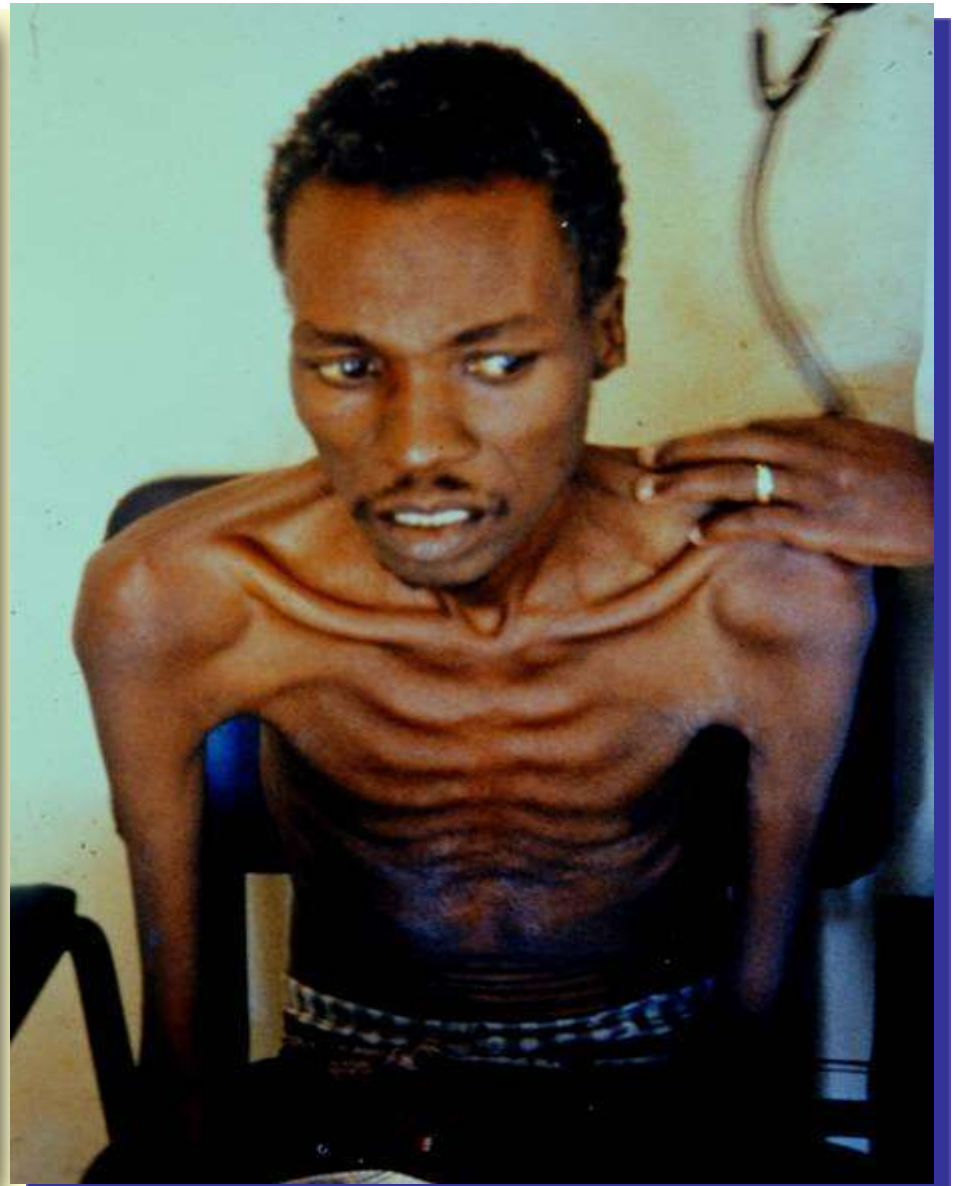


**ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ  
ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ  
ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ**



## Φυματίωση – σήμερα (WHO)

- ▶ 8,8 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις / έτος
- ▶ 3 εκατομμύρια θάνατοι / έτος
- ▶ 52.000 θάνατοι / εβδομάδα ή 7.000 / ημέρα
- ▶ 10.000 νέες περιπτώσεις / ώρα / ημέρα
- ▶ 80% των ασθενών 15-49 ετών
- ▶ 5-15% παιδική φυματίωση



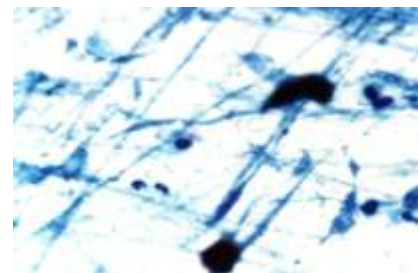
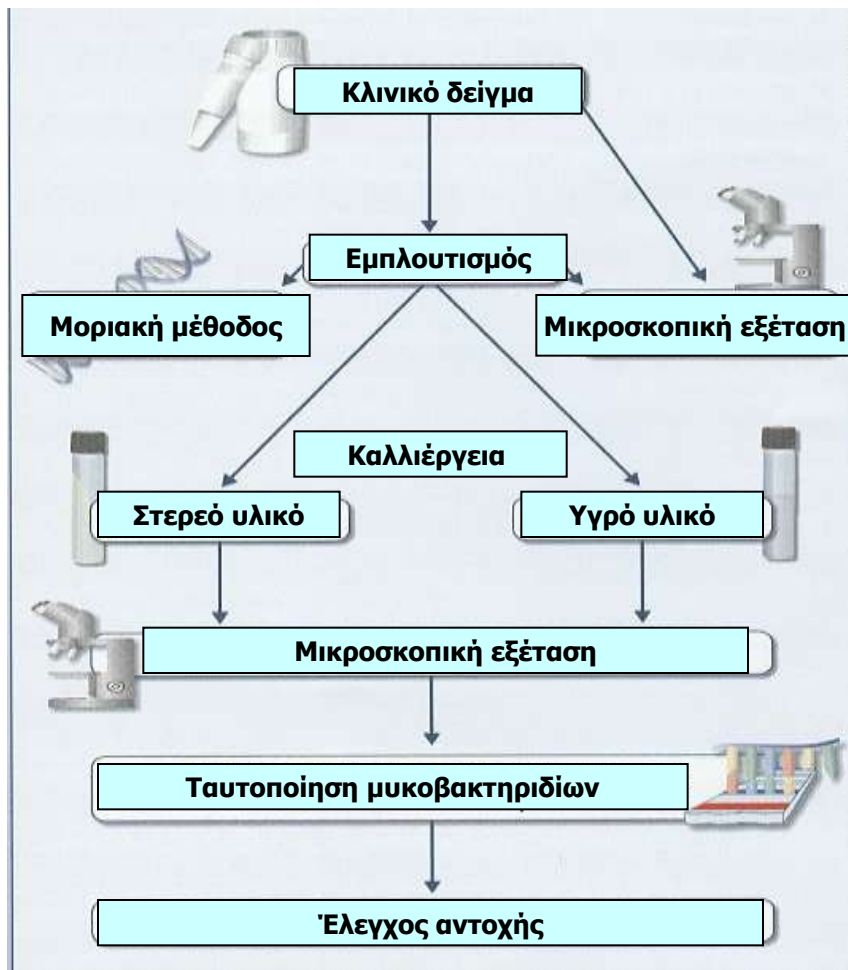
# Φυματίωση: φλέγοντα προβλήματα

## Αύξηση

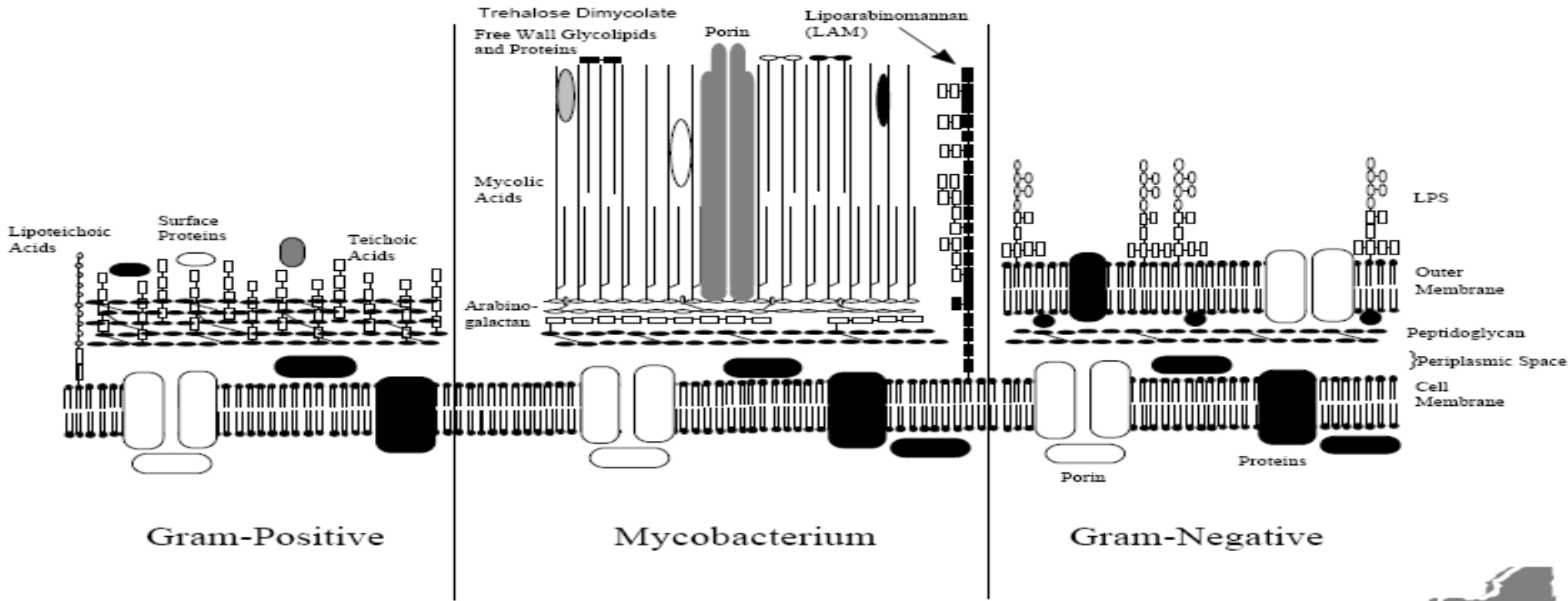
- ανθεκτικότητας (SIRE)
- πολυανθεκτικότητας – Multi Drug Resistance
  - MDR (INH + RIF)
- υπερανθεκτικότητας - Extensively Drug Resistance
  - XDR (INH + RIF + QNL + AMIK ή KAN ή CAP)



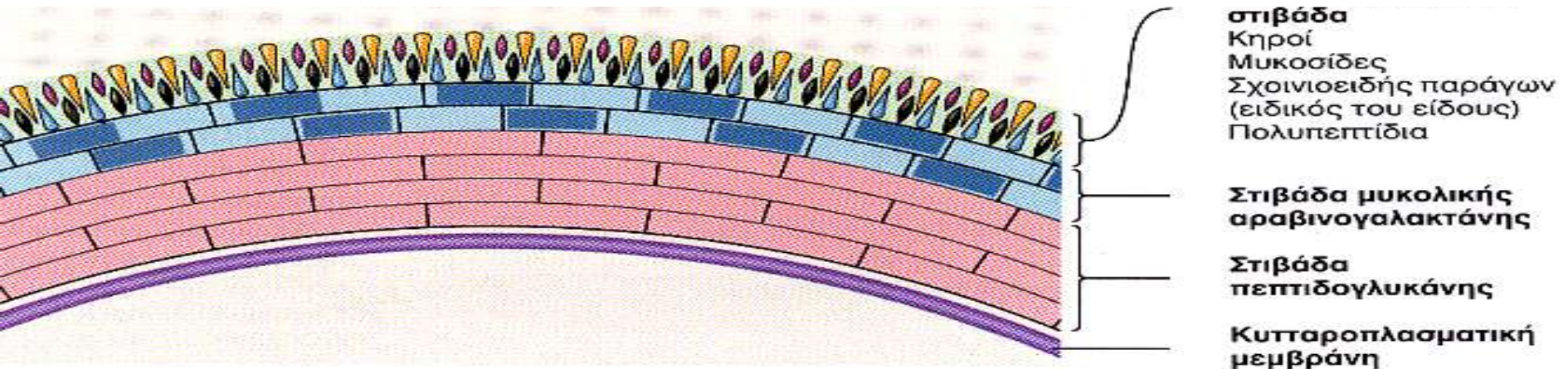
# Διαγνωστικές εργαστηριακές μέθοδοι

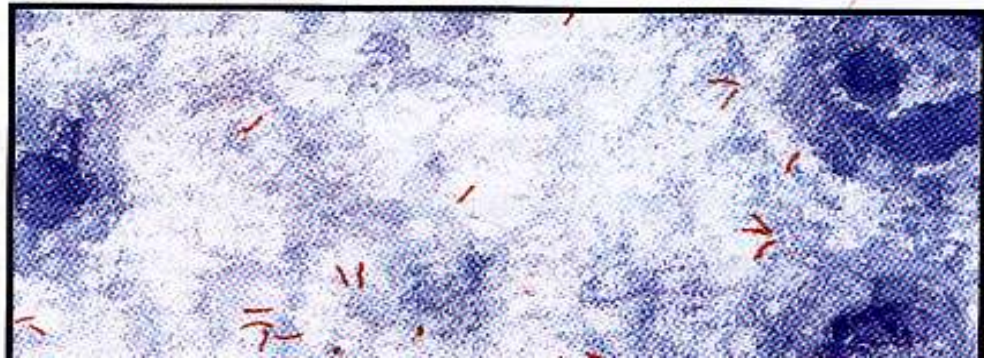
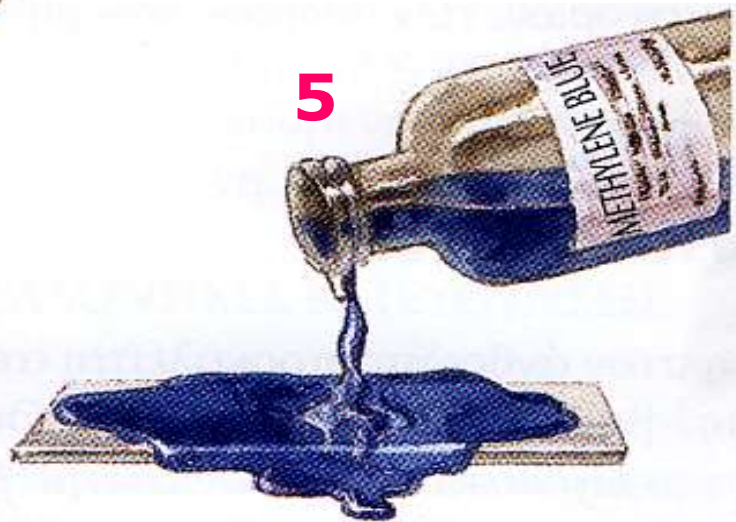
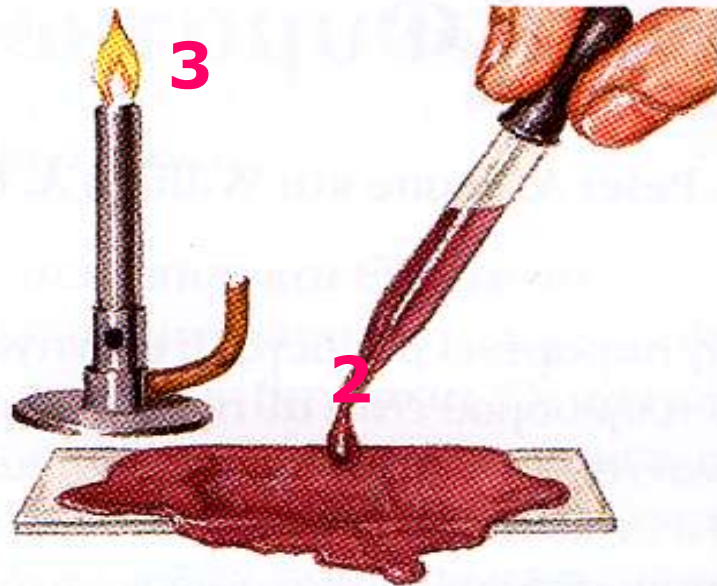
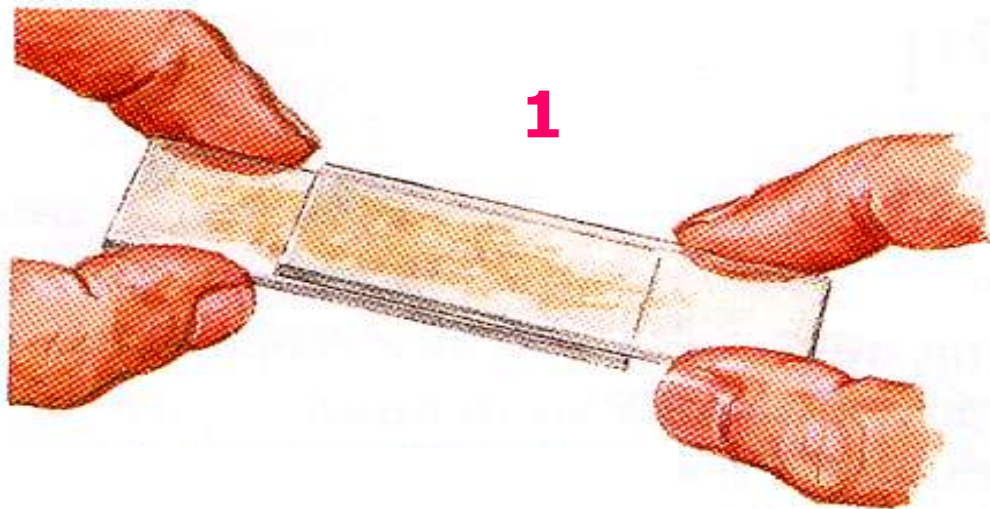


# Envelopes of Gram-Positive, Mycobacterium and Gram-Negative cells



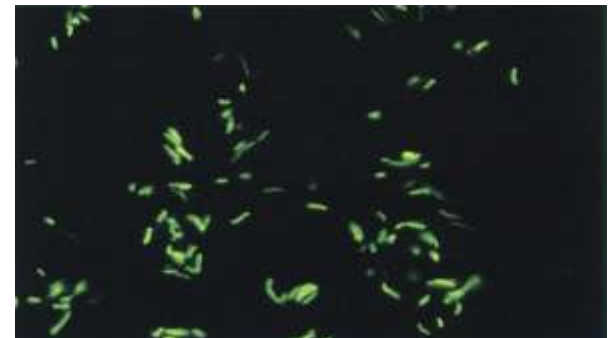
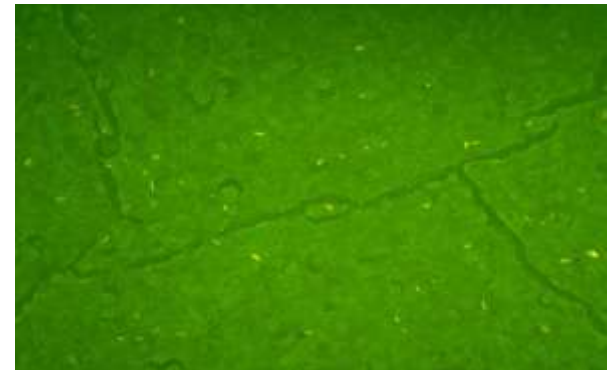
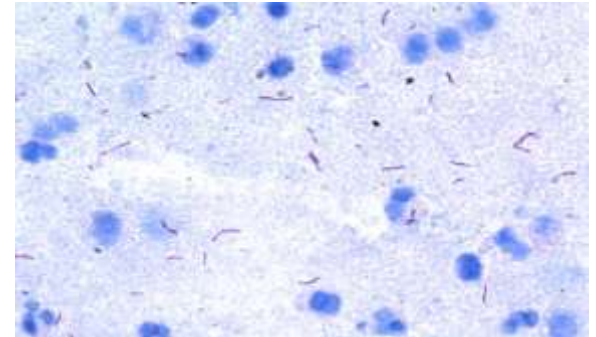
Parsons, L.M., et al. 1997 Infect. Dis. Clinics N.A. 11:905-928





# Μικροσκόπηση

- ❑ Z-N 300 οπτικά πεδία  
(10 λεπτά)
- ❑ Σε ένα παρασκεύασμα 1X2 cm  
**100-300** οπτικά πεδία (**10min**)  
**1-4%** του παρασκευάσματος
- ❑ Σε χρώση  
αουραμίνης-ροδαμίνης  
**30** οπτικά πεδία (**90sec**)



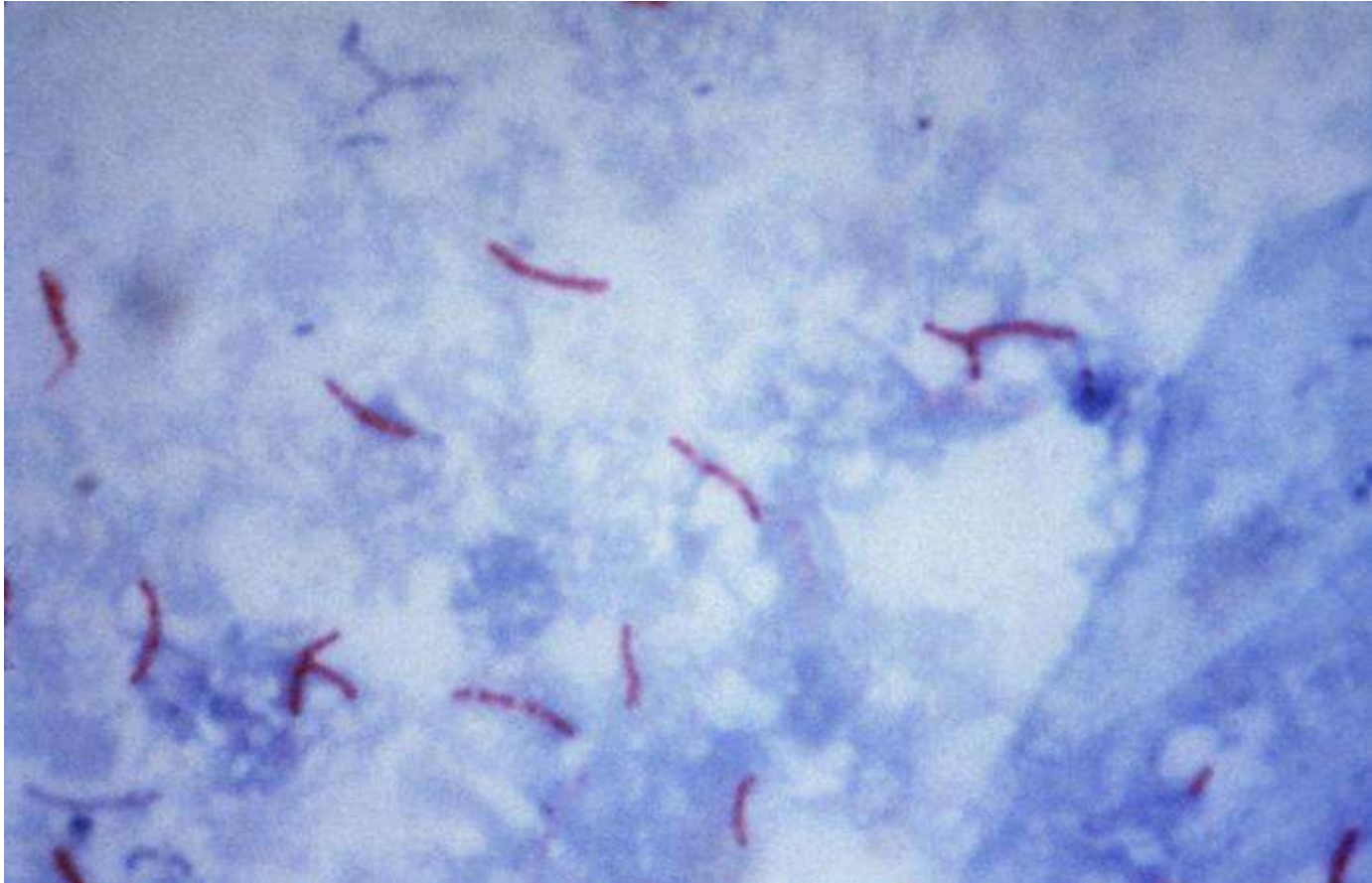


# Πιθανότητα θετικής μικροσκοπικής ανάλογα με τον αριθμό των μυκοβακτηριδίων ανά ml κλινικού δείγματος

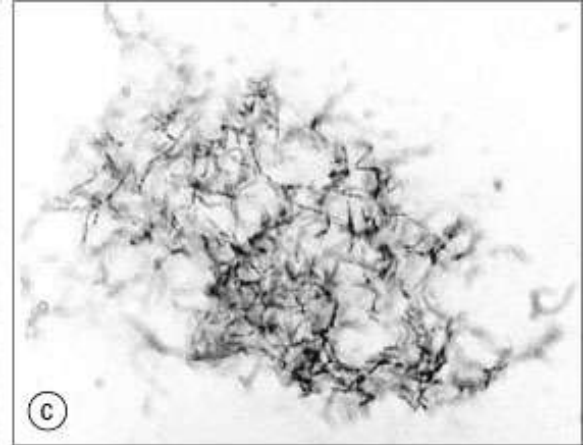
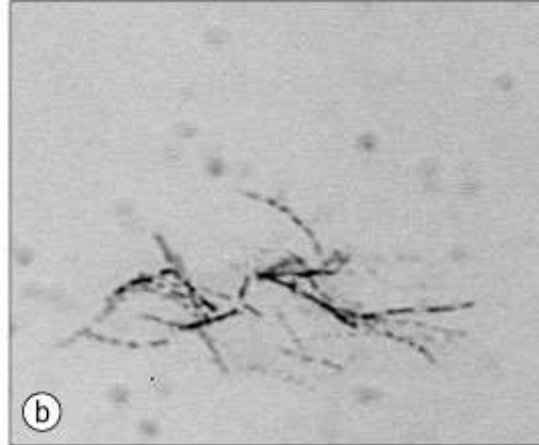
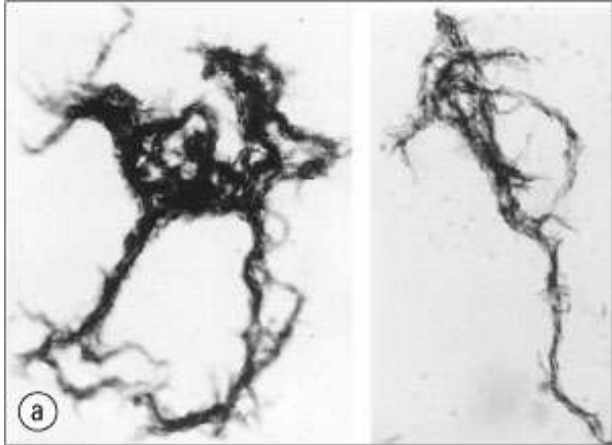
<b>Αποτέλεσμα</b>	<b>Μέση συγκέντρωση οξεάντοχων / ml πτυέλων</b>	<b>Πιθανότητα θετικού αποτελέσματος (%)</b>
<b>(-)</b>	<b>1000</b>	<b>10</b>
<b>1+</b>	<b>5.000-10.000</b>	<b>50</b>
<b>2+</b>	<b>50.000</b>	<b>90</b>
<b>3+</b>	<b>100.000</b>	<b>96</b>
<b>4+</b>	<b>&gt;500.000</b>	<b>99</b>



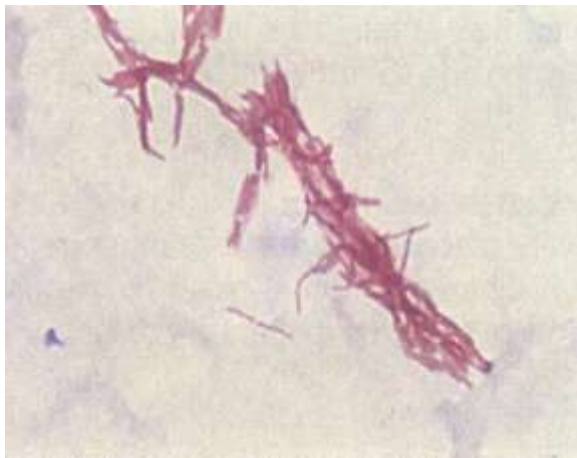
# Οξεοάντοχη χρώση



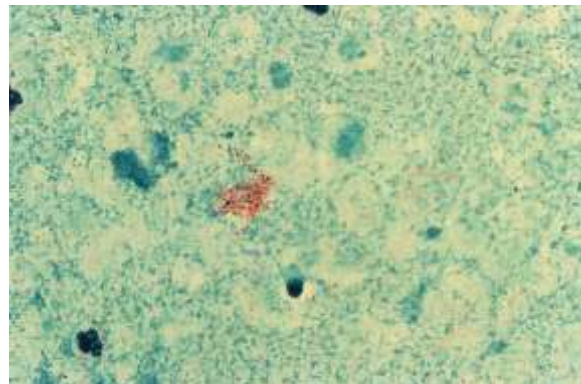
# Μικροσκοπική εξέταση



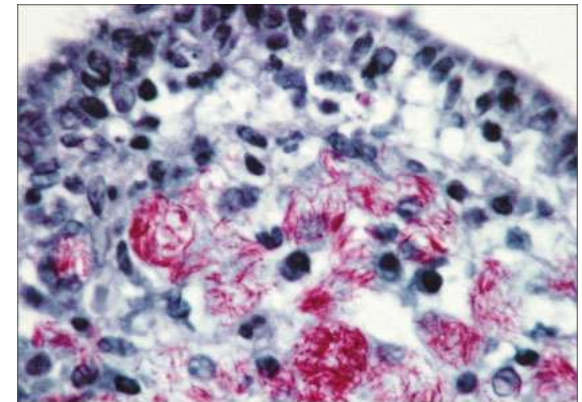
© Elsevier 2004. Infectious Diseases 2e - www.idreference.com



***M. tuberculosis***



***M. kansasii***



© Elsevier 2004. Infectious Diseases 2e - www.idreference.com

***M. avium***

# LED μικροσκόπιο

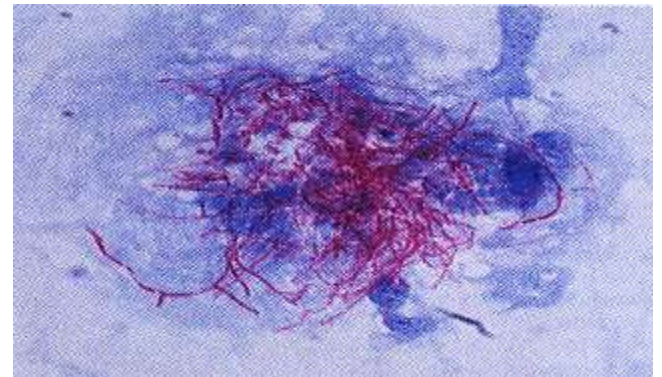
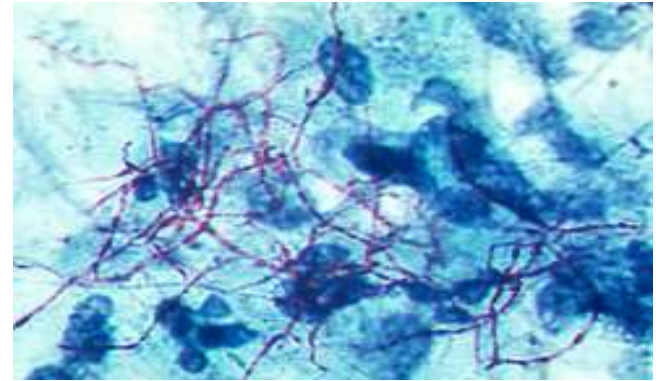
(light emitting diode=με πηγή φωτός ημιαγωγό)

- τελευταία εξέλιξη των μικροσκοπίων φθορισμού
- έχει όλα τα πλεονεκτήματα του μ. φθορισμού
- χωρίς το επί πλέον κόστος
- η WHO συνιστά να αντικατασταθεί με led το κοινό μ.φθορισμού και το Φ/Μ
- **εύχρηστο** (για όποιον επιθυμεί να το μάθει, απαιτείται συμπληρωματική εκπαίδευση περίπου 1 μηνός)



# Οξεάντοχα

- *Mycobacterium spp*
- *Mycobacterium leprae*
- *Nocardia spp*
- *Gordonia spp*
- *Tsukamurella spp*
- *Legionella micdadei*
- *Rhodococcus spp*
- *Cryptosporidium, Cyclospora, Isospora*



*Nocardia spp*

# Καλλιέργεια

## Μέθοδος αναφοράς

- ❑ Ευαισθησία **80-95%**
- ❑ Ειδικότητα **98%**
- ❑ Ανιχνεύει **10-100** βακτήρια/ml υλικού
- ❑ Χρόνος επώασης **6 - 8** εβδομάδες
- ❑ Απαραίτητη για
  - ❑ ταυτοποίηση του είδους
  - ❑ δοκιμασία ευαισθησίας στα αντιφυματικά
  - ❑ γονοτυπικό έλεγχο (επιδημιολογικές μελέτες και έλεγχος εργαστηριακής επιμόλυνσης)



# Καλλιέργεια

- **Επιβεβαιώνει οριστικά τη κλινική διάγνωση**
- **Επιλύει τυχόν διαφοροδιαγνωστικά προβλήματα**



# Καλλιέργεια

## Απαραίτητη

- Ταυτοποίηση του είδους
- Δοκιμή ευαισθησίας στα αντιφυματικά
- Γονοτυπικός έλεγχος (επιδημιολογικές μελέτες και έλεγχος εργαστηριακής επιμόλυνσης)





# Επεξεργασία δείγματος

- Ρευστοποίηση
- Ομογενοποίηση
- Απο-μόλυνση
- Φυγοκέντρηση ιζήματος
- Εξουδετέρωση (προστίθεται πενικιλίνης και  $H_2SO_4$ )
- Φυγοκέντρηση
- Εμβολιασμός σε 2 σωληνάκια L.J.
- Επώαση σε κεκλιμένη θέση στους  $37^{\circ}C$



# Επεξεργασία δείγματος

- Μέθοδος Petrof
- Τροποποιημένη Petrof
- Προσθήκη NaOH 4% ή ακετυλοκυστεΐνη
- Μέθοδος Zephiran



# Θρεπτικά υλικά

- **Στερεά θρεπτικά υλικά:**
  - Lowenstein-Jensen (Μέθοδος αναφοράς)
  - Middlebrook 7H10/11
- **Υγρά θρεπτικά υλικά:**
  - Ημιαυτόματο σύστημα Bactec 460
  - Αυτοματοποιημένο Bactec MGIT 960





# Απάντηση καλλιέργειας

## Ανάγνωση

Καμία απάντηση

1-50 αποικίες

50-100 αποικίες

100-200 αποικίες

200-500 αποικίες

>500 αποικίες

Επιμόλυνση

## Απάντηση

Αρνητική

θετική αριθμός αποικιών

θετική (1+)

θετική (2+)

θετική (3+)

θετική (4+ – συρρέουσα)

Επιμόλυνση



# Καλλιέργεια

Απαιτούμενος χρόνος ανάπτυξης:  
**5-6 εβδομάδες**

Χρόνος αναπαραγωγής

- Μυκοβακτηρίδια: **15-22h**
- Άλλα μικρόβια: **20-30min**



# Καλλιέργεια σε υγρά θρεπτικά υλικά

## ❑ Συστήματα ταχείας ανίχνευσης μυκοβακτηριδίων

- ✓ BACTEC TB 460 BD
- ✓ BACTEC MGIT 960 BD
- ✓ BACTEC 9000 BD
- ✓ MB/BacT Organon
- ✓ Septi-Check Roche
- ✓ MBCheck Hoffman - LaRoche
- ✓ MB Redox Biotest
- ✓ ESP Difco



# Ημιαυτόματο σύστημα Bactec 460

- **Ραδιομετρική μέθοδος**
  - θρεπτικό υπόστρωμα με σεσημασμένο  $^{14}\text{C}$
  - μετράει το παραγώμενο  $^{14}\text{CO}_2$
- **Πλεονέκτημα**
  - μείωση του χρόνου ανάπτυξης
- **Μειονεκτήματα**
  - κίνδυνος επιμολύνσεων
  - χρήση ραδιενεργών ουσιών
  - αυξημένο κόστος
  - απουσία αποικίας





# Αυτοματοποιημένο σύστημα Bactec MGIT 960 (Mycobacterium Growth Indicator Tube)

- Δείκτης φθορισμού στη σιλικόνη του πυθμένα.
- Φθορίζει σε συνθήκες έλλειψη  $O_2$  μετά από τη κατανάλωση του από τα μικρόβια
- Ευαισθησία 60-90%
- Δεν χρησιμοποιεί ραδιενεργές ουσίες
- Εφαρμόζεται και για **έλεγχο ευαισθησίας**



**Έλεγχος ευαισθησίας**

# Έλεγχος ευαισθησίας

## Φυσική αντοχή

- Υπάρχει στο βακτήριο χωρίς προηγούμενη επαφή του με το φάρμακο
- Δεν αναπτύσσεται με πρόσληψη γονιδίων



# Πιθανότητες αντοχής αγρίου τύπου / φάρμακα

- **υψηλές ( $10^{-3}$ ):** Ethionamide, Capreomycin, Cycloserine, Thiacetazone
- **μεσαίες ( $10^{-6}$ ):** Isoniazide, Streptomycin, Ethambutole, Kanamycin, PAS
- **χαμηλές ( $10^{-8}$ ):** Rifampicin
- **INH + RIF:**  $10^{-6} \times 10^{-8} = 10^{-14}$



# Αντοχή μυκοβακτηριδίων

- **Πρωτοπαθής αντοχή** (primary drug-resistance ή drug-resistance among new cases)
- **Δευτεροπαθής ή επίκτητη αντοχή** (acquired drug-resistance ή drug-resistance among previously treated cases)



# Φυματίωση

**πολυανθεκτικότητα – Multi Drug Resistance**

**☐ MDR (INH + RIF)**

**υπερανθεκτικότητα - Extensively Drug Resistance**

**☐ XDR (INH + RIF + QNL + AMIK ή CYCL ή CAP)**



# Δοκιμή Ευαισθησίας στα αντιφυματικά φάρμακα

## Πότε γίνεται?

- ❑ Πρώτη απομόνωση του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης
- ❑ Σε καλλιέργεια μετά από 3 μήνες θετική
- ❑ Αν δεν υπάρχει ικανοποιητική ανταπόκριση στη θεραπεία, επαναλαμβάνεται η DST στο νέο στέλεχος που απομονώνεται



Drug group <sup>a</sup>	Drug	DST category	DST method available	DST critical concentrations (µg/ml)				
				Löwenstein-Jensen <sup>b</sup>	Middlebrook 7H10 <sup>b</sup>	Middlebrook 7H11 <sup>b</sup>	BACTEC460	MGIT960
Group 1 First-line oral anti-TB agents	Isoniazid	I	Solid, liquid	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1
	Rifampicin	I	Solid, liquid	40.0	1.0	1.0	2.0	1.0
	Ethambutol	II	Solid, liquid	2.0	5.0	7.5	2.5	5.0
	Pyrazinamide	II	Liquid	-	-	-	100.0	100.0
Group 2 Injectable anti-TB agents	Streptomycin	II	Solid, liquid	4.0	2.0	2.0	2.0	1.0
	Kanamycin	II	Solid, liquid	30.0	5.0	6.0	4.0	-
	Amikacin	II	Liquid	-	-	-	1.0	1.0
	Capreomycin	II	Solid, liquid	40.0	10.0	10.0	1.25	2.5
	Viomycin	V	None	-	-	-	-	-
Group 3 Fluoroquinolones	Ciprofloxacin <sup>d</sup>	III	Solid, liquid	2.0	2.0	2.0	2.0	1.0
	Ofloxacin	III	Solid, liquid	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
	Levofloxacin	IV	Solid, liquid	-	2.0	-	-	2.0
	Moxifloxacin	IV	Liquid	-	-	-	0.5	0.25
	Gatifloxacin	IV	Solid	-	1.0	-	-	-
Group 4 <sup>c</sup> Oral bacteriostatic second-line anti-TB agents	Ethionamide	IV	Solid, liquid	40.0	5.0	10.0	2.5	5.0
	Prothionamide	IV	Solid, liquid	40.0	-	-	1.25	2.5
	Cycloserine	IV	Solid	40.0	-	-	-	-
	Terizidone	IV	None	-	-	-	-	-
	<i>P</i> -aminosalicylic acid	IV	Solid, liquid	1.0	2.0	8.0	2.0	-
	Thioacetazone	V	None	-	-	-	-	-
Group 5 <sup>c</sup> Antituberculosis agents with unclear efficacy (not recommended by WHO for routine use in MDR-TB patients)	Clofazimine	V	Liquid	-	-	-	4.0	-
	Amoxicillin/clavulanate	V	None	-	-	-	-	-
	Clarithromycin	V	None	-	-	-	-	-
	Linezolid	V	Liquid	-	-	-	1.0	1.0

<sup>a</sup> WHO *Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis* (5).

<sup>b</sup> Indirect proportion method recommended. Other solid media methods (resistance ratio, absolute concentration) have not been adequately validated for second-line drugs.

<sup>c</sup> Routine DST for group 4 and 5 drugs is not recommended.

<sup>d</sup> Ciprofloxacin is no longer recommended to treat drug-susceptible or drug-resistant TB (5).

<sup>e</sup> Gatifloxacin only to be used in exceptional circumstances (5).





# ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ *Mtb* ΣΤΑ ΑΝΤΙΦΥΜΑΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

## Κλασικές Μέθοδοι

- ❑ Μέθοδος της απολύτου περιεκτικότητας σε αντιφυματικά φάρμακα  
**Absolute concentration Method**
- ❑ Μέθοδος υπολογισμού του λόγου ανθεκτικότητας μεταξύ του υπό εξέταση και του πρότυπου στελέχους H37Rv  
**Resistant Ratio**
- ❑ Μέθοδος της αναλογίας των ανθεκτικών βακτηριδίων προς τον όλο πληθυσμό του μικροβίου  
**Proportion method**
- ❑ Μέθοδος με χρήση υγρών θρεπτικών υλικών  
**Bactec 460 (Becton Dickinson)**  
**ESP II (Trek Diagnostics System)**  
**MGIT 960 (Becton Dickinson)**  
**MB/BacT ALERT 3D system (bioMerieux)**



Georges Canetti  
1911-1971



# Πότε ένα στέλεχος είναι ανθεκτικό *in vitro*;

**Ανθεκτικό:** είναι ένα στέλεχος όταν αναπτύσσεται σε ποσοστό  $>1\%$ , παρουσία της κριτικής συγκέντρωσης του αντι-Tb φαρμάκου

## Κριτική αναλογία

Ποσοστό  $>1\%$  του πληθυσμού



## Κριτική συγκέντρωση

Η χαμηλότερη συγκέντρωση του φαρμάκου που αναστέλλει το **95%** των άγριων στελεχών του *M.tb*, ενώ δεν αναστέλλει στελέχη που απομονώθηκαν από ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε θεραπεία χωρίς ανταπόκριση



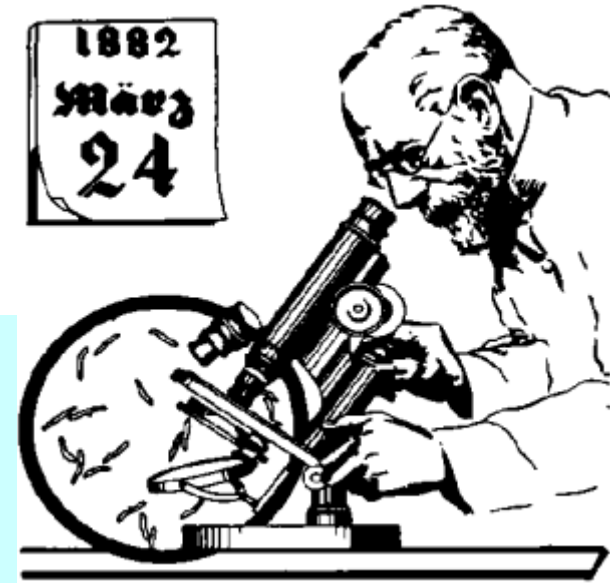
# Δοκιμασία ευαισθησίας

## Απάντηση:

- συγκέντρωση του φαρμάκου
  - θρεπτικό υλικό
  - μέθοδος που εφαρμόστηκε
- Αντοχή στις χαμηλές συγκεντρώσεις
  - έλεγχος και στις υψηλές συγκεντρώσεις
  - προσαρμογή της δοσολογίας των αντι-Tb φαρμάκων

• Έλεγχος ΡΖΑ (όξινο ΡΗ) μόνο σε υγρά θρεπτικά υλικά

- Συντομότερη απάντηση με έλεγχο σε υγρά θρεπτικά υλικά
- CDC- έγκριση για φάρμακα 1<sup>η</sup> γραμμής
- Τα στελέχη *M. tb* που είναι ανθεκτικά στη RIF ή σε 2 τουλάχιστον φάρμακα της 1ης γραμμής ελέγχονται και στα αντι- Tb 2ης γραμμής.

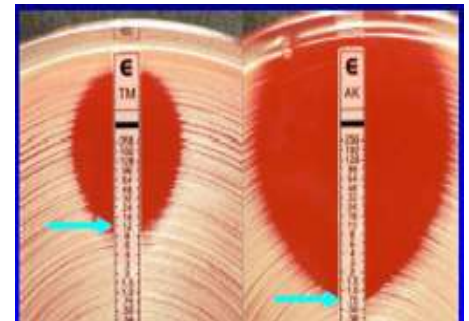


# Μέθοδοι ανίχνευσης αντοχής στα αντιφυματικά με κλασσικές μεθόδους

## □ Μέθοδος αναλογιών

□ στερεά θρεπτικά υλικά: 3 - 4 εβδομάδες

□ συστήματα ταχείας ανίχνευσης : 5 - 12 ημέρες



# Ταυτοποίηση

- ❑ Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά
- ❑ Καλλιεργητικοί χαρακτήρες
- ❑ Βιοχημικές δοκιμασίες
- ❑ Μοριακές μέθοδοι



# Μυκοβακτηρίδια

- Υποχρεωτικά παθογόνα
  - *M. tuberculosis complex* (MTBC)
  - *M. leprae*
- Ευκαιριακά
  - Non tuberculous mycobacteria (NTM)
- Σαπρόφυτα



# Ονοματολογία NTM

- αταξινόμητα
- ανώνυμα
- ψευδοφυματιώδη
- περιβαλλοντικά
- άτυπα
- ευκαιριακά
- \* άλλα από φυματίωση - Mycobacteria Other Than Tuberculosis (MOTT)
- \*\* Wolinski 1979 - Μη φυματιώδη - Non Tuberculous Mycobacteria (NTM)



# Ταξινόμηση NTM σήμερα

## A. ΒΡΑΔΕΩΣ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΑ

### α. NTM που συχνά απομονώνονται από λοιμώξεις στον άνθρωπο

- *M. avium complex*
- *M. genavense*
- *M. haemophilum*
- *M. kansasii*
- *M. malmoensae*
- *M. marinum*
- *M. simiae*
- *M. szulgai*
- *M. ulcerans*
- *M. xenopi*





# Ταξινόμηση NTM σήμερα

## β. NTM που σπανίως απομονώνονται από λοιμώξεις στον άνθρωπο

- *M. asiaticum*
- *M. celatum*
- *M. gordonae*
- *M. scrofulaceum*
- *M. shimoidei*
- *M. terrae*



# Ταξινόμηση NTM σήμερα

## **B. ΤΑΧΕΩΣ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΑ NTM**

### **α. Συχνά απομονώνονται:**

- *M. abscessus*
- *M. chelonae*
- *M. fortuitum*



# Ταξινόμηση NTM σήμερα

## β. Λιγότερο συχνά απομονώνονται :

- *M. boenickei*
- *M. goodii*
- *M. immunogenum*
- *M. peregrinum*
- *M. smegmatis*

## γ. Σπανίως απομονωθέντα

## δ. Μη αποδεδειγμένα παθογόνα



# Ταυτοποίηση NTM

## Καλλιέργεια

Έλεγχος ταχύτητας ανάπτυξης (καθημερινά)

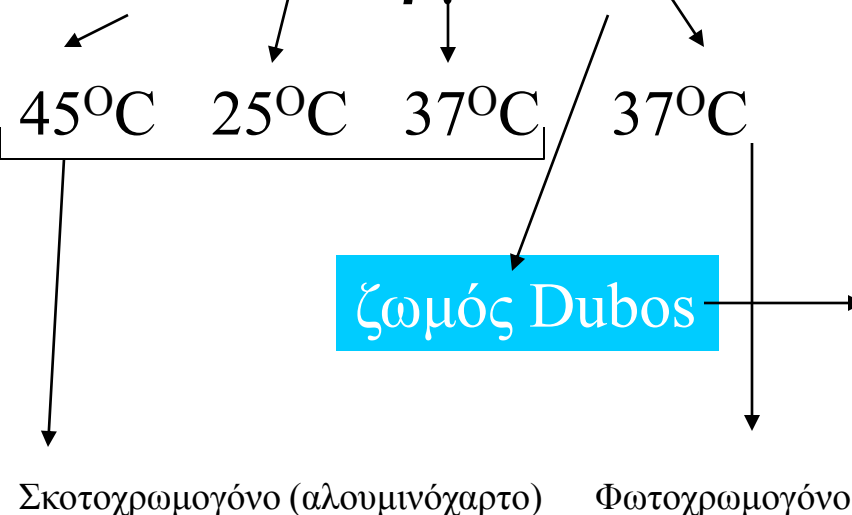
Ταχέως αναπτυσσόμενα

Βραδέως αναπτυσσόμενα

A. Κλασικός  
(προκαταρκτικός) έλεγχος

B. Μοριακός έλεγχος

Ανακαλλιέργεια σε LJ



	Ταχέως	Βραδέως
αρυλσουλφατάση	3 <sup>η</sup> ημέρα + 14 <sup>η</sup> ημέρα +	3 <sup>η</sup> ημέρα + 14 <sup>η</sup> ημέρα +
Ανάπτυξη LJ + NaCl 5%	+	-
Πρόσληψη Fe	+	-
Αναγωγή νιτρικών	+	+
Ανάπτυξη McConkey	+	-
Παραγωγή ουρεάσης	-	+
Υδρόλυση Tween 80	-	+
Αναγωγή Τελλουρικού Κ	-	+

# Βιοχημικές Εξετάσεις Ταυτοποίησης TB

TABLE VI  
SUMMARY TABLE: GROWTH CHARACTERISTICS AND IDENTIFICATION OF MYCOBACTERIA \*  
Variations are to be expected.

Species	Growth in less than 7 days	Pigment Formation		Niacin 1 hr	Nitrate Reduction	Catalase Activity			Tween Hydrolysis (days)	Tellurite Reduction in 3 days	Growth on 5% NaCl	Arylsulfatase		Growth on MacConkey Agar	Clinical Significance	
		Dark	Light			Rm Temp	SQ mm	pH7 68°				3-da	2-wk			
<u>M. tuberculosis</u>	-	-	-	-	+	3/5+	S	<45	-	>5	-	-	-	-	-	+
<u>M. bovis</u>	-	-	-	-	-	-	S	<45	-	>5	-	-	-	-	-	+
<u>M. kansasii</u>	-	-	+	+	-	3/5+	R	>45	+	<5	-	-	-	-1+	-	+
<u>M. marinum</u>	+	-	+	+	V	-	S	<45	+	<5	-	-	-2+	4+	-	+
<u>M. simiae</u>	-	-	+	+	+	-1+	R	>45	+	>5	-	-	-	-	-	+
<u>M. scrofulaceum</u>	-	+	+	-	-	-	R	>45	+	-	-	-	-	-	-	+
<u>M. gordonae</u>	-	+	+	-	-	-	R	>45	+	5-10	-	-	-	±	-	-
<u>M. szulgai</u>	-	±	+	**	-	+	R	>45	+	>5	-	-	-1+	+	-	+
<u>M. flavescens</u>	+	+	+	-	-	+	R	>45	+	5-10	-	±	-	-1+	-	-
<u>M. avium complex***</u>	-	-	-	-	-	-	S	<45	+	-	±	-	-	-1+	+	+
<u>M. ulcerans</u>	-	-	-	-	-	-	R	>45	+	-	-	-	-	-	-	+
<u>M. xenopi</u>	-	+	+	-	-	-	S	<45	+	-	-	±	2/5+	-	-	+
<u>M. gastri</u>	-	-	-	-	-	-	S	<45	-	5-10	-	-	-	-	-	-
<u>M. terrae complex</u>	-	-	-	-	-	1/5+	R	>45	+	5-10	-	-	-	-2+	-	-
<u>M. triviale</u>	-	-	-	-	-	1/5+	R	>45	+	5-10	-	+	+	3/5+	-	-
<u>M. fortuitum</u>	+	-	-	-	-	3/5+	R	>45	+	±	V	+	±2+	3/5+	+	+
<u>M. chelonae</u>	+	-	-	-	V	-	R	>45	+	-	V	V	2/3+	4/5+	+	+
<u>M. smegmatis</u>	+	-	-	-	-	1/3+	R	>45	+	<5	+	+	-	3+	-	-
<u>M. phlei</u>	+	+	+	-	-	1/3+	R	>45	+	<5	+	+	-	-1+	-	-
<u>M. vaccae</u>	+	+	+	+	-	1/3+	R	>45	+	<5	V	+	-	3+	-	-

\* See Key Tables II-V for additional differential tests.

\*\* M. szulgai may be photochromogenic when grown at 25° C.

\*\*\* M. avium complex includes M. intracellulare.

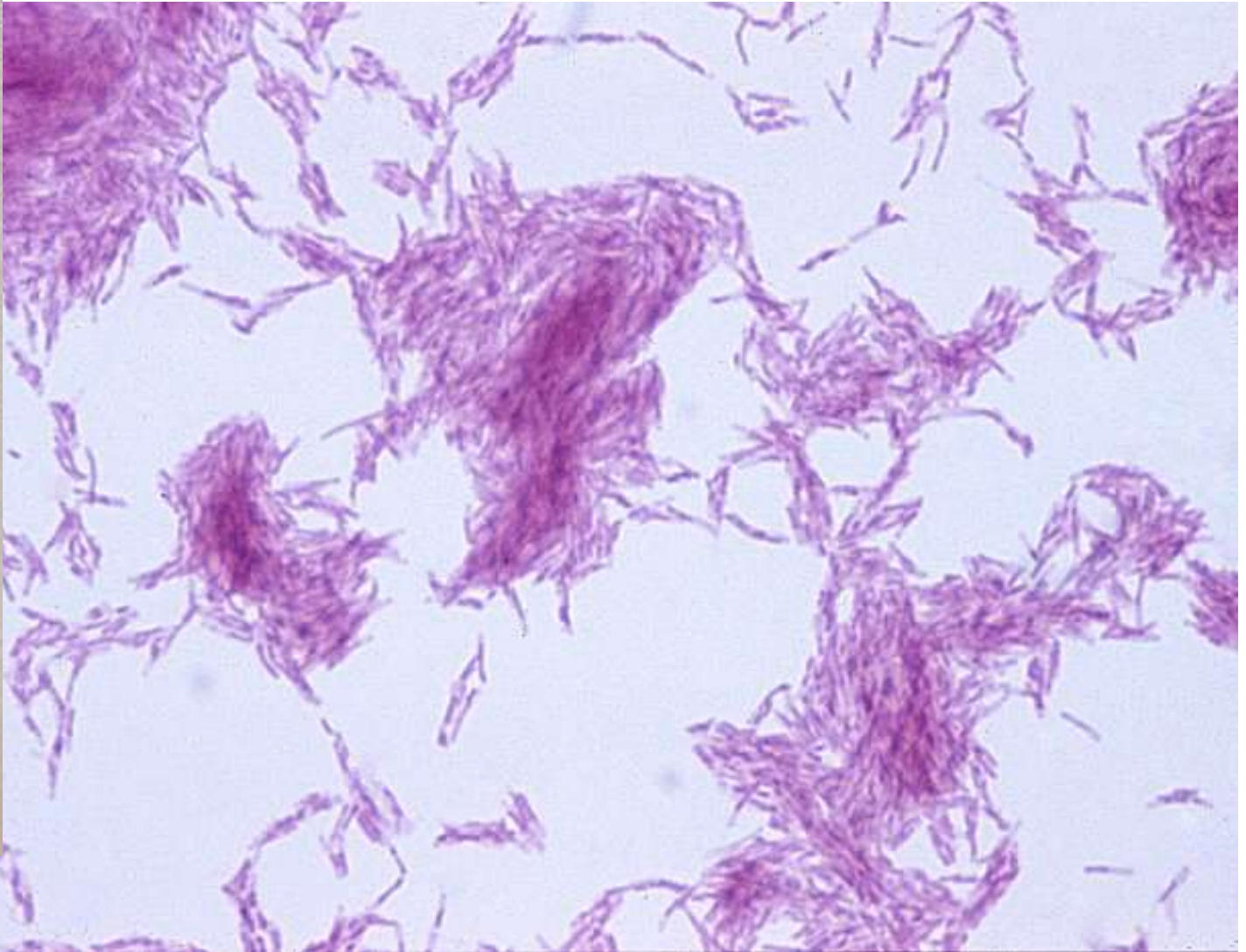
Key to symbols:

- = usually negative  
+ = negative, rarely positive  
± = positive, rarely negative  
+ = usually positive  
/ = low to high variations  
V = variable  
R = rapid  
S = slow  
Space = lack of information.

# Βιοχημικά χαρακτηριστικά NTM

- παραγωγή νιασίνης
- αναγωγή νιτρικών
- υδρόλυση Tween 80
- αντίδραση αρύλσουλφατάσης
- παραγωγή ουρεάσης
- αναγωγή τελουρικού
- παραγωγή καταλάσης
- ευαισθησία στο TCH (thiophen 2 carboxylacid hydrazide)
- ανάπτυξη σε PNB (παρανίτροβενζοϊκό οξύ)





***M.kansasii*: πνεύμονες, λεμφαδένες, οστά**

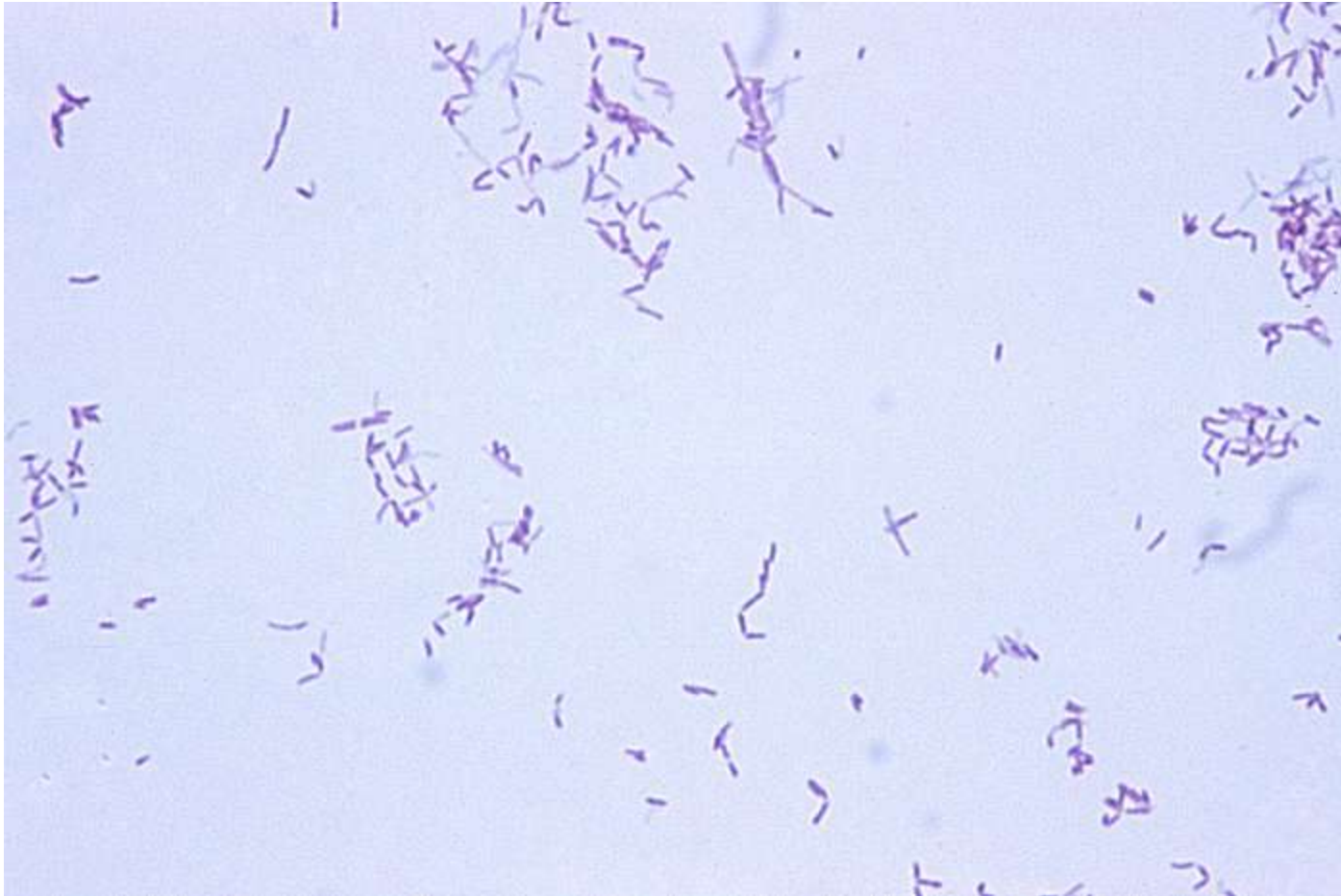


***M. marinum*: δέρμα, αρθρώσεις, οστά**





## **M.abscessus**



## **M.fortuitum**

# NTM- έλεγχος ευαισθησίας

- MIC άγνωστες
- Άλλοι μηχανισμοί αντοχής
- Διαφορετικές συγκεντρώσεις MIC σε όρο και ιστούς
- Έλεγχος 8 φαρμάκων (AM, KEF, CLAR, CIP, DOX, LIN, SXT, TOB)

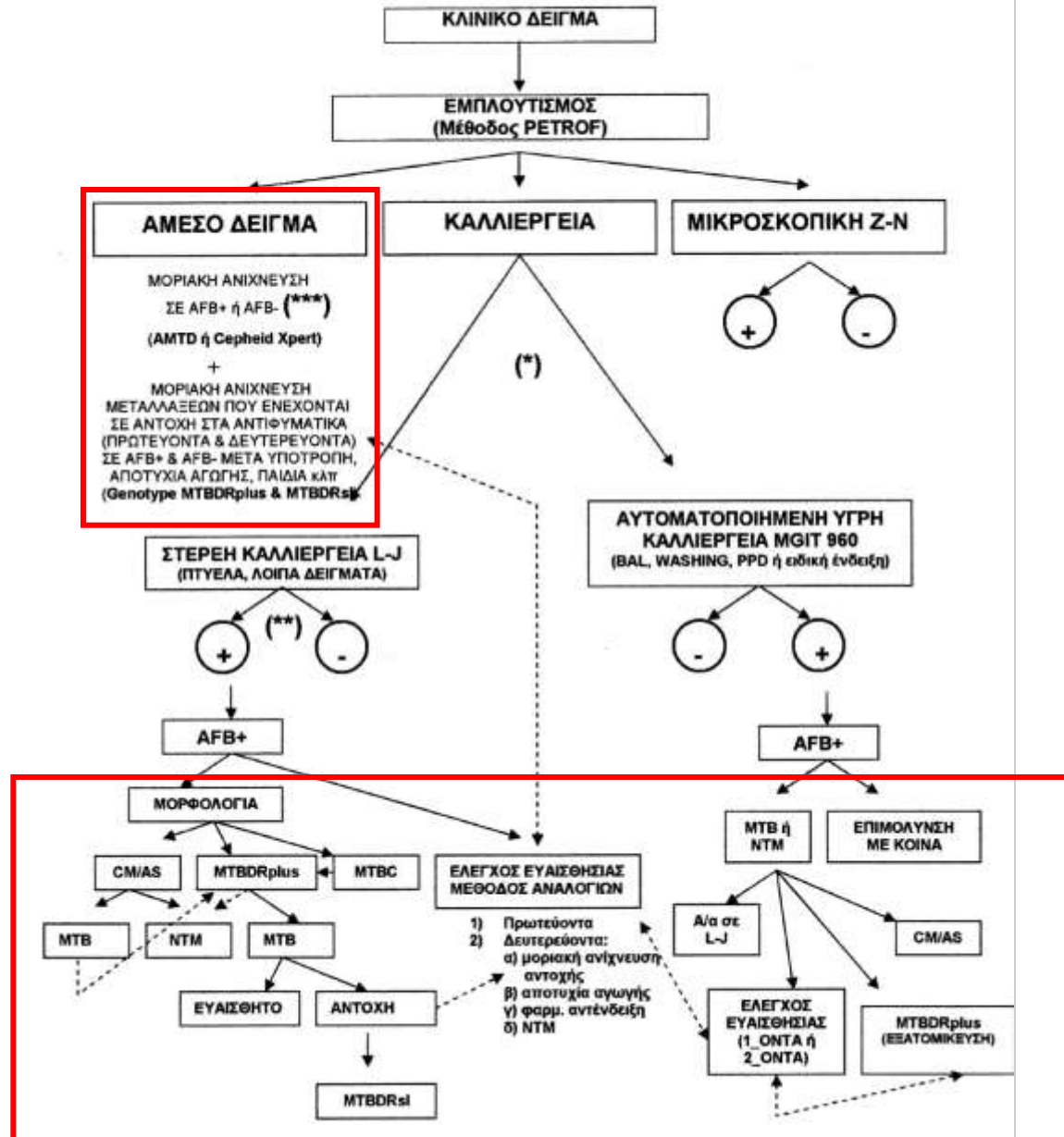


# Μοριακές Τεχνικές

- ❑ Άμεση ανίχνευση μυκοβακτηριδίου
- ❑ Ταυτοποίηση
- ❑ Ανίχνευση αντοχής



# ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ



# Μοριακές διαγνωστικές μέθοδοι

## Ανιχνεύουν στο γενετικό υλικό αλληλουχίες:

- ❑ χαρακτηριστικές του οργανισμού (όλοι οι οργανισμοί φέρουν στο γονιδίωμα τους αλληλουχίες με μοναδικό συνδυασμό βάσεων τυπικές των ατόμων του είδους).
- ❑ χαρακτηριστικές μιας ιδιότητας (π.χ. μεταλλάξεις που συνδέονται με αντοχή σε αντιβιοτικά)



# Υβριδισμός νουκλεϊνικών οξέων

**Μπορούμε να ρυθμίσουμε τις συνθήκες  
ώστε να είναι δυνατός ο υβριδισμός  
μόνο μεταξύ μορίων  
με 100% ομολογία βάσεων**



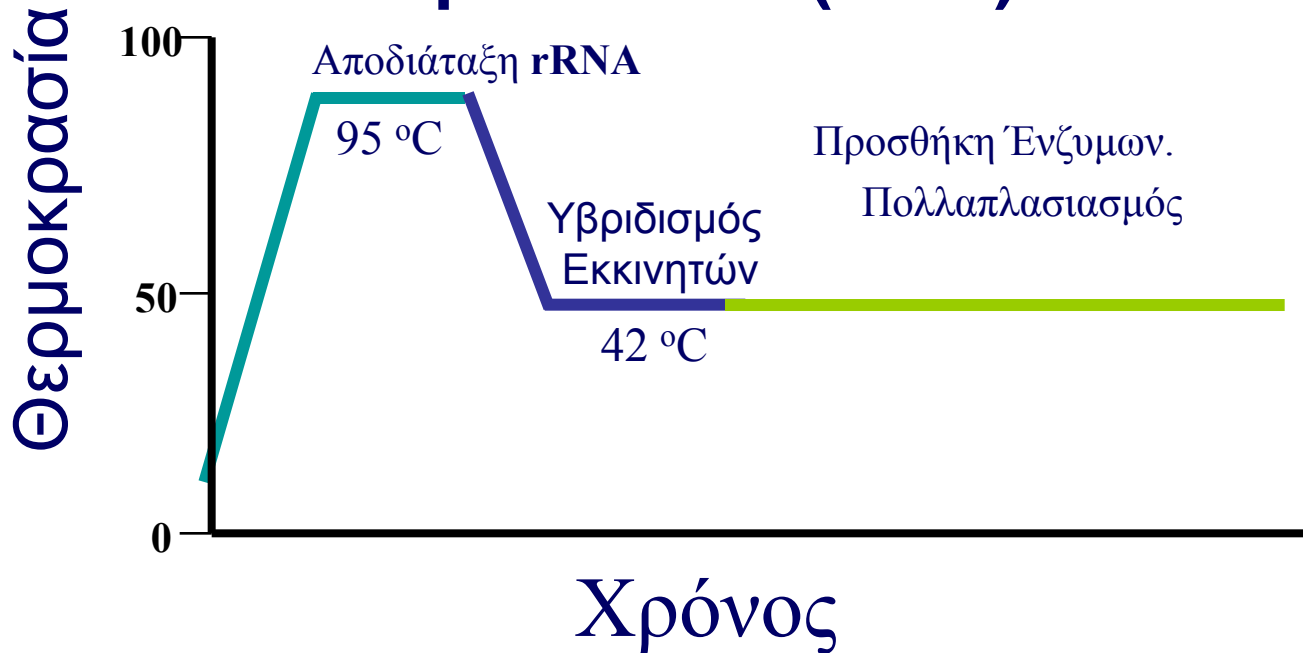
# Ανίχνευση με μοριακές μεθόδους

- **Amplification Mycobacterium Tuberculosis Direct test (AMTD)**, Gen Probe bioMerieux – μέθοδος TMA – ανίχνευση rRNA
- **Cobas Amplicor Mycobacterium Tuberculosis Direct**, Roche Diagnostics – μέθοδος PCR, ανίχνευση DNA
- **Genotype Mycobacteria Direct**, Hain Life Science – μέθοδος συνδυασμού NASBA και DNA STRIP, ανίχνευση RNA (*M. tuberculosis* complex, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. malmoense*)
- **BD Probe Tec energy transfer System**, Becton Dickinson-μέθοδος SDA-στόχος DNA (IS6110, 16S rRNA)
- **In house PCR** –στόχος DNA
- **Real time PCR** –στόχος DNA





# Αρχή Μεθόδου Transcription-Mediated Amplification (TMA)



## Ένζυμα:

- **Reverse Transcriptase (RT):** Συνθέτει DNA με «καλούπι» μονόκλωνο RNA ή DNA
- **Ενεργότητα RNase H της RT:** Αποικοδομεί την RNA αλυσίδα σε δίκλινα DNA:RNA μόρια
- **T7 RNA polymerase:** Συνθέτει RNA με «καλούπι» δίκλων DNA

# ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΜΤΔ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

<b>AFB</b>	<b>ΑΜΤΔ</b>	<b>ΚΛΙΝΙΚΗ ΥΠΟΨΙΑ</b>	<b>ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ</b>
<b>ΘΕΤΙΚΗ</b>	<b>ΘΕΤΙΚΗ</b>	<b>ΥΨΗΛΗ/ΧΑΜΗΛΗ</b>	<b>ΕΝΕΡΓΟΣ ΤΒ</b>
<b>ΑΡΝΗΤΙΚΗ</b>	<b>ΑΡΝΗΤΙΚΗ</b>	<b>ΥΨΗΛΗ/ΧΑΜΗΛΗ</b>	<b>ΔΕΝ ΑΠΟΚΛΕΙΕΤΑΙ ΤΒ</b>
<b>ΑΡΝΗΤΙΚΗ</b>	<b>ΘΕΤΙΚΗ (2 ΔΕΙΓΜΑΤΑ)</b>	<b>ΥΨΗΛΗ</b>	<b>ΕΝΑΡΞΗ ΑΓΩΓΗΣ ΕΠΑΝΕΚΤΙΜΗΣΗ ΜΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ</b>
<b>ΑΡΝΗΤΙΚΗ</b>	<b>ΘΕΤΙΚΗ (2 ΔΕΙΓΜΑΤΑ)</b>	<b>ΧΑΜΗΛΗ</b>	<b>ΕΝΕΡΓΟΣ ή ΠΑΛΑΙΑ ΤΒ ή ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ</b>
<b>ΘΕΤΙΚΗ</b>	<b>ΑΡΝΗΤΙΚΗ (ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ)</b>	<b>ΥΨΗΛΗ</b>	<b>NTM (ΔΕΝ ΑΠΟΚΛΕΙΕΤΑΙ MTB) ΕΝΑΡΞΗ ΑΓΩΓΗΣ ΕΠΑΝΕΚΤΙΜΗΣΗ ΜΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ</b>
<b>ΘΕΤΙΚΗ</b>	<b>ΑΡΝΗΤΙΚΗ (ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ)</b>	<b>ΧΑΜΗΛΗ</b>	<b>NTM (ΔΕΝ ΑΠΟΚΛΕΙΕΤΑΙ MTB) ΕΝΑΡΞΗ ΑΓΩΓΗΣ ΕΠΑΝΕΚΤΙΜΗΣΗ ΜΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ</b>



# ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΜΤΔ

	ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ		ΕΞΩ-ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ
	ΑΦΒ (+)	ΑΦΒ(-)	
ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ	0.93	0.70	0.66
ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ	0.99	0.97	0.96
ΘΕΤΙΚΗ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ	0.99	0.55	0.70
ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ	-	0.98	0.96
ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΑ ΨΕΥΔΩΣ ΘΕΤΙΚΟΥ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ	-	0.03	0.04

# Ταυτοποίηση MTB - Μέθοδοι

## DNA ανιχνευτές

Accuprobe (Gen Probe): τεχνική ταυτοποίησης από κ/α με ανιχνευτή και βασίζεται στην αρχή του υβριδισμού

## PCR-ανάστροφος υβριδισμός

Inno Lipa Mycobacteria (Immunogenetics)

Geno Type Mycobacterium CM (Hain)

Geno Type Mycobacterium AS (Hain)

Geno Type MTBC (Hain)

## PCR-RFLP:

PCR ανάλυση προϊόντων περιορισμού μετά από επώαση με ενδονουκλεάσες

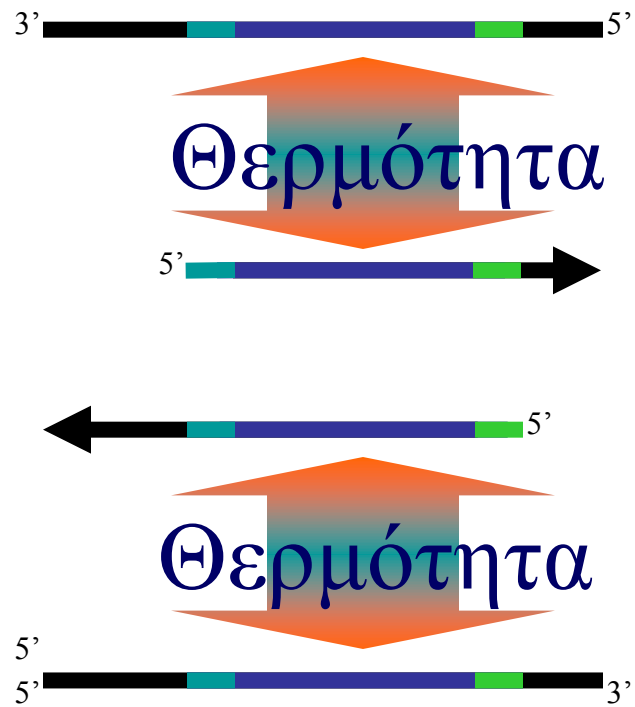
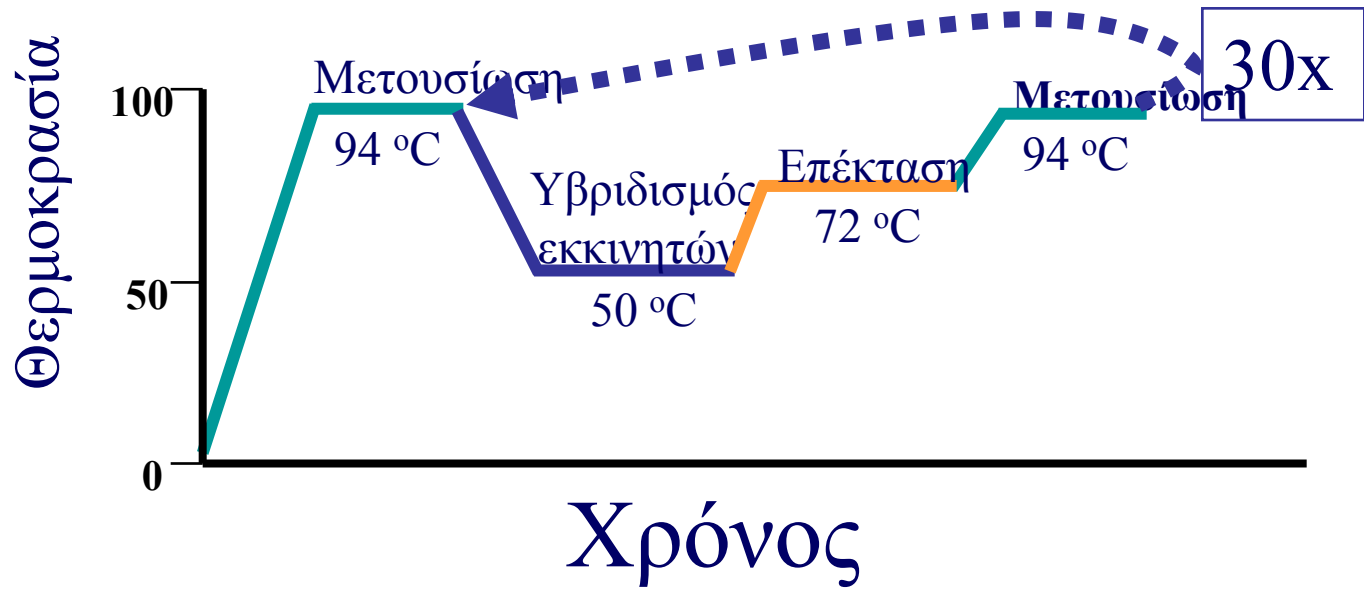
## PCR based sequencing:

ταυτοποίηση με καθορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και σύγκριση με αλληλουχίες αναφοράς

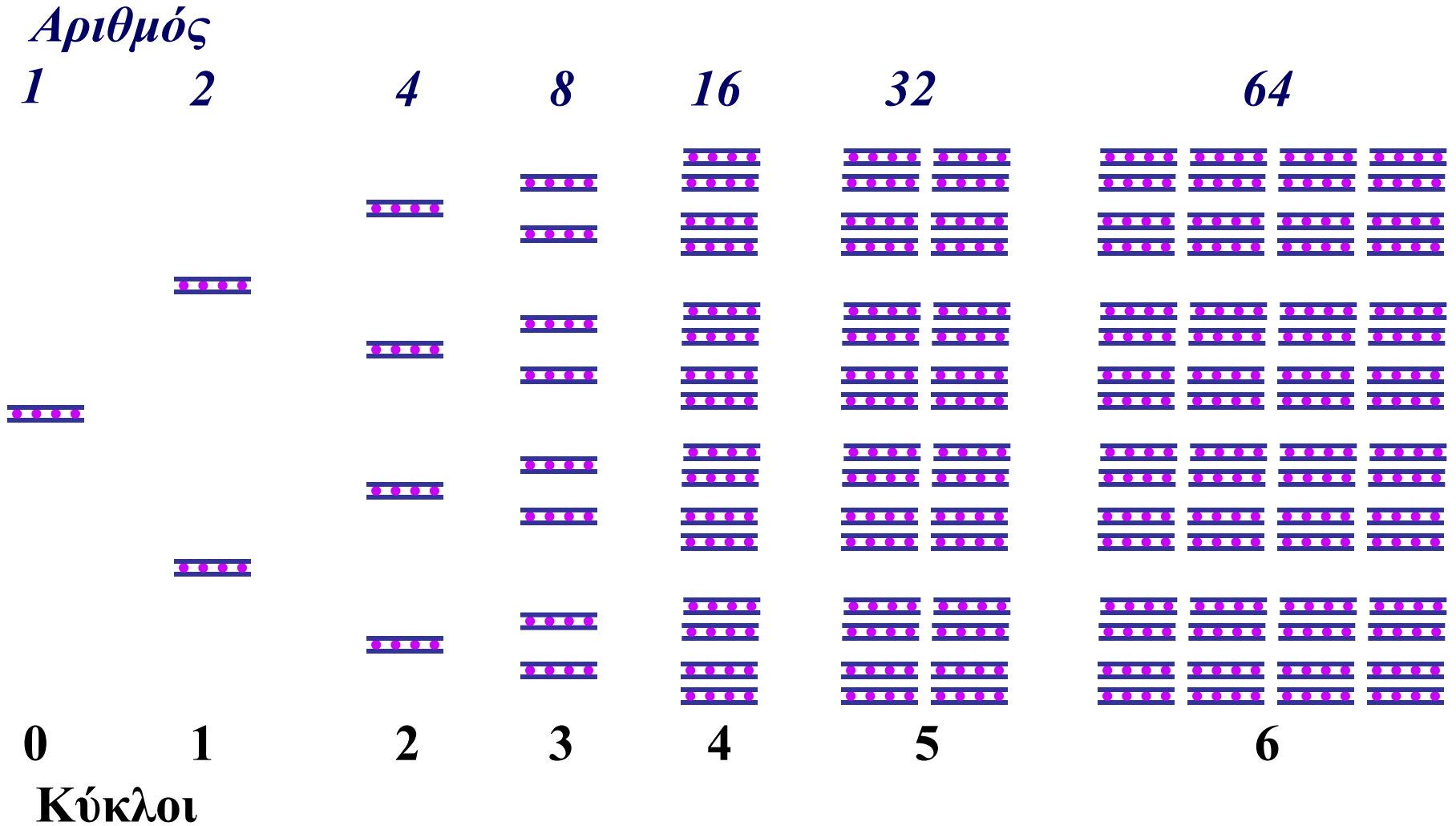
## DNA μικροσυστοιχίες



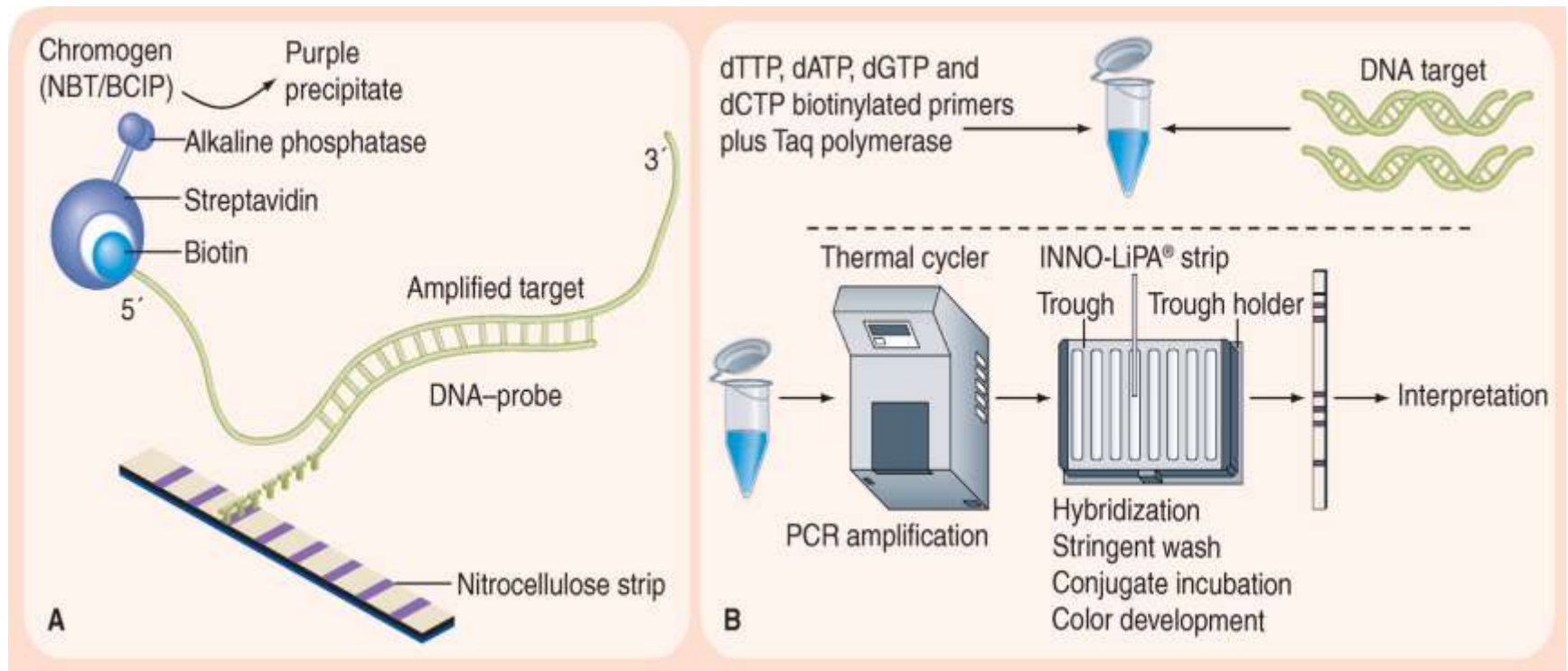
# PCR



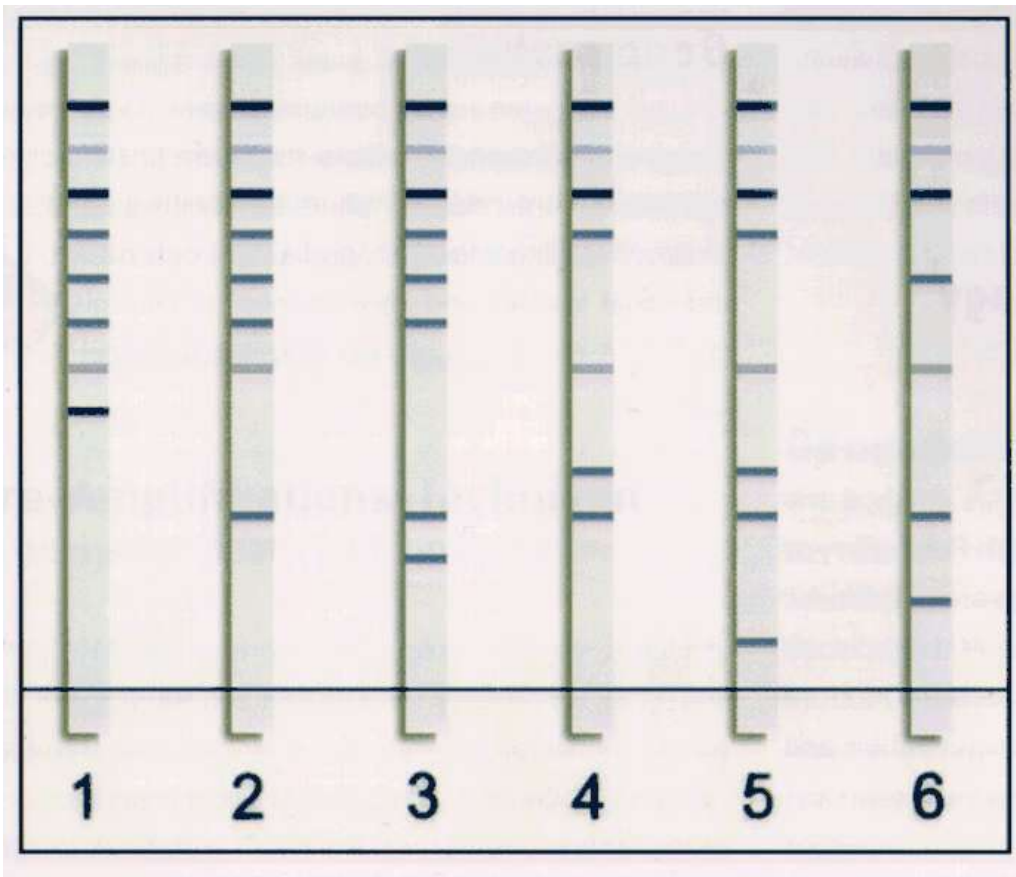
# Το DNA μεταξύ των εκκινήτων διπλασιάζεται με κάθε θερμικό κύκλο



# Ανάστροφος υβριδισμός



# Ταυτοποίηση MTB complex



1. *M. tuberculosis*
2. *M. africanum*
3. *M. bovis ssp. bovis*
4. *M. bovis ssp. caprae*
5. *M. microti*
6. *M. bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG)





# ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΗΝ RIF & INH

- ❑ Το ~95% των ανθεκτικών στην rifampicin στελεχών φέρουν μεταλλάξεις που εντοπίζονται σε μια περιοχή 81 bp του γονιδίου *rpoB*
- ❑ Οι μεταλλάξεις που συνδέονται με αντοχή στην isoniazid εντοπίζονται σε περισσότερες περιοχές ή γονίδια:
  1. 50% - 95% των ανθεκτικών στελεχών φέρουν μεταλλάξεις στο 315 κωδικόνιο του *katG* γονιδίου
  2. 20%-35% στην ρυθμιστική περιοχή του *inhA* γονιδίου
  3. Μεταλλάξεις σε άλλες περιοχές (*aphC-oxyR* intergenic region) ή γονίδια (π.χ. *kasA*, *furA*, *iniA*) έχουν επίσης ενοχοποιηθεί



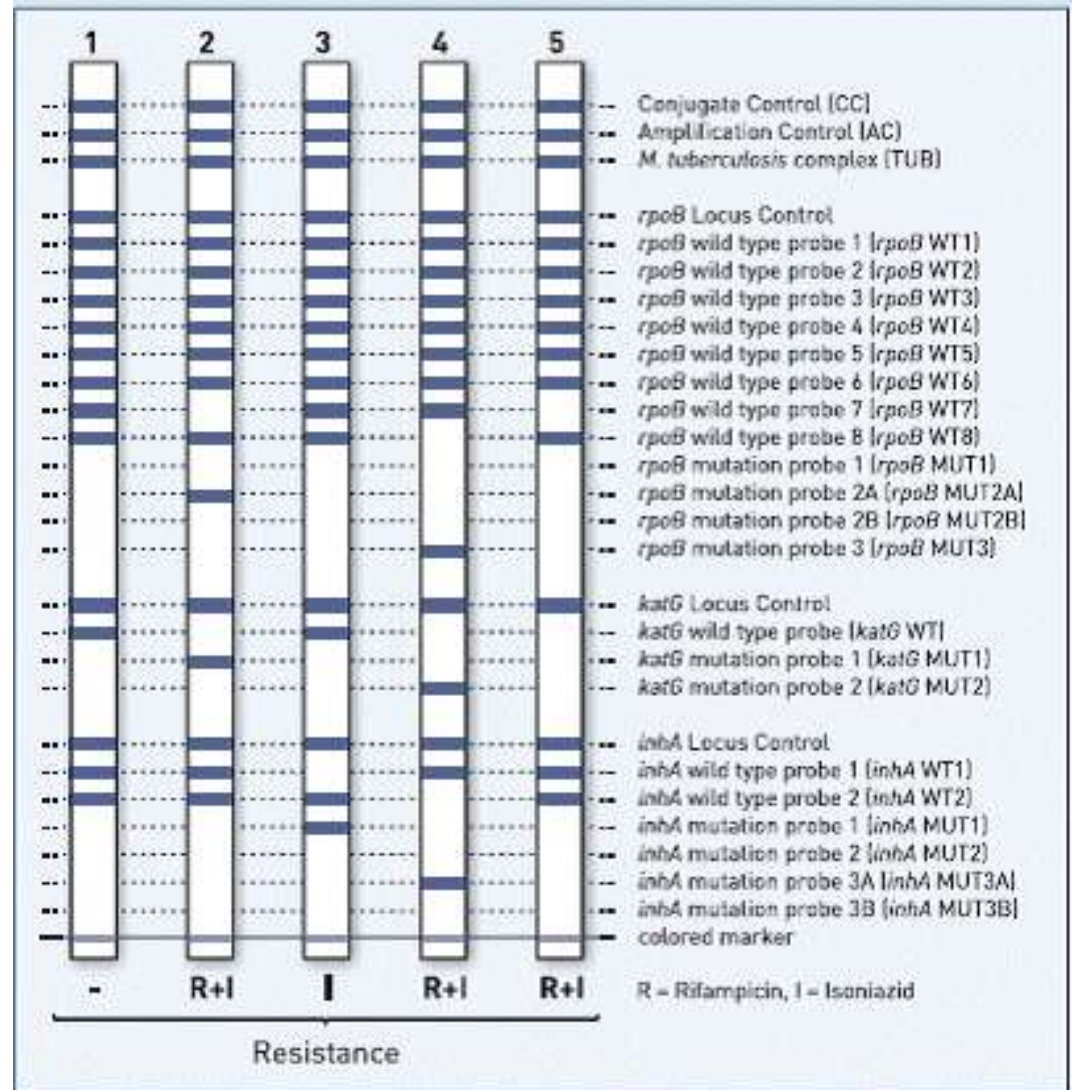
# MTBDRplus

## Multiplex PCR με βιοτινυλιωμένους εκίνητες

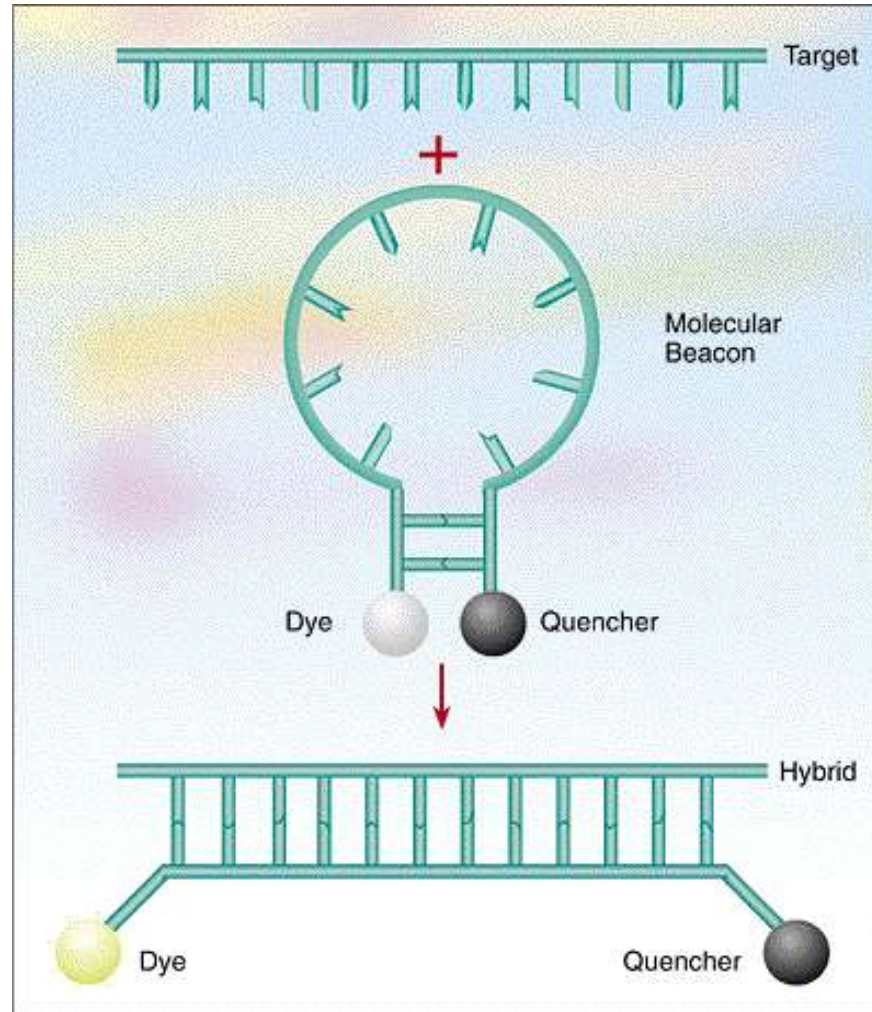
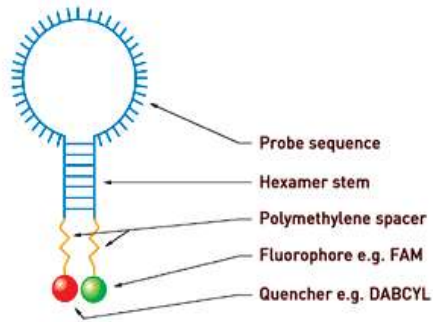
Amplicons:

1. Amplification control
2. Mtb complex
3. *rpoB* gene
4. *katG* gene
5. *inhA* gene

## Υβριδισμός ιχνηθετών ακινητοποιημένων σε μεμβράνη



# Molecular beacons

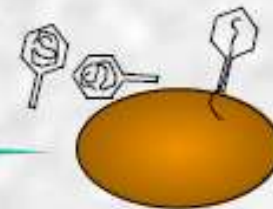


# **FAST** *Plaque* TB™ **Diagnostic Assay**

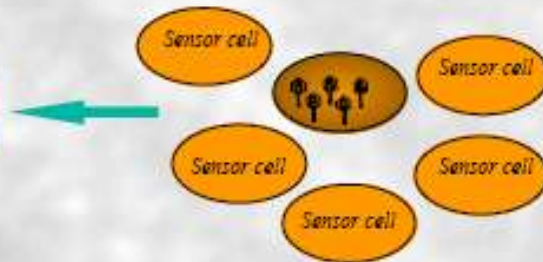
Bacteriophage



BACTERIOPHAGE  
INFECTION



VIRUCIDE  
ADDITION



NEUTRALISATION THEN AMPLIFICATION  
OF BACTERIOPHAGE IN SENSOR CELLS™

BACTERIOPHAGE  
DETECTION AS  
PLAQUES ON LAWN  
OF SENSOR  
CELLS™ GROWN IN  
PETRI DISH

Negative  
no plaques



Positive  
complete  
lysis

Positive  
countable  
plaques



Positive  
confluent  
lysis

Negative  
no plaques



Positive  
complete  
lysis



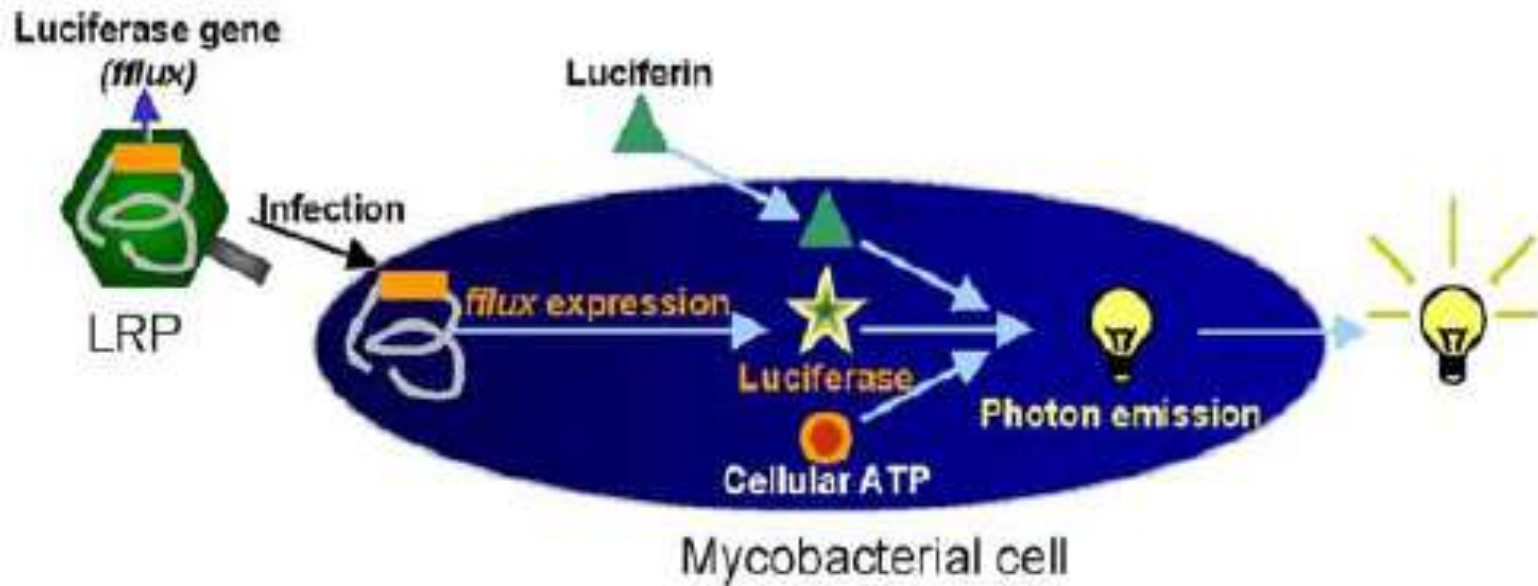
Positive  
countable  
plaques



Positive  
confluent  
lysis



# Luciferase Reporter Phage Assay



# Cepheid Gene Xpert MTB/RIF



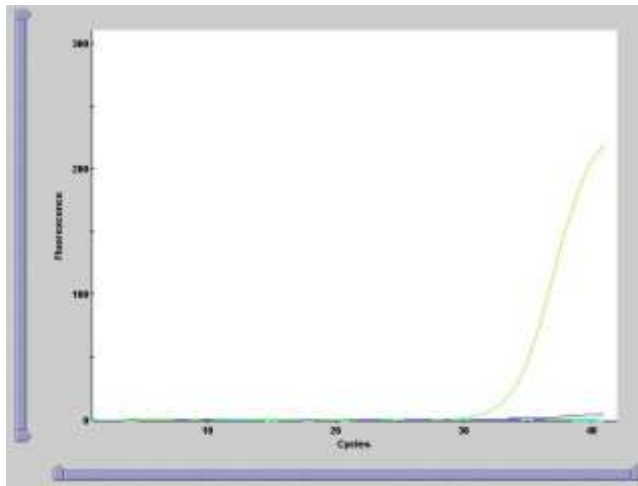
***rpoB* GENE 81 bp RIF RESISTANCE DETERMINING REGION**



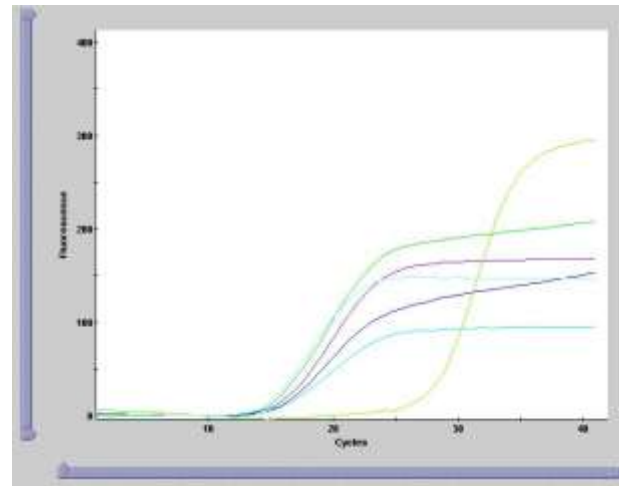


# Χpert MTB-RIF: Διαγράμματα Real-time PCR

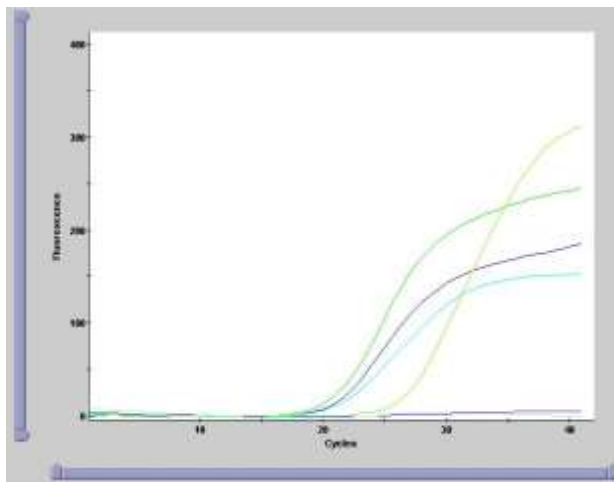
1.



3.



2.



4.

