

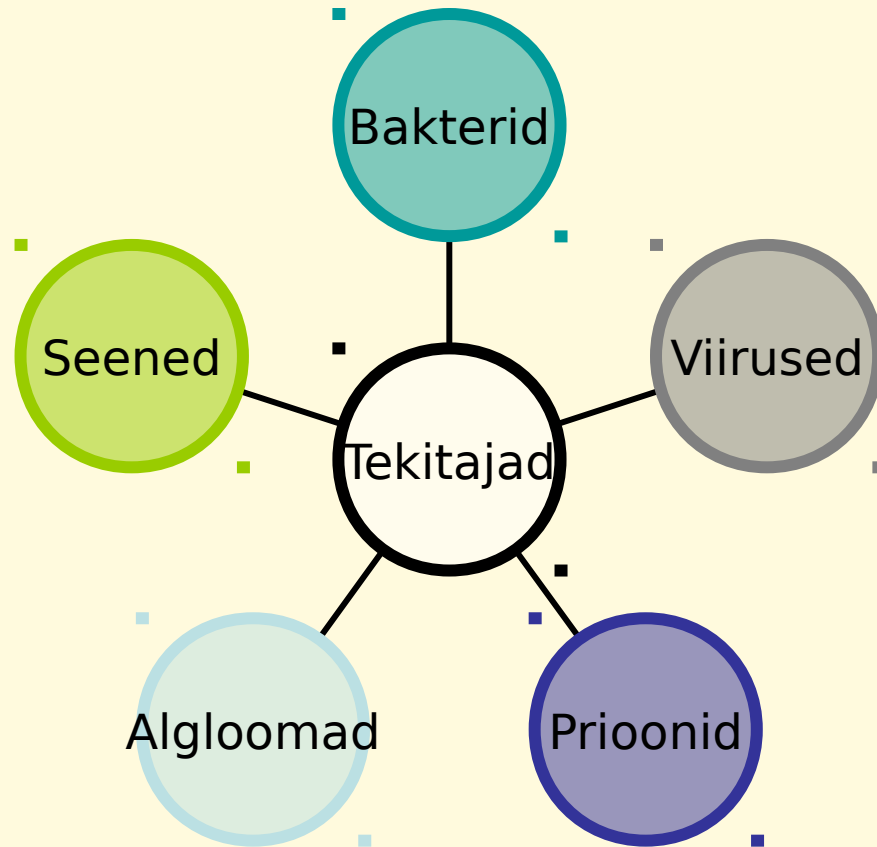


Infektsioonhaiguste diagnostika XXI sajandil

Reet Mändar

TÜ mikrobioloogia instituut

Infektsioonhaiguste tekitajad

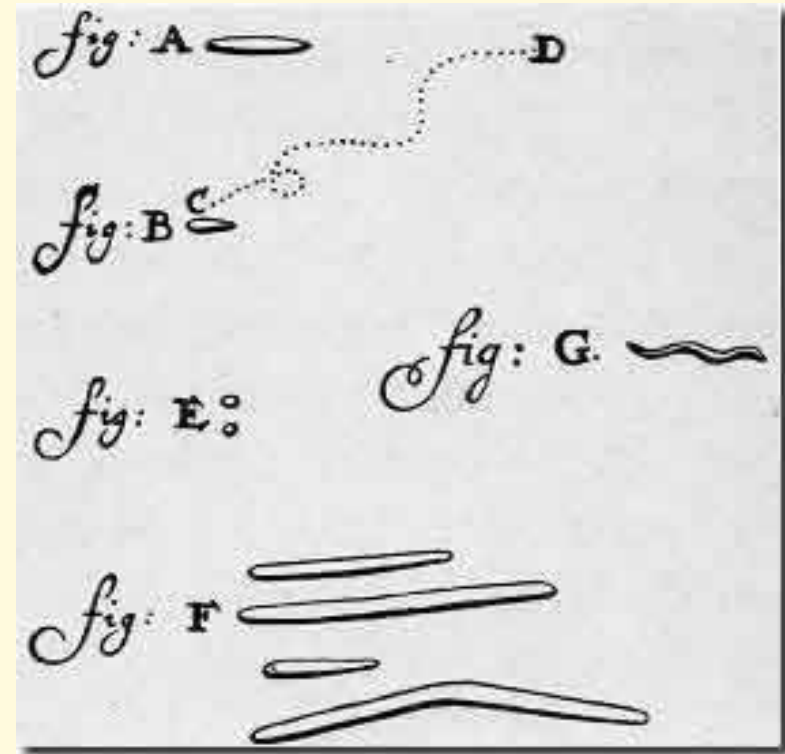
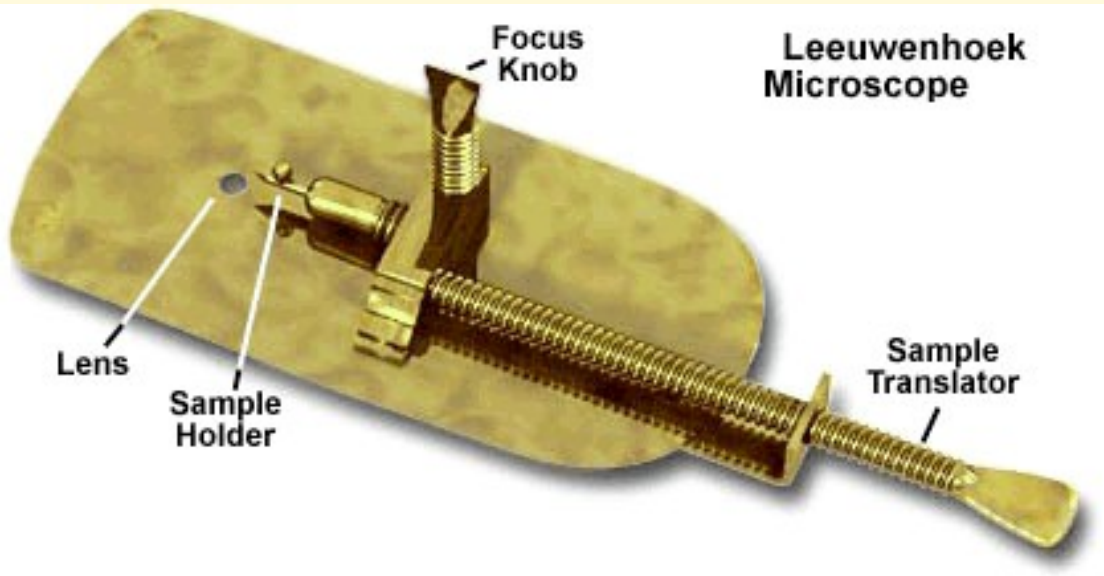


Esimene “mikroskoop”

Antonie van **Leeuwenhoek**
(1632-1723)



Joonistas omatehtud mikroskoobi
eellase abil mikroobe
alates 1683.a.



Louis Pasteur (1822-1895)



- **Nakkushaigusi tekitavad mikroorganismid**
- Käärimine on seotud mikroobidega
- Valmistas esimesed vaktsiinid (marutõve, siberi katku, kanakoolera vastu)
- Pastöriseerimine

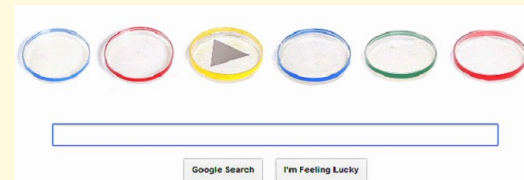
Robert Koch (1843-1910)



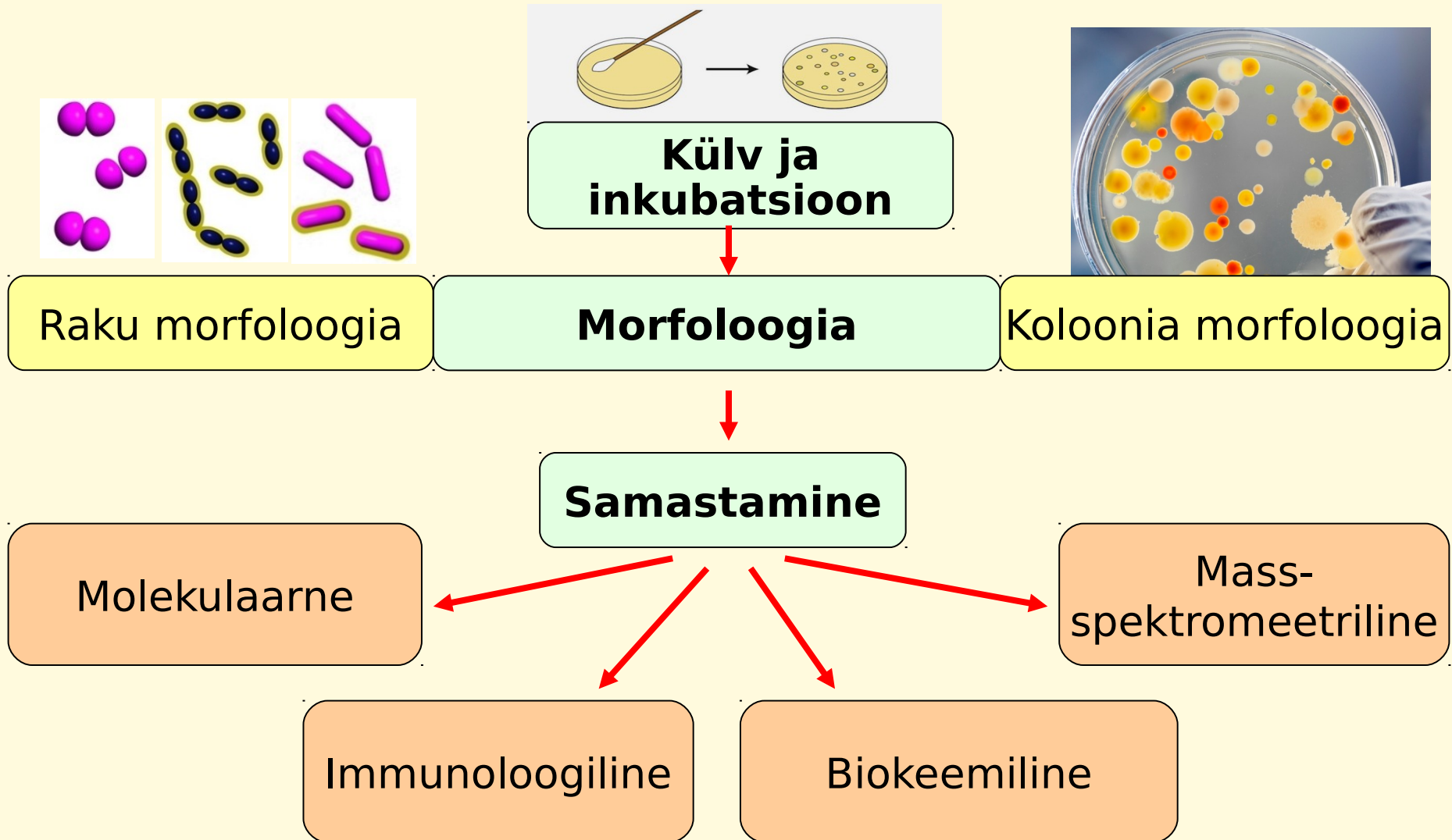
- **Mikrobioloogilised metoodikad**
- Avastas siberi katku, tuberkuloosi, koolera jt haiguste tekitajad



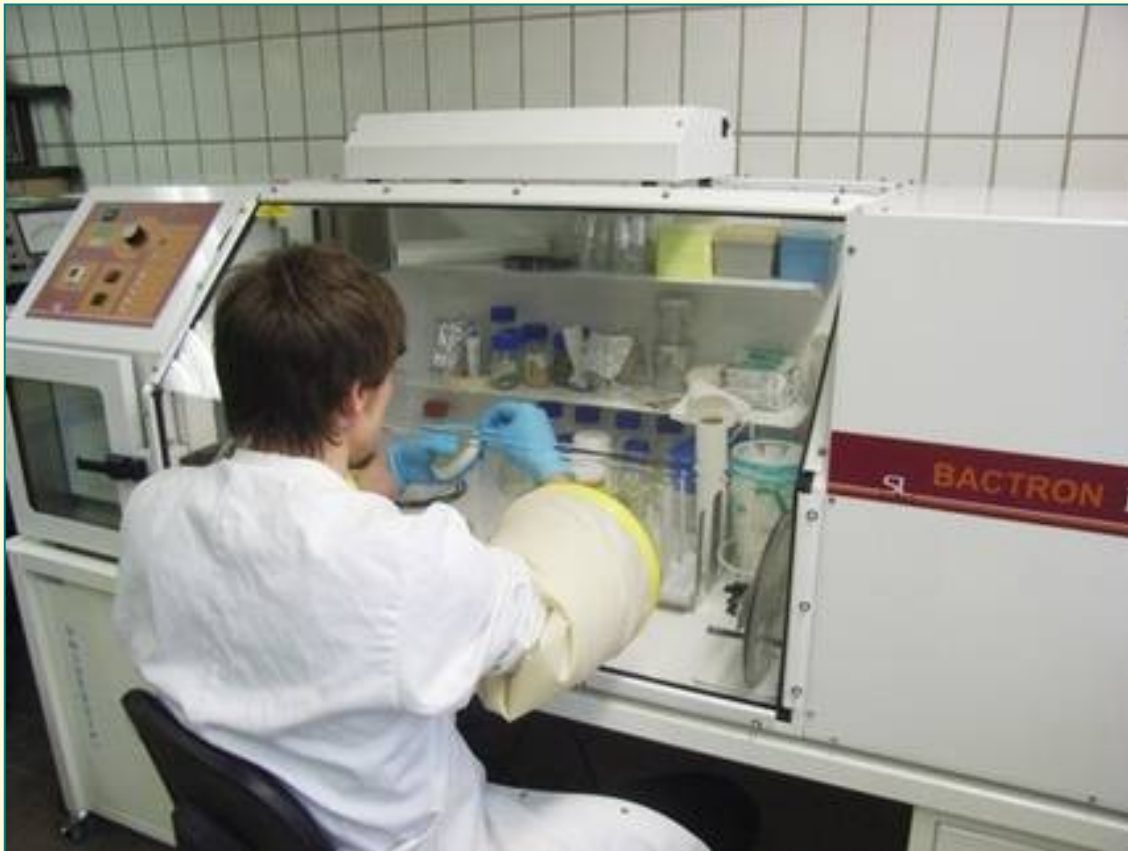
Julius R. Petri – Kochi assistent, kes leiutas Petri tassi



Bakteriakkuste diagnostika



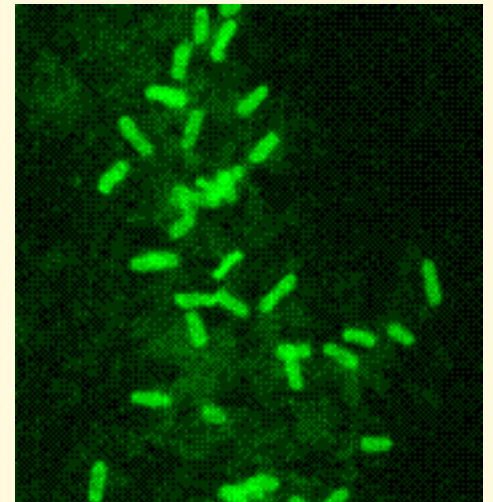
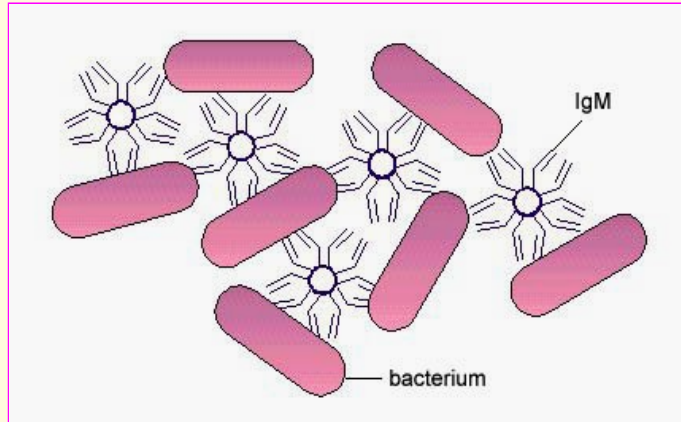
Inkubatsioon: aerobne, mikro- aerobne, anaerobne



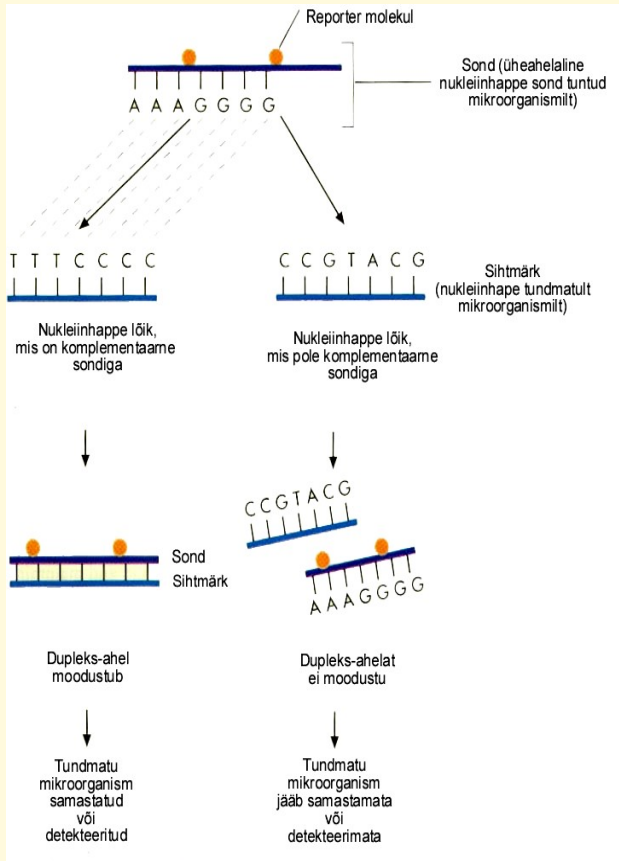
Samastamine: biokeemilised meetodid



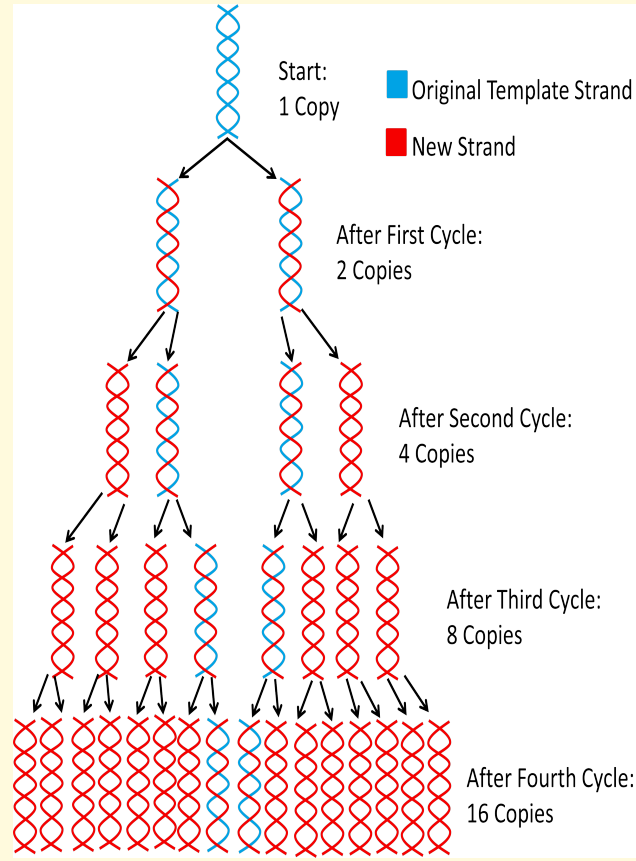
Samastamine: immunoloogilised meetodid



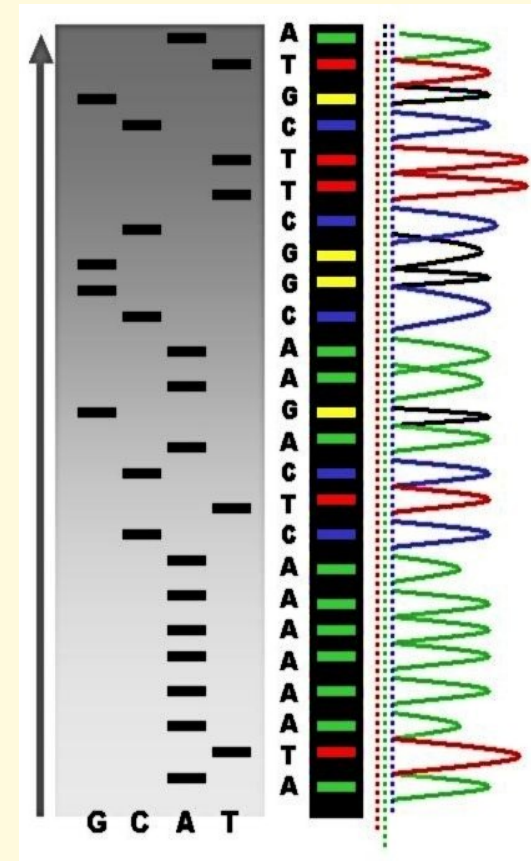
Samastamine: molekulaarsed meetodid



**Nukleiinhapete
hübridisatsioon**



**Polümeraasi
ahelreaktsioon
(PCR)**

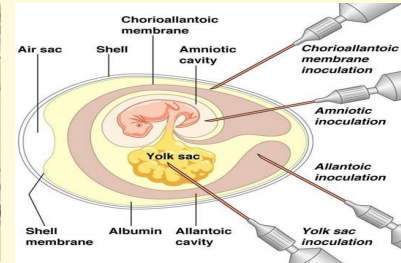
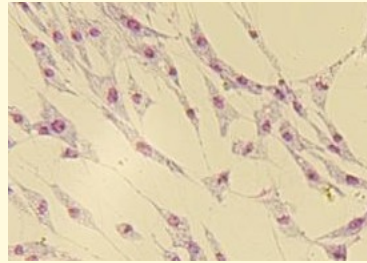


Sekvenerimine

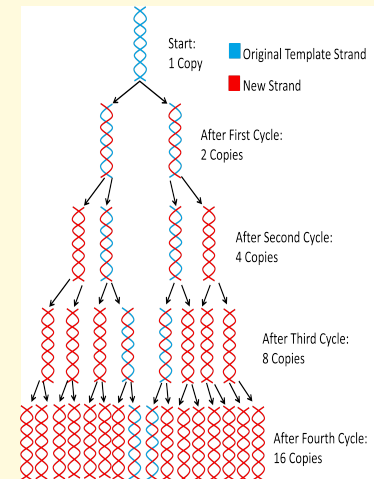
Viiirusinfektsioonide diagnostika

- Kasvatamine elusrakkudes

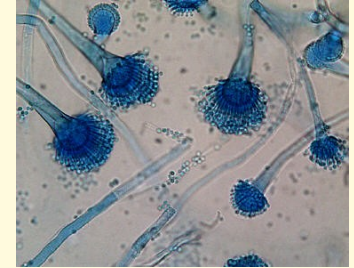
- Koekultuuris
- Kanaembrüös
- Katseloomas



- Immunoloogilised meetodid
- Molekulaarsed meetodid



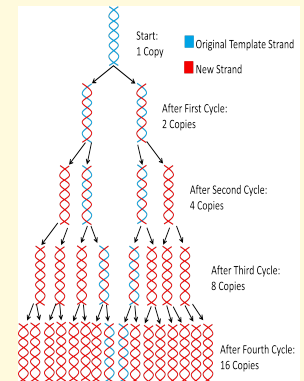
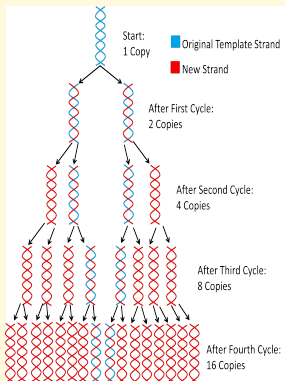
Algloom- ja seen- infektsioonide diagnostika



- Mikroskoopia
- Külvid



- Immunoloogilised meetodid
- Molekulaarsed meetodid

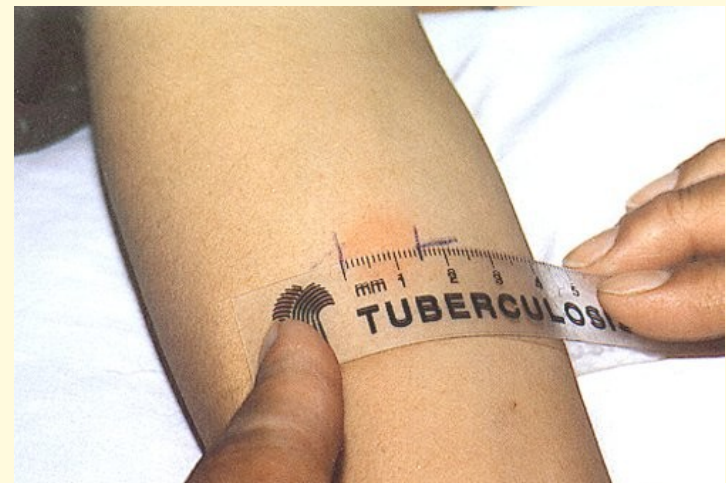
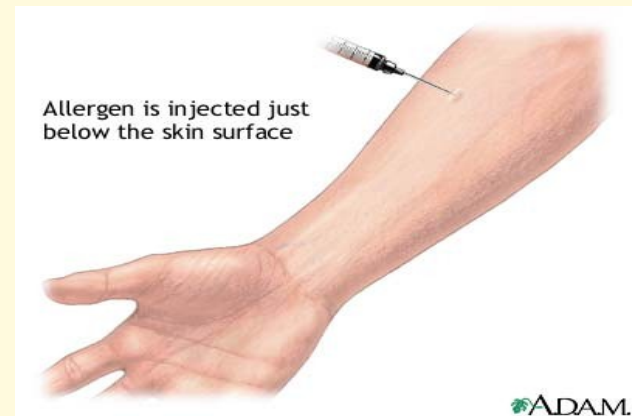


Tekitaja tuvastamine organismi vastusreaktsiooni kaudu

Antikehad vereseerumis



Allergiline nahatest



XXI sajandi mikrobioloogia

Mikrobioloogial kasvav roll:

- Infektsioonhaiguste käsitlese optimeerimisel
- Lokaalse ja globaalse epidemioloogia jälgimisel

Märksõnad:

- Proovide kogumise / testimise optimeerimine
- *Point-of-care* diagnostika
- Uued tehnoloogiad
- Automatiseerimine

Sündroomi-põhised diagnostikakomplektid

Endokardiit



Nukleiinhapete amplifikatsioonitest (NAAT) + mikrokiip + tarkvara.
Lihtne, kiire (<4 h).
Määrab olulisemad patogeendid ja kaks resistentsusmarkerit (metitsilliin, beta-laktamaas)

Uroinfektsioon



Mikroobide hulk

Gram-neg bakterite hulk

E. coli hulk

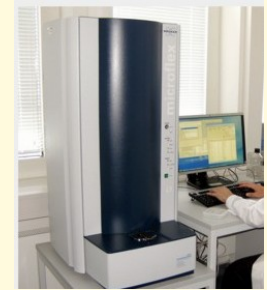
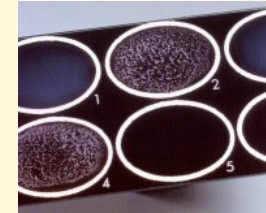
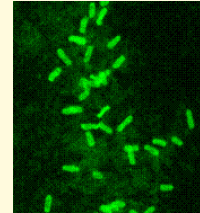
Meningiit



Lateksaglutinatsiooni komplekt olulisemate meningiidi tekitajate määramiseks.


Tekitaja määramine otse uuritavast materjalist

- Mikroskoopia
 - Nt. immuunfluorestsents
- Antigeeni määramine
 - Nt. lateksaglutinatsioon
- Mass-spektromeetria (MALDI-TOF)
 - Normaalselt steriilsed materjalid: verepudel, uriin, liikvor, küüs
- Molekulaarsed meetodid
 - NAAT (nucleic acid amplification tests)
 - Multiplex paneelid (nt. Luminex)
- Elektrooniline nina
 - Lenduvate komponentide määramine uriinist, bronhiloputisest




Point-of-care laborid ja testid

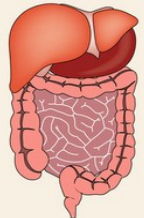
Pneumonia
 Influenza viruses
 Respiratory syncytial virus
 Mycoplasma pneumoniae
 Bordetella pertussis
 Staphylococcus aureus
 Pneumocystis jirovecii
 Legionella urinary antigen
 Pneumococcal urinary antigen

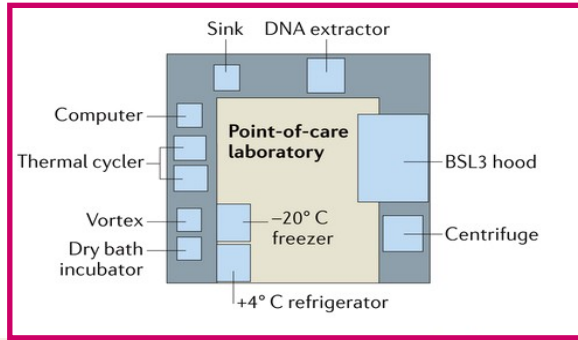


Fever in returning travellers
 Plasmodium spp.
 Dengue virus




Gastroenteritis
 Rotavirus
 Adenoviruses
 Clostridium difficile
 Helicobacter pylori







Sexually transmitted diseases
 Neisseria gonorrhoeae
 Herpes simplex virus
 HIV
 Chlamydia trachomatis



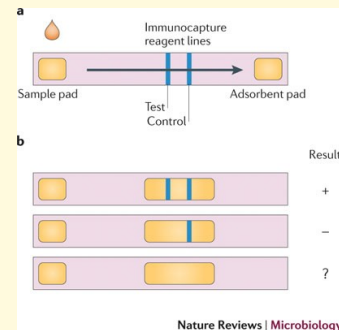
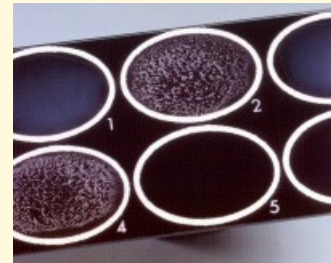
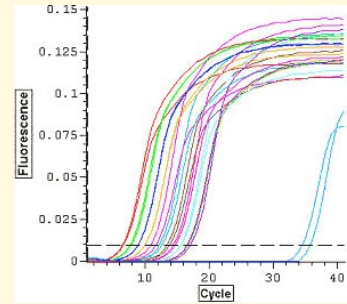
Pharyngitis
 Streptococcus pyogenes
 Epstein-Barr virus



Meningitis
 Enteroviruses
 Varicella-zoster virus
 Streptococcus pneumoniae
 Pneumococcal urinary antigen
 Cryptococcus neoformans



Nature Reviews | Microbiology



**Laeval
 Kriisikoldes
 Arsti kabinetis
 Haigla vastuvõtuosakonnas**

qPCR

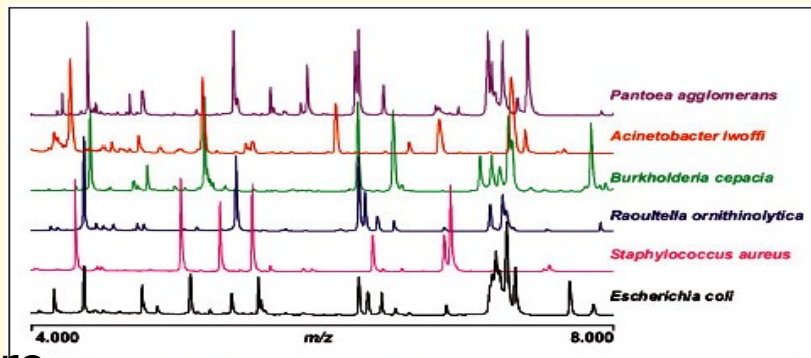
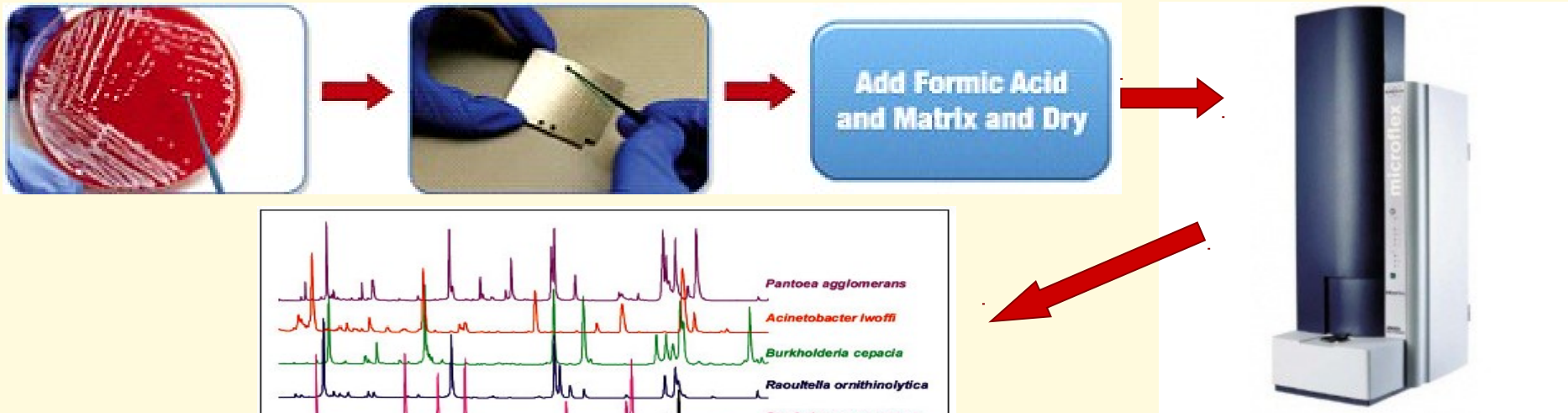
Latekstestid

Immuunkromatograafilised testid

Uued tehnoloogiad: mikroobide samastamine

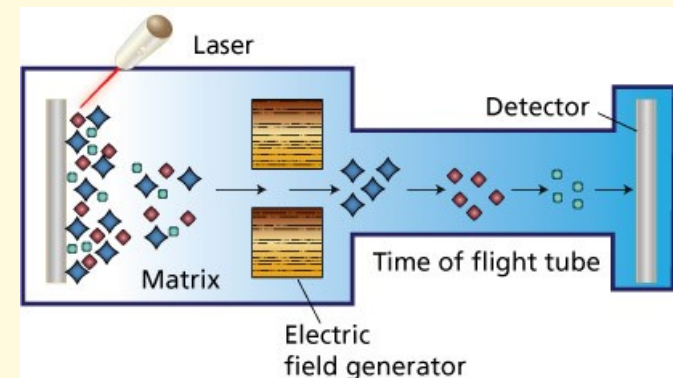
Mass-spektromeetria

MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight*)



Odav, kiire.
Sobib kultuuridele ja mõnedele
almaterjalidele.
Sobib ka tüpiseerimiseks.

Kallis aparatuur.
Mõned probleemsed mikroobid (streptokokid)



Uued tehnoloogiad: mikroobide samastamine

Raman spektroskoopia



Valgus hajub mikroobiga kohtudes.
Võrreldakse kui palju on hajunud
valguskvantide energiad muutunud
võrreldes pealelangenuid
valguskvantide energiatega.

Täpne, kiire, odav.
Kallis aparatuur, vahel nõrk signaal

Fenotüüpsed mikrokiibid Biolog system

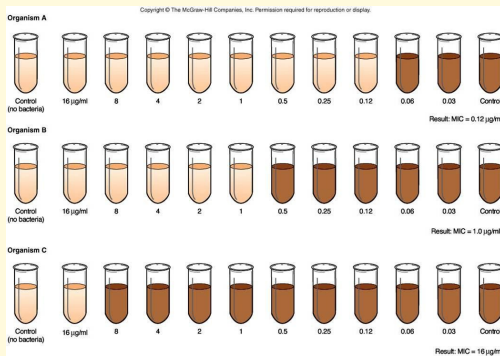


Sadu fenotüübi teste
ühel kiibil

Täpsus veidi väiksem kui
sekveneerimisel.
Aeglasem kui MALDI-TOF.

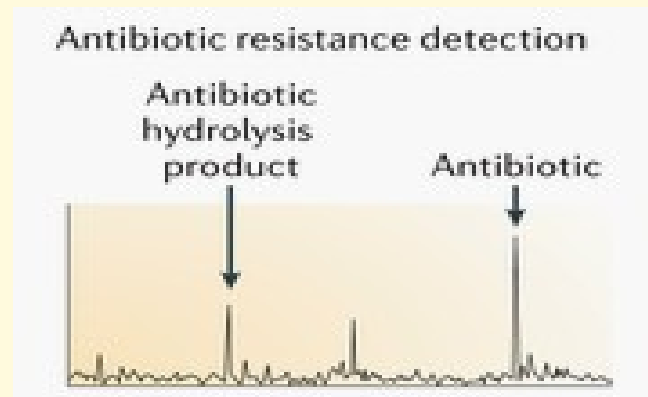
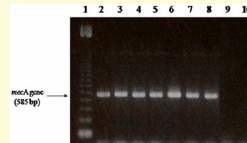
Uued tehnoloogiad: ravimiresistentsuse testimine

Kuldstandard:
fenotüübilised meetodid
(MIC määramine)

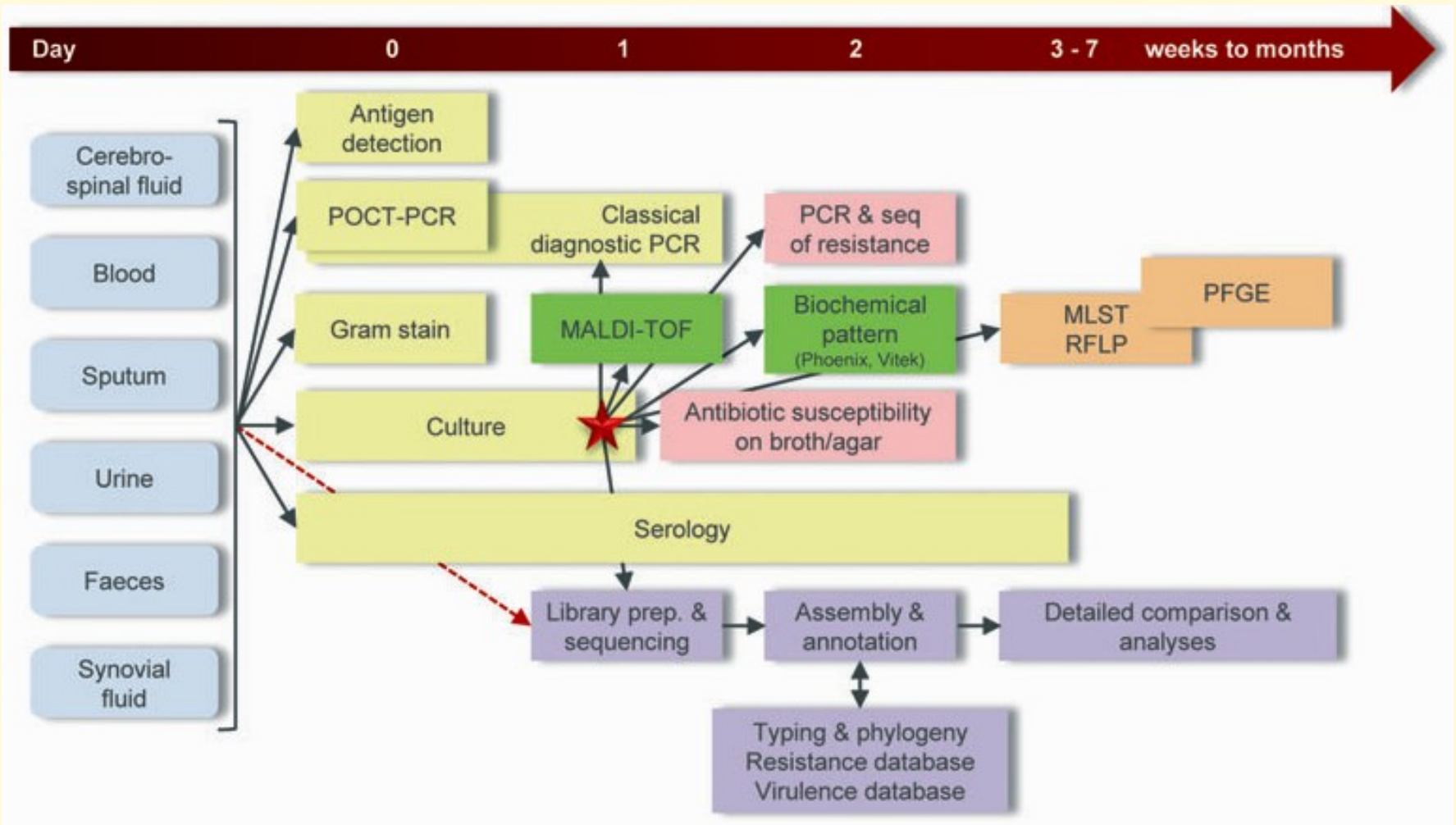


Uued meetodid

- Mõne teadaoleva geeni määramine (*mecA*): PCR
- Mutatsioonide määramine: DNA mikrokiip ja uue põlvkonna sekveneerimine
- Beta-laktamaaside määramine: MALDI-TOF (1...4 h, hea tundlikkus ja spetsiifilisus)



Ajafaktor sõltub meetodi(te)st



MALDI-TOF MS, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry; MLST, multilocus sequence typing; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; POCT, point-of-care tests; RFLP, restriction fragment length polymorphism.

Kas tulevik kuulub uue põlvkonna sekveneerimisele?

- o **MiSeq** (*Illumina*)
- o **Ion Torrent Personal Genome MAchine** (*Life Technologies*)
- o **454 GS Junior** (*Roche*)

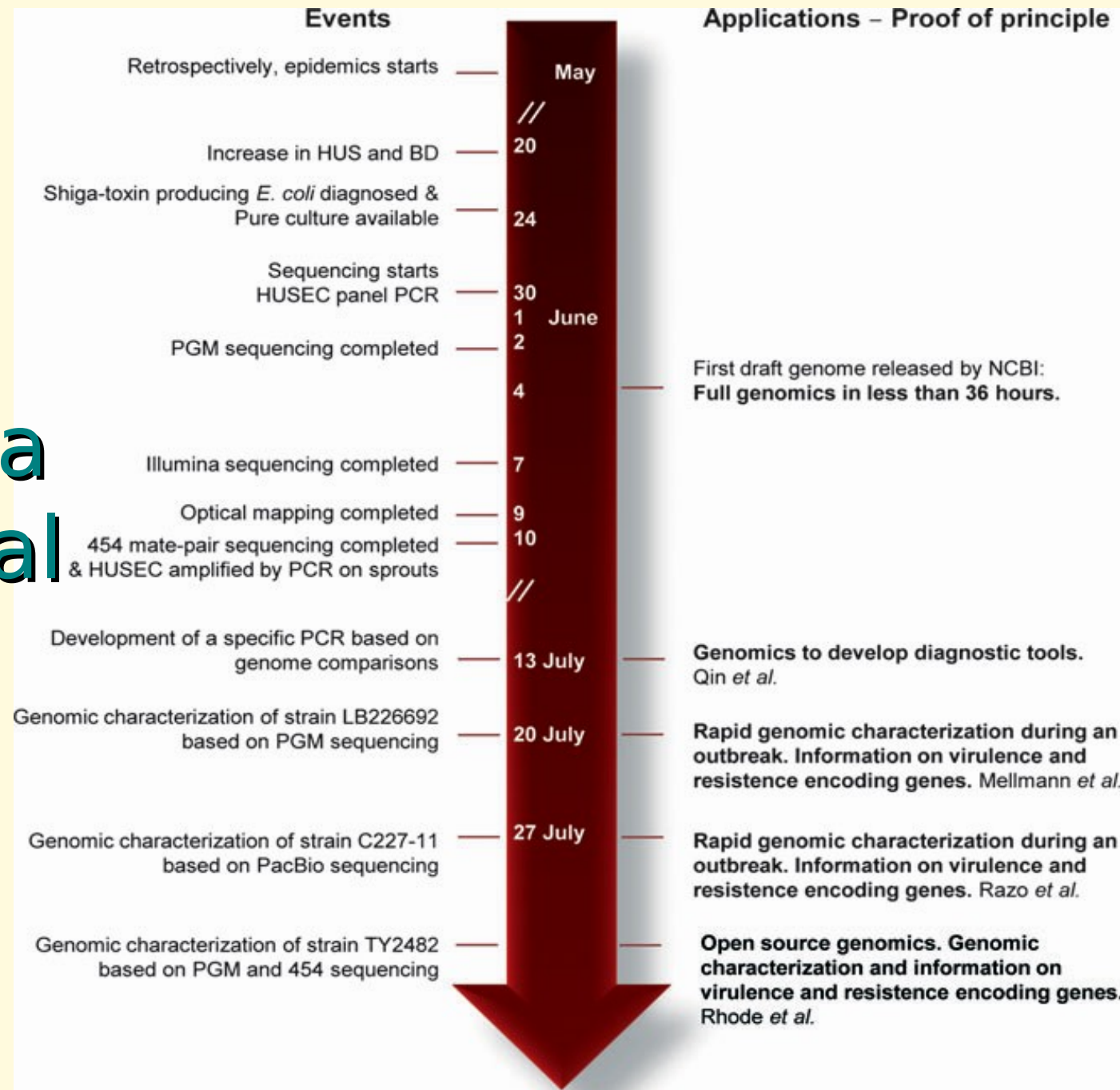
- Bakterid, viirused, seened, algloomad
- Hind alaneb
- Aeg vastuse saamiseni lüheneb
- Võimaldab otsingulist analüüsi
- Võimaldab tüvede täpset identifitseerimist puhangute korral ja epidemioloogia jaoks
- Võimaldab omaduste määramist (virulentsusfaktorid, resistentsus).
- Võimaldab määrata mikroobi otse uuritavast materjalist
- Parem arusaamine mikroobi ja peremeesorganismi suhetest

Peamine probleem: kiire, aga järgnev bioinformaatika võtab aega



E. coli O104:H4 epideemia Saksamaal 2011

BD, bloody diarrhoea;
HUS, haemolytic-
uraemic syndrome;
HUSEC, entero-
haemorrhagic *E. coli*
associated with HUS.



Automatiseerimine: üksikud töö etapid



Söötmete valmistaja



DNA ekstraktor

Preparaatide
värviija



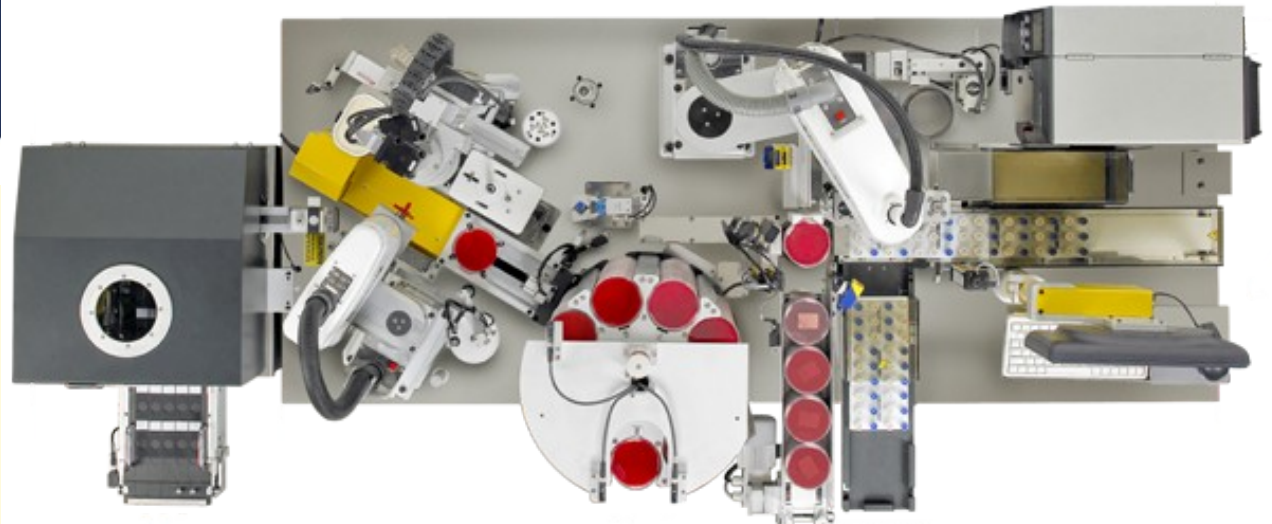


WASP

*walk-away
specimen
processor*

Algmaterjali külv
agarplaatidele ja
vedelsöötmesse

Preparaadi
valmistamine ja
värvimine Grami j.



Automaatsed laborid – TLA

(total lab automation)

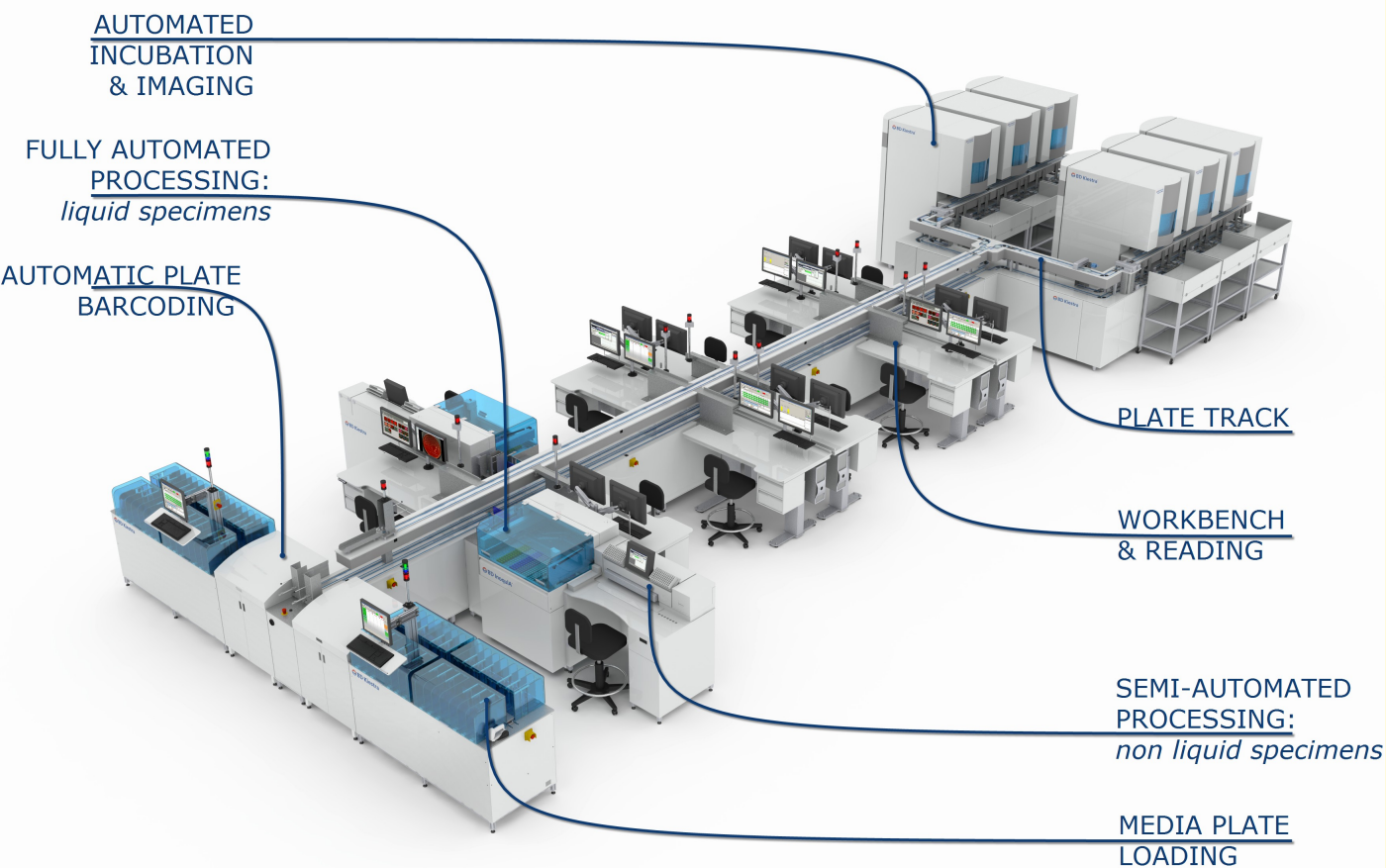
- **Kiestra TLA** (BD Kiestra B.V., Drachten, Netherlands)
- **FMLA** (Full microbiology laboratory automation; bioMérieux, Inc., La Balme, France)
- **WASPLab** (Copan Diagnostics, Murrieta, CA)

Ühised omadused:

- Konveiersüsteem külvide transpordiks inkubaatorisse ja tagasi
- Digitaalkaamerad söötmeplaatide pildistamiseks kindlate ajaintervallide järel
- Automaatsed inkubaatorid digitaalse lugemisjaamaga
- Spetsiaalne arvuti-tarkvara



Kiestra TLA



Esimene valmis 2006.

Koosneb moodulitest, mida saab erinevalt kombineerida.

Tõstab tööviljakust üle kahe korra.

Millised probleemid jäävad?

Preanalüütilised faktorid

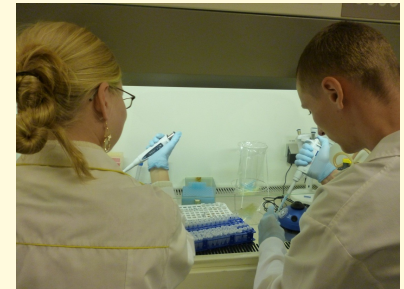
- Kas teha mikrobioloogiline uuring?
- Milliste patogeenide suhtes?
- Milliseid meetodeid kasutada?
- Üksiktest või komplektest?
- Proovi võtmine
 - Sobiv materjal
 - Õige transportsööde/konteiner
 - Transpordi aeg ja tingimused
 - Haiguse staadium
 - Enne AB-ravi
- Täiendav info
 - Riskifaktorid
 - Anamnees
 - Epid. olukord

Postanalüütilised faktorid

- Tulemuse interpreteerimine!
- Positiivne leid \neq haigus!
 - Haigus
 - Asümptomaatiline infekts.
 - Kolonisatsioon
 - Kontaminatsioon
- Antikehad seerumis
 - Äge haigus
 - Asümptomaatiline haigus
 - Vaktsineerimine
 - Varem põetud infektsioon

Lahendus

- Tulemuste interpreteerimise tarkvara oleks kasulik
- Elukestev õpe ja treening
 - Laboripersonal
 - Ravipersonal



**Tipptasemel masinapark laboris
ei asenda arstlikku mõtlemist!**