

**ΠΜΣ «ΛΟΙΜΩΞΙΟΛΟΓΙΑ»**  
**Μαθήματα Β' Εξαμήνου**

Ερμηνεία των  
μοριακών  
διαγνωστικών  
εξετάσεων από  
τον κλινικό Ιατρό


---

Γαρυφαλλιά Πουλάκου

Επίκουρη Καθηγήτρια

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”**

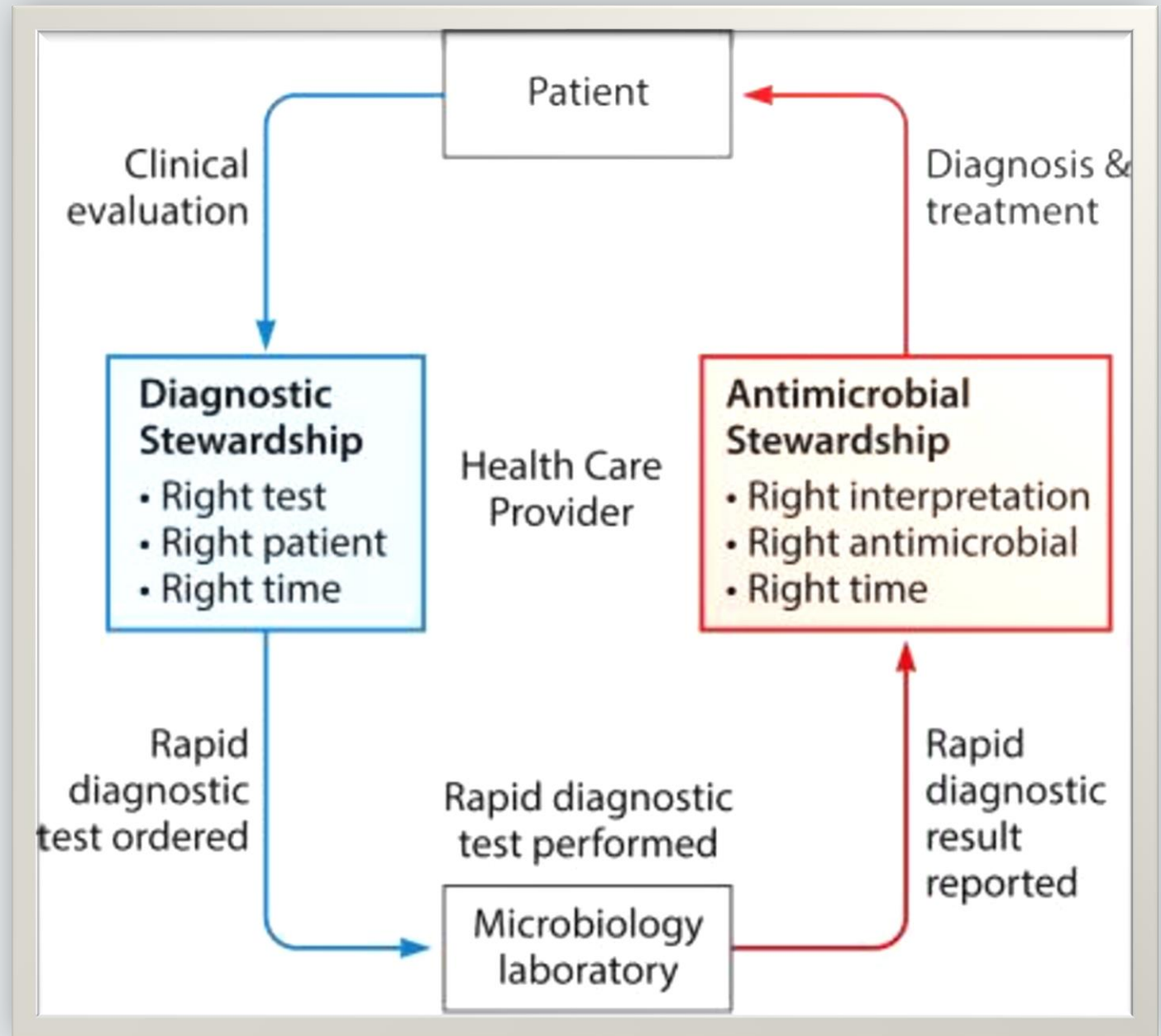
“....το σημερινό μικροβιολογικό εργαστήριο κατακλύζεται από τεράστιο όγκο ακαδημαϊκής πληροφορίας και πιέζεται για τη διενέργεια τεράστιας γκάμας εξετάσεων, που κινδυνεύουν να καθοδηγούν λανθασμένα τον κλινικό ιατρό ενώ εκτοξεύουν το κόστος”

# 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)

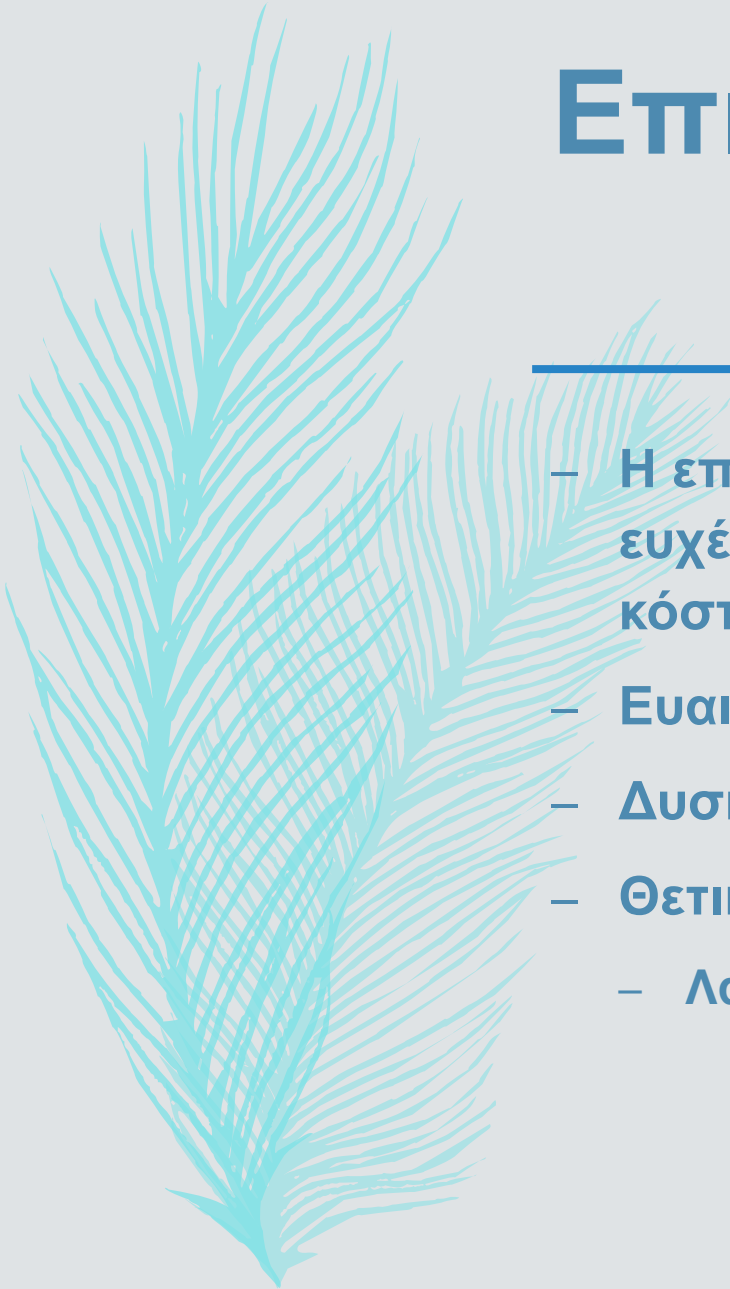
---

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 επιπροσθέτως
- 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




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

---

Μια υπεραπλουστευμένη προσέγγιση:

- Αξιολόγηση του διαγράμματος παρακολούθησης του ασθενούς
- Τι αλλαγές στη θεραπευτική 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 ακυκλοβίρη 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**

**Ηλεκτρονική- αλγοριθμική υποστήριξη της παραγγελίας προς το εργαστήριο**

**Θέσπιση κριτηρίων για τη χρήση ορισμένων εξετάσεων**

**Προέγκριση από λοιμωξιολόγο εφόσον δεν πληρούνται τα θεσπισμένα κριτήρια**

**Benchmarking**

**Απόρριψη «λανθασμένων» ή μη αποδεκτών δειγμάτων**



# 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



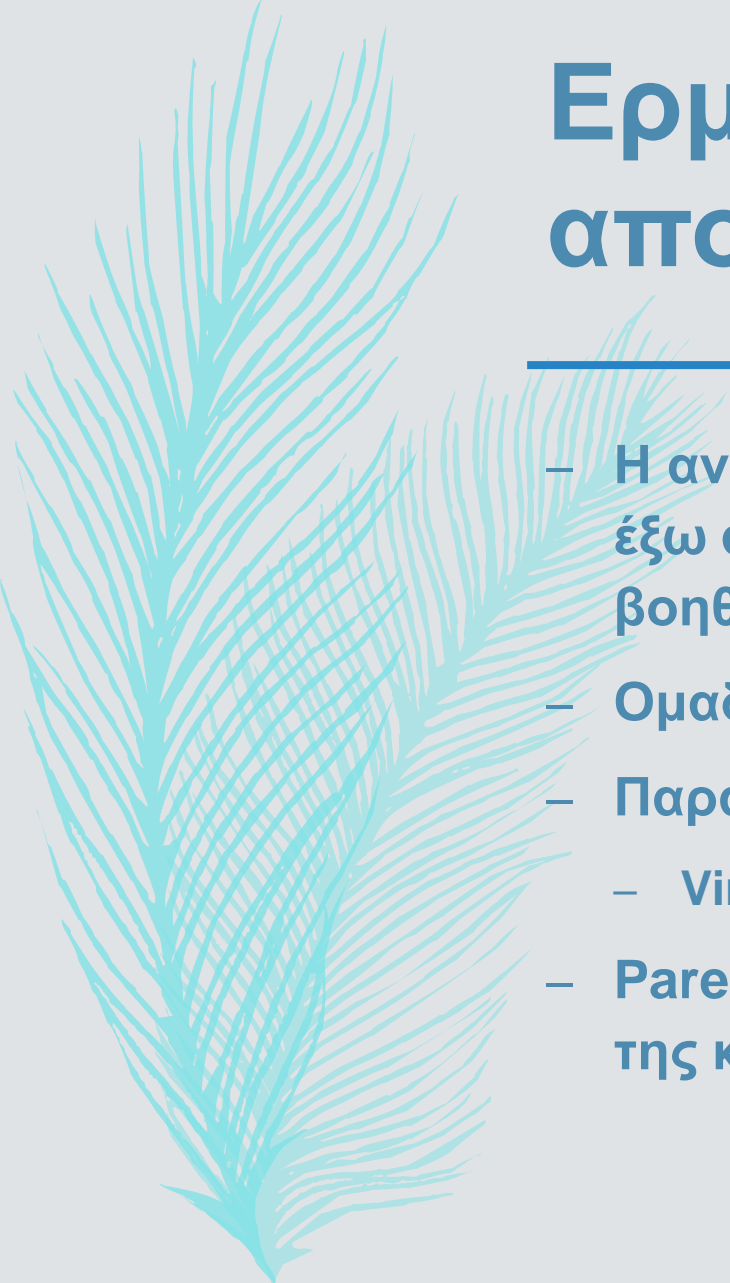


# Ερμηνεία-επεξήγηση του αποτελέσματος από το εργαστήριο

---

- 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.
- Ομαδοποίηση των species ή παροχή ερμηνευτικών σχολίων!
- 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 (πρέπει να δηλώνει ποια παθογόνα κοινοποιούνται και ποια όχι)



# 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

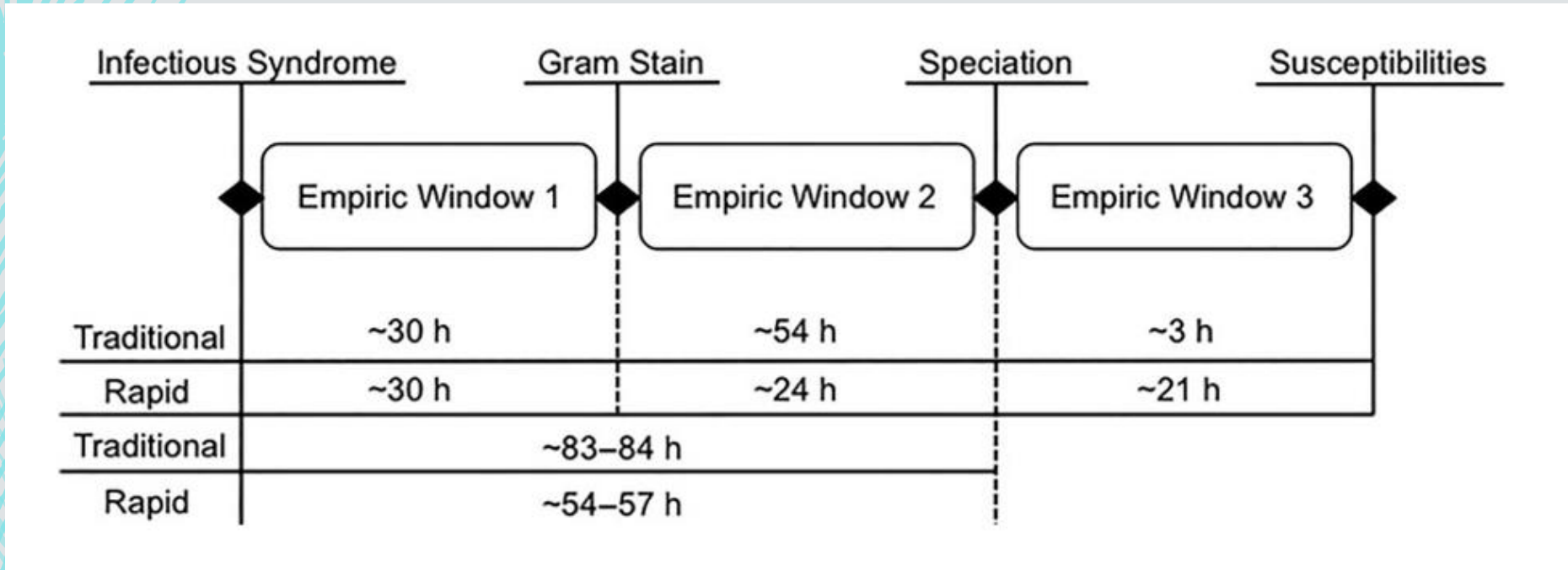


# Ερωτήματα κατά την ερμηνεία

---

Είναι τα διαθέσιμα panel κοντά στα τοπικά πρότυπα αντοχής;  
Τι θα σημαίνει για εμάς ένα αρνητικό αποτέλεσμα;

# 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** ≥ 75%    **Sp** ≥ 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



# 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.
- **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 κάποιος μπορεί να είναι αποικιστής;
- Αιμοληψίες ληφθείσες δια μέσου κεντρικών γραμμών ή περιφερειακά;
- Σε ποιον από τους μικροοργανισμούς αναφέρονται οι μηχανισμοί αντοχής;
- Κι αν κάποιος είναι «φυσικός» μηχανισμός σε ένα από τα παθογόνα (πχ αντοχή σε κολιστίνη σε *Proteus*);
- Ποιες θεραπευτικές επιλογές θα καλύψουν και τους δύο μηχανισμούς αντοχής;
- 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**

<b>Sample ID:</b> 14725	<b>Run Date:</b> 06 Feb 2015 7:46 AM
<b>Detected:</b> None	<b>Controls:</b> Passed
<b>Equivocal:</b> None	

**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>Chlamydomphila 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

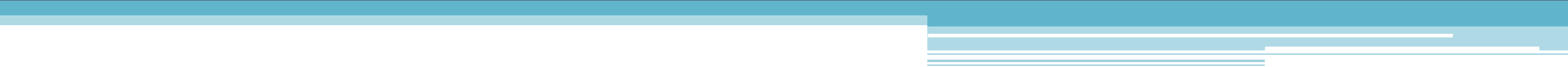
- **Επεισόδιο λοίμωξης και διάρκεια αποβολής του ιού *shedding***
  - The detection frequency for enveloped respiratory viruses decreased from more than 51 to 30% for sampling on days 0-6 versus 7-14 from symptom onset
  - Some respiratory viruses, such as bocaviruses, may be shed for several months
- **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\*

- *Recently described and/or of unknown significance*

## 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)**

# 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 <sup>a</sup>	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

## 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*

# 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*

*Cevy 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

## 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.



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

*Intensive Care Med (2018) 44:2302–2304*

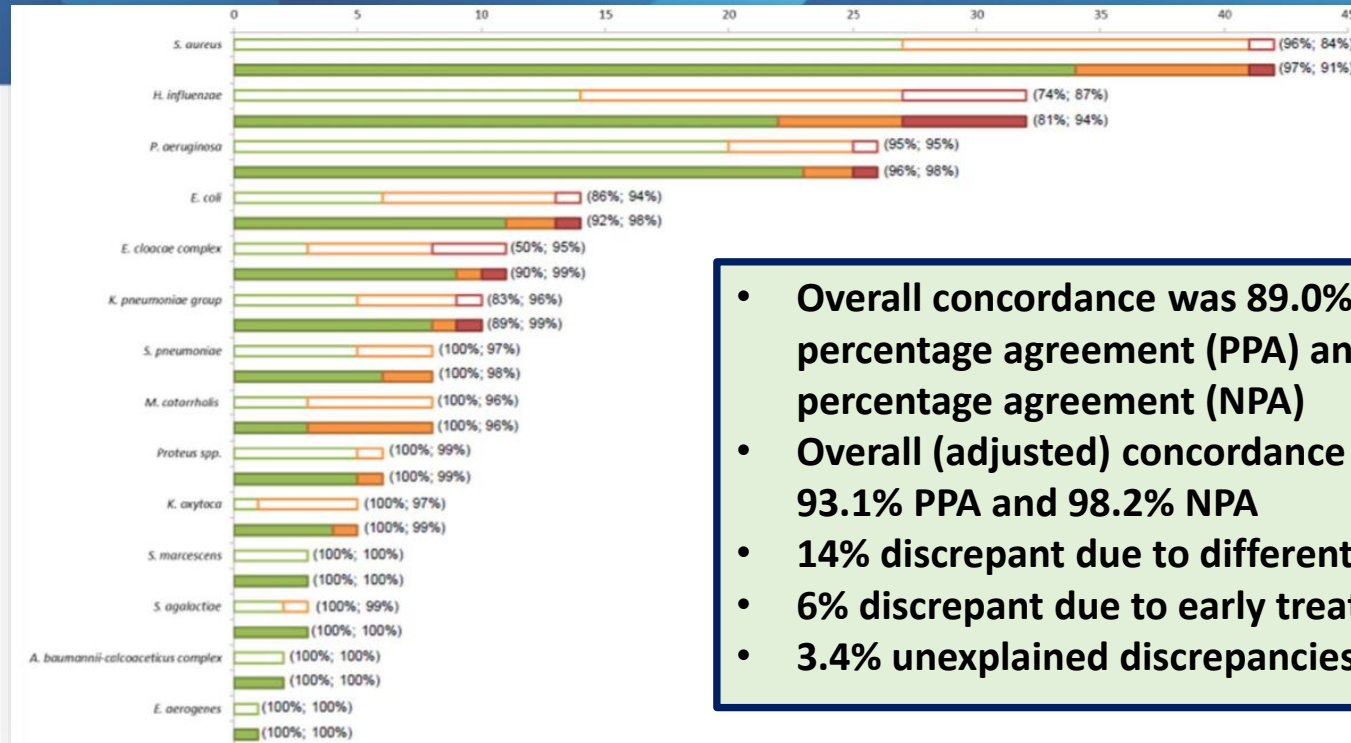
Javier Yugueros-Marcos<sup>1,2</sup>, Olivier Barraud<sup>3</sup>, Alexandra Iannello<sup>1</sup>, Marie Cécile Ploy<sup>3</sup>, Christine Ginocchio<sup>4,5</sup>, Margarita Rogatcheva<sup>4</sup>, Cristina Alberti-Segui<sup>2</sup>, Alexandre Pachot<sup>1</sup>, Virginie Moucadel<sup>1</sup>, Bruno François<sup>3,6,7\*</sup>  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

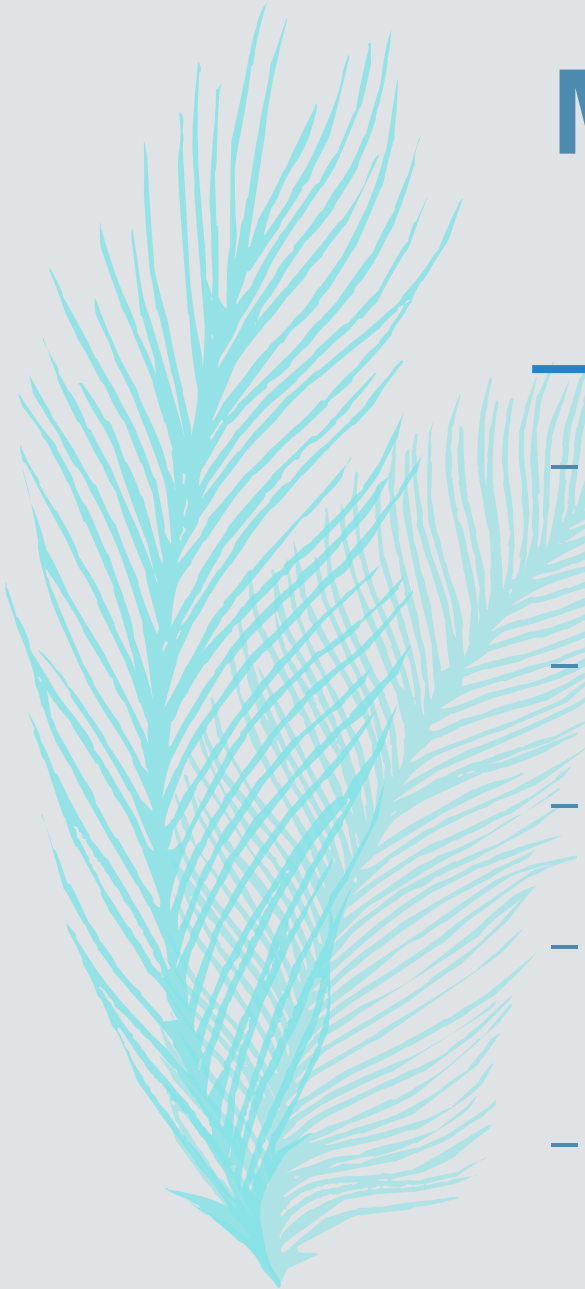
# Συμπεράσματα- μοριακές μέθοδοι και αναπνευστικό

- 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

