinotti P, Mietz H, Siegl G. Suitability and Clinical Application of Multiplex Nested PCR Assay for the Diagnosis of Herpes Simplex Virus Infections. J Med Virol 1996; 50: 75–81.
6. Cheung RC, Matsui SM, Greenberg HG. Rapid and Sensitive Method for Detection of Hepatitis C Virus RNA by Using Silica Particles. J Clin Microbiol, 1994; 32 (10): 2593–2597.
7. Gilstrap LC, Faro S. Infections in Pregnancy, 2nd Ed., Wiley-Liss New York 1997: 155–157, 177–184, 169–174, 177–184, 203–222, 255–261.
8. Hansen KK, Ricksten A, Hofmann B, et al. Detection of Cytomegalovirus DNA in Serum Correlates with Clinical CMV Retinitis in AIDS. J Inf Dis 1994; 170: 1271–1274.
9. Jardi R, Rodriguez F, Buti M. Quantitative Detection of Hepatitis B Virus DNA in Serum by a New Rapid Real-Time Fluorescence PCR Assay. J Viral Hepatitis, 2001; 8: 465–471.
10. Lamoril J, Molina JM, de Gouvelo A, et al. Detection by PCR of Toxoplasma Gondii in Blood in the Diagnosis of Cerebral Toxoplasmosis in Patients with AIDS. J Clin Pathol 1996; 49: 89–92.
11. Leland DS. Clinical Virology: Concepts and Perspectives. In: Lennette EH, et al. Laboratory Diagnosis of Viral Infections. Marcel Dekker Inc. New York 1999: 1–18.
12. Leland DS. Clinical Virology, Philadelphia Saunders Company 1996: 41–47, 107–108, 164–165.
13. Newell JO, Persing DH. Applications of Molecular Amplification Methods in Diagnostic Virology. In: Lennette EH, et al. Laboratory Diagnosis of Viral Infections. New York 1999: 111–137.
14. Olcen P, Lantz PG, Backman A, et al. Rapid Diagnosis of Bacterial Meningitis by a Seminested PCR Strategy. Scand J Infect Dis, 1995; 27: 537–539.
15. Pujol-Riqué M, Derouin F, Quintanilla AG, et al. Design of a One Tube Hemi-Nested PCR for Detection of Toxoplasma Gondii and Comparison of Three DNA Purification Methods. J Med Microbiol, 1999; 48: 857–862.
16. Read SJ, Jeffery KJM, Bangham CHRM. Aseptic Meningitis and Encefalitis: the Role of PCR in the Diagnostic Laboratory. J Clin Microbiol 1997; 35 (3): 691–696.
17. Saruta K, Matsunaga T, Kono T, et al. Simultaneous Detection of Streptococcus pneumoniae and Haemophilus Influenzae by Nested PCR Amplification from cerebrospinal fluid samples. FEMS Immunology and Medical Microbiology 1997; 19: 151–157.
18. Taha MK. Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of Neisseria meningitidis. J Clin Microbiol, 2000; 38: 855–857.
19. Talbot EA, Williams DL, Fronthingham R. PCR Identification of Mycobacterium Bovis BCG. J Clin Microbiol, 1997; 35: 566–569.
20. Yamamoto M, Kimura H, Hironaka T, et al. Detection and Quantification of Virus DNA in Plasma of Patients with Epstein-Barr Virus-Associated Diseases. J Clin Microbiol, 1995, 33 (7): 1765–1768.