

### 3. Οι Μοριακές Τεχνικές στην Διάγνωση των Λοιμώξεων.

#### Καίτη Θέμελη – Διγαλάκη

Μικροβιολογικό Εργαστήριο «Τζανείο» ΓΝΠ

#### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι Μοριακές μέθοδοι στοχεύουν στην ανίχνευση και ταυτοποίηση των μικροοργανισμών, αποτελούν επανάσταση της διαγνωστικής μικροβιολογίας και εκτελούνται πλέον σαν εξετάσεις ρουτίνας. Η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) άνοιξε τον δρόμο σε μια νέα εποχή, επιτρέποντας την ταχεία ανίχνευση των μικροοργανισμών που προηγουμένως ήταν δύσκολο ή αδύνατο να εντοπιστούν με τις παραδοσιακές μικροβιολογικές μεθόδους. Εκτός από την ανίχνευση των απαιτητικών μικροοργανισμών εφαρμόζονται για την ταχεία ανίχνευση παθογόνων μικρόβιων, που έχουν μεγάλη σημασία για την δημόσια υγεία. Οι μοριακές μέθοδοι εφαρμόζονται για την ανίχνευση των γονιδίων αντιμικροβιακής αντοχής και της παραοχής πληροφοριών για την υγεία, όπως το χαρακτηρισμό στελέχους με βάση τον γονότυπο. Η θεραπεία της ιογενούς λοίμωξης έχει βελτιωθεί με την μοριακή ανίχνευση της αντοχής και το προσδιορισμό του ιικού φορτίου με την εφαρμογή των τεχνικών Multiplex PCR, real-time PCR και την βελτίωση της αποδοτικότητας τους μέσω της αυτοματοποίησης, με αποτέλεσμα μείωση του κόστους. Ο ρόλος τους στην διάγνωση και θεραπεία των λοιμώξεων είναι καθοριστικός, αποδεικνύεται με πολλά παραδείγματα που έχουν αλλάξει την εργαστηριακή διάγνωση και συνεπώς, τη διαχείριση των λοιμωδών νοσημάτων.

**Λέξεις Ευρητήριο:** Μοριακές τεχνικές, PCR, μικρόβια, λοιμώξεις.

#### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανίχνευση του DNA των μικροοργανισμών επέφερε ριζική αλλαγή στις συμβατικές εργαστηριακές μεθόδους, που βασίζονται στην φαινοτυπική έκφραση των αντιγόνων ή στις βιοχημικές ιδιότητες. Οι μοριακές τεχνικές στοχεύουν στην ταχεία ταυτοποίηση των μικροβίων, εφαρμόζονται σήμερα, στην ρουτίνα του εργαστηρίου Κλινικής Μικροβιολογίας και βοηθούν στην διάγνωση των λοιμώξεων από απαιτητικά βακτήρια και ιούς. Τα πλεονεκτήματα των τεχνικών αυτών εκτός της ταχείας διάγνωσης είναι η υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, αλλά πρέπει να συνοδεύονται από αυστηρό ποιοτικό έλεγχο.

Η PCR (Polymerase Chain Reaction-Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης) είναι η βασικότερη μοριακή τεχνική. Αρχικά η PCR τεχνολογία συνδύασε την κυκλοποίηση για τον πολλαπλασιασμό του DNA, με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή. Ωστόσο, με την εισαγωγή του αυτοματισμού στα διάφορα στάδια εκχύλισης του DNA ή RNA συνδυάζει την ενίσχυση και την ανίχνευση του προϊόντος σε πραγματικό χρόνο, και έτσι η PCR γίνεται πιο αποτελεσματική και αποδοτική. Οι Μικροσυστοιχίες (Microarray)

είναι τεχνολογίες όπως το τσιπ DNA που θα βελτιώσει περαιτέρω την χρησιμότητα της μοριακής ανίχνευσης του DNA στην κλινική μικροβιολογία. Η ανασκόπηση αυτή θα βοηθήσει στην κατανόηση των κλινικών εφαρμογών των μοριακών μεθόδων για λοιμώδη νοσήματα, όπως συνοψίζονται στους Πίνακες (1) και (2). Η εφαρμογή στην ιολογία περιλαμβάνει τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιικά φάρμακα, τον ποσοτικό προσδιορισμό του ιικού φορτίου μαζί με την ανίχνευση του ιού. Στην βακτηριολογία οι μοριακές μέθοδοι έχουν εφαρμοστεί για τη μελέτη της αντοχής των μικροβίων στα αντιβιοτικά, την ανίχνευση απαιτητικών ή βραδέως αναπτυσσομένων βακτηρίων και στην ταχεία ανίχνευση των σοβαρών βακτηριακών λοιμώξεων, ακόμα και μετά από χορήγηση αντιβιοτικών. Στην παρασιτολογία και μυκητολογία έχουν επίσης εφαρμοστεί οι μοριακές τεχνικές για την ταχεία διάγνωση λοίμωξης ακόμα και σε ουδετεροπενικούς ασθενείς. Άλλες εφαρμογές είναι η μοριακή ανίχνευση των παραγόντων βιοασφάλειας, της επιδημιολογίας και του ελέγχου λοιμώξεων. Το προ-ϊικό DNA μπορεί να ανιχνευτεί στα αρχικά στάδια της HIV λοίμωξης προτού να επιβεβαιωθεί αυτή με τον προσδιορισμό των HIV – αντισωμάτων με την τεχνική Western-Blot[6]. Επίσης μπορεί να

διαγνωστεί η κάθετη μετάδοση της HIV λοίμωξης στο βρέφος με την ανίχνευση του HIV-DNA [7]. Με την σύγχρονη μοριακή μέθοδο Chiron Procleix HIV-1/HCV, η οποία εφαρμόστηκε σε εθελοντές δότες βοήθησε αποτελεσματικά στην μείωση της λανθάνουσας μολυσματικής περιόδου (κλείσιμο παραθύρου). Για τον HIV-1, από τις 22 μέρες έκλεισε στις 9, ενώ για τον HCV από τις 66 μέρες στις 7 [8].

Ο προσδιορισμός του ιϊκού φορτίου χρησιμοποιείται για της θεραπείας της χρόνιας ηπατίτιδας Β και C. Ασθενείς με HCV, που έλαβαν αγωγή τον συνδυασμό ιντερφερόνη-άλφα και ριμπαβιρίνη παραμένουν αρνητικοί κατά την

ανίχνευση του HCV-RNA, ακόμη και 6 μήνες μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας και παραμένουν ελεύθεροι συμπτωμάτων για μεγάλο χρονικό διάστημα. Στην περίπτωση που το ιϊκό RNA είναι μη ανιχνεύσιμο μετά από 12 εβδομάδες θεραπείας, υπάρχει πιθανότητα μακρόχρονης ορολογικής απάντησης.

Η φαινοτυπική ανίχνευση του mec A γονιδίου μπορεί καταστεί δυνατή με την ανίχνευση του nuc γονοδίου με ταχεία μοριακή ανίχνευση του *S. aureus* και επιβεβαίωση του MRSA από θετική αιμοκαλλιέργεια.

**Πίνακας 1.** Οι μοριακές τεχνικές στην ταυτοποίηση μικροβίων στην κλινική μικροβιολογία

<b>Ιϊκό φορτίο</b>	<i>Cytomegalovirus</i>
	<i>Epstein-Barr virus</i>
	<i>Hepatitis B</i>
	<i>Hepatitis C</i>
	<i>HIV</i>
<b>Γονότυπος ιών</b>	<i>HIV</i>
	<i>Hepatitis B</i>
	<i>Hepatitis C</i>
	<i>Human papillomavirus</i>
<b>Ανίχνευση βακτηριακής αντοχής</b>	<i>MRSA</i>
	<i>VRE</i>
	<i>ESBL containing E coli</i>
	<i>KPC - K pneumoniae</i>
	<i>M.tuberculosis</i>
<b>Ευρείας κλίμακας PCR</b>	Ενδοκαρδίτιδα -Μικροβιακή μηνιγγίτιδα
<b>Γονότυπος βακτηρίων</b>	<i>M. tuberculosis</i>
	<i>N. meningitidis</i>

**Πίνακας 2.** Μοριακές μέθοδοι που εφαρμόζονται στην διάγνωση των λοιμώξεων

<b>Ιολογία</b>	<i>Herpes simplex virus, Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus</i>
	<i>Varicella zoster virus, Human herpes virus type 6, 7, 8</i>
	<i>Respiratory viruses (such as influenza virus, Respiratory syncytial virus</i>
	<i>Parainfluenza virus, Adenovirus, Rhinovirus)</i>
	<i>SARS-CoV, Avian influenza virus</i>
	<i>HIV, Hepatitis B, Hepatitis C</i>
	<i>Human papilloma virus,</i>
	<i>Orf virus, Mulloscum contagiosum</i>
	<i>Rotavirus, Norovirus, Enteric adenoviruses</i>
	<i>Enterovirus</i>
<b>Βακτηριολογία</b>	<i>C. trachomatis, N. gonorrhoeae, B. pertussis, M. tuberculosis, nontuberculous Mycobacteria, T. whipplei, B. henselae, genital Mycoplasma, C. burnettii M. pneumoniae, C. pneumoniae, Legionella spp., N. meningitidis, S. pneumoniae</i>
<b>Παρασιτολογία</b>	<i>Plasmodium spp</i>
	<i>T. gondii</i>
<b>Μυκητολογία</b>	<i>P. jiroveci</i>
	<i>Aspergillus spp</i>

## ΙΟΛΟΓΙΑ

Η διάγνωση των ιογενών λοιμώξεων έχει αναπτυχθεί κατά τα τελευταία χρόνια με τις κυτταροκαλλιέργειες, οι οποίες απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό, έχουν μεγάλο κόστος, και γενικά χαμηλή ευαισθησία λόγω αργής ανάπτυξης των ιών. Οι ορολογικές μέθοδοι είναι περιοριστικές, διότι στα αρχικά στάδια της λοίμωξης η ανίχνευση των αντισωμάτων δεν είναι εφικτή για αρκετούς ιούς και έχουν μικρή διαγνωστική αξία. Αντίθετα η PCR έχει μεγάλη διαγνωστική αξία στις ιώσεις. Η εγκεφαλίτιδα από τον ιό του απλού έρπητα (HSV) [1], είναι μια σοβαρή λοίμωξη, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις, η διάγνωσή απαιτεί προηγουμένως βιοψία εγκεφάλου, λόγω της χαμηλής ευαισθησίας της καλλιέργειας του ιού στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) και της οροδιάγνωσης. Η PCR επιτρέπει πλέον την ανίχνευση του HSV-DNA από ENY με ευαισθησία [2] 95% αποφεύγοντας έτσι την βιοψία. Η ανίχνευση της ιογενούς μηνιγγίτιδας, που συνήθως προκαλείται από εντεροϊούς ή HSV 1 με την PCR έχει μεγάλη διαγνωστική αξία, σε σύγκριση με καλλιέργεια [3]. Η HSV -PCR μπορεί να είναι πολυπλεκτική (Multiplex PCR) με άλλα παθογόνα υπεύθυνα για μηνιγγίτιδα. [4] Οι μοριακές μέθοδοι έχουν βελτιώσει κατά πολύ την διάγνωση των αιματογενώς μεταδιδόμενων νοσημάτων και ιδιαίτερα στην ενεργό ηπατίτιδα C (HCV), που μπορεί να διαγνωστεί από την παρουσία του HCV- RNA, ενώ με την ανίχνευση των αντισωμάτων έναντι του HCV, δεν μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ πρόσφατης και παλαιάς λοίμωξης. Από την άποψη της μεταδοτικότητας μόνο τα άτομα με ανιχνεύσιμο HCV- RNA έχουν σημαντικό κίνδυνο μετάδοσης HCV [5] μετά από μετάγγιση αίματος, μεταμόσχευση οργάνου, τραυματισμό από βελόνη αιμοληψίας ή κάθετη μετάδοση. Η λοίμωξη από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV), συνήθως μπορεί να διαγνωστεί με ορολογικές εξετάσεις.

Στα αρχικά στάδια HIV λοίμωξης, μπορεί να ανιχνευθεί το προ-ϊικό DNA πριν τα HIV αντισώματα επιβεβαιωθούν με Western Blot. [6] Κάθετη μετάδοση της HIV λοίμωξης έχει επίσης ανιχνευθεί σε βρέφος ανιχνεύοντας HIV -DNA. [7] Σε εθελοντές δότες για τον HIV και HCV χρησιμοποιώντας Chiron Procleix HIV-1/HCV (μεταγραφική και μεσολαβητική μέθοδος) μειώνοντας έτσι την δυνητικά μολυσματική λανθάνουσα περίοδο (παράθυρο) από τις 22 και 66 ημέρες σε 9 και 7 ημέρες αντίστοιχα. [8] Ενδομήτρια λοίμωξη του εμβρύου από τον

Κυτταρομεγαλοϊό (CMV), [9] ιό της Ερυθράς, [10] και του ιού Ανεμευλογιάς (VZV) [11] μπορεί να διαγνωστεί με PCR του αμνιακού υγρού. Ο HSV 2 που προκαλεί έλκη ανιχνεύεται με PCR σε εξέταση ρουτίνας, λόγω της μεγάλης ευαισθησίας έναντι της καλλιέργειας του ιού. Η μοριακή ανίχνευση των ιογενών αναπνευστικών παθογόνων από δείγματα του ανώτερου αναπνευστικού, όπως ρινοφαρυγγικές αναρροφήσεις φαρυγγικά επιχρίσματα και του κατώτερου αναπνευστικού, όπως πτύελα ή βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) είναι οικονομικά αποδοτική, λόγω της πρόληψης της εισαγωγής σε νοσοκομείο, μειώνοντας άσκοπες εργαστηριακές εξετάσεις, θεραπεία με αντιβιοτικά και χορήγηση αποτελεσματικής αγωγής [12]. Μεγάλες ή συνδυαστικές δοκιμές (Multiplex PCR) για όλους τους αναπνευστικούς ιούς μαζί με απαιτητικά βακτηρια μπορούν να διαγνώσουν τις αιτίες της πνευμονίας.

Σε ασυνήθεις αιτίες ιογενών λοιμώξεων όπως στο σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο (SARS) Coronavirus (SARS-CoV) και της γρίπης A/H5N1 (Γρίπη των πτηνών), ο ιός Νέας Γρίπης (H1N3), το RNA του ιού μπορεί να βοηθήσει στην έγκαιρη ανίχνευση (RT-PCR). Κατά τη διάρκεια της επιδημίας SARS, λόγω της SARS-CoV, η εξέταση PCR των αναπνευστικών δειγμάτων για άλλους αναπνευστικούς ιούς είχε μεγάλη σημασία για να αποκλειστεί ο αριθμός των ύποπτων περιπτώσεων. Η πολυπλεκτική PCR είναι πιο χρήσιμη λόγω της ταχείας διάγνωσης (rapid screen) που παρέχει για πολλούς ιούς του αναπνευστικού συστήματος. Για την έγκαιρη διάγνωση της λοίμωξης από SARS-CoV, η ευαισθησία είναι 50-87% στις αρχές της νόσου. [13] Οι ορολογικές εξετάσεις για SARS-CoV είναι 100% ευαίσθητες, αλλά έχουν περιορισμένη διαγνωστική αξία στην αρχή της νόσου, όταν ο κίνδυνος μετάδοσης είναι μεγαλύτερος [14]. Η γρίπη των πτηνών (H5N1) σε κρούσματα στη Νοτιοανατολική Ασία κατέδειξαν επίσης την ανάγκη για ταχεία διάγνωση με μοριακές μεθόδους. Για την διάγνωση της πρόσφατης νέας γρίπης (H1N3) εφαρμόστηκε η Multiplex PCR, για τον αποκλεισμό άλλων ιών της γρίπης και την ταυτοποίηση του ιού. Παρομοίως γίνεται και η άμεση ανίχνευση με ανοσοφθορισμό με μονοκλωνικά αντισώματα της γρίπης τύπου A [15].

Οι ιογενείς γαστρεντερίτιδες είναι συχνότερες των βακτηριακών και άλλων παθογόνων σε όλο τον κόσμο. Η διάγνωση της ιογενούς διάρροιας με την

εφαρμογή PCR αποτελεί την μέθοδο εκλογής για τη διάγνωση των Rotavirus και Norovirus, παλαιότερα γνωστό ως ιό Norwalk και υπεύθυνος για τις μεγάλες επιδημίες με κρούσματα τόσο στην κοινότητα και στο νοσοκομείο. Μπορεί να διαγνωστεί με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, ανοσοενζυματική μέθοδο και PCR. Η PCR είναι η πιο γρήγορη και ευαίσθητη μέθοδος για τη διάγνωση της λοίμωξης από Astroviruses και την παρουσία Αδενοϊών (ορότυποι 40 και 41)

### ΘΕΡΑΠΕΙΑ- ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ

Στην παρακολούθηση του ιϊκού φορτίου DNA ή RNA βασίζεται η θεραπευτική αντιμετώπιση αρκετών χρόνιων ιογενών λοιμώξεων. Η μέτρηση του ιϊκού φορτίου γίνεται είτε με RT-PCR, με ενίσχυση των σημάτων του RNA ή, την πιο πρόσφατα εφαρμοζόμενη σε πραγματικό χρόνο real time-PCR. Ο προσδιορισμός του ιϊκού φορτίου αποτελεί το βασικό εργαλείο για παρακολούθηση της επιτυχίας της αντιρετροϊκής θεραπείας και την ανίχνευση αντοχής στα αντιϊκά φάρμακα. Επίσης, έχει προγνωστική αξία στην εξέλιξη της νόσου.[16] Σύγχρονα υπερευαίσθητα τεστ όπως το Cobas Amplicor HIV-1 Monitor έχουν κυκλοφορήσει με το κατώτατο όριο ανίχνευσης ιού σε 50 copies/mL.[17]

Ο έλεγχος του ιϊκού φορτίου HCV επίσης χρησιμοποιείται στην θεραπεία της χρόνιας ηπατίτιδας C και Λοίμωξης από τον ιό της ηπατίτιδας B (HBV), σε ασθενείς με γονότυπο HCV, που έλαβαν θεραπεία με τον συνδυασμό ιντερφερόνης-άλφα και ριμπαβιρίνης, παραμένουν αρνητικοί για HCV RNA, έξη μήνες μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας και σχεδόν πάντα παραμένουν ελεύθεροι συμπτωμάτων από το ιό για μακρό χρονικό διάστημα. Αν το ιϊκό RNA είναι μη ανιχνεύσιμο μετά από 12 εβδομάδες της θεραπείας υπάρχει 75% πιθανότητα μακρόχρονης ιολογικής απάντησης. Η μέτρηση του HBV- DNA φορτίου αποτελεί δείκτη για την παρακολούθηση της θεραπείας (ειδικά στην λαμβουδίνη)[18]. Η λοίμωξη από κυτταρομεγαλοϊό είναι μια σοβαρή λοίμωξη σε λήπτες του μυελού των οστών, μεταμόσχευσης οργάνων και σε ασθενείς με HIV λοίμωξη. [19] Με τον προσδιορισμό του ιϊκού φορτίου με ποσοτική PCR γίνεται η παρακολούθηση της λοίμωξης CMV κατά τη διάρκεια ανοσοκαταστολής.

Ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) είναι η αιτία σχεδόν όλων των καρκίνων του τραχήλου της μήτρας. Οι HPV γονότυποι χαρακτηρίζονται

σαν παράγοντες χαμηλού ή υψηλού κίνδυνου για την καρκινογένεση.

Ο έλεγχος για προνεοπλασματικές αλλοιώσεις γίνεται με τη κυτταρολογική εξέταση κατά Papanicolaou (Pap-test), αλλά η ανίχνευση των υψηλού κινδύνου γονότυπων του ιού HPV (15 τύποι) απαιτεί μοριακές μεθόδους. Η ανίχνευση μπορεί να επιτευχθεί με την ενίσχυση των σημάτων, όπως είναι η Digene Hybrid Capture 2, η δοκιμασία είναι η μόνη διαγνωστική in vitro δοκιμή που εγκρίθηκε από την Federal Drug Administration (FDA). Η ανίχνευση του υψηλού κινδύνου γονότυπων μπορεί επίσης να επιτευχθεί με πολυπλεκτική (Multi-plex PCR). Η ανίχνευση αυτών των γονότυπων μπορεί να βοηθήσει στην αξιολόγηση μιας διφορούμενης εξέτασης κατά Παπανικολάου για τις γυναίκες με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του τραχήλου της μήτρας [20]. Με τις μοριακές μεθόδους αυξήθηκε η διαγνωστική ικανότητα ανίχνευσης των ιογενών λοιμώξεων, ώστε σήμερα να αποτελούν χρήσιμο εργαλείο της διαχείρισης των λοιμώξεων.

### ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

#### Βακτήρια

Με την διάγνωση των λοιμώξεων από απαιτητικά βακτήρια, όπως τα *Mycobacterium* spp., *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* και η *Bordetella pertusis* και την εφαρμογή των μοριακών τεχνικών προλαμβάνονται οι επιπτώσεις στη δημόσια υγεία. Η έγκαιρη μοριακή ταυτοποίηση είναι γρήγορη, πλεονεκτεί από τη συμβατική καλλιέργεια που απαιτεί αρκετές ημέρες ή και εβδομάδες και η θεραπεία είναι άμεση. Οι εμπορικές δοκιμασίες είναι διαθέσιμες για *M. tuberculosis* και *Mycobacterium avium* complex, *C. trachomatis* και *N. gonorrhoeae*. Η εισαγωγή της μοριακής ανίχνευσης για τα σεξουαλικά μεταδιδόμενα βακτήρια έχει οδηγήσει σε μεγάλη αύξηση των ποσοστών των εργαστηριακά επιβεβαιωμένων κρουσμάτων λόγω της αυξημένης ευαισθησίας της μεθόδου. Αν και οι μοριακές τεχνικές για *C. trachomatis* και *N. gonorrhoeae* δεν επιτρέπουν την παρακολούθηση της αντοχής των μικροβίων στα αντιβιοτικά. Στα δείγματα ούρων η δοκιμή έδειξε ισοδύναμη ευαισθησία και ειδικότητα με την επεμβατική για την ανίχνευση του *C. trachomatis* σε άνδρες και γυναίκες, καθώς και για την ανίχνευση του *N. gonorrhoeae* στους άνδρες[21]. Επιπλέον μοριακές μέθοδοι μπορούν να εξετάσουν ταυτόχρονα πολλαπλούς παθογόνους γεννητικούς παράγοντες όπως *C.*

trachomatis, *N. gonorrhoeae*, και τα γεννητικά Μυκοπλασμάτα από το ίδιο επίχρισμα. Η μοριακή ανίχνευση του *M. tuberculosis* έχει καθοριστικό ρόλο, καθώς επιτρέπει την επιβεβαίωση της παρουσίας οξείων βακίλλων στο μικροσκόπιο με 98% ευαισθησία στην πνευμονική φυματίωση μέσα σε 24 ώρες, ενώ η καλλιέργεια απαιτεί χρόνο άνω των 4 εβδομάδων. Η Μυκοβακτηριολογία με τη χρήση μοριακών μεθόδων μπορεί να διακρίνει μεγάλο αριθμό ειδών. Με τον γενετικό προσδιορισμό της αλληλουχίας του 16S rRNA γονιδίου έχει απλοποιήσει τη διαδικασία αυτή. Για την ανίχνευση του *B. Pertussis* η αυξημένη ευαισθησία της PCR έχει αντικαταστήσει τον Άμεσο Ανοσοφθορισμό και την καλλιέργεια. Άλλα αναπνευστικά παθογόνα που μπορούν γρήγορα να διαγνωστούν με μοριακές τεχνικές περιλαμβάνουν *Legionella* spp. *Mycoplasma pneumoniae* και *Chlamydia pneumoniae*. Μερικά βακτήρια μπορούν να ανιχνευθούν μόνο με μοριακές μεθόδους διότι η καλλιέργεια είναι είτε εξαιρετικά δύσκολη ή αδύνατο να εφαρμοστεί στο μικροβιολογικό εργαστήριο. Η νόσος Whipple είναι μια σπάνια και θανατηφόρος λοίμωξη οφείλεται στο *Tropheryma whippelii*, η οποία θα μπορούσε στο παρελθόν μόνο να διαγνωστεί από τις χαρακτηριστικές ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις από μεταθανάτιο υλικό με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και επιπλέον εκθέτει το προσωπικό του εργαστηρίου σε σημαντικό επαγγελματικό κίνδυνο. Η PCR τώρα επιτρέπει τη διάγνωση της ασθένειας αυτής καθώς και της ενδοκαρδίτιδας από *T. whippelii*, *Bartonella henselae*, πυρετός Q από *Coxiella burnetii*, και ουρηθρίτιδας ανδρών από *Mycoplasma genitalium*. [22]

### ΤΑΧΕΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η μηνιγγιτιδοκοκκική νόσος μπορεί να έχει καταστροφικές συνέπειες και απαιτεί την έγκαιρη διάγνωση για τη σωστή θεραπεία με αντιβιοτικά και την έγκαιρη χημειοπροφύλαξη μετά από στενή επαφή με τον ασθενή. Η PCR προσφέρει την εργαστηριακή επιβεβαίωση επί κλινικής υποψίας. [23] Γονοτυπική τυποποίηση για οροομάδες Β και Γ στελεχών *N. meningitidis* βοηθάει στην αντιμετώπιση. Η ταχεία ανίχνευση των άλλων βακτηριακών αιτίων μηνιγγίτιδας όπως *N. meningitidis* με *Streptococcus pneumoniae* και *Haemophilus influenzae* τύπου Β αντιπροσωπεύουν το 90% των περιπτώσεων της βακτηριακής μηνιγγίτιδας με την μέθοδο πολυπλεκτικής PCR. [24]

Σήμερα επιτυγχάνεται επίσης η άμεση, ταυτόχρονη ανίχνευση με real-time PCR των 25 συχνότερων Gram-θετικών μικροβίων, Gram-αρνητικών μικροβίων και μυκήτων (*Candida* και *Aspergillus*) που προκαλούν βακτηριαιμία / μυκηταιμία. Η εξέταση αυτή σε συνδυασμό [25] με τον υπόλοιπο εργαστηριακό έλεγχο (γενική αίματος, καλλιέργεια αίματος, προκαλιτονίνη, ποσοτική CRP) μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες για την αντιμετώπιση ασθενών σε κρίσιμη κατάσταση με πυρετό αγνώστου αιτιολογίας, υπό αντιβιοτική αγωγή ή χημειοπροφύλαξη. Η τεχνική αυτή (SEPTI-FAST) έχει ευαισθησία 90% (έναντι της αιμοκαλλιέργειας 56,7%) και ειδικότητα 98,3%.

### ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Εφαρμόζοντας την ταχεία και αξιόπιστη ανίχνευση γονοτύπου σε ανθεκτικά βακτήρια έχουμε σαν αποτέλεσμα τον έλεγχο των λοιμώξεων, όπως methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) και vancomycin resistant *Enterococcus* s.pp. (VRE). Το *mecA* γονίδιο του MRSA, ευθύνεται για την αντοχή. Η ανίχνευση του *mecA* γονιδίου μπορεί με το *nuc* γονίδιο να καταστεί δυνατή η ταχεία μοριακή ανίχνευση του *S. aureus* και επιβεβαίωση του MRSA από θετική καλλιέργεια αίματος. Αυτό είναι σημαντικό διότι παρέχονται πληροφορίες σχετικά με την επιλογή αντιβιοτικού το συντομότερο δυνατόν, δεδομένου ότι τα ποσοστά θνησιμότητας είναι υψηλότερα με λοίμωξη από MRSA σε σύγκριση με methicillin-ευαίσθητα *S. aureus*. [26]. Ομοίως, η ανίχνευση των VRE είναι πιο ευαίσθητη και γρήγορη με τις τεχνικές του DNA. [27] Οι εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (ESBL) της *Escherichia coli* και *Klebsiella pneumoniae* οφείλεται σε πλασμιδία. Τα βακτήρια που περιέχουν ESBL μπορεί να εξαπλωθούν γρήγορα στο νοσοκομείο και να προκαλέσουν μολύνσεις τραυμάτων, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος και σηψαιμία. Η ανίχνευση τους απαιτεί ειδικές εργαστηριακές δοκιμές από αντιβιογράμματα, που δεν μπορεί να ανιχνεύσει τα στελέχη που μεταφέρουν τα γονίδια αντοχής. Τον τελευταίο καιρό έχει δημιουργηθεί μεγάλο πρόβλημα για την *Klebsiella pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάσες (KPC- *K. pneumoniae*) αλλά και των ανθεκτικών στελεχών της *Pseudomonas aeruginosa* και *Acinetobacter* s.pp. Με τις μοριακές δοκιμές ανιχνεύονται τα γονίδια αντοχής, που βοηθούν στον έλεγχο των λοιμώξεων. Η πολυανθεκτική φυματίωση (ορίζεται

ως η αντοχή των τόσο ριφαμπικίνη και ισονιαζίδη) είναι ένα σοβαρό πρόβλημα σε πολλά μέρη του κόσμου, όπως η Ανατολική Ευρώπη.

### ΜΥΚΗΤΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΑ

Λοιμώξεις από *Pneumocysti jiroveci* 28(ένας μύκητας που ονομαζόταν παλαιότερα *Pneumocystis carinii*) μπορεί να προκαλέσει σοβαρή πνευμονία σε ασθενείς με HIV λοίμωξη και άλλους ανοσοκατασταλαμένους ασθενείς. Η ανίχνευση περιορίζεται σε μικροσκοπήση δειγμάτων της αναπνευστικής οδού. Η PCR έχει μεγάλη ευαισθησία. Άλλη μυκητολογική χρήση του 18S rRNA με PCR γίνεται η ανίχνευση *Aspergillus* spp. Από λοίμωξη[29] σε ουδετεροπενικούς ασθενείς. Η διάγνωση των παρασίτων υποβοηθείται από μοριακές μεθόδους καθώς τα περισσότερα παράσιτα δεν καλλιεργούνται και ως εκ τούτου η διάγνωση βασίζεται κυρίως στις σχετικά λιγότερο ευαίσθητες μέθοδοι μικροσκοπίας ή σε ορολογικές εξετάσεις. Το *Toxoplasma gondii* μπορεί να ανιχνευτεί με PCR από αμνιοπαρακέντηση για την διάγνωση της εγκεφαλίτιδας από τοξόπλασμα. [30]

Η μικροσκοπία παραμένει η βασικότερη μέθοδος διάγνωσης της ελονοσίας, αλλά η PCR για το *Plasmodium* spp. λόγω της μεγαλύτερης ευαισθησίας του σε σύγκριση με το μικροσκόπιο, μπορεί να διαγνώσει την ελονοσία και να χορηγηθεί χημειοπροφύλαξη.

### ΕΥΡΕΙΑΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ PCR

Η χρήση της PCR ευρείας εμβέλειας για τη διάγνωση των λοιμωδών νοσημάτων στοχεύει συνήθως το βακτηριακό 16S rRNA γονιδίου ή γονιδίου 18S rRNA των μικροβίων. Κάθε ενισχυμένο προϊόν περιέχει περισσότερα από 9.000 αλληλουχίες βάσεων. Διαδοχικά συγκρίνεται με διαφορετικούς οργανισμούς στο Internet databases. [31] που περιέχουν διάφορες πλήρεις βάσεις δεδομένων όπως GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) / Genbank), το EMBL Βιβλιοθήκη δεδομένων ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk) / EMBL), και το DNA Data Bank της Ιαπωνίας ([www.ddbj.nig.ac.jp](http://www.ddbj.nig.ac.jp)) με την καθημερινή ανταλλαγή δεδομένων μεταξύ τους, με τις πιο εξειδικευμένες βάσεις δεδομένων υψηλής ποιότητας όπως RIDOM ([www.ridom-rdna.de/](http://www.ridom-rdna.de/)) για τις βακτηριακές rDNA αλληλουχίες που χρησιμοποιούνται για μυκοβακτηριακή τυποποίηση. Ευρείας κλίμακα PCR, χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό *B. henselae* και *T. whipplei* επίσης στην διάγνωση της

βακτηριακής μηνιγγίτιδας. Πιο πρόσφατα μια θεαματική χρήση της PCR ευρείας εμβέλειας ήταν ο προσδιορισμός του SARS Δεδομένου ότι η ταχεία και αξιόπιστη αιτιολογική διάγνωση ενισχύει την αποτελεσματική αντιμετώπιση των μεταδοτικών ασθενειών, η μοριακή διάγνωση έχει να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο. Η έλευση της μοριακής επιδημιολογίας, επιτρέπει την παρακολούθηση των παθογόνων παραγόντων με καθορισμό του γονοτύπου των μικροβιακών στελεχών.

### Η ΒΙΟΑΣΦΑΛΕΙΑ

Οι βιολογικοί παράγοντες πολέμου, θεωρούνται ο βακίλος του άνθρακα, ο ιός ευλογιάς (ευλογιά), *Clostridium botulinum* (αλλαντίαση) και *Yersinia pestis* (πανούκλα) δεδομένου ότι μπορεί να είναι αόρατοι και σε πολύ μικρές ποσότητες να μεταδοθούν σε πολλούς ανθρώπους με θανατηφόρα αποτελέσματα. Η Real-time PCR υπερέρχει από τις συμβατικές μεθόδους ως προς την διαγνωστική ικανότητα και την ταχύτητα. Η PCR σε πραγματικό χρόνο χρειάζεται επεξεργασία των δειγμάτων μόλις 30 λεπτά. Επιπλέον, τεχνολογίες μικροσυστοιχιών (microarray) έχουν μεγάλη εφαρμογή στον συγκεκριμένο τομέα. [32]

### ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Η PCR σε συνδυασμό με προσδιορισμό της αλληλουχίας έχει γίνει ένα ισχυρό εργαλείο για την διάγνωση των άγνωστων παθογόνων παραγόντων και την επιδημιολογική έρευνα των νέων και των αναδυομένων λοιμωδών ασθενειών. Οι μοριακές μέθοδοι έχουν βοηθήσει στην ταυτοποίηση πάνω από 30 ειδών βακτηρίων που δεν μπορούν να καλλιεργηθούν[33]. Η μοριακή τεχνολογία έχει προχωρήσει πέρα από την απλή αναγνώριση του αιτιολογικού μικροοργανισμού για τις μολυσματικές ασθένειες. Ούτε τώρα ούτε στο εγγύς μέλλον θα είναι κομβικής σημασίας για τη μελέτη της εξέλιξης παθογόνων παραγόντων, τη διατήρηση των μολυσματικών κύκλων στη φύση, τη διερεύνηση των αιτιών και των μηχανισμών των νέων παθογόνων παραγόντων και οι μηχανισμοί της ευαισθησίας των διαφόρων ομάδων υποδοχής και την ανάπτυξη του DNA και του RNA και γονιδίων που κωδικοποιούν παθογόνους παράγοντες. Αυτό θα επιτευχθεί με νέες μοριακές μεθόδους, όπως microarray, μικροσίπ, in situ PCR και αυτοματοποίηση. Οι προβληματισμοί που τίθενται είναι; πόσο καιρό θα πρέπει να

περιμένουμε το DNA για τη θεραπεία, και σε ποια βιολογικά υγρά ή ιστούς θα προσδιορίζεται, πώς μπορεί να γίνεται διάκριση μεταξύ αποικισμού και ενεργού λοίμωξης ;

Οι μοριακές μέθοδοι έχουν αντικαταστήσει μερικές παραδοσιακές μεθόδους στο εργαστήριο ιολογίας,

αλλά έως ότου μπορέσουν γρήγορα και ανέξοδα να εφαρμοστούν για τον καθορισμό της αιτιολογίας και της ευαισθησίας των μικροβίων, οι συμβατικές καλλιέργειες και το αντιβιογράμμα με παραδοσιακές μεθόδους θα εφαρμόζονται για αρκετό διάστημα.

## SUMMARY

Molecular methods for the detection and characterisation of microbes have revolutionised diagnostic microbiology and are now part of routine specimen processing. Polymerase chain reaction (PCR) techniques have led the way into this new era by allowing rapid detection of microorganisms that were previously difficult or impossible to detect by traditional microbiological methods. In addition to detection of fastidious microbes, more rapid detection by molecular methods is now possible for pathogens of public health importance. Molecular methods have now progressed beyond identification to detect antimicrobial resistance genes and provide public health information such as strain characterisation by genotyping. Treatment of certain microorganisms has been improved by viral resistance detection and viral load testing for the monitoring of responses to antiviral therapies. With the advent of multiplex PCR, real-time PCR and improvements in efficiency through automation, the costs of molecular methods are decreasing such that the role of molecular methods will further increase. This review will focus on the clinical utility of molecular methods performed in the clinical microbiology laboratory, illustrated with the many examples of how they have changed laboratory diagnosis and therefore the management of infectious diseases.

**Key words :** Molecular methods, PCR , microbes, infectious diseases

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Gilbert GL, James GS, Sintchenko V. Culture shock. Molecular methods for diagnosis of infectious diseases. *Med J Aust* 1999;171:536-40.
- Lakeman FD, Whitley RJ. Diagnosis of herpes simplex encephalitis: application of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain-biopsied patients and correlation with disease. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. *J Infect Dis* 1995;171:857-63.
- van Vliet KE, Glimaker M, Lebon P, et al. Multicenter evaluation of the Amplicor Enterovirus PCR test with cerebrospinal fluid from patients with aseptic meningitis. The European Union Concerted Action on Viral Meningitis and Encephalitis. *J Clin Microbiol* 1998;36:2652-7.
- Read SJ, Jeffery KJM, Bangham CRM. Aseptic meningitis and encephalitis: the role of PCR in the diagnostic laboratory. *J Clin Microbiol* 1997;35:691-6.
- Dore GJ, Kaldor JM, McCaughan GW. Systematic review of role of polymerase chain reaction in defining infectiousness among people infected with hepatitis C virus. *BMJ* 1997;315:333-7.
- Dax EM. The window period and HIV tests. *ASHM Journal Club* 2004;13:9-11.
- Luzuriaga K, Sullivan JL. Pathogenesis of vertical HIV-1 infection: implications for intervention and management. *Pediatr Ann* 1994;23:159-66.
- Seed CR, Cheng A, Ismay SL, et al. Assessing the accuracy of three viral risk models in predicting the outcome of implementing HIV and HCV NAT donor screening in Australia and the implications for future HBV NAT. *Transfusion* 2002;42:1365-72.
- Palasanthiran P, Jones C, Garland S. Cytomegalovirus. In: Management of Perinatal Infections. Palasanthiran P, Starr M, Jones C editors. Australasian Society for Infectious Diseases 2002. p 1-4.
- Nourse C. Rubella. In: Management of Perinatal Infections. Palasanthiran P, Starr M, Jones C editors. Australasian Society for Infectious Diseases 2002. p 33-5.
- Heuchan A, Isaacs D. Varicella zoster virus. In: Management of Perinatal Infections. Palasanthiran P, Starr M, Jones C editors. Australasian Society for Infectious Diseases 2002. p 45-50.
- Henrickson KJ. Cost-effective use of rapid diagnostic techniques in the treatment and prevention of viral respiratory infections. *Pediatr Ann* 2005;34:24-31.
- Ng EK, Hui DS, Chan KC, et al. Quantitative analysis and prognostic implication of SARS coronavirus RNA in the plasma and serum of patients with severe acute respiratory syndrome. *Clin Chem* 2003;49:1976-80.
- Ho PL, Chau PH, Yip PSF, et al. A prediction rule for clinical diagnosis of severe acute respiratory syndrome. *Eur Respir J* 2005;26:474-9.
- World Health Organisation. Recommended laboratory tests to identify avian influenza A virus in specimens from humans. [http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/guidelines/labtests/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/labtests/en/index.html). Accessed October 17, 2005.
- Katzenstein TL. Molecular biological assessment methods and understanding the course of the HIV infection. *APMIS* 2003;114(S):1-37.
- Berger A, Scherzed L, Sturmer M., Comparative

- evaluation of the Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Ultrasensitive Test, the new Cobas AmpliPrep/Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Ultrasensitive Test and the Versant HIV RNA 3.0 assays for quantitation of HIV-1 RNA in plasma samples. *J Clin Virol* 2005;33:43-51.
18. Thomson EC, Main J. Advances in hepatitis B and C. *Curr Opin Infect Dis* 2004;17:449-59.
  19. Long CM, Drew L, Miner R et al. Detection of cytomegalovirus in plasma and cerebrospinal fluid specimens from human immunodeficiency virus-infected patients by the AMPLICOR CMV test. *J Clin Microbiol* 1998;36:2434-8.
  20. Brestovac B, Harnett GB, Smith DW, Multiplex PCR (MNP) assay for the detection of 15 high risk genotypes of human papillomavirus. *J Clin Virol* 2005;33:116-22.
  21. Cook RL, Hutchison SL, Ostergaard L, . Systematic review: noninvasive testing for Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae. *Ann Intern Med* 2005;142:914-25.
  22. Fenollar F, Raoult D. Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. *APMIS* 2004;112:785-807.
  23. Taha, MK. Simultaneous approach for nonculture PCRbased identification and serogroup prediction of Neisseria meningitidis. *J Clin Microbiol* 2000;38:855-7.
  24. Tzanakaki G, Tsopanomichalou M, Kesanopoulos K, et al. Simultaneous single-tube PCR assay for the detection of Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae type b and Streptococcus pneumoniae. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:386-90.
  25. J. P. Casalta & F. Gouriet & V. Roux & F. Thuny & G. Habib & D. Raoult Evaluation of the LightCycler® SeptiFast test in the rapid etiologic diagnostic of infectious endocarditis *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2009) 28:569–573
  26. Cockerill FR. Rapid Detection of Pathogens and Antimicrobial Resistance in Intensive Care Patients Using Nucleic Acid-Based Techniques. *Scand J Clin Lab Invest* 2003;63(S239):34-46.
  27. Paule SM, Trick WE, Tenover FC, et al. Comparison of PCR assay to culture for surveillance detection of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 2003;41:4805-7.
  28. Helweg-Larsen J, Jensen JS, Dohn B, et al Detection of Pneumocystis DNA in samples from patients suspected of bacterial pneumonia-a case control study. *BMC Infect Dis* 2002;25:28.
  29. Williamson ECM, Leeming JP, Palmer HM, et al. Diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients by polymerase chain reaction. *Br J Haematol* 2000;108:132-9.
  30. Gilbert L. Toxoplasmosis. In: Management of Perinatal Infections. Palasanthiran P, Starr M, Jones C editors. Australasian Society for Infectious Diseases; 2002. p 39-41.
  31. Fredricks DN, Relman DA. Application of PCR to the diagnosis of infectious diseases. *Clin Infect Dis* 1999;29:475-88.
  32. Peruski LF, Peruski AH. Rapid diagnostic assays in the genomic biology era: detection and identification of infectious disease and biological weapon agents. *Biotechniques* 2003;35:840-6.
  33. Tarasevich IV, Shaginyan IA, Mediannikov OY. Problems and perspectives of molecular epidemiology of infectious diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2003;990: 751-6.