

# Η συμβολή των μοριακών τεχνικών στη διάγνωση και θεραπεία των λοιμώξεων



*Λουκία Ζέρβα*

*Επίκουρη Καθηγήτρια*

*Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας*

*Αττικό Νοσοκομείο, Πανεπιστήμιο Αθηνών*

## Η συμβολή των μοριακών τεχνικών στη διάγνωση και θεραπεία των λοιμώξεων

### Άμεση Μοριακή Διάγνωση

Εφαρμόζοντας τεχνικές μοριακής βιολογίας\* απ' ευθείας στο κλινικό δείγμα:

- ⇒ αναγνωρίζουμε την ύπαρξη του παθογόνου
- ⇒ προσδιορίζουμε την συγκέντρωσή του (φορτίο)
- ⇒ προσδιορίζουμε την αντοχή του παθογόνου

\* τεχνικές μοριακής βιολογίας:

τεχνικές που πολλαπλασιάζουν τα νουκλεϊνικά οξέα (αναγκαστικά)

# Μεθοδολογία «Συμβατικής» Μικροβιολογίας

1. Μικροσκόπηση
2. Καλλιέργεια
  - απομόνωση, ταυτοποίηση, έλεγχος αντοχής
3. Ανίχνευση αντιγόνου ή αντισώματος

# ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ «Συμβατικής» Μικροβιολογίας

- Χαμηλή Ευαισθησία
- Χαμηλή Ειδικότητα
- Παρατεταμένος Χρόνος Λήψης Αποτελεσμάτων (ΧΛΑ)
  
- Βραδεία ανάπτυξη, ουδεμία ανάπτυξη
- Πρόβλημα διάκρισης μεταξύ αποικισμού και λοίμωξης
- Επικίνδυνος μικροοργανισμός
- Αδύνατη η λήψη του βέλτιστου κλινικού υλικού
- Αρνητική εξέταση σε ανοσοκαταστολή
- Διασταυρούμενες αντιδράσεις
- «Καθυστερημένη» εμφάνιση αντισωμάτων
- Απέκκριση αντιγόνου για ↑↑ χρονικό διάστημα

# Άμεση Μοριακή Διάγνωση

## **Πλεονεκτήματα** Μεθόδων Πολλαπλ. Νουκλεϊνικών Οξέων

- 1. Μεγάλη Ευαισθησία :** πολλαπλασιασμός και ανίχνευση ενός μορίου - στόχου (→ ενός μικροοργανισμού)
- 2. Μεγάλη Ειδικότητα :** λόγω της ίδιας της φύσης των νουκλεϊνικών οξέων (→ ταυτότητα του ίδιου του μικροοργανισμού)
- 3. Ταχεία λήψη αποτελεσμάτων:** ολοκλήρωση της εξέτασης μέσα σε λίγες ώρες

# Άμεση Μοριακή Διάγνωση

## **Πλεονεκτήματα** Μεθόδων Πολλαπλ. Νουκλεϊνικών Οξέων

### 4. Ευελιξία Μεθοδολογίας

### 5. Ανίχνευση «δύσκολων» μικροοργανισμών

- που χρειάζονται ιδιαίτερα καλλιεργητικά υλικά
- που δεν καλλιεργούνται καθόλου
- που οι καλλιέργειές τους χρειάζονται ↑↑ χρόνο επώασης

(*L. pneumophila*, *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, HCV, *T. pallidum*, *M. leprae*,  
*M. tuberculosis*, CMV, *T. gondii*, *Leishmania* spp.)

### 6. Ανίχνευση μικροοργανισμών όταν ο ασθενής έχει ήδη λάβει αντιμικροβιακή θεραπεία

## ΠΡΟΒΛΗΜΑ

- Η ερώτηση που καλούμαστε να απαντήσουμε όταν παραλαμβάνουμε κλινικά δείγματα για καλλιέργεια στο Εργαστήριο είναι: **υπάρχει λοίμωξη και ποιο είναι το παθογόνο ?**  
≠ διάγνωση γενετικής νόσου
- Η άμεση μοριακή διάγνωση, όμως, στοχεύει αποκλειστικά σε **ένα παθογόνο**
- Ποιες λοιπόν είναι οι λοιμώξεις την διάγνωση των οποίων πρέπει, χρειάζεται να στοχεύσουμε εφαρμόζοντας την Μοριακή Διάγνωση ??

# «Μενού» Ιδιωτικού Εργαστηρίου «Μοριακός Μικροβιολογικός Έλεγχος»

- ανίχνευση HBV
- προσδιορισμός ιικού φορτίου HBV
- ανίχνευση HCV
- προσδιορισμός ιικού φορτίου HCV
- προσδιορισμός γονότυπου HCV
- ανίχνευση και τυποποίηση HPV
- ανίχνευση HSV, EBV, CMV, VZV
- ανίχνευση Εντεροϊών
- ανίχνευση Αδενοϊών
- ανίχνευση ιού Ερυθράς
- ανίχνευση Parvovirus B19
- ανίχνευση M. tuberculosis
- ανίχνευση C. pneumoniae
- ανίχνευση C. trachomatis
- ανίχνευση M. hominis
- ανίχνευση U. urealyticum
- **ανίχνευση T. gondii**



## **ΕΡΩΤΗΜΑ**

- Ποιες είναι οι λοιμώξεις για την διάγνωση των οποίων πρέπει, χρειάζεται να εφαρμόσουμε την Μοριακή Διάγνωση ??

## **ΑΠΑΝΤΗΣΗ**

- Ποιες αξιόλογες εξετάσεις Μοριακής Διάγνωσης είναι διαθέσιμες ??

# **Ο Βασικός Διαχωρισμός των Μοριακών Εξετάσεων**

- **Οι Εμπορικές Μέθοδοι**
- **Οι Μέθοδοι In-House** (σπιτικές)

# **Ο Βασικός Διαχωρισμός των Μοριακών Εξετάσεων**

- **Οι Εμπορικές Μέθοδοι**
  - **οι αξιόλογες Εμπορικές**
  - οι άγνωστης αξίας Εμπορικές
- **Οι Μέθοδοι In-House**

# Ο Βασικός Διαχωρισμός των Μοριακών Εξετάσεων: Αξιόλογες Εμπορικές $\Leftrightarrow$ In-House

## ΑΞ. ΕΜΠΟΡΙΚΕΣ

- προτυποποιημένες μέθοδοι με σαφείς οδηγίες χρήσης
- απλές, αλλά στιβαρές εξετάσεις
- έως και πλήρως αυτοματοποιημένες
- αξιολογημένες στην βιβλιογραφία
- πλήρης εξάρτηση από τον κατασκευαστή
- $\uparrow$  κόστος

## IN-HOUSE

- κανένας περιορισμός στο μενού
- περισσότερο ευέλικτες
- “ do-it-yourself ”
- $\downarrow$  κόστος
- απόδοση ??

# IN-HOUSE ΜΕΘΟΔΟΙ

## Ανάπτυξη Μεθοδολογίας

- **Επιλογή:** βέλτιστο κλινικό δείγμα, μέθοδος λύσης κυττάρων, μέθοδος εκχύλισης του DNA, γονίδιο-στόχος, μέθοδος πολλαπλασιασμού νουκλεϊνικών οξέων, μέθοδος ανίχνευσης αποτελέσματος
- **Εφαρμογή της μεθόδου**
- **Ανάπτυξη στρατηγικής κατά:** επιμόλυνσης και αναστολής
- **Μελέτη Αξιολόγησης:** σύγκριση με αποτελέσματα καλλιεργειών και με κλινικο-εργαστηριακά δεδομένα
- **Καθορισμός:** Ευαισθησία και Ειδικότητα
- **Προτυποποίηση και Έλεγχος Ποιότητας**

⇒ **Μόνο για Εργαστήρια με  
ερευνητικό υπόστρωμα**

# Άλλος Διαχωρισμός Εξετάσεων Μοριακής Διάγνωσης

1. Εξετάσεις που η κλινική τους χρησιμότητα είναι εδραιωμένη
2. Πολλά υποσχόμενες Μέθοδοι
3. Εξετάσεις που δεν θα έπρεπε να γίνονται

## Αδιαμφισβήτητη Αξία Εμπορικών Μεθόδων

⇒ Ριζικές Αλλαγές Διάγνωσης και Θεραπείας

⇒ Αποτελούν «χρυσό πρότυπο» της διάγνωσης

- ανίχνευση και προσδιορισμός ιικού φορτίου HIV
- ανίχνευση και προσδιορισμός ιικού φορτίου HBV και HCV
- προσδιορισμός γονότυπου HCV
- ανίχνευση και τυποποίηση HPV
- ανίχνευση C. trachomatis

## ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ

### Ανίχνευση *C. trachomatis*

- Η πρώτη μέθοδος που έδειξε μεγαλύτερη Ευαισθησία από αυτήν της καλλιέργειας, και σχεδόν την ίδια Ειδικότητα
- Πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία από άλλες μεθόδους ανίχνευσης (κατά 20-40%)
- Κλινικό δείγμα «εύκολο»: ούρα, τραχηλικό
- Πολλά διαθέσιμα αξιόλογα προϊόντα: Roche, Becton Dickinson, Abbott
- Αποτελεί την **μέθοδο επιλογής**
- Κόστος: 40-50 ευρώ / test



# ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣ ΕΜΠΟΡΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

## Ερωτήματα που θα πρέπει να θέσουμε

- Ποιες είναι οι διαθέσιμες Εμπορικές Μέθοδοι ?
- Ποια είναι η μέθοδος ανίχνευσης και ποια είναι τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά της ?
- Τι περιμένουμε από την εξέταση (αξιολόγηση στην βιβλιογραφία) ?
- Αυτοματισμός ?
- Ποια άλλα παθογόνα ανιχνεύει ο αναλυτής (και τα οποία ενδιαφέρουν το Εργαστήριό μας) ?
- Κόστος ?
- Συζήτηση με συναδέλφους άλλων Εργαστηρίων που έχουν εμπειρία στην συγκεκριμένη εξέταση

# Λοιμώξεις για τις οποίες φαίνεται να χρειαζόμαστε Μοριακή Διάγνωση

- **Φυματίωση**
- **Λοιμώξεις σε ανοσοκατασταλμένους** (HSV, EBV, CMV, VZV, Parvo B19, HHV 6,7,8, Rotavirus, RSV, Influenza A,B, Parainfluenza, BK virus, JC virus, Legionella spp, T. gondii) (**ΜΥΚΗΤΕΣ !!!!!**)
- **Λοιμώξεις σε εγκυμοσύνη** (συγγενής νόσος CMV, ερυθρά, τοξοπλάσμωση, Parvo B19)
- **Άσηπτη μηνιγγίτιδα** (HSV, εντερο-ιοί)
- **Άτυπη πνευμονία** (Legionella spp, C. pneumoniae, M. pneumoniae, **ιογενούς αιτιολογίας**)
- **Τοπικό ενδιαφέρον: βρουκέλλωση, λείσμανίαση, εχινοκοκκίαση**
- **Βακτηριακή μηνιγγίτιδα** (για την οποία χορηγήθηκε θεραπεία)

# ΑΠΟΣΤΟΛΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΕ ΕΞΩΤΕΡΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

Σε ποιες περιπτώσεις ????

- Σε βέβαιη κλινική χρησιμότητα εξετάσεων
- Παράδειγμα: αξίζει να εφαρμόζουμε μοριακή διάγνωση για τα *M. hominis* και *U. urealyticum* (και να πληρώνουμε κιόλας για αυτές ????)

Σε ποιο Εργαστήριο ?????

- Αξιολόγηση εξωτερικού Εργαστηρίου (από εμάς)

## ΤΕΛΕΥΤΑΙΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ

- η ποικιλία των διαφορετικών κλινικών δειγμάτων που χρειάζεται να εξετασθούν
- “the matrix effect”
- μία μέθοδος που αναπτύσσεται για ένα είδος κλινικού δείγματος, δεν αναμένεται να παρουσιάζει την ίδια απόδοση σε άλλου είδους κλινικό δείγμα

## ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ:

η προβληματική άμεση μοριακή  
διάγνωση ενός σημαντικότητας  
λοιμώδους νοσήματος

# ΦΥΜΑΤΙΩΣΗ (TB)

- Η ταχεία και αξιόπιστη διάγνωση της TB είναι εξαιρετικά σημαντική :
  - άμεση έναρξη χορήγησης θεραπείας (← σοβαρή λοίμωξη)
  - απομόνωση του ασθενούς (← Θέμα Δημόσιας Υγείας)
  - έλεγχος περιβάλλοντος του ασθενούς (← προφυλ. αγωγή)
  - από το 1985: παγκόσμια ↑ της συχνότητας της νόσου
  - εμφάνιση, εξάπλωση πολυανθεκτικών στελεχών (MDR)  
[ R σε INH και RIF (multidrug resistance, MDR) ]
  - 2006: εμφάνιση XDR στελεχών [ extensively drug resistant ]

# *M. tuberculosis* : «δύσκολος» οργανισμός

## Απαιτούνται

- βέλτιστο είδος κλινικού δείγματος
- βέλτιστος αριθμός κλινικών δειγμάτων
  - τουλάχιστον 3 δείγματα πρωινών πτυέλων ή ούρων
- ειδική επεξεργασία (καταστροφή φυσιολογικής χλωρίδας, ρευστοποίηση, συμπύκνωση)
- ειδικά καλλιεργητικά υλικά (στερεά και υγρά)
  - (υλικό *Loewenstein Jensen*: αυγά, πουρές πατάτας, γλυκερόλη, άλατα κ.α.)
- παρατεταμένος χρόνος επώασης
  - υπάρχει μυκοβακτηρίδιο (ΜΒ) ?
  - είναι ΜΤΒ ? - ποιά είναι η ευαισθησία του ?
  - εάν δεν είναι ΜΤΒ, ποιο είναι και ποια η κλινική σημασία του ?
- εξειδικευμένο εργαστήριο
- χώροι υψηλής βιολογικής ασφάλειας

# Η ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΤΒ

1. Μικροσκοπική Εξέταση (Οξ.Χρώση)
2. Καλλιέργεια, Απομόνωση, Ταυτοποίηση
3. Έλεγχος Ευαισθησίας (σήμερα πιά υποχρεωτικός)

**Η συμβατική αυτή διάγνωση είναι  
προβληματική**



# Συμβατικές Διαγνωστικές Τεχνικές TB

## (1) Οξ. Χρώση του Κλινικού Δείγματος

- ταχεία λήψη αποτελεσμάτων (επόμενη ημέρα)
- αναλυτική ευαισθησία μόνο  $10^4$  MB / ml
- μη ειδική εξέταση: αναγνώριση γένους, όχι είδους
- σε πνευμο-TB: συχνότητα (+) Οξ.Χρώσης 60-70%  
(ΜΕΤΑΔΟΣΗ !!)
- χαμηλότερη σε άλλες εντοπίσεις (πχ σε TB-μηνιγγίτιδα)

# Συμβατικές Διαγνωστικές Τεχνικές TB

## (2) Καλλιέργεια του Κλινικού Δείγματος

- ειδικότητα 100%
- ευαισθησία > 90% για πνευμο-TB (βέλτιστος αριθμός δειγμάτων, βέλτιστη μεθοδολογία)
- ↓ ευαισθησίας σε μη-αναπνευστικά δείγματα
- παρατεταμένος χρόνος επώασης (6-8 εβδομάδες )

## Καλλιέργεια σε υγρά θρεπτικά υλικά

- μέσος χρόνος ανίχνευσης (+) MTB καλλιεργείων : **9-14 ημέρες**

# Άμεση Μοριακή Διάγνωση της TB

Από την δεκαετία του 1990 :

- Ανάπτυξη μεθοδολογίας άμεσης διάγνωσης της TB
- Μέθοδος πρότυπο : η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης  
(Polymerase Chain Reaction, PCR)
- Αρχικά μέθοδοι “**in house**”, στην συνέχεια και **εμπορικές**
  
- **Ωστόσο, οι προσδοκίες μας δεν έχουν εκπληρωθεί**
  - Ευαισθησία, Ειδικότητα, ΧΛΑ  
(σε μάλιστα σε σύγκριση με άλλα παθογόνα όπως: HIV, HBV, HCV)

⇒ Ποιο είναι το πρόβλημα της εφαρμογής της άμεσης μοριακής εξέτασης στην διάγνωση της TB ?

### Τέσσερις Σημαντικές Ερωτήσεις :

- (1) Ποιά είναι η καλύτερη μοριακή εξέταση?
- (2) Πότε ενδείκνυται να την χρησιμοποιούμε ?
- (3) Ποιά η αξία της για πνευμονικά και εξω-πνευμονικά δείγματα ?
- (4) Ποιός είναι ο κατάλληλος αριθμός δειγμάτων που πρέπει να εξετασθούν ανά ασθενή ?

# ΑΜΕΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ TB

## (1) Ποιά είναι η καλύτερη εξέταση?

## ΕΜΠΟΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

- Αξιόλογες και αξιολογημένες, ημι- ή πλήρως αυτοματοποιημένες (18-60 € /test)

### ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ

#### (1) LCx MT Assay (Abbott)

- Gap Ligase Chain Reaction, στόχος: DNA (Protein Antigen B)
- το φθηνότερο test

#### (2) Amplified MT Direct Test (Gen-Probe, Biomerieux)

- Transcription - Mediated Amplification, στόχος: rRNA ( $2 \times 10^3$  αντίγραφα)
- το πιο ευαίσθητο test

#### (3) Amplicor MTB PCR (Roche)

- Polymerase Chain Reaction, στόχος: DNA (16S rRNA)
- ανίχνευση αναστολής

#### (4) BDProbeTec ET (Becton Dickinson)

- Strand Displacement Amplification, στόχος: DNA (IS6110; 8-25 αντίγραφα)
- ΧΛΑ: 1 ώρα (!!!), ανίχνευση αναστολής

**Μόνο για Δείγματα του Αναπνευστικού !!!!**

## ΑΜΕΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ TB

1η Ερώτηση: Ποιά είναι η καλύτερη εξέταση ?

### 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 δείγματα (πτύελα, σάλιο, νερό)
- επιμολυσμένα με *M. bovis* BCG: 0,  $10^3$ ,  $10^4$  or  $10^7$  κύτταρα
- δείγματα στάλθηκαν σε διαγνωστικά εργαστήρια
- ποικιλία εξετάσεων (in-house ή εμπορικές, ίδιες ή διαφορετικές)

⇒ Ποια από τα δείγματα είναι θετικά ?????

⇒ Ποια 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%)

### **Ψευδώς Θετικά Αποτελέσματα**

- δείγματα χωρίς κύτταρα: 3-20% (σε ένα εργαστήριο: 77%)

## **ΑΜΕΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΤΒ**

### **1η Ερώτηση:**

### **Ποιά είναι η καλύτερη εξέταση ?**

- υπάρχουν αξιόλογες μέθοδοι (εμπορικές ή In-House)
- η απόδοση του Εργαστηρίου είναι πιά σημαντική από την μεθοδολογία
- «καλά» αποτελέσματα παρέχονται μόνον από «καλά» Εργαστήρια
- η απόδοση του Εργαστηρίου ΠΡΕΠΕΙ να ελέγχεται από το ίδιο το Εργαστήριο



- Για τον έλεγχο της απόδοσής μας απαιτείται πάντοτε η διενέργεια του **Εξωτερικού Ελέγχου Ποιότητας**

# ΑΜΕΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΤΒ

## 2η Ερώτηση:

Πότε ενδείκνυται να χρησιμοποιούμε τις τεχνικές αυτές ?

## Θεώρημα του Bayes :

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

A: Ευαισθησία, B: Ειδικότητα, C: Θετική Προγνωστική Αξία (ΘΠΑ), D: Συχνότητα Νόσου

## ΥΠΟΘΕΣΗ

- test διάγνωσης ΤΒ με **Ευαισθησία και Ειδικότητα 99%** (!!!!)
- συχνότητα νόσου 1%: ΘΠΑ 50%
- συχνότητα νόσου 10%: ΘΠΑ 91%
- συχνότητα νόσου 20%: ΘΠΑ 96%

## **ΑΜΕΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΤΒ**

### **2η Ερώτηση:**

**Πότε ενδείκνυται να χρησιμοποιούμε τις τεχνικές αυτές ?**

**Η εφαρμογή της εξέτασης ΕΝΔΕΙΚΝΥΤΑΙ ΜΟΝΟΝ ΜΕΤΑ:**

→ από θετικό screening test (θετική Οξ.Χρώση)

→ από προσεκτική επιλογή των ασθενών

(υψηλή κλινική υπόνοια νόσου)

# 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 → υπόνοια πνευμονικής φυματίωσης

Δείγματα Αναπνευστικού → Gen-Probe MTD [το πιο ευαίσθητο test]

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%
<b>All patients (n=338)</b>	<b>21%</b>	<b>83%</b>	<b>97%</b>	<b>88%</b>	<b>95%</b>

## ΑΜΕΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ TB

### 3η Ερώτηση:

Ποιά είναι η αξία της εξέτασης για εξω-πνευμονικά κλινικά δείγματα ?

### Παράδειγμα : ΦΥΜΑΤΙΩΔΗΣ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΣ

- εύρος Ευαισθησίας: 24-100%
- εύρος Ειδικότητας: 85-94%
- ↑ Ποικιλία : gold standard διάγνωσης, πληθυσμός ασθενών, μεθοδολογία, όγκος ENY
- Για τις Εμπορικές Μεθόδους: Ειδικότητα >>> Ευαισθησία  
(Pai M et al, Lancet Infect Dis 2003, 3:633-43)

## ΑΠΑΝΤΗΣΗ

→ η αξία της εξέτασης παραμένει άγνωστη

(σαφώς μικρότερη Ευαισθησία σε σύγκριση με δείγματα αναπνευστικού)

## **ΑΜΕΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ TB**

**4η Ερώτηση: Πόσα δείγματα να εξετάσουμε ανά ασθενή ?**

## **ΑΠΑΝΤΗΣΗ**

- ακολουθούμε οδηγίες για καλλιέργειες
- τουλάχιστον 3 δείγματα πτυέλων ή ούρων (↑↑↑ κόστος)

## **(ΠΑΡΕΝΘΕΣΗ)**

### **ΑΜΕΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΒ ΚΑΙ ΧΛΑ**

- Τεχνικά, αντιστοιχεί σε ώρες
  - «σπάταλη» διαχείριση της εξέτασης (↓ ΧΛΑ)
  - «οικονομική» διαχείριση της εξέτασης (↑ ΧΛΑ)
  - εξαρτάται από τον αριθμό των δειγμάτων προς εξέταση
  - εξαρτάται από την αριθμητική επάρκεια του προσωπικού
- 
- **ΕΠΟΜΕΝΩΣ, ο ΧΛΑ ποτέ δεν θα αντιστοιχεί σε λίγες μόνον ώρες, αλλά αναγκαστικά επιμηκύνεται**

# ΑΜΕΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΤΒ

(μόνο για δείγματα του αναπνευστικού)

## ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ

- πάντα χαμηλότερη από αυτήν της καλλιέργειας
- εύρος: 70-85%
- δείγματα με (+) Οξ.Χρώση >> δείγματα με (-) Οξ.Χρώση

## ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

- βέλτιστη μέθοδος > 95%

⇒ ένα θετικό αποτέλεσμα θεωρείται πάντα προκαταρκτικό και απαιτεί επιβεβαίωση από καλλιέργειες

⇒ οι καλλιέργειες παραμένουν το «gold standard» της διάγνωσης της ΤΒ

⇒ οι καλλιέργειες είναι απαραίτητες για τον έλεγχο της αντοχής



# Άμεση Μοριακή Διάγνωση της TB

## Συμπέρασμα

- έχουμε **πολύτιμες εξετάσεις** για την άμεση μοριακή διάγνωση της πνευμονικής TB που οφείλουν να διενεργούνται **μόνο από εξειδικευμένα εργαστήρια**
- η εφαρμογή τους χωρίς περιορισμό σε όλους τους ασθενείς θα οδηγήσει σε θεραπευτικές καταστροφές και υψηλό κόστος
- η βελτίωση της μεθοδολογίας είναι απαραίτητη για την εξωπνευμονική TB
- **οι καλλιέργειες παραμένουν απαραίτητες τόσο για την διάγνωση όσο και για τον έλεγχο ευαισθησίας**

- Πως μπορούμε να «κλέψουμε», έτσι ώστε να βελτιώσουμε την **Ειδικότητα** της μοριακής (in-house) μεθόδου ???

# Case Report: Ταχεία και Ακριβής Διάγνωση Κεχροειδούς Φυματίωσης με PCR

*Ι. Παπαπαρασκευάς, Χ. Σινάνη, Φ. Κλούβα-Μολυβδά, Σ. Νικολάου, Ν. Λεγάκης, Α. Ζέρβα  
Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή Αθήνας, Μονάδα Εντατικής Θεραπείας, Θριάσειο Νοσοκομείο,  
Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μυκοβακτηριδίων, Νοσοκομείο Σωτηρια*

- άνδρας 19 χρονών από το Πακιστάν
- διαλείπων πυρετός από 3 μήνες
- μεταφορά στην ΜΕΘ σε κώμα
- Α/α θώρακα : πολλαπλές μικροοζώδεις σκιάσεις
- CT εγκεφάλου : υδροκέφαλος με οίδημα
- ΕΝΥ: 20 κύτταρα/ml, γλυκόζη 30 mg/dl, πρωτεΐνη 165 mg/dl

⇒ **Χρειαζόμαστε μοριακή διάγνωση για TB ?**

# Case Report: Ταχεία και Ακριβής Διάγνωση Κεχροειδούς Φυματίωσης με PCR

## ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

- 1η PCR (<3 ώρες)
- 1 CSF: PCR(+) (10 ml)
- 2 / 3 βρογχ.: PCR(+)

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- επιβεβαίωση με 2η PCR
- < 24 ώρες

## ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

- όλες Οξ.Χρ. (-)
- 1 / 2 CSF: ΚΑΛ(+)
- 3 βρογχ: ΚΑΛ(-)

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- ανάπτυξη: 19η μέρα επώασης
- έλεγχος ευαισθησίας

**Μοριακή Διάγνωση Φυματίωσης**

**Διασφάλιση της Ποιότητας**

(Quality Assurance)

# Quality Assurance

## στην Μοριακή Διάγνωση της Φυματίωσης

*Α. Φλούντζη, Δ. Χούχουλα, Α Πρίφτης, Ν. Λεγάκης, Α. Ζέρβα  
Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή Αθήνας*

- **Quality Assurance** : ορίζεται ως “ a planned and systematic process for evaluating and monitoring the quality and appropriateness of patient care, focusing on problem finding ”
- **Διασφάλιση της Ποιότητας**: “σχεδιασμένη και συστηματική διαδικασία για την αξιολόγηση και τον συνεχή έλεγχο της ποιότητας και ορθότητας της περίθαλψης του ασθενούς με εστιασμό στην ανεύρεση προβλημάτων”

### Σκοπός της Μελέτης

- κριτική ανάλυση εργαστηριακών δεδομένων αναφορικά με την μοριακή διάγνωση της φυματίωσης σε σχέση με κλινικά δεδομένα
- εστιασμός στην ανεύρεση προβλημάτων και βελτίωση

# QUALITY ASSURANCE

## Υλικά και Μέθοδοι

### Το Εργαστήριο : Τμήμα Μοριακής Διάγνωσης

- διενεργεί διάγνωση TB από τον Απρίλιο 2000
- μόνο μοριακή διάγνωση των κλινικών δειγμάτων (από 35 νοσοκομεία/κλινικές)

### Η Μελέτη (αναδρομική) :

#### (1) ανάλυση των αρχείων του Εργαστηρίου

- τύπος δείγματος, όγκος, αριθμός/ασθενή, αποτελέσματα PCR

#### (2) τηλεφωνική επαφή με τον κλινικό γιατρό

- κλινικά + εργαστηριακά ευρήματα (αποτελέσματα καλλιιεργειών TB, ιστολογικής, κλινική διάγνωση, ανταπόκριση στην θεραπεία)

### Δύο Περίοδοι της Μελέτης :

- **ολόκληρη η περίοδος - 42 μήνες** (Απριλ 2000 μέχρι Οκτ 2003)
  - όλοι οι ασθενείς : **(1)**
  - μόνο PCR-θετικοί ασθενείς : **(1) + (2)**
- **τελευταίοι 13 μήνες** (από Σεπτ 2002 μέχρι Οκτ 2003)
  - όλοι οι ασθενείς : **(1) + (2)**

# QUALITY ASSURANCE

## Υλικά και Μέθοδοι

- επεξεργασία κλινικού δείγματος : όπως συνιστάται για τις καλλιέργειες
- Μέθοδοι εκχύλισης DNA :
  - IsoQuick (Orca Research, Bothell, WA, USA)
  - QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)
- δύο Μέθοδοι PCR (in-house) :
  - για screening και επιβεβαίωση
  - πολλαπλασιασμός μη επικαλυπτόμενων αλληλουχιών IS6110

*Eisenach et al, J Infect Dis 1990; 161:977*

*Kox et al, J Clin Microbiol 1994; 32:672*



# QUALITY ASSURANCE

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ : 42 μήνες  $\Rightarrow$  508 δείγματα και 291 ασθενείς

## *Ερώτηση (1): ποιά ήταν η προέλευση των δειγμάτων ???*

- κατ αναπνευστικό  $\rightarrow$  n = 174 δείγματα (34%)
- άσηπτα υγρά  $\rightarrow$  n = 134 δείγματα (26%)
- αιματοποιητικό  $\rightarrow$  n = 89 δείγματα (18%)

## *Ερώτηση (2): ήταν επαρκής ο αριθμός των δειγμάτων ???*

- πτύελα (39 ασθενείς)  $\rightarrow$  τρία δείγματα: n = 24 (62%)
- ούρα (28 ασθενείς)  $\rightarrow$  τρία δείγματα : n = 18 (64%)

## *Ερώτηση (3): ήταν επαρκής ο όγκος των δειγμάτων ???*

- ΕΝΥ (n = 55)  $\rightarrow$  1.8 ml (εύρος 0.2-10 ml)
- Πλευριτικό (n = 46)  $\rightarrow$  24.5 ml (εύρος 1.5-100 ml)
- Περιτοναϊκό (n = 20)  $\rightarrow$  45.8 ml (εύρος 2.5-160 ml)

# QUALITY ASSURANCE

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: τελευταίοι 13 μήνες  $\Rightarrow$  123 δείγματα και 91 ασθενείς**

***Ερώτηση (4): διενεργήθηκαν πάντα καλλιέργειες για MB ???***

- ΚΑΛ έγινε  $\rightarrow n = 57$  (63%)
- ???  $\rightarrow n = 15$  (17%)
- ΚΑΛ δεν έγινε  $\rightarrow n = 19$  (21%)

***Ερώτηση (5): ποιά ήταν η τελική διάγνωση ???***

- άλλη λοίμωξη  $\rightarrow n = 29$  (32%)
- ???  $\rightarrow n = 21$  (23%)
- άλλη διάγνωση\*  $\rightarrow n = 29$  (32%)
- κακοήθεια  $\rightarrow n = 13$  (14%)
- φυματίωση  $\rightarrow n = 10$  (11%)

\* νόσος Crohn, ρευματοειδής αρθρίτις, κοκκιωμάτωση Wegener, ψευδομεμβρανώδης κολίτις, κίρρωση, ηπατονεφρικό σύνδρομο, επιληψία και άλλα

# QUALITY ASSURANCE

## *Ερώτηση(6): Ορθή Διάγνωση Φυματίωσης ???*

**PCR - θετικοί ασθενείς patients (n=10)** [42 μήνες]

*(17 PCR-θετ / σύνολο 33 δειγμάτων)*

- n = 8 → ΚΑΛ-θετικοί
- n = 1 → ΚΑΛ-αρνητικοί
- n = 1 → ???

**PCR -αρνητικοί ασθενείς (n=6)** [τελευταίοι 13 μήνες]

*με βέβαιη/πιθανή?? διάγνωση TB*

*(6 PCR-αρν / σύνολο 6 δειγμάτων)*

- n = 3 → ανταπόκριση στην θεραπεία (3 πλευριτικά, ΚΑΛ-αρν)
- n = 3 → συμβατή ιστολογική (2 ιστοί σε παραφίνη, ΚΑΛ δεν έγινε)  
+ απόκριση σε θεραπεία (1 βιοψία δέρματος, ΚΑΛ δεν έγινε)

**13 μήνες: 91 ασθενείς, 10 με TB (4 PCR-θετ, 6 PCR-αρν)**

⇒ Ειδικότητα 100%, ΘΠΑ 100%, ΑΠΑ 93%

⇒ Ευαισθησία 40% [ εύρος: 0% (πλευριτικό) έως 100% (κατ αναπνευστικό)]

# TB: QUALITY ASSURANCE

## Συμπεράσματα

- η πλειοψηφία των δειγμάτων (66%) είναι εξωπνευμονικά
- για αυτά τα δείγματα, η ευαισθησία της μοριακής διάγνωσης δεν είναι αξιόλογη

⇒ **Ανάπτυξη στρατηγικής για την βελτίωση της ευαισθησίας**

- πρέπει να διασφαλισθεί η υψηλή ποιότητα των κλινικών δειγμάτων (↑ του αριθμού και ↑ του όγκου των δειγμάτων)
- **όλα τα δείγματα πρέπει να καλλιεργούνται**

⇒ **Ανάπτυξη στρατηγικής για καλύτερη επικοινωνία μεταξύ εργαστηρίου και κλινικών**

- **Η Quality Assurance βελτιώνει την ποιότητα περίθαλψης**

**Άμεση Μοριακή Διάγνωση:  
Συμβολή στην Θεραπεία των Λοιμώξεων**

# Άμεσος Έλεγχος Ευαισθησίας με Μοριακές Μεθόδους

## Προϋποθέσεις Εφαρμογής:

- Κλινική χρησιμότητα της εξέτασης
- Οι συμβατικές μέθοδοι δεν παρουσιάζουν ικανοποιητική απόδοση (ακρίβεια, ταχύτητα ή διαθεσιμότητα)
- Η αντοχή θα πρέπει να συνδέεται με την ύπαρξη συγκεκριμένου γονίδιου ή συγκεκριμένης μετάλλαξης (ή μεταλλάξεις σε μία γενετική περιοχή)
- Πρακτικά Προβλήματα: στην πραγματικότητα το τελευταίο αποτελεί την εξαίρεση παρά τον κανόνα

# Εφαρμογές στην Θεραπεία των Λοιμώξεων

- Προσδιορισμός ιϊκού φορτίου HBV, HCV και HIV
- Προσδιορισμός γονότυπου HCV
- Τυποποίηση HPV
  
- Διάγνωση φορίας VRE (Vancomycin Resistant Enterococcus)
- Διάγνωση φορίας MRSA (Methicillin Resistant S. aureus)
  
- Ανίχνευση αντοχής του M. tuberculosis στην Ισονιαζίδη (INH) και την Ριφαμπικίνη (RIF)

# Διάγνωση φορίας VRE και MRSA

- Η **έγκαιρη** ανίχνευση της φορίας των VRE (ΓΕΣ) και MRSA (ρινικό δείγμα) σε νοσοκομειακούς ασθενείς προλαμβάνει την νοσοκομειακή μετάδοση των σημαντικών αυτών παθογόνων
- Προφύλαξη ασθενών από σημαντική λοίμωξη
- Μεγάλη ελάττωση κόστους



# Έλεγχος Ευαισθησίας ΜΤΒ

## Μέθοδος Αναλογιών σε Αγαρ (gold standard)

- Καλλιεργητική μέθοδος (στερεά)
- **ΧΛΑ: 21 ημέρες (τουλάχιστον)**

## Νεότερες Μέθοδοι Υγρών Καλλιιεργειών (αυτοματοποιημένα συστήματα)

- BACTEC 460, MGIT 960, ESP II System
- απλούστερη μεθοδολογία
- **ΧΛΑ: 8-10 ημέρες**

## Γενετικός Μηχανισμός Αντοχής MTB σε INH και RIF

### 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)

**ΠΡΟΣΟΧΗ:** Η συχνότητα ανίχνευσης των παραπάνω μεταλλάξεων διαφέρει ανάλογα με την γεωγραφική περιοχή απομόνωσης του παθογόνου

## **ΕΜΠΟΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ**

- ανίχνευση αντοχής σε RIF και INH
- PCR και reverse hybridization line probe assays
- ΧΛΑ: 1 ημέρα
- Κόστος: 60 € /test

### **(1) Inno-Lipa Rif TB (Innogenetics)**

- ανίχνευση αντοχής μόνον σε RIF

### **(2) Genotype MTBDR (Hain-Lifescience)**

- ανίχνευση αντοχής σε RIF και INH

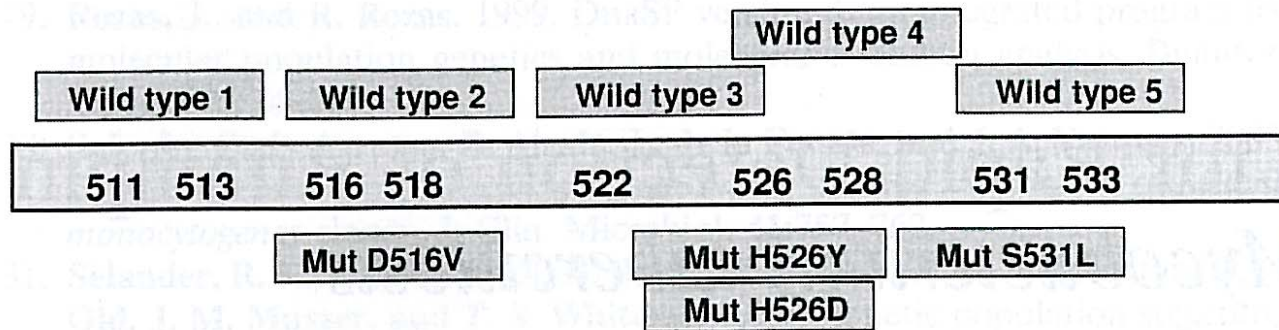


FIG. 1. Locations of probes within the 81-bp hot spot cluster of the *rpoB* gene.

# Μοριακή Ανίχνευση Αντοχής **Στελεχών TB** (με εμπορικές μεθόδους)

## (1) Detection of Resistance to RIF (Inno-Lipa Rif TB)

[μεταλλάξεις του γονιδίου *rpoB*]

Ευαισθησία **> 95%**

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

## (2) Detection of Resistance to RIF (Genotype MTBDR)

[μεταλλάξεις του γονιδίου *rpoB*]

Ευαισθησία → **98.7%** (Γερμανία), **100%** (Γαλλία), **95.1%** (Τουρκία),  
**91.5%** (Ιταλία), **96.4%** (Φινλανδία)

## (3) Detection of Resistance to INH (Genotype MTBDR)

[μεταλλάξεις του γονιδίου *katG*]

Ευαισθησία → **88%** (Γερμανία), **67%** (Γαλλία), **67.1%** (Ιταλία), **73%** (Τουρκία),  
**84.4%** (Finland)

## (4) [μεταλλάξεις του γονιδίου *katG*] + [μεταλλάξεις του γονιδίου της ρυθμιστικής περιοχής *inhA*] (Genotype MTBDRplus)

Ευαισθησία → **92%** (Φινλανδία)

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

## 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)

## **Άμεση Μοριακή Ανίχνευση της Αντοχής**

- Μέθοδος Genotype MTBDR
- Μόνο για δείγματα με (+) Οξ. Χρώση (αναπνευστικό)

*Somoskovi et al, J Clin Microbiol 2006, 44:4459-63*

- ανίχνευση RIF-R → Ευαισθησία 90.9%
- ανίχνευση INH-R → Ευαισθησία 94.4%

*Hillemann D et al, J Clin Microbiol 2007, 44:2635-40*

- ανίχνευση RIF-R → Ευαισθησία 96.8%
- ανίχνευση INH-R → Ευαισθησία 90.2%

# **Ποια είναι τα οφέλη της άμεσης διάγνωσης της αντοχής της INH και RIF ??**

- Άμεση τροποποίηση της αγωγής του ασθενούς
- Άμεση τροποποίηση της προφυλακτικής αγωγής στα εκτεθειμένα άτομα
- Άμεση αναγνώριση μιας ειδικής κατηγορίας «επικίνδυνων» ασθενών

→ **Αποτελεί μία από τις σημαντικότερες εφαρμογές της Άμεσης Μοριακής Διάγνωσης**

# **Συμπεράσματα**



# Άμεση Μοριακή Διάγνωση

## **Μειονεκτήματα** Μεθόδων Πολλαπλ. Νουκλεϊνικών Οξέων

1. **Ψευδώς θετικά αποτελέσματα** (ειδικότητα, επιμόλυνση, θεώρημα του Bayes)
2. **Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα** (ευαισθησία, χαμηλό μικροβιακό φορτίο στο κλινικό δείγμα, παρουσία αναστολέων)
3. **ΧΛΑ** (επηρεάζεται από τον αριθμό των εξετάσεων και την αριθμητική επάρκεια του προσωπικού)
4. **Τεχνικά περίπλοκες μέθοδοι** (εκπαίδευση και εξειδίκευση προσωπικού)
5. **Κόστος**

## Άμεση Μοριακή Διάγνωση

### **Μειονεκτήματα** Μεθόδων Πολλαπλ. Νουκλεϊνικών Οξέων

6. **Ιδιαιτερότητες κλινικής αξιολόγησης αποτελεσμάτων**  
(ανίχνευση νουκλεϊνικών οξέων ακόμα και νεκρών οργανισμών)
7. **Δεν αντικαθιστούν τις καλλιέργειες**
  - Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά
  - Απομόνωση απαραίτητη για περαιτέρω μελέτες
  - Αναγνώριση πολυμικροβιακών λοιμώξεων
  - Σημασία συγκέντρωσης μικροβίων

## Άμεση Μοριακή Διάγνωση

### **ΠΡΟΫΠΟΘΕΣΕΙΣ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΕΞΕΤΑΣΕΩΝ**

- Απαιτούνται γνώσεις για την εφαρμογή τους, την διενέργεια τους και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων τους
- Αποτελούν εξειδικευμένες εξετάσεις που χρειάζεται να εκτελούνται σε εξειδικευμένα «Κέντρα»
- Ωστόσο, (είτε τις διενεργούμε, είτε όχι) ως Βιοπαθολόγοι οφείλουμε να είμαστε άριστα ενημερωμένοι αναφορικά με αυτές

- **1990 → 2006**
- **Η εφαρμογή των μεθόδων της Μοριακής Βιολογίας στην Κλινική Μικροβιολογία αποτελεί το ορόσημο μίας καινούργιας εποχής**

Έχουμε ένα νέο, πολύτιμο εργαλείο:

- που δίνει λύσεις σε ιστορικά προβληματικές εργαστηριακές διαγνώσεις (αλλά όχι σε όλες)
- που οδηγεί στην καλύτερη θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών μας
- **και που συνεχίζει να εξελίσσεται**

Επίσης, έχουμε:

- νέα προβλήματα
- νέες διαγνωστικές υπευθυνότητες
- **αλλά και νέες προκλήσεις**