Μοριακές Μέθοδοι στη διάγνωση βακτηριακών λοιμώξεων

Επιλογή Μεθοδολογίας

- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
- Υβριδισμός

στην ανίχνευση γενετικού μικροβιακού υλικού

ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΛΟΙΜΩΞΗΣ

- Ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο

σύγκριση της γενετικής ομοιότητας ανάμεσα σε μικροοργανισμούς

ΠΡΟΛΗΨΗ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ

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

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 κλπ)
- Εφαρμογή αιτιολογικής θεραπείας
- Λήψη μέτρων πρόληψης

Μεθοδολογία: PCR, υβριδισμός

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ

2. Μοριακή ταυτοποίηση του μικροοργανισμού από καθαρό καλλιέργημα

ταυτοποίηση μυκοβακτηριδίων, χαρακτηρισμός νέων παθογόνων κλπ

Μεθοδολογία: PCR-υβριδισμός

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ

3. Διερεύνηση των μηχανισμών αντοχής

- αδυναμία των φαινοτυπικών μεθόδων

Παράδειγμα: στελέχη *S. aureus mecA*(+) με ενδιάμεση αντοχή στα β-λακταμικά αντιβιοτικά

Μεθοδολογία: PCR, etc

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ

4. Διερεύνηση ενδο-νοσοκομειακών λοιμώξεων

Διασπορά από ασθενή σε ασθενή με σκοπό τη λήψη μέτρων πρόληψης

Μεθοδολογία: PFGE

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ

5. Κατανόηση της παθογένειας των λοιμώξεων

π.χ. υποτροπιάζουσα φαρυγγο-αμυγδαλίτιδα, υποτροπές ορθοπαιδικών λοιμώξεων

(ενδοκυττάρια μικρόβια)

ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ

ΜΥΘΟΣ

ή

ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ???

Διάγνωση λοίμωξης με εφαρμογή μοριακής μεθόδου άμεσα στο κλινικό δείγμα

- μηνιγγίτιδα
- σηψαιμία
- φυματίωση

Ερωτήματα

- Εφαρμογή στο εργαστήριο ρουτίνας και σε ποιες περιπτώσεις ???
- Κόστος??
- Εμπορικά kits ή *in house* μέθοδοι??

ΠΡΟΥΠΟΘΕΣΕΙΣ

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

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

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*

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

Εισαγωγή της ευρέως φάσματος *16S rRNA* PCR στη διάγνωση των λοιμώξεων

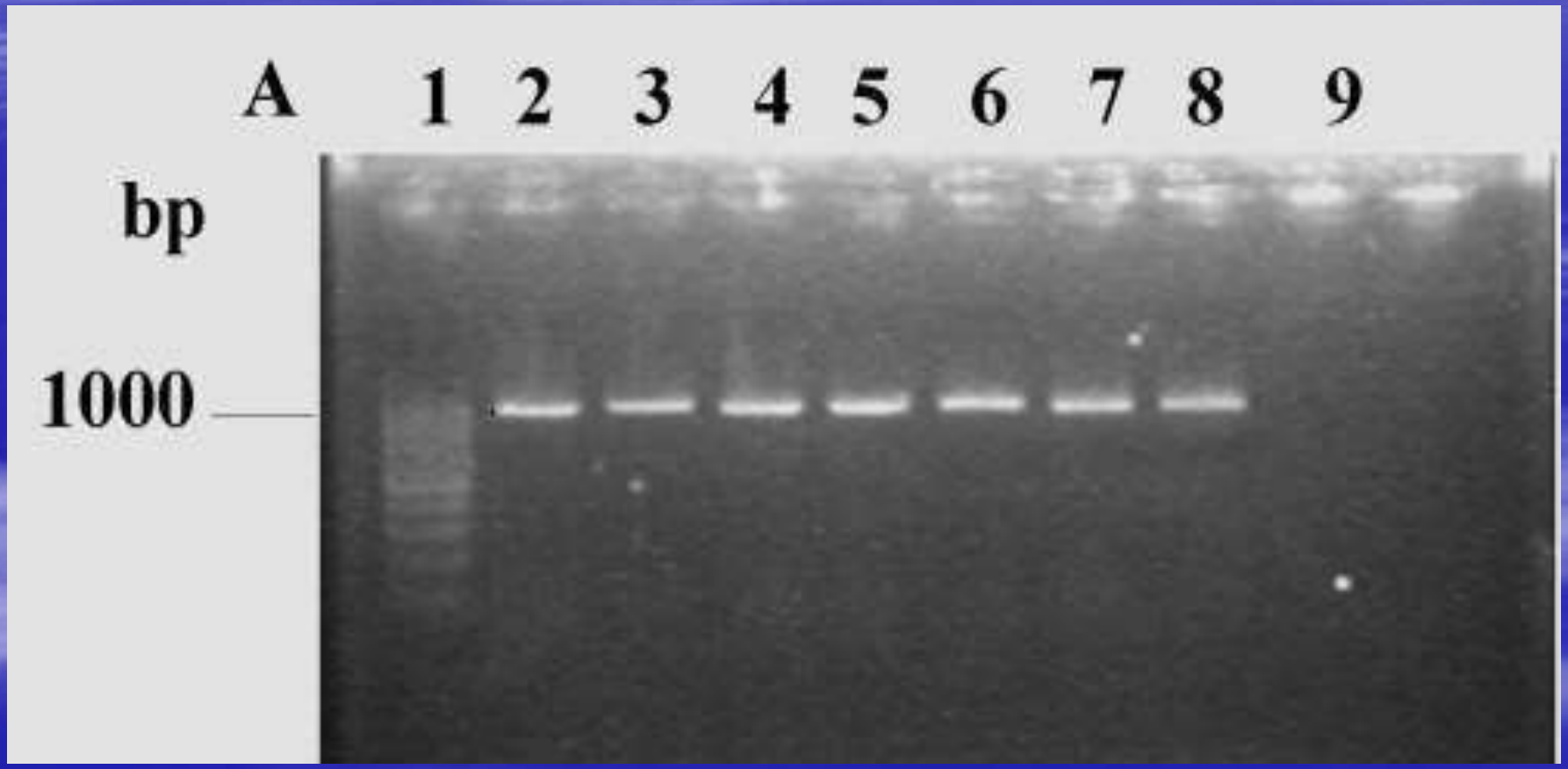
- μεγάλο φάσμα μικροοργανισμών
- ταυτοποίηση αξιόπιστη σε επίπεδο είδους
- χαρακτηρισμός νέων παθογόνων
- δυνατότητα ανίχνευσης περισσότερων από ένα είδη μικροοργανισμών
- δυνατότητα εφαρμογής στο εργαστήριο ρουτίνας
- ΕΝΥ, πλευριτικό, αρθρικό, ιστοί, αίμα κλπ

Παράλληλα με την κλασσική καλλιέργεια

πρώτο στάδιο (απάντηση σε 4 h)

- Απομόνωση DNA από το δείγμα (32 ασθενείς)
- Έλεγχος καταλληλότητας του DNA (ύπαρξη DNA, απουσία αναστολέων)
- Χρησιμοποιείται ζεύγος εκκινητών κοινών για όλα τα μικρόβια (*16S rRNA*)
- **Ύπαρξη ή όχι μικροβιακού DNA**
- Αδυναμία ταυτοποίησης σε επίπεδο γένους και είδους

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

ή

- Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κατά Sanger

Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

- Ανάλυση κατά Sanger (sequencing)
- Σύγκριση της συγκεκριμένης αλληλουχίας 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

ggaattactgggcgtaaagc gcacgcaggc ggttgcccaa
gtcagatgtg aaagccccgg gcttaacctgg gaactgca
ttgaaactgg gcgactagag tatgaaagag gaaagcgga
atttccagtgt 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 rRNA* 100%

Διάγνωση σηψαιμίας

- αιμοκαλλιέργεια (αυτόματα συστήματα)
- Gram-χρώση, καλλιέργεια σε στερεά υλικά
- δοκιμασίες ταυτοποίησης-έλεγχος ευαισθησίας
- απάντηση στον κλινικό ιατρό

πολλαπλά θεραπευτικά σχήματα

Διάγνωση σηψαιμίας

γρήγορη ταυτοποίηση του υπεύθυνου μικροοργανισμού με τη χρήση μοριακών τεχνικών

Μεθοδολογία

- λήψη ολικού αίματος ή ορού
- εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης
- ταυτοποίηση του γενετικού υλικού του μικροοργανισμού

Εμπορικά kits, *in house* μέθοδοι

Εμπορικά kits

- HAIN (PCR-υβριδισμός)
- Septi*Fast* PCR test (Real-time PCR) (16S, probes)

Ταυτόχρονα στο ίδιο δείγμα

- Gram(-) βακτηρίδια

  (E. Coli, Klebsiella, Serratia, Enterobacter, Acinetobacter, Proteus, Pseudomonas, Stenotrophomonas etc)

- Gram(+)

  (*S. aureus*, *Enterococcus*, S. pneumoniae, CoNS, *Streptococcus* sp etc)

Septi*Fast* test

- *Candida albicans*
- *Candida tropicalis*
- *Candida parapsilosis*
- *Candida krusei*
- *Candida glabrata*
- *Aspergillus fumigatus*

Πλεονεκτήματα

- ταυτόχρονη ανίχνευση διαφορετικών παθογόνων στο ίδιο δείγμα
- περίπου 3ml αίματος / αντίδραση
- η χρήση αντιβιοτικών δεν επηρεάζει το αποτέλεσμα
- ταχύτητα στη διάγνωση (4-6 ώρες)
- οικονομία (κόστος ΜΕΘ/ ημέρα 1444 €)

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

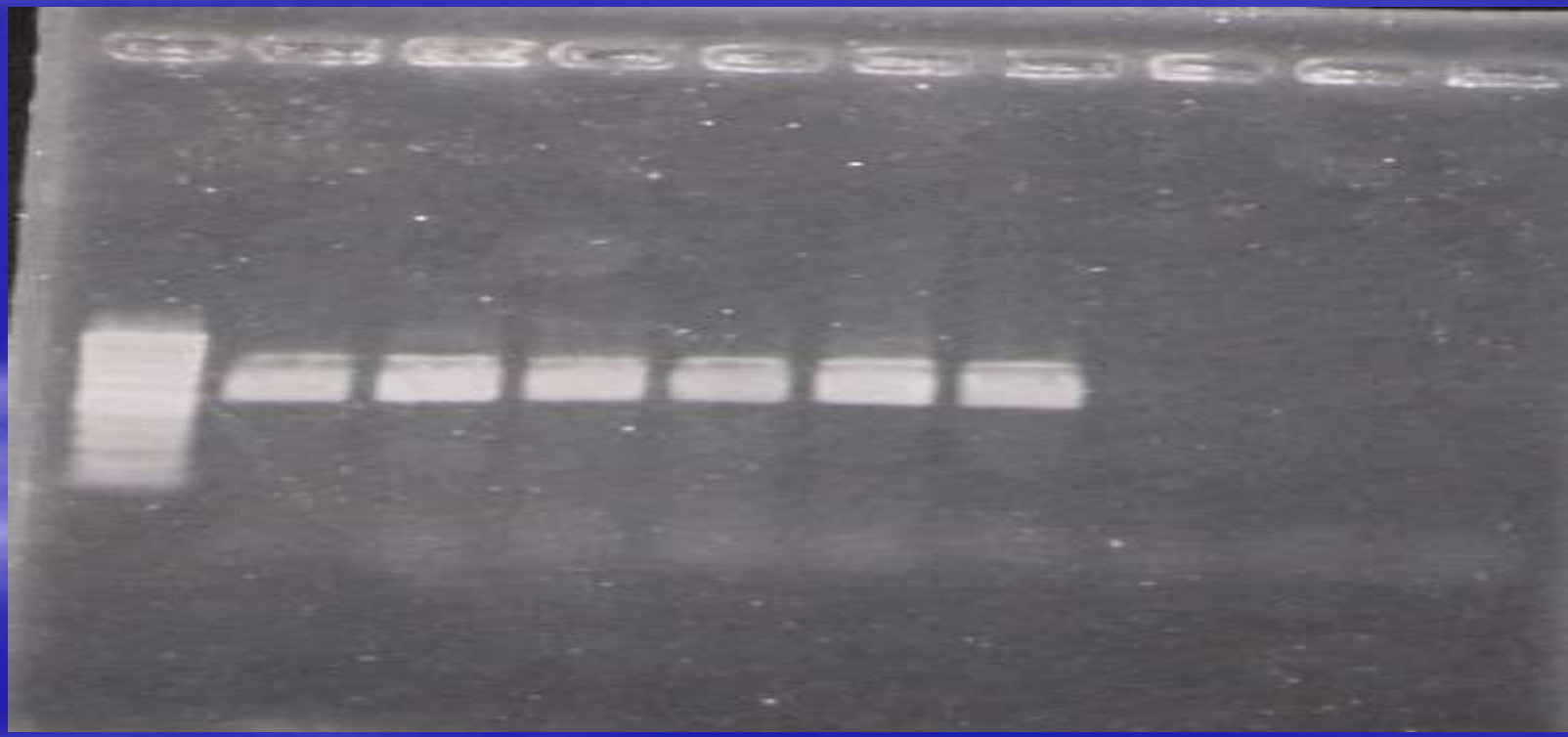
ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Σε επίπεδο γένους

- *16S rRNA* + ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας
- *16S rRNA* +υβριδισμό
- εκκινητές ειδικοί του γένους +ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας
- εκκινητές ειδικοί του γένους +υβριδισμό

Β. Ζεύγος εκκινητών κοινό για όλα τα είδη του γένους των μυκοβακτηριδίων

π.χ. *Mycobacterium* spp



ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΕ σε ΕΠΙΠΕΔΟ ΕΙΔΟΥΣ

Α. Εκκινητές ειδικοί για κάθε είδος σε περιπτώσεις που ξέρεις το γένος

- Υψηλό κόστος, μεγάλη ποικιλία

gram-θετικός κόκκος, καταλάση-αρνητικός
π.χ. *E. faecalis*
E. faecium
E. gallinarum
E. avium

Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ

- Panton-Valentin leukocidin gene
- TSST-1
- Γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή βιομεμβράνης
- Γονιδίων αντοχής σε διάφορα αντιμικροβιακά φάρμακα

Πλεονεκτήματα των μοριακών τεχνικών έναντι των κλασσικών τεχνικών

- Ταχύτητα στην ανίχνευση-ταυτοποίηση του λοιμογόνου παράγοντα
- Σημαντική βοήθεια στη κατανόηση της παθογένειας των λοιμώξεων
- Ανίχνευση νέων παθογόνων

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

ΗΜΕΡΙΔΑ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

24 ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΥ 2009

ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ

Ε. ΠΕΤΕΙΝΑΚΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΤΟΧΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

Ανίχνευση του αιτιολογικού παράγοντα λοίμωξης με σκοπό την εφαρμογή κατάλληλης αντιμικροβιακής θεραπείας

Μοριακές τεχνικές

α. ανίχνευση μηχανισμών αντοχής (γονίδια αντοχής,μεταλλάξεις κλπ)

β. διευκρίνιση τρόπου διασποράς της αντοχής

ΑΝ και ΠΟΤΕ

βοηθά η μοριακή ανίχνευση της αντοχής στο κλινικό μικροβιολογικό εργαστήριο

α. γρήγορη ανίχνευση της αντοχής

β. ελλείματα φαινοτυπικών μεθόδων

γ. επιδημιολογική επιτήρηση

Δυνατότητα ανίχνευσης γονιδίων άμεσα στο στέλεχος

3 ώρες / 16-18 ώρες

Μοριακές/ Κλασσικές

Εφαρμογές

- Βακτήρια (*Mycobacterium tuberculosis, Helicobacter pylori)*
- Ιοί (ηπατίτιδα Β, HIV)

BOX 48-5

Antituberculous Agents Commonly Tested Against *M. tuberculosis*

PRIMARY DRUGS	SECONDARY DRUGS
Streptomycin	Ethionamide
Isoniazid	Capreomycin
Rifampin	Ciprofloxacin
Ethambutol	Ofloxacin
Pyrazinamide	Kanamycin
	Cycloserine
	Rifabutin

Φυσική αντοχή σε πυραζιναμίδη

- *Mycobacterium bovis*
- *Mycobacterium canettii*

μετατροπή σε πυραζινοικό οξύ (POA) λόγω παρουσίας της πυραζιναμιδάσης

- μετάλλαξη στο *pncA* (γονίδιο που κωδικοποιεί την πυραζιναμιδάση)

Μοριακή ανίχνευση αντοχής σε ισονιαζίδη και ριφαμπικίνη

- Μεταλλάξεις *στο katG* (αντοχή σε ισονιαζίδη)
  inhA
- Μεταλλάξεις *στο rpoB* (αντοχή σε ριφαμπικίνη)
- MTBDR plus assay (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany)

ΜΕΘΟΔΟΣ

- ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ
- ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ

ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

- ΑΜΕΣΑ ΣΤΟ ΚΛΙΝΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ
- ΣΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ
- ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΜΕΘΟΔΟΥ 4 ΩΡΕΣ

ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

- ΣΥΣΚΕΥΗ PCR
- ΦΟΥΡΝΟ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ ΔΙΑΘΕΣΙΜΟ ΜΑΖΙ ΜΕ ΤΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

ΤΟ ΑΝΤΙΒΙΟΓΡΑΜΜΑ ΧΡΕΙΑΖΕΤΑΙ ΝΑ ΓΙΝΕΤΑΙ?

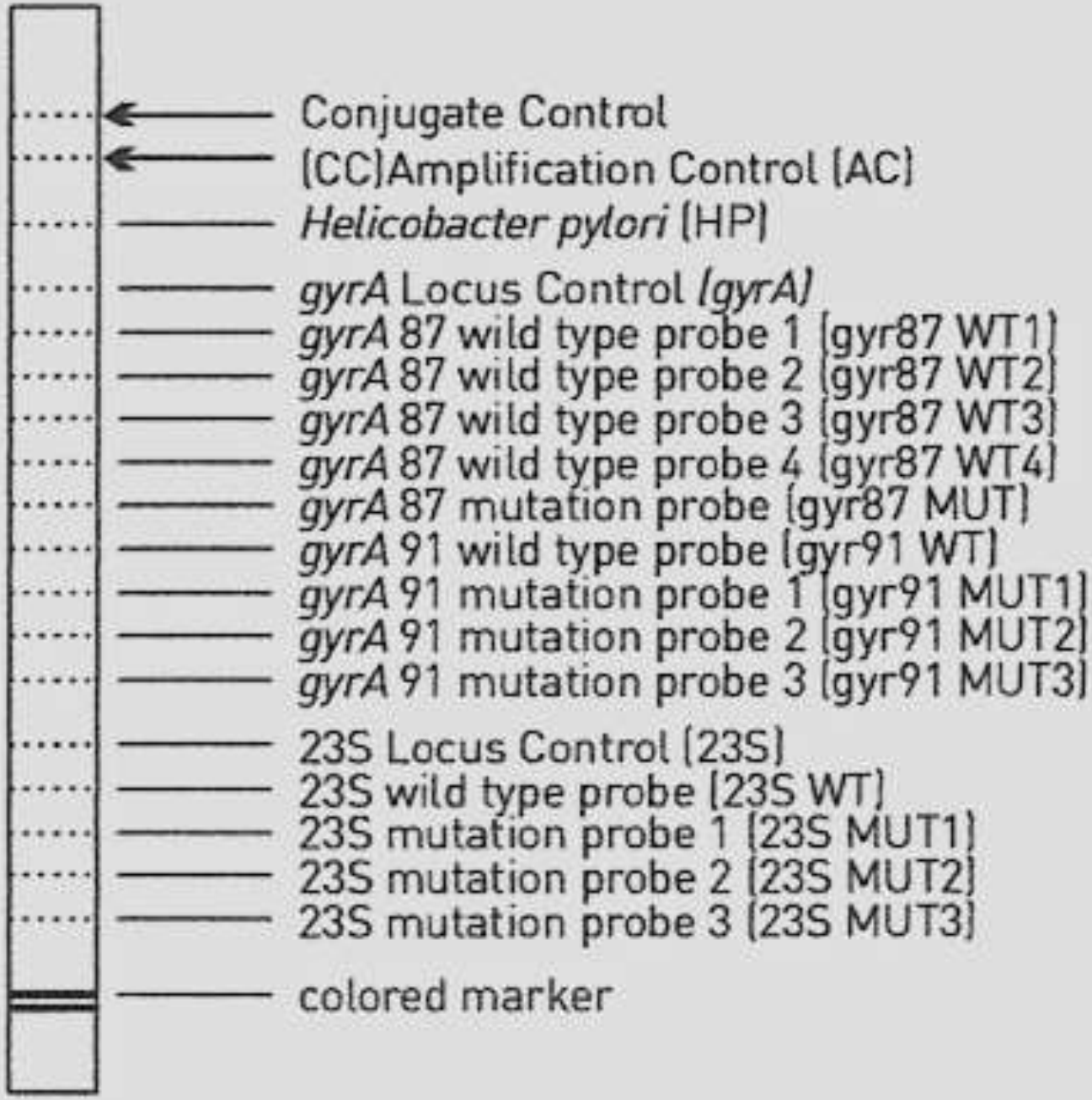
- ΕΙΝΑΙ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΟ
- ΣΠΑΝΙΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ
- ΠΟΣΟΣΤΟ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΗΣ HAIN

98.7% / 96.8% Ριφαμπικίνη
92 / 87.8% Ισονιαζίδη

Doris Hillemann,* Sabine Ru¨sch-Gerdes, and Elvira Richter, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 2007, p. 2635–2640

Helicobacter pylori

- Μεταλλάξεις σε φλουοροκινολόνες (*gyrA*) και σε κλαριθρομυκίνη (23S)
- Εμπορική μέθοδος HAIN
- Εφαρμογή άμεσα σε γαστρική βιοψία


Conjugate Control
(CC)Amplification Control (AC)
Helicobacter pylori (HP)
gyrA Locus Control *(gyrA)*
gyrA 87 wild type probe 1 (gyr87 WT1)
gyrA 87 wild type probe 2 (gyr87 WT2)
gyrA 87 wild type probe 3 (gyr87 WT3)
gyrA 87 wild type probe 4 (gyr87 WT4)
gyrA 87 mutation probe (gyr87 MUT)
gyrA 91 wild type probe (gyr91 WT)
gyrA 91 mutation probe 1 (gyr91 MUT1)
gyrA 91 mutation probe 2 (gyr91 MUT2)
gyrA 91 mutation probe 3 (gyr91 MUT3)
23S Locus Control (23S)
23S wild type probe (23S WT)
23S mutation probe 1 (23S MUT1)
23S mutation probe 2 (23S MUT2)
23S mutation probe 3 (23S MUT3)
colored marker

Η εισαγωγή στην κλινική πράξη νέων αντιμικροβιακών φαρμάκων προκάλεσε

τη δημιουργία,

εκ μέρους των μικροοργανισμών,

νέων μηχανισμών αντοχής,

που συχνά διαφεύγουν από τις κλασσικές φαινοτυπικές μεθόδους

(αυτόματα συστήματα, Kirby-Bauer)

Αρχόμενοι μηχανισμοί

↓

έκφραση αντοχής χαμηλού επιπέδου

↓

- ΑΔΥΝΑΜΙΑ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

- Κριτήρια NCCLS

Μοριακές μέθοδοι

- Συμβολή στη βελτιστοποίηση των φαινοτυπικών μεθόδων

- Όρια αντοχής, συμπληρωματικές μέθοδοι

Επιδημιολογική διερεύνηση της αντοχής

(γονίδια, γενετικό περιβάλλον)

Αποστολή σε κέντρα αναφοράς

ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ ΠΟΛΥ!