

Συμβολή των Μοριακών Τεχνικών στη Διάγνωση και Θεραπεία των Λοιμώξεων

1. ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ
2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ
3. ΚΛΙΝΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ
4. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
5. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*
6. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ HSV
7. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΛΛΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ
8. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΟΧΗΣ
9. ΕΞΕΛΙΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ
10. ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ

Συμβολή των Μοριακών Τεχνικών στη Διάγνωση και Θεραπεία των Λοιμώξεων

Λουκία Ζέρβα

*Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας
Αττικό Νοσοκομείο, Πανεπιστήμιο Αθηνών*

Μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας

- Πληθώρα Εφαρμογών στην Κλινική Μικροβιολογία
- Ταυτοποίηση/ενδεδειγμένος χαρακτηρισμός, προσδιορισμός αντοχής και επιδημιολογία μικρο-οργανισμών που έχουν ήδη απομονωθεί σε καλλιέργειες

Ιδιαίτερη Κλινική Σημασία → Άμεση Αιτιολογική Διάγνωση της Λοίμωξης

- απ' ευθείας ανίχνευση παθογόνου στο κλινικό δείγμα
- με ταχύτητα διαθέσιμο αποτέλεσμα
- Μεθοδολογία πολλαπλασιασμού νουκλεϊκών οξέων
→ **Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Rapid diagnosis of meningococcal meningitis by polymerase chain reaction

Kristiansen BE et al. Lancet 1991; 337:1568

“The PCR is a **rapid technique** for the early detection of meningococcal meningitis and also **when culture is negative**”

Epidemiology of meningococcal disease in England and Wales 1993/94 to 2003/04: contribution and experiences of the Meningococcal Reference Unit

Gray et al. J Med. Microbiol. 2006; 55:887-96

Method of confirmation in laboratory-confirmed cases

Epidemiological year	Culture only	PCR only	PCR and culture	Total cases confirmed
1993/94	1186 (100%)	0	0	1186
1994/95	1228 (100%)	0	0	1228
1995/96	1494 (87%)	159 (9%)	55 (3%)	1708
1996/97	1181 (51%)	790 (34%)	366 (16%)	2337
1997/98	993 (43%)	800 (35%)	505 (22%)	2298
1998/99	994 (36%)	1049 (38%)	735 (26%)	2778
1999/00	988 (35%)	1122 (40%)	689 (25%)	2799
2000/01	797 (33%)	1120 (46%)	528 (22%)	2445
2001/02	622 (32%)	903 (46%)	436 (22%)	1961
2002/03	473 (32%)	699 (47%)	305 (21%)	1477
2003/04	442 (30%)	670 (45%)	381 (26%)	1493

- **1991- έως σήμερα → 21 χρόνια κλινικών εφαρμογών της Άμεσης Μοριακής Διάγνωσης και εξέλιξης της τεχνολογίας**

Εφαρμογή νέας μεθοδολογίας: 3 διαδοχικές φάσεις

- Ενθουσιασμός
- Απογοήτευση
- Αντικειμενική Αξιολόγηση

Άμεση Μοριακή Διάγνωση

- **1991- έως σήμερα → 21 χρόνια κλιν. εφαρμογών**
 - **Πως εφαρμόζεται στην κλινική πράξη ??**
 - **Είναι «εύκολη» η διενέργειά της για το εργαστήριο ??**
 - **Η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων της είναι δεδομένη ??**
 - **Βελτιώνεται με την πάροδο του χρόνου ??**

«Συμβατική» Κλινική Μικροβιολογία

ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ → απομόνωση, ταυτοποίηση, ευαισθησία

- χρονοβόρες εργαστηριακές εξετάσεις
- έλλειψη αυτοματισμού
- ύπαρξη φυσιολογικής χλωρίδας (αποικισμός ? λοίμωξη ? επιμόλυνση ?)
- ταυτόχρονη αναζήτηση πολλών παθογόνων σε ένα κλινικό δείγμα
- παθογόνα με προβληματική ανάπτυξη *in vitro*
(βραδεία ανάπτυξη, μόνο σε ειδικά υλικά, ουδεμία ανάπτυξη)

↓ Ευαισθησίας και Ειδικότητας

↑ Χρόνος Λήψης Αποτελεσμάτων (ΧΛΑ)

Άμεση Μοριακή Διάγνωση

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ

Μεθόδων Πολλαπλασιασμού Νουκλεϊκών Οξέων

- 1. Μεγάλη Ευαισθησία** → ανίχνευση 1 μορίου – στόχου
- 2. Μεγάλη Ειδικότητα** → φύση των νουκλεϊκών οξέων
- 3. Ταχύτατος ΧΛΑ** → λίγες ώρες
- 4. Ανίχνευση παθογόνου ακόμα και σε χορήγηση αντιμικροβιακής θεραπείας**
- 5. Ποσοτική ανίχνευση παθογόνου** → προσδιορισμός του μικροβιακού φορτίου στο κλινικό δείγμα
- 6. Ανίχνευση «δύσκολων» μικροοργανισμών**

1. ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

ΕΡΩΤΗΜΑ:

- Για ποιά παθογόνα **ενδείκνυται** η εφαρμογή της άμεσης μοριακής διάγνωσης ???

Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing

Espy MJ et al. Clin. Microbiol. Rev. 2006; 19: 165-256

- **Βακτήρια:** Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, Escherichia coli (Shiga toxin+), Clostridium difficile, Bacillus anthracis, Yersinia pestis, Mycobacteria, Bartonella henselae, Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis, Tropheryma whipplei, Chlamydophila pneumoniae, Legionella pneumoniae, Legionella spp., Mycoplasma pneumoniae, Borrelia burgdorferi, Borrelia garinii, Borrelia afzelii, Ehrlichia chaffeensis
- **Ανίχνευση Αντοχής:** MRSA, VRE, ESBL, penicillin R (S. pneumoniae; N. meningitidis), fluoroquinolone R (S. aureus; Y. pestis)
- **Ιοί με ποιοτική μέθοδο:** HSV, CMV, EBV, VZV, Enteroviruses, JCV, BKV, Parvovirus B19, West Nile virus, Influenza viruses, Adenovirus, Metapneumovirus, Parainfluenza virus, SARS-CoV, Poxviruses, HPV
- **Ιοί με ποσοτική μέθοδο:** CMV, EBV, BK virus, hepatitis A, B, C, D, E viruses, HIV
- **Μύκητες:** Aspergillus spp., Candida spp., Pneumocystis jiroveci
- **Παράσιτα:** Plasmodium spp., Babesia spp., Trypanosoma spp., Leishmania spp., Toxoplasma spp., Trichomonas spp., Cryptosporidium, Entamoeba, Giardia spp.

ΕΡΩΤΗΜΑ

Για ποια παθογόνα **ενδείκνυται** η εφαρμογή της άμεσης μοριακής διάγνωσης ???

(1) Κλινική Χρησιμότητα

- Λήψη θεραπευτικής απόφασης
- Καθορισμός πρόγνωσης

(2) Προϋπόθεση: ύπαρξη αξιολογής μεθοδολογίας

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ

→ *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), *Chlamydia trachomatis*, HSV, εντερο-ιοί

Μικροοργανισμοί που ανιχνεύονται συχνά στα κλινικά δείγματα με Μεθόδους Πολλαπλασιασμού Νουκλεϊνικών Οξέων

*Hashem M et al. Molecular Tools in the Diagnosis and Management of Infectious Diseases.
Pediatr. Rev. 2005; 26:15-20*

Παθογόνο	Κλινικό Δείγμα	Κλινική Εφαρμογή
<i>Chlamydia trachomatis</i> *	από το γεννητικό	Διάγνωση
Cytomegalovirus *	ENY, αίμα, οφθαλμικό, αμνιακό	συστηματική λοίμωξη, συγγενής λοίμωξη, αμφιβληστροειδίτιδα, έλεγχος για χορήγηση προφυλακτικής αγωγής
Epstein-Barr virus	ENY, αίμα	PTLD, λέμφωμα ΚΝΣ (AIDS)
Enteroviruses	ENY, αίμα	Εγκεφαλίτιδα, μηνιγγίτιδα
Hepatitis B virus	αίμα	Έλεγχος ανταπόκρισης σε θεραπεία
Hepatitis C virus *	αίμα	Διάγνωση ενεργούς λοίμωξης, έλεγχος ανταπόκρισης σε θεραπεία
HIV *	αίμα	Πρόγνωση, έλεγχος ανταπόκρισης σε θεραπεία
Herpes simplex virus	ENY, αίμα, οφθαλμικό	Εγκεφαλίτιδα, μηνιγγίτιδα, οξεία νέκρωση αμφιβληστροειδούς
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> *	πτύελα	Ταυτόχρονη διάγνωση με καλλιέργεια
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> *	από το γεννητικό	Διάγνωση
<i>Toxoplasma gondii</i>	ENY, αμνιακό, οφθαλμικό, ιστός, αίμα, BAL	Εγκεφαλίτιδα, αμφιβληστροειδίτιδα, συγγενής λοίμωξη
Varicella zoster virus	ENY, οφθαλμικό, δερμ. βλάβες	Εγκεφαλίτιδα, μυελίτιδα, συγγενής λοίμωξη

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ PCR

Μέθοδοι Πολλαπλασιασμού Νουκλεϊκών Οξέων

Target Amplification Systems (πολλαπλασιασμός του στόχου)

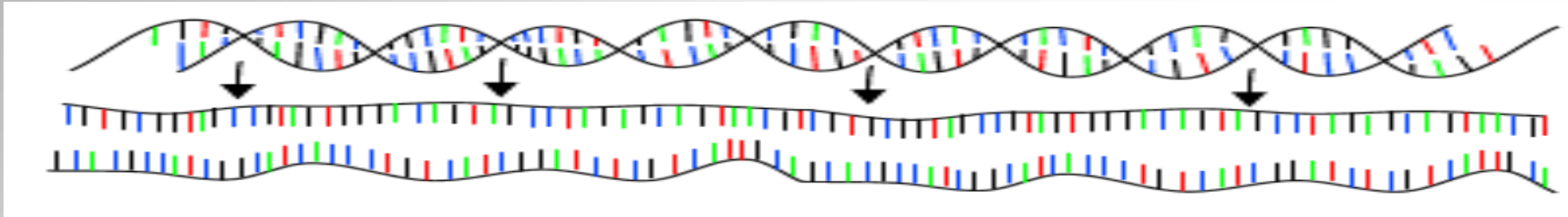
- **Polymerase chain reaction (PCR)**
- **Real time PCR**
- Ligase chain reaction (LCR)
- Self-sustaining sequence amplification (3SR)
- Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)
- Transcription-based amplification system (TAS)
- Transcription-mediated amplification (TMA)
- Strand displacement amplification (SDA)

Signal Amplification Systems (πολλαπλασιασμός του σήματος)

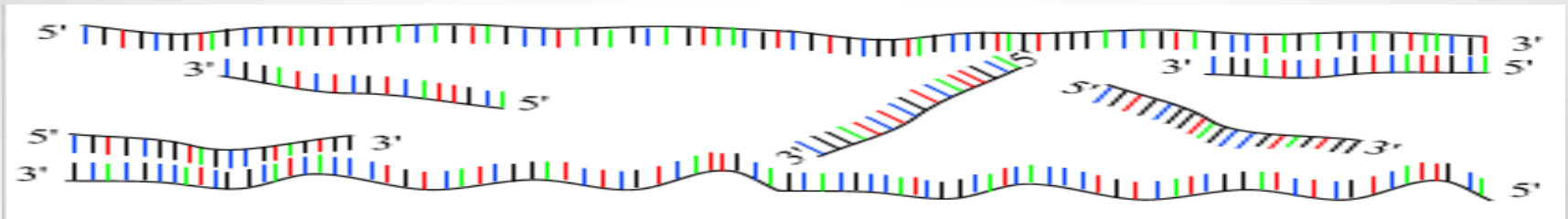
- Q β replicase
- Branched-DNA technology (bDNA)
- Cleavage-based signal amplification

Σε κάθε κύκλο της PCR αντιστοιχούν 3 στάδια

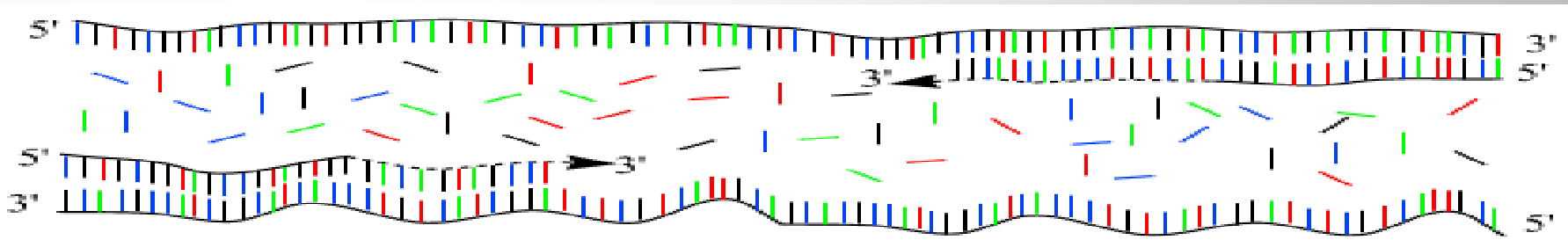
1ο Στάδιο: μετατροπή δίκλωνου DNA σε μονόκλωνο (92-95°C για ~30sec)



2ο Στάδιο: υβριδισμός των εκκινητικών μορίων (primers) στους αντίστοιχους κλώνους του DNA-στόχου (45-65°C, για 30sec-2min)



3ο Στάδιο: επέκταση εκκινητικών μορίων και δημιουργία θυγατρικού κλώνου (amplicon) (72°C, 30sec-2min)



Επανάληψη κάθε κύκλου 30-45 φορές → εκθετική αύξηση των amplicons
τελικός αριθμός → 2^n (όπου n, ο αριθμός των κύκλων της PCR)

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ

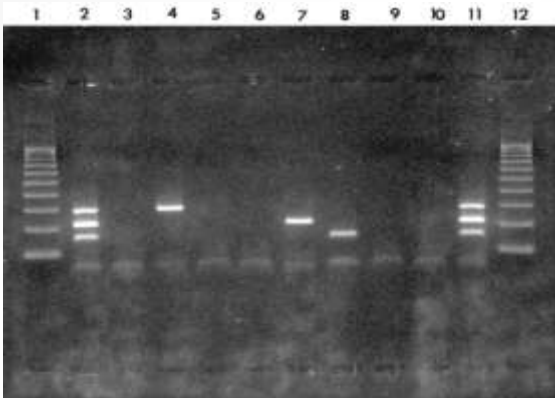
PCR 40 κύκλων με 1 μόνο μόριο DNA-στόχου στο κλινικό δείγμα:

$$2^{40} = 1.099.511.627.776 \text{ αντίγραφα}$$

(υποθέτοντας απόδοση PCR 100%)

Ανάγνωση Αποτελέσματος της PCR

- **Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης** (χαμηλή ευαισθησία, διαχωρισμός με βάση μόνο το μέγεθος, μη-ποσοτική και μη-αυτοματοποιημένη μέθοδος, χρονοβόρα διαδικασία, επιρρεπής σε επιμόλυνση)



Ανίχνευση HSV-1, VZV και εντεροϊών
σε δείγματα ENY

- 1, 12: Δείκτης MM
- 2, 11: (+) μάρτυρας
- 3: (-) μάρτυρας
- 5, 6, 9, 10: (-) κλινικά δείγματα
- 4: δείγμα HSV-1 (+)
- 7: δείγμα VZV (+)
- 8: δείγμα (+) για εντεροϊό

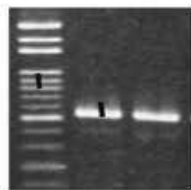
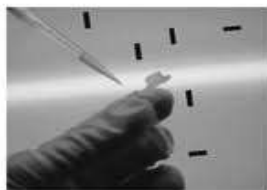
Τρία «Ενδογενή» Προβλήματα Μεθοδολογίας PCR

(1) Επιμόλυνση → ψευδώς (+) αποτέλεσμα (↓ Ειδικότητα)

- Διασπορά των amplicons στο χώρο του εργαστηρίου
- Πρόληψη: έμπειρο προσωπικό, ιδιαίτεροι χώροι και ροή κατεύθυνσης εργασίας, θάλαμοι κάθετης νηματικής ροής, γάντια, πιπέτες, tips, γλωρίνη, UV, χρήση παραγώγων ψωραλενίου, χρήση ενζυμικής μεθόδου (uracil-N-glycosylase)

Risks:

Vertical contamination (anterior amplification)



Horizontal contamination (carry-over)



Water and reagent's contamination



Neighboring contamination

Room 1
Vaccination

Room 2
PCR lab

Room 3
Bacterial
Culture

Same laboratory=
2 different teams



Managements:

Prevention

- Wearing gloves, caps and coats
- Use separate, dedicated, and controlled rooms
- Disinfection of working surfaces after each run with a bleach solution
- UV light to irradiate pipettes and working surfaces
- Uracil-DNA-glycosylase/dUTP use
- PCR performed in closed system

Detection

- Running one negative control for 5 samples

Prevention

- DNA extraction performed on automate
- PCR performed in a closed system

Detection

- Running one negative control for 5 samples
- Sequencing all amplicons

Prevention

- Aliquots of mix and primers
- Digestion with restriction enzymes

Detection

- Use mix as negative control
- Confirm PCR using a second gene

Prevention

- Communication and formation to be sure that the basic rules are applied

Detection

- Running one negative control for 5 samples

Τρία «Ενδογενή» Προβλήματα Μεθοδολογίας PCR

(1) Επιμόλυνση → ψευδώς (+) αποτέλεσμα (↓ Ειδικότητα)

(2) Αναστολή → ψευδώς (-) αποτέλεσμα (↓ Ευαισθησία)

- Ύπαρξη ουσιών στο κλινικό δείγμα που αναστέλλουν το ένζυμο
- Παραδείγματα: αιμοσφαιρίνη, ηπαρίνη, EDTA κ.α.
- Αναγνώριση αναστολής με χρήση **εσωτερικού μάρτυρα**
(ταυτόχρονος πολλαπλασιασμός στο ίδιο σωληνάριο ενός άλλου DNA-στόχου)

Real time PCR

- Η πιο πρόσφατη εξέλιξη της μεθοδολογίας

Χαρακτηριστικά:

- Ταχύτερη εναλλαγή της θερμοκρασίας
- Υπάρχουν ειδικοί DNA ανιχνευτές που υβριδίζονται με το προϊόν κατά την διάρκεια της αντίδρασης
- Οι ανιχνευτές είναι συνδεδεμένοι με φθορίζουσα χρωστική, η οποία φθορίζει μόνον σε περίπτωση υβριδισμού
- Η παραγωγή του προϊόντος του πολλαπλασιασμού καταγράφεται αυτόματα με συνεχή μέτρηση του φθορισμού

⇒ Η εξέταση χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη ακρίβεια

⇒ Το αποτέλεσμα παράγεται μέσα σε 30-45 min

⇒ Η τεχνική επιτρέπει και την ποσοτική ανίχνευση του στόχου

⇒ Δεν χρειάζονται περαιτέρω χειρισμοί (⇐ ελάττωση επιμόλυνσης)

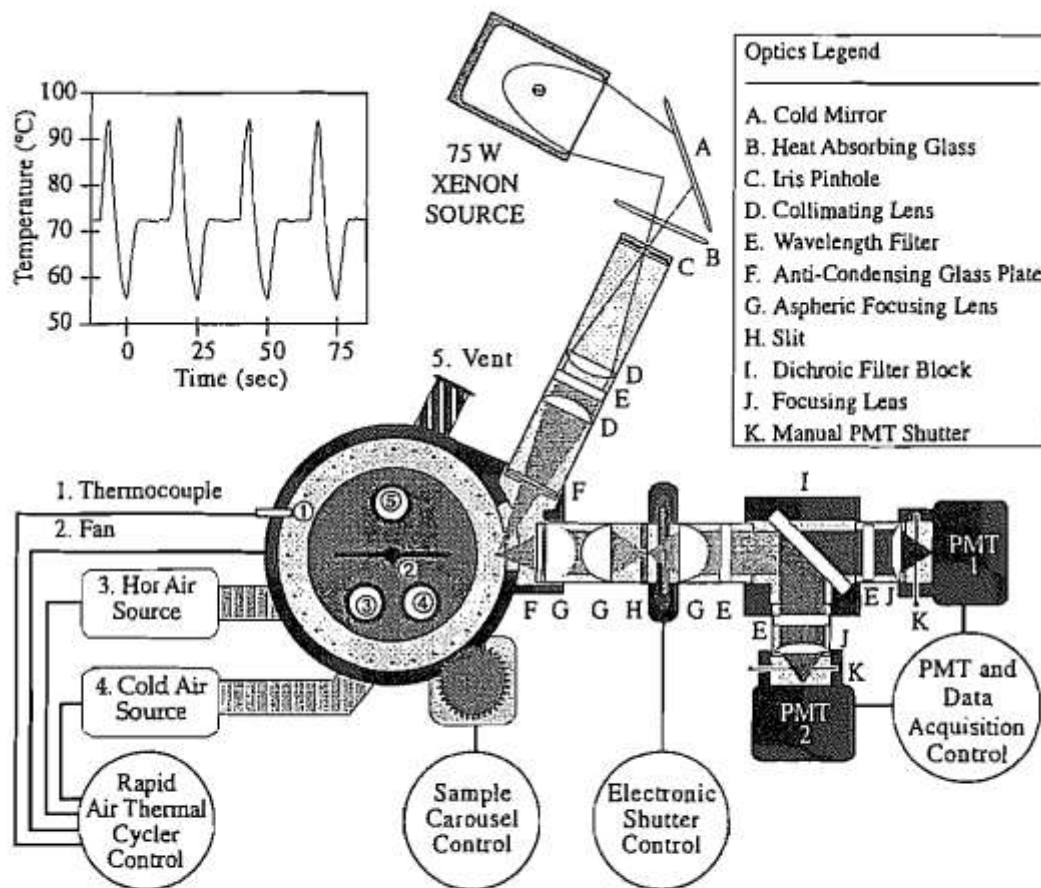


Figure 7 Prototype fluorescence rapid thermal cycler. Optical components are listed in the upper right legend and representative temperature cycles are diagrammed in the upper left graph. Samples are placed circumferentially around a cylindrical rapid air chamber. Continuous fluorescence monitoring is possible through optics adopted from flow cytometry (reprinted with permission from Wittwer *et al.*, 1997b).

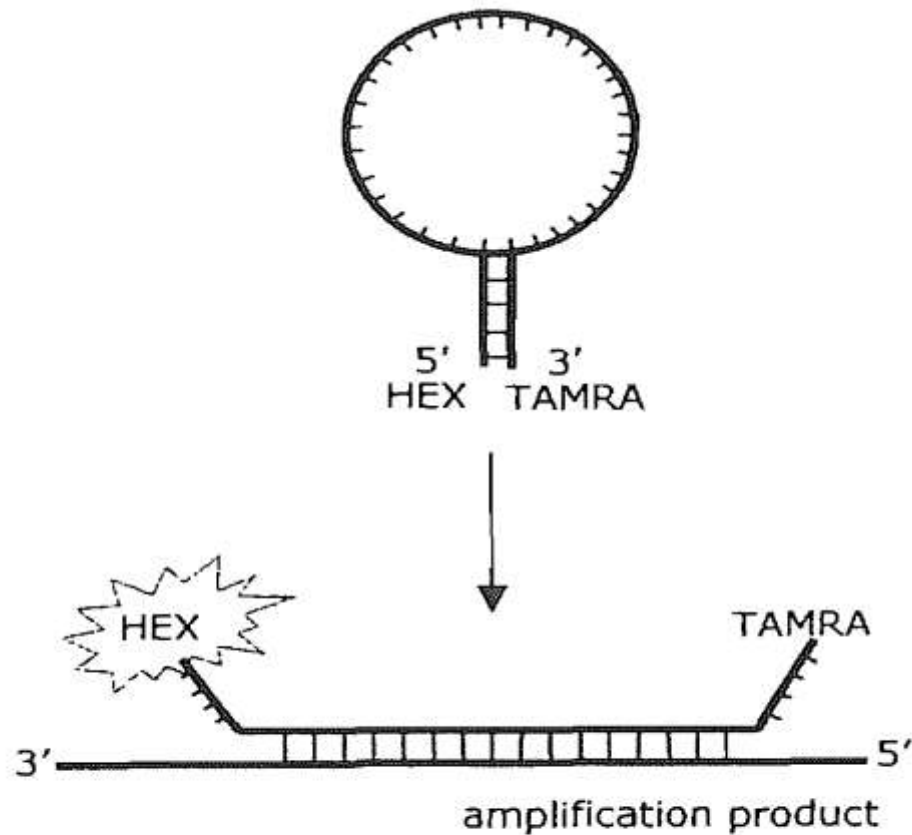


Figure 4. Molecular beacons. In this example, the fluorescence from the hexachlorofluorescein dye (HEX) on the molecular beacon is quenched by a rhodamine derivative dye (TAMRA) unless the ends of the probe are separated by the loop DNA annealing to the PCR amplification product.

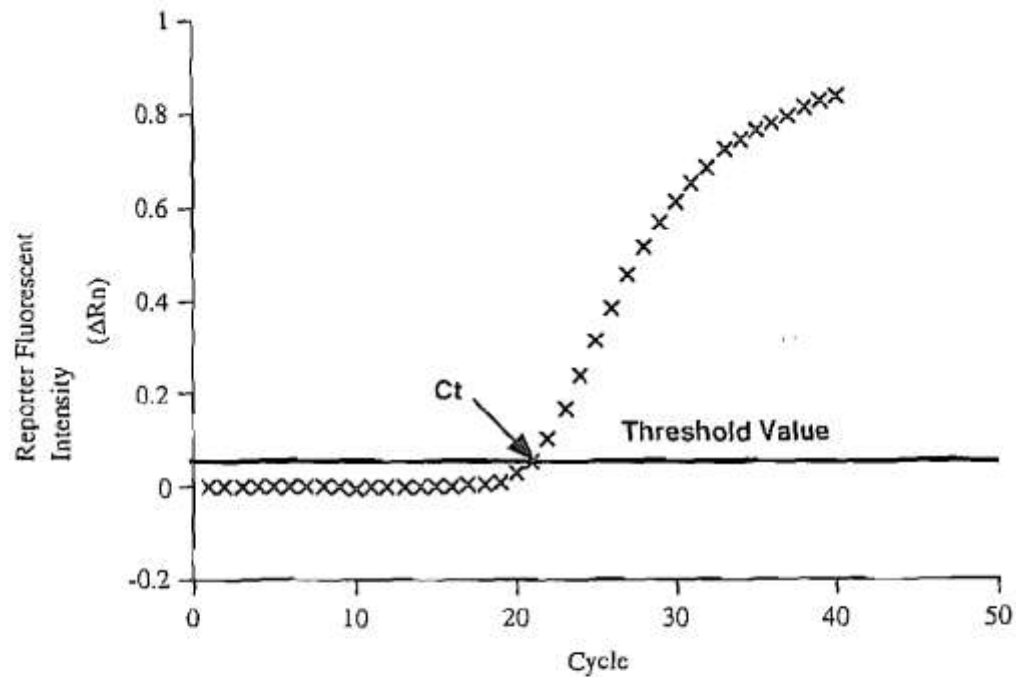


Figure 2 Amplification plot generated by Model 7700 Sequence Detector software. The fluorescent emission intensity is plotted on the y axis versus time (cycle numbers of PCR) on the x axis. A fluorescent threshold is calculated based on the fluorescent background of the initial cycles (generally cycles 3–15). The point at which the fluorescent intensity crosses the threshold is defined as C_t (i.e., threshold cycle). The C_t value is proportional to the starting target copy number (Heid *et al.*, 1996) and thus can be used as a quantitative comparison between samples. Lower C_t values correlate with greater target copies.

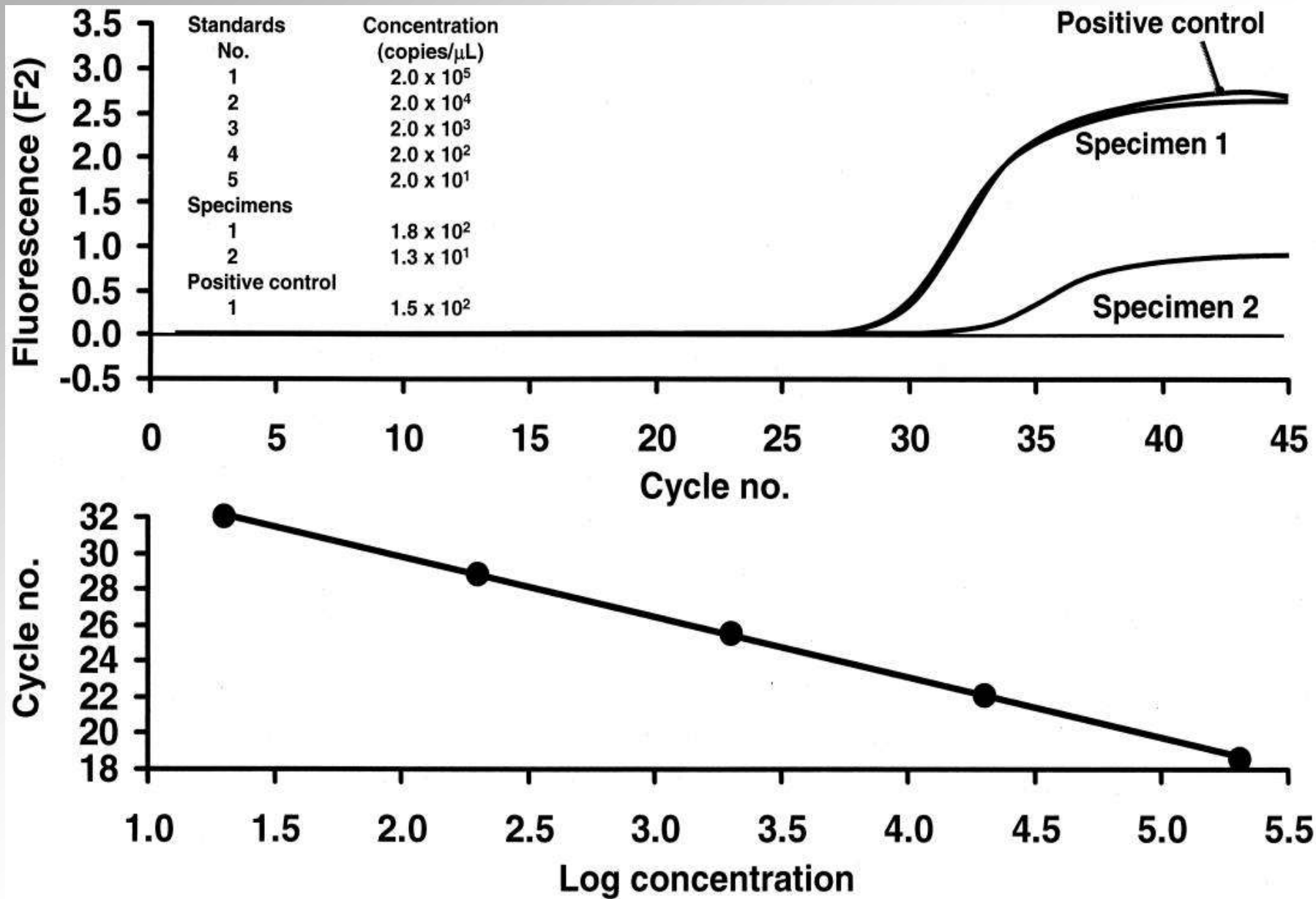


Figure 2. Real-time PCR amplification of commercial standards and specimens for the quantitative detection of cytomegalovirus DNA (*top*). Standard curve generated using known amounts of standard cytomegalovirus DNA relating log concentration to cycle number of amplification (*bottom*).

3. ΤΟ ΚΑΙΝΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ

Το Κλινικό Δείγμα

- το είδος του, η διαχείρισή του και η επεξεργασία του μέχρι να εξετασθεί → αποτελούν μία «ξεχωριστή» εξέταση
- η απόδοσή της θα επηρεάσει το τελικό αποτέλεσμα

Το Κλινικό Δείγμα

- Καθορισμός: κατάλληλο κλινικό δείγμα
- Καθορισμός: κατάλληλος τρόπος μεταφοράς στο εργαστήριο
- Καθορισμός: κατάλληλος τρόπος φύλαξης στο εργαστήριο

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ: Ανίχνευση ιικού φορτίου HIV-1

Κλινικό Δείγμα

- Πλάσμα (με αντιπηκτικό EDTA ή ηπαρίνη)
- Ογκος: ανάλογα με μέθοδο (0.2, 0.5, 1.0, 2.0ml)

Συνθήκες φύλαξης (πρόληψη αποδομής του RNA)

- Διαχωρισμός σε 4-6 ώρες
- Σταθερότητα στους 4⁰C για λίγες μέρες
- Αποθήκευση στους -70⁰C τουλάχιστον
- Σταθερότητα RNA: μόνο 3 κύκλοι κατάψυξης και απόψυξης

Επεξεργασία του Κλινικού Δείγματος

- **Στόχος** → εκχύλιση/απομόνωση του μικροβιακού DNA (ή RNA)
→ εξασφάλιση ακρίβειας και επαναληψιμότητας
- Μη βέλτιστη εκχύλιση: ψευδώς (-) αποτέλεσμα / ανακριβές φορτίο
- **Η μεθοδολογία πρέπει να περιλαμβάνει:**
 - χρήση **εσωτερικού μάρτυρα**
 - ↑↑ αυτοματοποίηση (συσκευές αυτόματης εκχύλισης)
- **Τρίτο Ενδογενές Πρόβλημα**

«Ενδογενή» Προβλήματα Μεθοδολογίας PCR

(3) Περιορισμοί Κλινικού Δείγματος

- **Μικρός Ογκος**

- Ανίχνευση ενός ιού (πχ CMV (Light Cycler, Roche) → **0.2 ml** πλάσματος → εκχύλιση DNA με απόδοση **0.035 ml** → εισαγωγή **0.01 ml** στην αντίδραση
- Παράδειγμα: **10-20 ml** σε ένα σετ αιμοκαλλιέργειας

- **Χαμηλό Μικροβιακό Φορτίο**

- Παράδειγμα: διάγνωση φυματιώδους μηνιγγίτιδας

→ **ψευδώς (-) αποτέλεσμα** (↓ Ευαισθησία)

Πρόβλημα: Χαμηλό Μικροβιακό Φορτίο Κλινικού Δείγματος

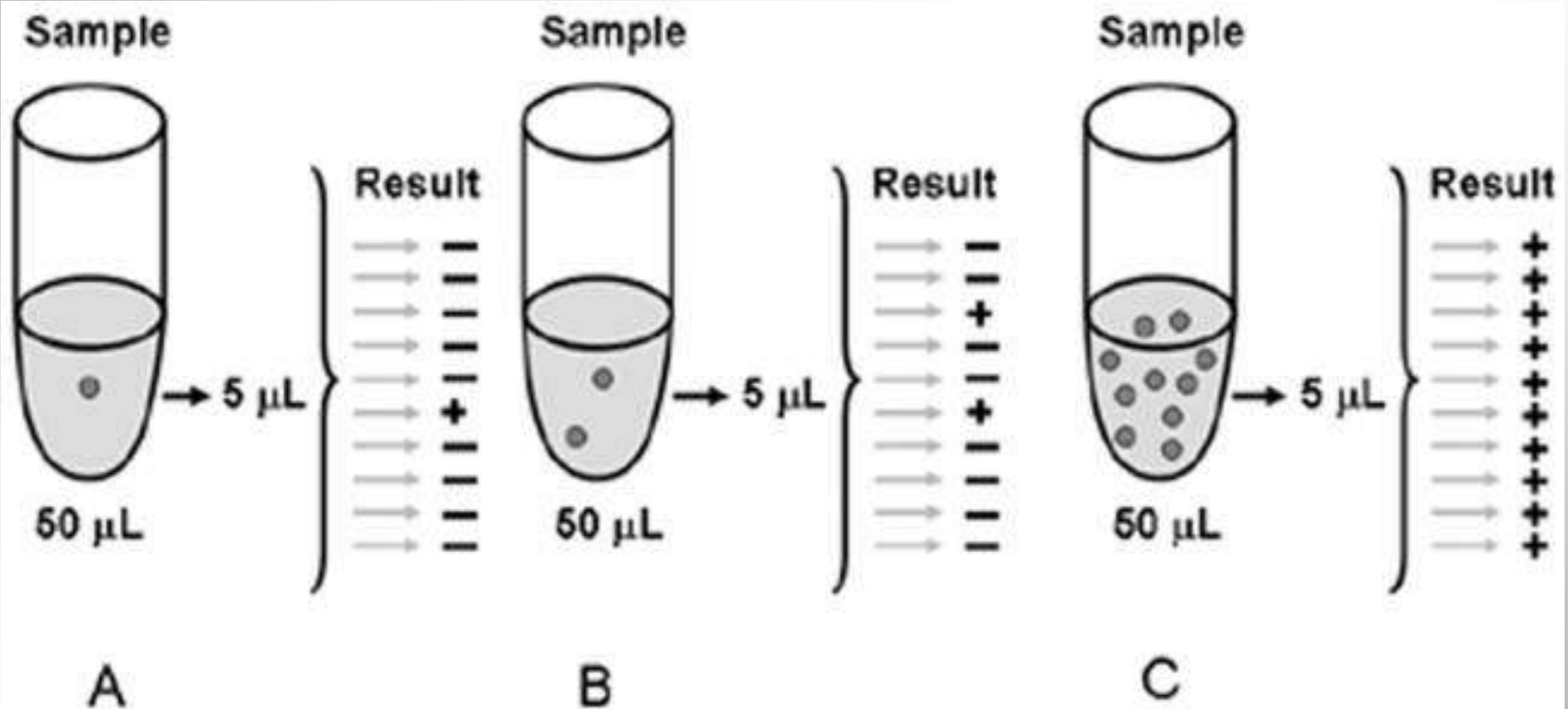


Figure 1. Illustration of sampling distribution of target nucleic acid and subsequent amplification by PCR

4. ANIXNEYΣH *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΒ

- **Λήψη Κατάλληλου Κλινικού Δείγματος**
 - 3 πρωινά δείγματα πτυέλων (τουλάχιστον)
 - 3 δείγματα γαστρικού υγρού
 - 3 δείγματα ούρων
 - μεγάλος όγκος ENY, BAL και άλλων υγρών
- **Ιδιαίτερη Επεξεργασία**
 - **διαλυτοποίηση, καταστροφή χλωρίδας και συμπύκνωση**
 - παγίδευση ΜβΦ σε βλέννη ← N-ακετυλο-κυστεΐνη
 - παρουσία φυσιολογική χλωρίδας ← NaOH
 - μεγάλος όγκος ← συμπύκνωση με φυγοκέντρηση

ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΒ

Οξεάντοχη Χρώση

* **Ziehl-Neelsen** (Kinyoun, Auramine)

- Εξέταση “ηλικίας” > 125 ετών

1ο βήμα: χρωματισμός με φουξίνη (κόκκινη) + θερμότητα

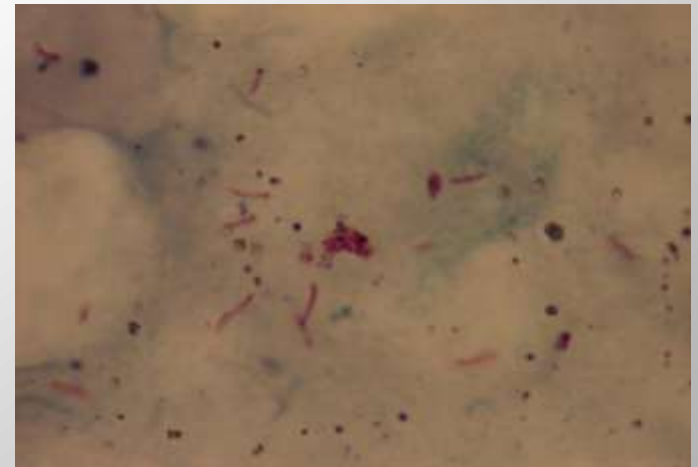
2ο βήμα: αποχρωματισμός με οξινομένη αλκοόλη

ΟΞΕΑΝΤΟΧΟ = ΔΕΝ ΑΠΟΧΡΩΜΑΤΙΖΕΤΑΙ

3ο βήμα: αντίθετη χρώση με μπλέ του μεθυλενίου

Πλεονεκτήματα

- Αποτέλεσμα εντός 24 ωρών
- Τεχνικά εύκολη
- Χαμηλό κόστος



Οξεάντοχη Χρώση

Μειονεκτήματα

- Πρόβλημα Ευαισθησίας

- αναλυτική Ευαισθησία: **10⁴ ΜυκοΒ/ml** πτυέλων
- διαγνωστική Ευαισθησία: 35-80%
- ↓↓ Ευαισθησίας → εξωπνευμονική ΤΒ, HIV(+), παιδιά

- Έλλειψη Ειδικότητας

- αναγνώριση γένους, όχι είδους
 - *M. tuberculosis* (ΠΑΘΟΓΟΝΟ) → *M. gordonae* (ΣΑΠΡΟΦΥΤΟ)

ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΒ

Καλλιέργεια και Ταυτοποίηση

- υγρά θρεπτικά υλικά αυτοματοποιημένων μεθόδων
- παρατεταμένος χρόνος επώασης (6 εβδομάδες)
- μέσος χρόνος ανίχνευσης: 9-14 ημέρες
- Ευαισθησία καλλιεργειών: 10-100 cfu/ml
- Φαινοτυπική ταυτοποίηση: αντικατάσταση από μοριακή

Έλεγχος Ευαισθησίας

- Αυτοματοποιημένες φαινοτυπικές μέθοδοι σε υγρό θρεπτικό υλικό
- SM (1.0 και 4.0 µg/ml), INH (0.1 και 0.4 µg/ml), RIF (1.0 µg/ml), EMB (5.0 και 7.5 µg/ml), PZA (100 µg/ml)
- Αποτελέσματα σε 8-10 ημέρες

**** ειδικοί χώροι υψηλής βιολογικής ασφάλειας**

ΕΡΩΤΗΜΑ

Άμεση Μοριακή Διάγνωση Φυματίωσης:

- ποιά μέθοδος είναι η καλύτερη ??

→ Βασική Διάκριση Μοριακών Εξετάσεων

- “In-house” Μέθοδοι
- Εμπορικές Μέθοδοι

Βασική Διάκριση Μοριακών Εξετάσεων

Μέθοδοι “In-house”

(α) Ανάπτυξη και Προτυποποίηση Μεθοδολογίας

- **Επιλογή:** βέλτιστο κλινικό δείγμα, μέθοδος λύσης κυττάρων, μέθοδος εκχύλισης του DNA, γονίδιο-στόχος, μέθοδος πολλαπλασιασμού νουκλεϊκών οξέων, μέθοδος ανίχνευσης αποτελέσματος, στρατηγική κατά της επιμόλυνσης και της αναστολής
- Ανάπτυξη εξέτασης
- Καθορισμός αναλυτικής Ευαισθησίας και Ειδικότητας
- Προτυποποίηση, Έλεγχος Ποιότητας, Επικύρωση

(β) Κλινική Μελέτη Αξιολόγησης

- Κλινική εφαρμογή
- Σύγκριση με πρότυπη μέθοδο διάγνωσης → ???
- Καθορισμός κλινικής Ευαισθησίας και Ειδικότητας

Βασική Διάκριση Μοριακών Εξετάσεων

Αξιόλογες Εμπορικές Μέθοδοι

- προτυποποιημένες
- αξιολογημένες στη διεθνή βιβλιογραφία (γνωστή απόδοση)
- πλήρης εξάρτηση από τον κατασκευαστή: “μενού” εξετάσεων / μεθοδολογία
- υψηλό κόστος

Παράδειγμα: Διάγνωση Φυματίωσης

- **Amplified MT Direct (AMTD)** (Gen-Probe)
 - ✓ 287 δημοσιεύσεις (Pubmed) → από 2/1994 – σήμερα
 - ✓ Κόστος 30-40 ευρώ / εξέταση
- **GeneXpert MTB/RIF Assay** (Cepheid)
 - ✓ 54 δημοσιεύσεις (Pubmed) → από 1/2010 – σήμερα
 - ✓ Κόστος 80-90 ευρώ / εξέταση

ΑΜΕΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΜΠΟΡΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

(1) **LCx MT Assay** (Abbott)

- Gap Ligase Chain Reaction (LCR), στόχος: DNA (Protein Antigen B)
- **η πιο φθηνή**

(2) **Amplified MT Direct (AMTD)** (Gen-Probe)

- Transcription - Mediated Amplification (TMA), στόχος: rRNA (**2×10^3 αντίγραφα**)
- **η πιο ευαίσθητη**

(3) **Amplicor MTB** (Roche)

- Polymerase Chain Reaction (PCR), στόχος : DNA (16S rRNA)
- **ανιχνεύει την αναστολή**

(4) **BDProbeTec ET** (Becton Dickinson)

- Strand Displacement Amplification (SDA), στόχος: DNA (IS6110, έως 25 αντίγραφα)
- **η ταχύτερη (αποτέλεσμα σε 1 ώρα)**
- **ανιχνεύει την αναστολή**

**** ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ

Sensitivity and Specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* : a blind comparison study among seven laboratories

GT Noordhoek et al. J. Clin. Microbiol. 1994; 33:277

- 200 «φυσιολογικά» δείγματα (πτύελα, σάλιο, νερό)
- τεχνητά επιμολυσμένα με *M. tuberculosis*
- διάφορες ποσότητες (10^3 , 10^4 ή 10^7 κύτταρα), ή καθόλου
- αποστολή δειγμάτων σε διαγνωστικά εργαστήρια
- εφαρμογή ποικιλίας εξετάσεων (in-house \Leftrightarrow εμπορικές, ίδιες \Leftrightarrow διαφορετικές)

\Rightarrow Ποιά δείγματα είναι θετικά ?

\Rightarrow Ποιά δείγματα είναι αρνητικά ?

**Sensitivity and Specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*:
a blind comparison study among seven laboratories**

GT Noordhoek et al. J. Clin. Microbiol. 1994; 33:277

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μέση Ευαισθησία

- δείγματα με 10^3 κύτταρα: 54% (εύρος 2-90%)
- δείγματα με 10^4 κύτταρα : 70% (εύρος 20-100%)
- δείγματα με 10^7 κύτταρα : 98% (εύρος 90-100%)

Ειδικότητα

- Εύρος: 80-97% (σε ένα εργαστήριο: 23%)

**Sensitivity and Specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*:
a blind comparison study among seven laboratories**

GT Noordhoek et al. J. Clin. Microbiol. 1994; 33:277

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Ποιά μέθοδος είναι η καλύτερη ?

- υπάρχουν πολλές αξιόλογες μέθοδοι (είτε εμπορικές, είτε in-house)
- η απόδοση του Εργαστηρίου αποδεικνύεται σημαντικότερη
- προσαρμογή του Εργαστηρίου στην νέα τεχνολογία
- έλεγχος απόδοσης του Εργαστηρίου
- Εξωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

ΕΡΩΤΗΜΑ

Άμεση Μοριακή Διάγνωση Φυματίωσης:

- σε ποιούς ασθενείς ενδείκνυται να εφαρμόζεται ??**

Το θεώρημα του Bayes

(και η επίδρασή του στα αποτελέσματα της διάγνωσης της
φυματίωσης με PCR)

$$C = \frac{(D \times A)}{(D \times A) + (1 - D) (1 - B)}$$

A: Ευαισθησία, B: Ειδικότητα

C: **Θετική Προγνωστική Αξία (ΘΠΑ)**

D: **Συχνότητα Νόσου**

ΥΠΟΘΕΣΗ

- **μοριακό τεστ διάγνωσης TB: → Ευαισθησία 99%, Ειδικότητα 99% (!!!)**
- με συχνότητα νόσου 1%: ΘΠΑ 50%
- με συχνότητα νόσου 10%: ΘΠΑ 91%
- με συχνότητα νόσου 20%: ΘΠΑ 96%

The Role of Clinical Suspicion in Evaluating a New Diagnostic Test for Active Tuberculosis

Results of a Multicenter Prospective Trial

(A. Catanzaro et al, JAMA, 2000, 283, 639)

- 338 ασθενείς με πιθανή πνευμονική φυματίωση
- Δείγματα Αναπνευστικού → Gen-Probe AMTD [το πιο ευαίσθητο test]
- Κατάταξη ασθενών ανάλογα με κλινική υπόνοια Φυματίωσης

PATIENTS	TB%	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
Low Risk (n=224)	5%	83%	97%	59%	100%
Intermediate Risk (n=68)	29%	75%	100%	100%	91%
High Risk (n=46)	87%	87%	100%	100%	55%
All patients (n=338)	21%	83%	97%	88%	95%

5. ANIXNEYΣH *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

Η σιωπηρή επιδημία: *Chlamydia trachomatis*

- Το συχνότερο σεξουαλικά μεταδιδόμενο νόσημα
 - 2.447/100.000 γυναίκες ηλικίας 20-24 ετών (CDC, 2001)
 - Κλινική εικόνα: από ήπια ουρηθρίτιδα έως σαλπινγίτιδα
 - Αλλά, η πλειοψηφία χωρίς συμπτωματολογία → απαιτείται έλεγχος για αναγνώριση της λοίμωξης και θεραπεία
 - Χωρίς θεραπεία: έως 40% των γυναικών εμφανίζει φλεγμονώδη νόσο της πυέλου (η πλειοψηφία χωρίς σημαντική συμπτωματολογία)
 - Σοβαρές συνέπειες: 20% στέρωση, 9% έκτοπη κύηση
- ⇒ Υποχρεωτικά δηλούμενο νόσημα (και στην Ελλάδα)
- ⇒ Κρατικά προγράμματα ελέγχου → ανίχνευση ασυμπτωματικής λοίμωξης → θεραπεία → διακοπή μετάδοσης

Η σιωπηρή επιδημία: *Chlamydia trachomatis*

«Συμβατική» Εργαστηριακή Διάγνωση

- Ανάπτυξη: μόνο σε κυτταροκαλλιέργειες
- Αρχικά: μοναδική μέθοδος διάγνωσης (ευαισθησία 65%)
(δύσκολη, μη προτυποποιημένη μέθοδος, καθώς και χρονοβόρα)
- Άμεση ανίχνευση αντιγόνων στο κλινικό δείγμα
→ μεγαλύτερη ευαισθησία, πρόβλημα ειδικότητας

- **1993: από τις πρώτες εμπορικές εφαρμογές μοριακής διάγνωσης**
- **Αποτελεί πλέον το νέο «χρυσό πρότυπο» διάγνωσης**
- ανίχνευση περισσότερων θετικών αποτελεσμάτων (κατά 20-30%)
- εξαιρετική Ειδικότητα
- Επιπλέον, «ευκολότερη» λήψη κλινικού δείγματος:
 - ούρα (άνδρες και γυναίκες), κολπικό (λήψη από την γυναίκα)
- **Σύγκριση με συνδυασμό εξετάσεων:**
[καλλιέργεια + ανίχνευση αντιγόνου + άλλη μέθοδο PCR]

Chlamydia trachomatis: Μεθοδολογία Μοριακής Διάγνωσης

- **Amplicor PCR Chlamydia assay**, Roche Diagnostics Systems
- **LCx Chlamydia assay**, Abbott Laboratories
- **BDProbeTec ET System C. trachomatis assay**, Becton Dickinson
- **APTIMA C. trachomatis (ACT)**, Gen-Probe (στόχος: αλληλουχία rRNA)
- **APTIMA COMBO 2 (AC2)**, Gen-Probe (στόχος: διαφορετική αλληλουχία rRNA)

- **Εξαιρετικά πετυχημένες εξετάσεις για περίπου 8 χρόνια**

Chlamydia trachomatis:

Προβλήματα Μοριακής Μεθοδολογίας Διάγνωσης ??

- Η ευρεία εφαρμογή των μεθόδων ανέδειξε πιθανό πρόβλημα ειδικότητας
- Θετικά αποτελέσματα δεν μπορούσαν να αναπαραχθούν

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ

Reproducibility problems with the AMPLICOR PCR *Chlamydia trachomatis* test

Peterson E et al, J Clin Microbiol 1997, 35; 957

Reproducibility problems with the Abbott Laboratories LCx assay for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*

Gronowski A et al, J Clin Microbiol 2000, 38;2416

Accuracy of results obtained by performing a second ligase chain reaction assay and PCR analysis on urine samples with positive or near-cutoff results in the LCx test for *Chlamydia trachomatis*

Castriciano S et al, J Clin Microbiol 2002, 40;2632

Reproducibility of positive test results in the BDProbeTec ET System for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*

Culler E et al, J Clin Microbiol 2003, 41;3911

Πιθανά Αίτια Ψευδώς (+) Αποτελεσμάτων

⇒ Επιμόλυνση, **χαμηλό βακτηριακό φορτίο στο κλινικό δείγμα, απώλεια του DNA κατά την διαδικασία εκχύλισης**, εργαστηριακό σφάλμα ή κακή τεχνική, προβληματικές παρτίδες αντιδραστηρίων (Abbott), ανεπαρκής Έλεγχος Ποιότητας ???

ΟΔΗΓΙΕΣ CDC (MMWR 2002)

- Όταν ΘΠΑ < 90% → Εφαρμογή επιβεβαιωτικής εξέτασης στα θετικά αποτελέσματα
- Σύσταση διαφόρων στρατηγικών αντιμετώπισης
 - Εξέταση του **ίδιου δείγματος** χρησιμοποιώντας την **ίδια μέθοδο**
 - Εξέταση του **ίδιου δείγματος** χρησιμοποιώντας **άλλη μέθοδο** που πολλαπλασιάζει διαφορετικό γονίδιο-στόχο
 - Εξέταση **άλλου δείγματος** χρησιμοποιώντας **άλλη μέθοδο** που πολλαπλασιάζει διαφορετικό γονίδιο-στόχο

Confirming positive results of nucleic acid amplification tests (NAATS) for *Chlamydia trachomatis*:

all NAATS are not created equal

Schachter J et al, J. Clin Microbiol 2005, 43; 1372

- 1.465 γυναίκες (1 δείγμα ούρων και 2 τραχηλικά)
- 1.322 άνδρες (1 δείγμα ούρων και 2 ουρηθρικά)
- Όλα τα δείγματα εξετάσθηκαν με 3 «διαφορετικές» μεθόδους:
 - BDProbeTec ET System *C. trachomatis* (Becton Dickinson) → **BD**
 - APTIMA *C. trachomatis* (Gen-Probe) → **ACT**
 - APTIMA COMBO 2 (Gen-Probe) → **AC2**

**Confirming positive results of nucleic acid amplification tests (NAATS) for
Chlamydia trachomatis: all NAATS are not created equal**

Schachter J et al, J Clin Microbiol 2005, 43; 1372

Αρχική μέθοδος εξέτασης	Επιβεβαιωτική μέθοδος	Αριθμός εξετασθέντων και % θετικοί
AC2		850
	ACT	98.1%
	BD	82.0%
ACT		927
	AC2	89.8%
	BD	75.1%
BD		720
	AC2	96.9%
	ACT	96.9%

⇒ Είναι η λιγότερο «ευαίσθητη» μέθοδος στην πραγματικότητα
περισσότερο «ειδική» ???

ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΣΤΙΣ ΟΔΗΓΙΕΣ ΤΟΥ CDC

⇒ Για την επιβεβαίωση των θετικών αποτελεσμάτων μίας μοριακής μεθόδου μπορούν να εφαρμοσθούν μόνο μέθοδοι με παρόμοια ευαισθησία

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: **Μοριακή διάγνωση *C. trachomatis***

- «Χρυσό πρότυπο» διάγνωσης (αξιόλογη ευαισθησία και ειδικότητα)
- Βελτίωση τεχνικής: αυτοματοποιημένη εκχύλιση
- Βελτίωση Ελέγχου Ποιότητας
- Επαγρύπνηση για την εξασφάλιση της καλής απόδοσης της μεθόδου

6. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ HSV

Διάγνωση λοίμωξης από HSV-1 και HSV-2

Η PCR ως πρότυπη μέθοδος διάγνωσης ?

Συμβατική Εργαστηριακή Μεθοδολογία

- Κυτταροκαλλιέργειες (βέλτιστη μέθοδος διάγνωσης βλαβών δέρματος/βλεννογόνων)
- Ανίχνευση αντιγόνου
- Ανίχνευση αντισωμάτων

Ανεπαρκής διάγνωση λοίμωξης ΚΝΣ (μέχρι τό 1995)

- Ευαισθησία κυτταροκαλλιεργειών ENY < 10%
- Πρότυπη μέθοδος διάγνωσης:

Βιοψία εγκεφάλου → κυτταροκαλλιέργειες → απομόνωση ιού

Diagnosis of herpes simplex encephalitis: application of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain-biopsied patients and correlation with disease

National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group

Lakeman FD, Whitley RJ. J. Infect. Dis. 1995; 171:857-863

- 54 ασθενείς με βέβαιη HSV-λοίμωξη (θετική καλλιέργεια βιοψίας εγκεφάλου)
- 47 αρνητικοί μάρτυρες

- «απλή» επεξεργασία ENY (βράσιμο – φυγοκέντρωση)
- εφαρμογή **2 μεθόδων «απλής» PCR** (για επιβεβαίωση αποτελεσμάτων)
- γονίδια-στόχοι: **glycoprotein B** και **DNA polymerase** (ίδια ευαισθησία)

- 53/54 (98%) ασθενείς με (+) βιοψία → (+) PCR στο ENY
- 3/47 (6%) ασθενείς με (-) βιοψία → (+) PCR στο ENY
- στην πραγματικότητα και οι 3 ασθενείς → πιθανότατα αληθώς (+)

Νέα πρότυπη μέθοδος HSV διάγνωσης: εξέταση ENY με PCR

Polymerase Chain Reaction for Detection of Herpes Simplex Virus (HSV) DNA on Mucosal Surfaces: Comparison with HSV Isolation in Cell Culture

Wald A et al, J Infect Dis 2003, 188:1345

- **296 άτομα με γνωστή λοίμωξη γεννητικού**
- Λήψη κλινικού δείγματος (\pm βλάβη) με ζεύγος στείλεων
 - άνδρες: πέος, περιπρωκτική περιοχή
 - γυναίκες: τράχηλος/κόλπος, αιδοίο, περιπρωκτική περιοχή
- **Κυτταροκαλλιέργειες**
- Εκχύλιση DNA: Quiagen
- Πολλαπλασιασμός: **ποσοτική in-house Real Time PCR** (glycoprotein B)
- Θετικό Δείγμα: > 500 αντίγραφα HSV DNA / δείγμα (1ml)
- Πέντε Αρνητικοί Μάρτυρες (βέβαιη μη-λοίμωξη από HSV)
- **Διάρκεια μελέτης: 6 χρόνια**

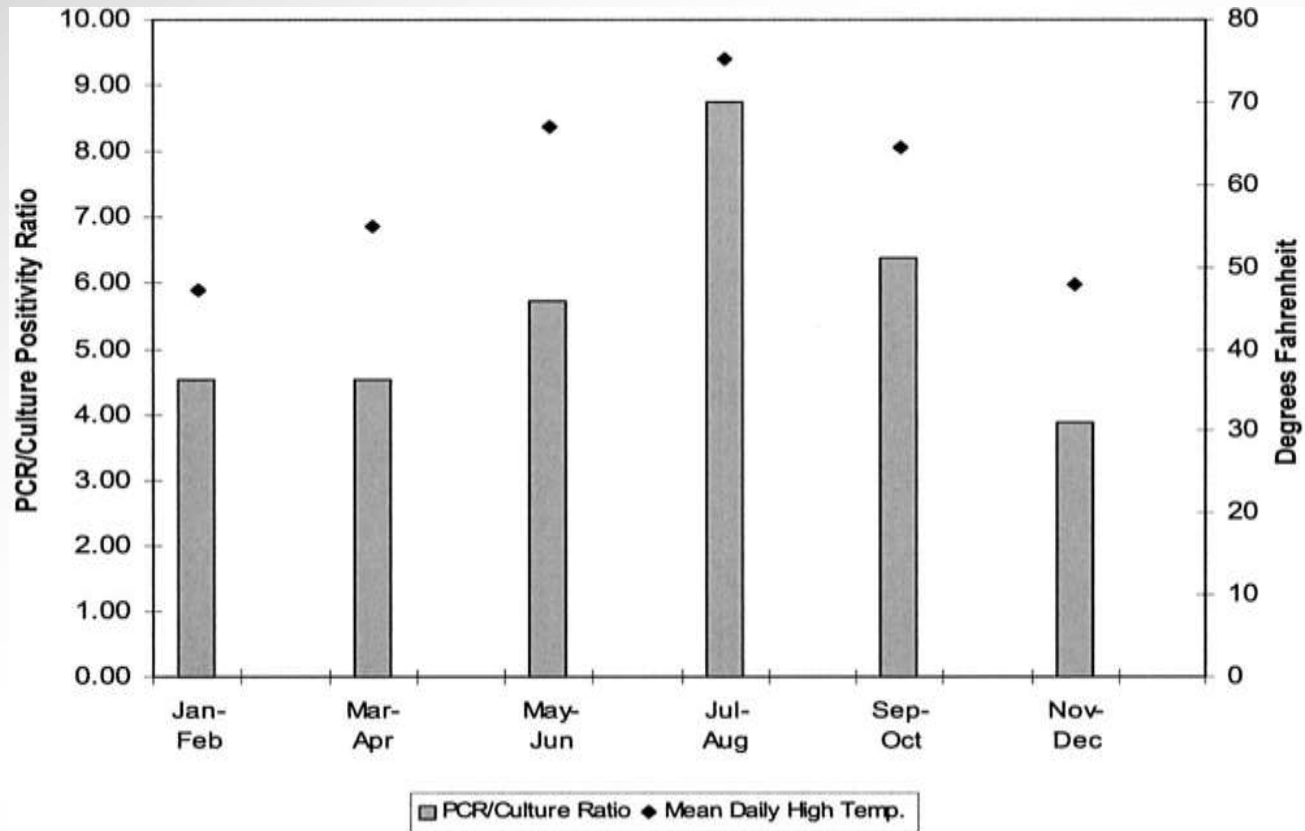
Polymerase Chain Reaction for Detection of Herpes Simplex Virus (HSV) DNA on Mucosal Surfaces: Comparison with HSV Isolation in Cell Culture

Wald A et al, *J Infect Dis* 2003, 188:1345

	Total	Positive by PCR	Positive by culture	Positivity ratio	Mean copies of HSV DNA, log
Sex					
Men	25,497	2636 (10%)	664 (2.6%)	4.0	4.6
Women	10,974	1779 (16%)	423 (3.9%)	4.2	4.5
Lesions					
Present	4,670	1735 (37%)	559 (12%)	3.1	4.9
Absent	31,801	2680 (8.4%)	528 (1.7%)	5.1	4.4
HIV status					
Negative	16,669	1818 (11%)	447 (2.7%)	4.1	4.5
Positive	19,802	2597 (13%)	640 (3.2%)	4.1	4.6
Overall	36,471	4415 (12%)	1087 (3.0%)	4.1	4.6

Polymerase Chain Reaction for Detection of Herpes Simplex Virus (HSV) DNA on Mucosal Surfaces: Comparison with HSV Isolation in Cell Culture

Wald A et al, *J Infect Dis* 2003, 188:1345



**An international external quality assessment of nucleic acid
amplification of herpes simplex virus**

Schloss L et al., J Clin Virol 2003, 28:175

HSV: Εξωτερικός Έλεγχος Ποιότητας

European Union Quality Control Concerted Action (QCCA)

Έτος 1999 → 68 εργαστήρια, panel (1) με 12 δείγματα

Έτος 2000 → 73 εργαστήρια, panel (2) με 12 δείγματα

Θετικά δείγματα → **συγκέντρωση 2×10^2 έως 4×10^7 αντίγραφα / ml**

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ → μεγάλη δυνατότητα βελτίωσης

Δείγμα	Ιός	Αριθμός Αντιγράφων/ml	Panel 1 (n=76) Αριθμός Ορθών Αποτελεσμάτων	Panel 2 (n=78) Αριθμός Ορθών Αποτελεσμάτων
1	αρνητικό	αρνητικό	74 (97.4%)	74 (94.9%)
2	αρνητικό	αρνητικό	71 (93.4%)	72 (92.3%)
3	VZV	αρνητικό	72 (94.7%)	74 (94.9%)
4	HSV-1	2-6 x 10 ⁷	-	77 (98.7%)
5	HSV-1	2-6 x 10 ⁵	72 (94.7%)	78 (100%)
6	HSV-1	2-6 x 10 ⁴	67 (88.2%)	-
7	HSV-1	2-6 x 10 ³	63 (82.9%)	68 (87.2%)
8	HSV-1	0.7-2 x 10 ³	52 (68.4%)	54 (69.2%)
9	HSV-1	2-6 x 10 ²	42 (55.3%)	40 (51.3%)
10	HSV-2	2-7 x 10 ⁶	73 (96.1%)	78 (100%)
11	HSV-2	2-7 x 10 ⁵	67 (88.2%)	76 (97.4%)
12	HSV-2	2-7 x 10 ⁴	61 (80.3%)	-
13	HSV-2	2-7 x 10 ³	37 (48.7%)	67 (85.9%)
14	HSV-2	2-7 x 10 ²	-	44 (56.4%)

7. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΛΛΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ

Μηνιγγίτιδα από Εντεροϊούς

Mann K et al. Meningitis. Pediatr Rev 2008; 29:417-30

«Η εξέταση για εντεροϊούς με PCR αποτελεί πλέον εξέταση ρουτίνας στα περισσότερα παιδιατρικά νοσοκομεία»

- Ramers C et al. Impact of a diagnostic cerebrospinal fluid enterovirus polymerase chain reaction test on patient management. JAMA 2000; 283: 2680
- Nigrovic L et al. Cost analysis of enteroviral polymerase chain reaction in infants with fever and cerebrospinal fluid pleocytosis. Arch Pediatr Adolesc Med 2000; 154: 817
- Archimbaud C et al. Impact of rapid enterovirus molecular diagnosis on the management of infants, children, and adults with aseptic meningitis. J Med Virol 2009; 81: 42

Impact of a Diagnostic Cerebrospinal Fluid Enterovirus Polymerase Chain Reaction Test on Patient Management

Ramers C et al. JAMA 2000;283:2680-2685

Table 2. Comparison of Clinical Parameters of Patient Groups With Enterovirus (EV) Polymerase Chain Reaction (PCR) Test Results Available Before Discharge

	EV-Negative	EV-Positive	P Value
Length of stay			
No. of patients	92	95	<.001
Median, h	71.5	42	<.001
Time from PCR test to discharge			
No. of patients	92	95	.005
Median, h	27.4	5.2	
Step-down unit stay			
No. of patients	34	18	.005
Median, d/patient	3	2	
No. (%) of patients who received computed tomographic scan or magnetic resonance imaging	33 (35.9)	9 (9.5)	<.001
No. (%) of patients who received a chest or abdominal x-ray film	51 (55.4)	18 (18.9)	<.001
No. (%) of patients who received an electroencephalogram	18 (19.6)	1 (1.1)	<.001
Intravenous antibiotics			
No. of patients	82	84	<.001
Median, d/patient	3.5	2	

Routine cerebrospinal fluid Enterovirus polymerase chain reaction testing **reduces hospitalization and antibiotic use** for infants **90 days of age or younger**

King RL et al. Pediatrics 2007;120:489-496

ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ

- **Αυτοματοποιημένη εκχύλιση RNA** από ENY (MagNAPure LC, Roche)
- Ποιοτική **in-house Real Time PCR** (ABI Prism 7000; Applied Biosystems)
- (+) και (-) Μάρτυρας → **παράλληλη εξέταση με κλινικά δείγματα (συμπεριλαμβανόμενης της εκχύλισης)**
- Ταυτόχρονος πολλαπλασιασμός γονιδίου αλβουμίνης → **αποκλεισμός ανεπαρκούς εκχύλισης νουκλεϊκών οξέων, αποκλεισμός αναστολής**
- **Μέσος Χρόνος Λήψης Αποτελεσμάτων** → **23 ώρες (εύρος 17-30 ώρες)**

ΑΜΕΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Σχόλιο: Χρόνος Λήψης Αποτελεσμάτων (ΧΛΑ)

- ο ΧΛΑ αντιστοιχεί μόνο σε λίγες ώρες
 - ωστόσο, ο χρόνος διενέργειας της εξέτασης αποτελεί συνάρτηση του αριθμού των δειγμάτων
 - η «οικονομική» διαχείριση της εξέτασης επιμηκύνει αναγκαστικά τον ΧΛΑ
- ⇒ Διενέργεια εξετάσεων **σε εξειδικευμένα κέντρα** (τεχνογνωσία) που δέχονται **μεγάλο αριθμό δειγμάτων** (ελάττωση ΧΛΑ)

Ανίχνευση και Προσδιορισμός Ιικού Φορτίου

- Πεδίο στο οποίο οι εμπορικές μοριακές τεχνικές έχουν διαπρέψει και εξακολουθούν να βελτιώνονται
- Human Immunodeficiency virus (HIV)
- Hepatitis C virus (HCV)
- Hepatitis B virus (HBV)
- Cytomegalovirus (CMV)

HIV-1: Προσδιορισμός του ιικού φορτίου

- Η πρώτη ποσοτική μοριακή μέθοδος με αποδεδειγμένη κλινική χρησιμότητα → καθορισμός θεραπευτικής αντιμετώπισης των ασθενών και πρόγνωσης
- Η αξιολογή μεθοδολογία και η διαθεσιμότητα δραστικής φαρμακευτικής αγωγής → ανάπτυξη και άλλων εξετάσεων προσδιορισμού ιικού φορτίου

Νεότερες Μέθοδοι Προσδιορισμού Φορτίου HIV-1

- **Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 (version 2)**
 - εύρος **20 - 10⁷ αντίγραφα/ml**
- **Abbott RealTime HIV-1 (m2000sp, m2000rt)**
 - εύρος **40 - 10⁷ αντίγραφα/ml**
- **Versant HIV-1 RNA 1.0 kinetic PCR**
 - εύρος **35 - 10⁷ αντίγραφα/ml**

Detection of Respiratory Viruses by Molecular Methods

Mahony M. Clin. Microbiol Rev 2008, 21; 716-747

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ (πιθανών) ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ:

- influenza A, B viruses, parainfluenza viruses types 1,2,3, respiratory syncytial virus, adenovirus, rhinovirus
- coronavirus, bocavirus, enterovirus, parainfluenza virus type 4, parvovirus types 4,5, mimivirus
- avian influenza viruses, human metapneumovirus, severe acute respiratory syndrome coronavirus

8. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΟΧΗΣ

Rapid detection of antimicrobial-resistant organism carriage: **an unmet clinical need**

Diekema DJ et al, J Clin Microbiol 2004, 42:2879

Οι Μηχανισμοί Αντοχής των Βακτηρίων είναι Περίπλοκοι

- Ωστόσο, σε συγκεκριμένες περιπτώσεις, η αντοχή οφείλεται στην ύπαρξη ενός γονιδίου
- Όχι μόνο είναι δυνατή η μοριακή τους ανίχνευση, αλλά αποτελούν και την πρότυπη μέθοδο διάγνωσης
- **Μεγάλη κλινική χρησιμότητα → άμεση ανίχνευση αντοχής στο κλινικό δείγμα → διάγνωση φορίας**

Αντιδραστήρια: **GeneOhm** (BD Diagnostics) και **Xpert** (Cepheid)

- Real Time PCR (έλεγχος αναστολής με εσωτερικό μάρτυρα)
- Χρόνος Λήψης Αποτελεσμάτων: 1.5 - 4.4 ώρες (και όχι ημέρες)

Ανίχνευση Φορίας Ανθεκτικών Βακτηρίων

1. **Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*** (MRSA)

- ρινική φορία → απομόνωση ασθενούς
- ταυτόχρονη ανίχνευση *S. aureus* και *mecA*

2. **Vancomycin Resistant *Enterococcus*** (VRE)

- φορία γαστρεντερικού → απομόνωση ασθενούς
- ανίχνευση γονιδίων *vanA* και *vanB*

Νοσοκομείο “Αττικών”

Καλλιέργειες για Μυκοβακτηρίδια

Νοσ. “Απτικών”: Καλλιέργειες για Μυκοβακτηρίδια (2007 - 2011)

Είδος δείγματος	Αριθμός δειγμάτων	Καλλιέργεια (+) MB	Καλλιέργεια (+) <i>M. tuberculosis</i>	Καλλιέργεια (+) “άτυπα”
Κατώτερο Αναπνευστικό (πτύελα, βρογχικές εκκρίσεις, BAL)	5.462	352 (6.5%)	223 (4.1%)	129
Αίμα/μυελός	1.013	10 (1.0%)	3 (0.3%)	7 (0.7%)
Πλευριτικό Υγρό	642	11 (1.7%)	11 (1.7%)	-
Ούρα	584	9 (1.5%)	8 (1.4%)	1
Γαστρικό υγρό	427	54 (12.7%)	44 (10.3%)	10
Πύον	209	50 (24.0%)	43 (20.6%)	7
ΕΝΥ	198	1 (0.5%)	1 (0.5%)	-
Ιστοί	140	13 (9.3%)	11 (7.9%)	2
Ασκιτικό Υγρό	108	4 (3.7%)	3 (2.8%)	1
Αρθρικό, περικαρδιακό, περιτοναϊκό υγρό	54	-	-	-
Άλλα δείγματα	17	-	-	-
ΣΥΝΟΛΟ	8.854	504 (5.7%)	347 (3.9%)	157 (1.8%)

Νοσοκομείο “Αττικών”

- Άμεση μοριακή διάγνωση **ΜΟΝΟ** σε δείγματα με (+) Οξ. Χρώση
- **ΑΛΛΑ**, στα δείγματα αυτά → και άμεση μοριακή διάγνωση αντοχής
→ ισονιαζίδη (INH) και ριφαμπικίνη (RIF)
- Από τις πολυτιμότερες μοριακές εξετάσεις

Στελέχη MDR (MultiDrug Resistant)

- Ταυτόχρονα R-σε INH και RIF
- 3.3% όλων των νέων περιστατικών Φυματίωσης (2009, WHO)
- Υψηλότερο ποσοστό (28%) σε χώρες πρώην Σοβιετικής Ενωσης

Στελέχη XDR (Extensively Drug Resistant)

- MDR + R-κινολόνες + R-σε 1 τουλάχιστον δευτερεύον ενέσιμο
(καπρομομκίνη, καναμυκίνη ή αμικασίνη)

Κλιματοθεραπεία Φυματίωσης



Στελέχη **MTB RIF-R** :

Μεταλλάξεις που εντοπίζονται στην 81-bp “core region” του γονιδίου *rpoB*

→ 95% όλων των RIF-R στελεχών

Στελέχη **MTB INH-R**:

Μεταλλάξεις που εντοπίζονται σε διάφορα γονίδια και περιοχές

→ 50-95% μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 315 του γονιδίου *katG*

→ 20-35% μεταλλάξεις στην ρυθμιστική περιοχή του *inhA*

→ 10-15% μεταλλάξεις στην ρυθμιστική περιοχή *ahpC-oxyR*

(± *katG* μεταλλάξεις εκτός του κωδικόνιου 315)

ΕΜΠΟΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

(1) **Inno-Lipa Rif TB** (Innogenetics): ανίχνευση αντοχής σε RIF

(2) **Genotype MTBDR** (Hain-Lifescience): ανίχνευση αντοχής σε RIF και INH

- Μεθοδολογία: PCR και υβριδισμός (line probe assays)
- ΧΛΑ: 6 ώρες

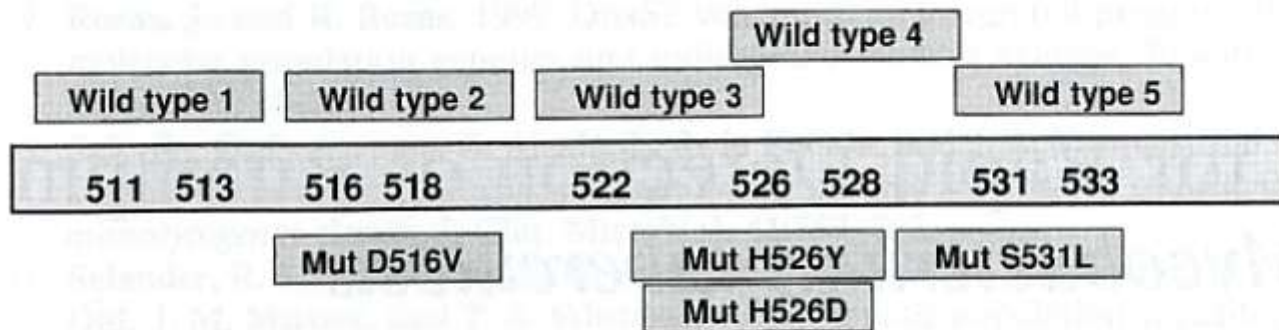
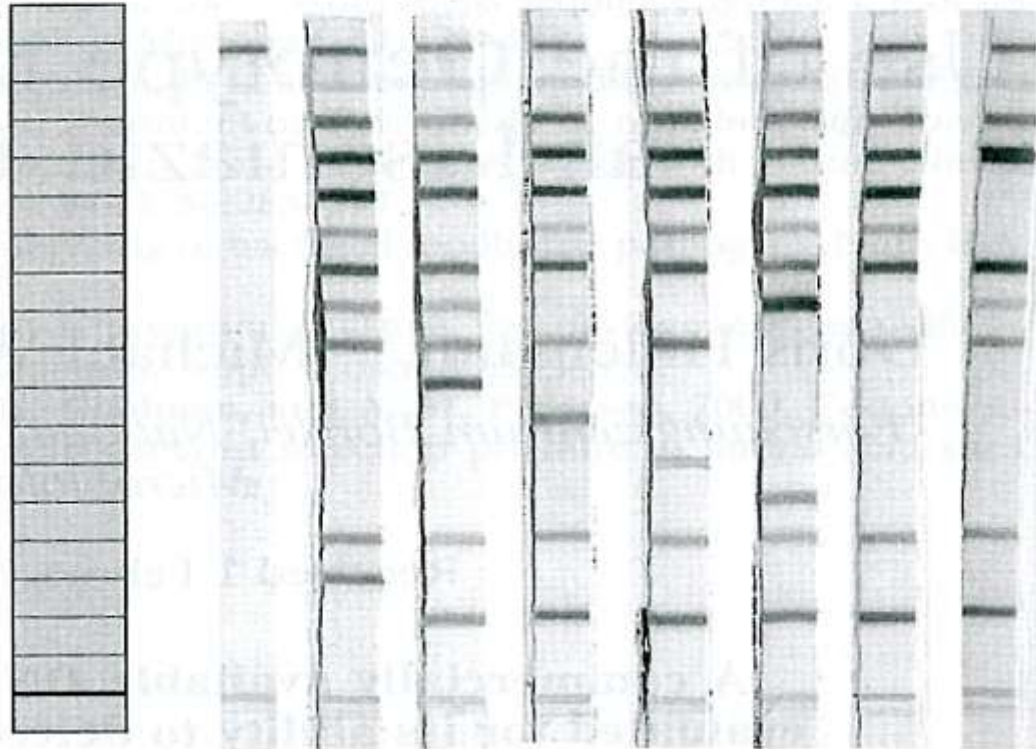


FIG. 1. Locations of probes within the 81-bp hot spot cluster of the *rpoB* gene.

1 2 3 4 5 6 7 8

- Control of the conjugate -
- Amplification control -
- Amplification control MTBC -
- Control *rpoB* -
- rpoB* Wild type 1 -
- rpoB* Wild type 2 -
- rpoB* Wild type 3 -
- rpoB* Wild type 4 -
- rpoB* Wild type 5 -
- rpoB* Mut D516V -
- rpoB* Mut H526Y -
- rpoB* Mut H526D -
- rpoB* Mut S531L -
- Control *katG* -
- katG* wild type -
- katG* S315T1 (ACC) -
- katG* S315T2 (ACA) -



Μοριακή Ανίχνευση Αντοχής MTB (με εμπορικές μεθόδους)

Inno-Lipa Rif TB

- Ανίχνευση Αντοχής σε RIF
→ Ευαισθησία > 95%

Genotype MTBDRplus

- Ανίχνευση Αντοχής σε RIF
→ Ευαισθησία >95%
- Ανίχνευση Αντοχής σε INH
→ Ευαισθησία 67-92% (Γερμανία, Γαλλία, Τουρκία, Ιταλία, Φινλανδία)
(παράγοντας: βιολογικής ποικιλομορφίας)
- Αριστη Ειδικότητα

(Makinen et al, J Clin Microbiol 2006, 44:350-52)

(Miotto et al, J Clin Microbiol 2006, 44:2485-91)

(Cavusoglu et al, J Clin Microbiol 2006, 44:2338-42)

(Brossier et al, J Clin Microbiol 2006, 44:3659-64)

(Morgan et al, BMC Infectious Diseases 2006, 5:62-70)

(Hillemann et al, J Clin Microbiol 2007, 45:2635-40)

Κλινικό Περιστατικό

Ασθενής Λε.Πε., 55 ετών από το Καζακστάν

- Ιστορικό: Κίρρωση ήπατος, HCV (+), κατάχρηση αιθυλικής αλκοόλης, πιθανή χρήση ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών

Ιστορικό Ασθενούς Λε.Πε.

11/6/2010

- **Ασθενής, άνδρας αγνώστων στοιχείων, άστεγος και υποσιτισμένος, που μιλάει μόνο ρωσικά**
- Αρχικά, διεκομίσθη μέσω ΕΚΑΒ στα Εξ. Ιατρεία Χειρουργικής Κλινικής Νοσοκομείου: **λοίμωξη μαλακών μορίων άκρων ποδών**
- Συστάσεις θεραπευτικής αντιμετώπισης (αντιβίωση) και **ψυχιατρικής εκτίμησης** (αδυναμία επικοινωνίας)
- Μεταφορά στο Αττικό Νοσοκομείο μέσω ΕΚΑΒ
- **Ψυχιατρική Διάγνωση: οργανικό ψυχοσύνδρομο**
 - σύσταση για παθολογική εξέταση
 - **εισαγωγή σε Παθολογική Κλινική**

Ιστορικό Ασθενούς Λε.Πε.

- **Αιτία εισόδου:** «Λοίμωξη μαλακών μορίων κάτω άκρων, γαλακτική οξέωση, υπογλυκαιμία»
- Σιπροφλοξασίνη, κλινδαμυκίνη, αλοπεριδίνη και λουτρό ασθενούς

Εργαστηριακός έλεγχος

- WBC 5.690 K/μL (Neut 84.8%, Lymph 8.3%, Mono 6.7%), RBC 3.64 M/μL, HGB 12.2 g/dL, HCT 36.6%, PLT 84.000 K/μL
- GLU 61 mg/dL, TBIL 4.88 mg/dL, DBIL 2.05 mg/dL, αλβουμίνη 1.5 g/dL, SGOT 75 U/L, LDH 659 U/L
- **Νοσηλεία στο διάδρομο, στην συνέχεια σε τετράκλινο**
- Ασθενής «μη συνεργάσιμος»
- Πυρετός και εμφάνιση επιδεινούμενης ταχύπνοιας και υποξυγοναιμίας

ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ ΘΩΡΑΚΟΣ (13/6/2010)

- Παρουσία **πολλαπλών διάσπαρτων πυκνωτικών διηθημάτων** με κατά τόπους δικτυοζώδη μορφολογία στους άνω λοβούς, μέσο λοβό, γλωσσίδα και άνω τμήματα των κάτω λοβών αμφοτερόπλευρα
- **Πολλαπλές κοιλότητες στο ΔΕ άνω λοβό** (μεγίστης διαμέτρου 2.7 cm)
- **Πύκνωση αριστερού κάτω λοβού**

→ Η διαφοροδιάγνωση περιλαμβάνει ευρύ φάσμα λοιμώξεων, με **μεγαλύτερη πιθανότητα αυτήν της φυματίωσης**

13/6/2010

- Εισαγωγή στη Μονάδα Ειδικών Λοιμώξεων σε δωμάτιο με αρνητική πίεση
- Αναπνευστική ανεπάρκεια, εικόνα σήψης
- Διασωλήνωση και λήψη δείγματος βρογχικών εκκρίσεων
- **Θετική χρώση Ziehl-Neelsen (ΧΛΑ: ίδια μέρα)**
- **Μοριακή ταυτοποίηση ως *M. tuberculosis* και ανίχνευση αντοχής σε RIF και INH (ΧΛΑ: την επομένη)**
- Ενοφθαλμισμός σε φιάλη συστήματος MGIT (Becton Dickinson) και σε σωληνάριο Loewenstein-Jensen (LJ)
- **Θετικοποίηση καλλιέργειας MGIT την 5^η ημέρα και LJ την 12^η ημέρα επώασης**

Ο ασθενής Λε.Πε. ήταν «γνωστός» στο ΚΕΕΛΠΝΟ

- Νοσοκομείο «Ασκληπιείο» → 1/1/2006
- Νοσοκομείο «Ευαγγελισμός» → 18/4/2006
- R - INH, RIF, SM, EMB, και S - PZA



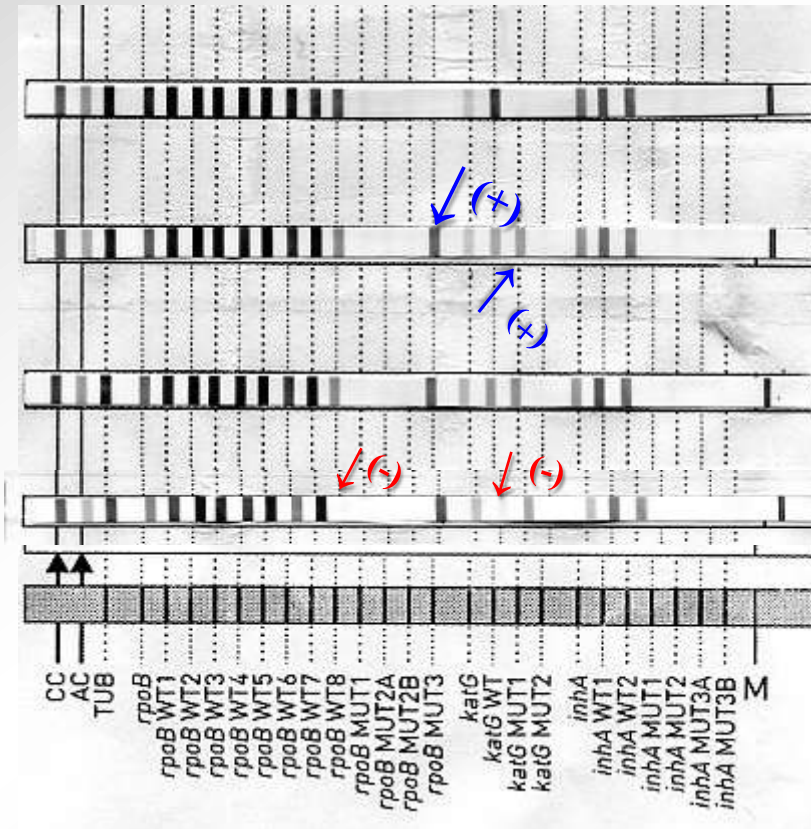
Genotype MTBDRplus (Hain-Lifescience)

ευαίσθητο στέλεχος Mtb

κλινικό δείγμα Λε.Πε.

καλλιέργημα δείγματος Λε.Πε.
σε MGIT

ανακαλλιέργημα στελέχους
Λε.Πε. σε MGIT με ριφαμπικίνη



Γονοτυπική Ανάλυση “στελέχους” Ασθενούς Λε.Πε.

- επρόκειτο για 3 στελέχη *M. tuberculosis*
- εξέταση ανακαλλιεργήματος σε φιάλη που περιείχε ριφαμπικίνη
- στέλεχος R σε INH, RIF, EMB

Γονότυπος MIRU του ανθεκτικού στελέχους:

442-3335-6448-5472 → **στέλεχος Beijing**

9. ΕΞΕΛΙΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ

Η Μεθοδολογία της PCR:

Νεότερα επιτεύγματα στη διάγνωση της Φυματίωσης



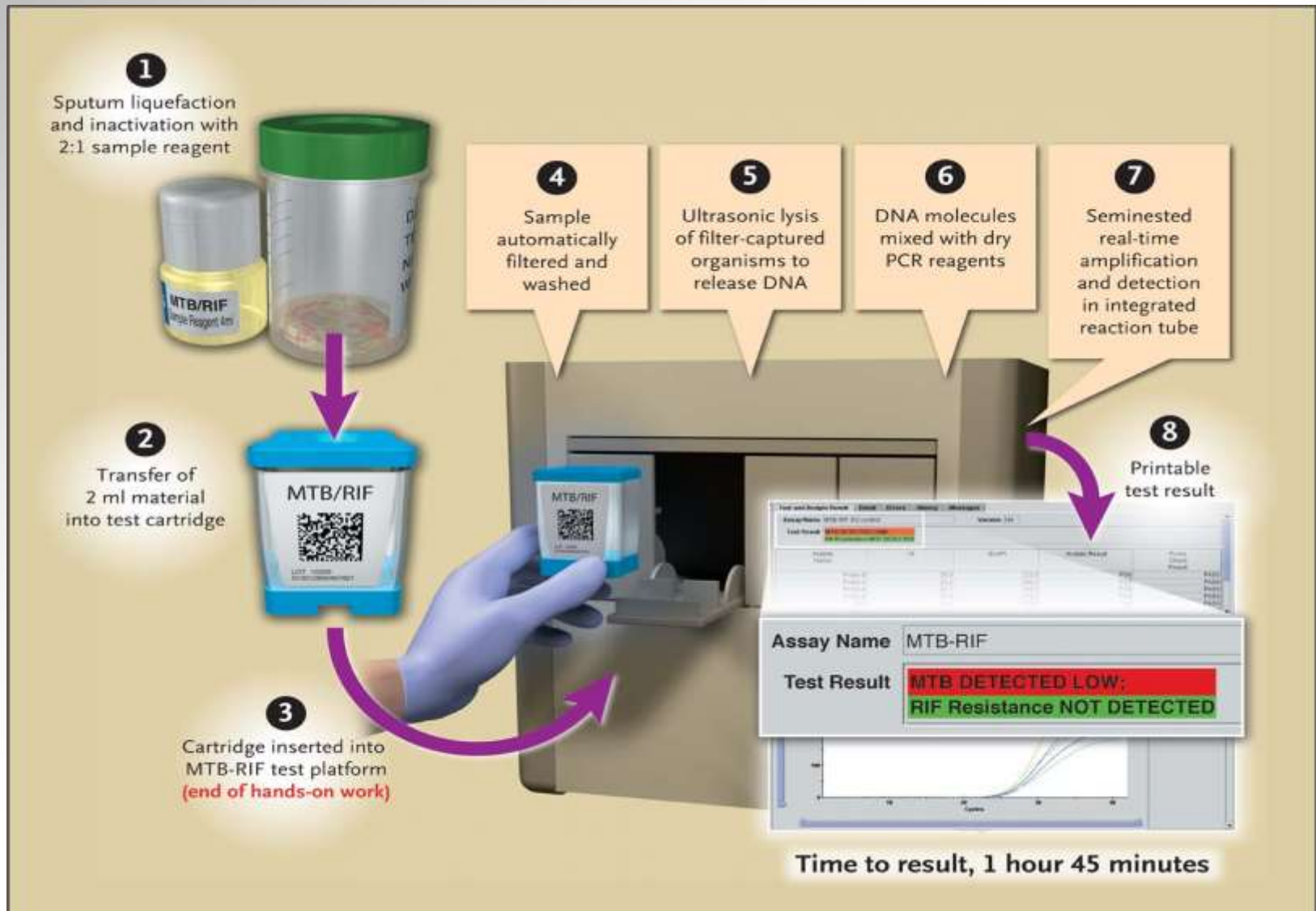
Η μοριακή οξείντοχη χρώση ???

GeneXpert MTB/RIF (Cepheid)

- Ταυτόχρονη ανίχνευση *M. tuberculosis* και αντοχής στη RIF στο κλινικό δείγμα
- Διενέργεια χωρίς προηγούμενη επεξεργασία δείγματος
- ΧΛΑ < 2 ώρες
- Χρόνος απασχόλησης προσωπικού: ελάχιστος
- Πλήρης αυτοματισμός
- Αναλυτική ευαισθησία 131 cfu/ml
- Δείγματα με (-) Οξεάντοχη Χρώση: τουλάχιστον παρόμοια ευαισθησία με την πιο αξιόλογη μέθοδο

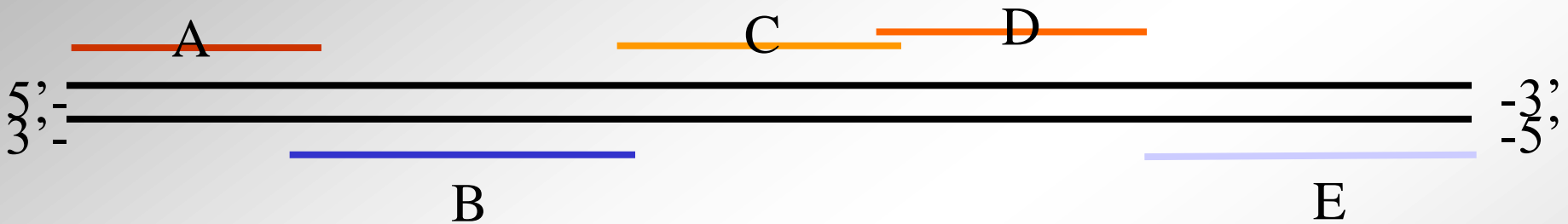
Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance

Boehme et al, N. Engl J Med 2010; 363: 1005-15



GeneXpert MTB/RIF (Cepheid)

rpoB gene

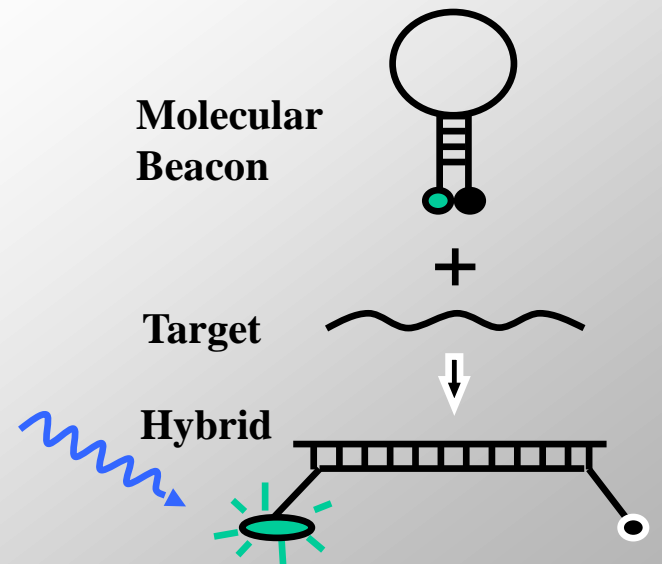


5 Probes bind to wild type

Probes do not bind to mutant sequence

1 Probe for SPC (*B. globigii*)

6 fluorescent dyes detected simultaneously



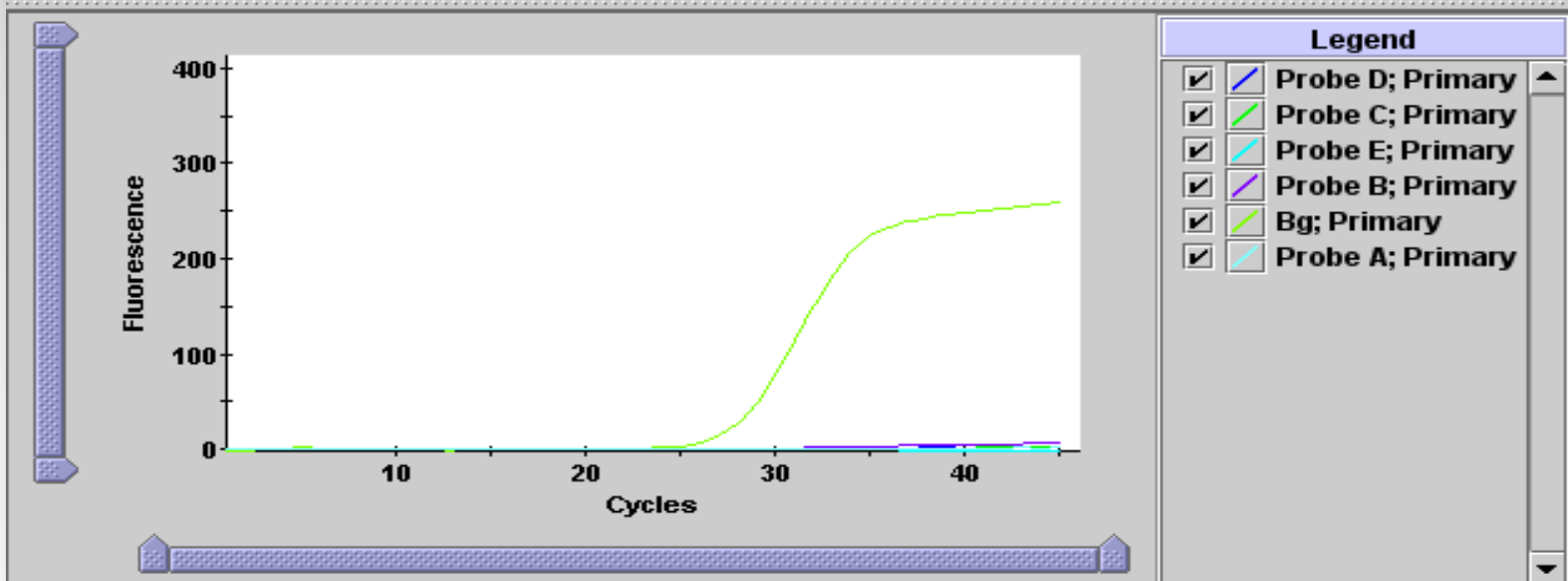
GeneXpert MTB/RIF (Cepheid)

Test and Analyte Result **Detail** Errors History Messages

Assay Name: MTB Beta 8 for LC review-detect Version: NA

Test Result: **MTB NOT DETECTED**

Analyte Name	Ct	EndPt	Analyte Result	Probe Check Result
Probe D	0.0	2.0	NEG	PASS
Probe C	0.0	2.0	NEG	PASS
Probe E	0.0	-2.0	NEG	PASS
Probe B	0.0	6.0	NEG	PASS
Bg	27.4	260.0	PASS	PASS
Probe A	0.0	2.0	NEG	PASS



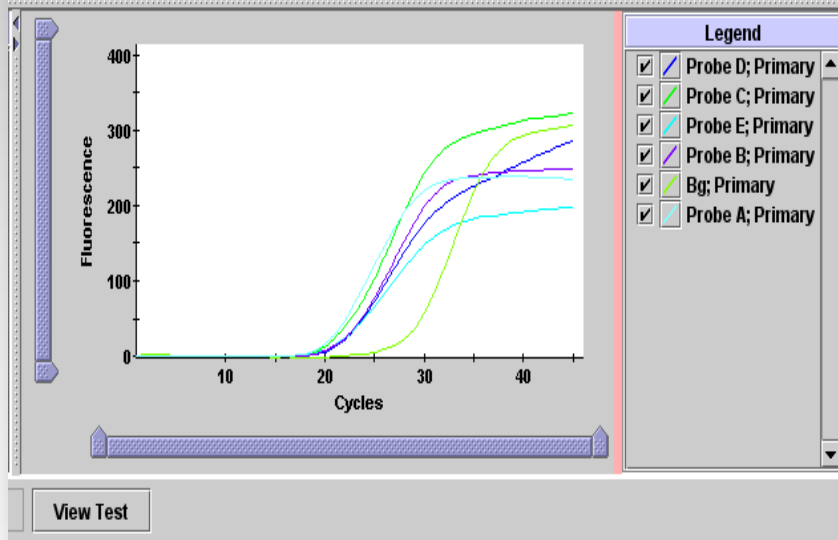
GeneXpert MTB/RIF (Cepheid)

Test and Analyte Result Detail Errors History

Assay Name: MTB Beta Version: 3

Test Result: **MTB POSITIVE MEDIUM;**
Rif Resistance NOT DETECTED

Analyte Name	Ct	EndPt	Analyte Result	Probe Check Result
Probe D	21.9	287.0	POS	PASS
Probe C	20.7	324.0	POS	PASS
Probe E	21.6	198.0	POS	PASS
Probe B	21.7	249.0	POS	PASS
Bg	27.7	306.0	NA	PASS
Probe A	20.4	235.0	POS	PASS

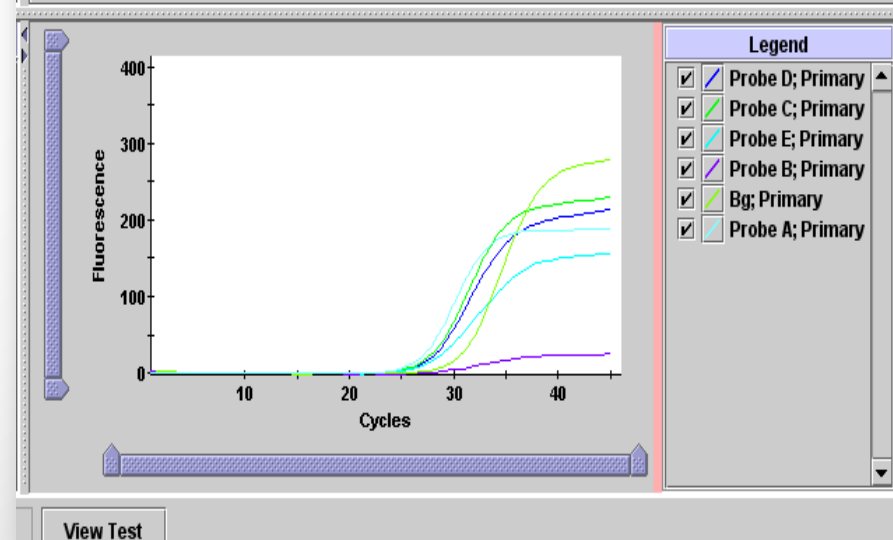


Test and Analyte Result Detail Errors History

Assay Name: MTB Beta Version: 5

Test Result: **MTB POSITIVE LOW;**
Rif Resistance DETECTED

Analyte Name	Ct	EndPt	Analyte Result	Probe Check Result
Probe D	27.9	214.0	POS	PASS
Probe C	27.5	229.0	POS	PASS
Probe E	28.3	157.0	POS	PASS
Probe B	36.5	25.0	POS	PASS
Bg	30.3	278.0	NA	PASS
Probe A	26.9	188.0	POS	PASS



ΦΕΚ: κοστολόγηση διάγνωσης φυματίωσης
«δια ενοφθαλμισμού σε πειραματόζωο», αλλά
όχι με μοριακές τεχνικές



10. ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ

Σημαντικά Προβλήματα Μοριακών Τεχνικών

- ❖ Οι διαθέσιμες διαγνωστικές εξετάσεις αφορούν **μόνο λίγα παθογόνα**
- ❖ Προβλήματα μεταφοράς δείγματος, χαμηλό φορτίο παθογόνου, γενετικές αλλαγές (θέση σύνδεσης των primers), τελικός όγκος αντίδρασης, αναστολή, επιμόλυνση, μη ειδικός πολλαπλασιασμός, πιθανό ανθρώπινο σφάλμα → **ψευδώς (+) και ψευδώς (-) αποτελέσματα**
- ❖ Οι εξετάσεις πρέπει να εφαρμόζονται μόνο στα κλινικά δείγματα για τα οποία έχουν επικυρωθεί
- ❖ Ελλειψη απαραίτητων πόρων (οικονομικών, ανθρώπινου δυναμικού)
- ❖ Η κοστολόγηση συχνά δεν καλύπτει το πραγματικό κόστος των εξετάσεων

Επικύρωση Αποτελεσμάτων μίας Νέας Μεθοδολογίας

- Ενδέχεται τα αποτελέσματα της συμβατικής μεθόδου **να μην συσχετίζονται** με τις (περισσότερο ευαίσθητες) μοριακές τεχνικές
- Ενδέχεται **να μην υπάρχει συμβατική «πρότυπη» μέθοδος διάγνωσης**
 - εφαρμογή κλινικών κριτηρίων
 - εφαρμογή άλλου γενετικού στόχου (εναλλακτική μέθοδος)
- **Απαραίτητη** η επικύρωση με ικανό αριθμό πρότυπων δειγμάτων (↑εύρος φορτίου) και θετικών κλινικών δειγμάτων

Παρουσίαση νέων τεχνικών σε βιβλιογραφία/συνέδρια:

- Δεν είναι απαραίτητα αξιόλογες
- Δεν αναπαράγονται “εύκολα” στο εργαστήριο

Ellen Jo Baron, Clin Infect Dis 2006:43, 1318-23

American Society of Microbiology, 2003

- Εφαρμογή διαγνωστικών μοριακών τεχνικών (ΗΠΑ)
- Ποσοστό εργαστηρίων → μόνο 17%
- Κυρίως, ανίχνευση *Chlamydia trachomatis*/*Neisseria gonorrhoeae*

Άμεση Μοριακή Διάγνωση
ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ

Μεθόδων Πολλαπλασιασμού Νουκλεϊκών Οξέων

- 1. Πρόβλημα ψευδώς (-) αποτελεσμάτων**
- 2. Πρόβλημα ψευδώς (+) αποτελεσμάτων**
- 3. Ταχύτατη λήψη αποτελεσμάτων: δεν είναι πάντα δυνατή**
- 4. Δεν αντικαθιστούν τις καλλιέργειες**
- 5. Δεν παρέχουν την δυνατότητα της ταυτόχρονης ανίχνευσης μεγάλου αριθμού παθογόνων**
- 6. Τεχνικά περίπλοκες**
- 7. In-house τεχνικές: επικύρωση και προτυποποίηση**
- 8. Περιορισμένος αριθμός αξιόλογων εμπορικών μεθόδων**
- 9. Υψηλό κόστος**

ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣ ΕΜΠΟΡΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ερωτήματα που θέτουμε:

- Ποιες είναι οι διαθέσιμες Εμπορικές Μέθοδοι, ποια τα χαρακτηριστικά τους (πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα) και ποια είναι η αξιολόγησή τους στην βιβλιογραφία ?
- Αυτοματισμός ? Βαθμός δυσκολίας ? Πώς θα εναρμονισθεί η μέθοδος με την ρουτίνα του εργαστηρίου ?
- Ποια άλλα παθογόνα ανιχνεύει ο αναλυτής ? Μας ενδιαφέρουν ?
- Κόστος ?
- Συζήτηση με συναδέλφους / χρήστες

ΑΠΟΣΤΟΛΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΕ ΕΞΩΤΕΡΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

- Αξιολόγηση «εξωτερικού» εργαστηρίου

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ: ΑΜΕΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

1991-2012 → 21 χρόνια εφαρμογών στην Κλινική Μικροβιολογία

Εφαρμόζοντας τεχνικές που πολλαπλασιάζουν τα νουκλεϊκά οξέα απ' ευθείας στο κλινικό δείγμα:

- ⇒ αναγνωρίζουμε την ύπαρξη του παθογόνου**
- ⇒ ανιχνεύουμε την αντοχή του**

Η μεθοδολογία βρίσκεται σε εξέλιξη

Star Trek Medical Tricorder



- A palm-sized, handheld, device used by doctors in the Star Trek universe of the 23rd and 24th centuries **to help diagnose diseases** and collect bodily information about a patient.
- The device scanned a living patient, interpreted and displayed the data obtained from the scan to the user, and recorded the data to isolinear chips

(Wikipedia, 2007)