

# Μοριακό Αντιβιογράμμα στη Διαγνωστική & Κλινική Μικροβιολογία: Πλεονεκτήματα και Προκλήσεις

Δρ. Κ. Θέμελη- Διγαλάκη

Συντονίστρια Διευθύντρια Μικροβιολογικού Εργαστηρίου

Πρόεδρος Επιστημονικού Συμβουλίου, ΓΝ Πειραιά «Τζάνειο»



Παραπομπή

Κ. Θέμελη- Διγαλάκη. Μοριακό Αντιβιογράμμα στη Διαγνωστική & Κλινική Μικροβιολογία: Πλεονεκτήματα και Προκλήσεις. Επιστημονικά Χρονικά 2017; 22(2): 104-109

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο έλεγχος ευαισθησίας κατά της μικροβιακής αντοχής (Antimicrobial susceptibility testing -AST) αποτελεί βασική εξέταση στην Κλινική μικροβιολογία. Το αντιβιογράμμα βασίζεται στη δοκιμασία της ικανότητας των αντιμικροβιακών παραγόντων να αναστέλλουν την ανάπτυξη μικροβίων σε ειδικές πειραματικές συνθήκες, οι οποίες μπορούν να εκτελεστούν με διάφορες μεθόδους, συμπεριλαμβανομένης της ελάχιστης αραιώσεως του αντιβιοτικού σε ζωμό ή σε άγαρ ή με διάχυση της αντιμικροβιακής ουσίας σε δίσκο ή σε λωρίδα διαβάθμισης.

Τα αποτελέσματα του αντιβιογράμματος είναι πολύ πιο χρήσιμα στην θεραπευτική των λοιμώξεων γιατί προσδιορίζονται οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MICs), ενώ και η απλή ανάγνωσή της διαμέτρου της ζώνης

αναστολής ανάπτυξης γύρω από δίσκους δίνει πολύτιμες πληροφορίες (φαινότυπος αντοχής) για την διαγνωστική μικροβιολογία. Όλες αυτές οι πληροφορίες μεταφράζονται σε κατηγορίες ευαισθησίας σύμφωνα με τα κλινικά σημεία διακοπής που ορίζονται από διάφορες οργανισμούς (π.χ. CLSI, EUCAST).

Τα αποτελέσματα AST χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη της κλινικής αποτελεσματικότητας των εξετασθέντων αντιβιοτικών και για την καθοδήγηση τόσο της οριστικής όσο και της εμπειρικής αντιμικροβιακής χημειοθεραπείας, όταν λαμβάνεται σε ατομική βάση ή σε αθροιστική βάση που αντιπροσωπεύει την τοπική επιδημιολογία των προτύπων ευαισθησίας των αντιβιοτικών αντιστοίχως.

Η ανάγκη για ακριβή δεδομένα AST ολοένα αυξάνεται λόγω της αυξανόμενης μικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά, όπου

η αντιμικροβιακή διαχείριση έχει αποκτήσει ολοένα και μεγαλύτερη σημασία για τη βελτίωση των κλινικών αποτελεσμάτων, ελαχιστοποιώντας ταυτόχρονα την πίεση για επιλογή της αντοχής.

Το συμβατικό αντιβιογράμμα βασίζεται στη φαινοτυπική ανίχνευση της βακτηριακής ανάπτυξης, η οποία απαιτεί χρονικό διάστημα 16-24 ωρών για τα ταχέως αναπτυσσόμενα παθογόνα ή ακόμα και περισσότερο για τα βραδέως αναπτυσσόμενα μικρόβια[1].

Πρόσφατα όμως εφαρμόζεται η δυνατότητα ανίχνευσης ορισμένων μηχανισμών αντοχής σε **μοριακό επίπεδο** σε σημαντικά μικρότερο χρονικό διάστημα για την διαγνωστική πρακτική του εργαστηρίου. Αυτή η προσέγγιση, που ορίζεται ως **μοριακό αντιβιογράφημα (ΜΑ)**, αναπτύχθηκε αρχικά για παθογόνα μικρόβια βραδέως αναπτυσσόμενα (π.χ. μυκοβακτηρίδια, *Helicobacter pylori*) [3,4], αλλά τώρα μπορεί να εφαρμοστεί σε διάφορους μηχανισμούς αντοχής των κοινών παθογόνων (π.χ. σταφυλόκοκκοι, εντερόκοκκοι, *Enterobacteriaceae* και Gram-αρνητικά αζυμωτικά βακτήρια).

Η μοριακή αυτή μεθοδολογία έχει γίνει πολύ αποτελεσματική για την επίτευξη ταχύτερων αποτελεσμάτων στην αντιμικροβιακή ευαισθησία και με αξιοσημείωτη επίδραση στην ορθολογική αντιμικροβιακή διαχείριση και κλινικές εκβάσεις προς όφελος του ασθενούς. [5,6].

Ωστόσο, πρέπει να εξεταστεί η χρησιμότητα κατά την εφαρμογή του ΜΑ στη διαγνωστική ρουτίνα.

## ΠΟΙΕΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΕΙΝΑΙ ΔΙΑΘΕΣΙΜΑ ΓΙΑ ΤΟ ΜΑ;

Το ΜΑ ανιχνεύει τους μηχανισμούς αντοχής των βακτηρίων σε μοριακό επίπεδο, με πρωταρχικό σκοπό την πρόβλεψη της αντοχής στους αντιμικροβιακούς παράγοντες που επηρεάζονται από αυτούς τους μηχανισμούς. Η ανίχνευση της αντοχής συνήθως στοχεύει σε γονίδια αντοχής χρησιμοποιώντας τεχνολογίες ενίσχυσης γονιδίων σε συνδυασμό με ανάλυση αντιγόνων (π.χ. PCR real time, PCR plus microarrays ή PCR plus ESI-MS) [5], αλλά μπορεί επίσης να στοχεύσει στους μηχανισμούς των καρβαπενεμασών μεταξύ των στελεχών *Enterobacteriaceae* ανθεκτικών σε καρβαπενέμη. Τα συστήματα για το ΜΑ που καλύπτουν τα διαφορετικά γονίδια καρβαπενεμάσης είναι προτιμότερα από εκείνα, που καλύπτουν ένα μόνο γονίδιο, ακόμη και αν είναι το πλέον επικρατών μεταξύ των ειδικών πρωτεϊνών αντοχής (π.χ. β-Λακταμάσης) μέσω ταχείας ανοσολογικής χρωματογραφίας [7] ή φασματομετρίας μάζας [8], αν και η τελευταία προσέγγιση εξακολουθεί να είναι σε μεγάλο βαθμό διερευνητική.

Είναι ένας τομέας εντατικής έρευνας, για το εγγύς μέλλον, όπου αναμένονται πρόσθετες τεχνολογίες και προσεγγίσεις για το ΜΑ.

Οι μηχανισμοί αντοχής, που στοχεύουν σε εμπορικά διαθέσιμα συστήματα μπορεί να διαφέρουν σε αριθμό και τύπος [9]. Αυτό το χαρακτηριστικό πρέπει να εξεταστεί προσεκτικά κατά την επιλογή ενός εμπορικού διαγνωστικού συστήματος για το ΜΑ. Για να βελτιωθεί και να χρησιμοποιηθεί η επιστρεφόμενη πληροφορία, το σύστημα

πρέπει να είναι σε θέση να καλύψει τους πιο σχετικούς μηχανισμούς αντοχής, που συναντώνται στην τοπική επιδημιολογία. Για παράδειγμα, εάν είναι γνωστό ότι υπάρχουν διαφορετικοί τύποι γονιδίων αντοχής.

### **ΠΟΙΑ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΑ ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΜΑ;**

Η ταχύτητα των αποτελεσμάτων, με μια χρονική ανταπόκριση (time-to-response - TTR) που μπορεί να είναι τόσο μικρή όσο 0,5-1 ώρες, είναι ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα του ΜΑ. Επιπλέον, το ΜΑ μπορεί επίσης να εφαρμόζεται σε θετικές καλλιέργειες αίματος ή απευθείας σε κλινικά δείγματα, επιτρέποντας περαιτέρω μείωση του TTR. Ωστόσο, με ορισμένα δείγματα (π.χ. αίμα) η ποσότητα στόχου νουκλεϊνικού οξέος είναι χαμηλή και το στάδιο εκχύλισης μπορεί να απαιτεί πιο σύνθετες διαδικασίες και δαπανηρά συστήματα, με αποτέλεσμα κάπως μεγαλύτερες TTRs (5-6 ώρες) [10].

Ένα άλλο πλεονέκτημα του ΜΑ είναι να παρέχει τη δυνατότητα να εφαρμόζεται σε πολυμικροβιακά δείγματα και να ανιχνεύεται ο μοριακός στόχος. Επίσης άμεσα να ανιχνεύει την απουσία βακτηρίων, λόγω προηγούμενης έκθεσης σε αντιμικροβιακούς παράγοντες και να εμφανίζει μια συνολικά μεγαλύτερη ευαισθησία ανίχνευσης σε άμεσα με κλινικά δείγματα .

Πράγματι, ορισμένα αποδεικτικά στοιχεία που υποστηρίζουν τα οφέλη του ΜΑ όσον αφορά τη μείωση της διάρκειας διαμονής στο νοσοκομείο και των δαπανών που σχετίζονται με την υγειονομική περίθαλψη είναι ήδη διαθέσιμα [6,11,12], αν

και πρόσφατη ανάλυση της τεχνολογίας για την αξιολόγηση της υγείας (Health Technology Assessment -HTA) κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα υπάρχοντα δεδομένα σχετικά με τις μοριακές τεχνικές για την ταυτοποίηση των παθογόνων από το αίμα και το ΜΑ είναι ανεπαρκή , για να αποδειχθεί οποιαδήποτε βελτίωση σε βασικά αποτελέσματα των ασθενών [13].

Ωστόσο, σε αυτήν την ανασκόπηση, είναι πολύπλοκο να αξιολογείται μόνο η επίδραση του ΜΑ, δεδομένου ότι οι πληροφορίες σχετικά με την ανίχνευση γονιδίων αντοχής εξετάζονται πάντοτε μαζί με την ταυτοποίηση των παθογόνων βακτηρίων.

### **ΠΟΙΟΙ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΟΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΟΥ ΜΑ;**

Εκτός από το κόστος, το οποίο είναι συνήθως υψηλότερο από αυτό του συμβατικού αντιβιογράμματος, ο περιορισμός της ΑΑ προέρχεται από το σχετικά στενό αποτέλεσμα των ανιχνεύσιμων μηχανισμών αντίστασης που καλύπτονται από τα διαθέσιμα συστήματα, πράγμα που συνεπάγεται μια πιο περιορισμένη πληροφορία σε σύγκριση με το συμβατικό αντιβιογράμμα. Πράγματι, τα αποτελέσματα του ΜΑ είναι μια χρήσιμη εξάρτηση για την πρόβλεψη αντοχής, αλλά με λιγότερη ευαισθησία για να προβλεφθεί (δηλαδή, η έλλειψη ενός συγκεκριμένου μηχανισμού αντοχής μπορεί να μην επαρκεί για να δικαιολογήσει την ευαισθησία).

Επιπλέον, δεδομένου του σχεδιασμού του, το ΜΑ είναι εγγενώς ανίκανο να ανιχνεύσει άγνωστους μηχανισμούς αντοχής.

Αυτοί οι περιορισμοί θα μπορούσαν ενδεχομένως να ξεπεραστούν όταν η ΑΑ βασίζεται σε πληροφορίες που καλύπτουν ολόκληρη την αντοχή του μικροβιακού στελέχους.

Στην πραγματικότητα, έχει αναφερθεί καλή συσχέτιση μεταξύ ανάλυσης αντοχής που διεξάγεται με αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος και συμβατικό αντιβιογράφημα με στελέχη *Staphylococcus aureus* [14,15]. Ωστόσο, το TTR αυτών των μεθοδολογιών που βασίζονται στο σύνολο του γονιδιώματος δεν είναι ακόμη συμβατό με τη χρήση στη διαγνωστική ρουτίνα για κλινικούς σκοπούς.

Ένας άλλος περιορισμός είναι ο ποιοτικός χαρακτήρας των αποτελεσμάτων των ΜΑ: δεν παρέχονται MIC, ενώ οι τιμές MIC βασίζονται όλο και περισσότερο για την αντιμικροβιακή διαχείριση, ειδικά με ορισμένα φάρμακα και βακτήρια[16].

Τέλος, με το ΜΑ, υπάρχει κίνδυνος υπέρβασης της αντοχής λόγω της παρουσίας στοχευμένων γονιδίων αντοχής που είτε αδρανοποιούνται είτε δεν εκφράζονται.

Λόγω αυτών των περιορισμών, το ΜΑ δεν μπορεί να θεωρηθεί αυτόνομη εξέταση αντικαθιστώντας το συμβατικό αντιβιογράμμα, αλλά ως συμπληρωματικό τεστ που μπορεί να παράσχει ορισμένες χρήσιμες πρόσθετες πληροφορίες, ζωτικής σημασίας για τις πολιτικές διαχείρισης αντιμικροβιακών φαρμάκων ή / και ελέγχου των λοιμώξεων, σε συντομότερο χρονικό διάστημα.

## ΠΩΣ ΝΑ ΕΦΑΡΜΟΣΕΤΕ ΤΟ ΜΑ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΡΟΥΤΙΝΑ

Το ΜΑ παρέχει κατά κύριο λόγο πληροφορίες σχετικά με την πιθανότητα αντοχής σε ορισμένα αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που επηρεάζονται από τον ανιχνευθέντα μηχανισμό αντοχής.

Το ΜΑ μπορεί επίσης να παρέχει πληροφορίες σχετικά με πιθανή ευαισθησία σε ορισμένα αντιβιοτικά μεταξύ εκείνων που διαφεύγουν από τους ανιχνευμένους μηχανισμούς αντίστασης.

Οι τελευταίες πληροφορίες, ωστόσο, μπορεί να επηρεαστούν έντονα από την κάλυψη των μηχανισμών αντοχής, τα βακτηριακά είδη και την τοπική επιδημιολογία της αντοχής.

Ως εκ τούτου, οι πληροφορίες του ΜΑ είναι διαφορετικές από αυτές του συμβατικού αντιβιογράμματος. Από την άλλη πλευρά, οι κλινικοί ιατροί συνήθως δεν είναι εξοικειωμένοι με αυτό το είδος πληροφοριών και τη σημασία τους. Επομένως, όταν εισάγεται ΜΑ στο διαγνωστικό εργαστήριο, σημαντική πρόκληση αντιπροσωπεύει η αναφορά των αποτελεσμάτων των ΜΑ σε κλινικούς χρήστες.

Από την εμπειρία μας, τα αποτελέσματα του ΜΑ αναφέρονται ως η παρουσία ή απουσία μηχανισμού αντοχής, από έναν κατάλογο των μηχανισμών που αναζητήθηκε, συνοδευόμενος από ένα σχόλιο που ενημερώνει για την πιθανότητα αντίστασης σε ορισμένα αντιβιοτικά ή κατηγορίες αντιβιοτικών, ανάλογα με τον μηχανισμό αντοχής, που έχει ανιχνευθεί και στο βακτηριακό είδος, που έχει εντοπιστεί στο

κλινικό δείγμα. Όταν είναι δυνατόν, προστίθενται επίσης πληροφορίες σχετικά με πιθανή ευαισθησία, ιδιαίτερα για τα αντιβιοτικά που είναι γνωστό ότι είναι δραστικά έναντι των περισσότερων απομονωμένων ειδών επηρεάζονται από ειδικούς μηχανισμούς αντίστασης (π.χ. γλυκοπεπτιδία για εντερόκοκκους, κεφτολοζάνη-ταζομπακτάμη για *Pseudomonas aeruginosa* και ceftazidime-avibactam για Enterobacteriaceae ).

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Το MA προσφέρει μια μοναδική ευκαιρία να παράσχει πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με την αντιμικροβιακή ευαισθησία των βακτηριακών προϊόντων

μέσα σε ένα μικρό χρονικό διάστημα , με σημαντική βοήθεια στην αντιμικροβιακή διαχείριση. Η αξιοποίηση αυτού του δυναμικού εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ευαισθητοποίηση σχετικά με τα πλεονεκτήματα και τους περιορισμούς των επί του παρόντος διαθέσιμων συστημάτων MA, την επιλογή των καταλληλότερων συστημάτων.

Το MA για το νοσοκομείο θεωρείται χρησιμότερο και κατάλληλη η εφαρμογή του στη διαγνωστική ρουτίνα εργασίας του εργαστηρίου.

Τελικά, θα πρέπει να βασίζεται σε συνεννόηση και συμφωνία με λοιμωξιολόγους και κλινικούς ιατρούς, οι οποίοι θα πρέπει να γνωρίζουν τις νέες αυτές διαγνωστικές τεχνολογίες.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Courvalin P, Leclercq R, Rice LB. Antibiogram (3rd Edition). ASM Press, Washington, DC, USA (2010).
2. Barlam TF, Cosgrove SE, Abbo LM et al. Implementing an antibiotic stewardship program: guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America. Clin. Infect. Dis. 62(10),e51-e77 (2016).
3. Gazi MA, Islam MR, Kibria MG, Mahmud 3.Z. General and advanced diagnostic tools to detect Mycobacterium tuberculosis and their drug susceptibility: a review. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 34(5), 851-861 (2015).
4. Mégraud F, Bénéjat L, Ontsira Ngoyi EN, Lehours P. Molecular approaches to identify Helicobacter pyloriantimicrobial resistance. Gastroenterol. Clin. North Am. 44(3), 577-596 (2015).
5. Van Belkum A, Dunne WM Jr. Next-generation antimicrobial susceptibility testing. J. Clin. Microbiol. 51(7), 2018-2024 (2013)
6. Timbrook TT, Morton JB, McConeghy KW, Caffrey AR, Mylonakis E, LaPlante KL. The effect of molecular rapid diagnostic testing on clinical outcomes in bloodstream infections: a systematic review and meta-analysis. Clin. Infect. Dis. 64(1), 15-23(2017).

7. Glupczynski Y, Evrard S, Ote I et al. Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 71(5), 1217–1222 (2016)
8. Van Belkum A, Chatellier S, Girard V, Pincus D, Deol P, Dunne WM Jr. Progress in proteomics for clinical microbiology: MALDI-TOF MS for microbial species identification and more. *Expert Rev. Proteomics*12(6), 595–605 (2015)
9. Arena F, Viaggi B, Galli L, Rossolini GM. Antibiotic susceptibility testing: present and future. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 34(10), 1128–1130 (2015).
10. Opota O, Jatou K, Greub G. Microbial diagnosis of bloodstream infection: towards molecular diagnosis directly from blood. *Clin. Microbiol. Infect.* 21(4),323–331 (2015).
11. Bauer KA, West JE, Balada-Llasat J-M, Pancholi P,Stevenson KB, Goff DA. An antimicrobial stewardship program's impact with rapid polymerase chain reaction methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*/S. aureus blood culture test in patients withS. aureus bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* 51(9),1074–1080 (2010).
12. Sango A, McCarter YS, Johnson D, Ferreira J, Guzman N, Jankowski CA. Stewardship approach for optimizing antimicrobial therapy through use of a rapid microarray assay on blood cultures positive for *Enterococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* 51(12),4008–4011 (2013).
13. Stevenson M, Pandor A, Martyn-St James M et al.Sepsis: the LightCycler SeptiFast Test MGRADE®, SepsiT<sup>TM</sup> and IRIDICA BAC BSI assay for rapidly identifying bloodstream bacteria and fungi – a systematic review and economic evaluation. *Health Technol. Assess.* 20(46), 1–246 (2016)
14. Gordon NC, Price JR, Cole K et al. Prediction of *Staphylococcus aureus* antimicrobial resistance by whole-genome sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 52(4),1182–1191 (2014)
15. Aanensen DM, Feil EJ, Holden MT et al. Whole-genome sequencing for routine pathogen surveillance in public health: a population snapshot of invasive *Staphylococcus aureus* in Europe. *MBio*7(3), doi:10.1128/mBio.00444-16 (2016).
16. Heil EL, Johnson JK. Impact of CLSI breakpoint changes on microbiology laboratories and antimicrobial stewardship programs. *J. Clin. Microbiol.* 54(4), 840–844 (2016).
17. Bassetti M, Carnelutti A, Peghin M. Patient specific risk stratification for antimicrobial resistance and possible treatment strategies in Gram-negative bacterial infections. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.*15(1), 55–65 (2017)
18. Valenzuela-Sanches F, Valenzuela-Méndez B,Rodríguez-Gutiérrez JF. New role of biomarkers: mid-regional pro-adrenomedullin, the biomarker of organ failure. *Ann. Transl. Med.* 4(17), 329 (2016).