


Ερμηνεία των
μοριακών
διαγνωστικών
εξετάσεων από
τον κλινικό Ιατρό

Γαρυφαλλιά Πουλάκου

Γ'ΠΠ ΕΚΠΑ

ΓΝΝΘΑ «Η ΣΩΤΗΡΙΑ»



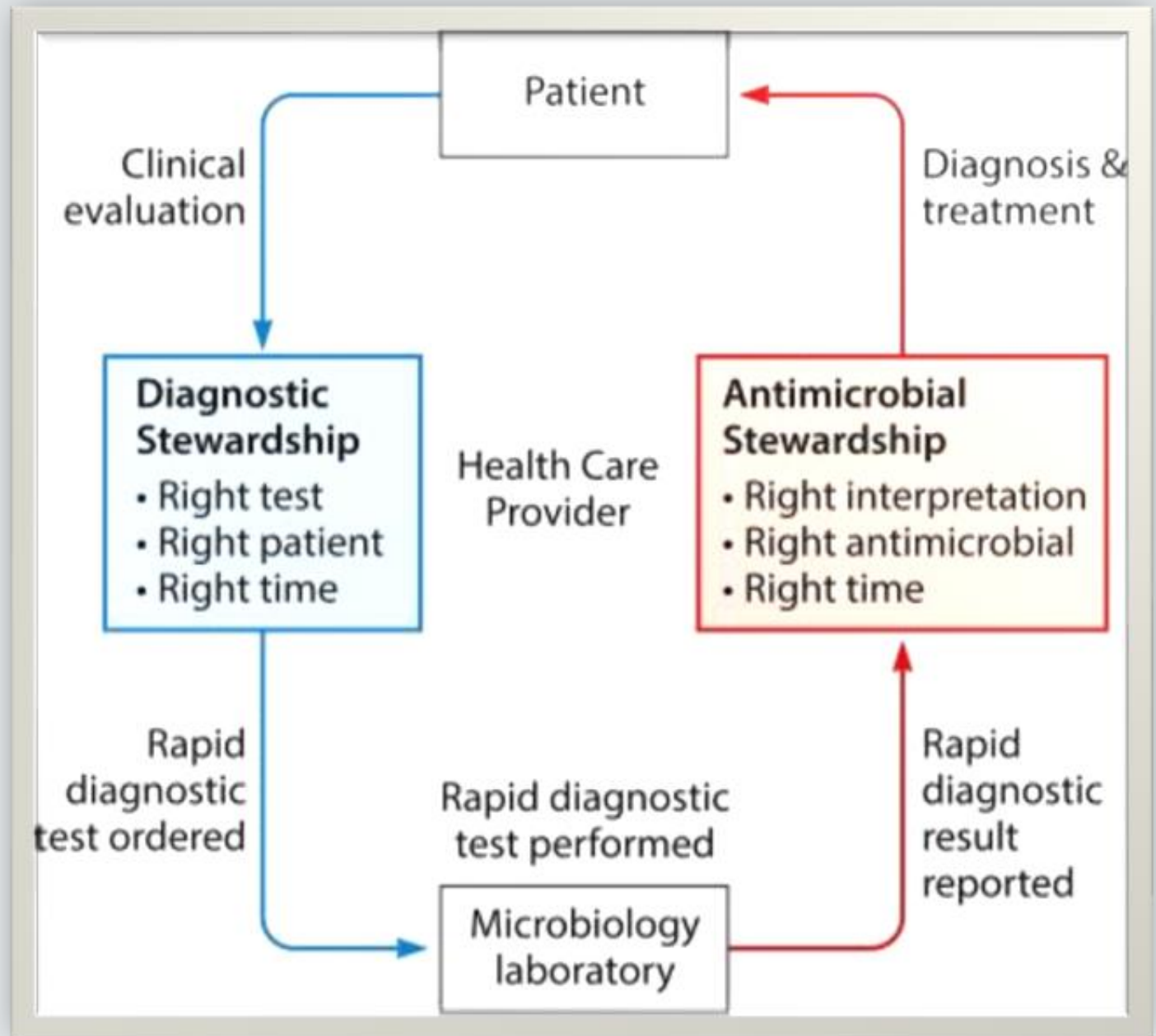
In 1974, Dr. Bartlett observed that “our technical capabilities are exceeding our ability to apply them effectively and economically to human problems”

“....το σημερινό μικροβιολογικό εργαστήριο κατακλύζεται από τεράστιο όγκο ακαδημαϊκής πληροφορίας και πιέζεται για τη διενέργεια τεράστιας γκάμας εξετάσεων, που κινδυνεύουν να καθοδηγούν λανθασμένα τον κλινικό ιατρό ενώ εκτοξεύουν το κόστος”

Οι κλινικοί ιατροί αναζητούν τρεις βασικές πληροφορίες από το μικροβιολογικό εργαστήριο



**Η ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ
ΚΑΙ Η ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ
«ΕΠΙΜΕΛΗΤΕΙΑ»:
ΑΚΡΟΓΩΝΙΑΙΟΙ ΛΙΘΟΙ
ΣΤΗ ΣΩΣΤΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ
ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΙ ΠΟΡΩΝ
ΥΓΕΙΑΣ**





DIAGNOSTIC STEWARDSHIP (ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΠΙΜΕΛΗΤΕΙΑ)

Επιλογή της σωστής διαγνωστικής μεθόδου, η οποία θα εφαρμοσθεί στο σωστό ασθενή, θα αποδώσει ακριβές και κλινικά χρήσιμο αποτέλεσμα στο σωστό χρόνο, το οποίο θα οδηγήσει σε βελτιστοποίηση της θεραπευτικής διαδικασίας και εξορθολογισμό των δαπανών για την υγεία

Επιμέρους συνιστώσες

- Η επιλογή της σωστής δοκιμασίας προϋποθέτει γνώση της ευχέρειας, αξιοπιστίας και απόδοσης καθώς και της ισορροπίας κόστους-αποτελεσματικότητας για την επιλεγείσα μέθοδο
- Ευαισθησία, ειδικότητα, ακρογωνιαία χαρακτηριστικά
- Δυσκολία εξεύρεσης “gold standard” για τις συγκρίσεις
- Θετική και αρνητική προγνωστική αξία
 - Λαμβάνοντας υπόψιν την τοπική επίπτωση της νόσου



Παράδειγμα 1

- Μέθοδος πολυπλεκτικής (multiplex) PCR assay ανιχνεύει πνευμονιοκοκκικό DNA σε εγκεφαλονωτιαίο υγρό που ελήφθη από ασθενή με υποψία μηνιγγίτιδας, ο οποίος όμως είχε προθεραπευθεί με αντιβιοτικά και είχε αρνητική καλλιέργεια ENY
- true-positive result or a false-positive result???
- Εξαρτάται από το κλινικό σενάριο




Η αρνητική προγνωστική αξία της multiplex PCR είναι μεγάλη

- ΑΛΛΑ
- Άλλη είναι η αρνητική προγνωστική αξία μιας multiplex PCR που ανιχνεύει ένα παθογόνο και άλλη μιας multiplex PCR που περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό παθογόνων
- Ακόμη μεγαλύτερη είναι αυτή της μεθόδου που περιλαμβάνει ΌΛΑ ή τα περισσότερα από τα πιθανά παθογόνα που δυνατόν να εμπλέκονται στο κλινικό σενάριο που διερευνάται



Παράγοντες που επιδρούν στην ευχρηστία ενός νέου ταχέος διαγνωστικού test


- Ανάγκη εκπαιδευμένου προσωπικού,
- Hands-on time for performing the test
- Η ενσωμάτωση της νέας μεθόδου στη ροή των εργασιών του εργαστηρίου
- Η ικανότητα της νέας μεθόδου να αντικαταστήσει τις υπάρχουσες ή η ανάγκη να εκτελείται επιπρόσθετως
 - multiplex PCR platforms for cerebrospinal fluid testing: culture is still needed for detection of bacterial pathogens not detected by the panel, confirmation of positive results, and susceptibility testing
 - multiplex PCR assays for stool testing may supplant monoplex PCR assays for viral and parasitic pathogens and save the time and expense of conducting multiple monoplex tests with a single sample



Πως θα αξιολογήσουμε το «αποτύπωμα» μιας νέας μεθόδου στην κλινική πράξη

Μια υπεραπλουστευμένη προσέγγιση:

- Αξιολόγηση του διαγράμματος παρακολούθησης του ασθενούς
- Τι αλλαγές στη θεραπευτική που έγιναν με τη γνωστοποίηση του αποτελέσματος
- Παράδειγμα: σε παιδιατρική κλινική η χρήση ταχείας multiplex PCR σε ENY με αποτελέσματα που γνωστοποιούνταν εντός 2ωρών οδήγησε σε μείωση της έκθεσης σε ασυκλοβίρη κατά 2 με 3 ημέρες στα παιδιά που υποβλήθηκαν σε ΟΝΠ



Βασικές συνθήκες για την εισαγωγή μιας ταχείας διαγνωστικής μεθόδου στη διαγνωστική των λοιμώξεων

Το σωστό test

**Είναι εφαρμόσιμο-
κατάλληλο για αυτό το
κλινικό περιβάλλον;**

**Ευαισθησία και ειδικότητα της
μεθόδου**

Προγνωστικές αξίες

**Απαιτούμενος όγκος
δείγματος**

Διαγνωστική «παραγωγή»

Εργαστηριακή ευχρηστία

Κόστος

Κλινικό όφελος

Οι διαγνωστικές εξετάσεις
πρέπει να εφαρμόζονται
στον ασθενή ο οποίος θα
έχει κλινικό/θεραπευτικό
όφελος με βάση το
αποτέλεσμα

Βασικές συνθήκες για την εισαγωγή μιας ταχείας διαγνωστικής μεθόδου στη διαγνωστική των λοιμώξεων

Ο σωστός ασθενής

Θα επιδράσει το αποτέλεσμα της ζητούμενης εξέτασης στη θεραπευτική του;

Επιτροπές διαχείρισης εργαστηριακών εξετάσεων

Αυτοματοποιημένα εργαστηριακά αντανακλαστικά

Ηλεκτρονική- αλγοριθμική υποστήριξη της παραγγελίας προς το εργαστήριο

Θέσπιση κριτηρίων για τη χρήση ορισμένων εξετάσεων

Επιλογή κριτηρίων

Προέγκριση από λοιμωξιολόγο εφόσον δεν πληρούνται τα θεσπισμένα κριτήρια

Benchmarking

Απόρριψη «λανθασμένων» ή μη αποδεκτών δειγμάτων

Computerized order entry (CPOE)

- Πιο χρήσιμη σε μοριακές μεθόδους που θα εφαρμοσθούν απ' ευθείας στο ληφθέν βιολογικό υλικό και όχι σε μια θετικοποιημένη καλλιέργεια, οπότε η ευθύνη παραγγελίας βαρύνει τον κλινικό ιατρό
- Θέσπιση αλγορίθμων
- Θέσπιση κριτηρίων για την επιλογή της δεδομένης εξέτασης
- Προέγκριση από κλινικό μικροβιολόγο ή λοιμωξιολόγο ή άλλη συναφή ειδικότητα σε εξαιρετικές περιπτώσεις που δεν εμπίπτουν στα ανωτέρω
- Παράδειγμα: to order a rapid multiplex gastrointestinal diagnostic panel, a provider could be required to select an indication from the approved use criteria of bloody diarrhea, concern for bacterial enteritis, or travel outside the United States.

Krasowski MD, BMC Med Inform Decis Mak 2015;15:11.

Wilson ML, Am J Clin Pathol 2015;143:614–616

Bhatia RS, Expert Rev Cardiovasc Ther 2016;14:281–290.



Βασικές αρχές **αντιμικροβιακής** επιμελητείας για την εισαγωγή μια ταχείας μεθόδου στη διαγνωστική των λοιμώξεων

Ορθή ερμηνεία

**Θα αντιληφθεί ο κλινικός
ιατρός το αποτέλεσμα της
εξέτασης;**

Γλώσσα αποτελέσματος!

**Επιλεκτική ανακοίνωση
«σχετικών κλινικά»
αποτελεσμάτων**

**Προοπτικός έλεγχος και feedback
από την επιτροπή διαχείρισης
των αντιμικροβιακών**

**Διαθέσιμη συμβουλευτική σε
πραγματικό χρόνο!**

Για να έχει ένα ταχύ διαγνωστικό τεστ το μέγιστο αποτέλεσμα, οι αποδέκτες του αποτελέσματος πρέπει να ενημερώνονται σε πραγματικό χρόνο όταν αυτό εκδοθεί

Ενεργητική ανάγνωση /ειδοποίηση για το αποτέλεσμα είναι ανώτερη από απλή ανάρτηση του αποτελέσματος σε έναν ηλεκτρονικό ιατρικό φάκελο ή σε ένα ηλεκτρονικό σύστημα υγείας



Ερμηνεία-επεξήγηση του αποτελέσματος από το εργαστήριο


- Η πολυπλοκότητα των διαθέσιμων μοριακών μεθόδων επιβάλλει την ανάγκη επεξηγηματικών για τον κλινικό ιατρό φύλλων αποτελεσμάτων
- Σε πρόσφατη μελέτη σε λοιμωξιολόγους το 67.5% παραδέχθηκε ότι οι νέες μέθοδοι είναι πολύ δύσκολες στην κατανόηση από μη-λοιμωξιολόγους

Blaschke AJ, Diagn Microbiol Infect Dis 2015; 81:57–59.



Ερμηνεία-επεξήγηση του αποτελέσματος από το εργαστήριο

- Η ανακοίνωση μικροοργανισμών σε επίπεδο είδους μπορεί να είναι έξω από το πεδίο της γνώσης του κλινικού ιατρού και να μην τον βοηθά να εντάξει το μικροοργανισμό στο σωστό σενάριο.
- grouping species and using more familiar, clinically relevant nomenclature or providing interpretive decision support!
- Παραδείγματα: *Streptococcus sobrinus* από MALDI-TOF MS
- viridans *Streptococcus* group
- Parechovirus στο ENY: καλύτερα να συνοδεύεται από περιγραφή της κλινικής εικόνας των parechoviruses



Ερμηνεία αποτελέσματος ή επιλεκτική κοινοποίηση;

- Παράδειγμα panel γαστρεντερικού ανιχνεύει *Escherichia coli* sp που αποτελεί ασυμπτωματική φορέα στην πλειονότητα ή *Clostridium difficile* σε παιδιά <1 έτους, όπου επίσης παριστά φορέα
- Επιλεκτική ανακοίνωση αποτελέσματος
 - Όχι πλήρως αποδεκτή ως μέθοδος (it requires full disclosure of the pathogens being reported versus withheld from reporting for the panel)




Προκλήσεις στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων

- Οι μικροοργανισμοί που αναδεικνύονται δεν είναι κατ' ανάγκη παθογόνοι
 - Αποικισμός
 - Ασυμπτωματική λοίμωξη
 - Ενεργοποίηση κατά τη διαδρομή οξείας νόσησης
 - Παρατεταμένη αποβολή μικροοργανισμών μετά από μη σχετιζόμενη προηγούμενη λοίμωξη
- Παράδειγμα:
 - Ανίχνευση εντεροϊού ή ρινοϊού σε αναπνευστικό panel σε δείγμα παιδιού με πυρετό μπορεί να παριστά προηγούμενη λοίμωξη, ασυμπτωματική λοίμωξη ή την αιτία του παρόντος επεισοδίου
 - Τα συνδρομικά panels και η χρήση next-generation sequencing αναμένεται να αυξήσει την αβεβαιότητα αυτή



Απομόνωση πολλαπλών μικροοργανισμών σε ένα δείγμα

- Επιμόλυνση;
- Αποικισμός;
- innocent bystanders;
- Ερμηνεία από τον κλινικό ιατρό ΠΟΛΥ ΔΥΣΚΟΛΗ



Βασικές αρχές αντιμικροβιακής επιμελητείας για την εισαγωγή μια ταχείας μεθόδου στη διαγνωστική των λοιμώξεων

ΕΠΙΜΕΛΗΤΕΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ

**Το σωστό
αντιμικροβιακό**


**Θα κάνει ο κλινικός
ιατρός τις απαραίτητες
αλλαγές με βάση τα
αποτελέσματα που του
κοινοποιήθηκαν;**

**Clinical practice
guidelines**

**Ηλεκτρονική υποστήριξη
με θεραπευτικό
αλγόριθμο μαζί με την
ανακοίνωση του
αποτελέσματος**

Επιτήρηση and feedback

**Διαθέσιμη
συμβουλευτική σε
πραγματικό χρόνο**



Βασικές αρχές αντιμικροβιακής επιμελητείας για την εισαγωγή μια ταχείας μεθόδου στη διαγνωστική των λοιμώξεων

Ο σωστός χρόνος

Θα ανταποκριθεί ο κλινικός σε εύλογο χρονικό διάστημα μετά την ανακοίνωση του αποτελέσματος από το εργαστήριο;

Ανακοίνωση σε ηλεκτρονικό αρχείο


Κοινοποίηση αποτελέσματος σε προσωπικό επίπεδο

Επιτήρηση and feedback

Διαθέσιμη συμβουλευτική σε πραγματικό χρόνο

**Ταχείες μέθοδοι για την
ανίχνευση πολυανθεκτικών
Gram (-) από
αιμοκαλλιέργεια**

Παθογόνο –
Μηχανισμός αντοχής



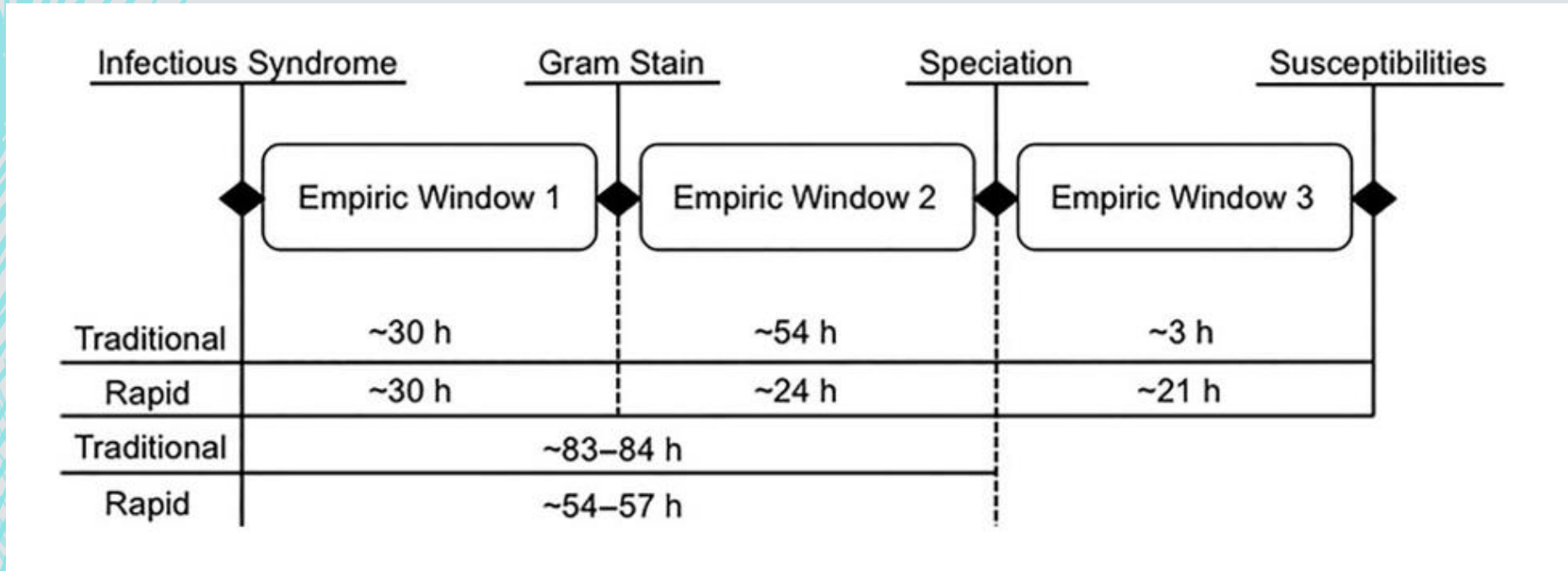
Ερωτήματα κατά την ερμηνεία Τοπικά πρότυπα αντοχής και διαθεσιμότητα των panel

Ask ourselves when interpreting the results of RCT and observational studies and extrapolating them to local diagnosis/treatment protocols.

- (i) is the epidemiology of MDR-GNB in the study population similar to that of my hospital/wards?
- (ii) is the epidemiology of the specific resistance determinants detected by the investigated rapid test/s similar to that of my hospital/wards?

Only a few high-quality studies comprehensively address the baseline epidemiology of MDR, a fact fueling uncertainty about the best test/s to adopt in different local realities

The Opening and Closing of Empiric Windows: The Impact of Rapid Microbiologic Diagnostics



Empiric window 1: the time period between diagnosis of the infectious syndrome/ordering of clinical isolate and availability of Gram stain. Empiric window 2: the time period between Gram stain availability and speciation.

Empiric window 3: the time period between speciation and antimicrobial susceptibility results.

Traditional: the method of diagnosing and empirically treating an infection using standard laboratory diagnostic techniques prior to the implementation of mass spectrometry or polymerase chain reaction (PCR)-based methods. Rapid: the method of diagnosing and empirically treating an infection using rapid microbiologic diagnostic techniques including mass spectrometry and PCR-based method

**Ταχείες μέθοδοι
πολυανθεκτικών Gram-
αρνητικών που
εφαρμόζονται σε θετική
αιμοκαλλιέργεια**

**Μέθοδοι με δημοσιευμένες
τυχαιοποιημένες και μη-
μελέτες**

MALDI/TOF MS

- Laser desorption ionization plus mass spectrometry
- Se \geq 75% Sp \geq 95%
- *Identification* : Most GNB
- *Molecular antibiogram* Usually unavailable outside research laboratories, and needing further clinical evaluation
- *Identification times*
 - 0.5- 2 h if made from bacterial pellets
 - 2-6 h if made after short incubation of positive cultures on a solid medium
 - Longer if made from isolated colonies



MALDI/TOF PERFORMANCE IN RCTS

- In a recent RCT enrolling patients in 2 Vietnamese hospitals with invasive bacterial or fungal infection (mainly BSI, 421/628, 67%, of which 304/421, 72%, caused by GNB, mostly Enterobacterales)
- **MALDI-TOF MS did not improve proportion of optimal antimicrobial therapy within 24- 48 after positivity of cultures vs. conventional methods, overall and in subgroups (including the GNB subgroup)**
- Among Enterobacterales, prevalences of third generation cephalosporin and carbapenem resistance were 48% and 5%, respectively.
- **No subgroup analyses were performed according to antimicrobial resistance.**
- **The study was conducted in absence of AMS interventions**



MALDI/TOF performance in RCTs and non RCTs

- Single-center controlled trial (**not randomized, allocation by weekdays**) in Switzerland, **no differences in duration of intravenous therapy** (primary endpoint) were observed in the MALDI-TOF MS arm vs. conventional processing arm (13 vs. 14 days, p 0.7) in 242 patients with BSI.
- **Rates of admission to ICU (23 vs. 37%, 0.02) and the mean time from Gram-stain to active therapy (3.7 vs. 6.7 h, p 0.003) were reduced in the MALDI-TOF MS arm vs. conventional processing arm.**
- GNB were isolated in 37% of enrolled patients.
- **The trial was conducted in a background of very rare prevalence of MDR in GNB (< 5 episodes of MDR infection/year).**



Θετικές μελέτες με συνδρομή Antimicrobial Stewardship: MALDI/TOF και *Acinetobacter baumannii*

- Wenzler and colleagues compared a pre-intervention phase (identification through conventional methods and no AMS interventions) with an intervention phase (identification through MALDI-TOF plus an AMS intervention) for the treatment of *A. baumannii* infections (BSI and pneumonia) in a setting with >60% prevalence of MDR [1].
- They observed an important reduction in the median time to adequate therapy (from 77.7 to 36.6 hours, $p < 0.001$) arguing that **MALDI-TOF plus AMS were able to improve rates of adequate early treatment of severe MDR-GNB infections by anticipating identification** [1]
- Other experiences testify to the effect of MALDI-TOF plus AMS interventions in reducing time to adequate therapy, as well as in **decreasing hospital length of stay and costs** [2]



MALDI/TOF and resistance mechanisms

- Promising evidence that MALDI-TOF could be of help for rapidly recognizing the presence of resistant organisms by detection of drug modification or spectra related to the presence of specific resistant mechanisms (e.g., ESBL or KPC enzymes in MDR-GNB)
- **Further development and clinical studies evaluating** these strategies are necessary to explore their impact on therapeutic choices and patients' outcomes as well as infection control issues

Figuroa-Espinosa R, J Microbiol Methods 2019; 159: 120-7.

Gaibani P, J Clin Microbiol 2016; 54(10): 2609-13.

Rodriguez-Sanchez B, Euro Surveill 2019; 24(4).

FilmArray BCID

- 
- NAAT/microarrays
 - Se >90% Sp 100%
 - *Identification*
 - *E. coli*
 - *K. pneumoniae*
 - *P. aeruginosa*
 - *A. baumannii*
 - Other GNB
 - *Molecular antibiogram*
 - KPC
 - *Identification time*
 - 1 h
 - *Molecular antibiogram*
 - 1 h



FilmArray RCTs and other studies


- In an RCT, 617 patients with BSI (of which 33% due to GNB) were randomized in 3 arms: (i) standard processing; (ii) FilmArrayBCID®; (iii) FilmArray BCID® plus AMS.
- The primary endpoint was duration of selected antimicrobial therapies
- **Duration of piperacillin-tazobactam therapy was lower in the FilmArray BCID® and FilmArray BCID® plus AMS arms than in the standard processing arm**
- **The study was conducted in a setting with low prevalence of MDR organisms. No KPC production was reported.**
- In non-randomized, before-after studies, **reductions in time to effective therapy and time to de-escalation** were observed after the implementation of the FilmArray BCID® assay in samples including either only GNB BSI or both GPB and GNB BSI

*Bookstaver PB, Antimicrob Agents Chemother 2017; 61(9).
Banerjee R, Clin Infect Dis 2015; 61(7):1071-80.*

*Buss BA, Open Forum Infect Dis 2018; 5(10): ofy258.
Messacar K, J Pediatric Infect Dis Soc 2017; 6(3): 267-74.*

Ταχείες μέθοδοι που εφαρμόζονται σε ολικό αίμα

Χαμηλότερη ευαισθησία και
ειδικότητα από τις προηγούμενες
μεθόδους



Θετικό αποτέλεσμα μοριακής μεθόδου χωρίς θετική αιμοκαλλιέργεια

Ερωτηματικά:

- Ζωντανός οργανισμός ή DNA ήδη θανατωμένου μικροοργανισμού;
- Πόσο μπορεί να διαρκεί αυτό;
- Κλινικά σημαντική βακτηριαιμία ή όχι;
- Βακτηριακή αλλόθεση μικρότερης σημασίας;;;
- Πηγή βακτηριαιμίας;;;
- Απαιτούμενη διάρκεια θεραπείας;

**Μέθοδοι με δημοσιευμένες
τυχαιοποιημένες και μη-
μελέτες**



SEPTIFAST

- LightCycler SeptiFast ; NAAT
- Se 50-75% Sp 86-92%
- *Identification*
 - *E. coli*
 - *K. pneumoniae*
 - *P. aeruginosa*
 - *A. baumannii*
 - Other GNB
- *Identification time*
 - 4-5 h

SEPTIFAST in RCTs and other studies

- In a recent, single-center RCT in 200 patients with sepsis comparing the use of the LightCycler SeptiFast® vs conventional cultures, **no difference was observed in antimicrobial consumption** (primary endpoint) [1]
- **In the subgroup of patients with microbiological diagnosis** in both arms (44, of which 68% were GNB) **a reduction in antimicrobial consumption** was observed in the SeptiFast® arm
- Statistically significant reductions were also observed in the **time to de-escalation** (8 vs. 54 h) and in the **duration of antimicrobial therapy** (12 vs. 15 days), but **not in mortality**
- Antimicrobial costs were reduced for **anti-GPB** but **not for anti-GNB** agents.
- **The trial was conducted in a setting of high prevalence of MDR**
- In a multicenter, cluster-randomized, crossover trial, appropriate antimicrobial treatment in patients with severe infections (mostly severe sepsis) and microbiological diagnosis (n = 478) was similar in the intervention (SeptiFast®,) and the control (conventional cultures) periods (92% vs. 91%) [2].
- **GNB were 14% of identified pathogens.** No information on resistance prevalence in GNB was provided.
- Overall, SeptiFast® **increased the number of septic patients with microbial diagnosis.**

1. Rodrigues C, et al. The effect of a rapid molecular blood test on the use of antibiotics for nosocomial sepsis: a randomized clinical trial. *J Intensive Care* 2019; 7: 37.

2. Cambau E et al, the EVAMICA open-label, cluster-randomised, interventional crossover trial. *Intensive Care Med* 2017; 43(11): 1613-25.

Θετικό αποτέλεσμα με δύο μικροοργανισμούς και δυο διαφορετικά markers αντοχής

T2 Resistance panel NAAT/T2MR

Se NA

Sp NA

Molecular antibiogram

- KPC
- OXA-48
- NDM
- VIM
- IMP
- CTX-M-14
- CTX-M-15
- CMY
- DHA

- Ποια η κλινική σημασία τους;
- Όλοι παθογόνοι ή κάποιο είναι αποικιστές;
- Αιμοληψίες ληφθείσες δια μέσου κεντρικών γραμμών;
- Σε ποιον από τους μικροοργανισμούς αναφέρονται οι μηχανισμοί αντοχής;
- Ποιες θεραπευτικές επιλογές θα καλύψουν και τους δύο μηχανισμούς αντοχής;
- Κι αν κάποιος είναι «φυσικός» μηχανισμός σε ένα από τα παθογόνα;
- Ανίχνευση ενός μηχανισμού αντοχής είναι ποιοτική και όχι ποσοτική έκφραση και δεν ισοδυναμεί με κλινική έκφραση αντοχής (δεν είναι MIC! Μεγάλη δόση αντιβιοτικού δυνατόν να είναι δραστική)
- Πολύ λίγες κλινικές μελέτες

**Ερμηνεία των νέων
διαγνωστικών εξετάσεων σε
λοιμώξεις του
αναπνευστικού**

**Ιοί – Μικρόβια
Μηχανισμοί αντοχής**



Run Summary

Sample ID: 14725

Detected: None

Equivocal: None

Run Date: 06 Feb 2015 7:46 AM

Controls: Passed

Result Details

Result	Interpretation	Call	Assay
Not Detected	Adenovirus	Negative	Adeno
		Negative	Adeno2
Not Detected	Coronavirus 229E	Negative	CoV-229E
Not Detected	Coronavirus HKU1	Negative	CoV-HKU1
Not Detected	Coronavirus NL63	Negative	CoV-NL63
Not Detected	Coronavirus OC43	Negative	CoV-OC43
Not Detected	Human Metapneumovirus	Negative	hMPV
Not Detected	Human Rhinovirus/Enterovirus	Negative	Entero1
		Negative	Entero2
		Negative	HRV1
		Negative	HRV2
		Negative	HRV3
		Negative	HRV4
Not Detected	Influenza A	Negative	FluA-H1-2009
		Negative	FluA-H1-pan
		Negative	FluA-H3
		Negative	FluA-pan1
		Negative	FluA-pan2
Not Detected	Influenza B	Negative	FluB
Not Detected	Parainfluenza Virus 1	Negative	PIV1
Not Detected	Parainfluenza Virus 2	Negative	PIV2
Not Detected	Parainfluenza Virus 3	Negative	PIV3
Not Detected	Parainfluenza Virus 4	Negative	PIV4
Not Detected	Respiratory Syncytial Virus	Negative	RSV
Not Detected	<i>Bordetella pertussis</i>	Negative	Bper
Not Detected	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Negative	Cpne
Not Detected	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Negative	Mpne
Result	Control	Call	Assay
Pass	PCR2 Control	Positive	PCR2
Pass	RNA Process Control	Positive	yeastRNA

Πρακτικές αρχές στη μοριακή διαγνωστική των αναπνευστικών ιών


- **Επεισόδιο λοίμωξης και διάρκεια αποβολής του ιού *shedding***
 - The detection frequency for enveloped respiratory viruses decreased from more than 51 to 30% for sampling on days 0-6 versus 7-14 from symptom onset
 - Some respiratory viruses, such as bocaviruses, may be shed for several months
- **Ποια η σημασία ενός θετικού *test*;**
 - An obvious risk with a sensitive assay is that a positive result may reflect a clinically irrelevant carriership rather than a symptomatic infection
 - Immunocompromised individuals may shed detectable amounts of respiratory viruses

ΠΟΣΟΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ
(real-time
PCR) πιθανόν μπορούν
να διακρίνουν ένα
αποικιστή από ένα
παθογόνο
μικροοργανισμό

Σωστή λήψη δείγματος: είναι εύκολη;

- **Δύσκολο να ληφθούν δείγματα χωρίς επιμόλυνση από το ανώτερο αναπνευστικό και τη χλωρίδα του**
- **Ενδοτραχειακές αναρροφήσεις δεν αποφεύγουν το πρόβλημα**
- **BALs και προστατευμένα ψήκτρα προκρίνονται ως καλύτερες**

Πως θα αξιοποιηθούν τα αποτελέσματα της PCR στην κλινική πράξη;



Σωστός διαχωρισμός των ασθενών

- Οι «νοσοκομειακές» ιογενείς λοιμώξεις αποτελούν τεράστιο κίνδυνο για ευπαθείς ασθενείς: νεογνά, ανοσοκατεσταλμένους
- Έγκαιρη αναγνώριση του αιτίου επιτρέπει απομόνωση ή συν-νοσηλεία (cohorting/isolation)
- Συν-νοσηλεία χωρίς τεκμηρίωση του αιτίου (με συνδρομική προσέγγιση μόνο) είναι **ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΗ** να τους εκθέσει σε νέες ιογενείς λοιμώξεις
- **Virus-specific cohorting!**

Μεταμοσχευμένοι ασθενείς

- Απαραίτητη η ανίχνευση ιογενών παθογόνων σε αυτό των πληθυσμό
- Πέραν των κοινών το πάνελ πρέπει να ανιχνεύει cytomegalovirus, Epstein Barr virus, human herpesvirus type 6, and herpes simplex virus
- Highly sensitive multiplex platforms!

Πως ερμηνεύεται η παρουσία
συγκεκριμένων ιογενών παθογόνων;

A decorative graphic consisting of several horizontal lines of varying lengths and colors (teal and white) extending across the width of the slide.

Ποιος είναι ο ρόλος των αναπνευστικών ιών στη σοβαρή πνευμονία;

Οι αναπνευστικοί ιοί αποτελούν σημαντικό αίτιο σοβαρής πνευμονίας και αναπνευστικής ανεπάρκειας σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, ιδίως μεταμοσχευμένους μυελού/αιμοποιητικών κυττάρων

Ison MG, Am J Transplant. 2009;9 (Suppl 4):S166-72
Kim YJ, Semin Respir Crit Care Med. 2007;28:222-42.

Ποιος είναι ο ρόλος των αναπνευστικών ιών στην πνευμονία της κοινότητας;
(και πως ερμηνεύουμε μια θετική μοριακή δοκιμασία;)

- Μπορεί να είναι το μοναδικό αίτιο της πνευμονίας (πρωτοπαθής ιογενής πνευμονία/primary viral pneumonia),
- Μπορεί να παριστούν συλλοίμωξη (virus- bacteria ή virus-virus),
- Μπορεί να δημιουργήσαν την προδιάθεση για την εμφάνιση ή την επιδείνωση της βακτηριακής πνευμονίας
- Απομόνωση μερικών κοινών ιών του ΑΝΩΤΕΡΟΥ αναπνευστικού δυνατόν να παριστά ασυμπτωματική λοίμωξη ή αποβολή ιού στα πλαίσια ανάρρωσης

Pavia A, Infect Dis Clin North Am 2013

Viruses associated with pneumonia

Common

Respiratory syncytial virus (RSV)

Influenza virus A and B

Human metapneumovirus*

Adenovirus

Parainfluenza virus 1, 2, 3, and 4*

Human Coronavirus types 229e, OC43, HKU1*, NL-63*

Rhinovirus*

Bocavirus*

Less common or predominantly in specific hosts or settings

Measles

Cytomegalovirus

Varicella zoster virus

Herpes simplex virus

Epstein Barr virus

Hantavirus


Enterovirus

Parechovirus*

SARS coronavirus, **Other coronaviruses (COVID-19, MERS-CoV)**

- *Recently described and/or of unknown significance*

Η επιδημιολογία της πνευμονίας της κοινότητας με τη σύγχρονη ματιά της μοριακής τεχνολογίας



Etiology of community acquired pneumonia in hospitalized adults and role of viruses in 6 recent studies

	Charles (N = 885)	Johansson (N = 184)	Johnstone (N = 193)	Lieberman (N = 183)	Jennings (N = 225)	Templeton (N = 105)
Age	Not stated	Mean 63	Median 71	Mean 60	Median 70	Median 60
Any pathogen	46%	67%	39%	Not stated	58%	76%
Any bacteria	38%	58%	20%	Not stated	48%	46%
Any virus	15%	29%	15%	32%	34%	54%
Co-infection	9%	23%	4%	Not stated	30%	27%
RSV	2%	4%	3%	7%	4%	3%
Influenza virus	8%	8%	4%	4%	12%	10%
hMPV	NS	2%	4%	1%	0	0
Adenovirus	<1%	2%	1%	2%	4%	4%
Parainfluenza virus	<1%	4%	2%	0	1%	8%
Rhinovirus/ enterovirus ^a	5%	7%	2%	5%	13%	17%
Coronavirus	NS	2%	2%	13%	2%	13%

Etiology of community acquired pneumonia in hospitalized adults and role of viruses in 6 recent studies

- At least one virus was detected in 15-54%.
- In the 5 studies that reported bacterial etiologies, bacterial pathogens were detected in 20-58% and co-infection was detected in 4-30%.
- Viral infections are generally a more prominent cause of CAP among older adults

Ποιος είναι ο ρόλος των μεικτών λοιμώξεων στην πνευμονία της κοινότητας;

- Τεκμηριωμένη η αλληλεπίδραση μεταξύ γρίπης, *S. pneumoniae* και *S. aureus* και αποδεδειγμένη η αύξηση της θνητότητας στη συλλοίμωξη
- Παρόμοια μπορεί να είναι η αλληλεπίδραση και με RSV, hMPV και ενδεχομένως rhinovirus και parainfluenza virus

Πως θα προσδιορίσουμε αν η απομόνωση ενός ιού από τους αεραγωγούς είναι το αίτιο που προκαλεί την πνευμονία;

- Κοινό πρόβλημα στις προοπτικές μελέτες
- Πιο μεγάλο πρόβλημα η ερμηνεία απομόνωσης ρινοϊών και κορονοϊών που μπορεί να ανιχνεύονται σε ποσοστά 2-45% και 0-6% αντίστοιχα, σε ασυμπτωματικούς
- Μικρότερη αμφιβολία επί απομόνωσης influenza και hMPV, οι οποίοι σπανίως απομονώνονται σε απουσία συμπτωμάτων
- Κάποιες μελέτες έδειξαν υψηλά ιικά φορτία σε πνευμονία, άρα οι ποσοτικές μέθοδοι δυνατόν να βοηθήσουν περισσότερο

Αναπνευστικός συγκυτιακός ιός

Respiratory Syncytial virus

- Paramyxovirus that causes URI, bronchiolitis and CAP in children (3 to 31% of children hospitalized with CAP)
- The incidence and severity varies with age; mostly affects younger children
 - Studies in the mid 1990's demonstrated that RSV affects also adults(4-7% of adults with CAP)
- RSV-associated CAP more common and severe among older adults
 - during the 1990s, RSV was associated with an average of more than than 11,000 deaths each year in the United States, the majority of these deaths in persons over 65

Falsey JR, J Infect Dis 1995
Dowell SF, J Infect Dis 1996
Jennings LC, Thorax 2008

Thomson WW JAMA 2005
Falsey JR, NEJM 2005
Johansson N Clin Infect Dis 2010

Recognition of true co-infections



First influenza season after the 2009 pandemic influenza: characteristics of intensive care unit admissions in adults and children in Vall d'Hebron Hospital

Clin Microbiol Infect 2011

G. Poulakou^{1,2}, J. Souto¹, J. Balcells³, M. Pérez¹, C. Laborda¹, O. Roca^{1,4}, T. Tórtola⁵, M. Pujol³, M. Palomar^{1,6} and J. Rello^{1,4,6,7}

Two commercial multiplex RT-PCR were used subsequently: ProFlu plus (ProFlu+, Prodesse, Inc. Gen-Probe, Waukesha, WI, USA), which detects influenza A virus, influenza B virus and respiratory syncytial virus (RSV), and ProFlu influenza A subtyping (ProFlu-ST, Prodesse, Inc. Gen-Probe), which detects seasonal H1, seasonal H3 and new H1 variant subtypes of the influenza A virus

Evolution of clinical picture during the 1st post pandemic year

- Influenza A (H1N1) 2009 and RSV epidemics peaked simultaneously, affecting a vulnerable population
- Primary viral pneumonia still predominated among ICU admissions for influenza, whereas cases of severe acute respiratory infection without chest X-ray opacities increased
- Clinical presentation as severe bronchiolitis and co-infection with RSV in 42.8% of children <2 years of age in the September 2010-January 2011 season was an observation reported for the first time
- Such coexistence could not be demonstrated in adults

Advancing our understanding of respiratory syndromes with multiplex PCR

The Influenza model with other viral co-infections

- **Bacterial co-infections doubled (21.7% vs 10%, $p > 0.20$) and the total rate of co-infections (either viral or bacterial) increased almost four-fold (39.1% vs 10%, OR 5.8, 95% CI 1.3-24.8, $p 0.01$) during September 2010-January 2011**

Therapeutic implications of a “positive” multiplex PCR beyond influenza

- Limited therapeutic options for the treatment of other viruses
- Ribavirin has broad antiviral activity in vitro that includes RSV, hMPV, parainfluenza virus and influenza
- Inhaled ribavirin for RSV
 - limited benefits among severely immunocompromised patients
 - Among other populations, the benefits are questionable and the costs and risks limit the use of inhaled ribavirin
- Intravenous ribavirin may have a potential role for overwhelming viral pneumonia in severely immunocompromised patients

Boeckh M, Clin Infect Dis. 2007

Ventre K, Cochrane Database Syst Rev. 2007

Therapeutic implications of a “positive” multiplex PCR beyond influenza

- **Palivizumab, a monoclonal antibody directed against the fusion glycoprotein of RSV is recommended for the prevention of RSV hospitalization in specific subgroups of premature infants and infants with some types of congenital heart disease or chronic lung disease**

Therapeutic implications of a “positive” multiplex PCR beyond influenza

- Cidofovir has potent activity against adenovirus and case reports suggest clinical benefit in immunocompromised patients
- It should be considered for patients with overwhelming adenovirus pneumonia including adenovirus type 14
- Because of the toxicity and difficulty with administration, cidofovir is not appropriate for CAP in immunocompetent hosts

Doan ML, J Heart Lung Transplant. 2007

Darr S, Clin Infect Dis. 2008

Toth K, Proc Natl Acad Sci U S A. 2008

Therapeutic implications of a “positive” multiplex PCR beyond influenza

- Pleconaril is active against picornaviruses including rhinovirus (inhibits viral uncoating)
 - A clinical trial showed reduction in the duration of symptoms for naturally occurring colds
- Most pools of intravenous immunoglobulin (IVIG) have significant titers of antibody, including neutralizing antibody against common respiratory viruses
 - IVIG should be considered for hypogammaglobulinemic and severely immunocompromised patients with viral pneumonia

Hayden FG Clin Infect Dis 2003

Pavia A, Infect Dis Clin North Am 2013

Human metapneumovirus(hMPV)

- hMPV is a paramyxovirus in the sub-family pneumovirinae (as RSV)
- First described by Dutch researchers first described in 2001 in children with bronchiolitis
- An important cause of acute respiratory infections in children and adults, with a worldwide distribution and **a wide array of manifestations from asymptomatic infections to respiratory failure**
- **Pneumonia is most commonly seen among younger children, older adults, and those with underlying medical conditions**
- In prospective studies of adults hospitalized in US incidence of hospitalization for hMPV among persons >65 years old was 220/100,000 compared to 254/100,000 and 123/100,000 for RSV and influenza virus respectively

Williams JV, NEJM 2004

Widmer J, J Infect Dis 2012

Walsh EE Arch Intern Med 2008

Schildgen V, Clin Microbiol Rev 2011

Bocavirus

- Human bocavirus is a recently described parvovirus that has been frequently detected in respiratory secretions of children with respiratory tract infection
- **Its role in CAP remains unclear**
- **Interpretation is complicated by common detection in asymptomatic children and prolonged detection after infection**
- At least 2 studies showed that isolation of bocavirus alone was more common in ill children than in control subjects
- Most bocavirus-infected children had a co-infection, but viral loads were higher in the mono-infected children.
- Bocavirus loads were significantly higher in patients with only bocavirus than in those with coinfection

Non-SARS Coronaviruses

- Human coronaviruses (HCoV) 229E and OC43 have been long recognized as causes of viral URI and were linked to pneumonia in children and immunocompromised adults
- Two novel human coronaviruses, NL63 and HKU1 were identified in the past decade. All four human coronaviruses show distinct winter seasonality and affect all age groups
- **An etiologic role in hospitalized CAP was demonstrated in a prospective study from Scotland but not in another from Thailand**
- **In a prospective study of patients with severe pneumonia undergoing bronchoalveolar lavage about half of whom were transplant recipients, coronaviruses were detected in 5.8%**
- **The role of coronaviruses in pneumonia has not been completely clarified**

Rhinoviruses

- Μελέτες που χρησιμοποιούν μοριακές μεθόδους ανιχνεύουν συχνά ρινοϊούς από ρινοφαρυγγικά ή φαρυγγικά δείγματα παιδιών και ενηλίκων με λοιμώξεις κατώτερου αναπνευστικού
- Επίσης έχουν ταυτοποιηθεί σε ποσοστό 4-45% παιδιών και 2-17% ενηλίκων με πνευμονία της κοινότητας

*Louie JK, Ped Infect Dis J 2009
Falsey AR J Infect Dis 2002
Charles PG, Clin Infect Dis 2008
Johnstone J, Chest 2008*

*Cevey Macherel M, Eur J Ped 2009
Tsolia MN Clin Infect Dis 2004
Templeton KE Clin Infect Dis 2005
Lieberman D, Chest 2010*

Rhinoviruses: και αιτιολογική συσχέτιση με την CAP?

- Δύσκολο να αποδειχθεί
- Συχνά ανιχνεύονται μαζί με άλλους ιούς ή βακτήρια
- Σε ασυμπτωματικούς ίσως παριστά καθυστερημένη κάθαρση προηγούμενης λοίμωξης ή ασυμπτωματική λοίμωξη
- Συνήθως η αποβολή ιού δεν ξεπερνά τις 2-3 εβδομάδες από τη λοίμωξη

Rhinoviruses και SARI

- Recent studies have demonstrated an emerging role of rhinoviruses in SARI (and CAP)
- Are higher viral loads in the nasopharynx better predictors of lower respiratory tract infection and rhinovirus pneumonia?
- Does co-infection with rhinovirus facilitate infection with a second viral or bacterial pathogen and does rhinovirus co-infection increase the severity?

Severe CAP or HCAP

- This study demonstrated that viral infection is common in adult patients with severe pneumonia.
- About one-third of patients with severe CAP or HCAP had viral infections, and the mortality from viral infection and bacterial infection were comparable.

Rhinoviruses as stand-alone cause of SARI

TABLE E3. THE NUMBER OF VIRUS TEST-POSITIVE SPECIMENS FOR EACH VIRAL PATHOGEN*

Virus	Total (n=72)	BAL fluid only (n=25)	Both BAL fluid and nasopharyngeal specimen (n=15)	Nasopharyngeal specimen only (n=32)
Rhinovirus	17 (23.6)	8	5	4
Parainfluenza virus	15 (20.8)	5	2	8
Type 3	8 (11.1)	1	1	6
Type 1	5 (6.9)	2	1	2
Type 2	1 (1.4)	1	0	0
Type 4	1 (1.4)	1	0	0
Human metapneumovirus	13 (18.1)	0	3	10
Influenza virus	12 (16.7)	3	5	4
Influenza A	11 (15.3)	4	3	4
Influenza B	1 (1.4)	0	1	0
Respiratory syncytial virus	10 (13.9)	5	1	4
Respiratory syncytial virus A	4 (5.6)	2	0	2
Respiratory syncytial virus B	6 (8.3)	3	1	2
Cytomegalovirus	8 (11.1)	8	0	0
Human coronavirus-OC43	4 (5.6)	1	0	3
Adenovirus	1 (1.4)	1	0	0
Enterovirus	1 (1.4)	0	0	1

Data are presented as the number (percentage) of patients.

*Two viruses were identified in 0 patients.

Rhinoviruses as stand-alone cause of SARI

- Among 17 patients with rhinovirus infection, 13 samples (76.5%) were isolated from bronchoscopic BAL fluid
- Ten patients (58.8%) had rhinovirus as the only identified pathogen, five (29.4%) had coinfection with other viruses, and two (11.8%) had coinfection with bacteria.
- These results suggest that rhinovirus should be considered as an independent cause of severe pneumonia
- Furthermore, among the respiratory viruses, rhinovirus infection was associated with the highest mortality (52.9%, 9 of 17).
- Of the 17 patients with rhinovirus infection, the majority of those patients had a severe underlying disease or condition



New molecular semi-quantification tool provides reliable microbiological evidence for pulmonary infection

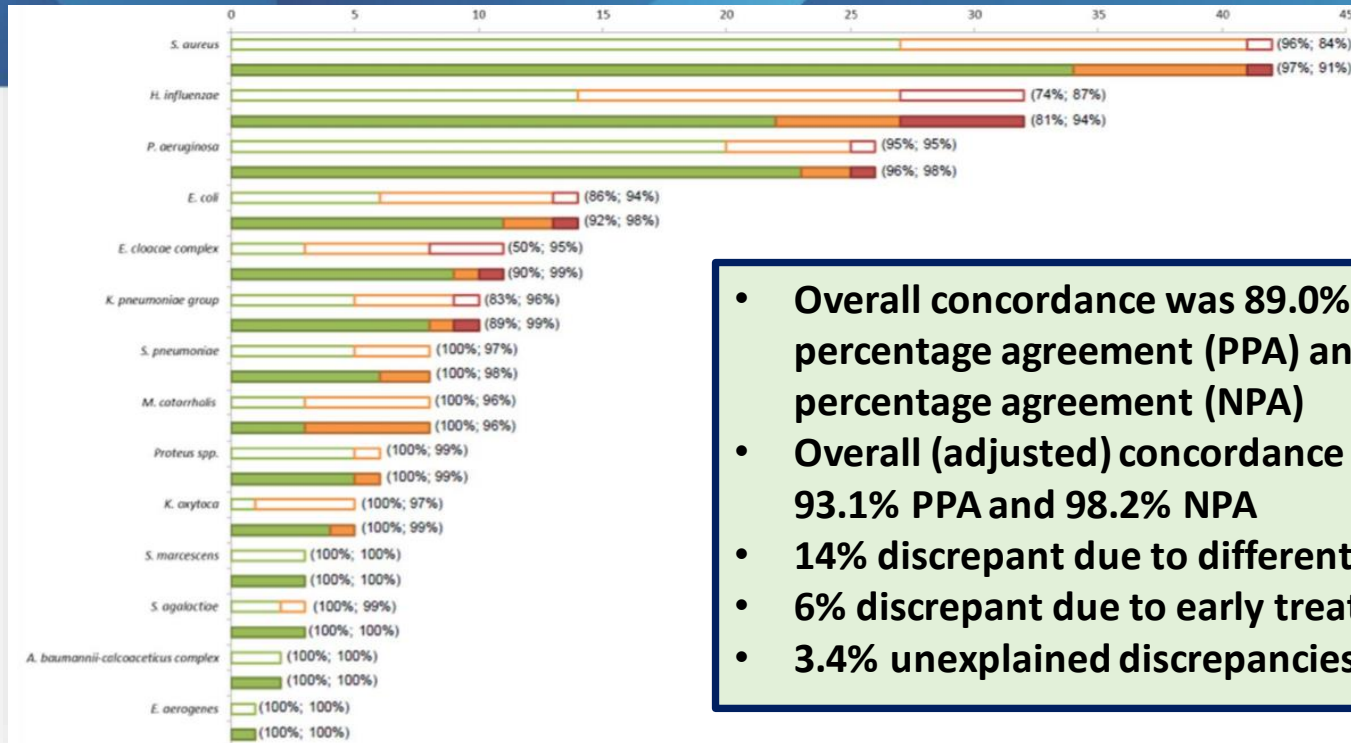
Intensive Care Med (2018) 44:2302–2304

Javier Yugueros-Marcos^{1,2}, Olivier Barraud³, Alexandra Iannello¹, Marie Cécile Ploy³, Christine Ginocchio^{4,5}, Margarita Rogatcheva⁴, Cristina Alberti-Segui², Alexandre Pachot¹, Virginie Moucadel¹, Bruno François^{3,6,7*}  and For the VALIBI study group

- **First (multicentered, non-randomized) study comparing concordance of a multiplexed molecular method with conventional culture, based on the use of specific semi-quantitative thresholds for positivity calls**
- **120 patients with suspected VAP- Bronchoalveolar lavage (BAL) specimens**
- **BioFire[®] Pneumonia Panel (BPP) can detect 18 bacteria, 8 viruses, and 7 antimicrobial resistance-associated genes in 1 h**
- **Clinicians were left blinded to the rapid test results**

Results

Main message: A new era opens for rapid reliable microbiological results and resistance information



- Overall concordance was 89.0% positive percentage agreement (PPA) and 95.9% negative percentage agreement (NPA)
- Overall (adjusted) concordance increased to 93.1% PPA and 98.2% NPA
- 14% discrepant due to different thresholds
- 6% discrepant due to early treatment
- 3.4% unexplained discrepancies

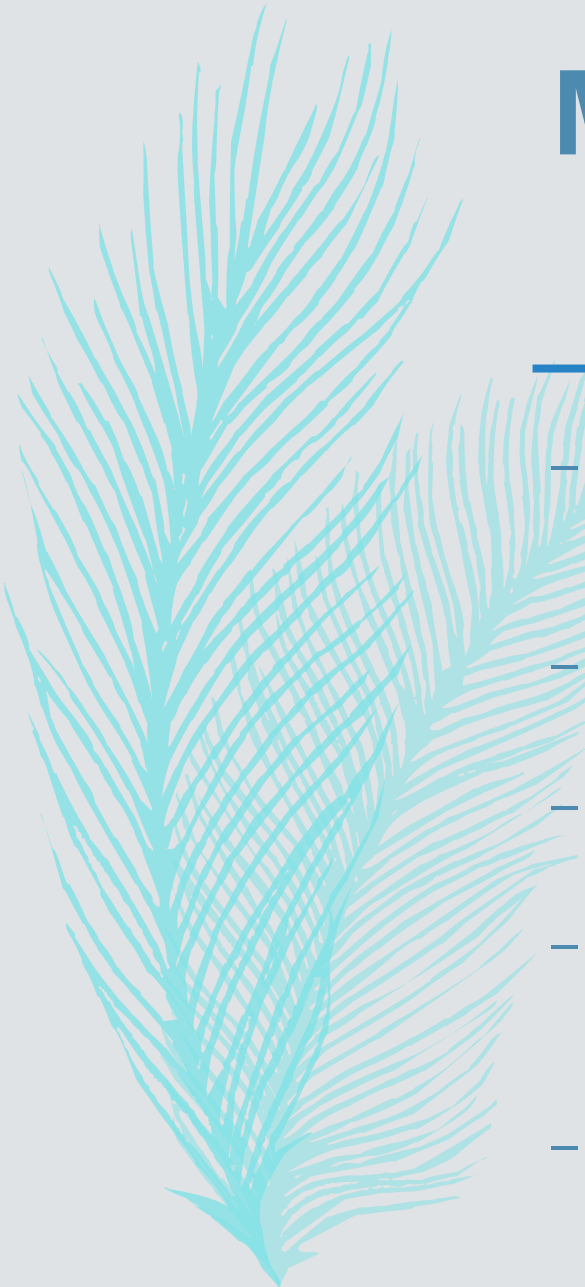
If the molecular method was used to choose initial therapy, in 29.1% patients, initial antimicrobial treatment should have been larger, and in 16.7% patients, initial antimicrobial therapy could have been more targeted

Συμπεράσματα- μοριακές μέθοδοι και αναπνευστικό

- Δεν αρκεί να αναγνωρίσουμε κάποια παθογόνα στα δείγματα των λοιμώξεων του αναπνευστικού: πρέπει να μπορέσουμε να τα συσχετίσουμε με την κλινική εικόνα και την επιδημιολογία
- Ευχέρεια διάγνωσης ιών με σαφή πρότυπα στο κατώτερο αναπνευστικό
- Αναγνώριση νέων ιών που αποτελούν ταυτόχρονα και νέους φαρμακευτικούς στόχους
- Χρειαζόμαστε χρόνο και μελέτες για να αποσαφηνίσουμε τη σημασία των συλλοιμώξεων
- Χρειαζόμαστε νέες μελέτες για την διαγνωστική μικροβιακών λοιμώξεων του αναπνευστικού σε βαρέως πάσχοντες-τα δεδομένα ως τώρα υποσχόμενα

Μελλοντικοί τομείς ανάπτυξης

- Η τεχνολογία αυτή τη στιγμή δεν μπορεί- ίσως και στο μέλλον να μην μπορέσει, αλλά ο στόχος είναι τεράστιος: αξιόπιστος αποκλεισμός της λοίμωξης
- Αντί να αναζητείται η παρουσία μικροοργανισμού/λοίμωξης, να αποδεικνύεται η απάντηση του ξενιστή
- Να βελτιωθεί η ικανότητα των νέων μεθόδων να απαντούν στο ερώτημα «τι θα θεραπεύσει το ασθενή»
- Η διάγνωση και έγκαιρη αναγνώριση των ανθεκτικών Gram-αρνητικών παθογόνων έχει τεθεί πολύ ψηλά στη λίστα των προτεραιοτήτων ως *important unmet need*
- ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ



ΣΑΣ ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ ΠΟΛΥ

