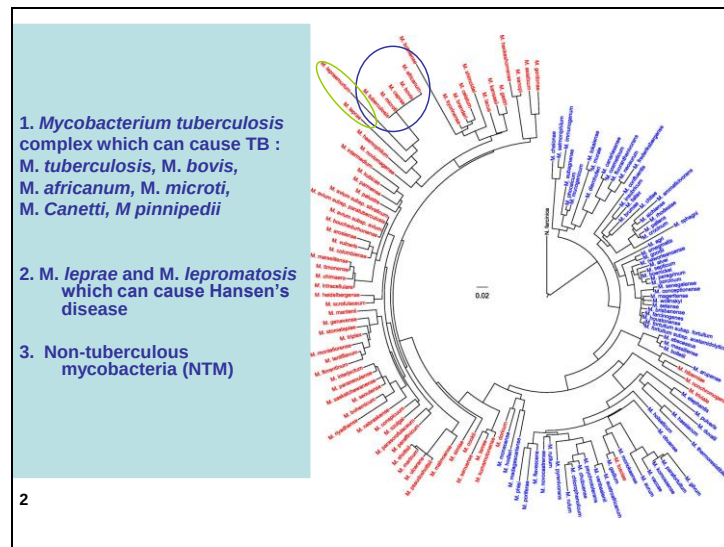


TB Molecular Diagnostic Approaches

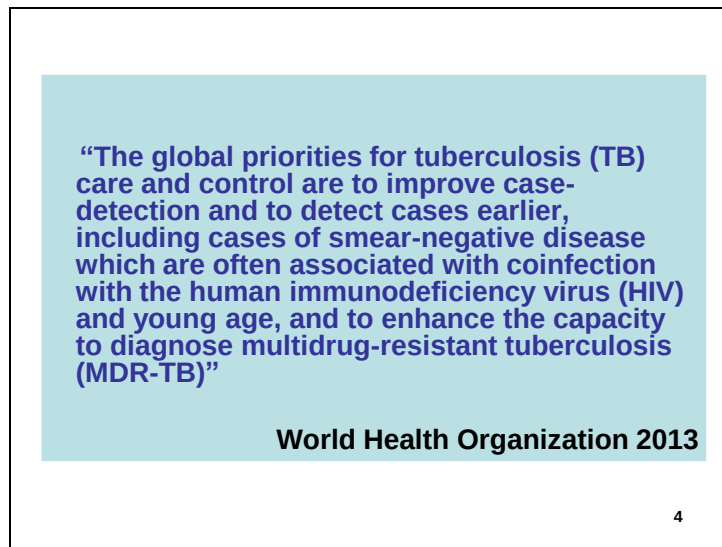
P. Ioannidis, PhD
National Reference Laboratory for Mycobacteria
(NRLM), Sotiria Chest Diseases Hospital



Το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης ανήκει στο γένος μυκοβακτήρια, μαζί με πάνω από 260 ακόμα είδη, που έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί μέχρι στιγμής. Μαζί με ένα πολύ μικρό αριθμό εξελικτικά πολύ κοντινών ειδών, συγκροτούν μια ομάδα γνωστή ως *Mycobacterium* *TuBerculosis* *Complex* (MTBC) τα οποία είναι εξελικτικά κοντά σε δύο ακόμη μυκοβακτηρία, που έχουν ως ξενιστή τους τον άνθρωπο και τα οποία προκαλούν την ασθένεια της λέπρας, τα *Mycobacterium* *leprae* & *M. lepromatosis*. Τα υπόλοιπα είδη γνωστά και ως μη φυματιώδη μυκοβακτήρια (NTM) είναι είτε σαπροφυτικά / περιβαλλοντικά ή έχουν άλλους ξενιστές. Αρκετά από αυτά είναι δυνάμει παθογόνα και για τον άνθρωπο.

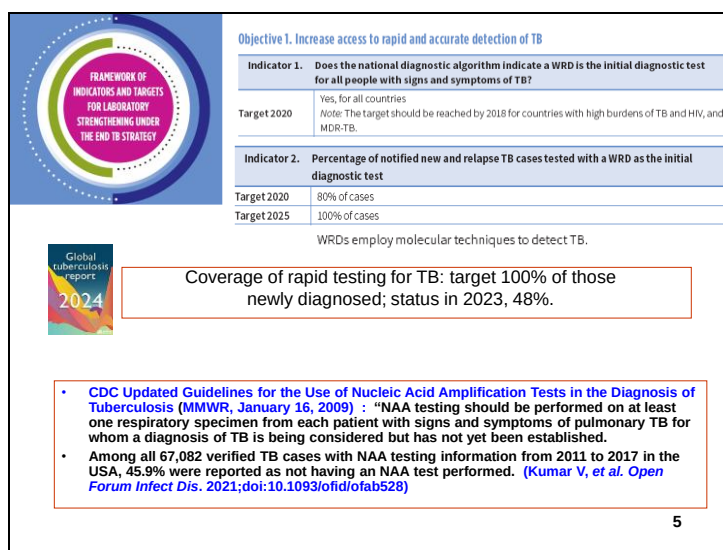
- Human TB is caused by bacteria of the *M. tuberculosis* complex (MTBC), predominantly *M. tuberculosis*, *M. bovis* and *M. africanum* (W. Africa, ~25% of cases).
- Occasional cases of infection with *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. orygis* and
- *M. canetti* (Horn of Africa)

Από τα είδη που ανήκουν στο MTB Complex κύριος παράγοντας πρόκλησης νόσου στον άνθρωπο είναι το *M. tuberculosis*. Ο πολύχρονος έλεγχος των κοπαδιών των βοοειδών και η παστερίωση έχει περιορίσει σημαντικά στις αναπτυσσόμενες χώρες την νόσο από το είδος *M. bovis* (ECDC: 0.05 - 0.02 περιστατικά /100.000 στην Ε.Ε. την περίοδο 2017-2020). Το είδος *M. africanum* - που μολύνει αποκλειστικά τον άνθρωπό - αποτελεί πρόβλημα κυρίως στις χώρες της Δ. Αφρικής. Περιστατικά λοίμωξης του ανθρώπου από τα άλλα είδη του MTBC, που κυρίως μολύνουν ζώα, όπως χοίρους, μικρά τρωκτικά ή γαζέλες, ελάφια, έχουν καταγραφεί και αποδίδονται σε επαφές με τα ζώα φορείς της νόσου. Ενώ τέλος η εξάπλωση του είδους *M. canetti* – που εκτιμάται ότι είναι εξελικτικά πιο κοντά στο κοινό πρόγονο των μελών του MTBC - περιορίζεται στο κέρασ της Αφρικής.



Κλειδί για την θεραπεία του ασθενούς και τον έλεγχο της διασποράς της φυματίωσης, όπως και για κάθε μολυσματικής νόσου, είναι η έγκαιρη διάγνωση της. Σ' αυτήν καθοριστικό ρόλο καλούνται να παίξουν οι μοριακές μεθοδολογίες, ειδικά στους μικροσκοπικά αρνητικούς ασθενείς, όπως επίσης και για την έγκαιρη διάγνωση των ανθεκτικών στελεχών του βακίλου, δεδομένων των προβλημάτων που έχουν οι συμβατικές μέθοδοι διάγνωσης, κυρίως σε ότι αφορά την ταχύτητα ή την ευαισθησία τους, όπως θα δούμε και στην συνέχεια.

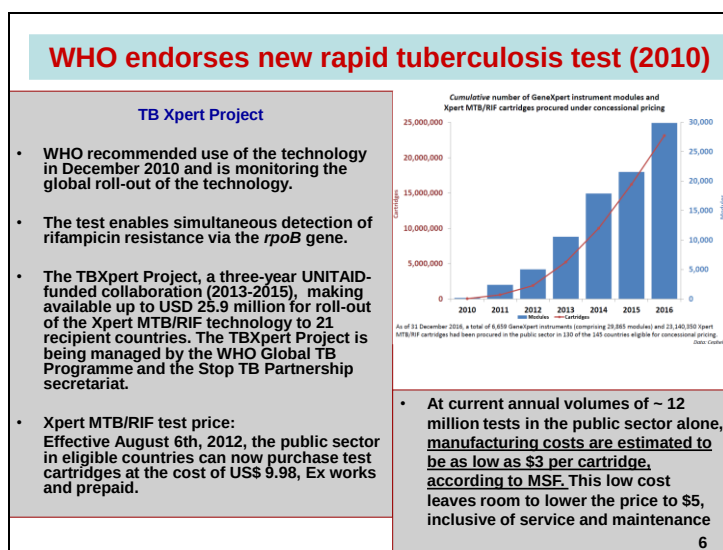
Διαφάνεια 5



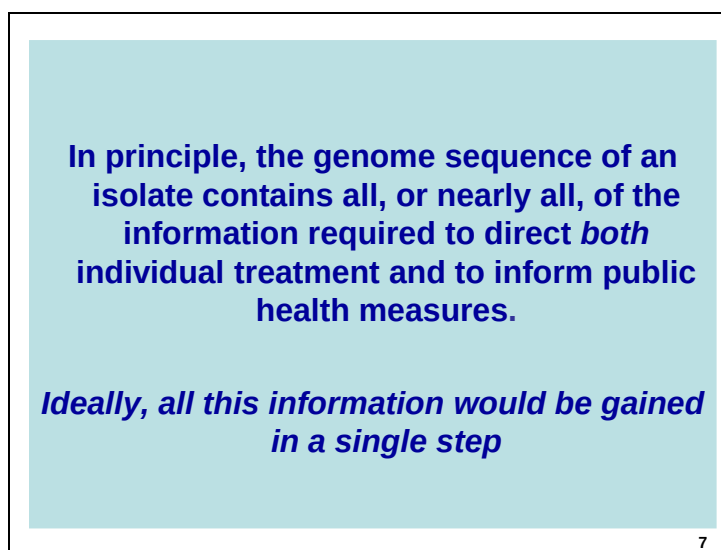
Μάλιστα ο ΠΟΥ στο πλαίσιο της στρατηγικής «End TB», στην οποία και αναφερθήκαμε πριν, θέτει ως προϋπόθεση για την εργαστηριακή διάγνωση της φυματίωσης την χρησιμοποίηση μιας εκ των εγκεκριμένων – προτεινόμενων από τον ΠΟΥ μοριακών διαγνωστικών μεθόδων, ως την πρώτη διαγνωστική προσέγγιση για όλους τους ασθενείς με υπόνοια φυματίωσης. Ο στόχος τέθηκε το 2016 και είχε ως πρώτο ορόσημο το 2020 όπου θα έπρεπε να έχει καλυφθεί το 80% των ασθενών και ως το 2025, σε ένα χρόνο δηλαδή, το 100% των ασθενών παγκοσμίως. Στην φετινή έκθεση του ΠΟΥ αναφέρεται ότι αυτό επετεύχθηκε μόνο για το 48% των ασθενών που διαγνώστηκαν με TB το 2023 .

Στη χώρα του κόσμου με το μεγαλύτερο ΑΕΠ, τις ΗΠΑ, ο στόχος που έθεσε το 2009 το CDC για άμεση εφαρμογή, και ήταν κάθε ασθενής που διερευνάται για πνευμονική TB να έχει τουλάχιστο ένα μοριακό τεστ, μόνο κατά το ήμισυ είχε υλοποιηθεί μέχρι το 2017, όπως έδειξε μελέτη του 2021.

Το δύσκολο με τους στόχους δεν είναι να τεθούν αλλά να υλοποιηθούν, ειδικά όταν «σκοντάφτουν» σε περιορισμούς μέσων, ανθρώπων, υποδομών, χρηματοδότησης.



Ο ΠΟΥ έχει «υιοθετήσει» και προτείνει την εισαγωγή συγκεκριμένων μοριακών διαγνωστικών μεθόδων. Μια τέτοια μέθοδος με υψηλή ευαισθησία που ταυτόχρονα δίνει και πληροφορία για την ανοχή στην ριφαμπικίνη, υιοθετήθηκε ήδη από το 2010. Επιπρόσθετα ο ΠΟΥ εξασφάλισε α) την χρηματοδότηση για την εγκατάσταση της σε 21 φτωχές χώρες με υψηλή επίπτωση της νόσου και β) επιδοτούμενη τιμή στα 9.98 \$/τεστ για περίπου 130 χώρες. Ενδεικτικά εμείς το αγοράζουμε 7 φορές ακριβότερα. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα μέχρι το τέλος του 2016 και μόνο στα πλαίσια του προγράμματος της επιδοτούμενης χρηματοδότησης, χρησιμοποιήθηκαν πάνω από 23 εκατ. τεστ. Ήταν η πρώτη φορά που μια διαγνωστική μέθοδος, που στηρίζεται σε τεχνολογία αιχμής, βρήκε άμεση και εκτεταμένη εφαρμογή εκεί που είναι εξ' άλλου και ο μεγαλύτερος όγκος των περιστατικών. Όμως ακόμη και αυτή η τιμή είναι απαγορευτική για πολλές χώρες, πολύ περισσότερο μάλιστα όταν ο αριθμός των τεστ πρέπει να 10-πλασιαστεί μόνο και μόνο για επιτευχθεί ο στόχος του ΠΟΥ να έχουν πρόσβαση στο τεστ όλοι όσοι ελέγχονται για φυματίωση στις 30 χώρες με την πιο υψηλή επίπτωση. Η τιμή για τις χώρες υψηλής επίπτωσης έχει μειωθεί πλέον στα 7,97\$. Με βάση την εκτιμώμενη κατανάλωση το κόστος παραγωγής ανά τεστ υπολογίζεται μόλις στα 3\$



Οι μοριακές μέθοδοι διαβάζουν πληροφορίες που υπάρχουν στο γενετικό υλικό. Σαν γενική αρχή μπορούμε να πούμε ότι, οτιδήποτε χρειάζεται για την καθοδήγηση της θεραπείας, αλλά και για την επιδημιολογική διερεύνηση – τον έλεγχο επιδημικών εξάρσεων - μπορεί να εξαχθεί ως πληροφορία από το γονιδίωμα του μικροοργανισμού ή σε συνδυασμό με αυτό του ασθενούς, (π.χ. να προβλεφθούν γενετικά καθοριζόμενες δυσανεξίες σε φάρμακα). Το ιδανικό θα ήταν όλη αυτή την πληροφορία να την αποκτούμε σε ένα βήμα, με ένα τεστ και αυτό υπόσχονται να κάνουν πράξη οι ταχέως εξελισσόμενες μοριακές μέθοδοι που στηρίζονται στις μεθοδολογίες του NGS - μέθοδοι αλληλουχοποίησης επόμενης γενιάς - που φέρνουν την νέα επανάσταση στην μοριακή-γενετική ανάλυση και στην μικροβιολογία και για τις οποίες θα αναφερθώ στο τέλος, αφού ήδη σε αρκετές χώρες έχουν μπει ή μπαίνουν σύντομα, σε εφαρμογή στην εργαστηριακή διερεύνηση της φυματίωσης .

Current molecular diagnostic approaches target specific genomic loci and are used:

- **To identify an organism by detecting species specific sequences at his genome**
- **To detect mutations or polymorphisms associated with specific strain characteristics such as antibiotic resistance, virulence e.t.c.**

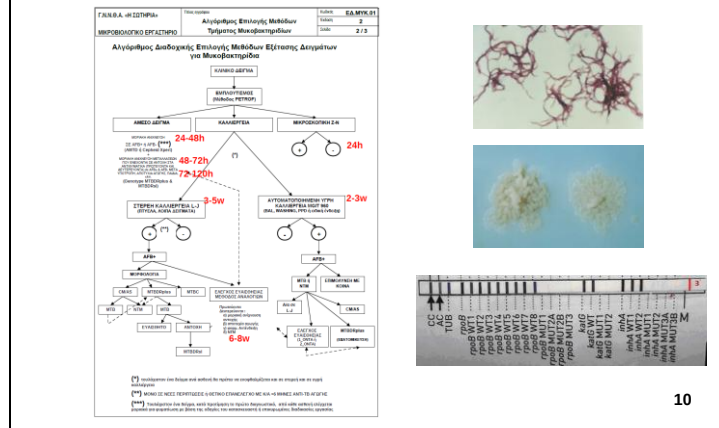
8

Μέχρι τότε ας δούμε πως δουλεύουν οι τρέχουσες μοριακές μέθοδοι ως εργαστηριακές εξετάσεις ρουτίνας. Γενικά μιλώντας και πάλι, το κοινό χαρακτηριστικό τους είναι η στοχευμένη ανάλυση επιμέρους περιοχών του γενετικού υλικού με σκοπό να εντοπίσουν τη παρουσία ενός μικροοργανισμού στο δείγμα του ασθενούς ή να τον ταυτοποιήσουν μετά από την ανάπτυξη του στη καλλιέργεια . Και αυτό το πετυχαίνουν ανιχνεύοντας γενετικές αλληλουχίες που είναι αποκλειστικές/χαρακτηριστικές για τον οργανισμό που διερευνούμε. Επίσης μπορεί να αναλύουν συγκεκριμένες γενετικές περιοχές για να εντοπιστεί η πιθανή παρουσία μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών που συνδέονται με κρίσιμα χαρακτηριστικά του παθογόνου οργανισμού όπως η αντοχή στα αντιβιοτικά ή η υψηλή λοιμογονικότητα

- MTB genome 4,441,529 bp, high CG content (~65%). 4111 genes. Numerous repetitive sequences, no plasmids
Cole, Nature 1998
- Members of the MTBC are indistinguishable in their 16SrRNA and *rpoB* genes, recombination does not occur between strains and have approximately the same genome length.
- No exchange of genetic material via plasmid and **horizontal gene transfer**.
- Resistance to anti-TB drugs is caused predominantly by chromosomal mutations
- Rate of change in DNA sequences ~ 0.5 single nucleotide polymorphisms (SNPs) per genome per year.
Walker, The Lancet Infectious Diseases 2013

Το πλήρες γονιδίωμα του MTB αποκωδικοποιήθηκε το 1998 και στην συνέχεια αλληλουχοποιήθηκε πλήρως και το γενετικό υλικό των υπόλοιπων ειδών του MTBC - τα όποια και δείχνουν φυσικά υψηλό βαθμό γενετικής συγγένειας. Τα είδη του MTBC δεν κάνουν ανταλλαγή γενετικού υλικού και η αντοχή στα αντιβιοτικά οφείλεται αποκλειστικά σε μεταλλάξεις - κυρίως σημειακές - σε συγκεκριμένα γονίδια. Ο ρυθμός μεταλλαξογένεσης έχει υπολογιστεί ότι είναι πολύ χαμηλός και ο βάκιλος θεωρείται γενετικά εξαιρετικά σταθερός.

Laboratory diagnostic Methodologies



Στην διαφάνεια φαίνεται ο διαγνωστικός αλγόριθμος του ΕΚΑΜ. Η διάγνωση απαιτεί τον συνδυασμό διαφορετικών μεθοδολογιών που αναπτύσσονται σε βάθος χρόνου, μέρος των οποίων είναι και οι μοριακές διαγνωστικές προσεγγίσεις. Μέχρι την ολοκλήρωση του ελέγχου της φαρμακευτικής αντοχής, με την μέθοδο της καλλιέργειας, το διάστημα μπορεί να φτάσει ως και τις 8 εβδομάδες. Μοριακές μέθοδοι χρησιμοποιούνται σε κλινικά δείγματα ασθενών για την ανίχνευση της παρουσίας του MTB. Χρησιμοποιούνται στα θετικά κλινικά δείγματα, για τον έλεγχο της αντοχής στα πρωτεύοντα και αν είναι ανάγκη και στα δευτερεύοντα Α/Φ φάρμακα. Μοριακές μέθοδοι χρησιμοποιούνται επίσης, σε στελέχη που έχουν αναπτυχθεί σε υγρή ή στερεή καλλιέργεια για την ταυτοποίηση τους σε επίπεδο είδους ή για τον έλεγχο αντοχής, αν αυτό δεν έχει επιτευχθεί ήδη, στο κλινικό δείγμα.

Laboratory diagnostic Methodologies			
Method	Microbes	Time to result	Comments
Microscopy	$\sim 10^4$	Few hours	Non specific (Mycobacterium genus, Nocardia, Rhodococcus κ.λ.π.)
Culture on solid media (LJ)	$10^2 - 10^3$	4-6 weeks	Gold standard
Culture on liquid media	$10^2 - 10^3$	~ 14 days	Risk of contamination
Molecular Test based on NAA	1 (Theoretically) $\sim 10 - < 10^2$	Few hours	Risk of contamination Detection of dead organism (DNA)

11

Θα αναφερθώ στα τεστ που χρησιμοποιούμε κυρίως στο εργαστήριο και κατ' αρχάς σε αυτά που επιτρέπουν την ανίχνευση του βακίλου στα κλινικά δείγματα. Στο πίνακα παρατίθενται ορισμένα από τα χαρακτηριστικά τους συγκρινόμενα με τις άλλες μεθόδους. Η μικροσκοπία, μετά από οξεάντοξη χρώση –που είναι ειδική για οργανισμούς που έχουν μυκολικό οξύ στο κυτταρικό τους τοίχωμα - και η καλλιέργεια, σε ειδικά στερεά ή υγρά θρεπτικά μέσα, υποφέρουν: Η πρώτη από χαμηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Αν και είναι κυρίως το MTB αυτό που συναντάται στα θετικά κλινικά δείγματα, είναι πολύ δύσκολο αν όχι αδύνατο να γίνει η διάκριση του μορφολογικά με την μικροσκοπική εξέταση, ακόμη και του καλλιεργημένου μικροβίου, από τα άλλα οξεάντοχα βακτήρια. Η δε καλλιέργεια, ιδίως η στερεή, είναι εξαιρετικά αργή, μιας και ο βάκιλος, τόσο *in-vivo* όσο και *in-vitro*, έχει χρόνο διπλασιασμού πάνω από 18 hrs . Η ανάγκη για μια ειδική, εξαιρετικά ευαίσθητη και γρήγορη μέθοδο είναι προφανής για το εντοπισμό οργανισμών με τέτοια χαρακτηριστικά και αυτό το προσφέρουν τα μοριακά τεστ που στηρίζονται στον πολλαπλασιασμό ειδικών για τον οργανισμό στόχων στο γενετικό υλικό, αξιοποιώντας την τεράστια καταλυτική ισχύ των ένζυμων. Τα κυριότερα προβλήματα τους είναι ο κίνδυνος των επιμολύνσεων, όπως και το ότι δεν μπορούν να διακρίνουν ανάμεσα σε ζωντανό ή νεκρό μικροοργανισμό. Αυτό το τελευταίο αφορά κυρίως μεθόδους που έχουν ως στόχο το DNA.

		Condition (as determined by "Gold standard")		
		Condition positive	Condition negative	
Test outcome	Test outcome positive	True positive	False positive (Type I error)	Precision (PPV) = $\frac{\Sigma \text{ True positive}}{\Sigma \text{ Test outcome positive}}$
	Test outcome negative	False negative (Type II error)	True negative	Negative predictive value = $\frac{\Sigma \text{ True negative}}{\Sigma \text{ Test outcome negative}}$
		Sensitivity = $\frac{\Sigma \text{ True positive}}{\Sigma \text{ Condition positive}}$	Specificity = $\frac{\Sigma \text{ True negative}}{\Sigma \text{ Condition negative}}$	Accuracy = $\frac{\Sigma \text{ True positive} + \Sigma \text{ True negative}}{\Sigma \text{ Total population}}$

12

Για το πώς δουλεύουν στην πράξη οι μοριακές μέθοδοι θα δούμε στην συνέχεια στοιχεία για την ακρίβεια τους (την ευαισθησία και ειδικότητα) και την θετική και αρνητική προγνωστική αξία τους, συγκρινόμενες πάντα με την καλλιέργεια που θεωρείται ακόμη ως η εργαστηριακή μέθοδος αναφοράς (gold standard).

Η ευαισθησία μιας μεθόδου, είναι η παράμετρος που δείχνει, από τα πραγματικά θετικά περιστατικά πόσα ταυτοποιεί η μέθοδος σαν τέτοια ενώ η ειδικότητα δείχνει από τα πραγματικά αρνητικά πόσα αναγνωρίζει ως αρνητικά.

Η θετική και η αρνητική προγνωστική αξία δείχνουν αντίστοιχα την πιθανότητα ένα περιστατικό να είναι όντως παθολογικό όταν η δοκιμασία αποβαίνει θετική και την πιθανότητα να μην είναι παθολογικό όταν η δοκιμασία είναι αρνητική. Οι δύο πρώτες παράμετροι είναι αποκλειστικό χαρακτηριστικό της μεθόδου. Είναι προφανές ότι επιδιώκουμε να δουλεύουμε με μεθόδους με την υψηλότερη δυνατή ευαισθησία και ειδικότητα, ιδανικά στο 100%. Στην πράξη βεβαία καμία μέθοδος δεν το πετυχαίνει αυτό, ενώ επίσης ισχύει ότι όσο αυξάνεται η ευαισθησία μιας μεθόδου τόσο επηρεάζεται προς την αντίθετη κατεύθυνση – μειώνεται δηλαδή - η ειδικότητα. .

The Impact on Positive Predictive Value (PPV) as Prevalence Changes, for a test with 99% Sensitivity and 95% Specificity				
	Prevalence	1%	10%	20%
a	# in population	1,000	1,000	1,000
b	Diseased	10	100	200
c	Not diseased	990	900	800
d	True Positives on the test ($b \times 0.99$)	10	99	198
e	False positives on the test ($c \times (1-0.95)$)	50	45	40
f	Total # positive on test ($d + e$)	60	144	238
	PPV (d / f)	17%	69%	83%

13 Dr. Chan Shah: Public health and preventive medicine in Canada. Elsevier, Canada, 2003

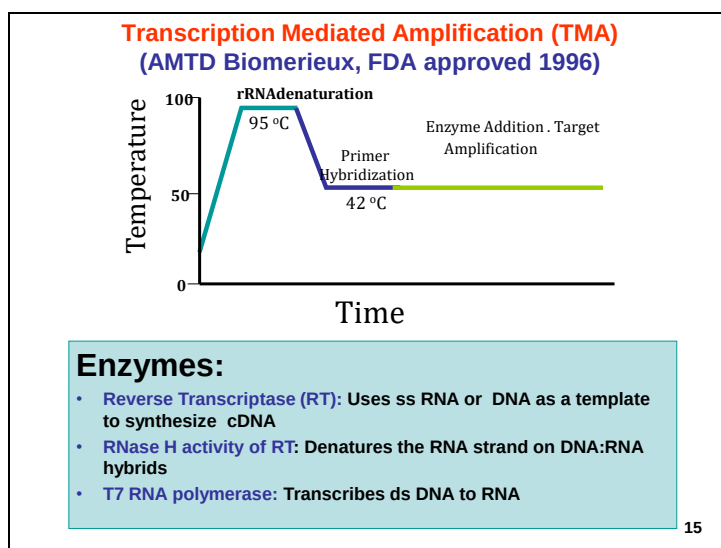
Από την άλλη η θετική και η αρνητική προγνωστική αξία επηρεάζονται και από την επίπτωση της νόσου, δηλαδή το ποσοστό των θετικών περιστατικών, στον πληθυσμό που εξετάζουμε. Ας το δούμε με ένα παράδειγμα. Ας υποθέσουμε ότι έχουμε μια μέθοδο με εξαιρετικά υψηλή ευαισθησία (99%) και υψηλή ειδικότητα 95%. Με ευαισθησία 99% η μέθοδος, θα ανιχνεύσει το 99% των πραγματικά θετικών περιστατικών, ενώ η ειδικότητα ίση με 95% μεταφράζεται σε 5% ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Σε πληθυσμούς 1000 ατόμων με επίπτωση 1%, 10% και 20% αντίστοιχα, η μέθοδος θα ανιχνεύσει τα 10, 99 & 198 από τα θετικά περιστατικά και αντίστοιχα θα δώσει και 50, 45 & 40 ψευδώς θετικά περιστατικά. Έτσι η θετική προγνωστική αξία, σε αυτούς τους πληθυσμούς, είναι αντίστοιχα 17%, δηλαδή εξαιρετικά χαμηλή, 69% ικανοποιητική και 83% αρκετά ικανοποιητική.

Διαφάνεια 14

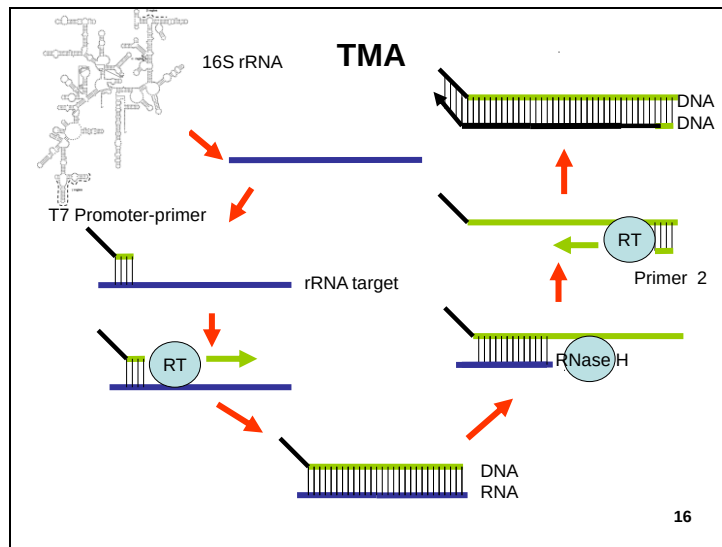
Test/Tool (Instrument)	Manufacturer (Country)	Type: Use case	Specimen type: Performance*	Intended level of use
Truenat MTB/MTB (Thurmap/Turkabi)	Malibu (India)	Rapid molecular: Diagnosis	Sputum: 95-96% SE, 100% SP	Peripheral lab
Truenat MTB (NI) (Thurmap/Turkabi)	Malibu (India)	Rapid molecular: DST (Rif) Follow-on drug resistance test	Sputum: not yet available	Peripheral lab
Truenat MTB FQ (Thurmap/Turkabi)	Malibu (India)	Rapid molecular: DST (FQ) Follow-on drug resistance test	Sputum: not yet available	Peripheral lab
Truenat MTB BDQ (Thurmap/Turkabi)	Malibu (India)	Rapid molecular: DST (BDQ) Follow-on drug resistance test	Sputum: not yet available	Peripheral lab
Axits Breath Test	Axits (Switzerland)	Sample collection: Diagnosis/DST using existing molecular tests	Exhaled (breath) not yet available	Community/ Primary care setting
Mask-based Biosensor Test	FINDI/QT/ University of Leuven (Switzerland/UK)	Sample collection: Diagnosis/DST using existing molecular tests	Exhaled (breath) not yet available	Home/ Community/ Primary care setting
Lumin Dx TB assay (LuminDx)	LuminDx (USA)	Rapid molecular: Diagnosis/DST using existing molecular tests	Sputum: not yet available	Community/ Primary care setting (Portable and battery-operated, current install base of 5,000 instruments in African regions)
RFLA-RIF (BDV qPCR)	Biomere (Israel)	Rapid molecular: Diagnosis/DST (RIF, FQ, INH, AMK) May be used as initial test for TB and drug resistance. BDV qPCR capable of testing for up to 40 molecular targets in a single test	Sputum: not yet available	Peripheral lab/ District lab (Battery-operated)
STANDARD MTB MDR-TB (STANDARD MTB)	SD Biomere (Israel)	Rapid molecular: Diagnosis/DST (RIF, INH) May be used as initial test for TB and drug resistance	Sputum: not yet available	Peripheral lab/ District lab

Test/Tool (Instrument)	Manufacturer (Country)	Type: Use case	Specimen type: Performance*	Intended level of use
Xpert MTB-RIF (Cepheid)	Cepheid (USA)	Host RNA response: Triage, progression to active TB, treatment monitoring	Blood: Triage SE: 90.0% SP: 88.0% AUC: 0.94 ^{***}	District lab
RISQ signature assay (Q-PCR)	QuantMDx (UK)	Host RNA response: Triage, progression to active TB, treatment monitoring	Blood: Triage SE: 90.9% SP: 87.8% AUC: 0.94 ^{***}	Community/ Primary care setting (Portable and battery-operated)
ISIT-TB (BioFire FilmArray)	bioMérieux (France)	Host RNA response: Triage, progression to active TB, treatment monitoring	Blood: Not yet available	District lab
TAM-TB (Flow cytometer)	Beckman Coulter (USA)	Host immune response: Triage, progression to active TB, treatment monitoring	Blood: Triage SE: 82.2% SP: 75.4% AUC: 0.87 ^{***}	District lab

Οι πρώτες εγκρίσεις από τον FDA των ΗΠΑ, δύο εμπορικών μεθόδων για την ανίχνευση του γενετικού υλικού του MTB σε δείγματα του αναπνευστικού, δόθηκαν το 1995 & 1996. Η μία είχε στόχο το ριβοσωμικό RNA και η άλλη περιοχή του 16S γονιδίου. Η πρώτη πολλαπλασιάζει τον στόχο μέσω μεταγραφής (Transcription Mediated Amplification) και η άλλη χρησιμοποιεί την μέθοδο της real time PCR. Η τεράστια επιτυχία της μέθοδου Xpert MTB/RIF, που υιοθετήθηκε το 2010 από τον ΠΟΥ, αναζωπύρωσε το ενδιαφέρον για τις μοριακές προσεγγίσεις διάγνωσης της φυματίωσης με αποτέλεσμα μια έκρηξη στην ανάπτυξη μοριακών τεχνολογιών για εφαρμογή σε όλα τα επίπεδα, από το πρωτοβάθμιο εργαστήριο μέχρι τα εργαστήρια αναφοράς. Στη διαφάνεια αναφέρονται μερικές από αυτές που είναι σήμερα στο στάδιο της αξιολόγησης και που περιλαμβάνουν από μεθόδους απλά πιο ανταγωνιστικές οικονομικά του Xpert ή και πιο πλήρεις όσον αφορά την γκάμα των φαρμάκων για τα οποία δίνουν πληροφορία για την αντοχή, μέχρι μεθόδους για την ανίχνευση αλλαγών στην γονιδιακή έκφραση του ασθενούς που υποδηλώνουν εξέλιξη της λανθάνουσας σε ενεργό νόσο. Η ακόμη και την ανάπτυξη μεθόδων συλλογής και εμπλουτισμού, για την αξιοποίηση στην διάγνωση κλινικού υλικού που συλλέγεται πιο εύκολα όπως π.χ. ο εκπνεόμενος αέρας ή το επίχρισμα από τη γλώσσα.

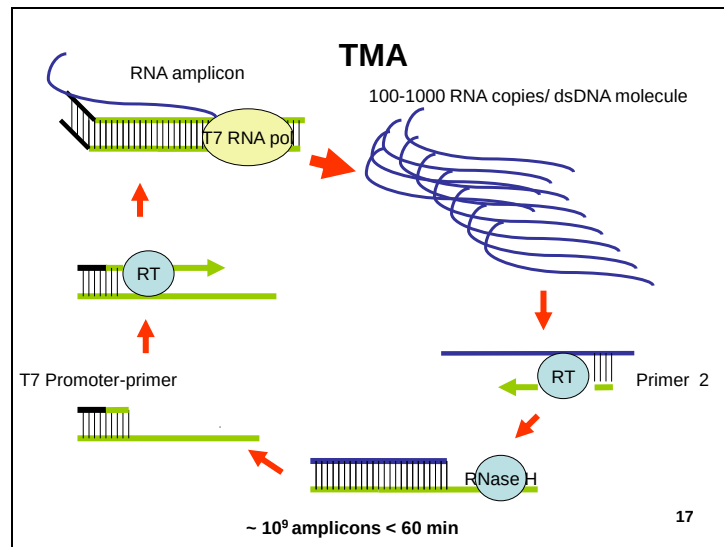


Στο εργαστήριο ως κύρια μοριακή προσέγγιση χρησιμοποιούμε μεθοδολογία που στηρίζεται στον πολλαπλασιασμό του RNA. Υπάρχουν δύο εμπορικά διαθέσιμες μέθοδοι, η AMTD & η TRCReady®-MTB και οι δύο στηρίζονται στην ενίσχυση του σήματος μέσω μεταγραφής. Θα αναφερθώ στις κοινές γενικές αρχές λειτουργίας τους. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται και οι καταλυτικές τους ιδιότητες αναφέρονται στην διαφάνεια και θα δούμε πως δουλεύουν. Το μόριο στόχος είναι το rRNA του μυκοβακτηριδίου. Η μέθοδος είναι ισοθερμική αφού μετά ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης των δίκλωνων περιοχών, - που ως γνωστόν σχηματίζει αναδιπλούμενο το rRNA - και την προσθήκη των εκκινητών και των ενζύμων οι αντιδράσεις γίνονται στους 42°C.



Μετά την αποδιάταξη του rRNA, προσδένεται σε ομόλογη αλληλουχία το μόριο εκκινητής που φέρει επιπρόσθετα στο 5' άκρο του και την αλληλουχία αναγνώρισης της T7 RNA πολυμεράσης. Η αντίστροφη μεταγραφάση ξεκινάει από τον εκκινητή και συνθέτει συμπληρωματική αλυσίδα DNA με καλούπι το rRNA.

Σε «δεύτερο» στάδιο το ίδιο ένζυμο με την ιδιότητα της ριβονουκλεάσης - RNase H - αποικοδομεί την αλυσίδα RNA στο υβριδικό μόριο DNA:RNA. Προσδένεται νέος εκκινητής, στο άλλο ακρο και συντίθεται δίκλωνο μόριο DNA



Η T7 RNA πολυμεράση αναγνωρίζει τον υποκινητή της μεταγραφής, που όπως είδαμε προστέθηκε τεχνητά στο 5' άκρο του μορίου και αντιγράφει 100-1000 μόρια RNA ανά δίκλωνο μόριο DNA. Κάθε ένα από αυτά τα νέα RNA με την σειρά του μπορεί να γίνει το καλούπι για τον σχηματισμό νέων δίκλωνων μορίων DNA που επίσης με την σειρά τους θα μεταγραφούν. Με αυτό τον τρόπο γίνονται συνεχείς κύκλοι. Η ανίχνευση των αντιγράφων RNA που σχηματίζονται στην μεν μέθοδο AMTD γίνεται μετά τον τελικό κύκλο, ενώ στην πιο σύγχρονη μέθοδο TRCReady®-MTB γίνεται σε πραγματικό χρόνο.

Performance of AMTD using culture as end point					
Specimen /Origin		Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
All samples (n=2564)		79,9 %	98,6%	88,8 %	97,2 %
Pulmonary	AFB (+) (n=200)	95%	88,8%	98,8%	64%
	AFB (-) (n=1910)	57%	98,9%	75%	92,7%
Extra-pulmonary	AFB (+) (n=10)	3/4	3/6	3/6	3/4
	AFB (-) (n=409)	66,6%	97,9%	69,2%	97,6%
Greeks TB Prevalence = 11,1%	AFB (+) (n=143)	93,6%	83,3%	97,5%	65,2%
	AFB (-) (n=2008)	63,1%	98,5%	68,95%	98,17%
Foreigners TB Prevalence = 24,5%	AFB (+) (n=73)	96,9%	4/8	94%	4/6
	AFB (-) (n=340)	45,5%	98%	71,4%	94,3%

Τα δεδομένα στην διαφάνεια αναφέρονται στα χαρακτηριστικά της απόδοσης της μεθόδου AMTD σε ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα κατά το διάστημα που ήταν ακόμη σε χρήση στο εργαστήριο. Πλέον έχει αντικατασταθεί με την μέθοδο TRCReady®-MTB που έχει υψηλό βαθμό αυτοματισμού τόσο στην απομόνωση του RNA όσο και στην απεικόνιση σε πραγματικό χρόνο των προϊόντων της αντίδρασης.

Η ευαισθησία και θετική προγνωστική αξία ήταν χαμηλότερες στα μικροσκοπικά αρνητικά δείγματα, τόσο του αναπνευστικού όσο και στα εξω-αναπνευστικά, που αποτελούν και το δυσκολότερο διαγνωστικό πρόβλημα . Οι ασθενείς έχουν χωριστεί σε γηγενείς και ξένους και θα δούμε στην συνέχεια τον λόγο.

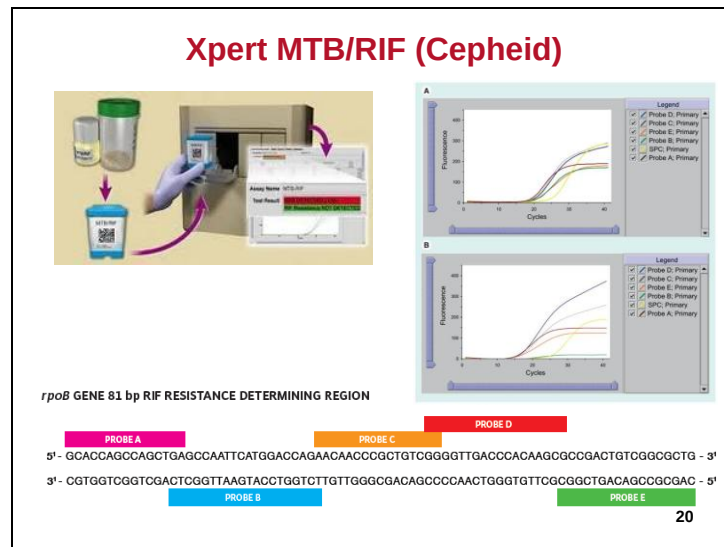
WHO endorses new rapid tuberculosis test (2010)

Product name: Xpert® MTB/RIF
Developers: FIND and Cepheid

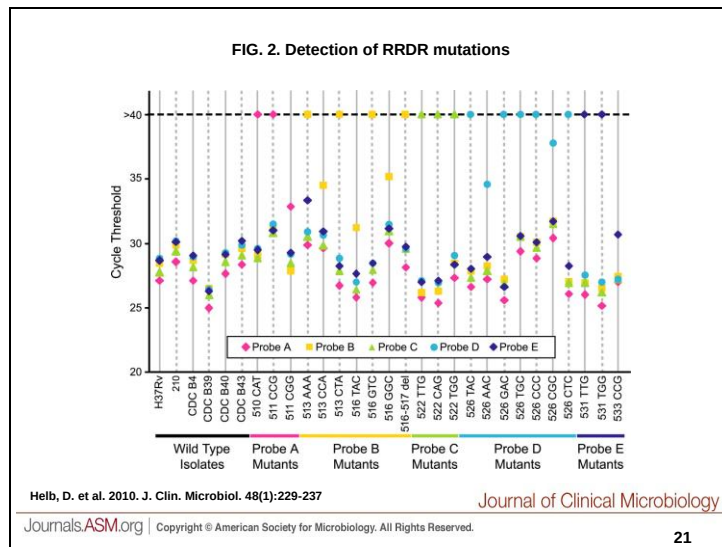
- ‘The Cartridge-Based Automated NAAT is a self-contained and fully automated technological platform that integrates sputum processing, DNA extraction and amplification, TB and MDR-TB diagnosis. It has similar sensitivity to culture, targets *Mycobacterium tuberculosis* specifically and enables simultaneous detection of rifampicin resistance via the *rpoB* gene.
- The closed system ensures that there is no risk of contamination and no requirement for bio-safety facilities.
- Test results can be obtained in just 90 minutes.

19

Η μέθοδος Xpert MTB/RIF έφερε επανάσταση στην διάγνωση της φυματίωσης για μία σειρά λόγους όπως η πλήρης αυτοματοποίηση της, η υψηλή βιολογική ασφάλεια, η ταχύτητα της (αποτέλεσμα σε 90 λεπτά) και η ευαισθησία της, ενώ επιπρόσθετα επιτρέπει και τη ταυτόχρονη ανίχνευση της αντοχής στην ριφαμπικίνη που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατος δείκτης MDR-TB.

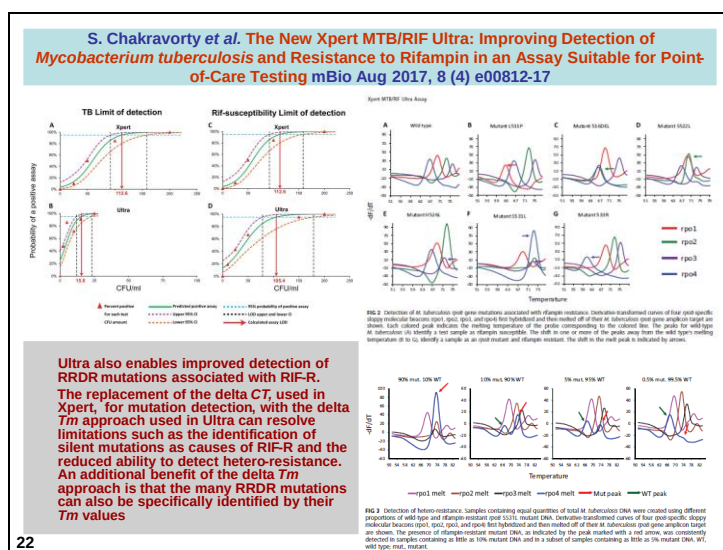


Η μέθοδος είναι μια Real-time PCR και βλέπουμε σε πραγματικό χρόνο τα προϊόντα που σχηματίζονται σε κάθε κύκλο. Η μέθοδος επιτρέπει επίσης και ημι-ποσοτική εκτίμηση της συγκέντρωσης του βακτηριακού φορτίου στο κλινικό δείγμα. Στην real-time PCR για την ανίχνευση του σχηματιζόμενου προϊόντος χρησιμοποιούνται ιχνηθέτες που εκπέμπουν σήμα – συνήθως μέσω φθορισμού - μετά την ειδική πρόσδεση τους σε αυτό. Στην μέθοδο Gene Xpert χρησιμοποιούνται 5 ιχνηθέτες που φθορίζουν σε διαφορετικό μήκος κύματος. Οι ιχνηθέτες αυτοί αναγνωρίζουν ειδικά και καλύπτουν διαδοχικά την περιοχή των 81 bp του γονιδίου *rpoB* στην οποία εντοπίζονται οι μεταλλάξεις που ενέχονται στην αντοχή στην ριφαμπικίνη.



Σε περίπτωση στελέχους αγρίου τύπου, το σήμα και από τους πέντε ιχνηθέτες εμφανίζεται σε παραπλήσιους κύκλους.

Σε περιπτώσεις μετάλλαξης το σήμα στον συγκεκριμένο ιχνηθέτη δεν εμφανίζεται καθόλου ή εμφανίζεται σε πολύ μεταγενέστερο κύκλο και έτσι το δείγμα αυτό χαρακτηρίζεται ως μεταλλαγμένο στην περιοχή που καλύπτει αυτός ο ιχνηθέτης. Το ποια ακριβώς είναι η μετάλλαξη η μέθοδος – στην πρώτη εκδοχή της -δεν ήταν σε θέση να την ανιχνεύσει



Παρά την υψηλή ευαισθησία της μεθόδου αυτή δεν είναι επαρκής σε μικροσκοπικά αρνητικά δείγματα και γενικά σε ασθενείς με νόσο φτωχή σε βάκιλο (π.χ. οι ασθενείς με AIDS ή τα παιδιά). Η νέα έκδοση της - που ονομάζεται Xpert MTB/RIF Ultra – εισήχθη για να αντιμετωπίσει αυτόν τον περιορισμό μιας και έχει συγκριτικά μεγαλύτερη ευαισθησία Α) στη διάγνωση της νόσου αλλά και Β) στην ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο *rpoB*. Αυτές τις ανιχνεύει πλέον με διαφορετική προσέγγιση, αυτή της ανάλυσης της θερμοκρασίας αποδιάταξης (T_m) του υβριδίου που σχηματίζει το προϊόν της PCR (amplicon) και σημασμένος - ειδικά σχεδιασμένος - ιχνηθέτης (Sloppy Molecular Beacon). Το T_m είναι χαρακτηριστικό για κάθε δίκλωνο DNA μόριο και είναι άλλο για τα υβριδικά μόρια που σχηματίζουν οι αγρίου τύπου και άλλο για αυτά των σημειακά μεταλλαγμένων αλληλουχιών, οι οποίες και ανιχνεύονται λόγω της χαρακτηριστικής μετατόπισης της καμπύλης αποδιάταξης. Τουλάχιστον για τις πιο συχνές μεταλλάξεις – όπως π.χ. την πιο S531L – ο σχεδιασμός των ιχνηθετών επιτρέπει σε περίπτωση μεικτού πληθυσμού, να πάρουμε σήμα με την μορφή διπλού peak, ακόμη και αν η συχνότητα των μεταλλαγμένων και των αγρίου τύπου στελεχών είναι 5% & 95% αντίστοιχα. Αυτή είναι μια επιπρόσθετη δυνατότητα της νέας έκδοσης και αποτελεί μια σημαντική βελτίωση που θα μπορούσε θεωρητικά να καλύψει ακόμη και την αδυναμία που έχει ορισμένες φορές η καλλιέργεια να ανιχνεύσει μεταλλαγμένα στελέχη - όταν αυτά βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση στο αρχικό πληθυσμό - λόγω διαφορετικής in-vitro ανάπτυξης τους.

Performance of Xpert MTB/RIF using culture as end point				
<i>Specimen</i>	<i>Sensitivity</i>	<i>Specificity</i>	<i>PPV</i>	<i>NPV</i>
<i>All samples (n=439)</i>	79,6 %	97,1%	88 %	94,6 %
<i>Pulmonary (n=292)</i>	83,3 %	98,1 %	94,2 %	94,1 %
<i>Extra-pulmonary (n=147)</i>	60 %	95,4 %	60 %	95,4 %
<i>AFB (+) (n=31)</i>	100%	4/5	96,3%	4/4
<i>AFB (-) (n=406)</i>	71%	97,3%	84%	94,5%
<i>Greeks (n = 309) TB Prevalence = 17,1%</i>	86,7 %	97,6%	88,5%	97,2%
<i>Foreigners (n=130) TB Prevalence = 30,7%</i>	70%	95,5%	87,5%	87,7%

Η μέθοδος Xpert χρησιμοποιείται στο εργαστήριο σε επιλεγμένα δείγματα με κριτήριο την υπόνοια ανθεκτικής νόσου ή την πιθανή αναζωπύρωση παλιάς φυματίωσης ή δείγματα από δύσκολα προσβάσιμα ανατομικά σημεία, λεμφαδένες, ΕΝΥ κ.λ.π. Τα δεδομένα στην διαφάνεια αφορούν εργαστηριακά αποτελέσματα από την πρώτη version του Xpert : Όπως βλέπουμε η σχέση πνευμονικών –εξωπνευμονικών δειγμάτων ήταν 4:3 ενώ περίπου το ~ 30% των ασθενών είναι μετανάστες. Και στην περίπτωση της Xpert MTB/RIF η ευαισθησία και η θετική προγνωστική αξία ήταν χαμηλότερη στα μικροσκοπικά αρνητικά και στα εξωαναπνευστικά δείγματα, που αποτελούν και το δυσκολότερο διαγνωστικό πρόβλημα. Οι ασθενείς έχουν και πάλι χωριστεί σε γηγενείς και ξένους.

Performance of Method F/T using culture as end point				
<i>Specimen</i>	<i>Sensitivity</i>	<i>Specificity</i>	<i>PPV</i>	<i>NPV</i>
<i>All samples (n=886)</i>	85,4 %	97,0 %	58,3 %	99,3 %
<i>Pulmonary (n=745)</i>	91,7 %	98,0 %	61,1 %	95,5 %
<i>Extra-pulmonary (n=136)</i>	40 %	97,7 %	33,3 %	97,7 %
<i>AFB (-) (n=874)</i>	81,8 %	97,7 %	53 %	99,3 %
<i>Greeks (n = 764) TB Prevalence = 3 %</i>	91,3 %	97,2 %	50 %	99,7 %
<i>Foreigners (n=122) TB Prevalence = 14,4 %</i>	77,8 %	96,2 %	77,8 %	96,2 %

24

Τα δεδομένα στην διαφάνεια αφορούν μια τρίτη μοριακή μέθοδο - την ονομάζω F/T - που για ένα διάστημα ήταν σε χρήση στο εργαστήριο και παρατίθενται γιατί θα τα χρειαστούμε στην συνέχεια. Και εδώ πάλι δίνονται χωριστά οι γηγενείς και ξένοι ασθενείς.

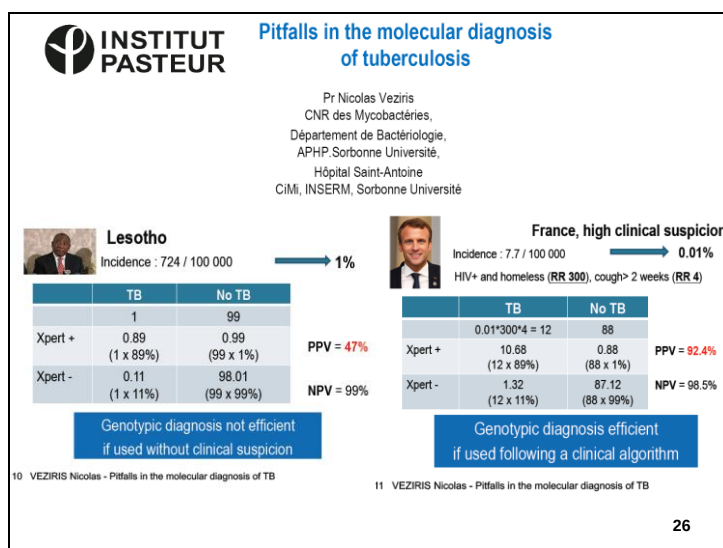
Comparison of methods						
	Method					
	AMTD		F/T		Xpert MTB/RIF	
	GR n=2151	F n=413	GR n=764	F n=122	GR n=309	F n=130
Prevalence	11,1%	24,5%	3%	14,75%	17,1%	30,7%
95%CI	9,1 - 11,7	20,1 - 28,6	1,9 - 4,5	8,9 - 22,3	13,1 - 21,8	23 - 34,5
Sensitivity	80%	80%	91,3%	77,8%	86,8%	70%
95%CI	74,3 - 85,2	70,8 - 87,3	71,9 - 98,9	52,3 - 93,6	74,6 - 94,5	53,5 - 83,4
Specificity	98,75 %	97,5%	97,2 %	97,5%	97,6 %	95,6%
95%CI	98,1 - 99,2	95 - 98,9	95,7 - 98,2	90,4 - 98,9	94,9 - 99,1	89 - 98,8
False Positive Rate	0,012%	0,025%	0,028%	0,025%	0,024%	0,045%
PPV	88,1%	90,9%	50%	77,8%	88,5%	87,5%
95%CI	82,8 - 92,2	82,9 - 96	34,2-65,8	52,3 - 93,6	76,6 - 95,6	71 - 96,5
NPV	97,7%	93,8%	99,7%	96,2%	97,2%	87,7%
95%CI	97 - 98,3	90,6 - 96,2	99 - 99,9	90,4 - 98,9	94,4 - 98,9	79,6 - 93,5
Detection Limit	3 cfu/ml		3 cfu/ml		132 cfu/ml	

Το ζήτημα που θέλω να αναδειχθεί από αυτή την διαφάνεια είναι η σημασία που έχει ο σκοπός για τον οποίο χρησιμοποιείται μια (μοριακή) μέθοδος.

Τα δεδομένα στον πίνακα είναι των τριών μεθόδων που προαναφέρθηκαν και έχουν χωριστεί για κάθε μία - AMTD, FT και Xpert - στους πληθυσμούς ελλήνων και ξένων ασθενών και ο λόγος είναι γιατί οι δύο πληθυσμοί εμφανίζουν διαφορετική επίπτωση της νόσου. Με κόκκινο είναι τα ζεύγη του χαρακτηριστικού της μεθόδου που εμφανίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ Ελλήνων και ξένων για την ίδια μέθοδο. **Η μικρές μεν αλλά στατιστικά σημαντικές διαφορές στη ευαισθησία και ειδικότητα** αντίστοιχα, για την μέθοδο Xpert και AMTD μπορούν να αποδοθούν στο διαφορετικό % πνευμονικών -εξωπνευμονικών & μικροσκοπικά θετικών/αρνητικών δειγμάτων στους δύο πληθυσμούς και δεν θα σταθώ περισσότερο.

Θα σταθώ στη πολύ χαμηλή ΘΕΤΙΚΗ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ της μεθόδου F/T στο δείγμα των ελλήνων, που το συγκεκριμένο διάστημα είχε επίπτωση μόλις 3% (επόμενο).

Έτσι βλέπουμε ότι μια μέθοδος με ευαισθησία >90% και ειδικότητα 97% - αρκετά υψηλές και οι δύο - όταν εφαρμόζεται σε ένα πληθυσμό με επίπτωση 3% οδηγεί μεν σε αρνητική προγνωστική αξία ~ 100% - δηλαδή, το αρνητικό αποτέλεσμα ουσιαστικά αποκλείει την νόσο - αλλά σε θετική προγνωστική αξία μόνο 50% (επόμενο). Αυτό συνέβη γιατί στο συγκεκριμένο πληθυσμό των Ελλήνων ασθενών, η επίπτωση ήταν ίδια με τη πιθανότητα ψευδώς θετικού αποτελέσματος. Έτσι αν μια μέθοδος δεν έχει σκοπό το πληθυσμιακό screening, για να αποκλείσει δηλαδή την νόσο - και αυτό ισχύει για αυτές που αναφερόμαστε - η εφαρμογή της πρέπει να γίνεται σε ασθενείς με πραγματικά υψηλή pre-test πιθανότητα νόσου, ώστε το αποτέλεσμα να προσθέτει στην διάγνωση.

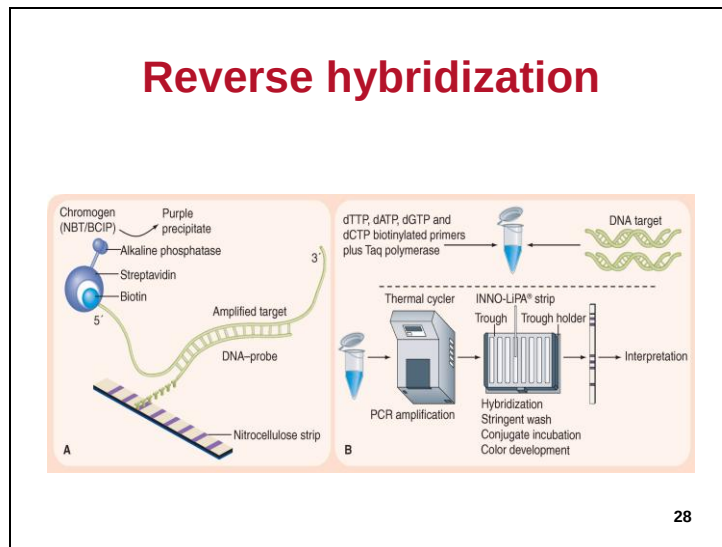


Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα που αναφέρει ο καθ. Veziris και αφορά την μέθοδο MTB-Rif ULTRA. Αν στο Lesotho, για παράδειγμα, μια από τις χώρες με την υψηλότερη επίπτωση της TB, κάνουμε screening, χωρίς επιλογή στο γενικό πληθυσμό, τότε παρά την επίπτωση 700/100.000, η θετική προγνωστική αξία της μεθόδου θα είναι κάτω από 50%. Αντίθετα στην Γαλλία με επίπτωση τα νόσου στο γενικό πληθυσμό 100 φορές μικρότερη αν η μέθοδος εφαρμοστεί σε επιλεγμένο πληθυσμό π.χ. HIV-positive ή άστεγους, με το κλινικό σύμπτωμα του βήχα που διαρκεί για > από 2 εβδομάδες, ακριβώς επειδή ο σχετικός κίνδυνος TB, στους ασθενείς αυτούς, είναι αυξημένος κατά 1200 φορές, η θετική προγνωστική αξία της μεθόδου γίνεται 92%. Τον κλινικό γιατρό στην πράξη δεν τον απασχολεί η ευαισθησία ή η ειδικότητα μιας μεθόδου, αλλά η θετική & αρνητική προγνωστική αξία της. Όταν, λοιπόν, ο κλινικός γιατρός, που μας στέλνει το δείγμα, δεν έχει αξιολογήσει σωστά ποιους ασθενείς θα ελέγξει, με βάση κλινικά ή/και άλλα κριτήρια και η pre-test πιθανότητα είναι χαμηλή, τότε το θετικό αποτέλεσμα που θα πάρει γίνεται εξαιρετικά αναξιόπιστο. Στην προκειμένη περίπτωση είναι σαν να στρίβουμε ένα νόμισμα. Δεν ισχύει βέβαια το ίδιο αν ο σκοπός είναι να αποκλείσει η νόσος, όπου και μας ενδιαφέρει η πολύ υψηλή NPV

Detection of mutations involved in drug resistance		
TABLE 1 Examples of resistance mutations and compensatory mechanisms in Mtb.		
Drug	Major resistance mutation	Compensatory mechanism
Rifampin (RIF)	<i>rpoB</i>	<i>rpoA</i> , <i>rpoC</i>
Pyrazinamide (PZA)	<i>pncA</i>	<i>pntB2</i> (epistatic)
Para-aminosalicylic acid (PAS)	<i>thyA</i>	<i>thyX</i> , <i>hsdR1</i> intergenic region associated, but not shown to be compensatory
Ethambutol (EMB)	<i>embCAB</i> operon	<i>glaA</i> (Rv3792)
Isoniazid (INH)	<i>katG</i> , <i>inhA</i>	<i>ahpC</i> promoter
Fluoroquinolones (FQ)	<i>gyrA</i>	Extragenic Rv0890c, Insertions in <i>gyrC</i> in <i>Mycobacterium aurum</i>
Bedaquiline (BDQ)	<i>mmpR</i> (Rv0678), <i>atpE</i> , <i>pepQ</i>	<i>atpB?</i> (suggested)
Clofazimine (CFZ)	<i>pepQ</i> , <i>mmpR</i>	Unknown
Protonamide (PA-824)/Delamanid (DLM)	<i>dds</i> , <i>folI</i> , <i>folA</i> , <i>folB</i> , <i>folC</i> , and <i>folD</i>	Unknown
Linezolid (LZD)	<i>rrl</i> , <i>rrpC</i>	Unknown
Capreomycin (CAP)	A1408G mutation in 16S rRNA gene (<i>rrs</i>)	Increased expression of <i>thyA</i> leading to methylation of C1409
Streptomycin (STR)	<i>rpsL</i> , <i>rrs</i> , <i>gndB</i>	<i>rpsD</i> , <i>rpsE?</i> (proposed)

- *Mycobacterium tuberculosis* has acquired drug resistance to all drugs that have been used against it, including those only recently introduced into clinical practice.
- Resistance to each new drug has occurred within five to ten years of clinical use and has occurred even more rapidly with recently introduced drugs
- Nimmo C *et al.* Front. Cell. Infect. Microbiol. 12: 954074. doi: 10.3389/fcimb.2022.954074

Να περάσουμε στην μοριακή ανάλυση των μεταλλάξεων που ενέχονται στην αντοχή στα Α/Φ. Το MTB έχει εμφανίσει ανθεκτικά στελέχη σε όλα τα φάρμακα που έχουν χρησιμοποιηθεί εναντίον του, σε διάστημα 5-10 χρόνια από την εισαγωγή τους και μάλιστα για ορισμένα από καινούργια φάρμακα σε ακόμη συντομότερο χρόνο. Στον πίνακα φαίνονται τα κυριότερα από τα γονίδια στα οποία έχουν εντοπισθεί μεταλλάξεις που ενέχονται στην αντοχή στα αντίστοιχα φάρμακα. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι μεταλλάξεις εντοπίζονται σε περιορισμένες περιοχές των αντίστοιχων γονιδίων και αυτό διευκόλυνε την ανάπτυξη τεστ με μεθόδους ανάστροφου υβριδισμού που επιτρέπουν την ανίχνευση των συγκεκριμένων μεταλλάξεων και τα οποία ευρέως χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα.



Στις μεθόδους ανάστροφου υβριδισμού πολλαπλασιάζουμε με PCR και με την χρήση σημασμένων εκκινητών, τις περιοχές των γονιδίων στις οποίες εντοπίζονται οι πιθανές μεταλλάξεις. Στην συνέχεια τα σημασμένα προϊόντα που προκύπτουν από τον πολλαπλασιασμό υβριδίζονται σε ιχνηθέτες που είναι ακινητοποιημένοι σε ταινίες νιτροκυτταρίνης και γίνεται η εμφάνιση του σήματος.



Στην διαφάνεια φαίνονται οι μεμβράνες υβριδισμού της μεθόδου MTBDRplus που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των κυριότερων μεταλλάξεων που ευθύνονται για την αντοχή στην RIF & την INH. Οι ακινητοποιημένοι στις μεμβράνες ιχνηθέτες αντιστοιχούν στις άγριου τύπου αλληλουχίες και στις συχνότερες μεταλλάξεις. Το προϊόν της PCR ανάλογα με την σύσταση του - που διαφέρει ανάλογα με το αν έχει προέλθει από τον πολλαπλασιασμό άγριου τύπου ή μεταλλαγμένου γονιδίου -θα υβριδιστεί ειδικά με τον αντίστοιχο ιχνηθέτη. Έτσι παίρνουμε διαφορά patterns υβριδισμού που ενδεικτικά μπορεί να αντιστοιχούν σε (επόμενο, επόμενο, επόμενο) ...

Correlation of <i>rpoB</i> genotype and <i>in vitro</i> susceptibility testing		
Genotype	Conventional DST on L-J (20 µg/ml RIF)	
	Resistant (n)	Susceptible (n)
<i>rpoB</i> wt	0	1415
<i>rpoB</i> mut	51	4 (H526L, H526N, S531F, ΔWT8)
<i>rpoB</i> ΔWT7(<i>pol</i> 1341C>T)	0	10 (6)

Ποια η συσχέτιση των γενετικών δεδομένων με τον φαινότυπο ?

Επειδή στις ταινίες υβριδισμού δεν υπάρχουν ιχνηθέτες για όλες τις πιθανές μεταλλάξεις, υπάρχουν στελέχη στα οποία μπορεί να εντοπισθεί απουσία της αγρίου τύπου αλληλουχίας χωρίς όμως να ανιχνεύεται και η μετάλλαξη. Χαρακτηριστικά, για ένα διάστημα 2 χρόνων απομονώσαμε στο ΕΚΑΜ έναν αριθμό στελεχών που εμφάνιζαν έλλειψη «σήματος» υβριδισμού σε έναν από τους ιχνηθέτες που αντιστοιχεί σε άγριου τύπου αλληλουχία χωρίς όμως και σήμα υβριδισμού σε ιχνηθέτη που αντιστοιχεί σε γνωστή μετάλλαξη. Τα στελέχη αυτά ήταν φαινοτυπικά ευαίσθητα στη καλλιέργεια. Η αλληλουχοποίηση ενός αριθμού από αυτά τα στελέχη, εντόπισε την παρουσία σιωπηλής μετάλλαξης, άρα η πρωτεΐνη ήταν λειτουργική -δηλαδή ικανή να προσδένει την ριφαμπικίνη - και ως εκ τούτου το στέλεχος ευαίσθητο. Διαφοροποιήσεις μεταξύ των μεθόδων μπορούν να εντοπιστούν και στην περίπτωση ορισμένων σπάνιων μεταλλάξεων με γνωστό χαμηλό MIC (Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του φαρμάκου). Έτσι στα υπόλοιπα 1470 στελέχη που είχαν αναλυθεί την συγκεκριμένη περίοδο, εντοπίστηκαν 4 ακόμη διαφοροποιήσεις, η μια αφορούσε στέλεχος χωρίς γνωστή μετάλλαξη (ΔWT8) το οποίο δεν διερευνήθηκε περεταίρω, 2 στελέχη με μεταλλάξεις με γνωστό χαμηλό MIC και ένα για το οποίο η διαφοροποίηση πιθανότητα οφείλονταν σε τεχνικό σφάλμα στην φαινοτυπική ανάλυση.

Comparison between MTBDR _{plus} and DST results (n=1480 strains)		
Genotype	Conventional DST on L-J (0.2μg/ml ISO)	
	Resistant (n)	Susceptible (n)
Wild type	10	1334
Mutated	114	22 1 <i>InhA</i> [-17G>T], 13 <i>InhA</i> [-15C>T], 2 <i>InhA</i> [-15C>T]+WT <i>InhA</i> , 1 <i>InhA</i> ΔWT1, 1 Δ <i>InhA</i> , 2 <i>katG</i> (S315T1), 1Δ <i>katG</i> , 1 <i>katG</i> ΔWT
Se =92%, Sp=98,3%, PPV=83,8%, NPV= 99,2%		

Όσον αφορά την ισονιαζίδη εδώ εντοπίζονται περισσότερες αναντιστοιχίες με τα φαινοτυπικά αποτελέσματα. Έναν αριθμό ανθεκτικών στελεχών τον χάνουμε λόγω της πιθανής παρουσίας μεταλλάξεων σε άλλα γονίδια, πέραν των δύο περιοχών που εστιάζει το τεστ – τις μεταλλάξεις S315T του γονιδίου *katG* και μεταλλάξεις στα -15 & -17 nts στον υποκινητή του γονιδίου *inhA*. Επίσης για έναν αριθμό στελεχών με μετάλλαξη στο υποκινητή του γονιδίου *inhA*, η καλλιέργεια έδειξε ευαισθησία. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι αυτές οι μεταλλάξεις συνδέονται με αντοχή σε χαμηλές συγκεντρώσεις του φαρμάκου, μιας και δρουν μεταβάλλοντας τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου. Συνήθως, λόγω του μηχανισμού με τον όποιον ασκούν την δράση τους οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *inhA*, η αντοχή στην INH, σε αυτούς τους ασθενείς, αντιμετωπίζεται θεραπευτικά με αύξηση της δόσης του φαρμάκου. Οι διαφορές αυτές υποδηλώνουν την αξία που έχει η επιβεβαίωση της τελικής εικόνας με την καλλιέργεια. Βέβαια υπάρχουν μεταλλάξεις - όπως η S315T στο κωδικόνιο του γονιδίου *katG*, η οποία είναι και η πιο συχνή - που η παρουσία τους συνδέεται απόλυτα με αντοχή στην ισονιαζίδη. Για αυτές η PPV =100%.



Για τα δευτερεύοντα Α/Φ χρησιμοποιούνται τεστ με ανάλογη προσέγγιση ανάστροφου υβριδισμού. Στο MTBDRsl v.1, που χρησιμοποιείτο μέχρι πρόσφατα, στόχοι ήταν οι περιοχές των γονιδίων της *gyrA* και του *rrs* που εντοπίζονται οι πιο κοινές μεταλλάξεις που ενέχονται στην αντοχή στις FQ και τα ενέσιμα Α/Φ αντίστοιχα, ενώ επιπρόσθετα το τεστ έχει τη δυνατότητα να ελέγχει και για μεταλλάξεις στο γονίδιο *embB* που ενέχονται στην αντοχή στην εθαμβουτόλη.

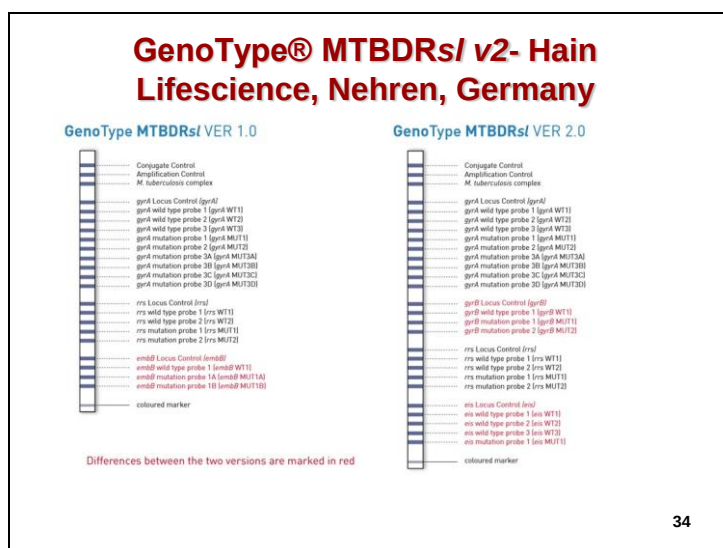
Table 2.3.4. Accuracy of GenoType MTBDRs/ (version 1.0) for fluoroquinolone and SLID resistance and XDR-TB, indirect and direct testing (smear-positive specimens), culture-based DST reference standard

Pooled sensitivity (95% CI)	Pooled specificity (95% CI)	Pooled sensitivity (95% CI)	Pooled specificity (95% CI)	Pooled sensitivity P value*	Pooled specificity P value*
Fluoroquinolones, indirect testing (19 studies, 2223 participants)		Fluoroquinolones, direct testing (9 studies, 1771 participants)			
85.6% (79.2–90.4%)	98.5% (95.7–99.5%)	86.2% (74.6–93.0%)	98.6% (96.9–99.4%)	0.932	0.333
SLID, indirect testing (16 studies, 1921 participants)		SLID, direct testing (8 studies, 1639 participants)			
76.5% (63.3–86.0%)	99.1% (97.3–99.7%)	87.0% (38.1–98.6%)	99.5% (93.6–100.0%)	0.547	0.664
XDR-TB, indirect testing (8 studies, 880 participants)		XDR-TB, direct testing (6 studies, 1420 participants)			
70.9% (42.9–88.8%)	98.8% (96.1–99.6%)	69.4% (38.8–89.0%)	99.4% (95.0–99.3%)	0.888	0.855

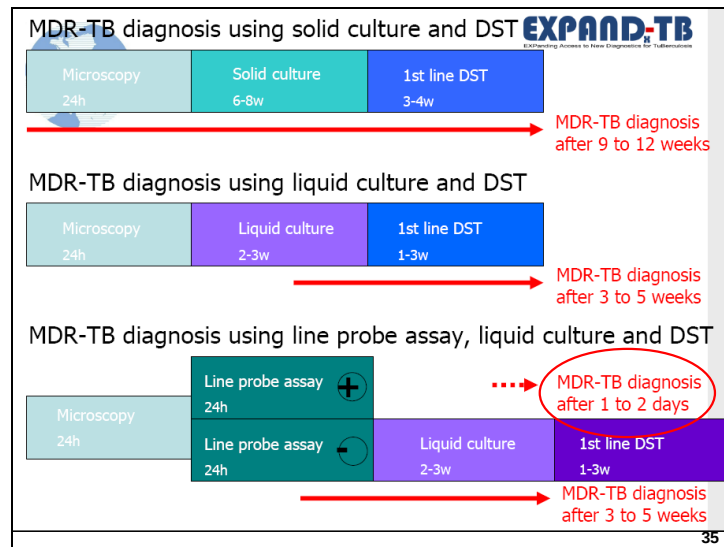
CI: confidence interval; DST: drug susceptibility testing; SLID: second-line injectable drugs; XDR-TB: extremely drug-resistant tuberculosis.
 * Likelihood ratio test for evidence of a significant difference between accuracy estimates.

WHO consolidated guidelines on tuberculosis: rapid diagnostics for tuberculosis detection. Third edition.

Στην διαφάνεια φαίνονται τα δεδομένα μετά-αναλύσεων που συμπεριέλαβαν πάρα πολλά περιστατικά και αφορούν την ευαισθησία και ειδικότητα της μεθόδου, για κάθε επιμέρους δεύτερης γραμμής αντιφυματικό φάρμακο συγκρινόμενα πάντα με την φαινοτυπικό αποτέλεσμα.
 Η ευαισθησία κυμαίνεται από 76- ~86% ενώ η ειδικότητα είναι πάνω από 98%



Και εδώ έχουμε την εισαγωγή πρόσφατα νεώτερης έκδοσης του τεστ. Οι αλλαγές φαίνονται στην διαφάνεια με κόκκινο. Δεν υπάρχει στην v2 το panel για το γονίδιο *emdB*, που όπως είδαμε είχε χαμηλή ευαισθησία, ενώ έχουν προστεθεί α) panel με την αγρίου τύπου αλληλουχία και τις δύο κοινότερες μεταλλάξεις στο γονίδιο της *gyrB* για να αυξηθεί η ευαισθησία διάγνωσης αντοχής στις F/Q και panels με μεταλλάξεις στον υποκινητή του γονιδίου *eis* που οδηγούν σε υπερέκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου και αντίστοιχα σε αυξημένη παραγωγή του ένζυμου aminoglycoside acetyltransferase που αδρανοποιεί ειδικά την kanamycin.



Με την χρήση των μεθόδων αυτών μπορεί να μειωθεί δραματικά ο χρόνος διάγνωσης της φαρμακευτικής αντοχής. Θεωρητικά μπορεί να περιοριστεί στις 1-2 ημέρες μετά από το θετικό μικροσκοπικό ή μοριακό αποτέλεσμα

 **Application of the MTBDRplus assay on primary samples**

MICROSCOPY	INFORMATIVE RESULT*	
	YES	NO
POSITIVE	302 (93,8%)	20 (6,2%)
NEGATIVE	80 (65%)	43 (35%)
SUSPICIOUS	2	1

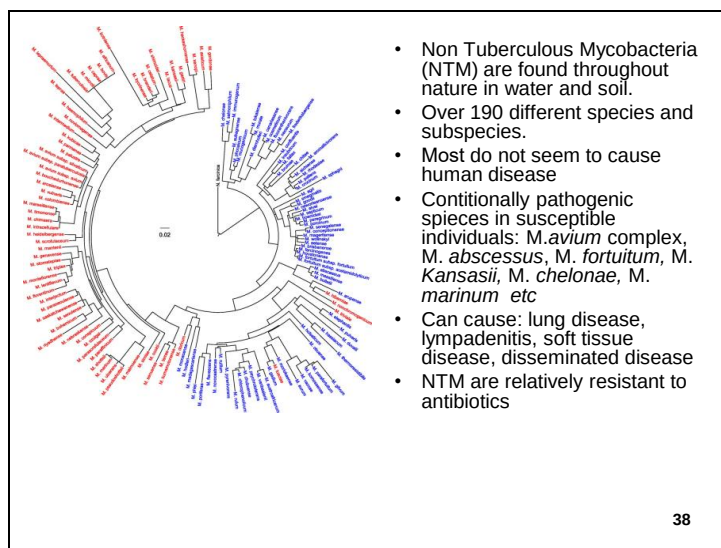
* Culture Positive samples

36

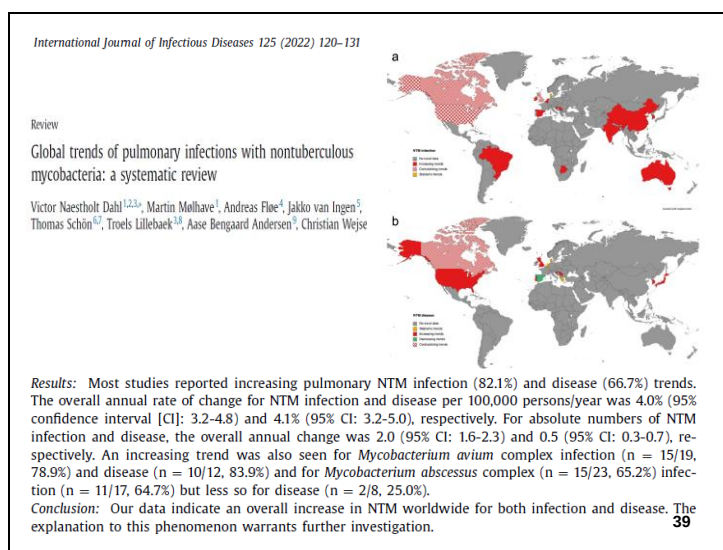
Στην πράξη για το εργαστήριο μας η αποτελεσματικότητα της μεθόδου MTBDRplus σε ότι αφορά την δυνατότητα να πάρουμε αξιοποιήσιμο - πληροφοριακό – αποτέλεσμα είναι πολύ υψηλή στα μικροσκοπικά θετικά δείγματα >90%, αλλά χαμηλότερη ~ 65% στα μικροσκοπικά αρνητικά δείγματα – δηλαδή αυτά με χαμηλότερο βακτηριακό φορτίο

 TIME TO RESULT		
	Days	
First Line TB Drugs	Mean $\pm$ S.D.	Min –Max
AFB - (n=30)	6,75 $\pm$ 3,22	2 - 15
AFB + (n=94)	5,68 $\pm$ 3,16	1 - 22
	Days	
MDR	Mean $\pm$ S.D.	Min –Max
First Line Drugs (n=7)	5,14 $\pm$ 3,9	2 - 13
Second Line Drugs (n=5)	7,8 $\pm$ 5,6	3 - 17
REDUCTION IN TIME TO DIAGNOSIS		
Mean ($\pm$ SD) : 48,7 $\pm$ 14,6 days Min-Max: 13 - 82 day		
37		

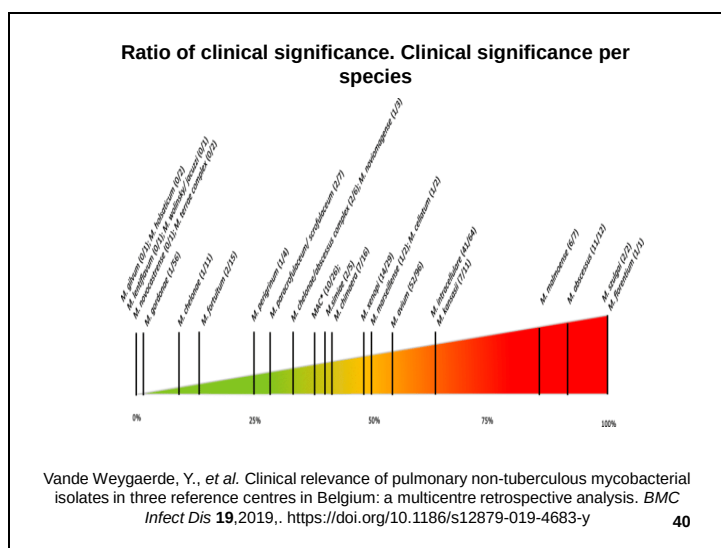
Όταν οι μέθοδοι είναι πληροφοριακές στο άμεσο δείγμα, τότε το αποτέλεσμα της αντοχής το έχουμε κατά μέσον όρο 49 ημέρες νωρίτερα από το αποτέλεσμα της φαινοτυπικής ευαισθησίας και είναι προφανές τι σημαίνει αυτό και για τον ασθενή και για τον έλεγχο της διασποράς της νόσου



Εκτός από τα είδη του MTBC και τα δύο που προκαλούν την λέπρα, τα υπόλοιπα είδη μυκοβακτηριδίων χαρακτηρίζονται γενικά - και σε αντιδιαστολή - ως μη φυματιώδη μυκοβακτηρίδια (NTM). Έχουν χαρακτηριστεί πάνω από 260 είδη. Αυτά είναι είτε σαπροφυτικά / περιβαλλοντικά ή έχουν άλλους από τον άνθρωπο, ζωικούς ξενιστές. Αρκετά από αυτά όμως, είναι δυνάμει παθογόνα και για τον άνθρωπο. Μπορούν να προκαλέσουν ανάλογα, πνευμονική νόσο, λεμφαδενίτιδα, νόσους των μαλακών μορίων ή ακόμη και διάχυτη νόσο, κυρίως σε ανασοκατασταλμένα άτομα. Πολλά είναι σχετικά ανθεκτικά στα αντιβιοτικά και απαιτούν μακρόχρονη θεραπεία με συνδυασμό φαρμάκων. Ο χαρακτηρισμός τους σε επίπεδο είδους είναι αναγκαίος και για να τεθεί η διάγνωση και για το σχεδιασμό της θεραπείας και για την πρόγνωση και παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου.



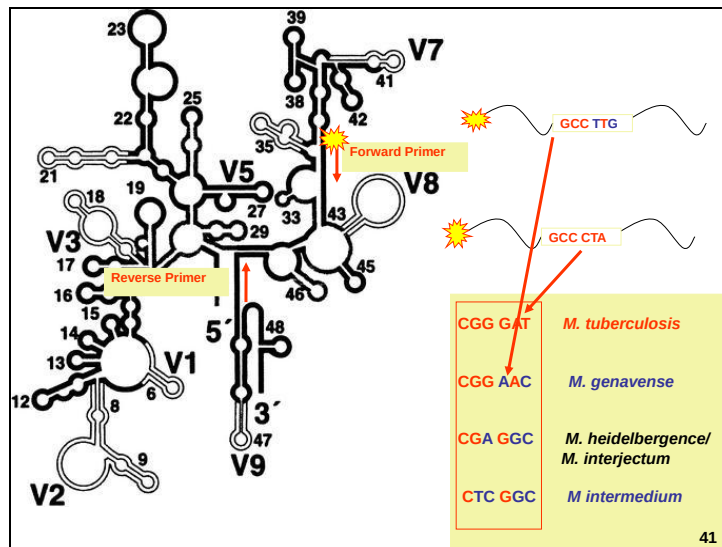
Η πιο πρόσφατη και εκτεταμένη Μέτα-ανάλυση έδειξε ότι καταγράφεται αυξητική τάση και σε ότι αφορά την λοίμωξη αλλά και την νόσο για τις χώρες που παρουσίασαν δεδομένα, που είναι αυτές που απεικονίζονται με χρώμα στον χάρτη. Πολλοί και διαφορετικοί παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί, για αυτή την αυξητική τάση, όπως η γήρανση του πληθυσμού και η συνεπακόλουθη πτώση του ανοσοποιητικού, η αύξηση υποκειμένων νοσημάτων, η αύξηση της χρήσης ανοσοτροποποιητικών φαρμάκων, αλλαγές στον τρόπο ζωής κ.λ.π. αλλά και η ίδια η αύξηση της επαγρύπνησης των κλινικών γιατρών. Από την άλλη η βελτίωση των διαγνωστικών μέσων κυρίως με την εισαγωγή των μοριακών τεχνικών έχει βελτιστοποιήσει την σωστή διάγνωση και κατά συνέπεια και την αυξημένη καταγραφή.



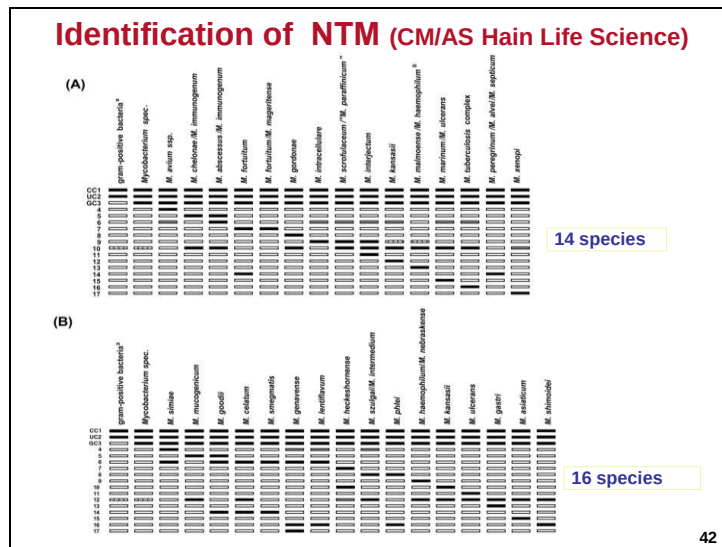
Ενώ η απομόνωση στην καλλιέργεια NTM από στείρα δείγματα (π.χ. LN) είναι αρκετή για να θέσει την διάγνωση νόσου από μη φυματιώδη μυκοβακτηρίδια, σε ότι αφορά την πνευμονική νόσο, που είναι και η πιο συχνή, τα πράγματα είναι πιο περίπλοκα μιας και η θετική καλλιέργεια μπορεί να αντανακλά την παροδική επιμόλυνση, εξαιτίας της καθολικής παρουσίας των NTM στο περιβάλλον. Έτσι έχουν υιοθετηθεί κριτήρια από τις ATS/ERS/ESCMID/IDSA για τη διάγνωση της πνευμονικής νόσου από NTM που είναι συνδυασμός, κλινικών, ακτινολογικών και μικροβιολογικών ευρημάτων

Για να πληρούνται τα τελευταία χρειάζεται η ταυτοποίηση του ίδιου NTM σε δυο τουλάχιστον ξεχωριστά δείγματα του ασθενούς. Ακόμη, όμως και τότε, η πιθανότητα το εύρημα μας να αντανakλά πραγματική νόσου ποικίλει με βάση το είδος του NTM. Στη διαφάνεια φαίνονται τα δεδομένα μιας χαρακτηριστικής μελέτης, η οποία «τοποθέτησε» τα είδη με βάση τη λοιμογόνο δράση τους, αφού υπολογίστηκε στο σύνολο των ασθενών που πληρούσαν τα μικροβιολογικά κριτήρια το % των ασθενών που πληρούσαν και τα κλινικά & απεικονιστικά κριτήρια, είχαν δηλαδή με βάση τα guidelines διαγνωσμένη νόσο. Αριστερά βρίσκονται τα είδη που σπανίως ή και ποτέ δεν ταυτίζονταν με νόσο και πηγαίνουν προς τα δεξιά συναντάμε πιο παθογόνα για να φτάσουμε σε είδη, όπως π.χ. το *M. sulzgaï*, που η εργαστηριακή απομόνωση του σημαίνει πάντα νόσο.

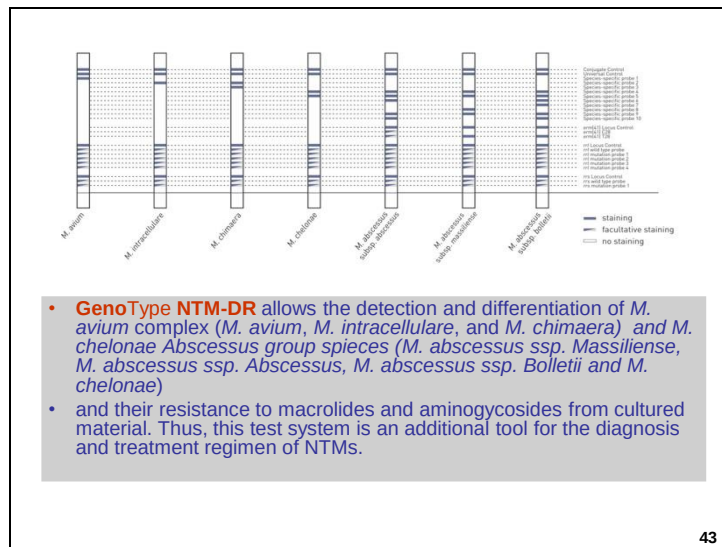
Βλέπουμε λοιπόν την τεραστία σημασία που έχει για την διάγνωση η ταυτοποίηση των NTM σε επίπεδο είδους.



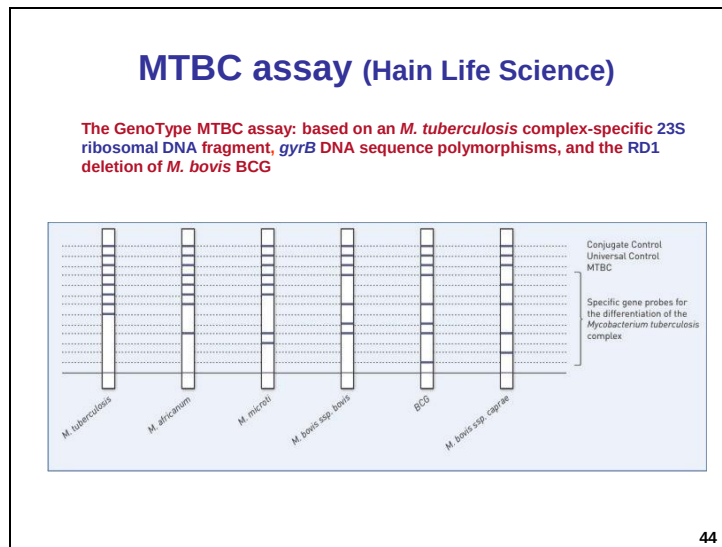
Για την ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους των NTM χρησιμοποιούνται επίσης μέθοδοι ανάστροφου υβριδισμού αντίστοιχες με αυτές που αναφέρθηκαν για την διερεύνησης της αντοχής του *M. tuberculosis* στα A/Φ. Πολλαπλασιάζουμε με σημασμένους ιχνηθέτες την υπερμεταβλητή περιοχή του 16S ριβοσωμικού RNA - που είναι ο στόχος μας στην προκειμένη περίπτωση - και το προϊόν της PCR υβριδίζεται σε ακινητοποιημένους ιχνηθέτες που φέρουν ο καθένας την χαρακτηριστική για το κάθε είδος αλληλουχία



Τα patterns υβριδισμού που παίρνουμε είναι χαρακτηριστικά του είδους και μας επιτρέπουν να διάφορο-διαγνώσουμε, με τις δυο μεθόδους που είναι σε χρήση στο εργαστήριο, 14 & 16 κοινά και σχετικά πιο σπάνια είδη NTM αντίστοιχα.



Μια επιπρόσθετη μέθοδος, ανάστροφου υβριδισμού , επιτρέπει την ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους των μελών που ανήκουν στα *M. avium* & *M. abscessus/chelonae* complexes – που αποτελούν τις πιο κοινές αιτίες λοίμωξης με NTM - όπως και την μοριακή διερεύνηση της αντοχής τους στα ειδικά φάρμακα – τις μακρολίδες & αμινογλυκοσίδες - που χρησιμοποιούνται για να αντιμετωπιστούν αυτές οι σχετικά δύσκολες, στη θεραπεία τους, λοιμώξεις.



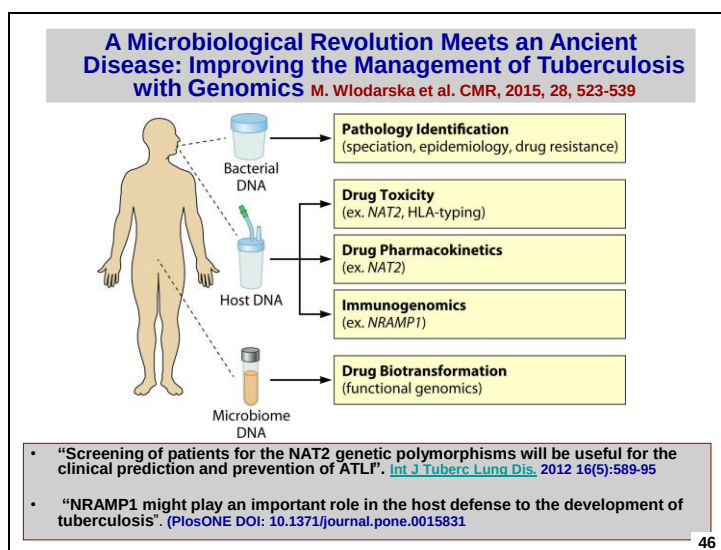
Μεθόδους ανάστροφου υβριδισμού χρησιμοποιούμε στα εργαστήριο και για το διαχωρισμό σε επίπεδο είδους των μελών του MTBC, αν αυτό κρίνεται απαραίτητο. Τα είδη αυτά που έχουν πανομοιότυπη 16S ριβοσωμική RNA αλληλουχία διαχωρίζονται με την στόχευση περιοχών του 23 S ριβοσωμικού RNA, του γονιδίου της γυράσης B και μιας γενετικής περιοχή γνωστής ως Region of Difference 1 που απουσιάζει στο *M. bovis* BCG

The use of next-generation sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex: technical guide (WHO 2018)

- Next-generation sequencing (NGS) is a powerful tool with the capacity to improve tuberculosis (TB) management and control through the rapid and accurate detection of all clinically relevant mutations, and thereby the rapid diagnosis of drug-resistant TB (DR-TB) in clinical specimens.
- This information is crucial for clinicians to make prompt decisions regarding the best therapy to adopt for treatment of multi- and extensively DR-TB (M/XDR-TB)
- Over time, NGS technologies that enable comprehensive, rapid DST are anticipated to reduce the need for phenotypic DST for DR-TB diagnosis, especially for drugs for which phenotypic methods are often unreliable, such as pyrazinamide.

45

Φυσικά και στην φυματίωσης, όπως και σε άλλα πεδία, αυτό που αλλάζει δραστικά την εργαστηριακή διάγνωση είναι οι δεύτερης και τρίτης γενιάς μεθοδολογίες αλληλουχοποίησης του γενετικού υλικού. Αυτές έχουν την δυνατότητα, με την παράλληλη αλληλουχοποίηση του DNA, να παράγουν τεράστιες ποσότητες δεδομένων σε πολύ μικρό χρόνο και με σχετικά πολύ μικρό κόστος. Το DNA μπορεί να έχει απομονωθεί από μια καλλιέργεια ή από ένα κλινικό δείγμα. Το ζητούμενο, εκτός από την διάγνωση της νόσου, είναι να προσφέρουν και πλήρη εικόνα για την φαρμακευτική ευαισθησία ή αντοχή αντικαθιστώντας τις χρονοβόρες- κοστοβόρες και επικίνδυνες όσον αφορά την βιοασφάλεια, φαινοτυπικές προσεγγίσεις που στηρίζονται στην καλλιέργεια. Με στόχο βεβαία την εξατομίκευση της θεραπευτική αγωγής για την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση της νόσου



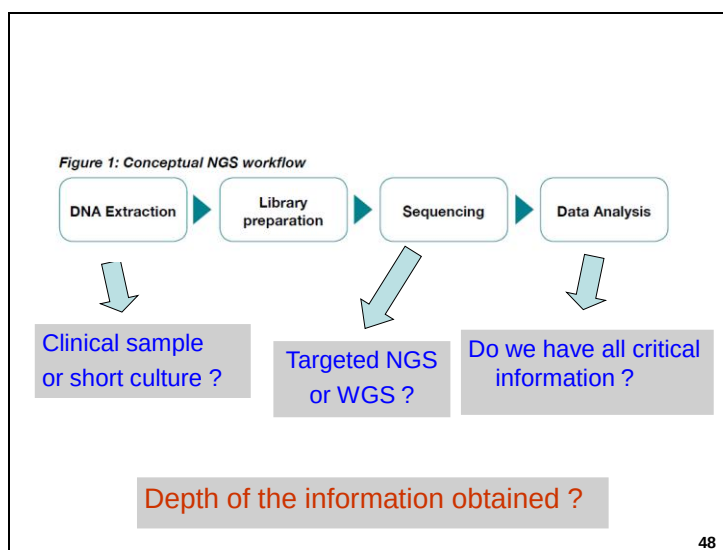
Ιδεατός στόχος είναι να δίνεται όσον το δυνατόν πιο γρήγορα η πιο αποτελεσματική εξατομικευμένη θεραπεία, παίρνοντας υπ’ όψιν όχι μόνο τα χαρακτηριστικά του βακίλου αλλά και τον γενετικό υπόβαθρο του ασθενούς, έχοντας πληροφορίες για κρίσιμους πολυμορφισμούς όπως π.χ. αυτούς στο γονίδιο *NAT2* που προδιαθέτουν για ηπατοτοξικότητα στην ισονιαζίδα ή ίσως ακόμη και την συνολική σύσταση του εντερικού μικροβιωματος, που μπορεί να επηρεάζει παραμέτρους, όπως ο μεταβολισμός των φαρμάκων και κατά συνέπεια την βιοδιαθεσιμότητά τους. Ακόμη απέχουμε αρκετά από κάτι τέτοιο, όχι μόνο ή κυρίως από τεχνική άποψη, αλλά και από το να έχουμε την πλήρη εικόνα της βιολογικής σημασίας του τεράστιου όγκου των πληροφοριών που μπορούν και παράγουν οι μεθοδολογίες του NGS.

- **Novel katG mutations causing isoniazid resistance in clinical *M. tuberculosis* isolates**
"We report the discovery and confirmation of 23 novel mutations with previously undocumented role in isoniazid (INH) drug resistance, in catalase-peroxidase (katG) gene of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) isolates. With these mutations, a synonymous mutation in fabG1g609a, and two canonical mutations, we were able to explain 98% of the phenotypic resistance observed in 366 clinical Mtb isolates collected from four high tuberculosis (TB)-burden countries."
J.N.Torres *et al.* *Emerging Microbes and Infections* (2015); doi:10.1038/emi.2015.42
- **A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*.**
(WGS sequencing of) "Mutants selected in vitro suggest that the drug targets the proton pump of adenosine triphosphate (ATP) synthase."
Andriers K. *et al.* *Science*, 2005 Jan 14;307(5707):223-7.
- **"Systematic review of mutations associated with resistance to the new and repurposed *Mycobacterium tuberculosis* drugs bedaquiline, clofazimine, linezolid, delamanid and pretomanid"**
"..studies characterized 277 mutations in the genes atpE, mmpR, pepQ, Rv1979c, fgd1, fbiABC and ddn and their association with resistance to one or more of the five drugs".
S. Kadura *et al.* *J Antimicrob Chemother* 2020; 75: 2031–2043

Σε ερευνητικό επίπεδο οι δυνατότητες που μας παρέχουν οι τεχνολογίες του NGS είναι τεράστιες. Η συσχέτιση των γονοτυπικών και των φαινοτυπικών δεδομένων διευκολύνεται σημαντικά αφού μπορούμε να έχουμε πολύ εύκολα την συνολική εικόνα του γονότυπου του οργανισμού. Κάποια χαρακτηριστικά παραδείγματα για το MTB δίνονται στην διαφάνεια:

Χρησιμοποιώντας την τρίτης γενιάς τεχνολογία NGS, ερευνητική ομάδα από το Παν/μιο του San Diego, εντόπισε – και επιβεβαίωσε στην συνέχεια με μεταλλαξογένεση στο *M. smegmatis* – 23 νέες μεταλλάξεις που ενέχονται στην αντοχή στην ισονιαζίδη. Με αυτές και τις ήδη γνωστές, που αναφέρθηκαν πριν, ήταν σε θέση να ερμηνεύσουν πλέον την αντοχή στο 98% των 366 στελεχών που μελέτησαν.

Από την άλλη η αλληλουχοποίηση στελεχών επιλεγμένων για την αντοχή τους στα νέα φάρμακα μπορεί να υποδείξει μηχανισμούς ανάπτυξης αντοχής σε αυτά, αλλά και να αποκαλύψει τον ενδοκυττάριο στόχο τους, όταν αυτοί δεν είναι γνωστοί όπως στην περίπτωση των diarylquinolones.



Υπάρχουν διάφορες πλατφόρμες NGS και δεν θα μπω σε τεχνικά ζητήματα. Όλες περιλαμβάνουν τα στάδια που αναφέρονται διαγραμματικά στην διαφάνεια. Απομόνωση DNA, πολλαπλασιασμός του με PCR— στις δεύτερης αλλά όχι στις τρίτης γενιάς μεθόδους – και δημιουργία βιβλιοθήκης με τους κλώνους, παράλληλη αλληλουχοποίηση των κλώνων και ανάλυση των δεδομένων

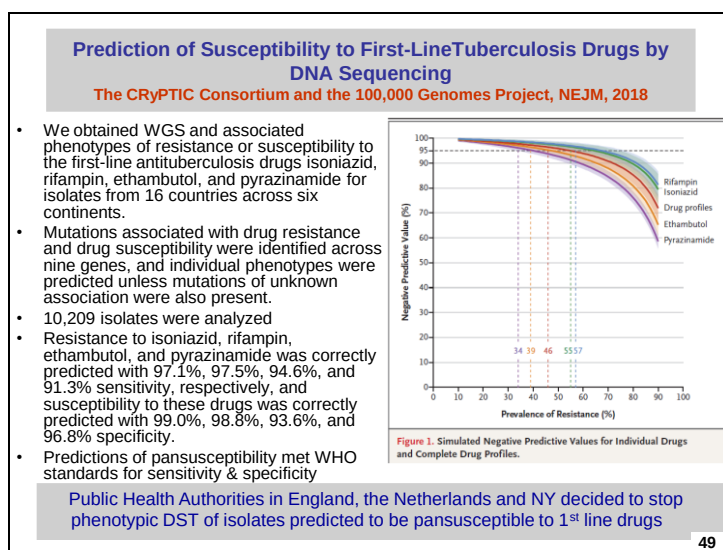
Σε όλα τα στάδια υπάρχουν ανοιχτά ζητήματα τα οποία αφορούν:

1. Το υλικό από το οποίο μπορούμε να ξεκινήσουμε. Μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε το κλινικό δείγμα ή χρειάζεται εμπλουτισμός του μετά από καλλιέργεια ή με άλλο τρόπο π.χ. επιλεκτικό «ψάρεμα» του βακίλου ?
2. Η αλληλουχοποίηση θα καλύπτει όλο το γενετικό υλικό ή αρκεί η κάλυψη επιλεγμένων περιοχών του (π.χ. γονίδια που ενέχονται στην αντοχή).

Τα πτύελα π.χ. είναι πλούσια σε ανθρωπινά κύτταρα – και άλλη χλωρίδα – και το WGS, χωρίς εμπλουτισμό, δίνει συνήθως πάνω από 99% αλληλουχίες ομόλογες με αυτές του ανθρώπου, με αποτέλεσμα χαμηλή ευαισθησία, σε αντίθεση με την στοχευόμενη αλληλουχοποίηση (tNGS)

3. Έχουμε όλη την κλινικά χρήσιμη πληροφορία? Γνωρίζουμε την κλινική σημασία κάθε μετάλλαξης ή πολυμορφισμού, ώστε να περιοριστούμε στην τεχνικά πιο εύκολη στοχευόμενη αλληλουχοποίηση ?

4. Πόσο εξαντλητική είναι η πληροφορία που παίρνουμε ώστε να μην μας διαφεύγει κάτι κλινικά σημαντικό και να αντικαταστήσουμε άλλες προσεγγίσεις ? Ανιχνεύουμε π.χ. ετεροαντοχή (την παρουσία δηλαδή υπολειπόμενου πληθυσμού) και σε ποιο ποσοστό ? Μπορούμε να καταργήσουμε τελείως την καλλιέργεια ? Αυτά είναι ακόμη ανοικτά ζητήματα και από τεχνική άποψη και από την άποψη της πληρότητας της πληροφορίας.



Το 2018 το διεθνές consortium CRyPTIC και το βρετανικό πρόγραμμα των 100.000 genomes, δημοσίευσε τα δεδομένα μιας εκτεταμένης ανάλυσης, στη οποία συσχέτισαν το γονότυπο με το φαινότυπο για πάνω από 10.000 στελέχη μυκοβακτηριδίων. Η ανάλυση των μεταλλάξεων σε 9 γενετικούς τόπους ήταν αρκετή για να προβλέψει με υψηλή ακρίβεια την ευαισθησία για τα τέσσερα πρωτεύοντα αντιφυματικά φάρμακα. Προσομοιώνοντας τα δεδομένα τους με διαφορετικές επιπτώσεις αντοχής, βρήκαν ότι η αρνητική προγνωστική αξία για την αντοχή στα φάρμακα αυτά, παραμένει πολύ υψηλή, ακόμη και αν θεωρήσουμε επιπτώσεις αρκετά μεγάλες - πολύ πέρα από αυτές που συναντώνται στην πραγματικότητα. Γιατί με την NPV ισχύει το αντίστροφο από την PPV: όσο αυξάνει η επίπτωση τόσο μειώνεται η NPV. Με αυτά τα στοιχεία και με το δεδομένο ότι η αξιοπιστία της προσέγγισης ικανοποιεί τα standards που θέτει ο ΠΟΥ, η Μ. Βρετανία, η Ολλανδία κ.α. σταμάτησαν τον φαινοτυπικό έλεγχο με την καλλιέργεια στα στελέχη που γενετικά κρίνονται ως παν-ευαίσθητα.. Το γενετικό υλικό του βακίλου για το WGS που εφαρμόζουν, απομονώνεται μετά από ολιγοήμερη (~3 ημέρες) ανάπτυξη του σε υγρή καλλιέργεια.



Phenotypic Susceptibility Testing for *Mycobacterium tuberculosis*

National Mycobacterium Reference Service

What does this mean?

Drug	WGS Prediction	Predictive value (%)
Rifampicin	Sensitive	>98.5
Isoniazid	Sensitive	>98.5
Pyrazinamide	Sensitive	>98.5
Ethambutol	Sensitive	>98.5

Drug	WGS Prediction	Predictive value (%)
Rifampicin	No prediction	>97.8
Isoniazid	Sensitive	>98.5
Pyrazinamide	No prediction	>97.8
Ethambutol	No prediction	>97.8

Key Points

- Improved performance of WGS allows for reduced phenotypic testing
- Predictive value of sensitive prediction is at least 98.5%
- 70 – 85% of *M. tuberculosis* isolates will no longer undergo phenotypic susceptibility testing
- Isolates predicted to have resistance to one or more first line agents, or where WGS information is insufficient to make a prediction, will have phenotypic testing performed
- The choice of drugs tested phenotypically will depend on the pattern of WGS predictions



50

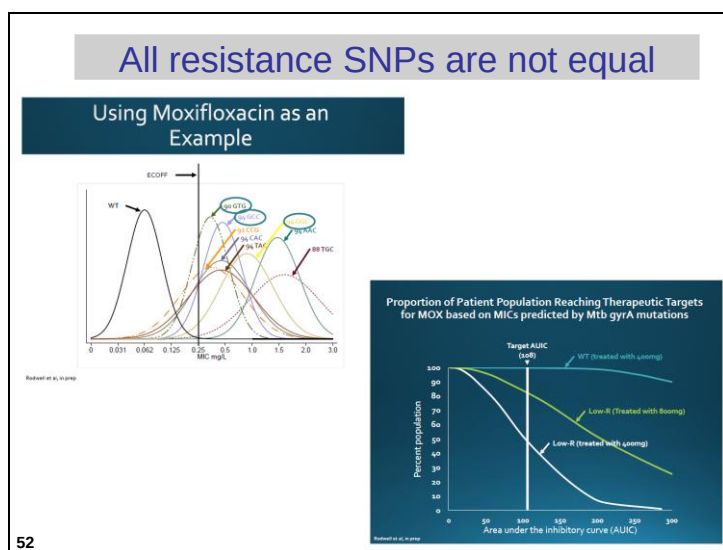
Στη Μ. Βρετανία π.χ. το Εθνικό Σύστημα Αναφοράς για τα Μυκοβακτήρια δεν κάνει φαινοτυπικό έλεγχο αντοχής για τα στελέχη στα οποία η αλληλουχοποίηση δεν εντοπίζει μεταλλάξεις αντοχής στα 4 κύρια Α/Φ, μιας και η πρόβλεψη για αυτά είναι ακριβής για τουλάχιστον το 98,5% των περιπτώσεων. Αυτό στην πράξη σημαίνει ότι δεν γίνεται κανένας φαινοτυπικός έλεγχος για το 70-85% των στελεχών. Και όχι μόνο αυτό: Για τα υπόλοιπα στελέχη ο φαινοτυπικός έλεγχος γίνεται στοχευμένα σε συγκεκριμένα Α/Φ με βάση την γενετική εικόνα.

Comprehensive Resistance Prediction for Tuberculosis (CRyPTIC Consortium)

- Our ultimate goal is to achieve sufficiently accurate genetic prediction of resistance to most of the anti-tuberculosis drugs, so that whole genome sequencing replaces culture-based DST for TB.
- The development and validation of a high throughput 14-drug microtitre plate assay is a crucial component of CRyPTIC as a means to provide standardised quantitative minimum inhibitory concentrations (MIC) for drug-susceptibility phenotypes.
- The use of statistical methods to detect associations between robust and accurate MICs and genetic variants identified from whole genome sequencing (WGS) data of a large number of isolates will enable prediction models to accurately identify resistance-conferring genetic variants and to precisely quantify their contribution to the degree of drug resistance of an isolate.
- We will assemble a global and clade-representative WGS collection to develop and use (i) better WGS assembly methods to identify more genomic variants with more precision, and (ii) improved statistical methods, both statistical genetic and machine learning, to detect associations between genetic variants and both quantitative and binary DST.

51

Έχουμε όλη την πληροφορία και για όλα τα φάρμακα ? Όχι ακόμη. Για αυτό και γίνεται μια συντονισμένη προσπάθεια σε διεθνές επίπεδο μέσω συνεργασιών, μια από αυτές είναι και το κονσόρτσιουμ CRyPTIC, αφ ενός μεν να υπάρξουν αξιόπιστα ποσοτικά δεδομένα για τις ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις κάθε φάρμακου (MICs) και αφετέρου να γίνει συσχέτιση τους με τους γονοτύπους, για ένα μεγάλο αριθμό στελεχών διαφορετικού γενετικού background.



Γιατί εκτός των άλλων, όλες οι μεταλλάξεις δεν είναι “ίδιες” από την άποψη των φαινοτυπικών επιπτώσεων. Για παράδειγμα και σε ότι αφορά την δεύτερης γενιάς κινολόνη Moxifloxacin, οι διαφορετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο της γυράσης A - που συνδέονται, όπως προαναφέρθηκε, με την αντοχή στις κινολόνες - αυξάνουν μεν την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση σε όλες τις περιπτώσεις σε σχέση με το άγριου τύπου γονίδιο, σε διαφορετικό όμως βαθμό, όπως φαίνεται από την κατανομή των MICs. Έτσι ένας αριθμός ασθενών μπορεί να επωφεληθεί από το φάρμακο, με αύξηση της δοσολογίας της κινολόνης, στην περίπτωση παρουσίας μετάλλαξης που προσφέρει χαμηλό επίπεδο αντοχής.

I491F is an *rpoB* mutation located outside the RRDR, is not detectable by routine mDSTs . It is also a low-level resistance mutation that is undetectable by the phenotypic DST

Beckert et al. *Genome Medicine* (2020) 12:104
<https://doi.org/10.1186/s13073-020-00793-8>

MDR *M. tuberculosis* outbreak clone in Eswatini missed by Xpert has elevated bedaquiline resistance dated to the pre-treatment era

***rpoB* I491F mutation accounted for up to 56% of RR-TB in Eswatini**

Euro Surveill. 2024;29(28):pii=2400420. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2024.29.28.2400420>

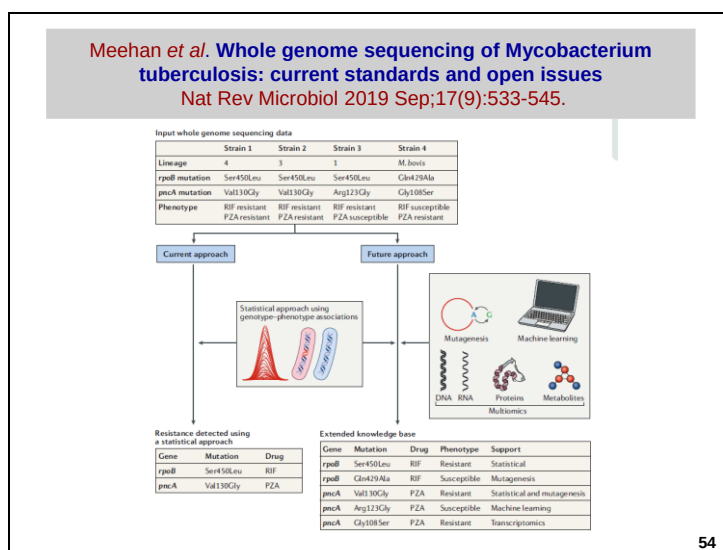
First detection of a *Mycobacterium tuberculosis* XDR clinical isolate harbouring an RpoB I491F mutation in a Ukrainian patient treated in Germany, October 2023

Antimicrob Agents Chemother. 2022 Dec 20;66(12):e0092522. doi: 10.1128/aac.00925-22.

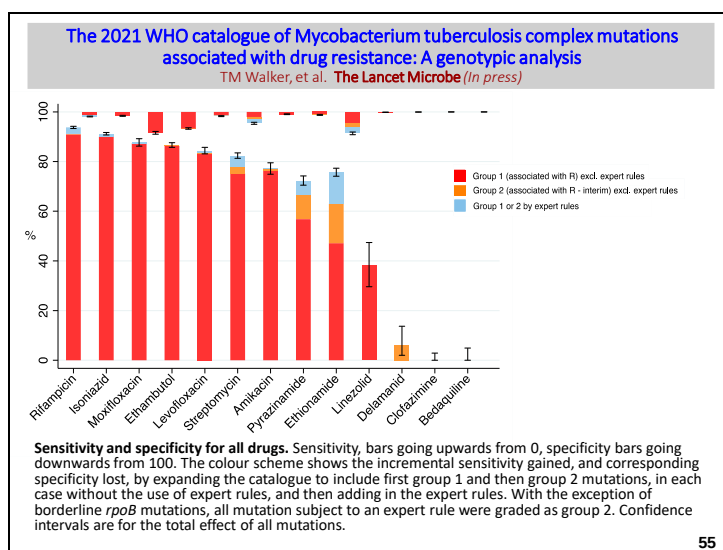
First Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates Harboring I491F Borderline Resistance *rpoB* Mutation in Myanmar

53

Η σημασία του να ξέρουμε όλες τις μεταλλάξεις αλλά και την ακριβή επίπτωση τους στον φαινότυπο φαίνεται και από το εξής παράδειγμα. Η Μετάλλαξη Ile491Phe στο γονίδιο *rpoB* είναι έξω από την περιοχή των 81 bp που βρίσκονται οι μεταλλάξεις που εξηγούν την αντοχή στην RIF για το 95-98% των περιπτώσεων. Επιπρόσθετα δε, προσφέρει αντοχή μόνο σε χαμηλά επίπεδα του φαρμάκου, με αποτέλεσμα να «ξεφεύγει» τόσο από τα μοριακά τεστ που έχουμε αναφέρει, όσο και από τις φαινοτυπικές δοκιμασίες αντοχής. Αυτό στην πράξη οδηγεί σε λάθος θεραπείες αφού η RIF είναι αναποτελεσματική σε αυτούς τους ασθενείς. Όπως προαναφέραμε όταν ο πλήρης συνδυασμός των φαρμάκων δεν είναι αποτελεσματικός αυτό μπορεί να οδηγήσει στην ανάδειξη κλώνων με επιπρόσθετη αντοχή. Και αυτό είχε ήδη γίνει στο βασίλειο του Eswatini, όταν εντοπίστηκε η μετάλλαξη και όχι μόνο αυτό αλλά υπήρχε ήδη ενεργής διασπορά του MDR-TB κλώνου που την έφερε και που αντιστοιχούσε στο 56% των περιπτώσεων αντοχής. Εκτότε νέες δημοσιεύσεις αναφέρονται σε εντοπισμό της μετάλλαξης και σε άλλες περιοχές/πληθυσμούς.



Με το WGS, μπορεί να αποκαλύπτονται σπάνιες μεταλλάξεις, που εντοπίζονται σε ελάχιστα στελέχη παγκοσμίως. Αυτό δημιουργεί την ανάγκη να περάσουμε σε νέες προσεγγίσεις στη διερεύνηση της σχέσης γονοτύπου-φαινοτύπου. Η κλασική προσέγγιση που στηρίζεται στο πόσο ισχυρή στατιστικά είναι η συσχέτιση ενός συγκεκριμένου γονοτύπου με το φαινοτυπικό χαρακτηριστικό μπορεί να μην είναι εφικτή στις περιπτώσεις αυτές, λόγω της σπανιότητας των μεταλλάξεων, και να χρειάζεται να συμπληρωθεί ή και να υποκατασταθεί, με πειράματα στοχευμένης μεταλλαξηγένεσης και ανάλυσης της γενετικής έκφρασης ή ακόμη και με την ανάλυση *in silico* π.χ. των στερεοδομών των πρωτεϊνών που επηρεάζονται και την πρόβλεψη των επιπτώσεων στην λειτουργικότητα τους.



Την συλλογή των δεδομένων τόσο από κλασικές συσχέτισες γονοτύπου-φαινοτύπου αλλά και από τις άλλες προσεγγίσεις που αναφέρθηκαν την έχει αναλάβει ο ΠΟΥ. Το 2021 δημοσίευσε το πρώτο κατάλογο συσχέτισης μεταλλάξεων και αντοχής για 13 Α/Φ που συστήνονται για την θεραπεία της νόσου και το 2023 τον δεύτερο. Οι μεταλλάξεις κατατάσσονται σε αυτές με ισχυρή συσχέτιση, σε αυτές με «προσωρινή» συσχέτιση, δηλαδή με μικρό ακόμη αριθμό στελεχών για να υπάρξουν ισχυρά στατιστικά δεδομένα και σε αυτές που η φύση της μετάλλαξης επέτρεψε να καταταγούν ως εμπλεκόμενες στην αντοχή χωρίς αρκετά δεδομένα από τεστ αντοχής (π.χ. frame sifts, premature stop codons), σε αυτές που δεν συσχετίζονται με αντοχή και σε αυτές που είναι άγνωστη η σχέση τους με την φαρμακευτική αντοχή. Στην εικόνα η μπάρα, για κάθε φάρμακο από το 0 και προς τα πάνω δείχνει την ευαισθησία και αυτή από το 100 και προς τα κάτω την ειδικότητα. Με τα δεδομένα του πρώτου καταλόγου, για τα Α/Φ rifampicin, isoniazid, ethambutol, fluoroquinolones, and streptomycin, η αθροιστική ευαισθησία είναι >80%. Συνολικά η ειδικότητα είναι πάνω από 95% για όλα πλην των ethionamide (91·4%), moxifloxacin (91·6%) και ethambutol (93·3%). Όμως για τα νέα φάρμακα όπως η bedaquiline, delamanid, clofazimine, linezolid τα δεδομένα ήταν ακόμη ελάχιστα λόγω του μικρού αριθμού ανθεκτικών στελεχών.

Catalogue of mutations in
Mycobacterium tuberculosis
complex and their association
with drug resistance

Second edition

 World Health
Organization

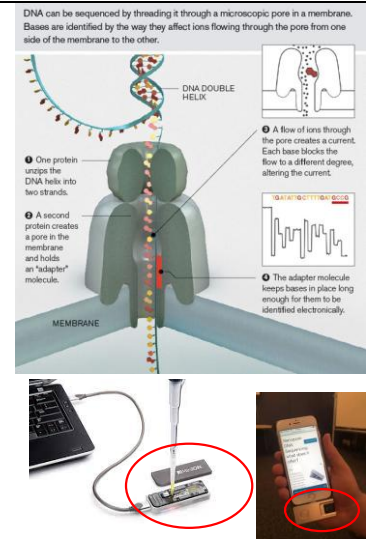
Table 3. Groups 1–5 mutations for the second edition and their performance for predicting phenotypic resistance

	Group 1: Assoc w R	Group 2: Assoc w R-interim	Group 3: Uncertain significance	Group 4: Not assoc w R-interim	Group 5: Not assoc w R
RIF	26	110	4484	2 (2568)	52 (32)
No. of variants identified					
Sens. spec. PPV (% [95% CI])	92.1 (91.7–92.5), 97.1 (96.9–97.3), 1.1 (1.0–1.3), 99.8 (99.8–99.9), 76.6 (70.8–81.6)				
Combined performance	93.3 (92.8–93.7), 96.9 (96.7–97.1), 94.2 (93.8–94.6)				
INH	7	135	5404	11 (1671)	41 (16)
No. of variants identified					
Sens. spec. PPV (% [95% CI])	89.8 (89.2–90.3), 98.2 (98.1–98.4), 2.0 (1.8–2.2), 99.7 (99.6–99.7), 82.5 (78.9–85.7)				
Combined performance	91.6 (91.2–92.0), 97.9 (97.8–98.1), 97.1 (96.8–97.3)				
EMB	13	0	4943	10 (2068)	50 (34)
No. of variants identified					
Sens. spec. PPV (% [95% CI])	81.1 (80.3–81.9), 91.6 (91.3–91.9), 0 (0–0), 100.0 (100.0–100.0), 0 (0–0)				
Combined performance	81.1 (80.3–81.9), 91.6 (91.3–91.9), 71.9 (71.9–72.8)				
PZA	139	202	1465	20 (720)	17 (8)
No. of variants identified					
Sens. spec. PPV (% [95% CI])	63.5 (62.0–64.9), 98.6 (98.5–98.6), 14.6 (13.5–15.6), 99.2 (99.1–99.3), 92.4 (91.4–93.4)				
Combined performance	78.8 (76.8–79.2), 97.9 (97.8–98.1), 99.5 (99.5–99.5)				
BED	5	81	947	5 (424)	1
No. of variants identified					
Sens. spec. PPV (% [95% CI])	28.3 (23.7–29.1), 99.4 (99.3–99.5), 23.0 (20.5–25.7), 99.3 (99.1–99.4), 78.2 (75.5–80.4)				
Combined performance	46.4 (45.3–47.5), 98.7 (98.5–98.9), 75.2 (73.9–76.6)				
LJD	1	7	844	0 (71)	4 (1)
No. of variants identified					
Sens. spec. PPV (% [95% CI])	27.3 (22.8–32.1), 99.8 (99.8–99.9), 6.7 (4.4–9.7), 100.0 (99.9–100.0), 78.5 (70.4–85.7)				
Combined performance	34.9 (29.3–39.6), 99.8 (99.7–99.9), 78.4 (71.3–84.5)				
CFZ	2	58	1256	0 (575)	11 (1)
No. of variants identified					
Sens. spec. PPV (% [95% CI])	4.3 (2.8–6.1), 99.8 (99.7–99.8), 46.0 (12.7–103.1), 99.9 (98.7–99.1), 38.6 (29.9–47.4)				
Combined performance	17.8 (14.2–20.9), 99.7 (99.5–99.9), 38.1 (32.8–43.6)				
DLM	0	24	579	0 (334)	0
No. of variants identified					
Sens. spec. PPV (% [95% CI])	0 (0–1.5), 100.0 (100.0–100.0), 0 (0–0), 14.7 (10.8–19.7), 99.9 (99.8–99.9), 77.3 (59.3–84.1)				
Combined performance	14.7 (10.8–19.7), 99.9 (99.8–99.9), 77.3 (59.3–84.1)				

56

56

Το 2023 δημοσιεύτηκε ο επικαιροποιημένος δεύτερος κατάλογος που περιλάμβανε τα δεδομένα από ~14000 επιπλέον στελέχη και τα πρώτα για τη pretomanide. Η συνεχής επικαιροποίηση, όπως είναι φυσικό βελτιώνει την ευαισθησία, ειδικότητα, και θετική προγνωστική αξία. Ακόμα όμως για πολλά φάρμακα είμαστε μακριά από μια κατάσταση που θα επέτρεπε να υποκαταστήσουμε τον φαινότυπο με το τον μοριακό έλεγχο αντοχής. Για παράδειγμα για την BD έχουμε 5 μεταλλάξεις με ισχυρή συσχέτιση και 81 με «προσωρινή» συσχέτιση και η συνδυασμένη ευαισθησία τους είναι μόνο 49% ενώ για την DLM έχουμε μόνο 24 μεταλλάξεις με «προσωρινή» συσχέτιση με την αντοχή και ευαισθησία 14,7%. Είναι σαφές ότι χρειάζονται, ειδικά για τα νέα φάρμακα, πολλά δεδομένα ακόμη



DNA can be sequenced by threading it through a microscopic pore in a membrane. Bases are identified by the way they affect ions flowing through the pore from one side of the membrane to the other.

DNA DOUBLE HELIX

❶ One protein unzips the DNA helix into two strands.

❷ A second protein creates a pore in the membrane and holds an "adapter" molecule.

❸ A flow of ions through the pore creates a current. Each base blocks the flow to a different degree, altering the current.

❹ The adapter molecule keeps bases in place long enough for them to be identified electronically.

MEMBRANE

- **Staphylococcus aureus α -hemolysin:** oligomerization of the toxin monomer forms water-filled channels.
- **ϕ 29 DNA polymerase:** synthesis is continual and involves a strand displacement mechanism

- Pocket-sized, portable device
- Sequence outside a lab
- Up to 512 nanopore channels
- Simple 10-min sample prep available
- Real-time analysis for rapid, efficient workflows
- Adaptable to direct DNA or RNA sequencing
- Access to sequencing for \$1,000
- 10–20Gb per 48 hrs

57

Η τρίτης γενιάς τεχνολογία αλληλουχοποίησης που αναπτύσσει η εταιρεία Oxford Nanopores, έχει στόχο να μεταφέρει την αλληλουχοποίηση στο πεδίο ή παρά την κλίνη. Η μέθοδος στηρίζεται σε ακινητοποιημένους σε μη ηλεκτροδιαπερατό υπόστρωμα νανοπόρους που φτιάχνει η α -hemolysin (διερευνούνται και άλλοι βιολογικής ή τεχνητής ή και «μεικτής» κατασκευής πόροι). Διαφορά δυναμικού εξασφαλίζει σταθερή ροή ιόντων μέσω των πόρων η οποία διακόπτεται, αν περάσει ένα μεγάλο μόριο και φράξει παροδικά το πόρο. Η αλλαγή στην τάση του ρεύματος που καταγράφεται είναι χαρακτηριστική για το μόριο.

Για τις ανάγκες της αλληλουχοποίησης ελέγχεται η ταχύτητα με την οποία περνά μέσα από το πόρο το μονόκλωνο μόριο DNA. Αυτό επιτυγχάνεται με την χρησιμοποίηση της DNA πολυμεράσης του φάγου ϕ 29, που έχει και καταλυτική ιδιότητα αντίστοιχη των helicases και μπορεί με συνεχή & σταθερό ρυθμό να ανοίγει το δίκλωνο μόριο του DNA, επιτρέποντας στον έναν από τους κλώνους να περνά με σταθερό ρυθμό μέσα από τον πόρο. Η διαφορά τάσης, που είναι ανάλογη της σύστασης των βάσεων καταγράφεται ανά τριπλέτα και έτσι επιτυγχάνεται η αλληλουχοποίηση.

Μια βασική αδυναμία της μεθόδου είναι το μεγάλο ποσοστό λάθους που όμως αυτό αντισταθμίζεται από το «βάθος» της αλληλουχοποίησης αλλά και τεχνικές βελτιώσεις της ίδιας της μεθόδου.

Η εταιρεία έχει θέσει σε κυκλοφορία mini εκδοχές της μεθόδου, με ελάχιστο μέγεθός που συνδεόμενες με φορητό υπολογιστή μεταφέρουν την αλληλουχοποίηση στο πεδίο έξω από το εργαστήριο.


58

WHITE PAPER

In addition to the What's in my pot? (WIMP) species identification workflow, Oxford Nanopore has developed a complete end-to-end analysis pipeline for AMR profiling of *M. tuberculosis* samples. The pipeline is available on the cloud-based EPI2ME platform which offers easy access to a number of analysis workflows for commonly used applications.

ahpC	atpE	eis	embA	embB
embC	embR	ethA	ethR	fabG1
folC	gid	gidB	gyrA	gyrB
inhA	kasA	katG	ndh	pncA
rplC	rpoB	rpoC	rpsA	rpsL
rrl	rrs	thyA	thyX	tlyA

Oxford Nanopore, have successfully completed phase I of a DR-TB NGS study, involved the development of a rapid end-to-end sequencing workflow to identify mutations associated with drug-resistance across the TB genome, directly from clinical samples as part of a research study. The nanopore targeted sequencing solution succeeded in the Phase I analytical evaluation by reaching or surpassing the main WHO performance targets, including genotypic sensitivity (>98%), genotypic specificity (>98%), limit-of-detection (<1000 cells) failure rates (0%), turnaround time (target <24 hours, achieved 8 hours) and ability to detect mixed resistance (≥10% heteroresistance detection).

Η εταιρεία έχει αναπτύξει μια end-to end , όπως λέγεται, εφαρμογή, που καλύπτει δηλαδή όλα τα στάδια από το κλινικό δείγμα μέχρι την αναφορά του αποτελέσματος . Είναι μέθοδος tNGS . Τα γονίδια στοχοι φαίνονται στην διαφάνεια και η εταιρεία αναφέρει πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα μετά την ολοκλήρωση των κλινικών trials, τόσο όσον αφορά την ευαισθησία και ειδικότητα, αλλά και το χαμηλό όριο ανίχνευσης (<1000 βάκιλοι στο κλινικό δείγμα), την ταχύτητα και την ικανότητα να ανιχνεύει ετεροαντοχή (≥10%).

A fast, deep sequencing-based assay for antibiotic resistance prediction of *Mycobacterium tuberculosis* complex + mycobacterial identification and genotyping

An all-in-one assay based on targeted sequencing

The Deeplex® Myc-TB assay starts with DNA extraction from either a (suspected) mycobacteria-containing clinical specimen or a mycobacteria-positive culture. A single multiplex PCR is then performed to amplify mycobacterial genome regions from 18 drug resistance associated MTBC genes, the *hsp65* gene (for mycobacterial speciation) and the *DRI/CISPR* locus of the MTBC (for spoligotyping).

The resulting PCR products are cleaned-up and libraries are prepared for sequencing. The obtained sequencing data are then uploaded to a secure web app for automated analysis, results can be viewed directly from the web app and exported in several formats (Figure 2).

Highlights

- Prediction of resistance to 15 anti-TB drugs**
 Easily visualise resistance associated mutations in (detected) *M. tuberculosis* complex (MTBC) gene targets, thanks to our Deeplex web app for automated analysis and interpretation of the sequencing data.
- Genotyping and spoligotyping of MTBC strains**
 Get to know the lineage / sublineage and spoligotype of MTBC strains present in the sample. Detect mixed infection involving distinct MTBC lineages/sublineages.
- Identification of more than 140 mycobacterial species**
 Identify mycobacteria including most species of clinical or veterinary relevance: MTBC, *M. kansasii*, *M. abscessus*, *M. intracellulare*, *M. avium* complex, and many more. Detect co-infection/co-colonization with distinct species.
- Turnaround time of less than 48 hours**
 Save time using DNA from clinical samples*, prepare libraries, sequence and analyse results in the Deeplex web app for a total turnaround time of less than 48 hours.
- Highly sensitive**
 Predict >97%** of MTBC resistance profiles detected by whole genome sequencing, **identify heteroresistance down to 3% subpopulations** and work with DNA loads down to 100 genomes.

Deeplex® Myc-TB

From clinical samples to drug resistance profile

Figure 1. The Deeplex® web app (Top) Deeplex® map showing mutations associated (red) or unassociated (or synonym, grey) with antibiotic resistance of MTBC along with yet-to-be characterized mutations (blue). Information on mycobacterial identification is shown in the center of the map. (Bottom) Resistance of an identified MTBC strain showing its predicted resistance pattern to 15 anti-tuberculosis drugs. The Deeplex® map is a registered design.

Εμπορική end to end μέθοδο για την διαφοροδιάγνωση 140 διαφορετικών ειδών μυκοβακτηριδίων και τον έλεγχο της αντοχής σε 15 Α/Φ φάρμακα στη περίπτωση ταυτοποίησης MTB, όπως επίσης και γονοτυπική ανάλυση του στελέχους με την μέθοδο spoligotyping – την οποία θα δούμε στην συνέχεια - έχει αναπτύξει και η εταιρεία GenoScreen. Η μέθοδος έχει CE/IVD και μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε κλινικά δείγματα όσο και καλλιεργημένα στελέχη. Εφαρμόζει targeted NGS, έχει ευαισθησία >97% συγκρινόμενη με προσέγγιση WGS και επιπρόσθετα μπορεί να ανιχνεύσει ετεροαντοχή σε υποπληθυσμό που βρίσκεται σε ποσοστό 3% του ολικού.

Use of targeted next-generation sequencing to detect drug-resistant tuberculosis
WHO, Rapid communication, July 2023

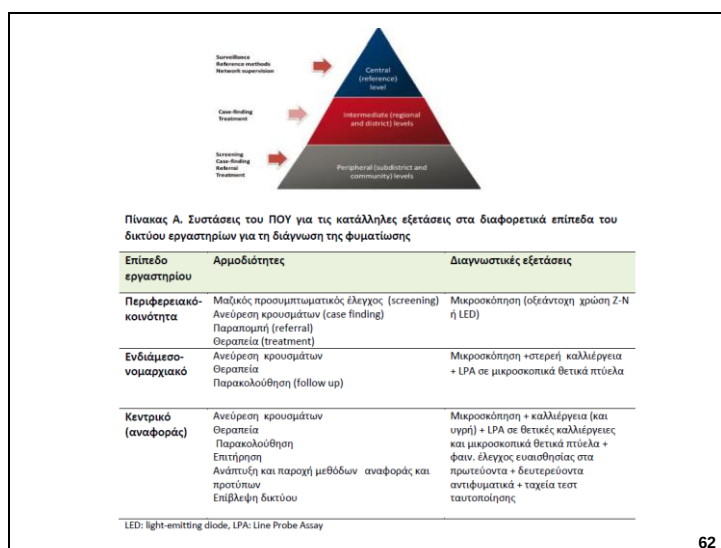
- Targeted NGS was found to be accurate
- Among people with confirmed pulmonary TB pooled Se of $\geq 95\%$ for rifampicin, isoniazid, moxifloxacin and ethambutol, 94% for levofloxacin and 88% for pyrazinamide. Sp $\geq 96\%$ for all drugs.
- Among people with RR-TB was accurate for isoniazid, levofloxacin, moxifloxacin, pyrazinamide and ethambutol (pooled Se $\geq 95\%$), and acceptable for bedaquiline (68%), linezolid (69%), clofazimine (70%), amikacin (87%) and pyrazinamide (90%). Sp was $\geq 95\%$ for all drugs except streptomycin (75%).
- Targeted next-generation sequencing was found to be cost-effective depending on context
- Targeted next-generation sequencing was found to be acceptable and implementable under routine conditions, despite inherent complexity
- The products for which eligible data met the class-based performance criteria
 - Deeplex® Myc-TB (GenoScreen):
 - NanoTB® (Oxford Nanopore Technologies):
 - TBseq® (ShengTing Biotech).

60

Εκτός από τις 2 μεθόδους που προαναφερθήκαν ο ΠΟΥ. αξιολογείσε και μια τρίτη tNGS end to end μέθοδο, που στηρίζεται μεν στην πλατφόρμα της Oxford Nanopore , μπορεί όμως εκτός του MTB και της αντοχής του σε 16 Α/Φ, να δώσει πληροφορίες και για την παρουσία 168 NTM και την αντοχή σε 6 αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για άτυπα μυκοβακτηρίδια. Τα συμπεράσματα της αξιολόγησης φαίνονται στην διαφάνεια. Η ακρίβεια των μεθόδων είναι πολύ υψηλή για πολλά από τα φάρμακα, κυρίως τα πρωτεύοντα, ενώ υπολείπεται – χαρακτηρίζεται όμως ως αποδεκτή – για ορισμένα από τα δεύτερης γραμμής ΑΦ ,που χρησιμοποιούνται για την MDR-TB. Είναι cost-effective και συστήνεται να μπουν σε εφαρμογή στην ρουτίνα παρά την πολυπλοκότητα τους.

laboratory safety		
The handbook Global edition A publication of the Global Laboratory Initiative a Working Group of the StopTB Partnership		
gli		
Activity	Relative risk value	95% Confidence Interval
Administration	1.0	
Microscopy only	1.4	0.2 – 10.0
Culture only	2.0	0.2 – 13.3
Combined culture and DST*	7.8	1.7 – 34.9
DST only	21.5	4.5 – 102.5
Activity	Relative risk value	Target
GeneXpert	≤1.4	Equivalent to sputum smear microscopy. Lysis buffer reduces AFB viability by 10 ⁶ within 15 minutes.
LPA (on specimens)	≤2.0	Equivalent to culture. Specimen processing as for culture. DNA extraction step inactivates AFB.
LPA (on culture)	≤21.5	May be as high as for DST. Requires manipulation of a positive culture. DNA extraction step inactivates AFB.

Δυο λόγια ως προς τις συνθήκες Βιοασφάλειας ,στα εργαστήρια που διενεργούν εξετάσεις διάγνωσης φυματίωσης. Οι πρόσφατες οδηγίες του ΠΟΥ τονίζουν ιδιαίτερα τη σπουδαιότητα της διεξοδικής εκτίμησης κινδύνου ανά διαδικασία για τις διαφορετικές εργαστηριακές δοκιμασίες, λαμβάνοντας υπόψη κυρίως τον κίνδυνο δημιουργίας μολυσματικών αερολυμάτων αλλά και τη συγκέντρωση των βακίλων σε κάθε διαγνωστική δοκιμασία (μικροβιακό φορτίο). Έτσι αν θεωρήσουμε ως 1 τον σχετικό κίνδυνο του διοικητικού προσωπικού, που κανονικά δεν εμπλέκεται σε εργαστηριακές πρακτικές, αυτός αυξάνει ως και 21,5 φορές για το προσωπικό που εκτελεί τα φαινοτυπικά τεστ. Σε ότι αφορά δε τα μοριακά τεστ, ο σχετικός κίνδυνος μέχρι την αδρανοποίηση του βακίλου για την απομόνωση του γενετικού υλικού, είναι ανάλογος του βακτηριακού φορτίου που χειριζόμαστε κάθε φορά και δεν διαφοροποιείται από άλλες εργαστηριακές εργασίες ανάλογου φορτίου.



Ο ΠΟΥ συστήνει την οργάνωση της διάγνωσης της φυματίωσης από δίκτυο εργαστηρίων από την περιφέρεια μέχρι το κεντρικό επίπεδο όπου είναι το εργαστήριο αναφοράς με τις αντίστοιχες κλιμακούμενες αρμοδιότητες και εφαρμογή των διαγνωστικών εξετάσεων. Οι εξετάσεις υψηλότερου κινδύνου, όπως βλέπουμε συγκεντρώνονται από το ενδιάμεσο επίπεδο και πάνω και κυρίως στο εργαστήριο αναφοράς και πρέπει ιδανικά να διενεργούνται σε εργαστήρια που παρέχουν τις απαραίτητες δομές για τον ασφαλή χειρισμό καλλιεργημάτων βακίλου της φυματίωσης. Εργαστήρια επιπέδου Βιοασφάλειας 3 ικανοποιούν όλες τις απαιτήσεις, όμως στις περιπτώσεις εργαστηρίων κατώτερου επιπέδου π.χ. Βιοασφάλειας επιπέδου 2, όταν δεν είναι δυνατή η δομική μετατροπή τους σε επιπέδου Βιοασφάλειας 3, παρέχεται η εναλλακτική λύση της εργασίας με την χρήση πρακτικών και διαδικασιών επιπέδου Βιοασφάλειας 3. Αυτό σημαίνει πρακτικές BSL-2 και επιπρόσθετα: 1) περιορισμένη πρόσβαση, 2) διενέργεια όλων των εργασιών σε θάλαμο βιολογικής ασφάλειας, 3) πρόσθετα μετρά Ατομικής Προστασίας (ιδιαίτερα αναπνευστικής) και 4) απολύμανση όλων των αποβλήτων πριν την τελική διάθεση τους (αυτόκαυστο στο χώρο εργασίας).

**laboratory
safety**

The handbook
Global edition
A publication of the Global Laboratory Initiative
a Working Group of the StopTB Partnership



The major risk of TB infection in the laboratory is associated with inhalation of aerosols generated by laboratory processes. Minimising their production is the most effective means of staying safe.

- 1 Primary**
Safe working practices to minimize spills and creation of infectious aerosols
Equipment that is 'fit for purpose', correctly used and maintained
- 2 Secondary**
Infrastructure and layout to support the primary activities
- 3 Tertiary**
Buildings to contain the laboratory and its activities

The combination of all three is required to handle TB bacilli safely.
However, safe working practice is essential.

63

Η μόλυνση του προσωπικού μπορεί να προκληθεί κυρίως με την εισπνοή μολυσμένων αεροσταγονιδίων που δημιουργούνται σε διαφορά στάδια των εργαστηριακών δοκιμασιών όπως π.χ. φυγοκεντρίσεις, πιπιεταρίσματα, αναδεύσεις, θέρμανση δειγμάτων κ.λ.π. Η προστασία προϋποθέτει τον συνδυασμό των σωστών πρακτικών δουλειάς, με την χρήση των κατάλληλων μέσων και στις σωστά σχεδιασμένες υποδομές ώστε να ελαχιστοποιείται η δημιουργία αερο-σταγονιδίων ή άλλων πηγών μόλυνσης και όταν αυτά δημιουργούνται να περιορίζονται σε προστατευμένο χώρο όπως π.χ. οι καμπίνες βιολογικής ασφάλειας και να επάγονται εκτός του χώρου εργασίας μέσω κατευθυνόμενης ροής αέρα και μέσω φίλτρων προς το περιβάλλον. Και φυσικά σε πιθανή επαφή με τον εργαζόμενο, αυτός να είναι προστατευμένος με την χρησιμοποίηση των κατάλληλων ατομικών μέτρων προστασίας (π.χ. μάσκες FFP3)

laboratory safety

The handbook
Global edition
A publication of the Global Laboratory Initiative
a Working Group of the StopTB Partnership



Test procedure	Maximum number of tests/technician ¹			
	Day	Week	Month	Year ²
AFB light microscopy	25	125	500	5,750
AFB fluorescence microscopy	50	250	1,000	11,500
Culture (liquid/solid) specimen processing	40	200	800	9,200
DST (liquid)	20	100	400	4,600
DST (solid)	20	100	400	4,600
Xpert (4-module)	16	80	320	3,680
LPA - First line (manual)	24	120	480	5,520

Personal protective equipment provides a physical barrier to minimise the risk of exposure to aerosols, splashes and accidental inoculation. PPE must be worn at all times within the laboratory.

64

Δεν θα επεκταθούμε περεταίρω στα μέτρα βιολογικής ασφάλειας που από μόνα τους αποτελούν ένα ξεχωριστό κεφάλαιο. Μια μόνο παράμετρος που δεν πρέπει να ξεχνιέται, ιδιαίτερα στις νέες εργασιακές συνθήκες που διαμορφώνει το τρίπτυχο: «λιγότεροι άνθρωποι, για πιο πολύ δουλειά και σε συνθήκες εργασιακής ανασφάλειας». Το να τηρείται με ευλάβεια – εκτός φυσικά των μέτρων προστασίας- και ο ημερήσιος φόρτος δουλειάς, που έχει εκτιμηθεί ότι μπορεί να φέρει σε πέρας ένας εργαζόμενος, είναι προϋπόθεση όχι μόνο για την ποιότητα της δουλειάς, το να αποφύγουμε δηλαδή το λάθος που μπορεί να μη επιτρέψει την έγκαιρη διάγνωση ή αντίθετα να οδηγήσει σε αχρείαστες πολύμηνες και επιβαρυντικές θεραπείες, αλλά και για να αποτραπεί το λάθος που θα βάλει σε κίνδυνο την υγεία του εργαζόμενου