Η σημασία των νεώτερων εργαστηριακών τεχνικών στη διάγνωση των λοιμωδών νόσων

Επικ. Καθ. Γεωργία Βρυώνη
Εργαστήριο Μικροβιολογίας,
Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Αθηνών

Κλινικό Μικροβιολογικό Εργαστήριο

Ρόλος:

- γρήγορη και αξιόπιστη ανίχνευση και ταυτοποίηση του λοιμογόνου παράγοντα

Στόχοι:

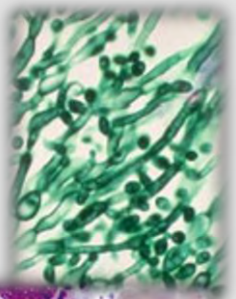
- έναρξη έγκαιρα αιτιολογικής θεραπείας
- λήψη κατάλληλων μέτρων πρόληψης της διασποράς του λοιμογόνου παράγοντα

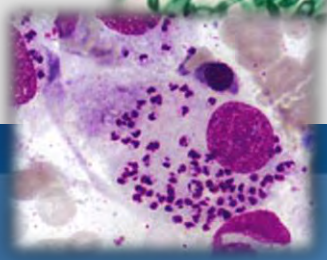
Μικροβιολογικές τεχνικές διάγνωσης

Οι νεότερες (μοριακές) τεχνικές καλύπτουν αδυναμίες συμβατικών μεθόδων

Μικροκοπική

- Περιορισμένη ειδικότητα και ευαισθησία
- Παρουσία μεγάλου αριθμού μικροβίων (10.000/mL βιολογικού υγρού)
- Δυσχερής η μορφολογική αναγνώριση
- Εμπειρία





Καλλιέργεια

- Δυσκολίες στην απομόνωση απαιτητικών μικροοργανισμών ή που αναπτύσσονται βραδέως (*M. tuberculosis*)
- Αδυναμία απομόνωσης του παθογόνου αίτιου λόγω χορήγησης ΑΤΒ θεραπείας
- Αδυναμία διάγνωσης ιογενών λοιμώξεων

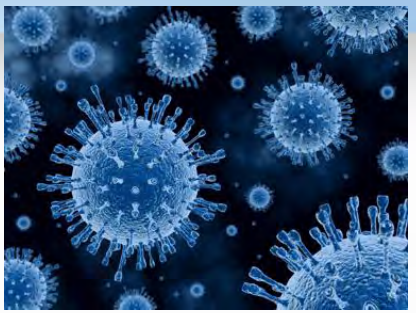
Ορολογικές

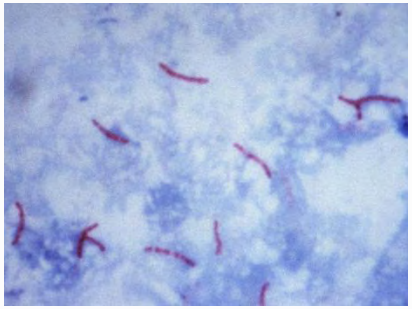
- Μικρή συγκέντρωση στα βιολογικά υγρά
- Αναμονή για εμφάνιση ορομετατροπής
- Μη αύξηση σε ειδικές ομάδες ασθενών (ανοσοκαταστολή)

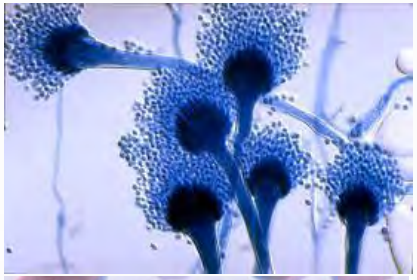
Άμεση ανίχνευση παθογόνου – μοριακές τεχνικές

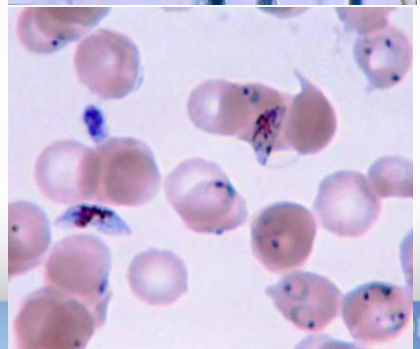
- **ΙΟΙ:**
  - **HCV, HBV, HIV, CMV, HPV**
  - **HSV, VZV, EBV, εντεροϊοί…**
- **ΒΑΚΤΗΡΙΑ:**
  - ***Mycobacterium, Chlamydia, N. gonorrhoeae***
  - ***Borellia, Treponema, Ricketsia,N. meningitidis …***
- **ΜΥΚΗΤΕΣ:**
  - ***Pneumocystis, Cryptococcus, Candida, Aspergillus…***
- **ΠΑΡΑΣΙΤΑ:**
  - ***Plasmodium, Leishmania, Toxoplasma……/*** **in house (ποικίλη ευαισθησία / ειδικότητα)**

FDA → Food and Drug Administration approved

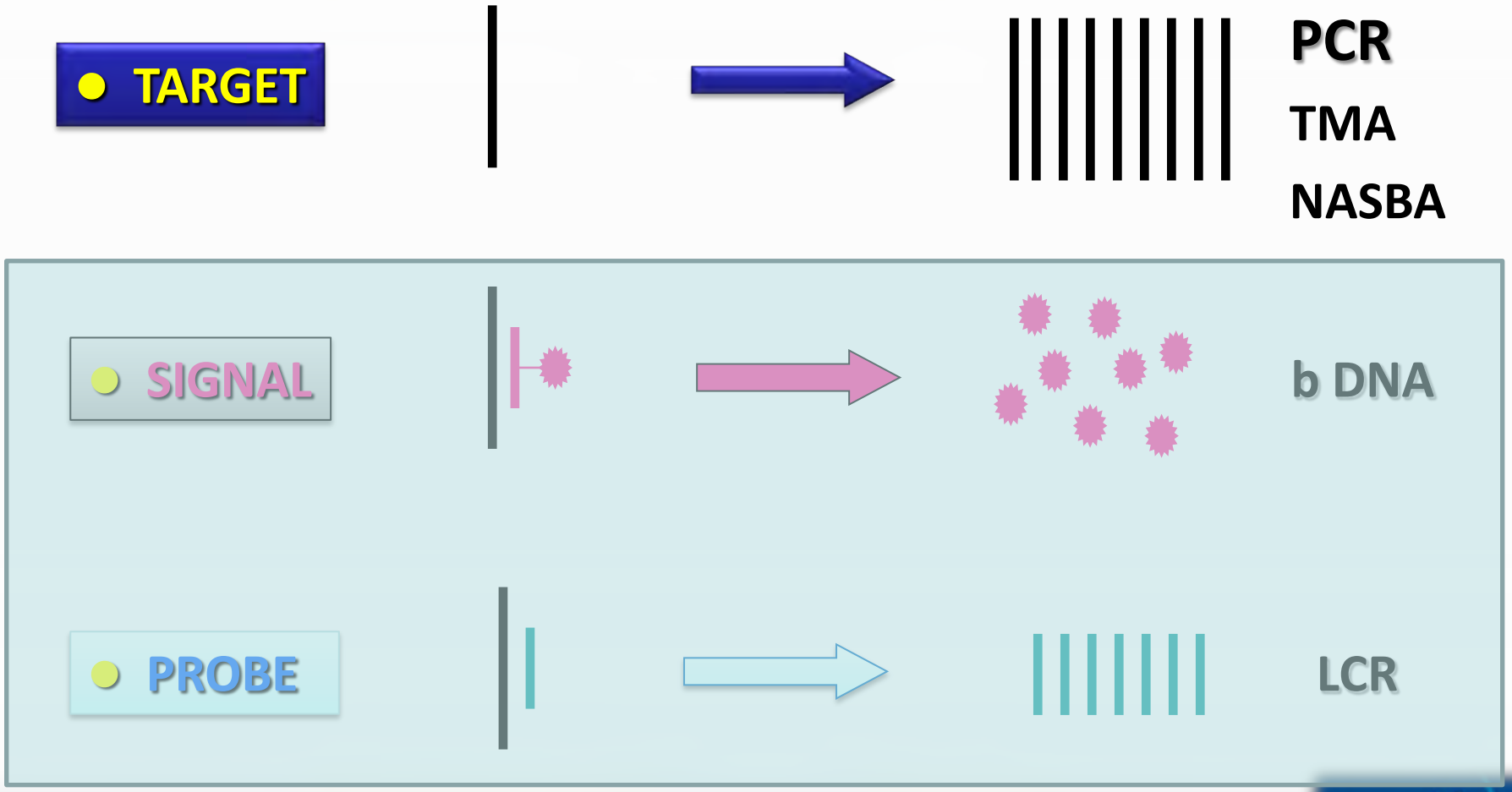








1. Μέθοδοι πολλαπλασιασμού
Nucleic acid amplification methods



PCR: Η ΚΥΡΙΌΤΕΡΗ ΜΈΘΟΔΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΎ ΤΟΥ ΣΤΌΧΟΥ (TARGET AMPLIFICATION METHOD)

- Η **αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης** (Polymerase Chain Reaction, PCR) επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό σε λίγες ώρες ελάχιστης ποσότητας συγκεκριμένης DNA αλληλουχίας – στόχου από μια δεξαμενή διαφόρων ετερογενών μορίων γενετικού υλικού

- Ανακαλύφθηκε από τον Dr. Kary Millis το 1983 (Nobel Prize in Chemistry, 1993)
- Μια από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές, «**χρυσό πρότυπο**» («**gold**» **standard**) στη διάγνωση των λοιμώξεων.

Mark Hughes (Υπεύθυνος: National Center for Human Genome Project-NIH)
"PCR η πλέον ενδιαφέρουσα επιστημονική τεχνολογία των τελευταίων 100 ετών"

Πότε εφαρμόζεται η PCR στη διάγνωση λοιμώξεων

- Αδυναμία καλλιέργειας του μικροοργανισμού
- Βραδεία ανάπτυξη
- Απαίτηση για πολύ εμπλουτισμένα ή ειδικά υλικά καλλιέργειας
- Μικρός αριθμός παθογόνων στο κλινικό υλικό
- Ανεπαρκείς ορολογικές τεχνικές ή χαμηλός τίτλος Abs
- Ανίχνευση γονιδίων τοξινών και αντοχής σε αντιμικροβιακά

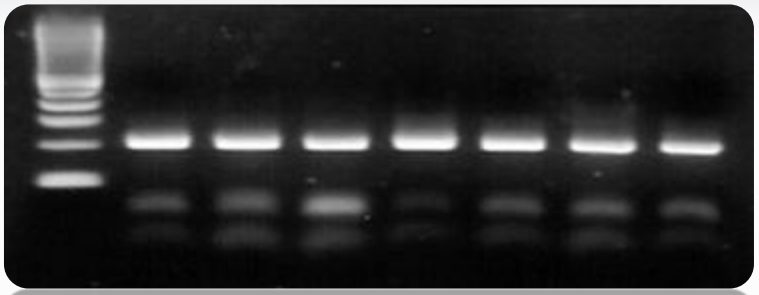
Εφαρμογή PCR – Έτοιμα σωληνάρια

- Μικρή ποσότητα DNA
- Εκκινητές (Primers)
- Ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει την DNA πολυμεράση
- 4 ζεύγη βάσεων (A, T, C, G)
- $MgCl_2$

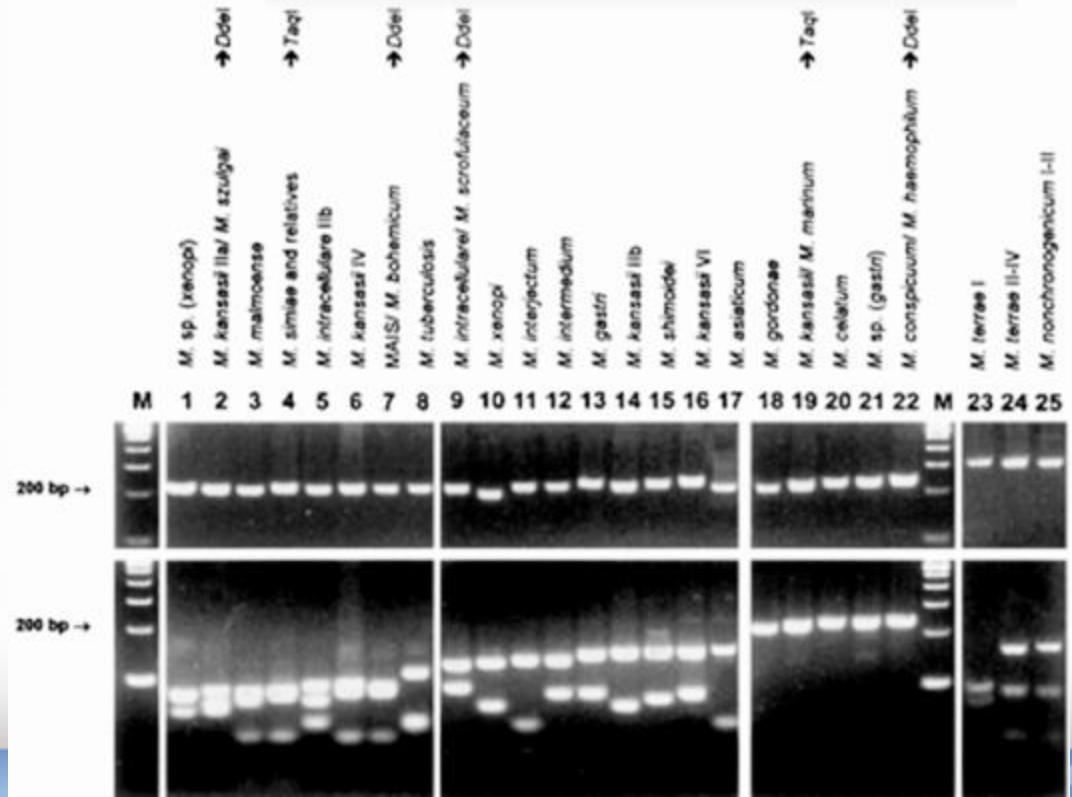
Όλα σε ένα σωληνάριο

Ανίχνευση προϊόντων αντίδρασης PCR

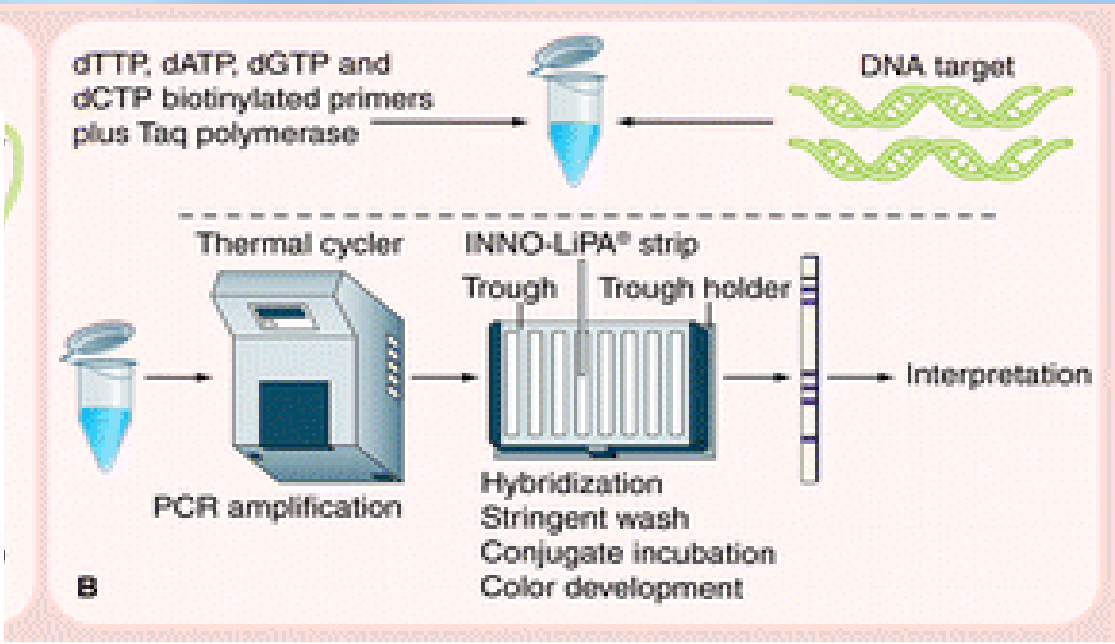
- Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης και χρώση με ethidium bromide (υπολείπεται σε ειδικότητα και ευαισθησία)



- Ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα [restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis] → βελτίωση



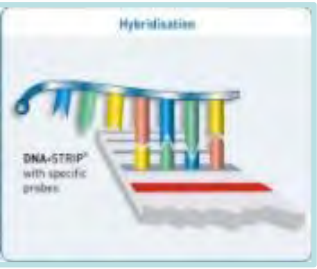
Ανίχνευση προϊόντων αντίδρασης PCR

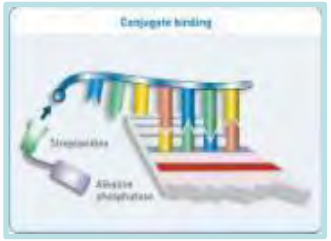


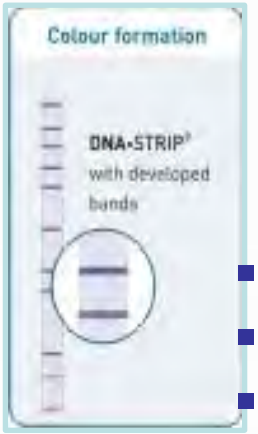
probe assay ή line probe assay)

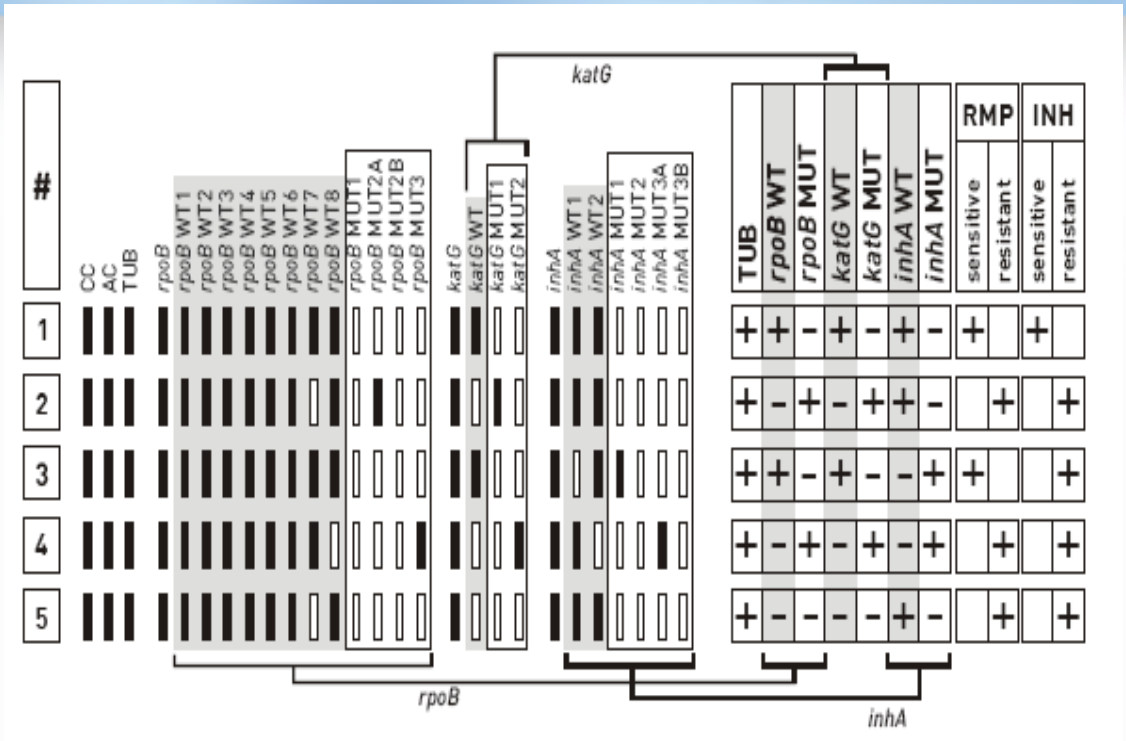
Ανίχνευση προϊόντων PCR με τεχνική ανάστροφου υβριδισμού (PCR-based reverse hybridisation DNA strip assays)

GenoType®

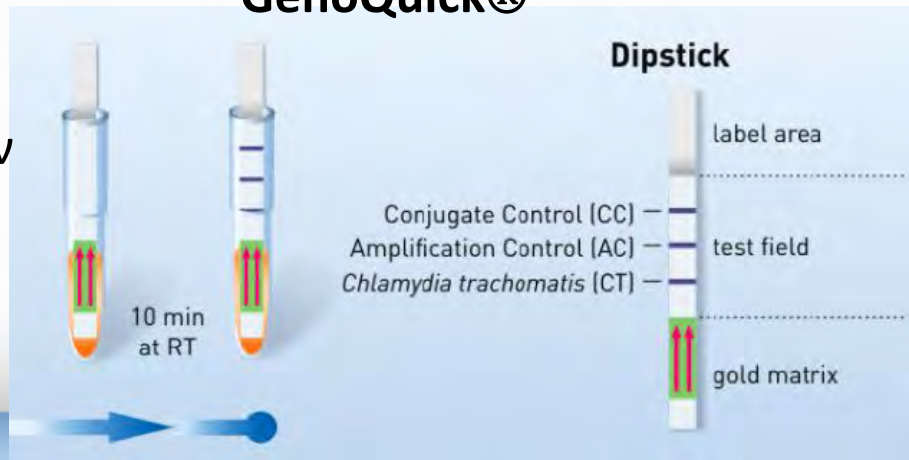








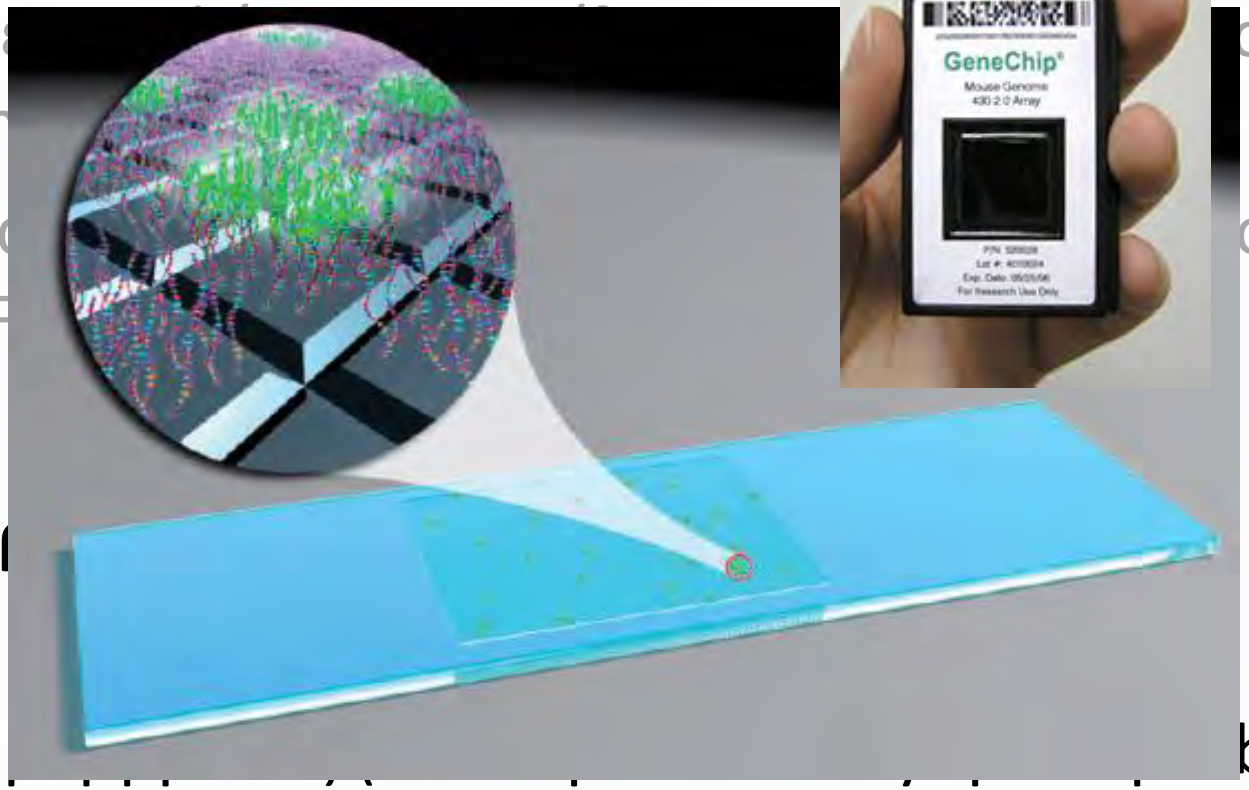
GenoQuick®



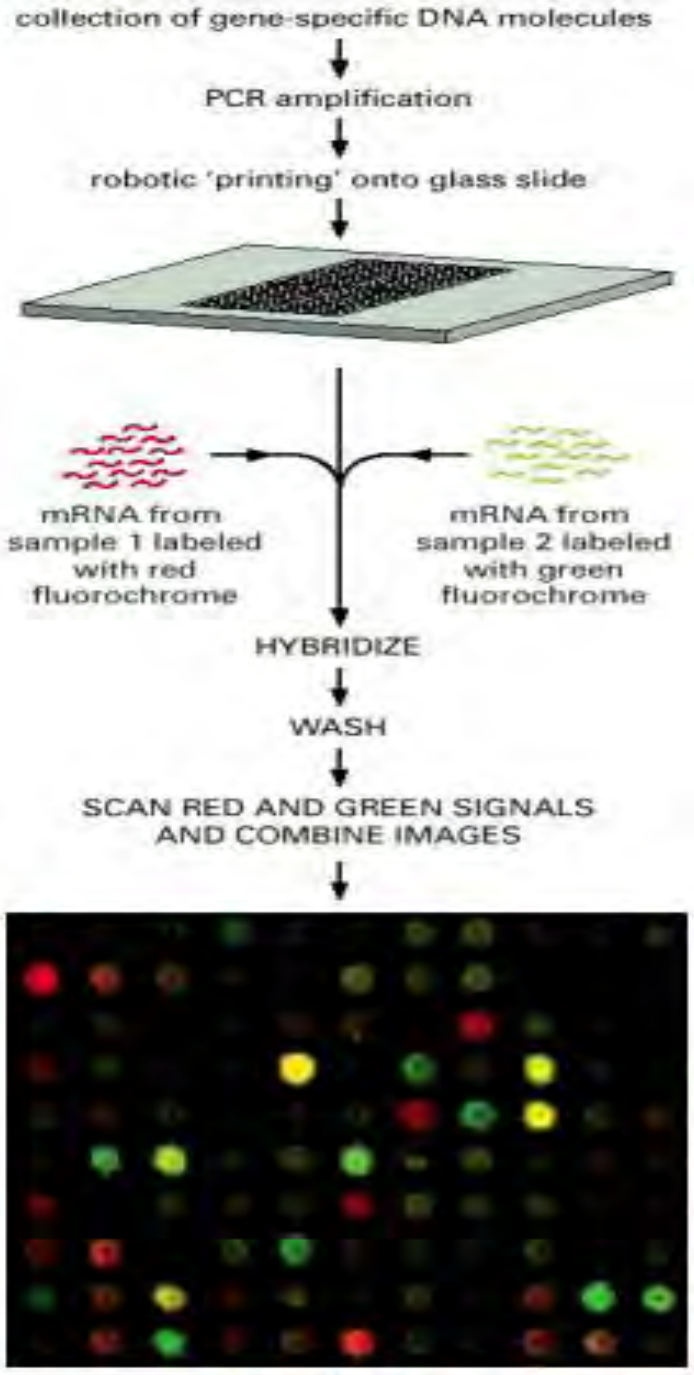
- αποτελέσματα σε 4 ώρες
- Ταυτοποίηση μυκοβακτηριδίων
- MDR + XDR-TB.
- VRE, MRSA.
- *Helicobacter pylori*
- *Chlamydia trachomatis*

Ανίχνευση προϊόντων αντίδρασης PCR

- Ηλ ση με eth
- Αν orphism (RF
- **Υβ**
  -
  - be assay)
  - μικροσυστοιχίες (microarrays)



Microarrays – DNA chips



small region of microarray representing expression of 110 genes from yeast

- ✓ Σύνολο μικρών στοιχείων ή κηλίδων τακτοποιημένων σε σειρές και στήλες σε στερεή επιφάνεια (διοξείδιο της σιλικόνης)
- ✓ Υβριδισμός μορίων-στόχων με μόρια σημασμένα με φθορίζουσα χρωστική
- ✓ Ανάγνωση αποτελέσματος με laser scanning σε συνεστιακό (confocal) μικροσκόπιο φθορισμού
- ✓ Ανάλυση της εικόνας μέσω Η/Υ

- **Εφαρμογές**
  - **Ανίχνευση παθογόνων,**
  - **Γονοτυπικές - συγκριτικές αναλύσεις**
  - **Ανίχνευση μικροβιακής αντοχής**

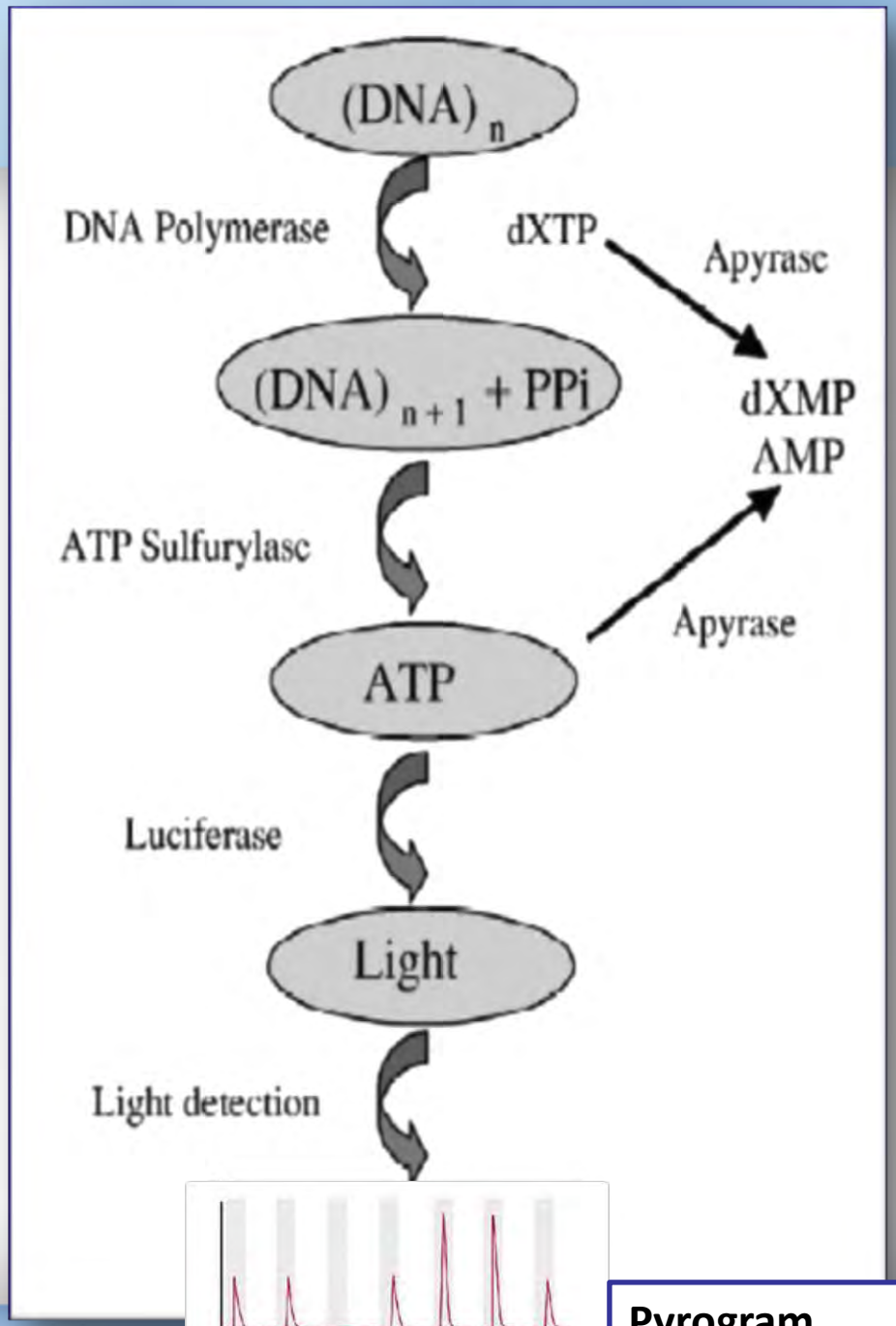
Trends in Biotechnology, December 2010, Vol. 28, No. 12

Ανίχνευση προϊόντων πολλαπλασιασμού PCR

- **Ηλεκτροφόρηση** σε γέλη αγαρόζης και χρώση με EB
- **Restriction fragment length polymorphism (RFLP)**
- **Υβριδισμός των προϊόντων PCR**
  - μικροπλάκες
  - μεμβράνες (linear probe assay ή line probe assay)
  - μικροσυστοιχίες (microarrays)
- Πλήρης χαρακτηρισμός του προϊόντος με sequencing
  - Dideoxy chain terminating sequencing
  - Pyrosequencing
  - Next generation sequencing

Pyrosequencing

- ✓ Κατά την PCR → ενσωμάτωση δεοξυνουκλεοτιδίου → ελευθέρωση πυροφωσφορικού → μετατροπή σε ATP
- ✓ Ενέργεια από ATP → οξείδωση της λουσιφεράσης από τη λουσιφερίνη → ανίχνευση σαν εκπομπή φωτός
- ✓ Τεχνική **οικονομικότερη** της κλασικής (δε χρησιμοποιεί φθοριοχρώματα και δέσμη laser)



Pyrogram

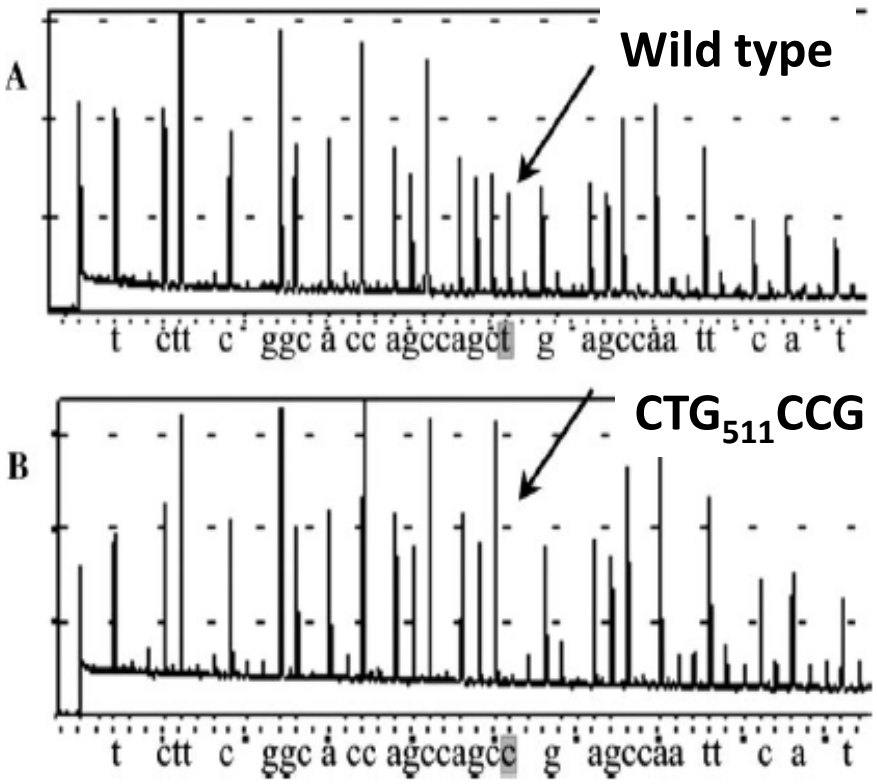
Pyrosequencing

- ✓ Ανίχνευση **νέων μεταλλάξεων**
- ✓ Ανίχνευση **αντοχών**
  - MTb, EMB και RIF -αντοχή
  - FQ-αντοχή

Δύο περιορισμοί:

1. το μέγεθος της αλληλουχίας που μπορεί να «διαβάσει» είναι σχετικά μικρό (20-70 bp) και
2. η δυσκολία ανάγνωσης περιοχών με περισσότερα από 5-6 όμοια νουκλεοτίδια (homopolymeric regions).

Pyrogram: the tops represent light emission and nucleotide binding



fppt.com

Next-generation sequencing technologies

- Next-generation sequencing technologies were introduced in 2004
- This group of technologies gains efficiency by allowing **the sequencing of hundreds of thousands to millions of random DNA templates <u>in the same reaction.</u>**

Table I. Comparison of NGS technologies

Sequencing platform	Read length (bp)	Yield per run	Run time	Current cost-effectiveness for diagnostic sequencing applications[a]		
				Resequencing	*De novo* sequencing	Metagenomics
Roche/454 GS-FLX	400–500	>800 Mb	12 h		X	X
Illumina GAII	36–150	>36 Gb	10 days	X	XX	XX
ABI SOLiD	>50	>50 Gb	7 days	X		
Helicos Helicope	25	30–40 Gb	8 days	X		
Pacific Bio SMRT System	>1000	>200 Mb	15+ min	XX	XX	XX

[a]'X' represents the technologies that are generally accepted to be most cost-effective for a given application; 'XX' are those that are emerging owing to ongoing technological improvements, yielding longer and/or greater numbers of sequence reads at a lower cost.

Applications:
- Metagenomics
- Microbial identifications
- Detection of rare mutations (rare viral variants consisting of as little as 1% of the population)

Sandeep J and Read T. Trends in Biotechnology 2010; 28:611

Είδη PCR

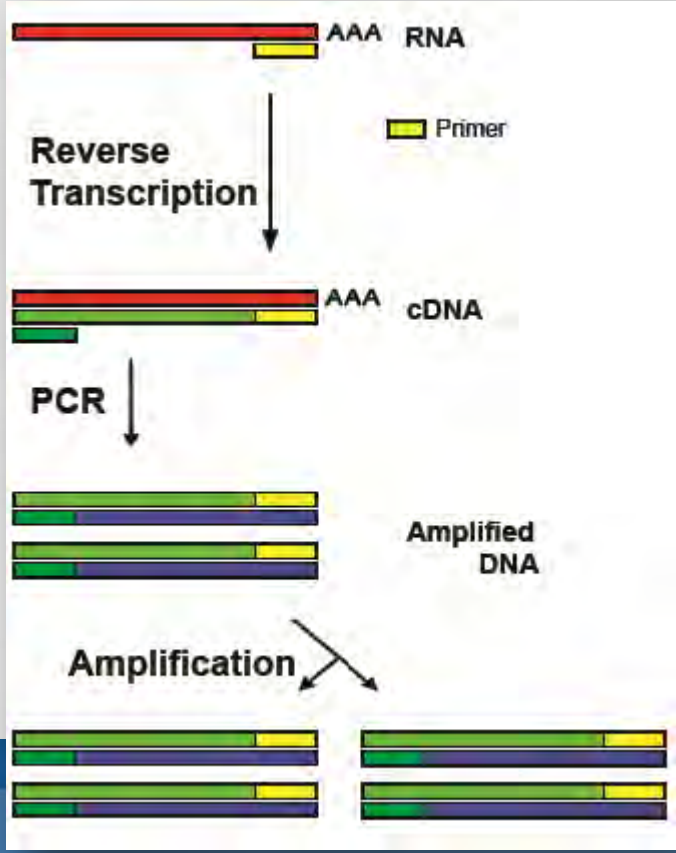
Reverse Transcriptase PCR

- **RT-PCR για τον πολ/σμό RNA στόχων**
  1. Δημιουργία cDNA
  2. Πολλαπλασιασμός cDNA με PCR

Nested PCR

Multiplex PCR

Real-Time PCR



Είδη PCR

Reverse Transcriptase PCR

Nested PCR

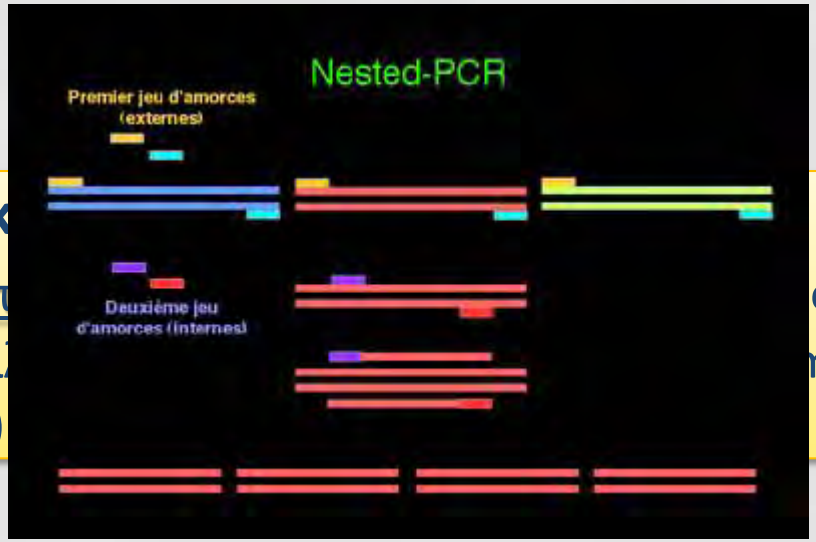
Multiplex PCR

Real-Time PCR

Μειονέκ

• υψηλά π ς

πρωτοκόλ mplification protocols)



- **Nested-PCR: «φωλιασμένη» ή δύο σταδίων** (για την αύξηση ευαισθησίας και ειδικότητας της κλασικής PCR)
- **Χρησιμοποίηση 2 ζευγών (set) εκκινητών για τον πολλαπλασιασμό και 2 κύκλους PCR**

  1. το πρώτο primer set χρησιμοποιείται στο 1ο κύκλο πολλαπλασιασμού και στη συνέχεια

  2. το προϊόν πολλαπλασιασμού χρησιμοποιείται σε 2ο κύκλο πολλαπλασιασμού με το 2ο set primers

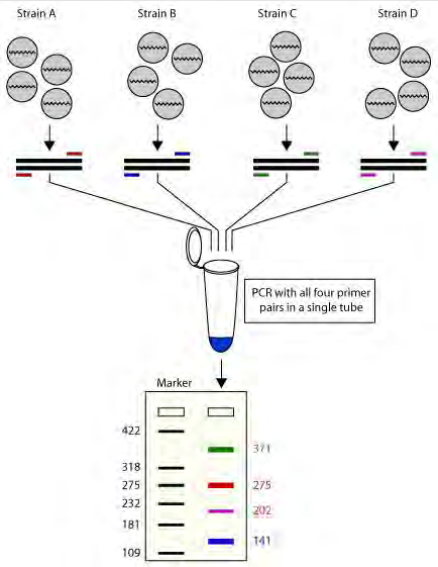
Είδη PCR

Reverse Transcriptase PCR

Nested PCR

Multiplex PCR

Real-Time PCR

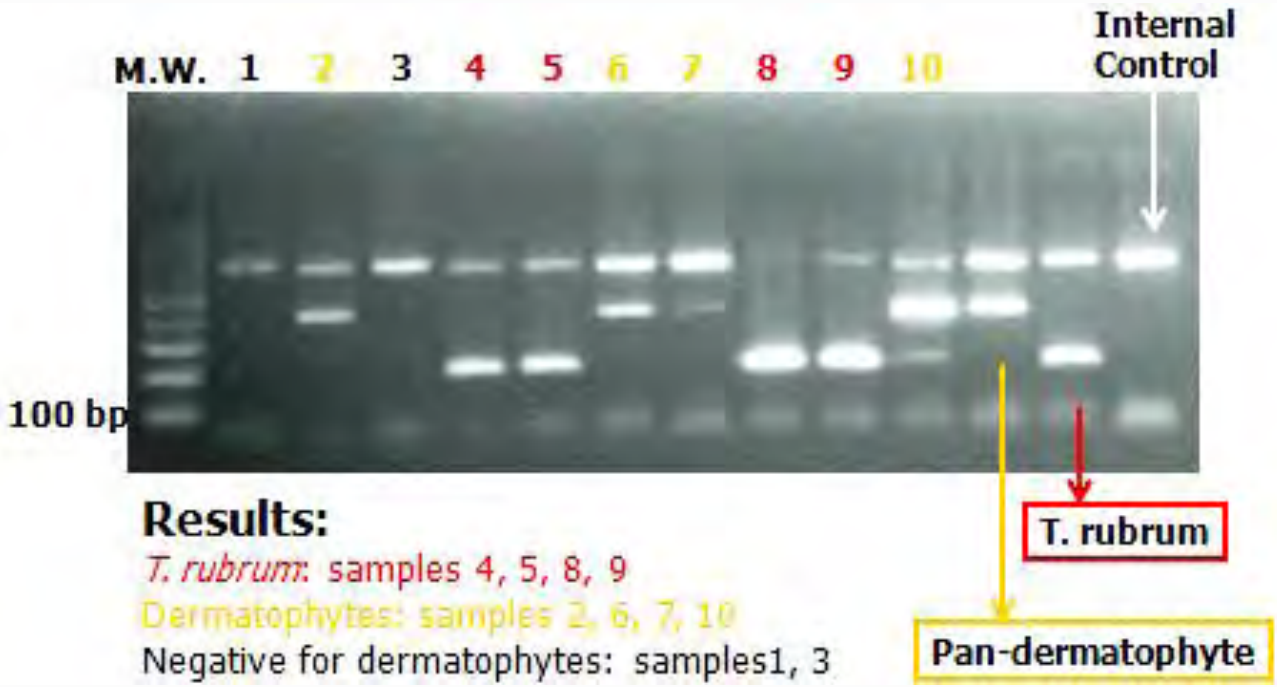


- **Πολυπλεκτική PCR**: 2 ή περισσότερα primer sets σχεδιασμένα για τον πολλαπλασιασμό **διαφορετικών DNA στόχων** μέσα στο ίδιο μίγμα αντίδρασης → περισσότερα παθογόνα μπορούν να συν-πολλαπλασιαστούν μέσα σε ένα σωληνάριο

Εφαρμογές:

- ανίχνευση παθογόνων λοιμώξεων ΚΝΣ
- ανίχνευση αναπνευστικών παθογόνων

Παράδειγμα ανίχνευσης *T. rubrum* και/ή δερματοφυτικών μυκήτων σε νύχια με multiplex PCR

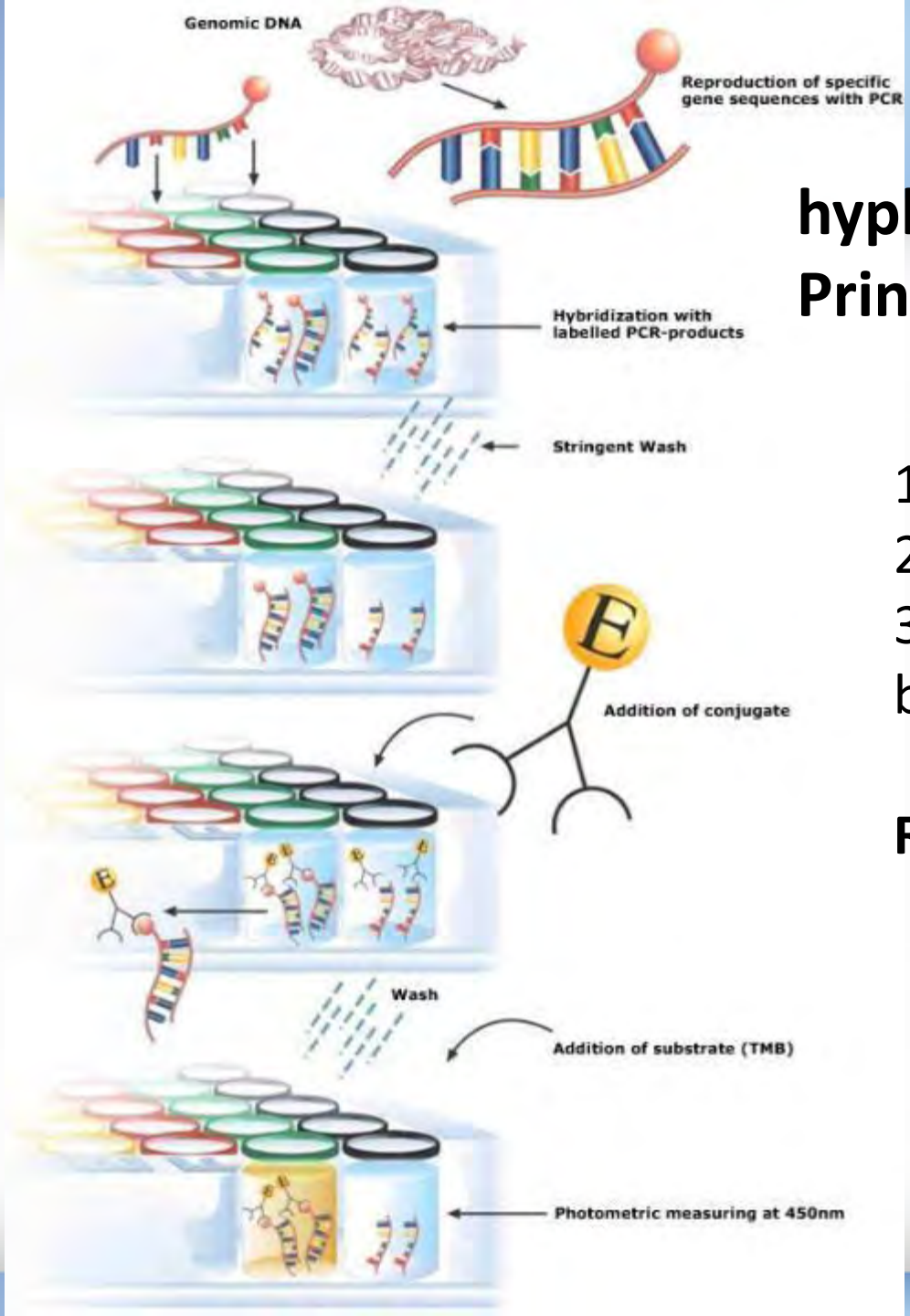


A multiplex PCR (Dermatophyte PCR kit, Statens Serum Institut, SSI Diagnostica, Denmark) which uses two sets of primers aimed at:

a. **chitin synthase I** for detecting dermatophytes generally and

b. **ITS2** (internal transcribed spacer) for detecting *T. rubrum*.

- Amplicon analysis is made using agarose gel electroph.
- The test is completed **within 5 hours**, including the extraction stage.



hyplex® (Multiplex-PCR-ELISA) Principle

1. DNA extraction
2. Multiplex PCR
3. Hybridization in an ELISA-based format

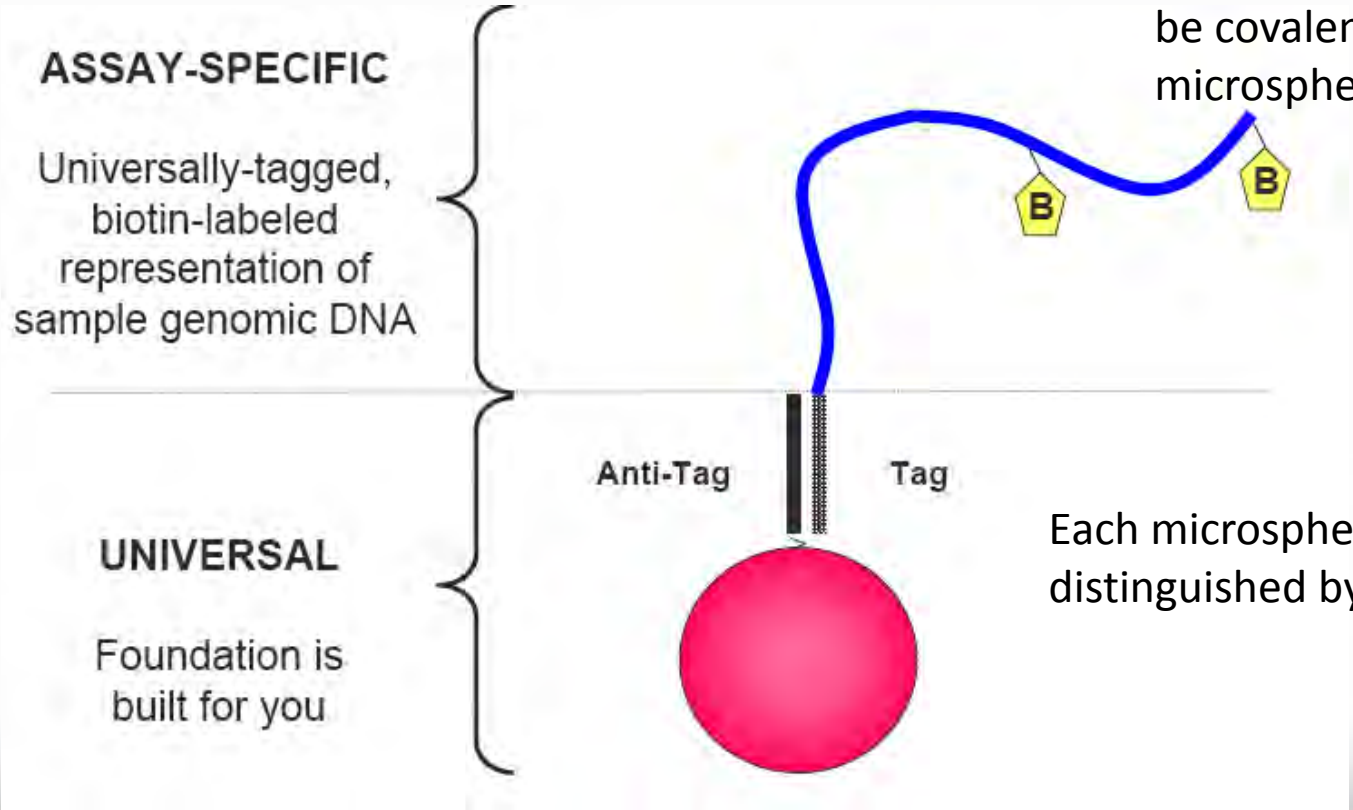
Results in less than 2 hours

BAG HEALTH CARE

xMAP system: a platform for multiplex PCR analysis

- The system incorporates a proprietary process to internally dye polysterene microspheres with two spectrally distinct fluorochrome

Oligonucleotide probes would be covalently bound to the microsphere surface



Each microsphere set can be distinguished by its spectral address

Table 1. Summary of Emerging Multiplex Technologies for the Diagnosis of Respiratory Pathogens[a]

Characteristic	Test System					
	RespPlex	Infiniti	Jaguar	FilmArray	STAR	PLEX-ID
Pathogens detected	Viruses and bacteria	Viruses	Viruses	Viruses and bacteria	Viruses	Viruses and bacteria
Degree of multiplexity, no. of targets	>15	>15	2–6	>15	>15	>15
Complexity	High	High	Low	Low	High	High
Fully integrated system (all steps)	No	No	Yes	Yes	No	No
Testing locatio						ory
Time required f						
Throughput						te h
Carryover conta						
Quantification						
Pathogen disco						

A broad diagnostic panel, preferably consisting of 15 or more agents, offers an additional diagnostic value:

1. **a negative result is more valid** if many agents have been targeted,
2. **the quantitative component** of the test **improves the interpretation** of a positive result, not least if several agents are detected and the Ct values of these agents can then be compared

Μεγάλη ποικιλία τεχνικών για την

✓ <u>ανίχνευση</u> ακόμη και «παρά την κλίνη» του ασθενούς

✓ <u>ποσοτικοποίηση</u> αναπνευστικών παθογόνων

άμεσα στο κλινικό δείγμα.

Caliendo A. CID 2011;52(S4):S326–S330

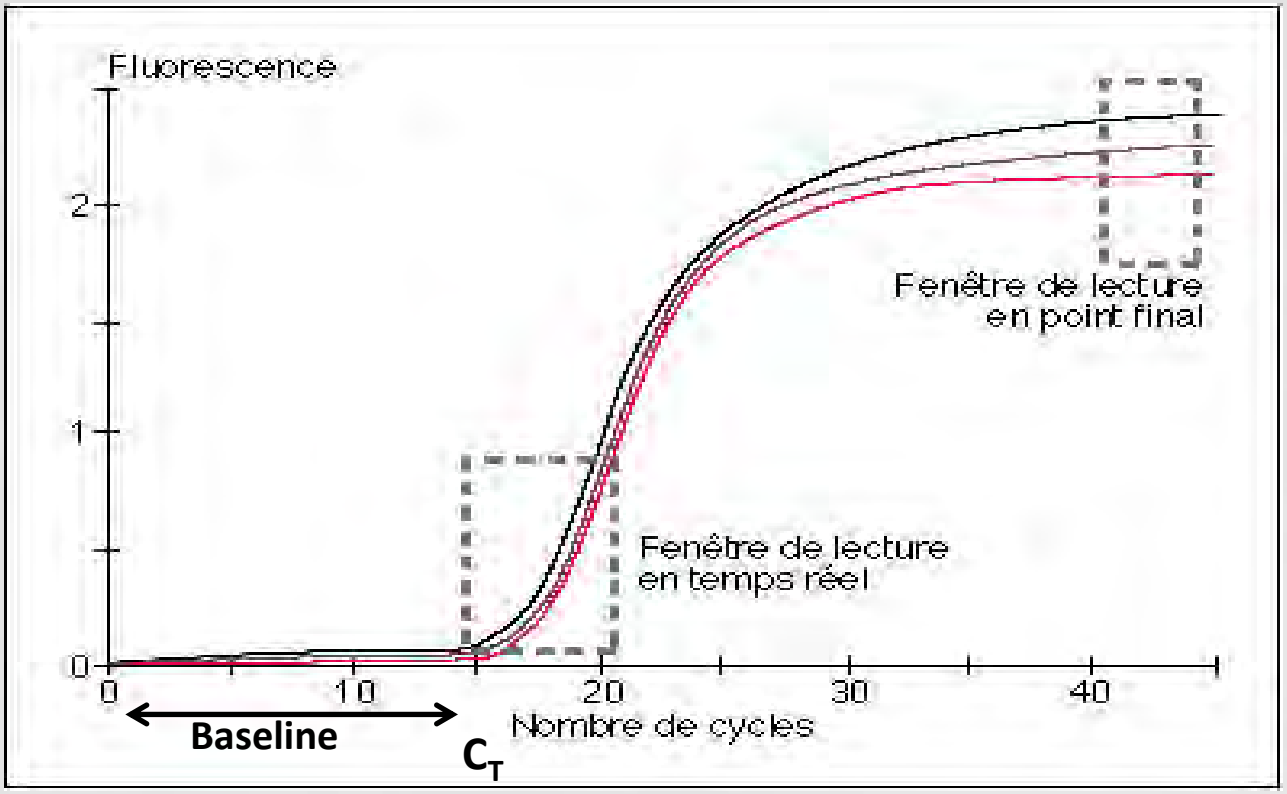
Είδη PCR

Reverse Transcriptase PCR

Nested PCR

Multiplex PCR

Real-Time PCR



Real-Time PCR amplification plot

- **Πραγματικού χρόνου PCR**: πολλαπλασιασμός στόχου και ανίχνευση στο ίδιο σωληνάριο

Είδη PCR

Reverse Transcriptase P

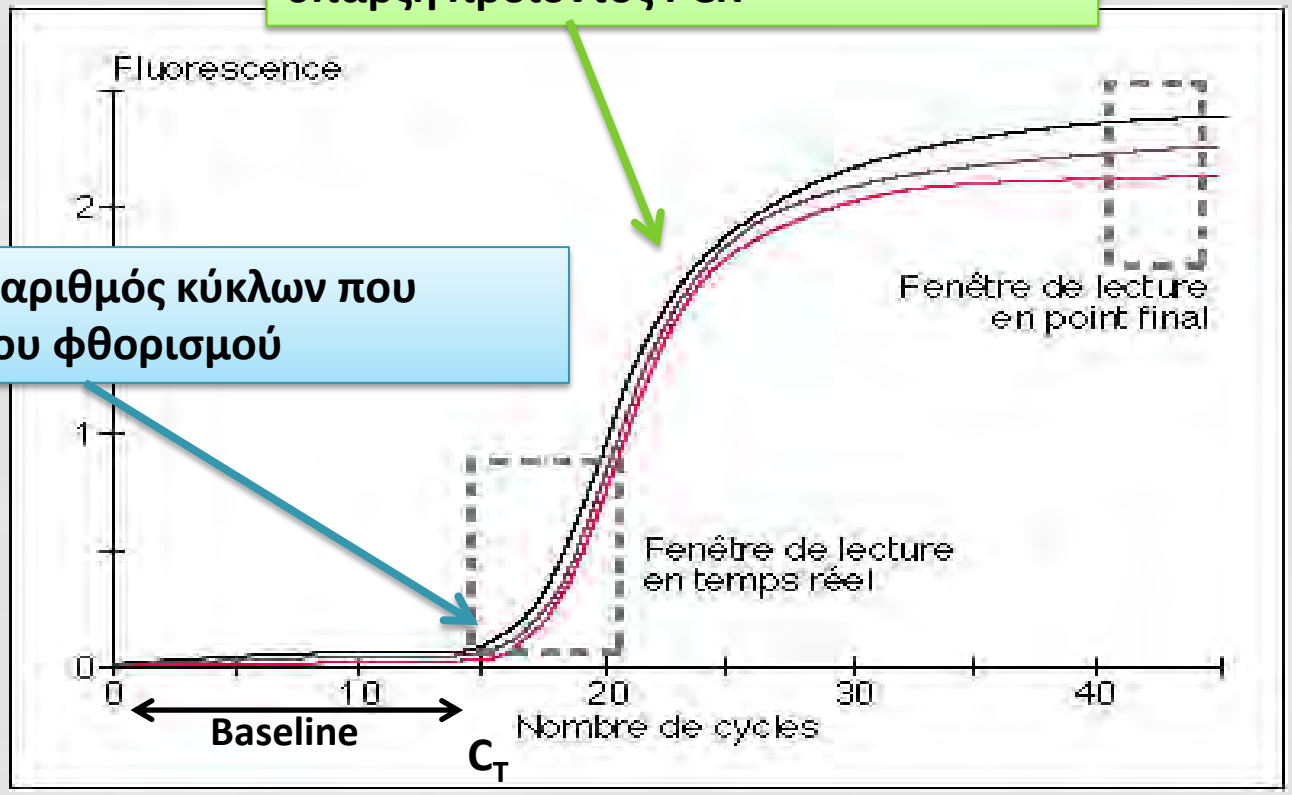
Nested PCR

Multiplex PCR

Real-Time PCR

Αύξηση πάνω από τη baseline σημαίνει ύπαρξη προϊόντος PCR

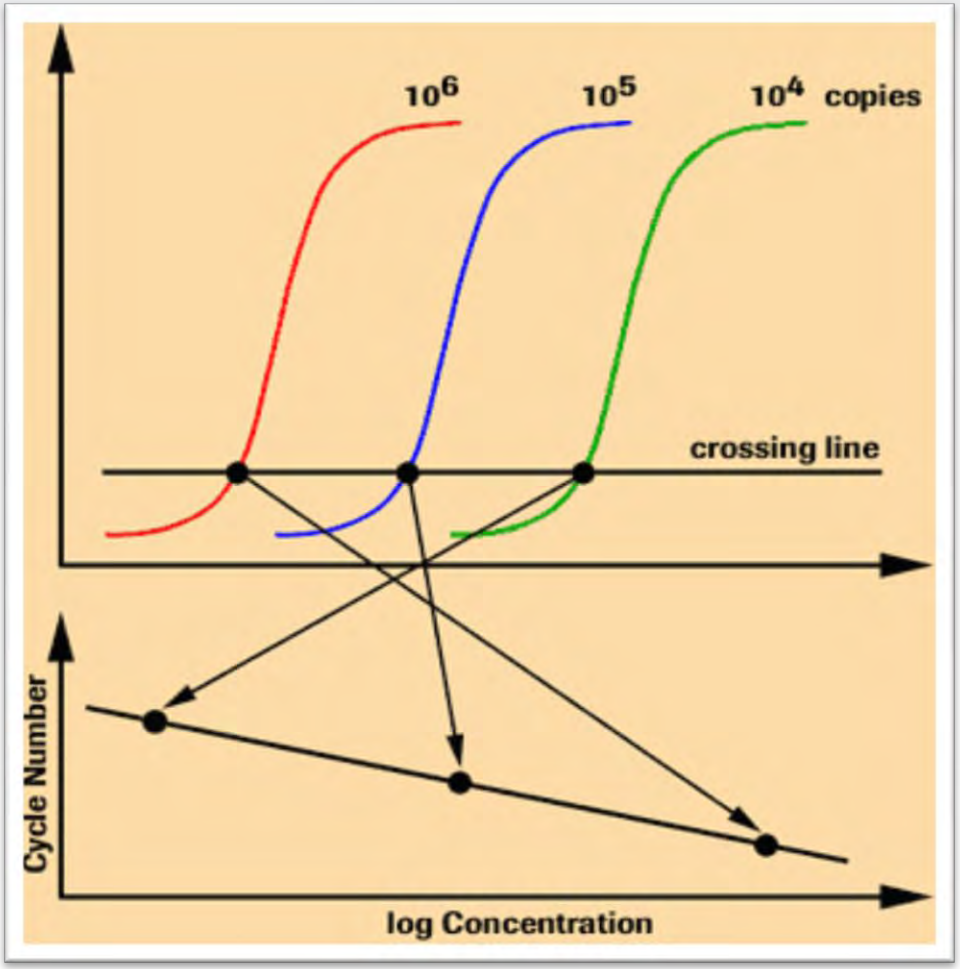
Cycle threshold C_T: αριθμός κύκλων που αρχίζει η αύξηση του φθορισμού



Real-Time PCR amplification plot

- **Real-time PCR** (πραγματικού χρόνου PCR)
- Πολ/σμός στόχου & ανίχνευση ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάριο
  - σύνδεση προϊόντος με φθορίζουσα χρωστική
  - καταγραφή κινητικής της αντίδρασης
- **Ποιοτική** & **ποσοτική** ανάλυση
- **Ταχύτητα**: αποτέλεσμα σε 2-3h

Real-time PCR: ποσοτικοποίηση αποτελεσμάτων

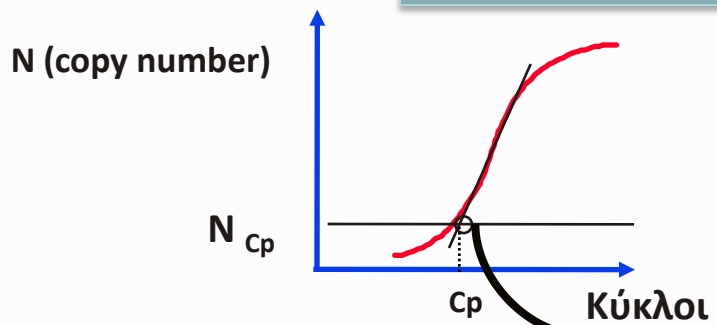


- ✓ Ενίσχυση 3 δειγμάτων συγκεντρώσεων: 10^6, 10^5 και 10^4 αντιγράφων.
- ✓ Όσο λιγότερα αντίγραφα περιέχονται στο δείγμα, τόσο περισσότεροι κύκλοι απαιτούνται για να εισέλθει η αντίδραση στην εκθετική της φάση.
- ✓ Δημιουργία καμπύλης αναφοράς **standard curve**

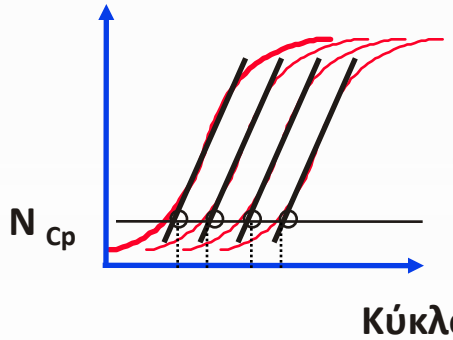
Real-time PCR: ποσοτικοποίηση αποτελεσμάτων

Πολλαπλασιασμός στόχου

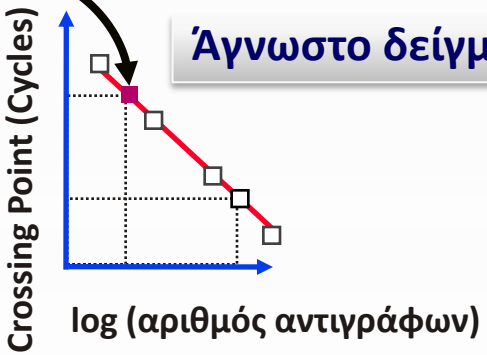
Άγνωστο δείγμα



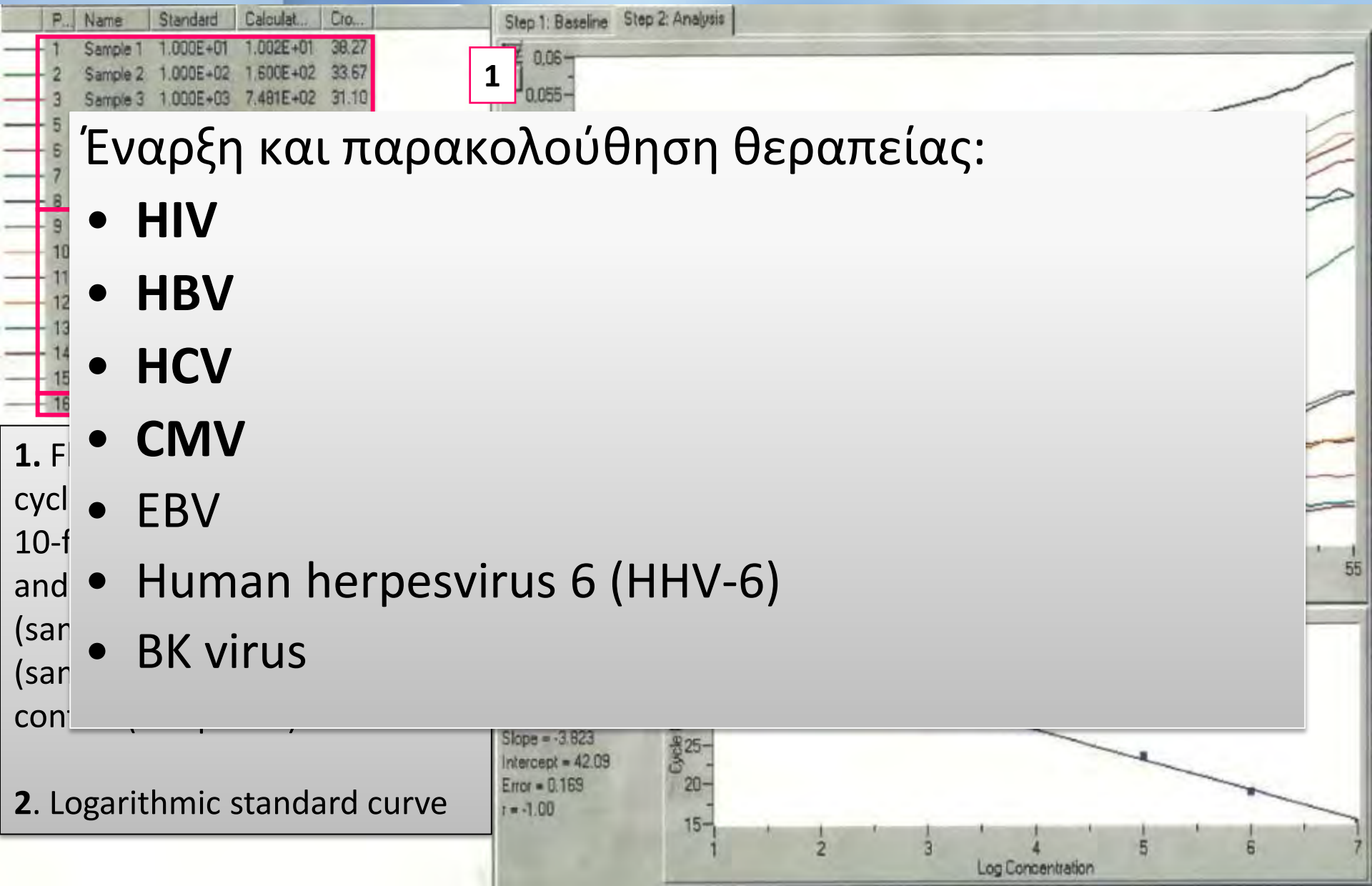
Καμπύλη αναφοράς (standard curve)



Άγνωστο δείγμα



Παράδειγμα ανίχνευσης & ποσοτικοποίησης *Brucella* DNA με RT-PCR



Έναρξη και παρακολούθηση θεραπείας:

- **HIV**
- **HBV**
- **HCV**
- **CMV**
- EBV
- Human herpesvirus 6 (HHV-6)
- BK virus

1. F
cycl
10-f
and
(sar
(sar
con

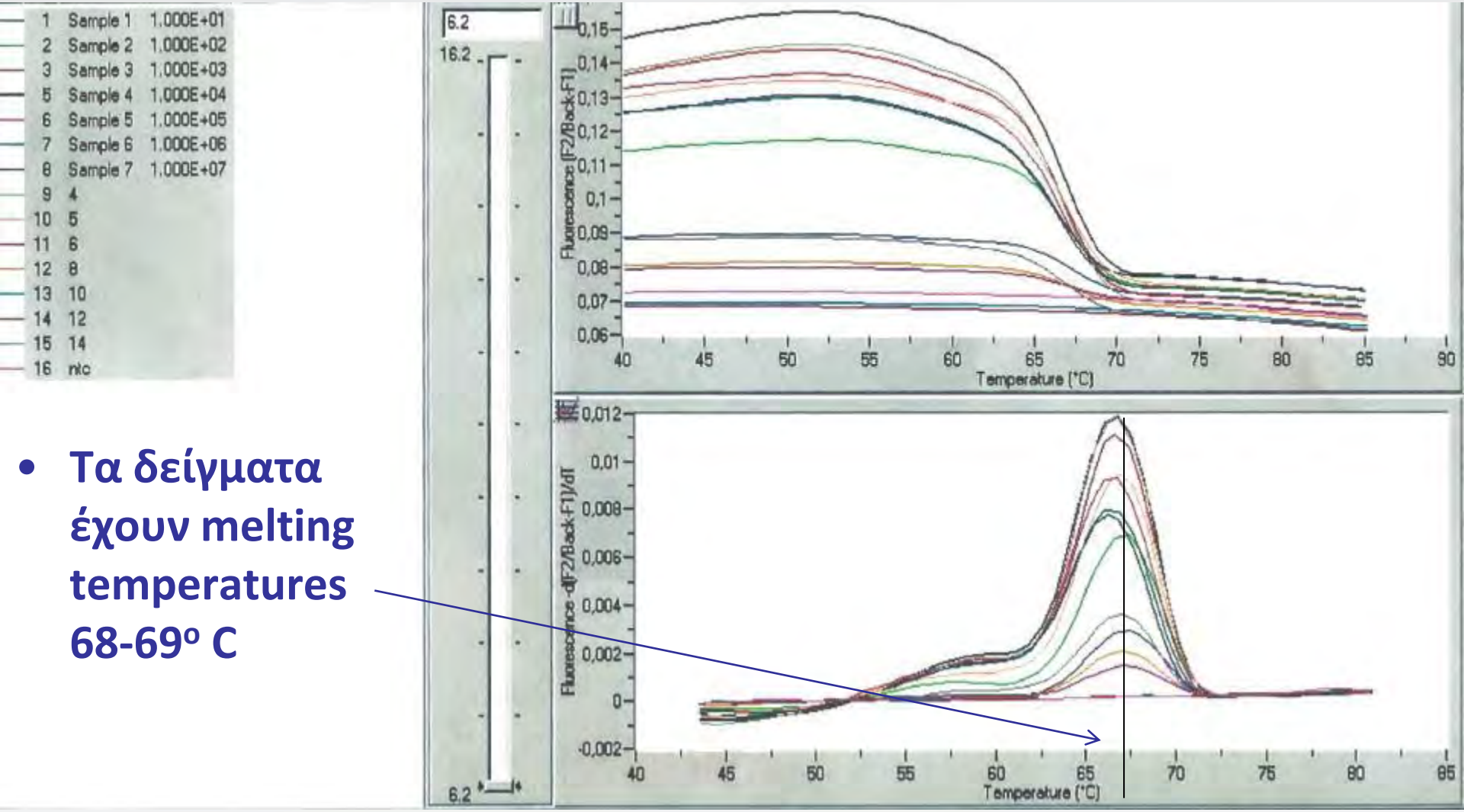
2. Logarithmic standard curve

Πώς γίνεται ο χαρακτηρισμός του προϊόντος στη real-time PCR ?

Μελέτη της καμπύλης αποδιάταξης του DNA (Melting Curve Analysis)

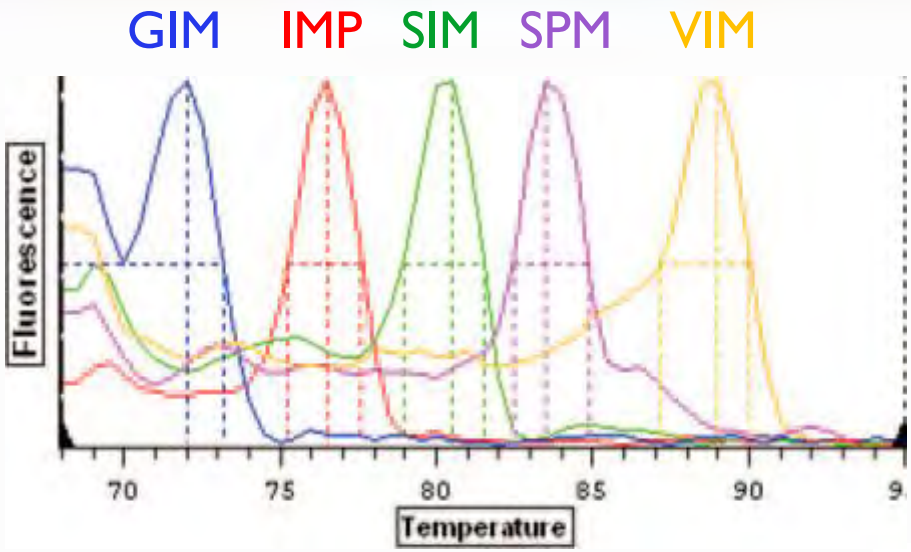
- Tm: η θερμοκρασία στην οποία το 50% του DNA είναι αποδιεταγμένο (melting point)
  - ✓ εξαρτάται απόλυτα από τις G & C βάσεις
  - ✓ ακόμα και μια μοναδική αλλαγή σε μια βάση, δηλαδή μια σημειακή μετάλλαξη ή η διαφορετική αλληλουχία μεταξύ διαφορετικών ειδών, θα δώσει προϊόντα PCR με διαφορετική Tm

Παράδειγμα ανίχνευσης Βρουκέλλα DNA με RT-PCR



- **Τα δείγματα έχουν melting temperatures 68-69° C**

RT-PCR melting curve ανάλυση γονιδίων αντοχής

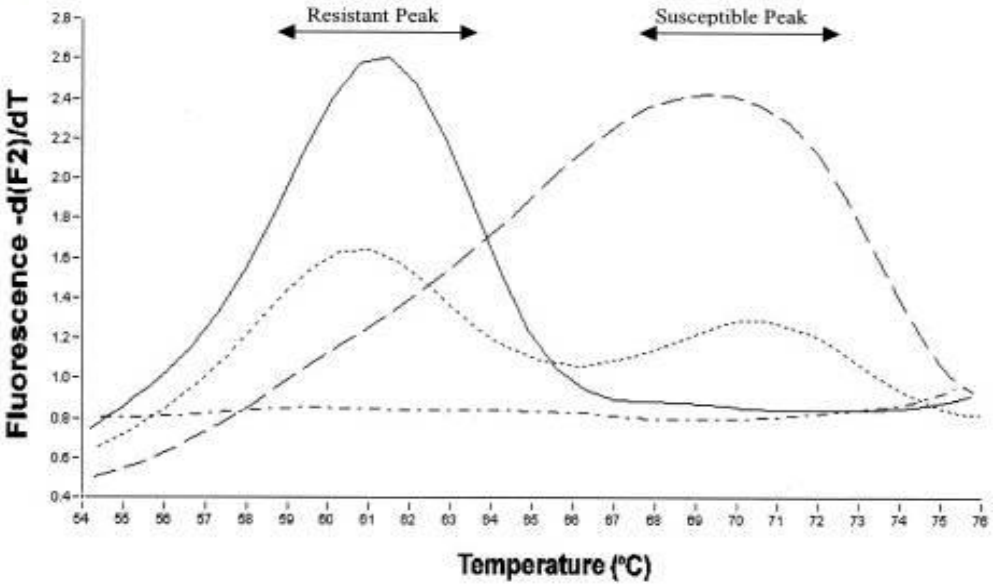


Metallo-ß-lactamase detection

The temperature at which DNA dissociates (melting temperature) is dependent on amplicon length and GC content.

Detection of linezolid^{R} *E. faecalis/E. faecium*

Melting temperature is dependent on the degree of complementarity between the probe and target sequence.



SeptiFast® panel: >25 παθογόνα

Όριο ανίχνευσης για CoNS και στρεπτόκοκκους

Gram-αρνητικά βακτήρια	Gram-θετικά βακτήρια	Μύκητες
Escherichia coli	Staphyloccus aureus	
Klebsiella (pneumoniae / oxytoca)	CoNS (Coagulase negative Staphylococci)	
Serratia marcescens	Streptococcus pneumoniae	Ca
Enterobacter (cloacae / aerogenes)	Streptococcus spp.	Candida krusei
Proteus mirabilis	Enterococcus faecium	Candida glabrata
Pseudomonas aeruginosa	Enterococcus faecalis	Asperigillus fumigatus
Acinetobacter baumannii		
Stenotrophomonas maltophilia		

Cp cut-off value : 20 cycles

Cp cut-off value : 20 cycles

CoNS: *S. epidermidis, S. hae*
saprophyticus, S.
Streptococci: *S. pyogenes, S. a*
constellatus, S. cristatus, S. ves
sangu

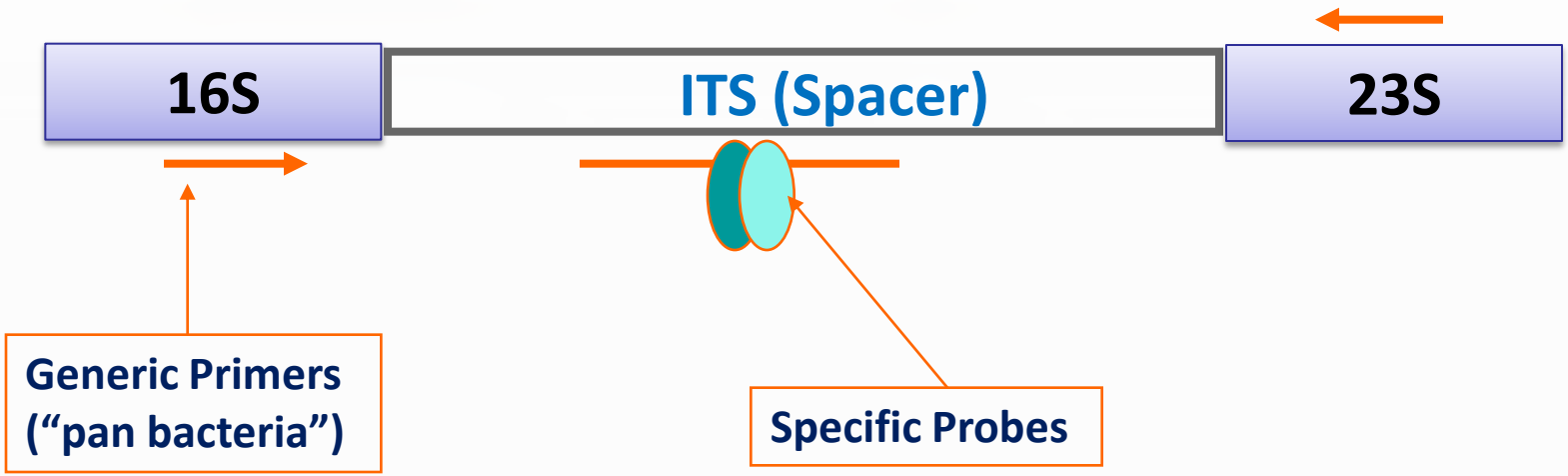
- LightCycler® Red 610
- LightCycler® Red 640
- LightCycler® Red 670
- LightCycler® Red 705

Όριο ανίχνευσης

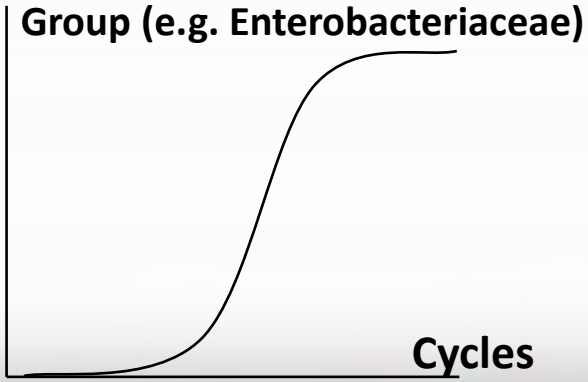
100 CFU/mL σε
- CoNS
- *C. glabrata*
- *Streptococcus* spp.

30 CFU/mL σε
- υπόλοιπους μικρο/σμούς

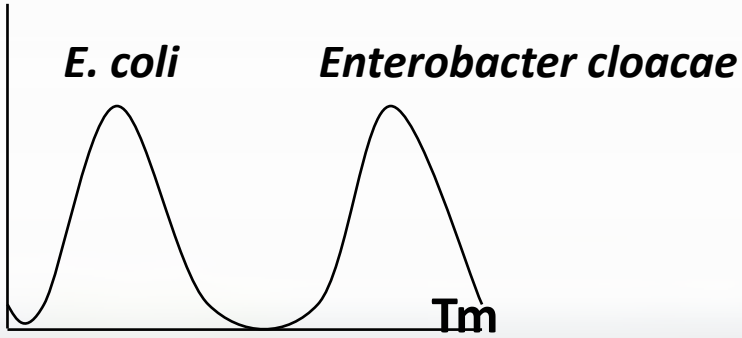
Η μεθοδολογία “Spacer Technology” που χρησιμοποιεί το SeptiFast test επιτρέπει τη διαφορική ανίχνευση σε επίπεδο είδους



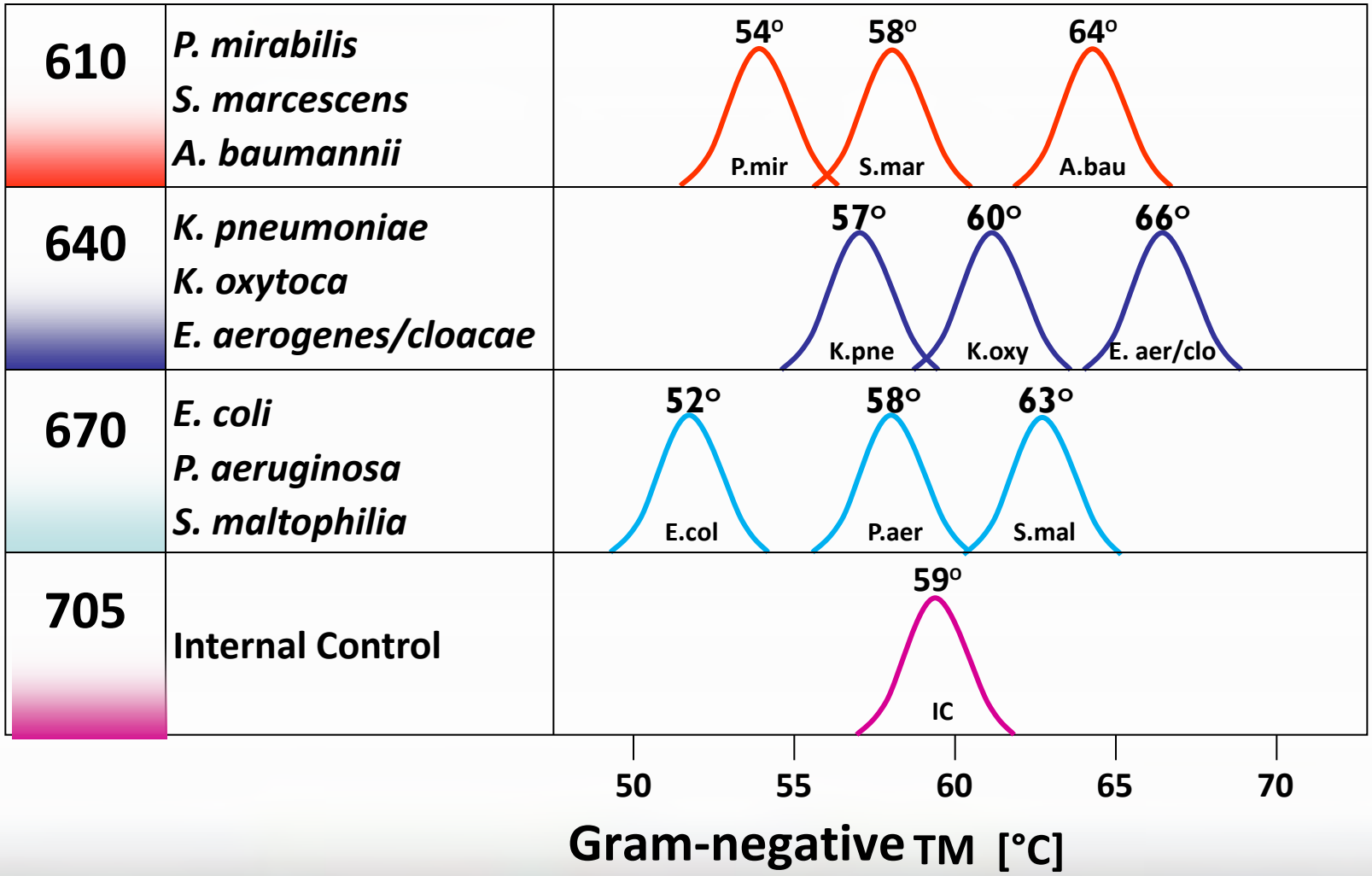
Amplification curve



Probe Melting Point(s)



Septi*Fast* PCR Test – Μεθοδολογία



Ποια τα πλεονεκτήματα από την εφαρμογή της τεχνολογίας Septi*Fast*;

- Ταχύτερη διάγνωση και έναρξη στοχευμένης ΑΒ αγωγής
  - Υψηλότερα ποσοστά θετικών αποτελεσμάτων (έως και 2 φορές)
  - Λιγότερες επιμολύνσεις
- Μεγαλύτερη ευαισθησία στη διάγνωση διεισδυτικών μυκ.
  - 5 είδη *Candida* & *Aspergillus fumigatus*
- Ανίχνευση μικροβιακού DNA παρά τη χορήγηση αντιβιοτικών
- Ανίχνευση παθογόνων σε αρνητικές αιμοκαλλιέργειες
  - Επιβεβαίωση με άλλες μικροβιολογικές εξετάσεις (καλλιέργειες από την περιοχή της φλεγμονής, ανίχνευση αντιγόνων)

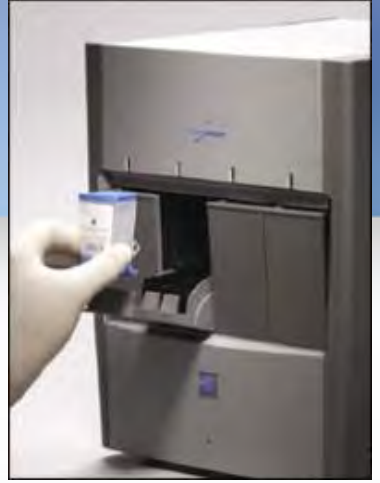
✓LC-SF is of high **rule-in value** for early detection of septic patients.
✓In a population <u>with low pretest probability</u>, LC-SF test can still provide **valuable information for ruling out** bacteremia or fungemia.

Chang S-S et al., (2013) Multiplex PCR System for Rapid Detection of Pathogens in Patients with Presumed Sepsis – A Systemic Review and Meta-Analysis. PLoS ONE 8(5): e62323

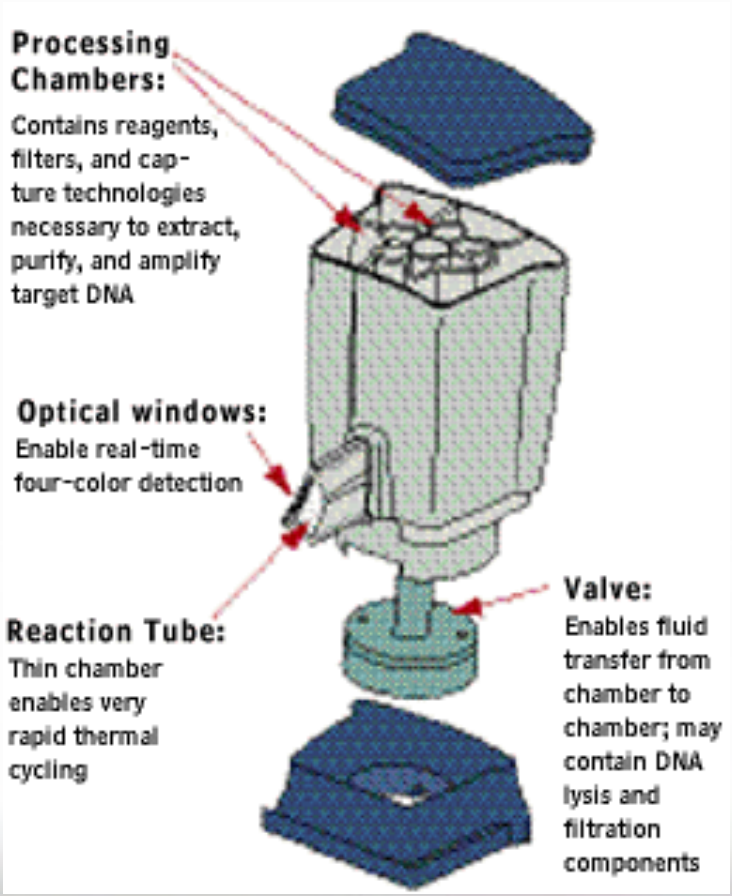
Comparison of FDA-cleared molecular methods for detection of microorganisms in positive blood culture broths

Test	Targets	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Time to result (h)	Format and setup
Verigene BC-GP	12 Gram-positive genus or species targets and 3 resistance markers (*mecA*, *vanA*, *vanB*)	92–100	98–100	2.5	On-demand, microarray, automated sample processor, manual transfer of array to analyzer
Verigene BC-GN	8 Gram-negative genus or species targets and 6 resistance markers (KPC, NDM, CTX-M, VIM, IMP, OXA)	81–100	98–100	2	On-demand, microarray, automated sample processor, manual transfer of array to analyzer
FilmArray BCID	8 Gram-positive, 11 Gram-negative, and 5 yeast genus or species targets, 4 resistance markers (*mecA*, *vanA/B*, KPC, NDM)	88–100	94–100	1	On-demand, parallel miniaturized singleplex RT-PCR, full sample-to-result capability
GeneOHM StaphSR	*S. aureus*, MRSA	50–100	98–99	2	Batch, RT-PCR, offline manual sample lysis, extraction, and RT-PCR setup
Xpert MRSA/SA Blood Culture	*S. aureus*, MRSA	69–100	98–100	1	On-demand, RT-PCR, full sample-to-result capability

Buchan BW, Ledeboer NA. Emerging Technologies for the Clinical Microbiology Laboratory
Clin. Microbiol. Rev. 2014, 27(4):783



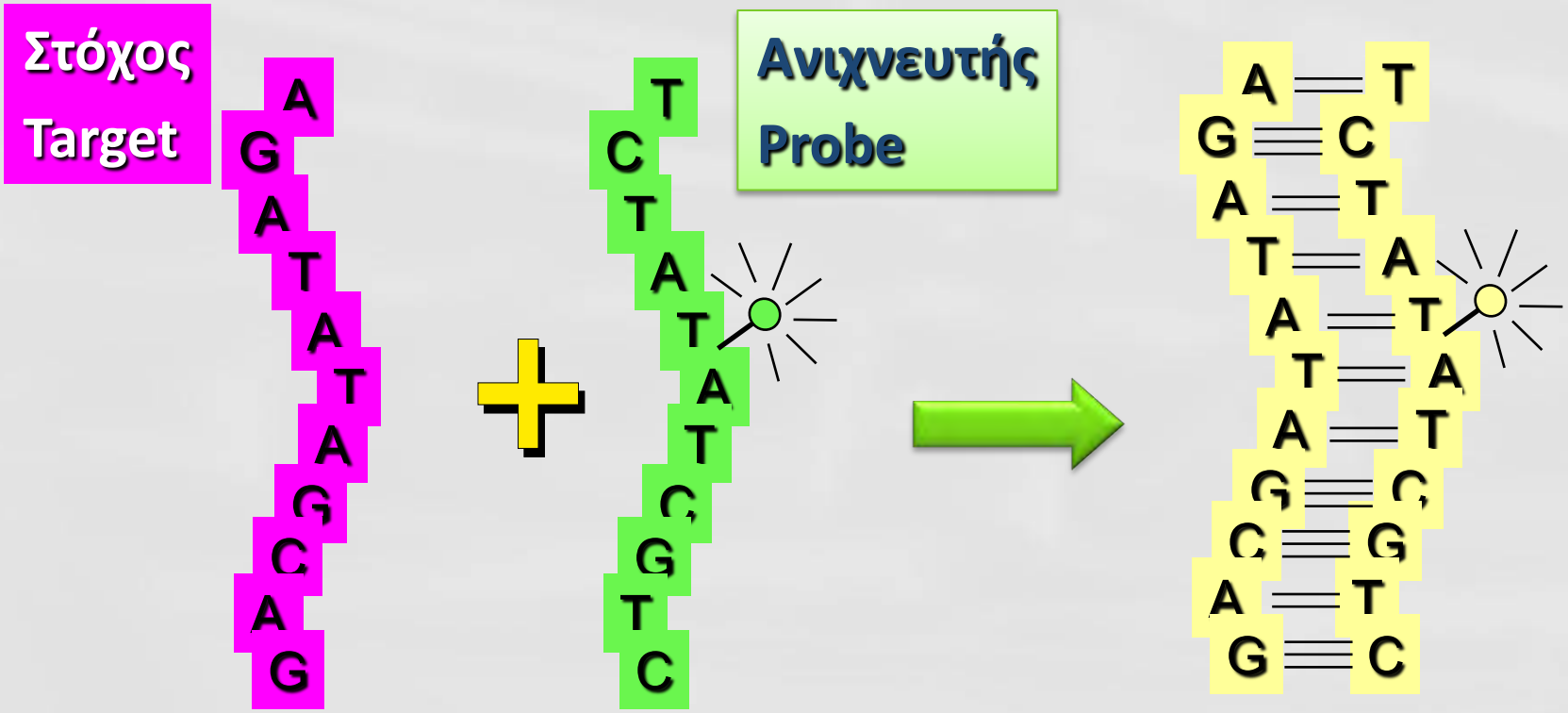
Cepheid GeneXpert system



- Fully integrated and automated sample preparation, RT-PCR and detection
- Specimens don't need to be batched
- <2 mins hands-on time
- Results in **<1hr** – 6 targets per sample
- Detection of
  - ✓*Streptococcus agalactiae* (Group B)
  - ✓MRSA/SA – *orfX*-SCC*mec* junction + *mecA* +*spa*.
  - ✓VRE – *vanA.*
  - ✓*M. tuberculosis* and MTB/RIF – mutations in *rpoB*

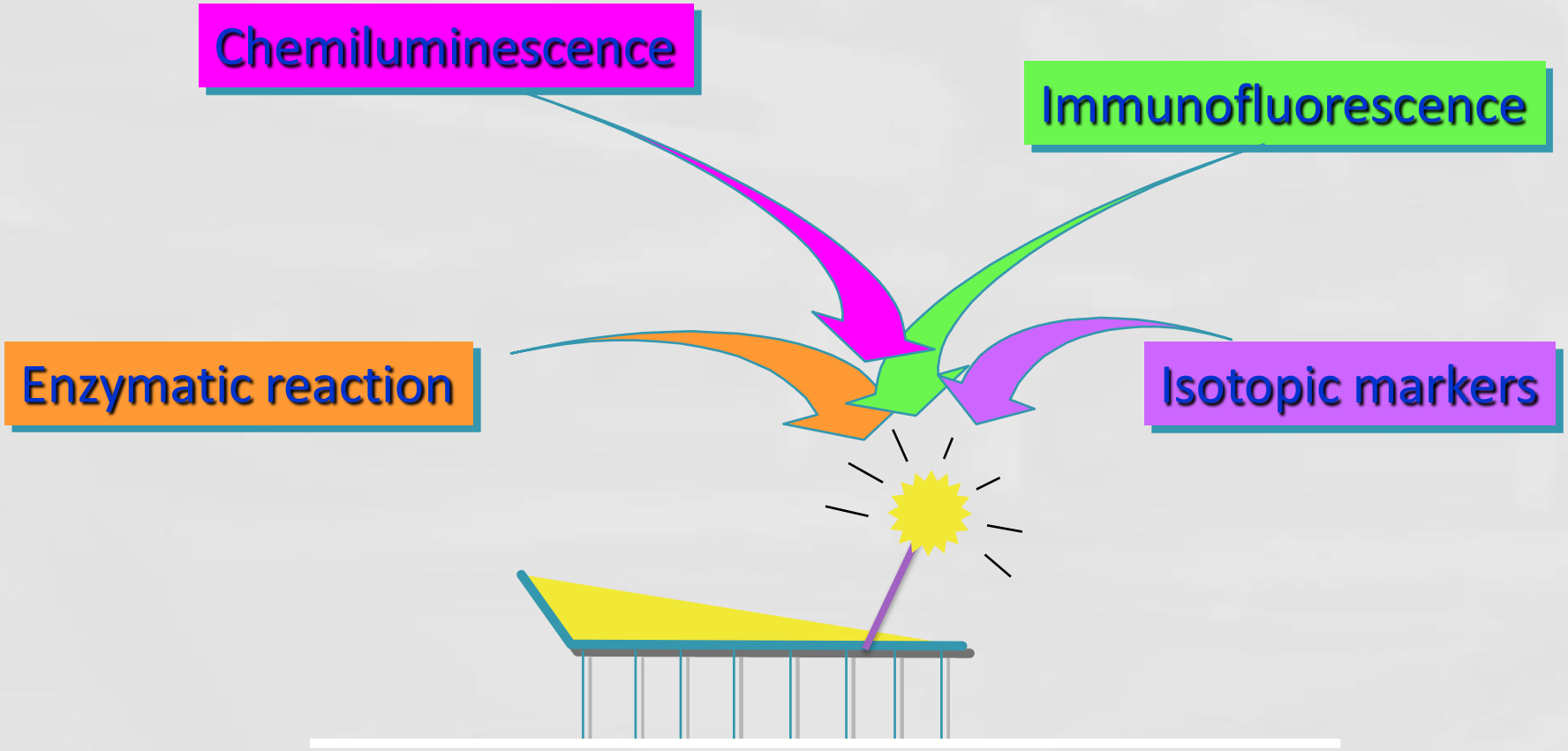
http://www.cepheid.com/

2. Μέθοδοι υβριδισμού (Hybridization methods)



Χρησιμοποίηση σημασμένων ανιχνευτών (DNA, RNA ή PNA probes) που συνδέονται ειδικά με συμπληρωματικές αλληλουχίες –στόχους

2. Μέθοδοι υβριδισμού: ανίχνευση



Εφαρμογές μεθόδου υβριδισμού

- **Ταυτοποίηση μικροοργανισμού από καλλιέργεια**

  όπου η κλασική μεθοδολογία είναι δύσκολη, χρονοβόρα, πολυέξοδη, απαιτεί ειδικό εξοπλισμό

  - Έτοιμα kits για *M. pneumoniae, Streptococcus* group A, *C. jejuni, N. gonorrhoeae, H. influenzae, M. avium, M. intracellulare,…*

    Histoplasma capsulatum, Coccidioides immitis

- **Άμεση αναζήτηση σε κλινικά δείγματα**

  Στόχος το rRNA: σε πολλά αντίγραφα, αλληλουχία συντηρημένη

  - Έτοιμα kits για *N. gonorrhoeae, C. trachomatis, M. pneumoniae, L. pneumophila*

PNA-FISH (Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridization) σε θετική καλλιέργεια αίματος

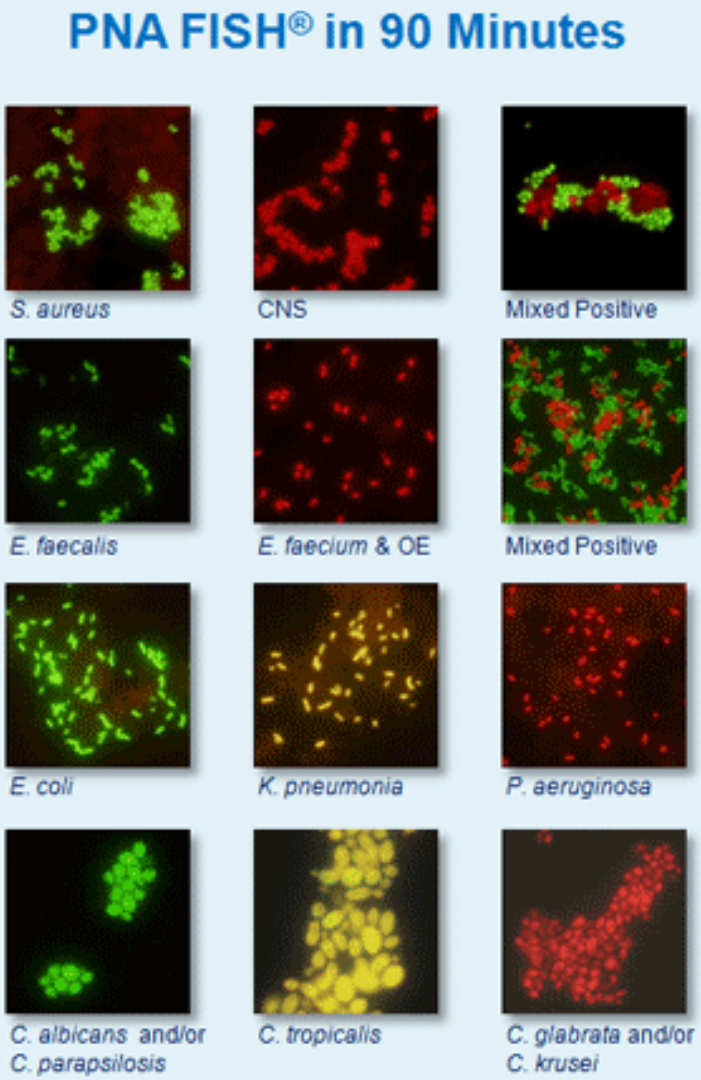
✓Στόχος rRNA

✓Συνθετικά probes σημασμένα με φθοριόχρωμα

- μονής έλικας σημασμένα με fluorescein ή rhodamine
- ουδέτερης φόρτισης
- μικρό μέγεθος και υδροφοβικότητα → διέλευση μέσω κυτταρικής μεμβράνης → δεν απαιτείται κυτταρική λύση, ούτε απομόνωση γενετικού υλικού

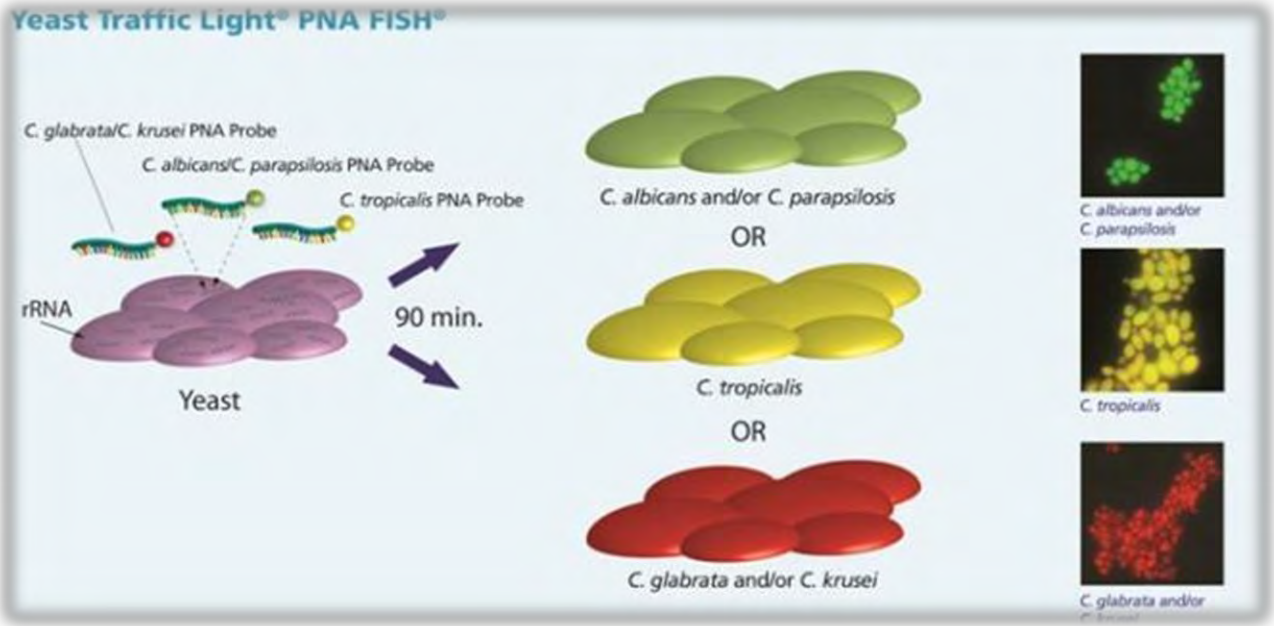
- Μετά τον υβριδισμό, ανίχνευση με μικροσκόπιο φθορισμού.

AdvanDx



PNA-FISH: χρησιμότητα εφαρμογής της

- Υψηλές ευαισθησία (98.7%) και ειδικότητα (99%)
- Γρήγορη ταυτοποίηση: μείωση θνητότητας, χρήσης αντιβιοτικών και παραμονής στο νοσοκομείο



Διάκριση ειδών *Candida*:

- σωστή αντιμυκητική αγωγή,
- μείωση θεραπευτικού κόστους

1. Gescher DM, et al. Int J Antimicrob Agents 2008;32 (Suppl 1):S51–S59; **2**. Kudo M, et al. J Infect Chemother 2009;15:23–6. **3.** Forrest GN, et al. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:3558–63; **4.** Forrest GN, et al. J Clin Microbiol 2006;44:3381–3; **5.** Della-Latta, P. et al. Presented at: 18th ECCMID; Barcelona, Spain. 2008; **6.** Ly T, et al. Ther Clin Risk Manag 2008;4:637–40; **7.** Forrest GN, et al. J Antimicrob Chemother 2006;58:154–8; **8.** Alexander BD, et al. Diagn Microbiol Infect Dis 2006;54:277–82

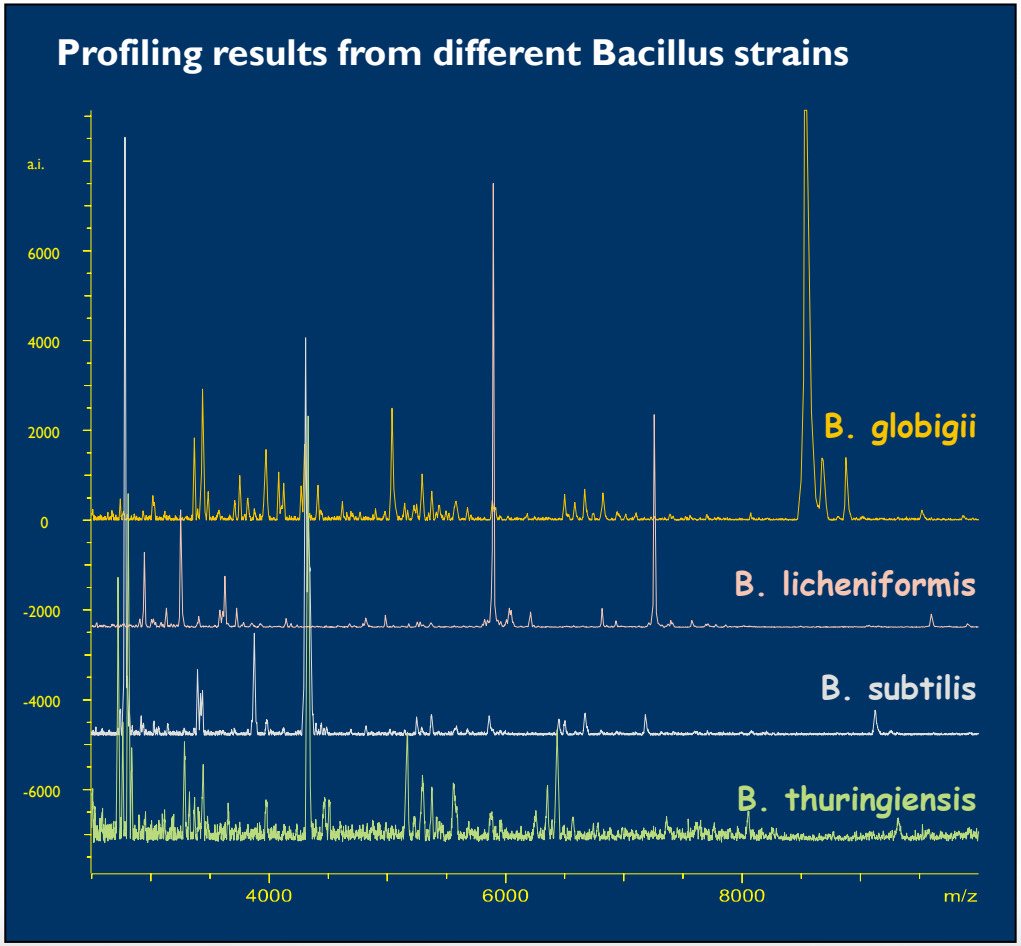
Ταυτοποίηση παθογόνου από θετική καλλιέργεια

- Μέθοδοι χωρίς πολλαπλασιασμό (non-amplified)
  - **Nucleic acid-based technology**
    - Peptide nucleic acid (PNA) fluorescence in situ hybridization (FISH)
  - **Non nucleic acid-based techniques**
    - Malti matrix-assisted laser desorption–ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)

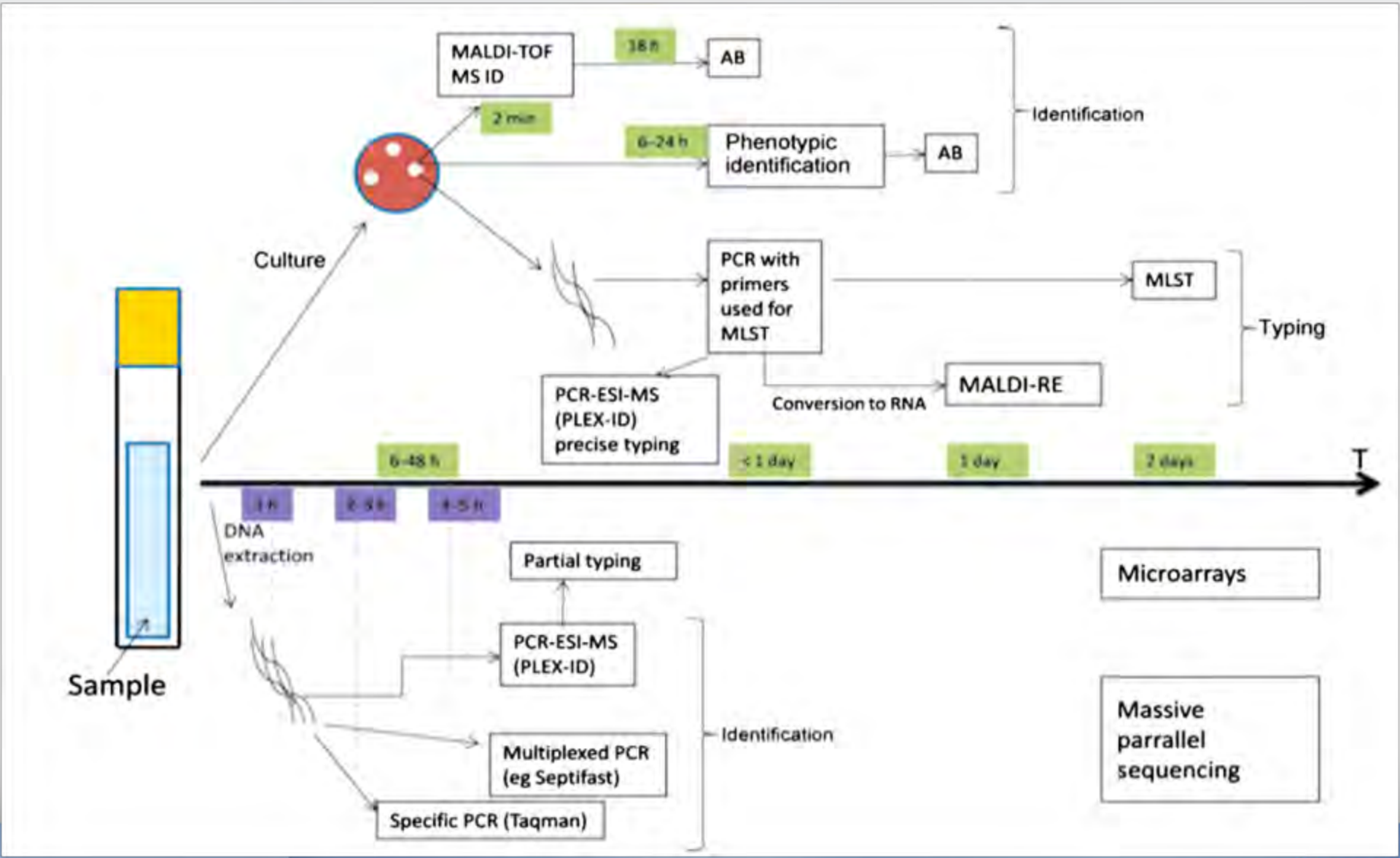
Kotsaki A, Giamarellos-Bourboulis EJ Expert Opin Med Diagn 2012;6:209

The matrix-assisted laser desorption ionization time-off light mass spectrometry (MALDI-TOF MS)

- Δημιουργία χαρακτηριστικών εικόνων **φασμάτων μάζας** μοναδικών για κάθε μικροοργανισμό
  - Ακριβής ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους και είδους
  - Πιθανή χρησιμοποίησή της σε τυποποίηση στελεχών



Ποιες οι εφαρμογές της φασματομετρίας μάζας στο κλινικό μικροβιολογικό εργαστήριο ρουτίνας ;

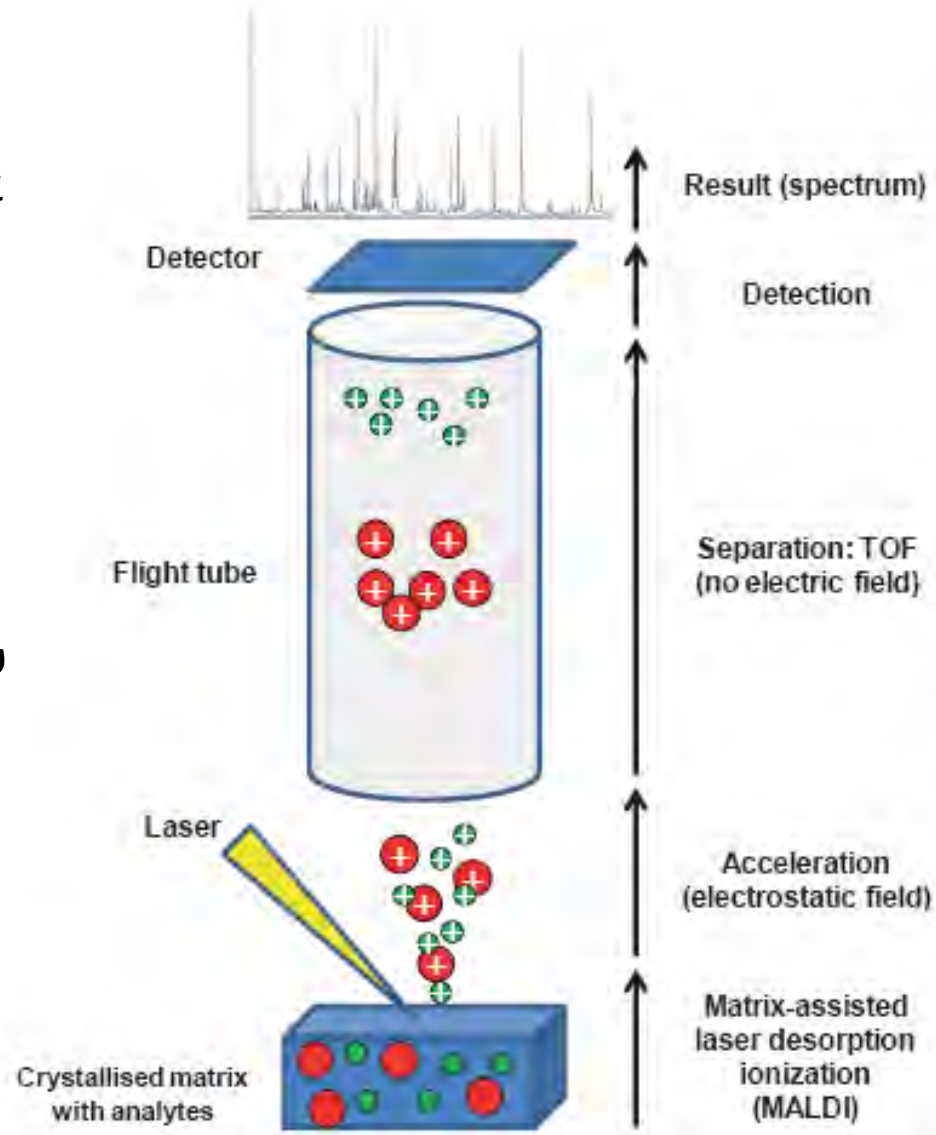


Φασματομετρία μάζας (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight, MALDI-TOF-MS)

Αρχή μεθόδου

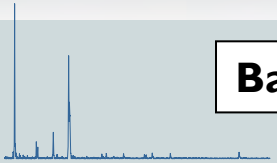
- Ιονισμός μακρομορίων, κυρίως πρωτεϊνών, ενός εύκολα και γρήγορα προετοιμαζόμενου δείγματος
- Επιτάχυνση των ιόντων προς την περιοχή του ανιχνευτή κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες και σε περιβάλλον κενού
- Ανίχνευση και ανάλυση των προκυπτουσών φασμάτων μάζας που οδηγεί στην ταυτοποίηση των μακρομορίων μέσω του προσδιορισμού του λόγου μάζας προς φορτίο (**χρόνος 2 min**).

Clin Microbiol Infect 2010;16:1604



MALDI-TOF MS: ταυτοποίηση από καλλιέργεια

Identified species

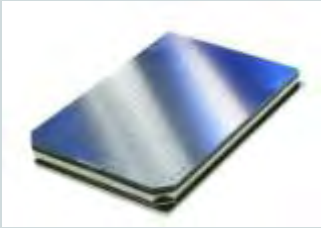


Bacillus globigii

BioProfiler
Data interpretation

Generate MALDI-TOF profile spectrum

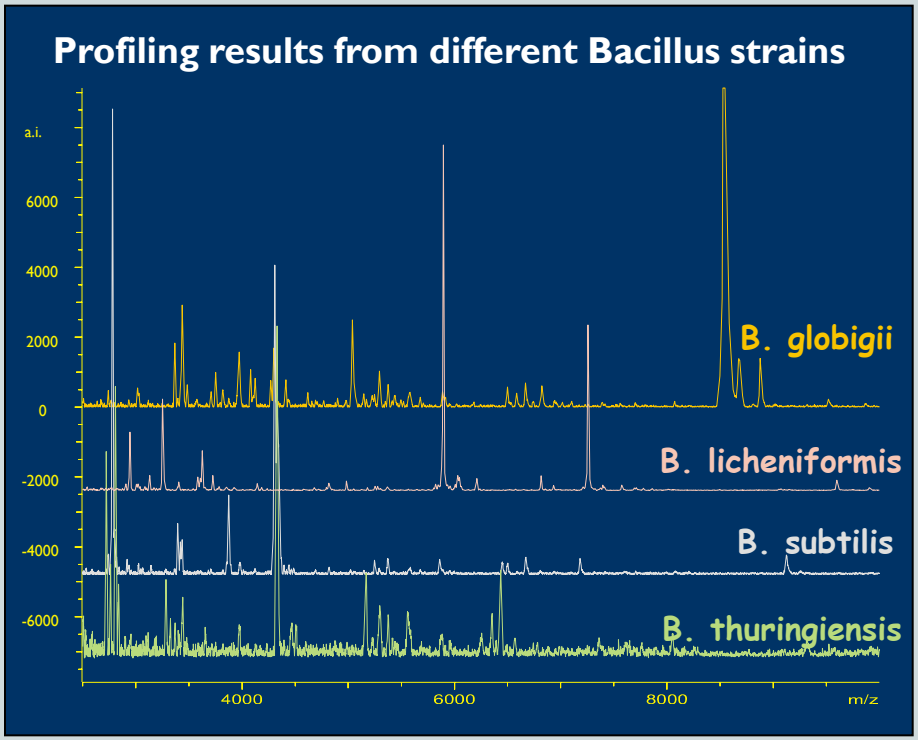
Smear a thin-layer onto a MALDI target plate

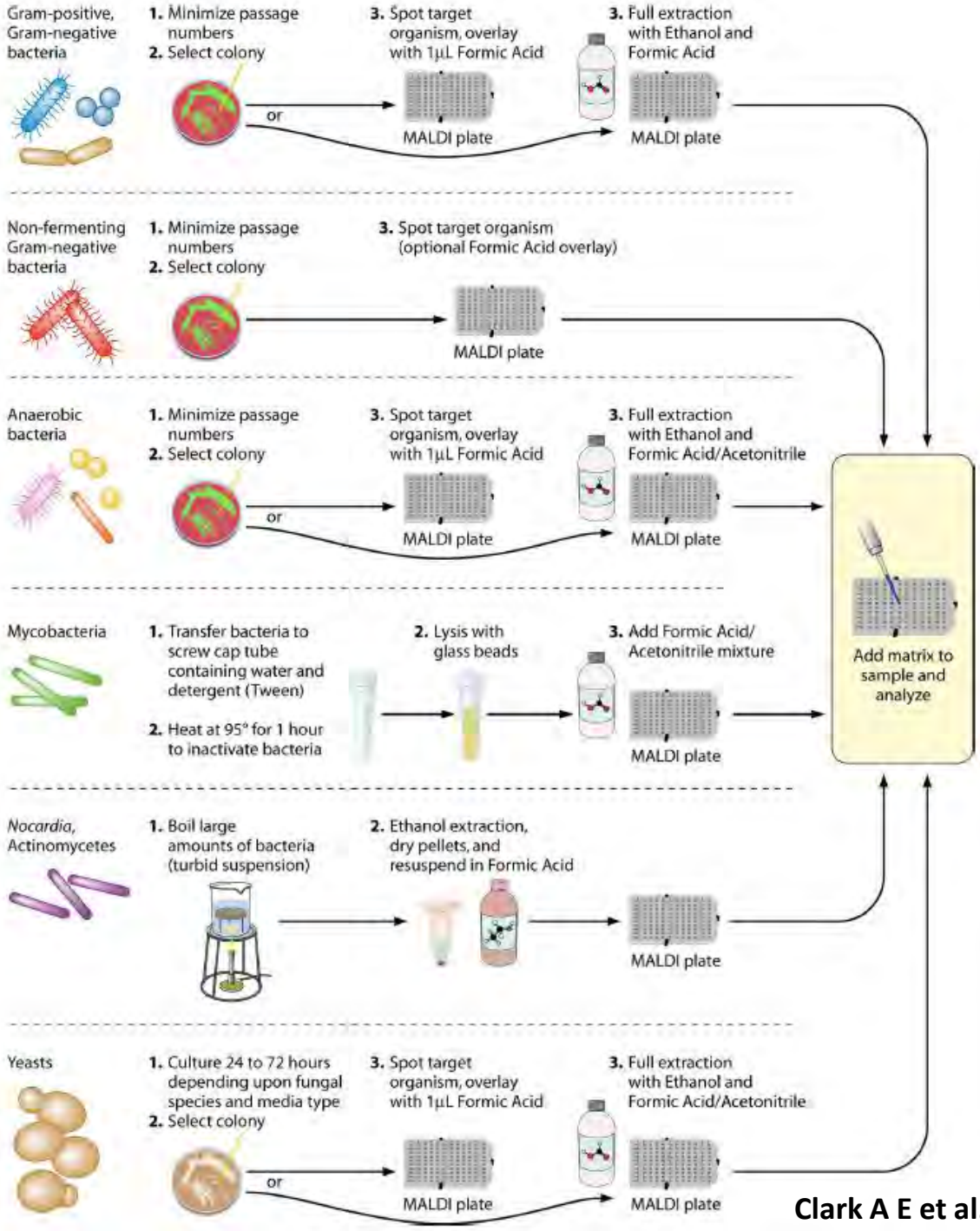


Select a colony

Unknown microrganism

?

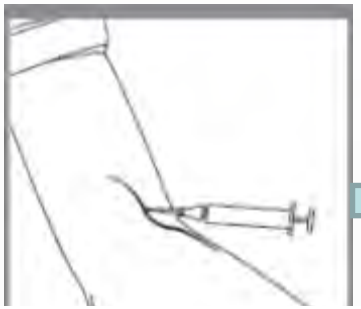


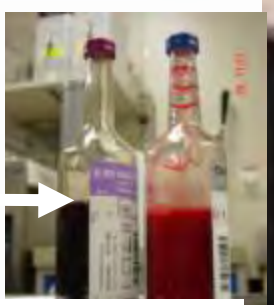


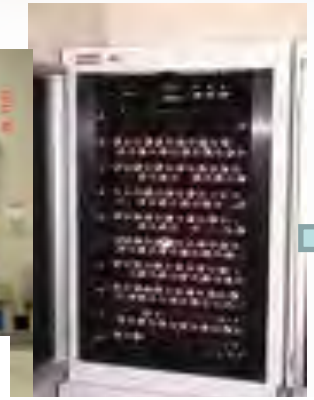
Clark A E et al.

Genus	Species or group evaluated
Gram-positive organisms	
Staphylococcus	Coagulase-negative staphylococci
	S. aureus
	Coagulase positive, non-*S. aureus*
	Mixed staphylococcal species
Micrococcus	*Micrococcus* spp.
Streptococcus	Beta-hemolytic species
	Group A streptococci
	Group B streptococci
	Streptococcus pneumoniae
	Viridans group streptococci
	Nutritionally variant streptococci
Enterococcus	*Enterococcus* spp.
Lactococcus	*Lactococcus* spp.
Bacillus	*Bacillus* spp.
Listeria	*Listeria* spp.
Corynebacterium	*Corynebacterium* spp.
Arcanobacterium/Trueperella	*Trueperella* spp./*A. haemolyticum*
Nocardia/mycobacteria	
Nonfermenting rods	
Acinetobacter	*Acinetobacter*
Burkholderia	*B. cepacia* complex
	B. mallei/*B. pseudomallei*
Pseudomonas	*Pseudomonas* spp.
Stenotrophomonas	*Stenotrophomonas maltophilia*
Fastidious organisms	
Brucella	*Brucella* spp.
Bartonella	*Bartonella* spp.
Francisella	*Francisella* spp.
Haemophilus	*Haemophilus* spp.
Fungi	
Yeasts	
Candida	*Candida* spp.
Cryptococcus	*Cryptococcus* spp.
Filamentous fungi/molds	
Aspergillus	*Aspergillus* spp.
Fusarium	*Fusarium* spp.
Dermatophytes	
Pseudallescheria-Scedosporium	*Pseudallescheria-Scedosporium*
Penicillium	*Penicillium* spp.
Lichtheimia	*Lichtheimia* spp.

MALDI-TOF-MS: εφαρμογή σε θετική αιμοκαλλιέργεια





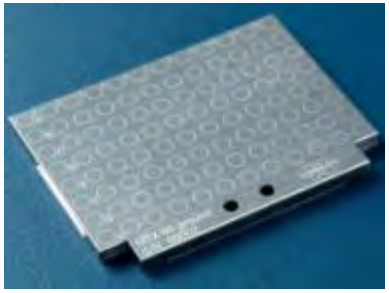


Επώαση αιμοκαλλιεργειών

Αν Θετική

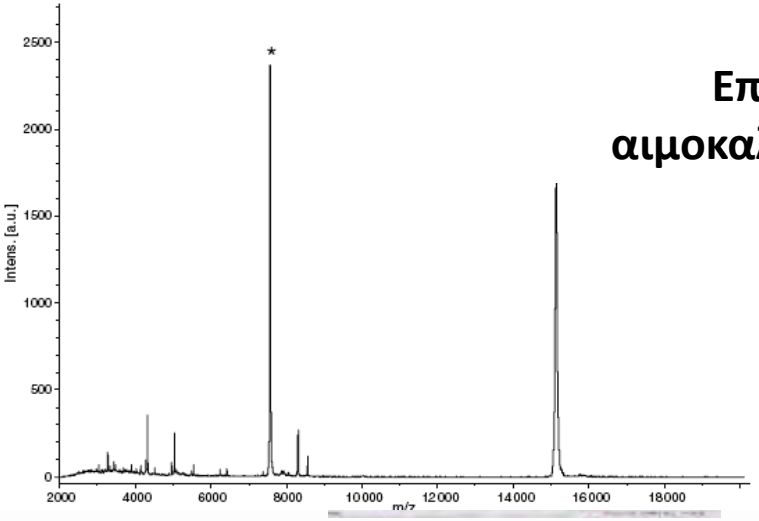
Απομάκρυνση αίματος γιατί ψευδώς θετικά σήματα λόγω αιμοσφαιρίνης

Ετοιμασία του βακτηριακού ιζήματος



Τοποθέτηση του βακτηριακού ιζήματος στην MALDI μικροπλάκα

Λήψη του πρωτεϊνικού προφίλ

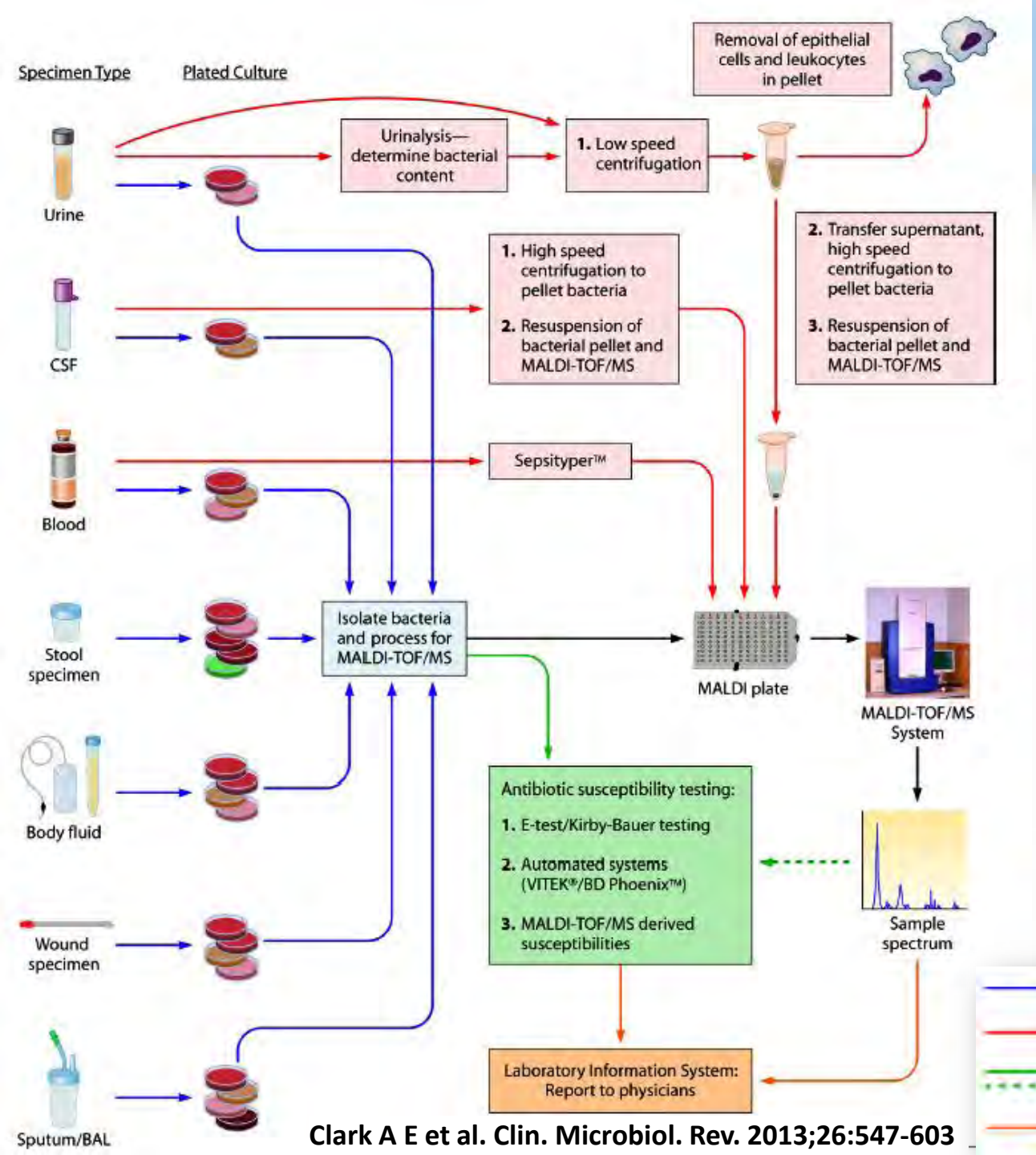


Σύγκριση με βάση δεδομένων

Αποτέλεσμα σε < 2 h

Clin Microbiol Infect 2010;16:1620

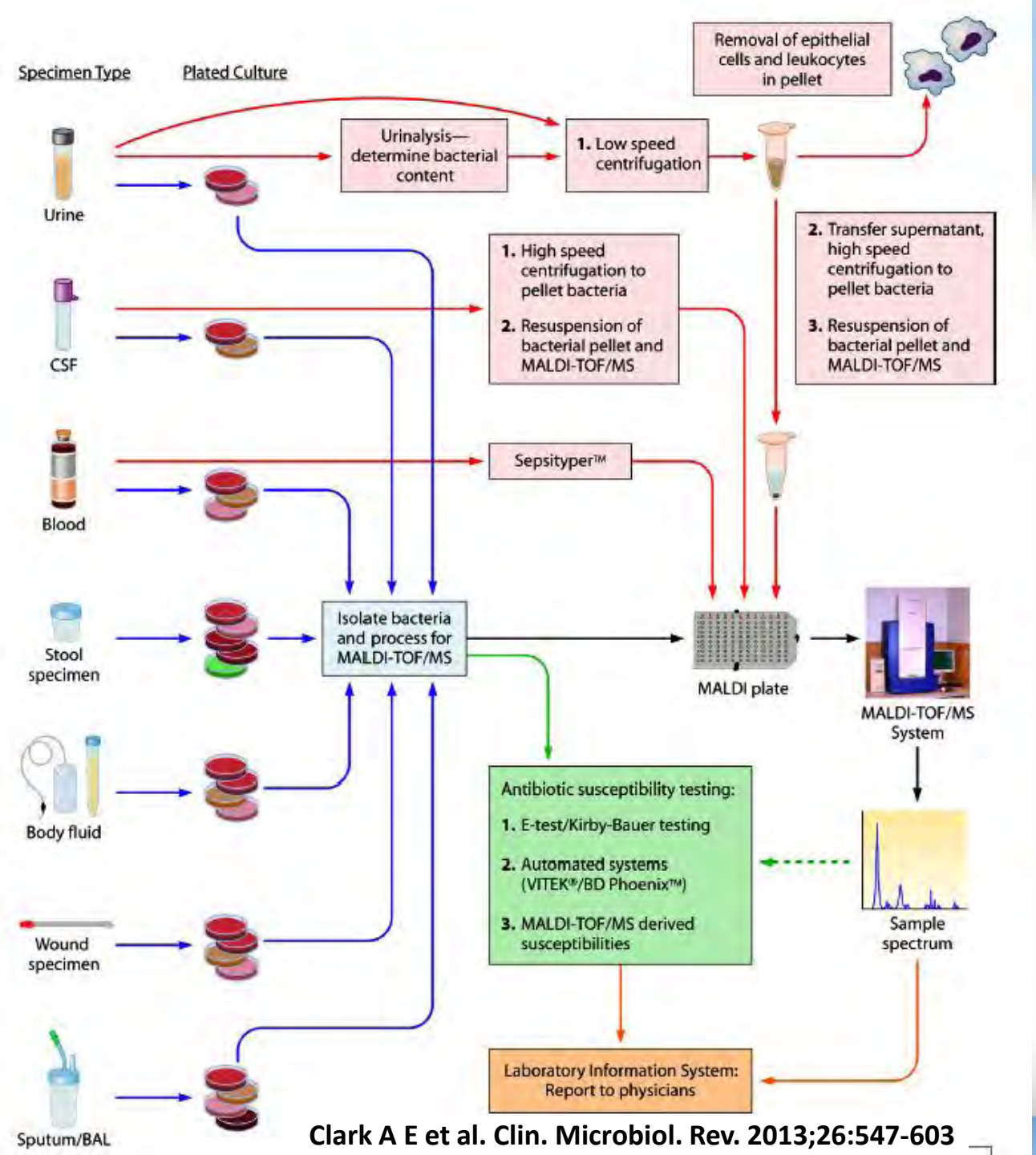
MALDI-TOF MS στη ρουτίνα του Εργαστηρίου



Clark A E et al. Clin. Microbiol. Rev. 2013;26:547-603

- **Από καλλιέργεια**
- **Άμεσα από το κλινικό δείγμα**
  - Ούρα
  - ΕΝΥ
  - Αιμοκαλλιέργεια
- **Έλεγχος ευαισθησίας**

MALDI-TOF MS στη ρουτίνα του Εργαστηρίου



Clark A E et al. Clin. Microbiol. Rev. 2013;26:547-603

Έλεγχος ευαισθησίας

Resistance to Beta-Lactam Antibiotics in Enteric and Nonfermenting Gram-Negative Rods

Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*

Carbapenem-Resistant *Klebsiella* spp.

Carbapenem-Resistant *Bacteroides fragilis*

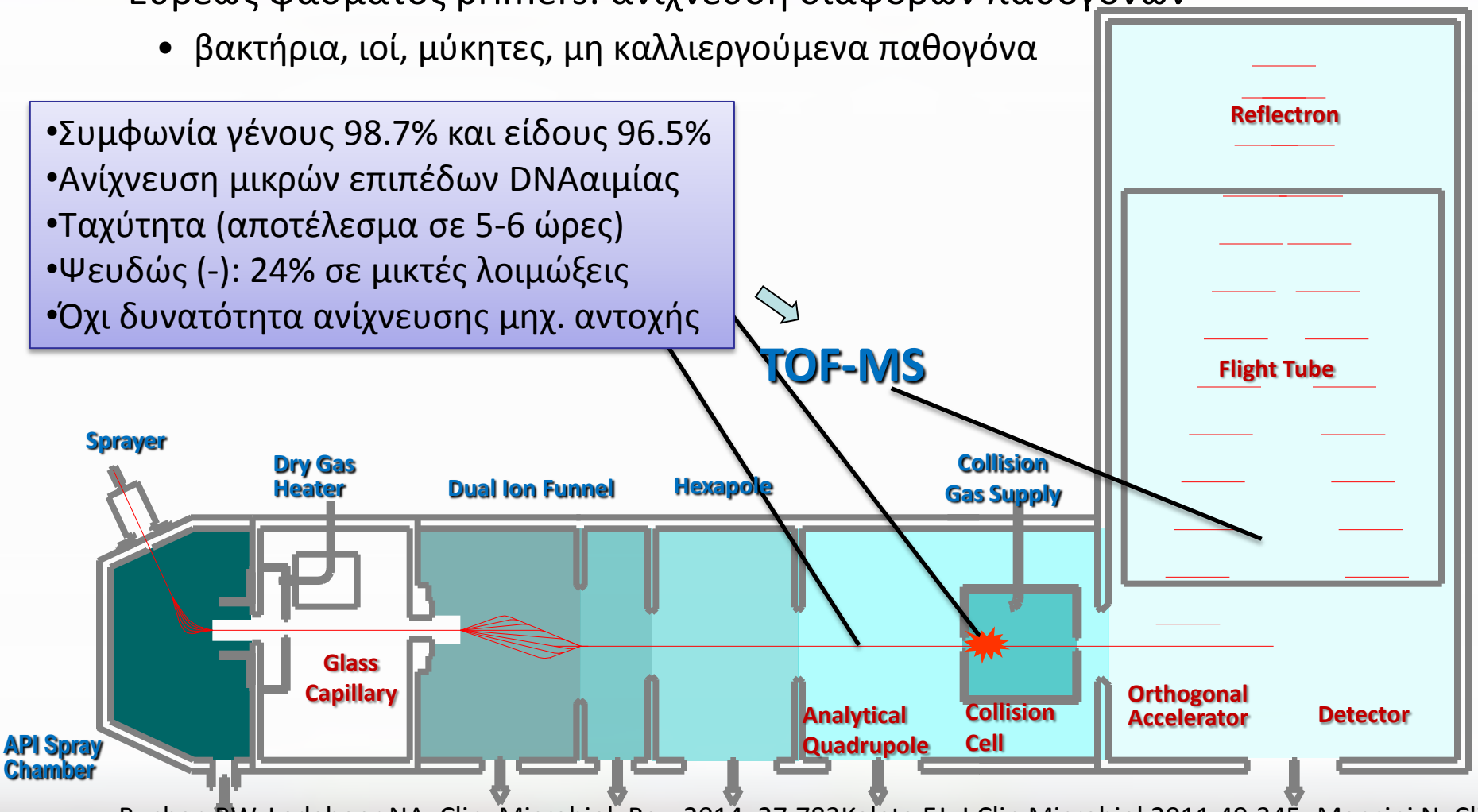
MRSA and Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*

Vancomycin-Resistant *Enterococcus*

PCR/ESI-MS

- Συνδυασμός PCR και electrospray ionization mass spectrometry.
  - Ευρέως φάσματος primers: ανίχνευση διαφόρων παθογόνων
    - βακτήρια, ιοί, μύκητες, μη καλλιεργούμενα παθογόνα

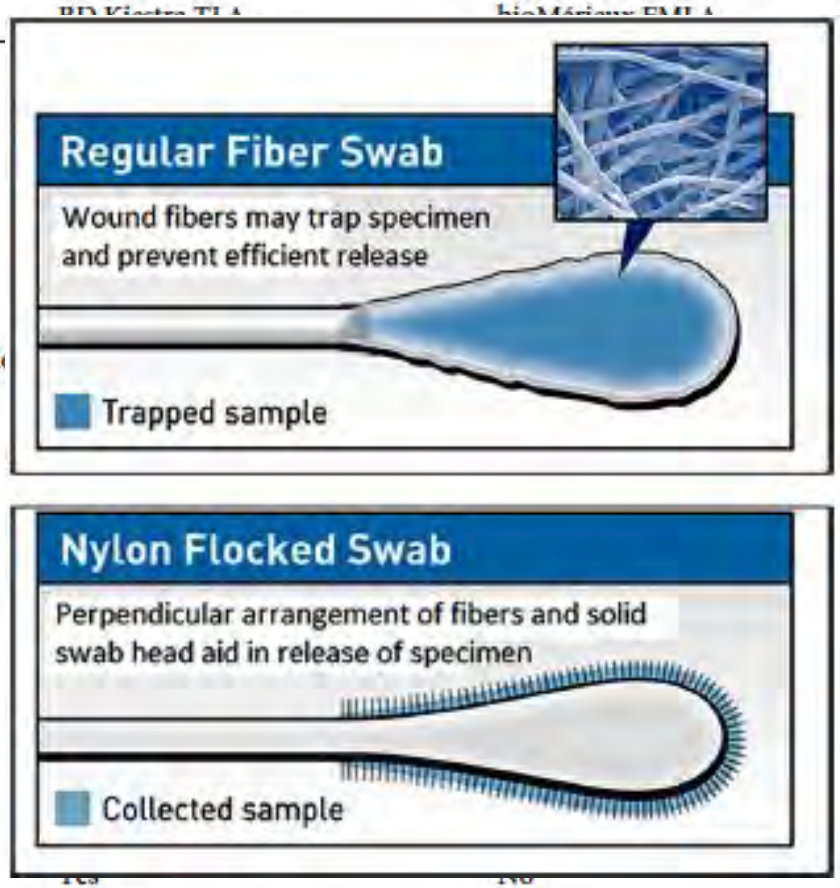
•Συμφωνία γένους 98.7% και είδους 96.5%
•Ανίχνευση μικρών επιπέδων DNAαιμίας
•Ταχύτητα (αποτέλεσμα σε 5-6 ώρες)
•Ψευδώς (-): 24% σε μικτές λοιμώξεις
•Όχι δυνατότητα ανίχνευσης μηχ. αντοχής



Buchan BW, Ledeboer NA. Clin. Microbiol. Rev. 2014, 27:783Kaleta EJ, J Clin Microbiol 2011;49:345; Mancini N, Clin Microbiol Rev 2010;23:235; Ecker DJ, Proc Natl Acad Sci 2005;102:8012; Mayr BM, Anal Chem 2005;77:4563

Το σύγχρονο κλινικό Μικροβιολογικό Εργαστήριο: πλήρης αυτοματοποίηση

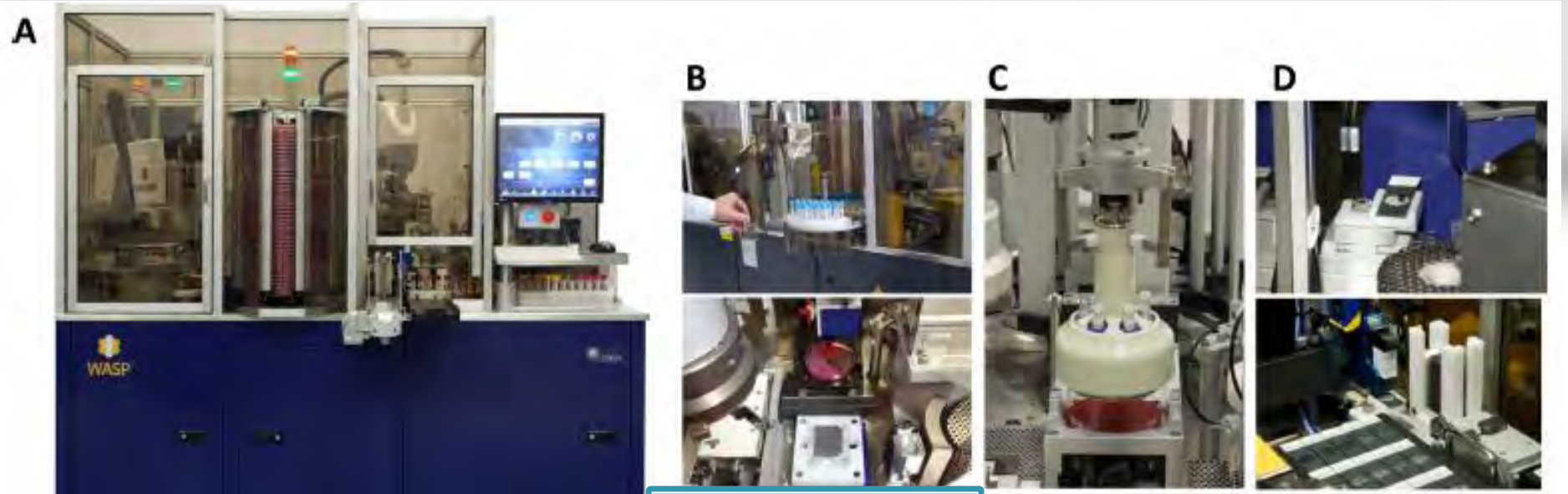
Characteristic
Core specimen inoculation module
Inoculation conducted in integrated biosafety cabinet
Uninoculated plate capacity (no. of standard plates)
Automated decapping and recapping
Inoculation method
Manual inoculation of nonliquid or nonstandard specimens for automated streaking
Streak pattern
Inoculations (no. of standard plates)/h
Automated inoculation of broths
Automated placement of disks
Automated slide prepn
Automated prepn of MALDI target plates
Commercially available



Ledeboer NA. Clin. Microbiol. Rev. 2014, 27(4):783

Μικροβιολογικό Εργαστήριο: πλήρης αυτοματοποίηση

Walk-away specimen processor (WASP)



MALDI-TOF MS

C: application of antibiotic disks to inoculated media

D & E: Gram slide prep module

Core unit (A): two independently operating robotic arms capable of decapping, recapping, and inoculating up to 180 solid agar plates per hour.
The core unit is also equipped with a vortex for sample mixing and a "tool belt" which can accommodate three different-size reusable calibrated inoculating loops and a blunt tipped colony-picking instrument which can be accessed by the robotic arm as needed.

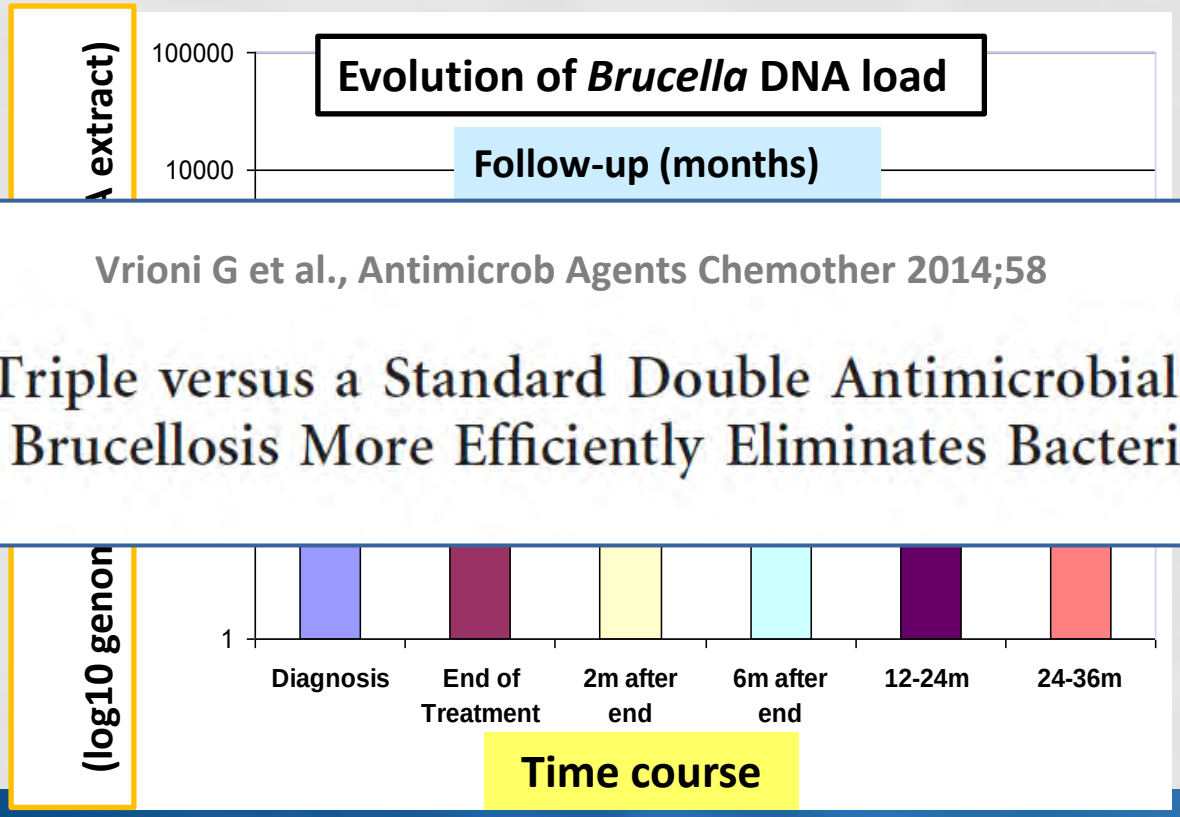
Περιορισμοί μοριακών τεχνικών

- Κίνδυνος ανίχνευσης **νεκρών** μικροβίων
  - σημασία σε περίπτωση θεραπείας
  - δυνατότητα ανίχνευσης mRNA
- Κίνδυνος επιμολύνσεων → **ψευδώς (+)** αποτέλεσμα
  - κανόνες ασηψίας
  - καλός σχεδιασμός των χώρων εργασίας
  - χρησιμοποίηση tips με φίλτρο
  - χειρισμοί κάτω από laminar
  - χρήση UV
  - χρησιμοποίηση controls
- Κίνδυνος ύπαρξης αναστολέων → **ψευδώς (-)** αποτέλεσμα
  - χρησιμοποίηση (+) control μαζί με υπό εξέταση δείγμα

Ερμηνεία αποτελεσμάτων

The results of the molecular testing should always be interpreted in a clinical context

- *B. melitensis* DNA may persist during a
c
a
t
apparent recovery from infection.



AAC Journals.ASM.org

Vrioni G et al., Antimicrob Agents Chemother 2014;58

Administration of a Triple versus a Standard Double Antimicrobial Regimen for Human Brucellosis More Efficiently Eliminates Bacterial DNA Load

Vrioni G. et al. Clinical Infectious Diseases, 2008, 46:e131-136

Ερμηνεία αποτελεσμάτων

- Αναγνώριση ψευδώς αρνητικών
- Αναγνώριση ψευδώς θετικών
- Διάκριση ζωντανών από μη μικροοργανισμών
- Καθορισμός του είδους της λοίμωξης
  - Αποικισμός vs. λοίμωξη
  - Ασυμπτωματική λοίμωξη vs. ενεργό λοίμωξη

Παραδείγματα εφαρμογής μοριακών τεχνικών
1. Ταχεία-αξιόπιστη διάγνωση φυματίωσης

- Είναι απαραίτητη λόγω
  - αναγκαιότητα έναρξης θεραπευτικής αγωγής
  - απομόνωσης του ασθενούς (← stop transmission)
  - έναρξη προφυλακτικής αγωγής στο οικείο περιβάλλον (← prevent disease)

  - 1985-σήμερα: ↑ συχνότητας νόσου
  - ↑ πολυανθεκτικών TB (MDR-TB) (R to INH and RIF)

Μικροβιολογική εργαστηριακή διάγνωση ΤΒ

Δείγματα (80% πνευμονικά – 20% εξωπνευμ.)
Ομογενοποίηση / ρευστοποίηση

Μικροσκοπική (Z-N)

Ευαισθησία:
45-80% σε κ/α (+)
20% αν HIV(+)

1000-10000 βακ/mL
PPV: 50-80%

Καλλιέργεια

Ευαισθησία: υψηλή

100-1000 βακ/mL
Υγρό θρ.υλικό: 10 βακ/mL
Χρονοβόρα: 2-8 εβδ.
Υγρό θρ.υλικό: 1-2 εβδ.

Μοριακές τεχνικές άμεσης ανίχνευσης

ά θρεπτικά υλικά

Ταυτοποίηση

Έλεγχος αντοχής

Μορφολογία (όχι ακριβής)

Βιοχημικά tests (κοπιώδη, ημέρες) (Κέντρα Αναφοράς)

Μοριακές τεχνικές

Αξιολόγηση μοριακών τεχνικών στη διάγνωση TB

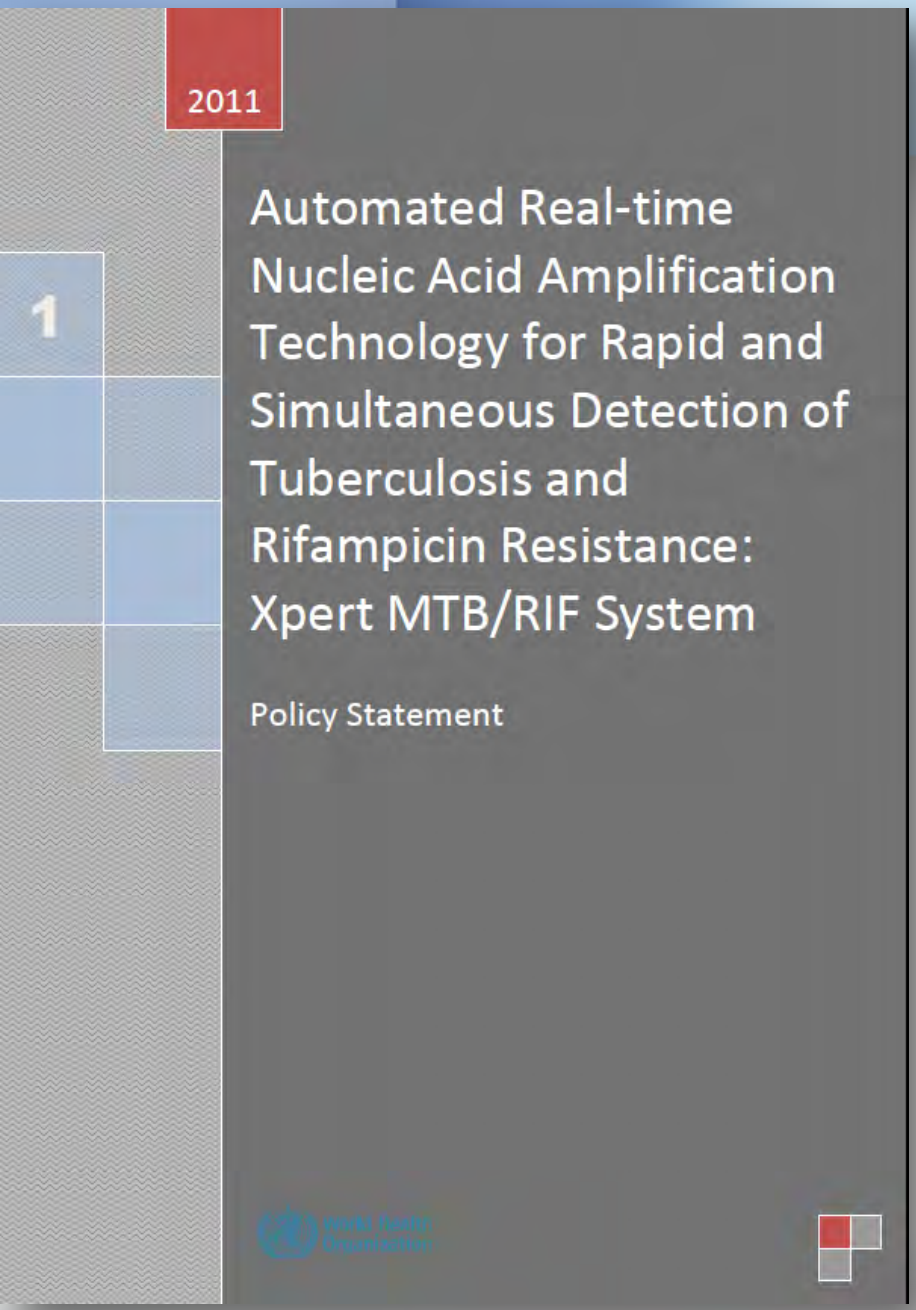
AFB	NAA	Κλινική υποψία	Σχόλια
Θετική	Θετική	Υψηλή / Χαμηλή	Ενεργός TB Έναρξη θεραπείας, PPV FDA-approved tests>95%
Αρνητική	Αρνητική	Υψηλή / Χαμηλή	Δεν αποκλείεται η ενεργός TB
Αρνητική	Θετική **σε 2 ή > δείγματα**	Υψηλή	Υποψία *M. tuberculosis* 98% Έναρξη θεραπευτικής αγωγής και επανεκτίμηση θεραπείας με τα αποτελέσματα της καλλιέργειας
Αρνητική	Θετική **σε 2 δείγματα**	Χαμηλή	Ενεργός TB, παλαιά TB ή επιμόλυνση
Θετική	Αρνητική **αναστολείς 3-7%**	Υψηλή	*M. tuberculosis* 10% ή NTM 90% Έναρξη θεραπευτικής αγωγής και επανεκτίμηση θεραπείας με τα αποτελέσματα της καλλιέργειας
Θετική	Αρνητική	Χαμηλή	Συχνά NTM. Δεν αποκλείεται MTB Έναρξη θεραπευτικής αγωγής και επανεκτίμηση θεραπείας με τα αποτελέσματα της καλλιέργειας

Αξιολόγηση μοριακών τεχνικών στη διάγνωση TB

AFB	NAA	Κλινική υποψία	Σχόλια
Θετική	Θετική	Υψηλή / Χαμηλή	Ενεργός TB Έναρξη θεραπείας, PPV FDA-approved tests>95%
Αρνητική	Αρνητική	Υψηλή / Χαμηλή	Δεν αποκλείεται η ενεργός TB
Αρνητική	Θετική **σε 2 ή > δείγματα**	Υψηλή	Υποψία *M. tuberculosis* 98% Έναρξη θεραπευτικής αγωγής και επανεκτίμηση θεραπείας με τα αποτελέσματα της καλλιέργειας
Αρνητική	Θετική **σε 2 δείγματα**	Χαμηλή	Ενεργός TB, παλαιά TB ή επιμόλυνση
Θετική	Αρνητική **αναστολείς 3-7%**	Υψηλή	*M. tuberculosis* 10% ή NTM 90% Έναρξη θεραπευτικής αγωγής και επανεκτίμηση θεραπείας με τα αποτελέσματα της καλλιέργειας
Θετική	Αρνητική	Χαμηλή	Συχνά NTM. Δεν αποκλείεται MTB Έναρξη θεραπευτικής αγωγής και επανεκτίμηση θεραπείας με τα αποτελέσματα της καλλιέργειας

Αξιολόγηση μοριακών τεχνικών στη διάγνωση TB

AFB	NAA	Κλινική υποψία	Σχόλια
Θετική	Θετική	Υψηλή / Χαμηλή	Ενεργός TB Έναρξη θεραπείας, PPV FDA-approved tests>95%
Αρνητική	Αρνητική	Υψηλή / Χαμηλή	Δεν αποκλείεται η ενεργός TB
Αρνητική	Θετική **σε 2 ή > δείγματα**	Υψηλή	Υποψία *M. tuberculosis* 98% Έναρξη θεραπευτικής αγωγής και επανεκτίμηση θεραπείας με τα αποτελέσματα της καλλιέργειας
Αρνητική	Θετική **σε 2 δείγματα**	Χαμηλή	Ενεργός TB, παλαιά TB ή επιμόλυνση
Θετική	Αρνητική **αναστολείς 3-7%**	Υψηλή	*M. tuberculosis* 10% ή NTM 90% Έναρξη θεραπευτικής αγωγής και επανεκτίμηση θεραπείας με τα αποτελέσματα της καλλιέργειας
Θετική	Αρνητική	Χαμηλή	Συχνά NTM. Δεν αποκλείεται MTB Έναρξη θεραπευτικής αγωγής και επανεκτίμηση θεραπείας με τα αποτελέσματα της καλλιέργειας



- 1) Xpert MTB/RIF should be used as **the initial diagnostic test in individuals suspected of MDR-TB or HIV-associated TB** (strong recommendation);
- 2) Xpert MTB/RIF may be used **as a follow-on test to microscopy** in settings where MDR and/or HIV is of lesser concern, especially in smear-negative specimens
- Xpert MTB/RIF technology does, however, **not eliminate the need for conventional microscopy culture and DST** which are required to monitor treatment progress and to detect resistance to drugs other than rifampicin.
- In settings or patient groups where rifampicin resistance is rare, Xpert MTB/RIF results indicating rifampicin **resistance should be confirmed** by conventional DST or LPA.

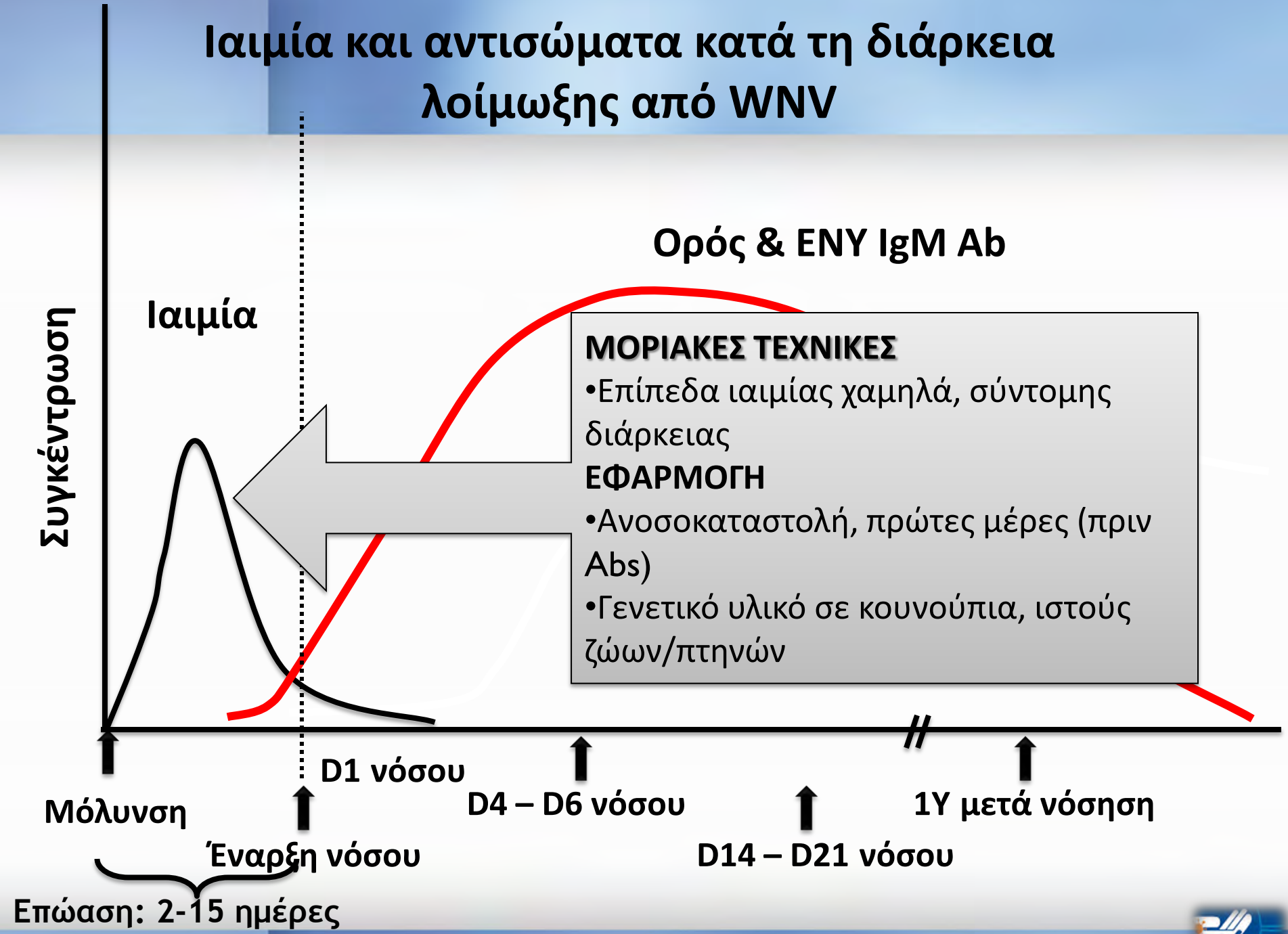
fppt.com

Διάγνωση λοίμωξης από ιό Δυτικού Νείλου

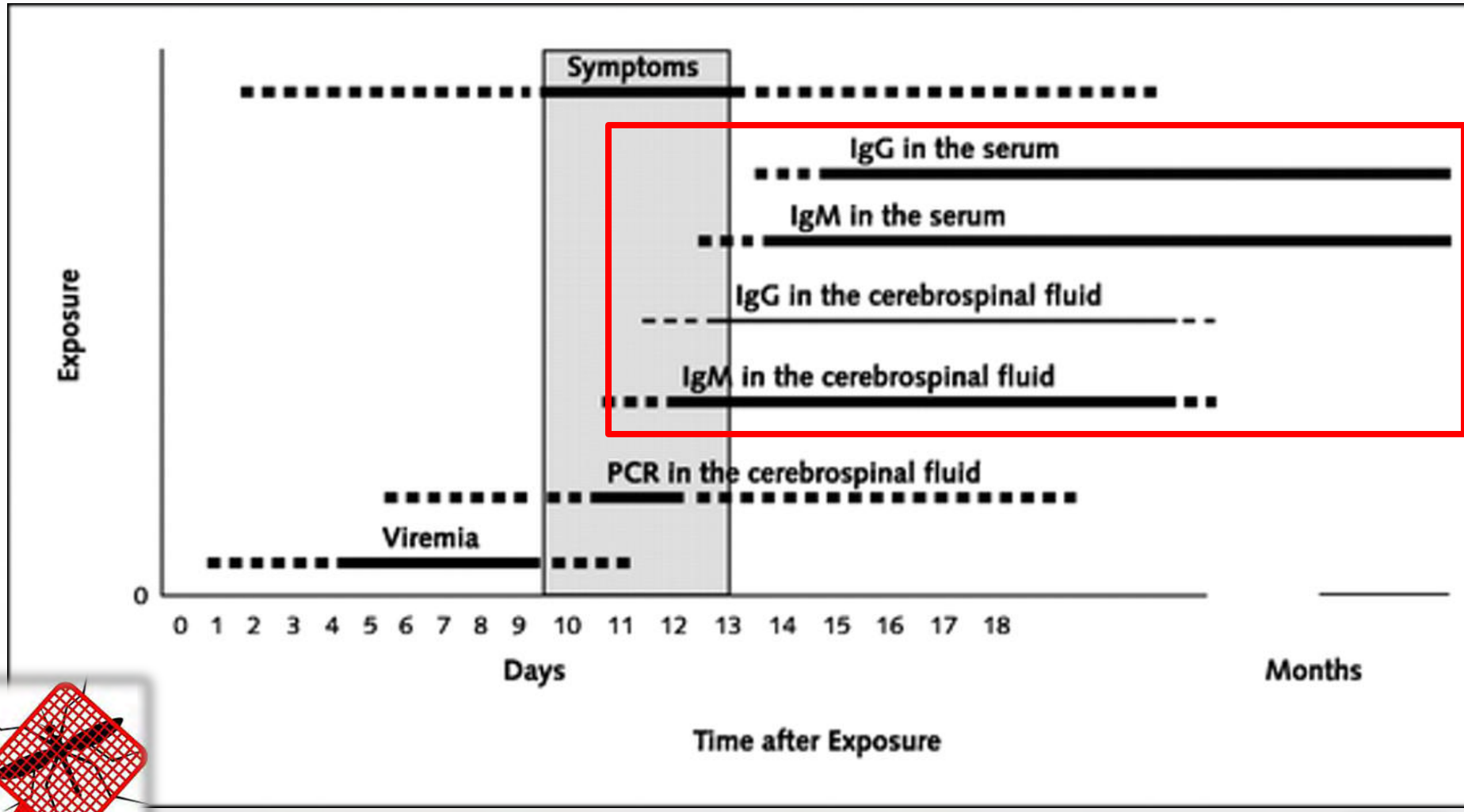
- **Ανίχνευση αντισωμάτων (ορολογική)**
  - **Ανοσοενζυμικές (ELISA IgM & IgG)**
  - Δοκιμασία εξουδετέρωσης κατά 90% της κυτταροπαθογόνου δράσης σε μικροπλάκα (Plaque reduction neutralization test, PRNT)
  - Ανοσοφθορισμός (IFA)

- **Άμεση ανίχνευση**
  - Απομόνωση ιού (κυτταροκ/α)
  - **Μοριακές τεχνικές**

Ιαιμία και αντισώματα κατά τη διάρκεια λοίμωξης από WNV



Για τη διάγνωση WNV λοίμωξης χρήσιμα τα αντισώματα



(http://www.annals.org/cgi/content /full/140/7/545)

Παραδείγματα εφαρμογής μοριακών τεχνικών
2. Διάγνωση διεισδυτικών μυκητιάσεων

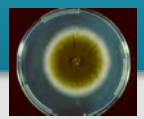
- **Καλλιέργειες**
  - μη επαρκώς ευαίσθητες
  - όχι γρήγορες
  - μη δυνατότητα λήψης βιοπτικού υλικού αν βαριά κατάσταση ασθενούς (θρομβοκυττοπενία)
  - διάκριση από αποικισμό / επιμόλυνση (όχι ειδικές)
- **Ακτινολογικός έλεγχος (HCT)**
  - βλάβες πρέπει να είναι ορατές μακροσκοπικά (φτωχή πρόγνωση)

✓Περιορισμένη η συμβολή τους στην έγκαιρη θεραπευτική αντιμετώπιση
✓Ανάγκη εναλλακτικών τεχνικών

Διάγνωση διεισδυτικών μυκητιάσεων

Μικροβιολογική

Συμβατικές (κλασικές)
- άμεση μικροσκοπική
- καλλιέργεια



Νεότερες (μη καλλιεργητικές) μέθοδοι

Ορολογικές μέθοδοι

- β-D glucan
- Mannan Anti-Mannan
- Galactomannan
- Cryptococcal Capsular Polysaccharide

Μη μικροβιολογική

Ιστολογική Ακτινολογική

Μοριακές μέθοδοι

- PCR

State of the art diagnostic of mold diseases: a practical guide for clinicians

F. Beirão & R. Araujo Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2013) 32:3–9

- **Πλεονεκτήματα μεθόδων στη διάγνωση ΔΜ**

Καλλιέργε	GM	BDG	RT-PCR	Άλλες
Απλή & φτ	Μη επεμβατική	Μη επεμβατική	Μη επεμβατική	CT βοηθάει διάγνωση
Ταυτοποίη Ευαισθησί	Πρώιμη διάγνωσ Επαναληψιμότητ	Πρώιμη διάγνωση Επαναληψιμότητα	Πρώιμη διάγνω Επαναληψιμότη	Ακτινογραφία ως πρώτη ένδειξη σε ΔΜ αναπνευστ.
Απομόνωσ Fusarium. Βελτίωση αιμοκαλ/	Μεγαλύτερη ευαισθησία στη διάγνωση *A. non fumigatus*	Διάφορα είδη μυκ Ως screening σε υπ (όχι Crypto/Mucor	Διάφορα είδη μ Ως screening σε ΔΜ	Ιστολογική χρήσιμη στη διάγνωση, αλλά επεμβατική τεχνική
		Ναι αν αντιμυκητι	Ναι αν αντιμυκητική αγωγή	
			Δεύτερο test ταυτοποίηση και ευαισθησία	

it is an invasive method

Ερμηνεία αποτελεσμάτων μοριακών τεχνικών στις ΔΜ

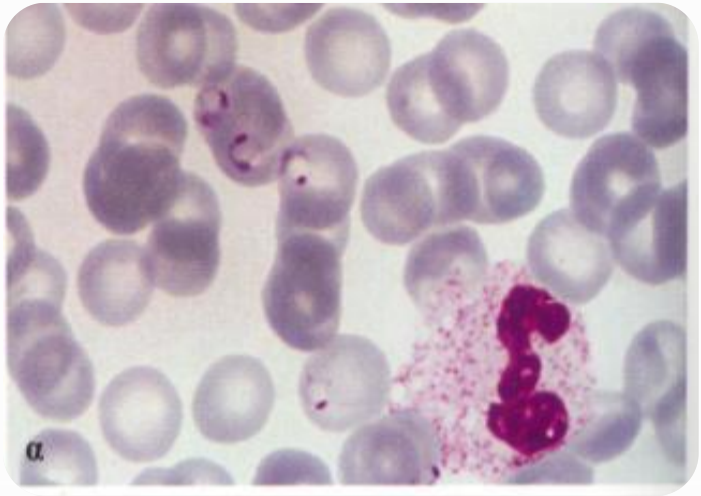
- **Μοριακές μέθοδοι = παρουσία ή όχι στο κλινικό δείγμα DNA του μύκητα**
  - Σχέση παρουσίας νουκλεϊνικών οξέων και λοίμωξης
    - Αποικισμός ή λοίμωξη ?
    - Ιστορικό, κλινική εικόνα, άλλες διαγνωστικές εξετάσεις
- **Υψηλή NPV: ως screening δοκιμασίες**
  - Αποκλεισμός ΔΜ και περιορισμός εμπειρικής θεραπείας
- **Ποικίλη ευαισθησία και PPV**
  - Θετικό ένα δείγμα: ανάγκη επανάληψης
  - Θετικό PCR και ELISA ή 2 και περισσότερα PCR θετικά:
    - Έναρξη αντιμυκητικής σε συμπτωματικό ασθενή
    - Ένδειξη για HRCT/BAL σε απουσία κλινικών συμπτωμάτων

Ποιος ο καλύτερος τρόπος χρησιμοποίησης των διαγνωστικών δεικτών στη ΔΜ;

- **Screening** για τον αποκλεισμό όταν ο επιπολασμός είναι μικρός (<5%): μη ανίχνευση νόσου
- **Διάγνωση** για επιβεβαίωση όταν ο επιπολασμός είναι υψηλός (>20%): ανίχνευση νόσου
- **Παρακολούθηση** θεραπείας: θετικό αποτέλεσμα σε σειρά δειγμάτων → αποτυχία

Παραδείγματα εφαρμογής μοριακών τεχνικών
3. Διάγνωση παρασιτώσεων → ελονοσία

- Μέθοδος αναφοράς → **μικροσκοπική**



Πλεονεκτήματα

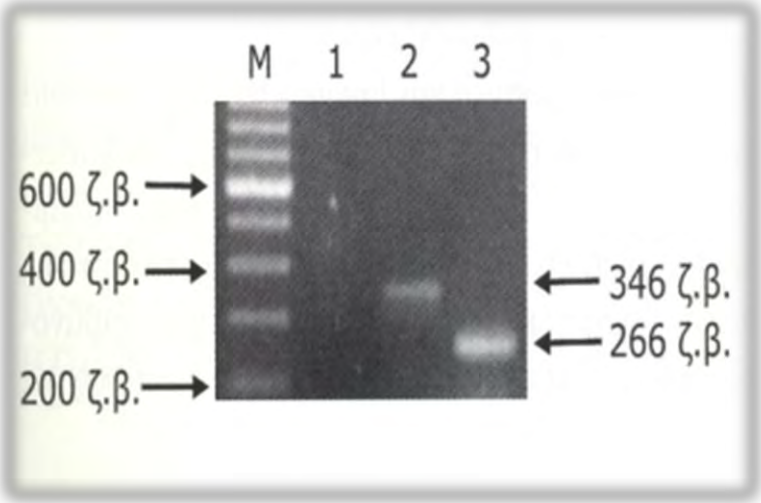
- Μέθοδος φτηνή
- Ευαίσθητη (2-5 πλασμ/μl)
- Ταυτοποίηση είδους
- Διατήρηση παρασκευάσματος

Μειονεκτήματα

- Ανάγκη εκπαιδευμένου προσωπικού
- Χρονοβόρα

PCR

1. Multiplex PCR
2. Real time PCR



- Υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα
- Λίγο πιο ευαίσθητη της μικροσκοπικής

Πλεονεκτήματα

- Ανίχνευση: 1 πλασμ /μl αίματος
- Χρήσιμη στις περιπτώσεις μικρού φορτίου ή μικτής λοίμωξης

Μειονεκτήματα

- Ανάγκη εξειδικευμένου προσωπικού, εξοπλισμού, εκπαίδευσης
- Μη μέτρηση παρασιταιμίας

IGRA techniques

- QuantiFERON: 24 €/sample
- T-SPOT: 55 €/sample if 28 patients in the same run

- Direct detection (RT-PCR): 100-140 €
- Identification: ~ 60 € / strip
- Resistance: ~ 40 € (RMP) - ~ 60 € (&INH) / strip

- in liquid medium
  - χ 7 low concentration
  - χ 10 & high concentration
- second line drugs
  - ~ 3 € / strip E-test

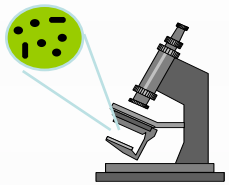
Sensitivity test

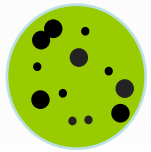
1€ / L-J tube
8-13€ / bottle

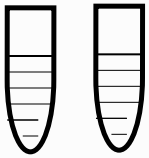
Culture

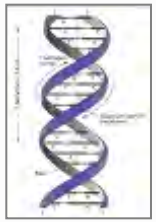
Z-N stain
~ 0.5 €

Microscopy







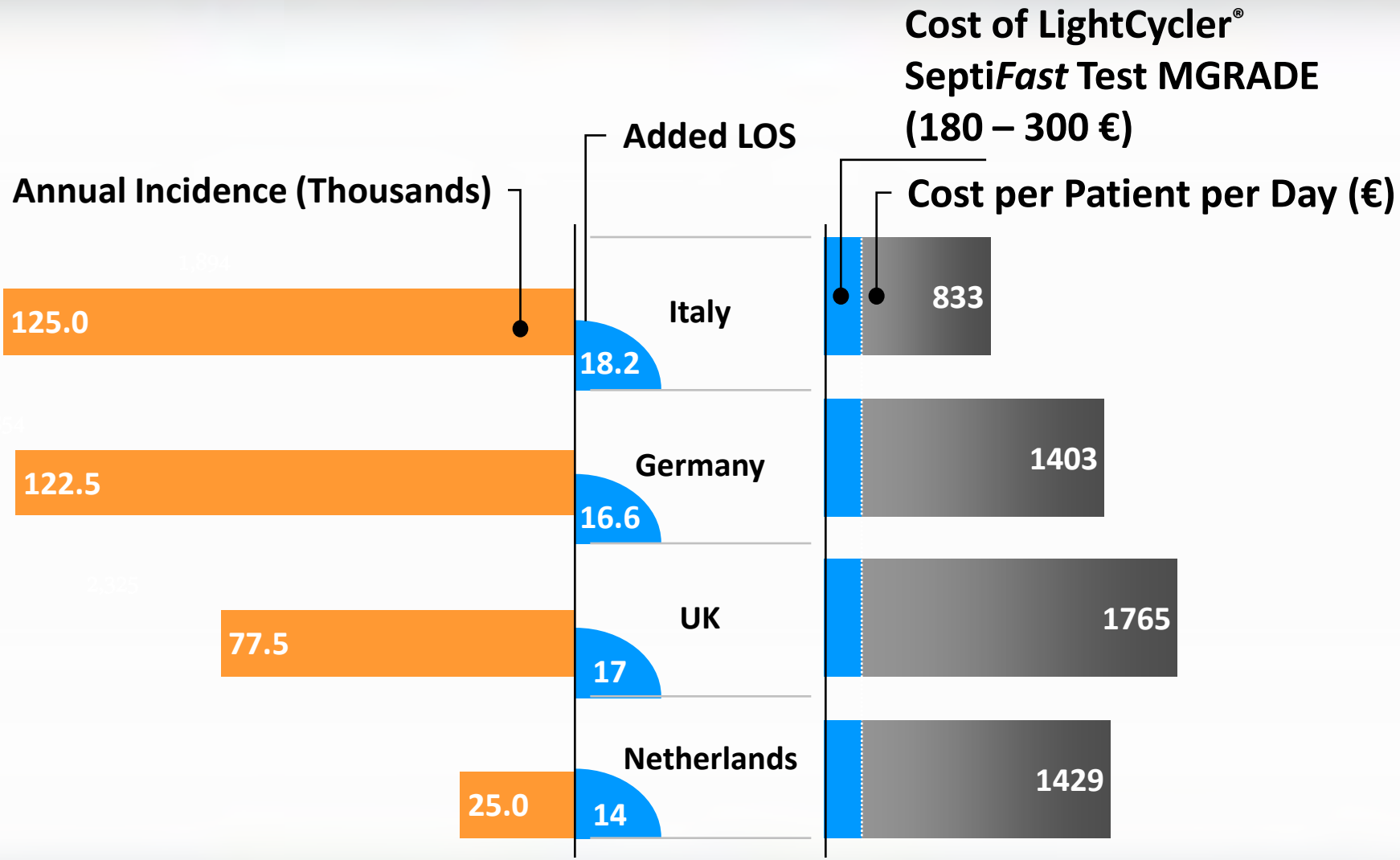


Molecular methods

Κόστος

Οι μοριακές τεχνικές κοστίζουν;

Are molecular methods cost-effective ?



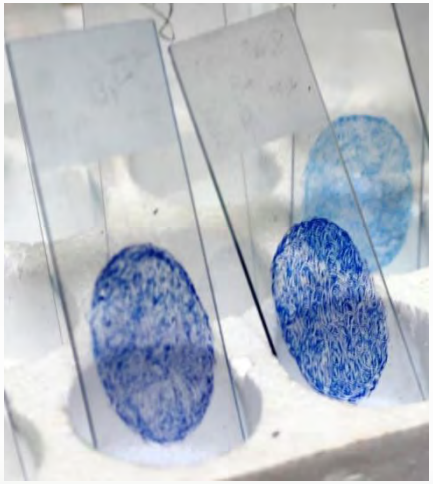
Source: Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. // literature to number of Sepsis cases // Statistical Department Germany

Rapid Molecular Testing for TB to Guide Respiratory Isolation in the U.S.: A Cost-Benefit Analysis

PLoS ONE 2013; 8: e79669

- cost–benefit analysis comparing the use of a single negative Xpert **versus** 2 negative sputum smears to release consecutive adult inpatients with presumed TB from respiratory isolation at an urban public hospital in the United States

VS



Rapid Molecular Testing for TB to Guide Respiratory Isolation in the U.S.: A Cost-Benefit Analysis

Outcome	Smear Strategy	Xpert Strategy	Difference	95% Uncertainty Range‡
Length of Stay*				
Isolation room	2.7	1.4	1.3	1.2, 1.3
Standard room	3.2	4.4	−1.2	−1.2, −1.1
Total	5.9	5.8	0.1	−0.1, 0.2
Costs†				
Isolation room	$10,483	$5,305	$5,178	$4,234, $5,200
Standard room	$7,285	$9,980	−$2,695	−$2,750, −$2,504
Diagnostic testing	$15	$218	−$203	−$699, −$66
Total	$17,783	$15,503	$2,278	$1,582, $4,570

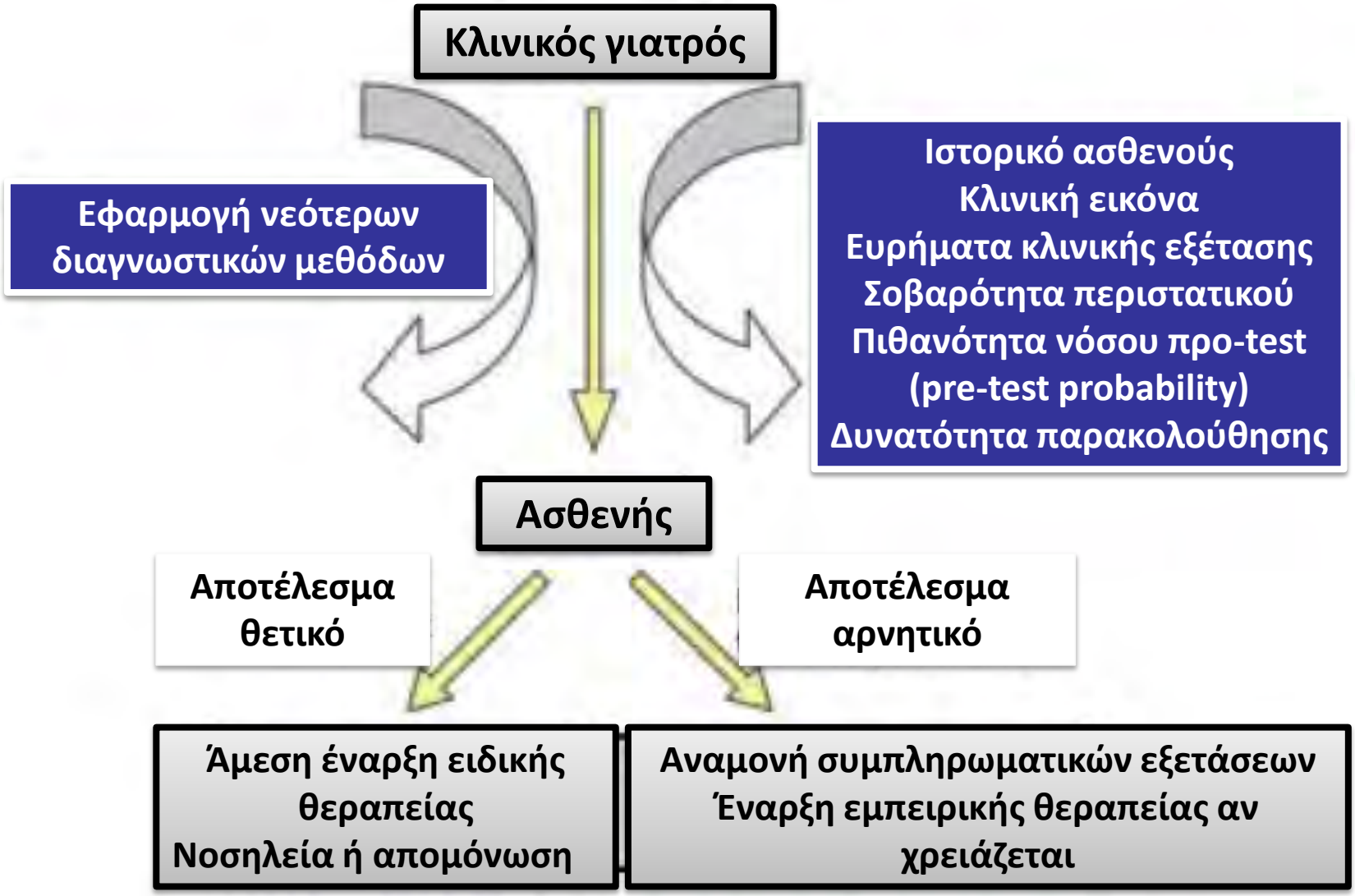
PLoS ONE 2013; 8: e79669

234 individuals undergoing evaluation for presumed active TB annually**, 6.4% had culture-positive TB**.

- Compared to smear microscopy, **Xpert reduced isolation bed utilization from an average of 2.7 to 1.4** days per patient, leading to a **48% reduction in total annual isolation bed usage from 632 to 328 bed-days**.

Xpert saved an average of **$2,278 per admission**, **or $533,520 per year**, compared with smear microscopy.

Σχηματική παράσταση αξιολόγησης νεότερων διαγνωστικών μεθόδων



IDSA GUIDELINES

A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM)[a]

Ellen Jo Baron et al. Clin Infect Dis 2013;57(4):e22–121

Ευχαριστώ για την προσοχή σας!

The critical role of the microbiology laboratory in infectious disease diagnosis calls for a **close, positive working relationship between the physician and the microbiologists who provide enormous value to the health care team**. This document, developed by both laboratory and clinical experts, provides information on which tests are valuable and in which contexts, and on tests that add little or no value for diagnostic decisions.