ΝΕΟΤΕΡΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΚΛΙΝΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ ΕΙΝΑΙ
Η ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ

ΤΕΛΟΣ ΤΗΣ ΕΜΠΕΙΡΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ

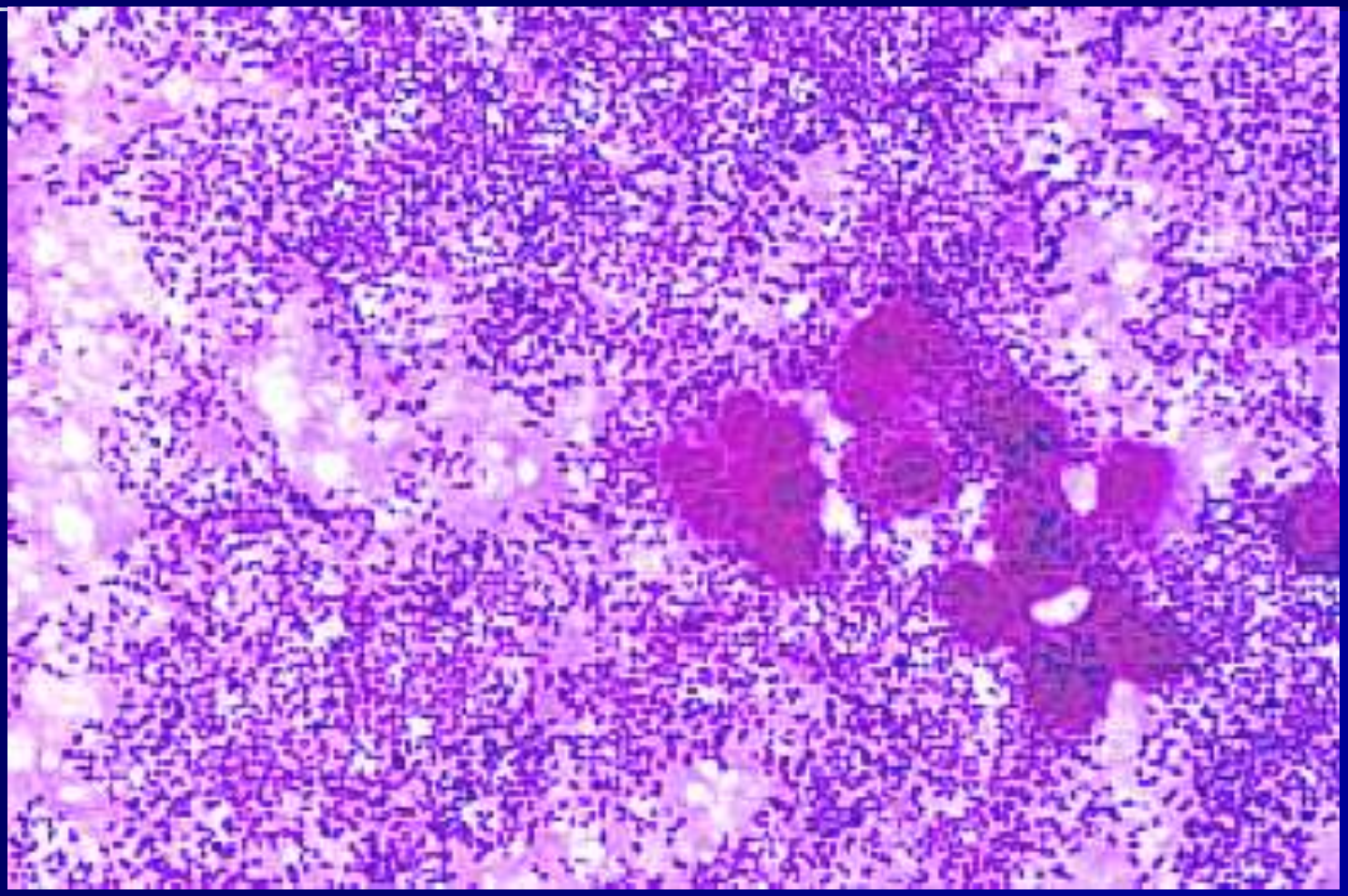
ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ

- άμεση μικροσκόπηση του παθολογικού υλικού
- απομόνωση του μικροοργανισμού σε καθαρό καλλιέργεια
- ταυτοποίηση βάσει των φαινοτυπικών και βιοχημικών χαρακτήρων
- Έλεγχος της ευαισθησίας του μικροοργανισμού (ΑΝΤΙΒΙΟΓΡΑΜΜΑ)

ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΗΣΗ

- Περιορισμένη ειδικότητα και ευαισθησία
- Παρουσία μεγάλου αριθμού μικροβίων (10.000/mL βιολογικού υγρού)
- Κατάλληλη χρώση και τεχνική (π.χ. σκοτεινό πεδίο)
- Λανθασμένη επιλογή τεχνικής
- Δυσχερής η μορφολογική αναγνώριση
- Εμπειρία

Πνευμονιόκοκκοι ► ΕΝΥ άμεσο



ΔΥΣΚΟΛΙΕΣ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

- Δυσκολίες στην απομόνωση μικροοργανισμών οι οποίοι αναπτύσσονται δύσκολα ή καθόλου σε καλλιεργητικά υλικά

(Mycobacterium tuberculosis, Chlamydia trachomatis, *Mycoplasma*, HIV,HSV, HPV,HBV)

ΟΡΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

- Η εισαγωγή νεότερων τεχνικών όπως των ορολογικών αντιδράσεων έδωσε λύση σε αρκετές αλλά όχι σε όλες τις περιπτώσεις όπου η απομόνωση του μικροοργανισμού ήταν δύσκολη
- Ιογενείς λοιμώξεις

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΟΡΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ

- Απουσία αντισωμάτων στην αρχική φάση της νόσου
- Απαραίτητη η λήψη δύο δειγμάτων με διαφορά 15νθημέρου το ένα από το άλλο
- Αδυναμία παραγωγής αντισωμάτων σε άτομα με ανοσοανεπάρκεια
- Συγκεκριμένη αίτηση αντισωμάτων-ανεπαρκής διαγνωστική κάλυψη

ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΡΟΥΤΙΝΑΣ ΕΝΟΣ ΚΛΙΝΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

- αδυναμία καλλιέργειας κάποιων βακτηρίων (μυκοπλάσματα, χλαμμύδια, ρικέτσιες κλπ)-δυσκολία στη διάγνωση
- αδυναμία απομόνωσης του παθογόνου αίτιου λόγω χορήγησης αντιμικροβιακής θεραπείας
- Αδυναμία απομόνωσης ιών
- τυποποίηση των βακτηρίων-επιδημιολογία λοιμώξεων

Η εισαγωγή των μοριακών μεθόδων έγινε με κύριο σκοπό να επιλυθούν οι αδυναμίες των κλασσικών μεθόδων, έτσι ώστε ο αιτιολογικός παράγοντας της λοίμωξης να ταυτοποιείται αξιόπιστα και γρήγορα

Η ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας και η εισαγωγή των μοριακών τεχνικών στη μελέτη των μικροοργανισμών μετέβαλλε ριζικά τις τεχνικές διάγνωσης των λοιμώξεων

Σύγχρονο Μικροβιολογικό Εργασήριο

- εξοικείωση με τη χρήση των μοριακών τεχνικών
- επιλογή και σχεδιασμός καταλληλότερης μεθοδολογίας, η οποία κατά κύριο λόγο εξαρτάται από το κλινικό δείγμα
- περιορισμός του κόστους, ασφάλεια
- Εμπορικά kits, in house μέθοδοι

ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΣΤΟ ΚΛΙΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

- η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR)

- η τεχνική του υβριδισμού

ή

- συνδυασμός των δύο τεχνικών

Αρχή της PCR

Θεωρητικά από 1 αντίγραφο DNA μπορεί να παραχθούν εκατομμύρια αντίγραφα

Χρησιμοποιείται σε δείγματα για ανίχνευση-χαρακτηρισμό γενετικού μικροβιακού υλικού

- Υψηλή ευαισθησία
- Χαμηλότερη ειδικότητα

Βασικές αρχές του υβριδισμού

Ομοιότητα του βακτηριακού DNA με την αλληλουχία του ιχνηθέτη που έχουμε επιλέξει

Η πρόσδεση του βακτηριακού DNA με τον ιχνηθέτη ανιχνεύεται με διάφορους τρόπους

- Χρησιμοποιείται για ανίχνευση-χαρακτηρισμό γενετικού μικροβιακού υλικού

- Εξαιρετική ειδικότητα
- Υπολείπεται σε ευαισθησία σε σχέση με την PCR

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

- άμεση ανίχνευση μικροοργανισμού στο κλινικό δείγμα
- Ταυτοποίηση των μικροοργανισμών
- Διερεύνηση της αντοχής σε μοριακό επίπεδο
- Μοριακή τυποποίηση για έλεγχο ενδο-νοσοκομειακών λοιμώξεων

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ

1. **Άμεσα στο κλινικό δείγμα (4h)**

- **ανίχνευση-ταυτοποίηση του μικροοργανισμού**
- **ανίχνευση γνωστών γονιδίων αντοχής και γονιδίων παθογονικότητας**

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ

- Ανίχνευση απαιτητικών μικροβίων (χλαμμυδίων, ιών κλπ)
- Εφαρμογή αιτιολογικής θεραπείας
- Λήψη μέτρων πρόληψης (φυματίωση)

Μεθοδολογία: PCR, υβριδισμός

Διάγνωση λοίμωξης με εφαρμογή μοριακής μεθόδου άμεσα στο κλινικό δείγμα

- μηνιγγίτιδα
- σηψαιμία
- φυματίωση

Άμεση ανίχνευση του μικροοργανισμού στο κλινικό δείγμα

- ανίχνευση-ταυτοποίηση του μικροοργανισμού σε σοβαρή λοίμωξη (σηψαιμία, μηνιγγίτιδα κλπ)
- απάντηση σε συντομότερο διάστημα (π.χ. *Mycobacterium tuberculosis)*
- ανεξάρτητη από προηγηθείσα αντιμικροβιακή θεραπεία

ΠΡΟΥΠΟΘΕΣΕΙΣ

- Είδος του δείγματος
- Σχεδιασμός διαγνωστικής προσέγγισης ανάλογης με την ιδιαιτερότητα του δείγματος
- Απομόνωση γενετικού υλικού
- Καταλληλότητα δείγματος

Παράλληλα με την άμεση μικροσκόπηση του δείγματος και την κλασσική καλλιέργεια

- Απομόνωση DNA από το δείγμα
- Έλεγχος καταλληλότητας του DNA (ύπαρξη DNA, απουσία αναστολέων)
- Χρησιμοποιείται ζεύγος εκκινητών ειδικών ή μη ειδικών (16S)

- Ειδικοί εκκινητές : άμεσο αποτέλεσμα (4 ώρες)

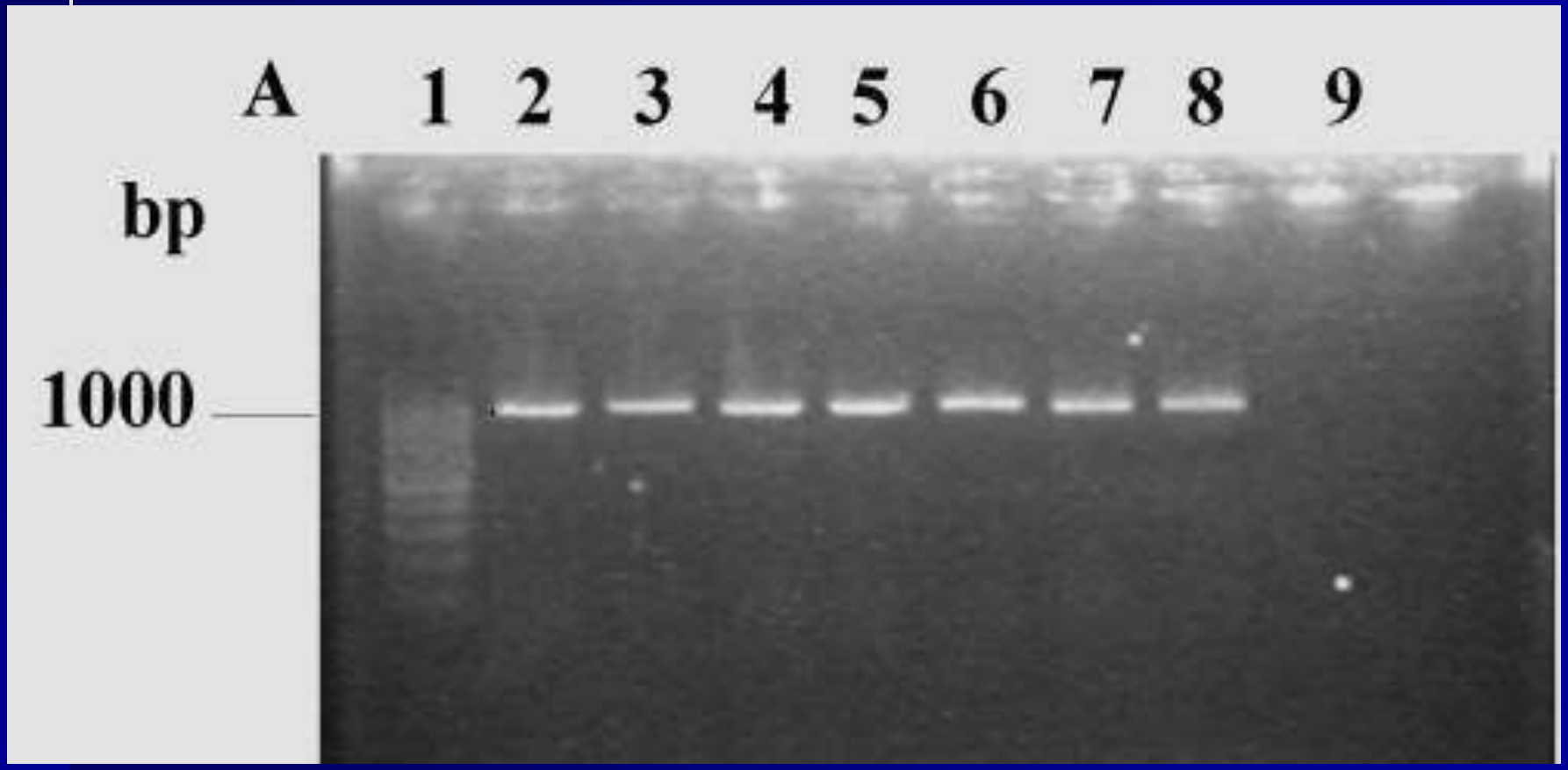
- 16S rRNA: ότι υπάρχει βακτηριακό γενετικό υλικό (4 ώρες)

Χρειάζεται επιλέον διαδικασία για ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους και είδους

- Περιορισμοί της κλασσικής PCR-ειδικότητα εκκινητών
- Ανάγκη εισαγωγής της *16S rRNA* PCR
- Εκκινητές κοινοί για όλα τα βακτηριακά είδη

Προιόντα PCR μετά από πολλαπλασιασμό του 16S rRNA διαφόρων βακτηρίων. Γραμμή 1: μάρτυρας μοριακών βαρών, 2: *Staphylococcus* spp, 3: *E. Coli*, 4: *Klebsiella spp*, 5: *Enterococcus* spp, 6: *S. pneumoniae*, 7: *Streptococcus* spp

8: *Pseudomonas* spp, 9: αρνητικός μάρτυρας



δεύτερο στάδιο- ταυτοποίηση

- Μέθοδος υβριδισμού (ταινίες με DNA συγκεκριμένων μικροβίων)-απάντηση σε ώρες

  Χρήση σε *Mycobacterium* spp

ή

Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κατά Sanger

Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

- Ανάλυση κατά Sanger (sequencing)
- Σύγκριση της συγκεκριμένης αλληλουχίας με όλες τις γνωστές μέχρι σήμερα αλληλουχίες μέσω μιας τράπεζας BLAST-GENOME
- Η ομοιότητα πρέπει να είναι πάνω από 97.5% για να είμαστε βέβαιοι ότι το βακτήριο ανήκει στο συγκεκριμένο γένος

Συνδυασμός μοριακών και συμβατικών μεθόδων

- Αίμα (16S rRNA)
- Υγρά (περιτοναικό, πλευριτικό, αρθρικό) (16S rRNA)
- ΕΝΥ (H, N, Pn)
- Πτύελα (*M. tuberculosis*)
- Βρογχικές εκκρίσεις (*M. tuberculosis, Pneumocystis carinni*)
- Ιστοί (16S rRNA)
- Τραχηλικό/ουρηθρικό επίχρισμα (*Mycoplasma, Chlamydia)*

???

- **ggaattactg ggcgtaaagc** gcacgcaggc ggttgcccaa gtcagatgtg aaagccccgg gcttaacctg ggaactgcat ttgaaactgg gcgactagag tatgaaagag gaaagcggaa tttccagtgt agcagtgaaa tgcgtagata ttggaaggaa caccgatggc gaaggcagct ttctgggtcg atactgacgc tcatgtgcga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgccctaaa cgatgtcaac taggcgtcgg gttgttaaag actcggtgcc ggagctaacg cattaagttg accgcctggg gagtacggcc gcaaggttga aactcaaaga aattgacggg gacccgcaca agcggtggag catgtggttt aattcgatgc aacgcgaaga accttaccag gccttgacat cctaggaact tggcagagat gccttggtgc cttcgggaac ctagagacag gtgttgcatg **gctgtcgtca gctcgtgtcg**

Σύγκριση της αλληλουχίας

- *Cardiobacterium hominis 16S riboso…* 100%
- *C.hominis 16S ribosomal RNA* 99%
- *Cardiobacterium sp. A 16S ribo 993* 99%
- *Unidentified proteobacterium …* 98%
- *Cardiobacterium valvarum 16S ribos…* 97%
- *Cardiobacterium valvarum strain CC…* 97%
- *Cardiobacterium valvarum strain CC…* 96%

PCR σε αίμα για ανίχνευση μικροβιακού DNA

No	PCR σε αίμα	κ/α αίματος
300	300(-)	300 (-)
26	9 (+)	26 (+)

Ειδικότητα 100 %

Ευαισθησία 34.61%

Εξαρτάται η ευαισθησία της PCR στο αίμα από τον αριθμό των μικροβιακών κυττάρων

PCR σε περιτοναικά υγρά

No	PCR σε	κ/α
30	30(-)	30 (-)
4	2 (+)	4 (+)

Ειδικότητα 100 %
Ευαισθησία 50%

Εξαρτάται η ευαισθησία της PCR από τον αριθμό των μικροβιακών κυττάρων
Προσπάθεια αύξησης της ευαισθησίας/ προ-επώαση πριν την απομόνωση του DNA

PCR απευθείας σε ΕΝΥ για ανίχνευση μικροβιακού DNA με χρήση ειδικών εκκινητών (4 ώρες)

No	PCR σε ΕΝΥ	κ/α ΕΝΥ
60	48 (-)	48 (-)
	12 (+)	8 (+)

S. pneumoniae, N. meningitidis, H. influenzae type *b*

PCR σε ιστούς από ασθενείς με ορθοπαιδικές λοιμώξεις

Χαμηλή ευαισθησία των κλασσικών μεθόδων λόγω

- προηγούμενης αντι-μικροβιακής θεραπείας
- κακής λήψης δείγματος
- ανεπάρκεια του εργαστηρίου
- δημιουργία βιομεμβράνης
- μεικτή λοίμωξη, *Alcanindiges illinoisensis, Comamonas terrigena,* άγνωστα αναερόβια

Raoult et al, J Clin Microbiol 2000, 1018-1028

Ορθοπαιδική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας 2006

52 ασθενείς	Gram stain	καλλιέργεια	Παρουσία βακτηριακού DNA
θετικά	+ +++ πυοσφαίρια	Θετικά 22 Ασθενείς	52 Ασθενείς
αρνητικά	+ + ++ πυοσφαίρια	Αρνητικά 30 Ασθενείς	

Ταυτοποίηση του μικροβιακού DNA

16 *Escherichia coli* (10 positive culture)
10 *Staphylococcus aureus* (5 positive culture)
10 *Staphylococcus epidermidis* (5 positive culture)
2 *Enterococcus faecalis* (1 positive culture)
2 *Streptococcus pneumoniae* (1 positive culture)
2 *Streptococcus group B*
2 *Streptococcus group A*
2 *Pseudomonas aeruginosa*
1 *Bacteroides fragilis* + *Peptostreptococcus*
1 *Fusobacterium*
3 *Kingella kingae*
1 *Eikenella corrodens*

Παρουσία DNA στο κλινικό δείγμα κλινική σημασία

- Νεκρά ή ζωντανά μικροβιακά κύτταρα

- **Έλεγχος βιωσιμότητας του μικροοργανισμού (εκχύλιση RNA από το κλινικό δείγμα, RT-PCR)**

Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας 2006

30 ασθενείς	Gram χρώση	καλλιέργεια	Έλεγχος για παρουσία μικροβιακού DNA	βιωσιμότητα
30 ασθενείς	+ + + + πυοσφαίρια	αρνητική	30 ασθενείς	25 ασθενείς

	Sperm (n=61)	Urethral (n=34)	Vaginal (n=43)	Cervical (n=2)	Total (n=140)
U. parvum	16	5	32	1	54
U. parvum + U. urealyticum	1	1			2
U. parvum + M. hominis	2		1		3
U. urealyticum	4		1		5
U. urealyticum + M. hominis		1			1
U. urealyticum + M. genitalium		1			1
Total positive signals	**23/10**	**8/1**	**34/13**	**1/0**	**64/ 23**

Εισαγωγή της Real time PCR στην κλινική διαγνωστική

- Δυνατότητα ποσοτικοποίησης του ιικού φορτίου σε κλινικό δείγμα

Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΗΤΑΝ ΚΑΘΟΡΙΣΤΙΚΗ

η εξάπλωση της μικροβιακής αντοχής επέβαλλε τη διερεύνηση σε μοριακό πλέον επίπεδο των μηχανισμών που ευθύνονται

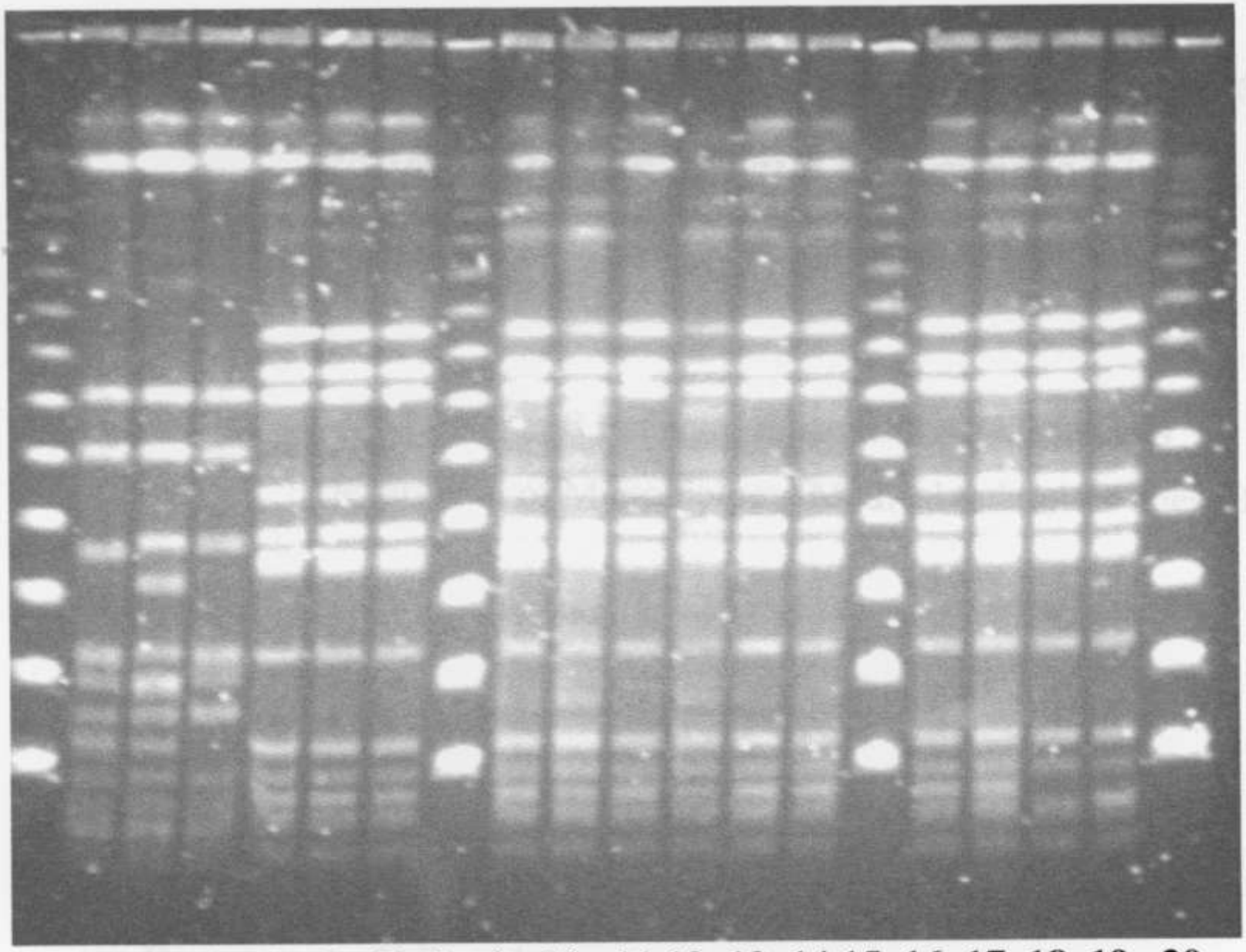
Η εξάπλωση στο νοσοκομειακό περιβάλλον

πολυανθεκτικών μικροοργανισμών επέβαλλε τη τυποποίηση αυτών

(στελέχη που συνδέονται κλωνικά μεταξύ τους έχουν κοινά χαρακτηριστικά)

Πλεονεκτήματα της PFGE

- μέθοδος αναφοράς για διερεύνηση ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων
- μεγάλη επαναληψιμότητα
- διαθέσιμα εμπορικά kits (*Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* etc)
- μειονέκτημα η σύγκριση των στελεχών


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΚΛΩΝΟΥ ΣΕ ΜΙΑ ΚΛΙΝΙΚΗ

- ΜΕΤΆΔΟΣΗ ΑΠΟ ΑΣΘΕΝΗ ΣΕ ΑΣΘΕΝΗ
- ΛΗΨΗ ΕΙΔΙΚΩΝ ΜΕΤΡΩΝ ΠΡΟΛΗΨΗΣ
- ΕΝΗΜΕΡΩΣΗ ΤΟΥ ΙΑΤΡΙΚΟΥ ΚΑΙ ΠΑΡΑΙΑΤΡΙΚΟΥ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟΥ

ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΚΛΩΝΩΝ

- ΕΥΡΕΙΑ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ
- ΑΛΛΑΓΗ ΠΟΛΙΤΙΚΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΤΗΣ

ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ

Πλεονεκτήματα των μοριακών τεχνικών έναντι των κλασσικών τεχνικών

- Ταχύτητα στην ανίχνευση του αιτιολογικού παράγοντα της λοίμωξης
- Σημαντική βοήθεια στη διερεύνηση των ενδονοσοκομειαών λοιμώξεων

Μειονεκτήματα των μοριακών τεχνικών έναντι των κλασσικών τεχνικών

- βιωσιμότητα και **λοιμογόνο δύναμη** του βακτηρίου
- ευαισθησία του βακτηρίου στα διάφορα αντι-μικροβιακά φάρμακα
- υψηλό κόστος ?
- εξειδικευμένο προσωπικό ?
- κατάλληλο εξοπλισμό ?

Αξιολόγηση του αποτελέσματος

- Απαιτεί εμπειρία
- Συνδυασμός με τα αποτελέσματα των συμβατικών μεθόδων
- Επικοινωνία με τον κλινικό ιατρό