

Obrigada por ver esta apresentação
Gostaríamos de recordar-lhe que esta
apresentação é propriedade do autor.

É-lhe fornecida pela Sociedade Portuguesa
de Pediatria no contexto do 19º
Congresso Nacional de Pediatria, para
seu uso pessoal, tal como submetido pelo
autor

© 2018 pelo autor



Curso: Actualizações em Pediatria

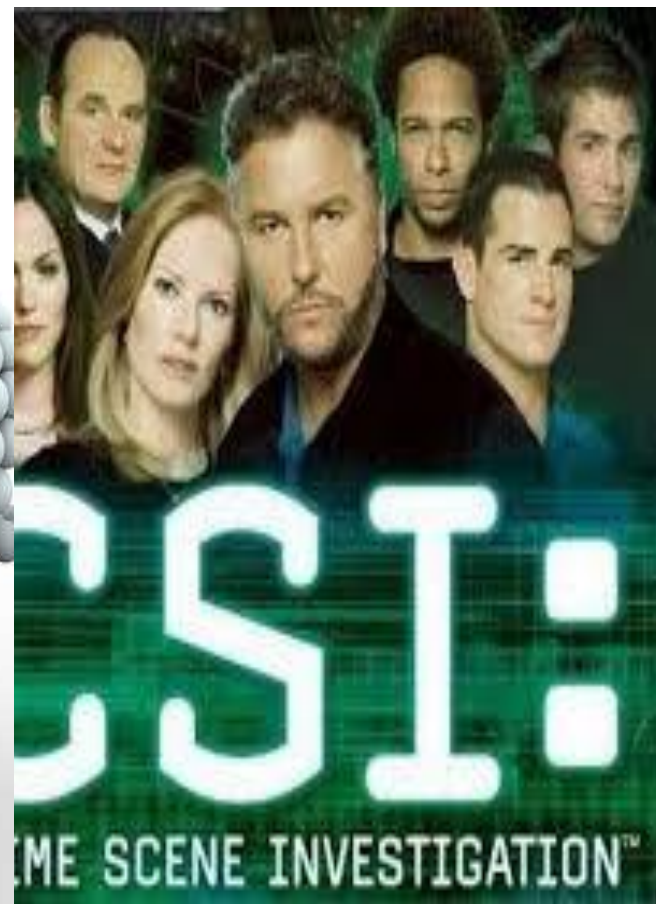
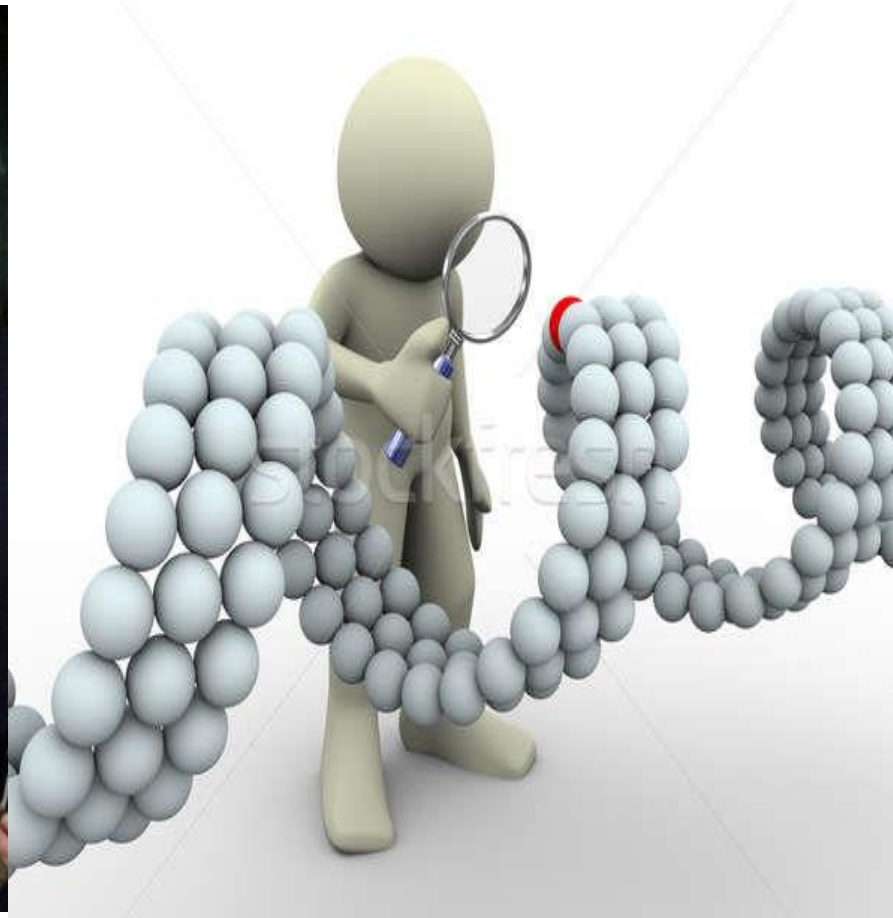
Exames Laboratoriais em Infeciologia: Biologia Molecular

Rita Côrte Real, Laboratório Biologia Molecular



CENTRO HOSPITALAR
UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
CENTRAL

Diagnóstico Molecular



Diagnóstico Molecular

Testes baseados na amplificação e detecção de ácidos nucleicos

- Identificação de microrganismos que não crescem ou crescem lentamente em meios de cultura - vírus, bactérias, fungos e parasitas
- Diferenciação de espécies e de subtipos muito semelhantes
- Mutações de resistência: diagnóstico e tratamento
- Rotina laboratorial



Diagnóstico Molecular

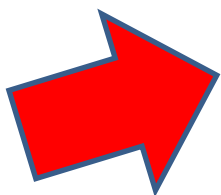
Validação analítica
e
Validação clínica



Diagnóstico Molecular- Técnicas

Técnica	Objectivo	Exemplos
RFLP	Comparação de DNA	Epidemiologia molecular
Electroforese de DNA	Comparação de DNA	Diferenças entre estirpes virais
Electrofores em gel de campo pulsado	Comparação de DNA(fragmentos grandes)	Comparação ente estirpes estreptococicas
Hibridização <i>in situ</i>	Deteção e localização de seqências de DNA em tecido	Deteção de virus como CMV e HPV em fase não replicativa
Dot blot	Deteção de sequência de DNA em solução	Detecção de DNA Viral
Southern blot	Deteção e caracterização de seqências de DNA pelo tamanho	Identificação de estirpes virais específicas
Northern blot	Deteção e caracterização de seqências de RNA pelo tamanho	Identificação de estirpes virais específicas
PCR	Amplificação e deteção de amostras de DNA	Deteção de virus DNA
RT-PCR	Amplificação e deteção de amostras de RNA	Deteção de virus RNA
PCR em tempo real	Amplificação e deteção de amostras de DNA e RNA	Quantificação do DNA /RNA Viral-carga viral
Ensaio de captura hibrida	Amplificação e deteção de amostras de DNA e RNA	Quantificação do DNA /RNA viral
Espectrometria de massa- MALDI-TOF	Análise rápida e sensível de amostras de DNA, RNA e proteínas	Análise sequencial, identificação microrganismos
SDS-PAGE	Separação de proteínas por peso molecular	Epidemiologia molecular

8



Diagnóstico Molecular

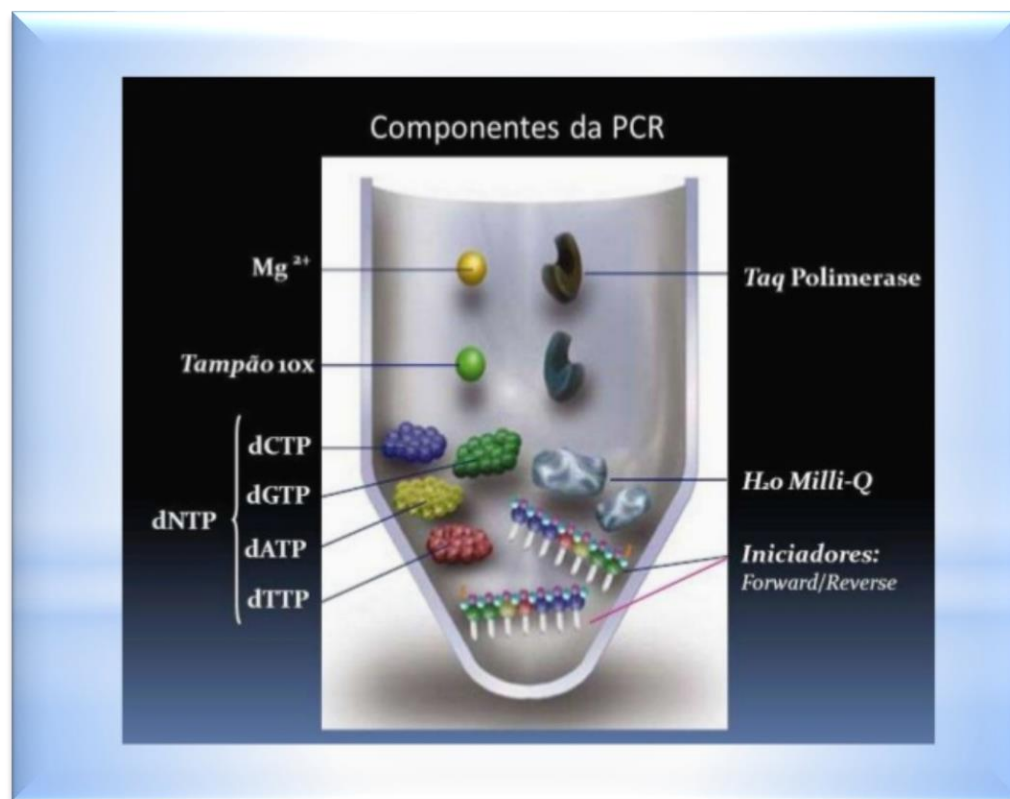
Reação em cadeia da polimerase (PCR)

- Revolução na deteção dos ácidos nucleicos
- Concebida por Kary Mullins-1985
- Prémio Nobel em Química-1993
- Tecnologia que produz múltiplas cópias da sequência nucleotídica de um determinado segmento de ADN
- “Fotocopiadora” molecular
- Deteção da presença de microrganismos : qualitativa e quantitativa

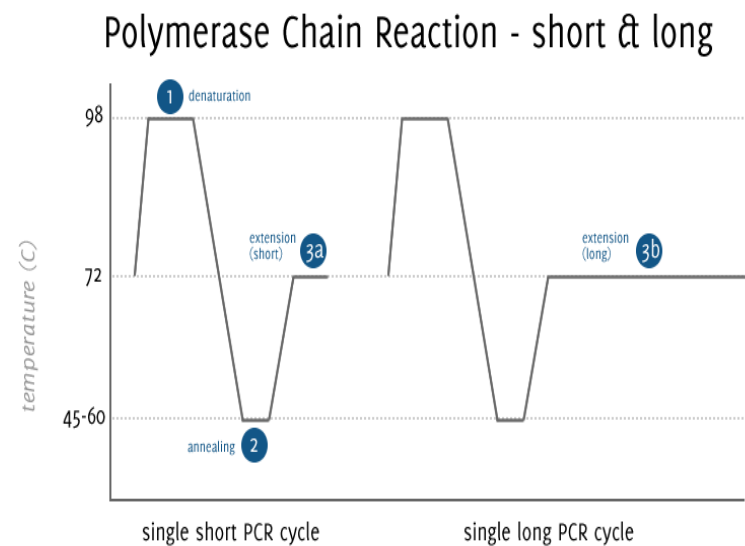


Diagnóstico Molecular

Reação em cadeia da polimerase (PCR)- após extração



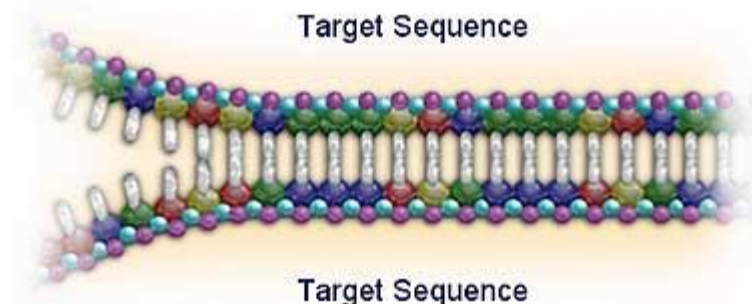
Ciclo de PCR e temperatura



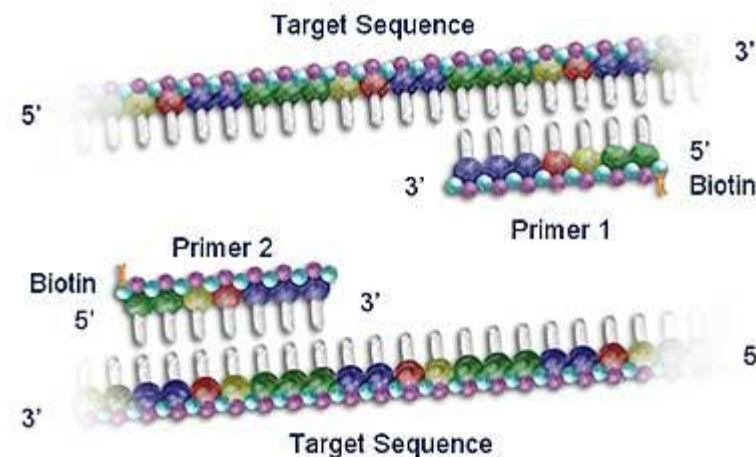
Diagnóstico Molecular

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

1.Desnaturação - separar a dupla cadeia de ADN



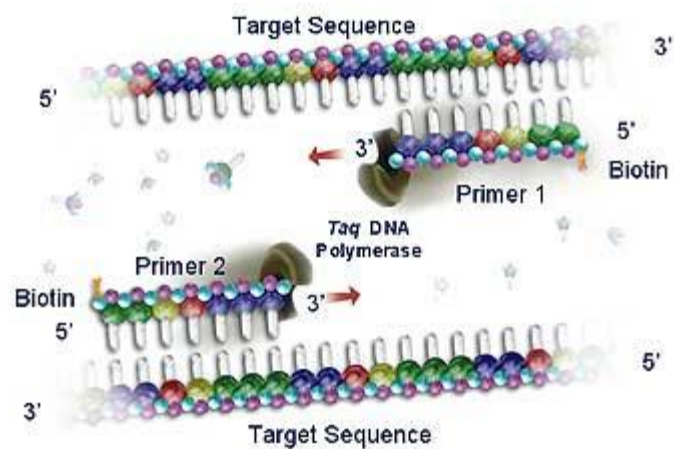
2.*Annealing*- ligar os *primers* à sequência-alvo de ADN



Diagnóstico Molecular

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

3.Extensão – fazer uma cópia

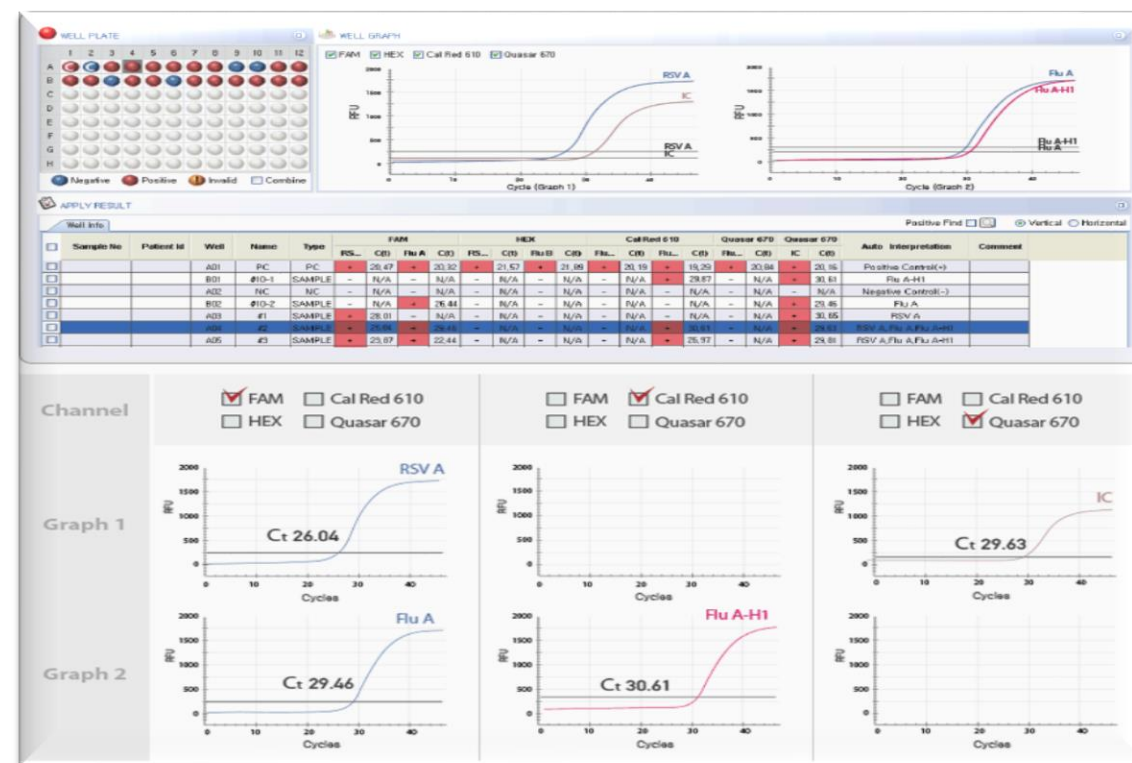


Milhões de cópias em poucas horas

Nº de Ciclos	Nº de cópias alvo
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
8	64
20	1 048 578
30	1 073 741 824

Diagnóstico Molecular - PCR em tempo real

- Rapidez e simplicidade
- Sensibilidade e especificidade
- Elevado nº de testes por sessão
(*high throughput*)
- Quantificação
- Experiência
- Custo



Diagnóstico Molecular

Complexidade dos testes PCR

Um alvo

- MRSA, *C. difficile*, CMV, enterovirus...

Dois alvos

- Flu A and B, CT/NG

Multiplex

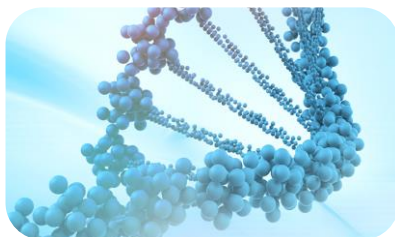
- Virus respiratórios, herpesvirus, virus gastrointestinais...



Diagnóstico Molecular - PCR



Resultados dependem:



- qualidade de todos os seus componentes, incluindo ADN-alvo
- condições da reação



- equipamento utilizado
- sistema de amplificação/deteção



- ambiente (temperatura, humidade, limpeza química e microbiológica)
- experiência/prática do operador.



Diagnóstico Molecular - fases



Diagnóstico Molecular - fase pré-analítica

Os testes moleculares são especialmente sensíveis aos procedimentos na fase pré-analítica

Erros pré-analíticos
responsáveis por cerca de
85% dos erros
laboratoriais

95% destes erros ocorrem
fora do laboratório

Falsos Negativos
e
Falsos Positivos



Diagnóstico Molecular - fase pré-analítica

Qualidade da amostra:

1. Colheita – tubo com EDTA; tubo ou contentor estéril; zaragatoa e/ou contentor específicos; tubo primário - < erro na identificação
2. Meio de transporte adequado (manual de colheitas do Laboratório)

No laboratório:

1. Tratamento - centrifugação/homogeneização
2. Armazenamento – condições estéreis e temperatura

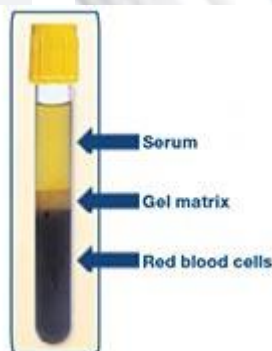


Ausência de interferentes da PCR (heparina, formol, fenol, etc)
Reduzir a actividade das DNases e RNAses



Diagnóstico Molecular- fase pré-analítica

Colheita - tubo ou contentor estéril, meios específicos; adequado ao transporte



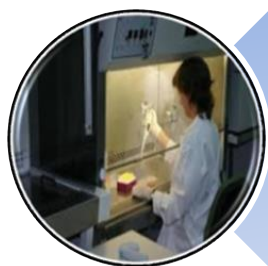
Diagnóstico Molecular - processamento de amostra



Organização do
Laboratório/Espaço dedicado



Câmaras de fluxo laminar



Equipamento de proteção
adequado - bata, luvas, óculos



Contaminação e incidentes com material infeccioso



Diagnóstico Molecular- automatização total

Extração



Amplificação/ deteção



**Automatização total
>384 testes**



Diagnóstico Molecular - abordagem sindrómica

- Diagnóstico e acesso mais rápido ao tratamento adequado
- Diagnóstico diferencial e diagnóstico de co-infecções
- Diagnóstico mais rápido em populações especiais como crianças, idosos e doentes imunocomprometidos
- Rápida identificação do agente – implementação de medidas de prevenção e controlo de infeção
- Menor utilização de antimicrobianos
- Redução dos custos



Abordagem sindrómica – infeções respiratórias

- As infeções respiratórias estão associadas a elevada taxa de morbilidade e mortalidade
- O diagnóstico preciso do(s) microrganismo(s) envolvido(s) tem um efeito significativo na evolução da doença -instituição da terapêutica adequada
- Os testes de um único alvo tornam-se demorados e necessitam de um grande volume de amostra
- Os testes *multiplex* permitem a deteção rápida de dezenas de microrganismos diferentes, em simultâneo
- O painel respiratório pode ser construído a partir de painéis *customizados*



Painel respiratório – associação de vários painéis

Virus	Sensibilidade (%)	Especificidade(%)
Adenovirus	88.9	98.3
Coronavirus HKU1	95.8	99.8
Coronavirus 229E	98.8	100
Coronavirus OC43	100	99.6
Human Metapneumovirus	94.6	99.2
Human Rhinovirus/Enterovirus	92.7	95.6
Influenza A	90.0	99.8
Influenza A/H3	100	100
Influenza A/H1pdm2009	88.9	99.6
Influenza B	100	100
Parainfluenza Virus 1	100	99.9
Parainfluenza Virus 2	88.4	99.8
Respiratory Syncytial Virus	100	89.1
<i>Bordetella pertussis</i>	100	99.9
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	100	100
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	100	100

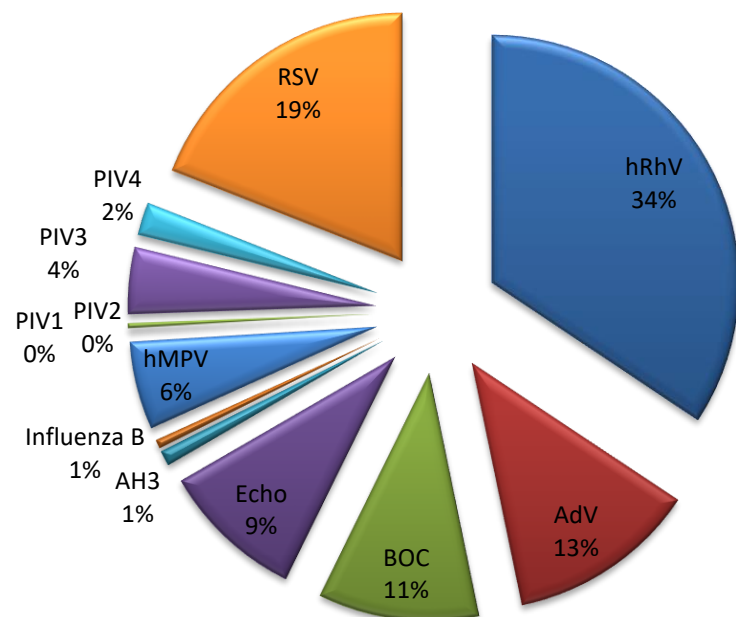


Painel respiratório – associação de vários painéis

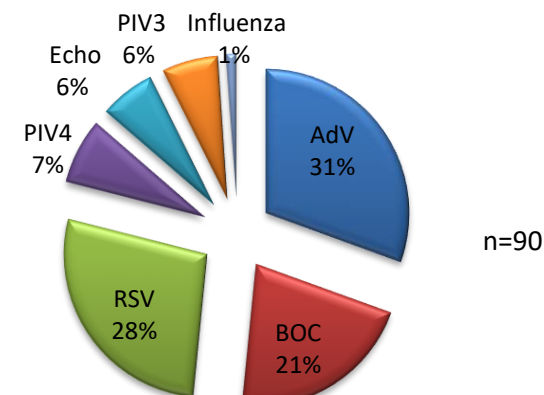
Distribuição dos virus em amostras pediátricas

2017

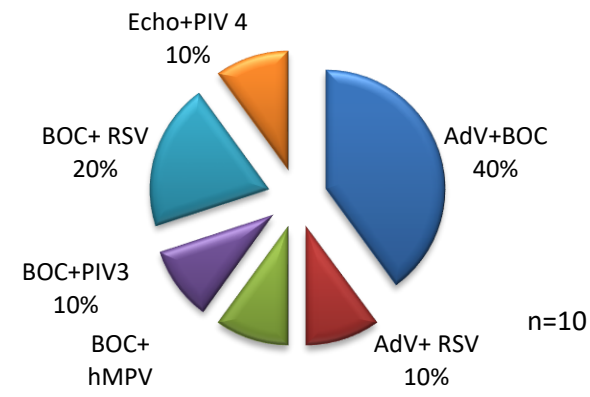
n= 686



Associação Rhino e outros Virus



Associação Rhino e outros dois Virus



Abordagem sindrómica - meningites/encefalites

- As infeções do SNC requerem um diagnóstico precoce
- O quadro clínico pode evoluir rapidamente
- Podem causar sequelas permanentes ou mesmo a morte
- O tratamento adequado deve ser iniciado o mais rapidamente possível

Os agentes patogénicos podem ser vírus, bactérias, fungos ou parasitas



Abordagem sindrómica - meningites/encefalites

Painel 1

- Adenovirus
- Citomegalovirus
- Enterovirus (polio, coxsackie, echovirus, other enterovirus)
- Epstein-Barr virus

Painel 2

- Human Herpes virus 6
- Human Herpes virus 7
- Varicella-zoster virus
- Human Parechovirus
- Parvovirus B19

Painel 3

- *Hemophilus influenzae*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Neisseria meningitidis*
- etc...

Abordagem sindrómica - infeções gastrointestinais

Painel 1

- **Bactérias**
- *Campylobacter (jejuni, coli & upsaliensis)*
- *Clostridium difficile (Toxin A/B)*
- *Plesiomonas shigelloides*
- *Salmonella*
- *Yersinia enterocolitica*
- *Vibrio (parahaemolyticus, vulnificus, & cholerae)*
- *Vibrio cholerae*

Painel 2

- **E. coli/Shigella**
- *E. coli O157*
- Enteroaggregative *E. coli* (EAEC)
- Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)
- Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) *lt/st*
- Shiga-like toxin-producing *E. coli* (STEC) *stx1/stx2 E. coli O157*
- Shigella/Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

Painel 3

- **Virus**
- Adenovirus F 40/41
- Astrovirus
- Norovirus GI/GII
- Rotavirus A
- Sapovirus (I,II, IV, and V)

Painel 4

- **Parasitas**
- *Cryptosporidium*

Abordagem sindrómica – infeções da corrente sanguínea

Painel 1

- Bactérias Gram positivo
 - Enterococcus
 - Listeria monocytogenes
 - Staphylococcus
 - Staphylococcus aureus
 - Streptococcus
 - Streptococcus agalactiae
 - Streptococcus pyogenes
 - Streptococcus pneumoniae

Painel 2

- Fungos
 - Candida albicans
 - Candida glabrata
 - Candida krusei
 - Candida parapsilosis
 - Candida tropicalis

Painel 3

- Bactérias Gram negativo
 - *Acinetobacter baumannii*
 - *Haemophilus influenzae*
 - *Neisseria meningitidis*
 - *Pseudomonas aeruginosa*
 - *Enterobacteriaceae*
 - - *Enterobacter cloacae* complex
 - *Escherichia coli*
 - *Klebsiella oxytoca*
 - *Klebsiella pneumoniae*
 - *Proteus*
 - *Serratia marcescens*

Painel 4

Factores de resistência

Van A e VanB
Genes das
carbapenemases
(IMP1, KPC, OXA 48,
NDM e VIM)



Diagnóstico Molecular - *microarrays*

- Têm o potencial de detetar sequências –alvo de múltiplos microrganismos simultaneamente
- Detecção de factores de virulência e de resistência antimicrobiana
- Eficiência variável de hibridização
- Falsos negativos e falsos positivos



Resp TAC

1. RSV A
2. RSV B
3. HPIV 1
4. HPIV 2
5. HPIV 3
6. HPIV 4
7. Enterovirus
8. Rhinovirus
9. B. pertussis ptx S1
10. HCoV OC43/HKU1
11. 18S RNA
12. HCoV NL63
13. HCoV 229E
14. hMPV
15. MS2 IC
16. Adenovirus #1
17. Bocavirus
18. Adenovirus #2
19. L. pneumophila
20. M. pneumoniae
21. C. pneumoniae
22. Coxiella burnetii
23. C. psittaci
24. M. tuberculosis



25. Flu B #1
26. Flu B #2
27. Flu A #1
28. Flu A #2
29. Flu A #3
30. Flu A H1 2009 #1
31. Flu A H1 2009 #2
32. Tamiflu Sensitive
33. Tamiflu Resistant
34. Flu A H5
35. Flu A H3 #1
36. Flu A H3 #2
37. Flu A H7
38. CMV
39. M. pneumoniae #2
40. B. pertussis IS481
41. Parechovirus
42. P. jiroveci
43. RSV #3
44. HCoV OC43
45. RNase P IC
46. HPIV 1 #2
47. HPIV 3 #3
48. Rhinovirus #2

ECMO TAC

1. RSV A
2. RSV B
3. HPIV 1
4. HPIV 2
5. HPIV 3
6. HPIV 4
7. Enterovirus
8. Rhinovirus
9. B. pertussis ptx S1
10. HCoV OC43/HKU1
11. 18S RNA
12. HCoV NL63
13. HCoV 229E
14. hMPV
15. MS2 IC
16. Adenovirus #1
17. Bocavirus
18. Adenovirus #2
19. L. pneumophila
20. M. pneumoniae
21. C. pneumoniae
22. Coxiella burnetii
23. C. psittaci
24. M. tuberculosis



25. Flu B #1
26. Flu B #2
27. **Staph PVL**
28. Flu A #2
29. Flu A #3
30. **S. pneumoniae**
31. **S. pyogenes**
32. **S. aureus (Nuc)**
33. Aspergillus 28S
34. **Staph spp (Tuf)**
35. **MecA gene**
36. **N. meningitis**
37. **H. influenzae**
38. **Mycobacteria spp**
39. M. pneumoniae #2
40. B. pertussis IS481
41. Parechovirus
42. P. jiroveci
43. RSV #3
44. HCoV OC43
45. RNase P IC
46. HPIV 1 #2
47. HPIV 3 #3
48. Rhinovirus #2

CNS TAC

1. Enterovirus #1
2. Enterovirus #2
3. S. pneumoniae
4. S. pyogenes
5. S. aureus (Nuc)
6. H. influenzae
7. Parechovirus
8. S. pyogenes #2
9. N. meningitis
10. S. agalactiae #1
11. 18S RNA
12. E. coli
13. L. monocytogenes #1
14. L. monocytogenes #2
15. LCMV
16. Staph spp (Tuf)
17. S. agalactiae #2
18. C. neoformans
19. Cryptococcus ITS
20. Rubella virus
21. B19
22. B. thuringiensis IC
23. BK/JC virus
24. Measles virus



25. RNase P IC
26. Mumps virus
27. West Nile virus
28. JC virus
29. BK virus
30. HSV #1
31. HSV #2
32. HSV type 1
33. HSV type 2
34. VZV #1
35. VZV #2
36. EBV #1
37. EBV #2
38. CMV #1
39. CMV #2
40. HHV 6 A/B
41. HHV 7
42. HHV 8
43. Mycobacteria spp
44. M. tuberculosis
45. B. burgdorferi
46. T. gondii
47. HSV #3
48. MS2 IC

Jaundice TAC

1. HAV #1
2. HAV #2
3. HBV #1
4. HBV #2
5. HDV
6. HGV
7. HEV #1
8. HEV #2
9. HCV #1
10. HCV #2
11. 18S RNA
12. HCV gt 1 #1
13. HCV gt 1 #2
14. HCV gt 2 #1
15. HCV gt 2 #2
16. HCV gt 3 #1
17. HCV gt 3 #2
18. HCV gt 3 #3
19. HCV gt 3 #4
20. HCV gt 4
21. B19
22. Sen V/TTV
23. SV40
24. Dengue virus



25. RNase P IC
26. Adenovirus #1
27. Adenovirus #2
28. JC virus
29. BK virus
30. HSV #1
31. HSV #2
32. HSV type 1
33. HSV type 2
34. VZV #1
35. VZV #2
36. EBV #1
37. EBV #2
38. CMV #1
39. CMV #2
40. HHV 6 A /B
41. HHV 7
42. HHV 8
43. Mycobacteria spp
44. M. tuberculosis
45. Coxiella burnetii
46. Toxoplasma gondii
47. C. psittaci
48. MS2 IC

Gastro TAC

1. Adenovirus #1
2. Adenovirus 40/41 #1
3. Astrovirus #1
4. Sapovirus #1
5. Sapovirus #2
6. Enterovirus #1
7. Parechovirus
8. HEV #1
9. PDV IC
10. Rotavirus #1
11. 18S RNA
12. Norovirus GI
13. Norovirus GI #1
14. Norovirus GI #2
15. C. difficile GDH
16. C. difficile Tox B
17. E. coli vtx 1
18. B. thuringiensis IC
19. E.coli vtx 2
20. Campylobacter spp
21. Salmonella ttr
22. Cryptosporidium #1
23. GFP IC
24. Adenovirus #2



25. Adenovirus 40/41 #2
26. Astrovirus #2
27. Giardia lamblia #1
28. Rotavirus #2
29. Enterovirus #2
30. HAV
31. HEV #2
32. MS2 IC
33. Rotarix vaccine NSP2
34. CMV
35. RNase P IC
36. Salmonella hil A
37. Shigella ipa H
38. Entero Agg E. coli
39. C. jejuni
40. C. coli
41. Y. enterocolitica
42. Bacterial 16S
43. A. hydrophilia
44. V. cholerae
45. Dientamoeba fragilis
46. Entamoeba histolytica
47. Cryptosporidium #2
48. Giardia lamblia #2

Transplant TAC

1. HAV #1
2. HAV #2
3. HBV #1
4. HBV #2
5. HDV
6. HGV
7. HEV #1
8. HEV #2
9. HCV #1
10. HCV #2
11. 18S RNA
12. Aspergillus 18S
13. Aspergillus 28S
14. Fungal 18S
15. HPV generic
16. HPV 16 E6
17. HPV 18 E6
18. WU PyV
19. KI PyV
20. MC PyV
21. B19
22. SENV
23. BK/JC virus
24. HPV gp 16



25. RNase P IC
26. Adenovirus #1
27. Adenovirus #2
28. JC virus
29. BK virus
30. HSV #1
31. HSV #2
32. HSV type 1
33. HSV type 2
34. VZV #1
35. VZV #2
36. EBV #1
37. EBV #2
38. CMV #1
39. CMV #2
40. HHV 6 A/B
41. HHV 7
42. HHV 8
43. Mycobacteria spp
44. M. tuberculosis
45. Coxiella burnetii
46. Toxoplasma gondii
47. C. psittaci
48. MS2 IC

Diagnóstico Molecular - carga viral

- Validação clínica
- Doentes imunossuprimidos (transplantes, por ex) - CMV, EBV ou virus BK
- Monitorização da resposta terapêutica - VHB, VHC ou VIH
- Avaliação do prognóstico



Diagnóstico Molecular - carga viral

- Amostra - plasma, soro, LCR
- Automatização total (extração, amplificação e quantificação)
- Quantificação em UI/mL ou cópias/ mL
- Resultados em escala numérica e logaritmo
- *Primers* e sondas dirigidos para regiões altamente conservadas que não sofrem o impacto das mutações de resistência
- Amplo intervalo de linearidade



Diagnóstico Molecular- PCR

Resultados

- Reportados de forma clara
- Ensaaios qualitativos:
 - Detectado(ou positivo)
 - Não detectado(ou inferior **LOD**)
- Ensaaios quantitativos:
 - Dentro do intervalo de linearidade- resultado quantitativo, unidade de medida,log.
 - Inferior ao LOQ- pode ser detectável(positivo <LOQ) ou não detectado
 - Se superior ao limite máximo de quantificação- diluiu-se de forma a cair no intervalo de linearidade



Testes Point of Care - POCT

- Simples, robustos, transportáveis.
- Utilização de todos os tipos de amostra
- Rápidos : resultados em cerca de 15mn-2horas
- “On-demand PCR technology has far-reaching influences on HAI rates, health care outcomes, hospital length of stay, isolation days, patient satisfaction, antibiotic stewardship, and health care economics.”



We put a Lab in a tube!



Testes rápidos - POCT

- *MRSA*
- *Influenza A/B e VSR*
- *Strepto A e Strepto B*
- *Enterovirus*
- *CT/NG*
- *VHC*
- *VIH*
- *Resistência à Rif.*
- *Resistência à Vanc.*
- *Deteção dos genes das carbapenemases, etc...*



Diagnóstico Molecular - Sequenciação genómica

- Genotipagem - VHB, VHC, VIH
- Identificação de mutações de resistência aos antimicrobianos
- Sequenciação de nova geração ou NGS



FUTURO?



Diagnóstico Molecular- Futuro

- Maior utilização de testes *multiplex e de microarrays*
- Desenvolvimento dos POCT
- Sequenciação do genoma completo (NGS)-redução do custo e bases de dados acessíveis
- Identificação simultânea de microrganismos, sensibilidade aos antimicrobianos e factores de resistência



Take home messages

- Os resultados devem ser valorizados no contexto do quadro clínico
- Os ácidos nucleicos identificados não significam sempre infecção
- Os testes qualitativos e os testes quantitativos têm habitualmente sensibilidades analíticas diferentes
- Os resultados dos testes quantitativos devem ser valorizados em logaritmo
- Os testes *point of care* devem ser sujeitos a um controlo de qualidade semelhante ao dos outros testes laboratoriais
- A multiplicidade de testes de DM implica algoritmos de diagnóstico laboratorial!

Falar com o Laboratório





Curso: Actualizações em Pediatria

MUITO OBRIGADA

Bibliografia

- Paul C. Schreckenberger, Alexander J. McAdamb . Point-Counterpoint: Large Multiplex PCR Panels Should Be First-Line Tests for Detection of Respiratory and Intestinal Pathogens .J .Clin.Microbiology. October 2015 Volume 53 Number 10
- AKKaya O et al.Real-time PCR Detection of the Most Common Bacteria and Viruses Causing Meningitis. Clin.Lab 2017Apr 1;63(4)
- Salez, N et al. Evaluation of Four Commercial Multiplex Molecular Tests for the Diagnosis of Acute Respiratory Infections. PLOS ONE June 24, 20
- PROTOCOLO DA SOCIEDADE DE INFECCIOLOGIA PEDIÁTRICA DA SPP E SOCIEDADE PORTUGUESA DE NEUROPEDIATRIA: Agentes etiológicos das Encefalites
- The Evolution of PCR- ROCHE Diagnostics
- Murray, Rosenthal,Pfaller.Medical Microbiology, 8th Edition.
- Y.M.Dennis Lo. Methods in Molecular Medicine. Clinical Applications of PCR,1998
- Harald H. Kessler. Molecular Diagnostic of Infectious Diseases. 3th Edition
- Thomas R. Kozel, Amanda R. Burnham-Marusich.Point-of-Care Testing for Infectious Diseases: Past, Present, and Future. J.Clin.Microbiology August 2017 Volume 55 Issue 8
- Keitel, Kristina, PhD, MD; Lacroix, Laurence, MD Gervaix, Alain, MD..**Point-of-care Testing in Pediatric Infectious Diseases.** The Pediatric Infectious Disease Journal: January 2018- Volume 37-Issue 1 pg10-110
- Jason R. Miller, Sergey Koren, Granger Sutton . Assembly algorithms for next-generation sequencing data. Genomics 95 (2010) 315–327

