

Suvremena dijagnostika virusnih infekcija dišnog sustava

Izv. prof. dr. sc. Sunčanica Ljubin Sternak

Nastavni Zavod za javno zdravstvo „Dr Andrija Štampar”

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu



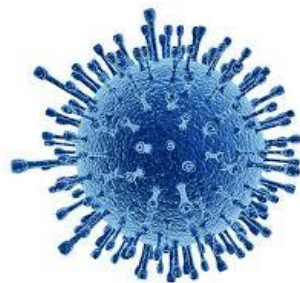
Akutne infekcije

75%



Infekcije dišnog sustava

80%



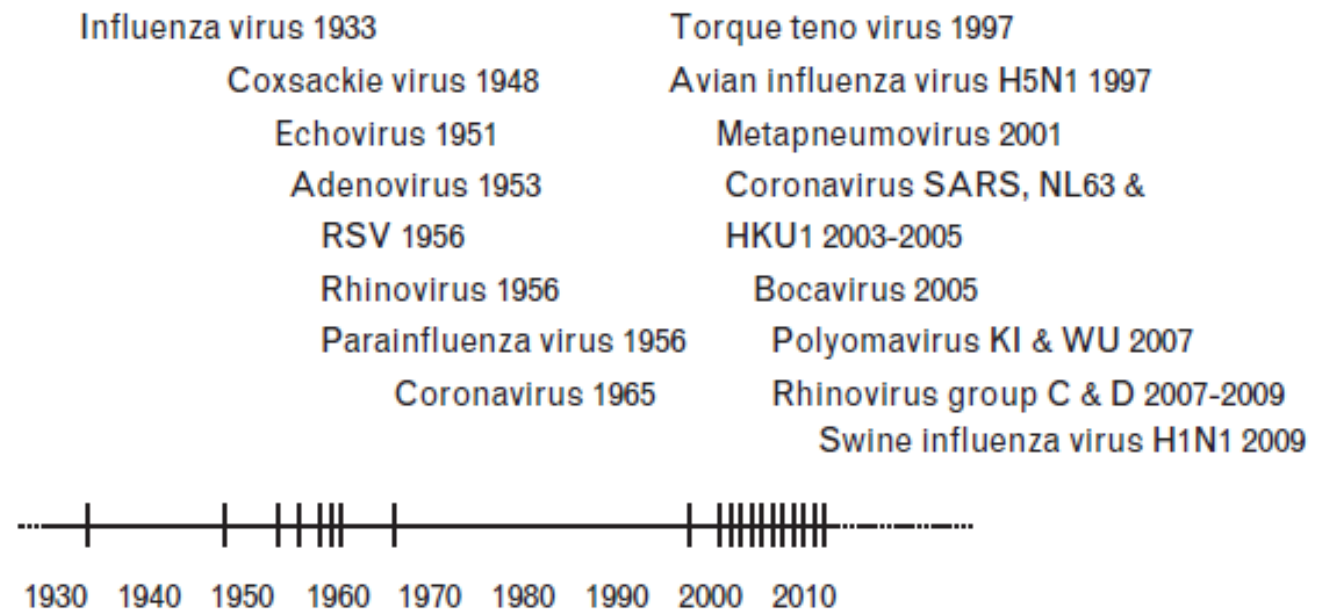
Virusne infekcije

ARI su najčešći uzrok hospitalizacije dojenčadi i male djece u razvijenim zemljama

ARI su vodeći uzrok smrtnosti u zemljama u razvoju

Otkriće respiratornih virusa

- 1933. otkrićem influence tipa A započinje dijagnostika respiratornih virusnih infekcija (Smith, Andrewes i Laidlaw inokulirali sekret oboljelog u pokusnu životinju-tvor- koji je nakon 48 sati počeo pokazivati simptome bolesti)
- u početku je dijagnostika virusa bila usko vezana uz kultivaciju u lab. životinjama, oplođenom kokošjem jajetu (1940) i staničnoj kulturi (1949)
- tijekom 90-tih godina prošlog stoljeća dolazi do razvoja molekularnih metoda detekcije, osobito metoda amplifikacije nukleinskih kiselina (NAAT) i započinje nova era u dijagnostici virusnih infekcija



Jartti et al. Curr Opin Pulm Med 2012.

Respiratorni virusni patogeni

„Klasični” respiratorni virusi

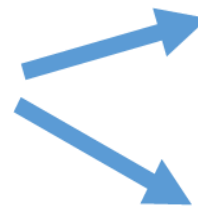
- Virusi influenza tipa A, B, C
- Rinovirusi grupe A i B (> 100 serotipova)
- Respiratorni sincicijski virus tip A i B
- Virusi parainfluenze tipa 1, 2 i 3
- Adenovirusi (> 50 tipova)
- Koronavirusi (22E i CoVOC43)
- Enterovirusi

„Novi” respiratorni virusi

- Humani metapneumovirus
- Virus parainfluenze tip 4
- Rinovirusi grupe C
- Koronavirusi
 - NL63 i HKU1
 - SARS CoV
 - MERS CoV
- Bokavirus
- Poliomavirusi KI i MU

Respiratorne virusne infekcije (RVI): da li je potrebna virološka dijagnostika?

- Akutne respiratorne infekcije



70%



30%



- Virusne infekcije dišnog sustava su većinom blage i samo ograničavajuće, ali nove studije naglašavaju važnost respiratornih virusa u patogenezi infekcija donjeg dišnog sustava u djece i odraslih



Udio pneumonija s mikrobiološki dokazanom virusnom etiologijom

Djeca^a 45-66%

Odrasli^b ~25%

^aJartti et al. Ped Res Rew; 2013

^bAlimi et al. J Clin Virol; 2017

Respiratorne virusne infekcije (RVI): da li je potrebna virološka dijagnostika?

- Osim što su značajni uzročnici infekcije donjega dišnog sustava respiratorni virusi:
 - mogu uzrokovati egzacerbaciju već postojećih kardiopulmonalnih bolesti
 - mogu uzrokovati komplikacije s fatalnim ishodom u imunodeficientnih bolesnika ili bolesnika ekstremne dobi
 - Povezani su s prekomjernom upotrebom antibiotika
 - Česti su uzročnici hospitalnih infekcija koje se mogu spriječiti pravovremenim mjerama prevencije

Virusni uzročnici infekcija donjeg dišnog sustava

Djeca

Klinički sindrom	Virus	Učestalost detekcije
Akutne egzacerbacije astme	Rinovirusi	95%
Bronhiolitis	RSV	95%
Pneumonija <12 mjeseci	RSV, HMPV	77%
Pneumonija > 12 mjeseci	Rinovirusi, Bokavirus	72%

Odrasli

Klinički sindrom	Virus	Učestalost detekcije
Izvanbolnička pneumonija (<i>engl. community acquired pneumonia-CAP</i>)	Influenca tip A i B	9%
	Rinovirusi	5%
	Koronavirusi	4%
	Parainfluenca	3%
	RSV	2%
	HMPV	2%
	Adenovirusi	1%

Jartti et al. Ped Res Rew; 2013

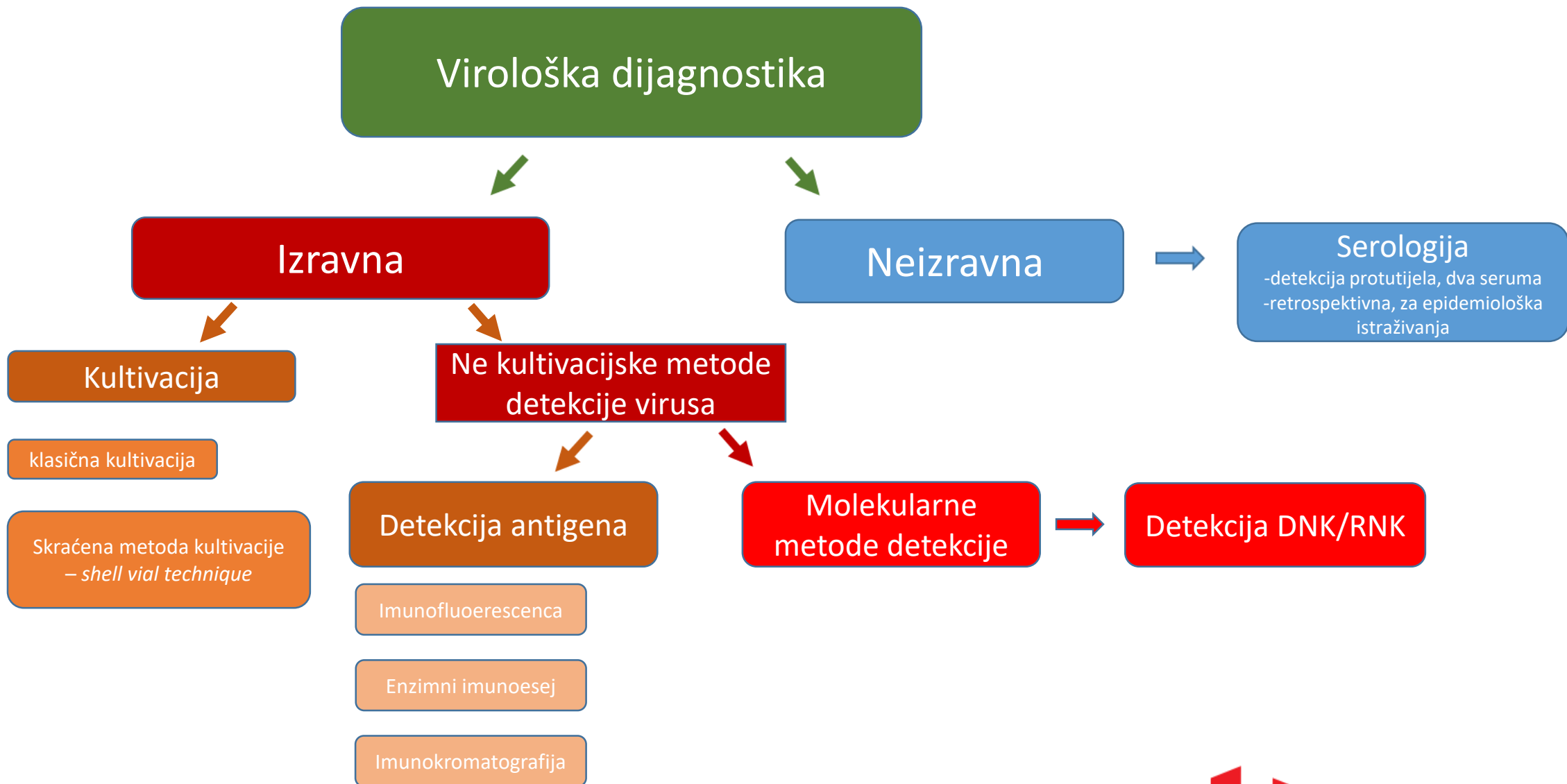
Značaj detekcije virusa: učestalost detekcije virusa kod bolesnih vs. asimptomatskih

Djeca

Uzročnik	Djeca (<18 g) s pneumonijom (n= 832)	Kontrolna skupina bez simptoma ARI (n=521)	P-vrijednost
Bilo koji virus	68,8%	24,4%	<0,01
RSV	26,6%	1,9%	<0,01
Rinovirusi	21,9%	17	0,04
HMPV	15,1%	1,5%	<0,01
Adenovirus	6,4%	3,1%	<0,01
Parainfluenca 1-3	4,7%	1,9%	0,01
Koronavirusi	4,5	1,5%	<0,01
Influenca A/B	3,4	0%	<0,01

Odrasli

Uzročnik	Odrasli s pneumonijom (n= 192)	Kontrolna skupina bez simptoma ARI (n=238)	P-vrijednost
Bilo koji virus	24,5%	2,1%	<0,01
Rinovirusi	10,9%	0,8%	<0,01
HMPV	4,2%	0,4%	0,01
Koronavirusi	3,1%	0,8%	0,14
Influenca A/B	2,6%	0%	0,02
RSV	1,6%	0%	0,09
Parainfluenca 1-3	1,6%	0%	0,09
Adenovirus	1,6%	0%	0,09



Uzorci za izravnu dijagnostiku

- Uzorke treba uzeti tijekom prvih dana bolesti (najveći titar virusa)
 - ako uspoređujemo uzorkovanje tijekom prvih 6 dana bolesti i nakon 7-og dana bolesti učestalost detekcije ovijenih virusa opada za više od 50%
- Uzorci:
 - obrisak nazofarinksa
 - obrisak ždrijela
 - aspirat nazofarinksa
 - nazalni ispirak
 - BAL
- Transport i pohrana
 - 4°C do 48h (DIF, izolacija virusa)
 - -70°C dugotrajna pohrana (vijabilitet)



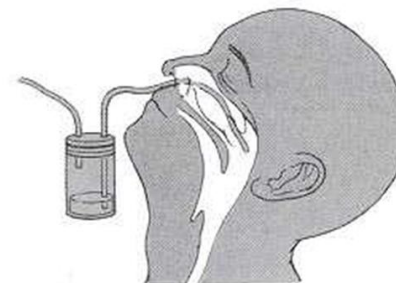
obrisak nazofarinksa



UTM- univerzalni transportni medij



nazalni ispirak



nazofaringealni aspirat



Sterilna posudica s
čepom na navoj

Virološka dijagnostika

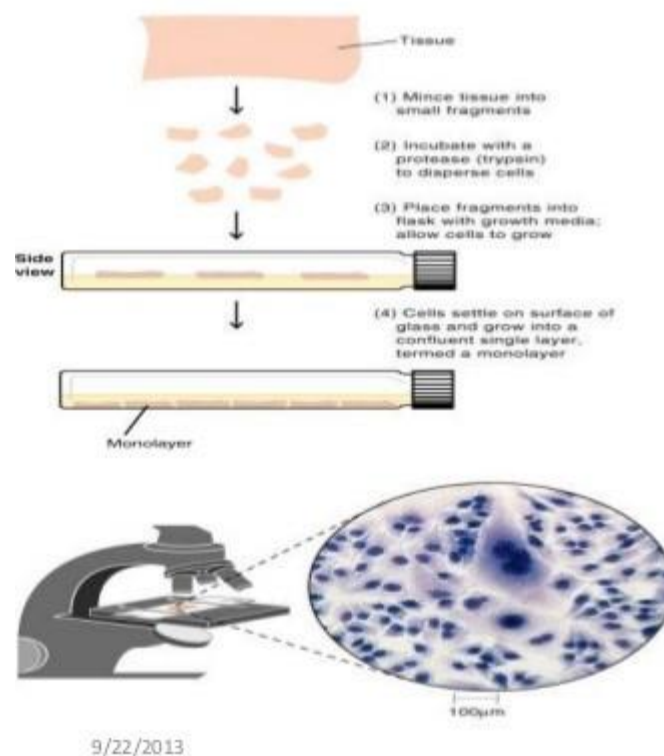
Izolacija virusa

Klasična kultivacija

- Uzorak se nasadi na kulturu stanica te inkubira kroz 2 tjedna
- virus se otkriva pojavom citopatičnog učinka ili hemadsorpcijom

- Širok spektar patogena, ali ovisan o broju i vrsti staničnih kultura koje se upotrebljavaju za izolaciju
- Pogodna i za detekciju nepoznatih ili neočekivanih virusa
- Vrijeme detekcije virusa 3-7 dana

Tissue culture



• Prednosti

- Izolacija sojeva za epidemiološke studije i izradu cjepiva
- U slučaju kada se razmatra infekcija s neočekivanim uzročnicima (imunokompromitirani)

• Nedostaci

- Tehnički zahtjevna i ne izvodi se izvan referalnih laboratorija
- Skupa
- Rezultati ovise o vijabilnosti virusa tj. brzom transportu i održavanju hladnog lanca
- Prespora metoda za pravovremenu odluku o liječenju (dani do rezultata)

Virološka dijagnostika

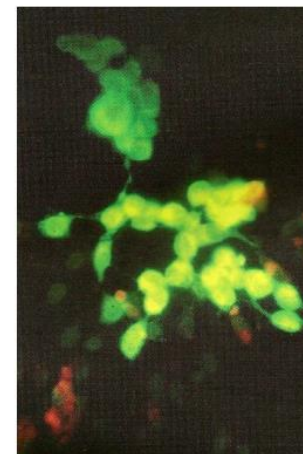
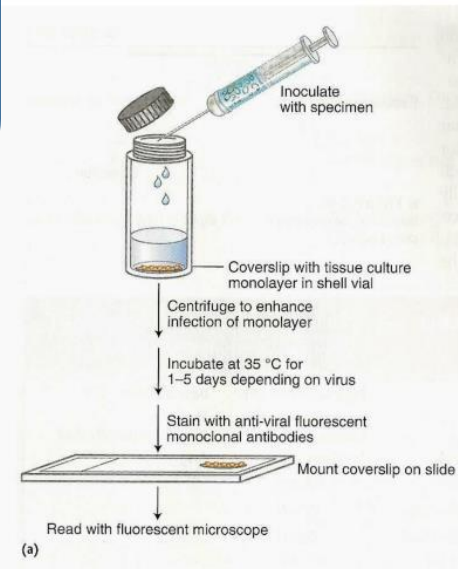
Izolacija virusa

Skraćena metoda kultivacije – *shell vial technique*

- Uzorak se centrifugira na staničnu kulturu kako bi se pospješila interakcija virusa i stanica
- nakon skraćene inkubacije inficirane stanice detektiraju se monoklonskim protutijelima

- Spekter detekcije patogena isti kao i kod DFA (8 virusa)
- Vrijeme detekcije virusa 48 sati

Virus Cell Culture - Shell Vial



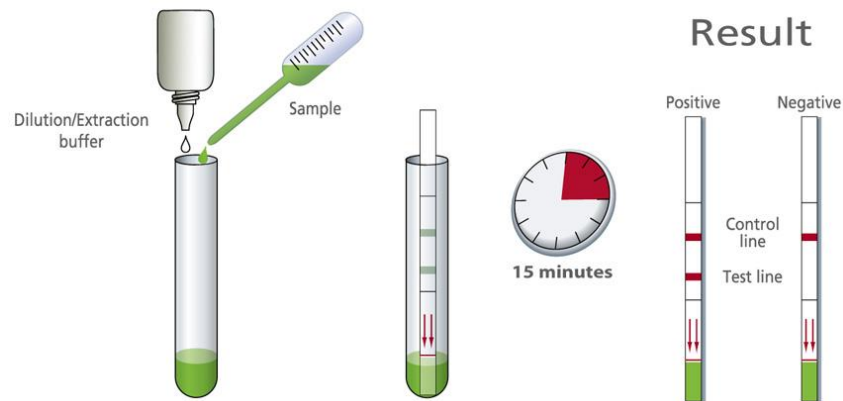
- Prednosti
- Osjetljivost i specifičnost bolja od metoda detekcije antigena
- relativno brza metoda koja omogućava pravovremenu odluku o liječenju
- Nedostaci
- Tehnički zahtjevna i ne izvodi se izvan referalnih laboratorija
- Rezultati ovise o vijabilnosti virusa tj. brzom transportu i održavanju hladnog lanca

Virološka dijagnostika

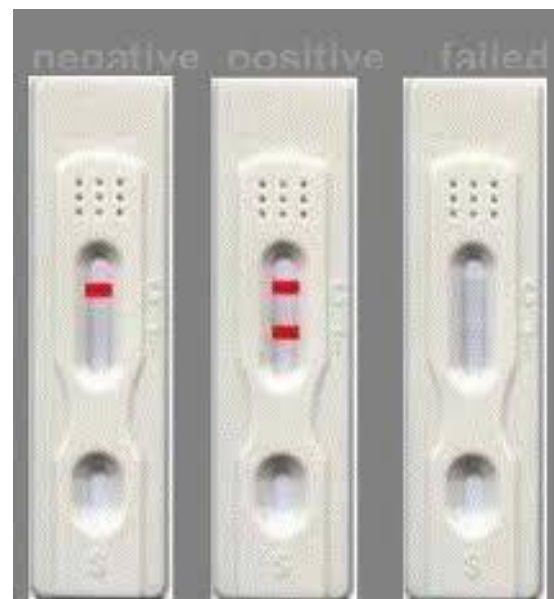
Detekcija antigena

Imunokromatografija

RSV Respi-Strip



- Mogućnost detekcije svega par patogena: Influenca A i B, RSV
- Vrijeme detekcije virusa 15 -30 min



negativan

pozitivan

nevažeci

• Prednosti

- Vrlo brza metoda (minute)
- Jednostavna za izvođenje
- Nema potrebe specijalne opreme
- POC („point of care“) test
- Dobra NPV u slučaju visoke prevalencije (sezona influence)

• Nedostaci

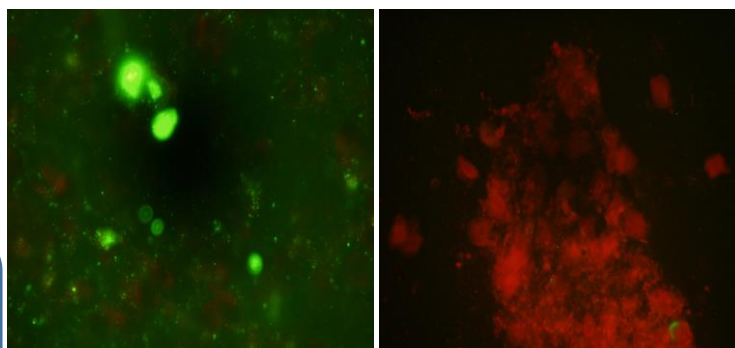
- Niska osjetljivost i specifičnost u odnosu na druge brze metode (DFA)
- niska PPV u slučaju niske prevalencije

Virološka dijagnostika

Detekcija antigena

Imunofluorescenca

- epitelne stanice dišnog sustava iz uzorka se fiksiraju na stakalce
- antigen virusa dokazuje se pomoću monoklonskih protutijela obilježenih fluoresceinom – inficirane stanice svijetliti će karakterističnom fluorescentom bojom
- Mogućnost detekcije 8 patogena: Influenca A i B, Parainfluenca 1, 2, i 3, RSV, Metapneumovirus, Adenovirus
- Vrijeme detekcije virusa: 2-4 sata



pozitivan uzorak

negativni uzorak

Prednosti

- relativno osjetljiva i specifična metoda (adenovirus 50%, RSV >80%)
- brza metoda (sati)
- omogućava procjenu kvalitete uzroka (prisustvo epitelnih stanica)

Nedostaci

- potreban je adekvatno opremljen laboratorij i oprema (fluorescentni mikroskop)
- stručna osposobljenost tehničara može imati utjecaj na izvođenje testa

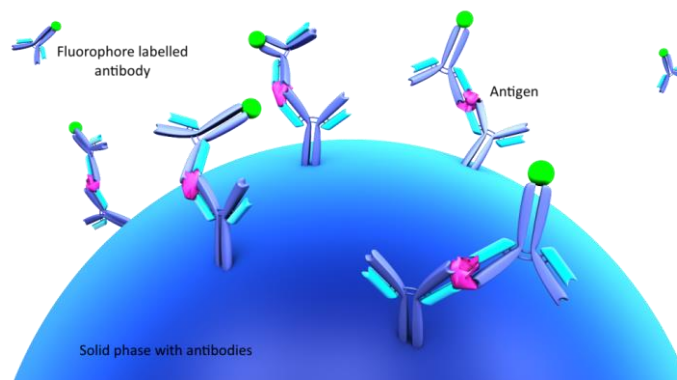
Virološka dijagnostika

Detekcija antigena

Automatizirani imunofluorescentni esej

- uzorak se postavi u aparat
- aparat mjeri fluorescentni signal specifičnih imunokompleksa vezanih na polistirenske čestice

- Mogućnost detekcije 10 patogena: Influenca A i B, Parainfluenca 1, 2, i 3, RSV, Metapneumovirus, Adenovirus, Koronavirus OC43 i Bokavirus
- Vrijeme detekcije virusa: 20 min -2 sata



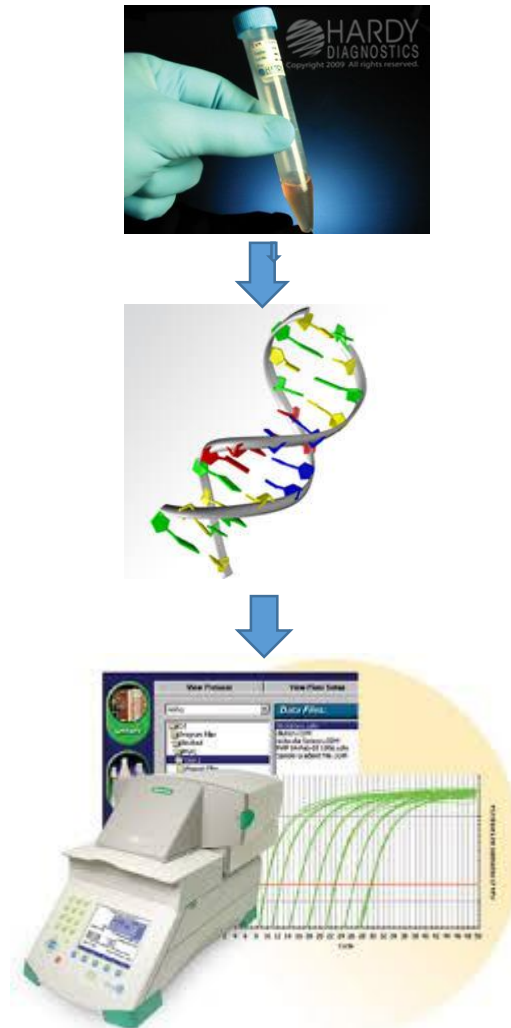
- Prednosti
 - Vrlo brza metoda
 - Jednostavna za izvođenje
 - POC („point of care“) test
 - Bolja osjetljivost i specifičnost u odnosu na druge metode detekcije antigena
- Nedostaci
 - Potrebna specijalna oprema
 - cijena

Virološka dijagnostika

Molekularne metode detekcije

Detekcija virusne nukleinske kiseline

- Iz uzorka se izolira nukleinska kiselina
- Dio specifičan za patogen se umnoži
- Umnožena DNK se detektira gel elektroforezom, spektrofotometrijski ili pomoću specifičnih proba koje se komplementarno vežu na ciljnu nukleinsku kiselinu
- Spektar detekcije virusa ovisi o specifičnim početnicama i metodi – od jednog do nekoliko desetaka patogena
- Vrijeme detekcije virusa: od 30 min do 2 dana



- Prednosti
- visoka osjetljivost i specifičnost
- vrlo brza metoda
- sve veća automatiziranost
- pogodna za viruse koji se teško kultiviraju ili se ne mogu kultivirati (bokavirus)
- Nedostaci
- mogućnost kontaminacije zbog velike osjetljivosti – lažno pozitivni rezultati
- Potrebna skupa oprema

Molekularne metode detekcije

Metoda	Glavne značajke
Konvencionalni PCR -detekcija na gelu ili spektrofotometrom	Spor (2 dana) nema kvantifikacije visok rizik kontaminacije (nested PCR)
Real-time PCR -istovremena detekcija uz amplifikaciju (hidroliza fluorescentnih proba emitira signal)	Mogućnost KVANTIFIKACIJE Ograničena mogućnost detekcije više patogena istovremeno (do 5)
PCR vezan uz Luminex tehnologiju detekcije -klasični PCR uz detekciju amplikona hibridizacijom na specifično označene mikročestice koje se detektiraju laserom	Velik broj detekcije više patogena istovremeno Nema mogućnosti kvantifikacije
Izotermalne reakcije (NASBA, LAMP) -izotermalni enzimi koji dovode do stvaranja intermedijarnih DNA ili RNA/DNA produkata	Nije potreban termalni cycler Nije potreban RT korak za RNA viruse, kvantifikacija zahtjevna
Brzi dijagnostički instrumenti- POC molekularni testovi -Integrirana izolacija i amplifikacija nukleinskih kiselina u zatvorenim kasetama ili vrećicama	Odlični POC testovi, ali zatvoreni sustavi, kontaminacija svedena na minimum skupi

- Udio kliničkih uzoraka u kojima se detektira virus (jedan ili više) izrazito ovisi o:

1. metodologiji (osjetljivosti testa)

2. Broju ispitivanih patogena

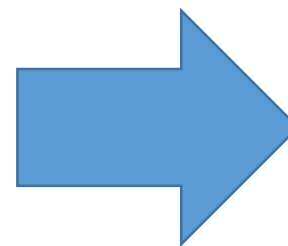
-što je veći broj ispitivanih patogena veći je udio dokazanih infekcija a negativni nalaz ima veću kliničku vrijednost

Vrsta testa (broj ispitivanih uzročnika)	Udio dokazanih virusnih infekcija
Detekcija antigena imunokromatografskim testovima (3 virusa)	~20%
Izravna imunofluorescenca -DFA (8 virusa)	~20%
Brza metoda kultivacije – <i>shell vial technique</i> (7 virusa)	35%
Molekularne metode – <i>multiplex NAATs</i> (15 virusa)	68%

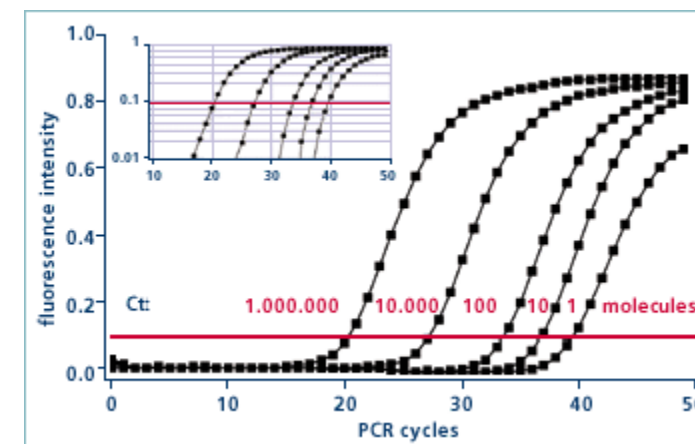
Ginocchio et al. J Clin Microbiol 2011.

Klinička interpretacija pozitivnog molekularnog testa

- Visoko osjetljivi testovi kao NAATs nose sa sobom rizik da se detektira asimptomatsko izlučivanje virusa
- Uzročnik bolesti (RSV, Influenca ili posljedica dugotrajnog izlučivanja (bokavirus, adenovirus)
- Koinfekcije s više virusa istovremeno mogu stvarati poteškoće u interpretaciji nalaza



Kvantifikacija virusa u uzorku mogla bi pomoći u razlučivanju pravog uzročnika



Naša iskustva – učestalost detekcije virusa u hospitalizirane djece i odraslih s ARI dokazana s *multiplex* PCR metodom

Djeca (sezona 2015) N=76

Uzročnik	Učestalost (%)
Bilo koji uzročnik	55 (72,4%)
Koinfekcija (dva ili više virusa istovremeno)	17 (30,1%)
RSV	19 (34,5%)
Enterovirus	10 (18,2%)
Metapneumovirus	8 (14,5%)
Influenca A/B	8 (14,5%)
Bokavirus	8 (14,5%)
Rinovirusi	7 (12,5%)
Parainfluenca 1-4	6 (10,9%)
Adenovirusi	5 (9%)
Koronavirusi	4 (7,3%)







Ljubin-Sternak S et al. J Pathogens 2016

Odrasli (N=118; period 2016-2017)

Uzročnik	Učestalost (%)
Bilo koji uzročnik	61 (51%)
Koinfekcija (dva ili više virusa istovremeno)	10 (16%)
Influenca A/B	23 (37,7%)
Parainfluenca 1-4	13 (21,3%)
RSV	12 (19,6%)
Rinovirus	11 (18%)
Metapneumovirus	9 (14,8%)
Adenovirus	2 (3,3%)
Enterovirus	2 (3,3%)
Koronavirus	1 (1,7%)
Bokavirus	0 (0%)

Preliminarni rezultati – data not published

Molekularni POC testovi za dijagnostiku respiratornih virusa

Naziv testa	Metoda	Virusi	Trajanje testa (min)	Karakteristike		
				Osjetljivost	Specifičnost	
Alere™ Influenza A/B, RSV (Alere Inc.)		LAMP (<i>engl.</i> loop mediated isothermal amplification)	Infl A/B, RSV	13-15	75 -97,9%	53-100%
Xpert® Xpress Flu i Flu/RSV (Cepheid Inc.) Xpert® Flu i Flu/RSV XC (Cepheid Inc.)		Real-time RT-PCR	Infl A/B, RSV	20-75	85,7-100%	95,2-100%
Cobas® Liat Influenza A&B i RSV (Roche Diagnostics)		Real-time RT-PCR	Infl A/B, RSV	20	94,2-100%	97,1-99,7%
FilmArray Respiratory panel (Biofire/Biomereux)		Nested PCR i analiza krivulje taljenja	Infl A i B, RSV, AdV, BocV, Rhino/Entero, Parinfl 1-4	60	66,7-100%	89,1-100%
Simplexa™ Flu A/B+ RSV (Focus Diagnostics)		Real-time RT-PCR	Infl A/B, RSV	60	80,7-100%	100%
Verigene respiratory panel (Luminex Corporation)		PCR	Infl A i B, RSV, HMPV, AdV, Rhino, Parinfl 1-4	<120	81,8%-100%	97,7-99,9%

POC nemolekularni testovi vs. POC molekularni testovi

- Brzi ne-molekularni testovi zbog svoje niske osjetljivosti i granične specifičnosti nisu više prikladan opcija za dijagnostiku respiratornih virusa prvenstveno zbog posljedica koje sa sobom povlači pogrešna dijagnoza koja je rezultat negativnog testa
- Iako je cijena NAATs znatno viša od brzih nemolekularnih testova, vrijednost NAATs je osim točnih i brzih rezultata treba razmatrati u svjetlu ukupne cijene liječenja pacijenta što uključuje:
 - Neadekvatnu upotrebu antibiotika (poskupljuje liječenje i doprinosi razvoju rezistencije)
 - Produljuje duljinu boravka u bolnici
 - Povećava broj drugih dijagnostičkih pretraga i testova zbog nedostatka dijagnoze
 - Mogućnost izbijanja epidemije bolničke infekcije

Respiratorne virusne infekcije (RVI): da li je potrebna virološka dijagnostika?

- Pravovremenom, specifičnom i osjetljivom virološkom dijagnostikom:
 - utječemo na odluku o liječenju (imunokompromitirani!)
 - detektiranjem sezone virusa utječemo na uvođenje specifične prevencije (monoklonska protutijela –RSV)
 - utječemo na potrošnju antibiotika
 - smanjujemo druge troškove dijagnostike i liječenja



Hvala na pažnji!