



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ  
ΙΔΡΥΜΑ ΑΘΗΝΑΣ

ATHENS  
UNIVERSITY  
OF APPLIED  
SCIENCES



UNIVERSITY OF  
LIVERPOOL



# Σύγχρονες Τεχνικές στη Μοριακή Διάγνωση Λοιμωδών Νοσημάτων

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών  
«Βιοϊατρικές Μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση»

Apostolos Beloukas

[abeloukas@teiath.gr](mailto:abeloukas@teiath.gr); [beloukas@liverpool.ac.uk](mailto:beloukas@liverpool.ac.uk)



Δευτέρα, 29 Μαΐου 2017

# Εκπαιδευτικοί στόχοι

- ❖ Εισαγωγή (Λοιμώδη Νοσήματα – Μοριακή Διάγνωση)
  - ❖ Γιατί μοριακή Διάγνωση – Πλεονεκτήματα vs Μειονεκτήματα
- ❖ Μοριακή διαγνωστική και Ιογενείς λοιμώξεις
  - ❖ κατηγορίες
  - ❖ Εφαρμογές στην Κλινική πράξη

# Εκπαιδευτικοί στόχοι

- ❖ Εισαγωγή (Λοιμώδη Νοσήματα – Μοριακή Διάγνωση)
  - ❖ Γιατί μοριακή Διάγνωση – Πλεονεκτήματα vs Μειονεκτήματα
- ❖ Μοριακή διαγνωστική και Ιογενείς λοιμώξεις
  - ❖ κατηγορίες
  - ❖ Εφαρμογές στην Κλινική πράξη

# Λοιμώδη νοσήματα

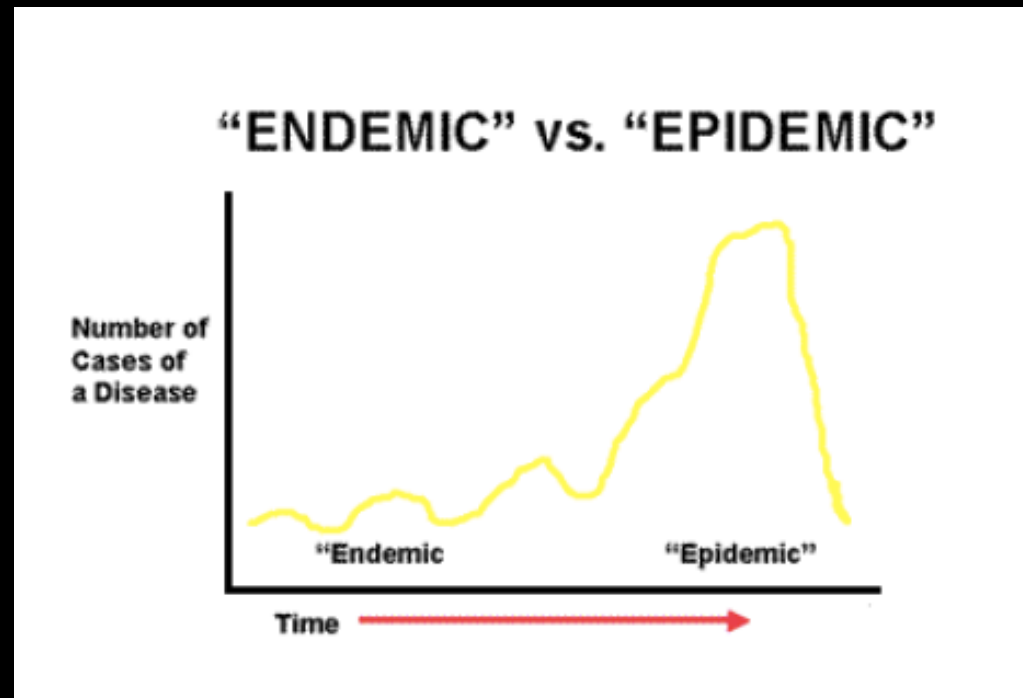
- ❖ Λοιμώδη ή μεταδοτικά ονομάζονται τα νοσήματα που οφείλονται σε «λοιμογόνους» παράγοντες, δηλαδή μικροοργανισμούς ή στα τοξικά προϊόντα τους. (Λοιμός= επιδημία).

## ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ:

- ❖ Ιοί
- ❖ Βακτήρια
- ❖ Μύκητες
- ❖ Παράσιτα

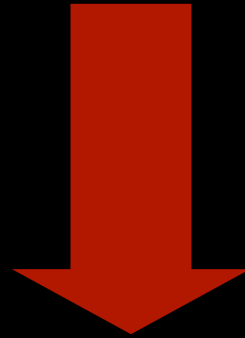
# Επιδημίες – Επιδημικές εξάρσεις

- ❖ **Επιδημία:** η κατάσταση στην οποία παρατηρείται αυξημένη συχνότητα ενός νοσήματος οποιασδήποτε αιτιολογίας σε έναν πληθυσμό.
- ❖ **Επιδημικές εξάρσεις:** οι επιδημίες με παρόδικό χαρακτήρα, μικρή χρονική διάρκεια (πχ ώρες έως μήνες) και κατά κανόνα περιορισμένο αριθμό κρουσμάτων.



# Revolution in Molecular Biology has Impacted:

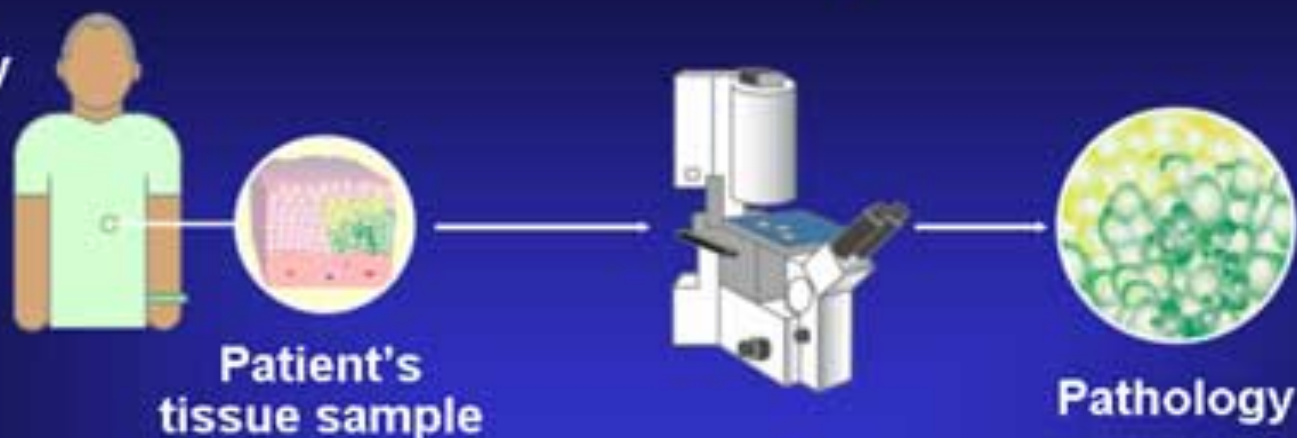
- Science
- Medicine
- Society
- **Diagnosis/Clinical management**



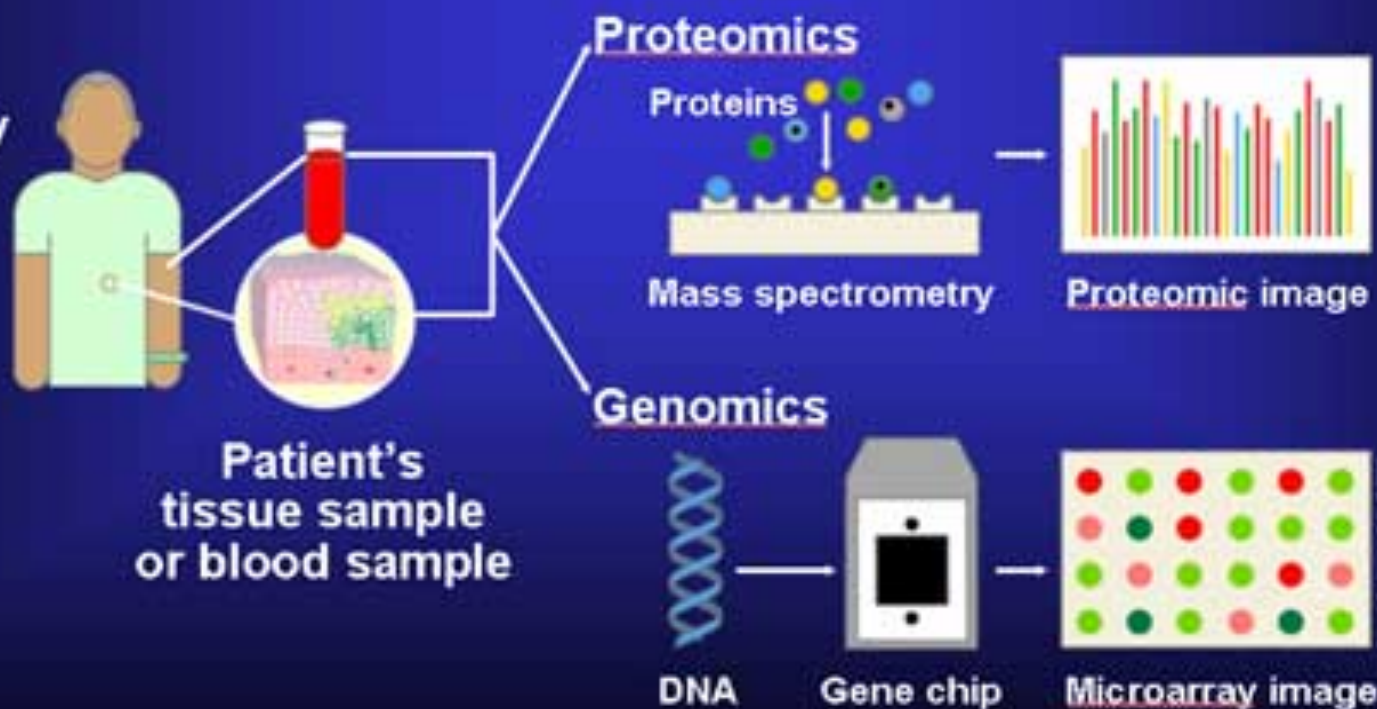
**Molecular Diagnostics**  
**Personalise medicine**  
Challenge for the 21<sup>st</sup> Century

# Molecular Diagnostics

Old Way



New Way



# Χρήση Μοριακών Μεθόδων για τη διάγνωση Λοιμωδών Παραγόντων

- ❖ Ανάγκη για ακριβή και έγκαιρη διάγνωση

Σημαντικό για:

- ❖ την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας
- ❖ την πρόληψη της εξάπλωσης ενός μεταδοτικού παράγοντα (*infectious agent*)

# Leading uses

## Nucleic acid based tests

- ❖ Μη καλλιεργήσιμα παθογόνα
  - ❖ *Human papilloma virus*
  - ❖ *Hepatitis B Virus*
- ❖ Δύσχρηστα ή αργά αναπτυσσόμενα παθογόνα
  - ❖ *Mycobacterium tuberculosis*
  - ❖ *Legionella pneumophila*
- ❖ Highly infectious agents που είναι επικίνδυνα
  - ❖ *Francisella tularensis*
  - ❖ *Brucella species*
  - ❖ *Ebola virus*

Συνεχίζεται...

# Leading uses

## Nucleic acid based tests II

- ❖ In situ detection λοιμογόνων παραγόντων
  - ❖ *Helicobacter pylori*
  - ❖ *Toxoplasma gondii*
- ❖ Παθγόνα σε χαμηλή συγκέντρωση
  - ❖ HIV σε ασθενείς σε θεραπεία
  - ❖ CMV σε όργανα προς μεταμόσχευση
- ❖ Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση σε δείγματα μικρού-πολύ μικρού όγκου
  - ❖ CSF
  - ❖ Forensic samples

Συνεχίζεται...

# Leading uses

## Nucleic acid based tests III

- ❖ Διαφοροποίηση (*differentiation*) παραγόντων με παρόμοιο αντιγονικό προφίλ (*antigenically similar agents*)
  - ❖ *HPV genotypes and association with human cancers*
  - ❖ *HCV genotype and treatment*
- ❖ Antiviral drug susceptibility testing
  - ❖ *HIV infections*
- ❖ Non-viable παθογόνοι μικροοργανισμοί
  - ❖ *Organisms tied up in immune complexes*

Συνεχίζεται...

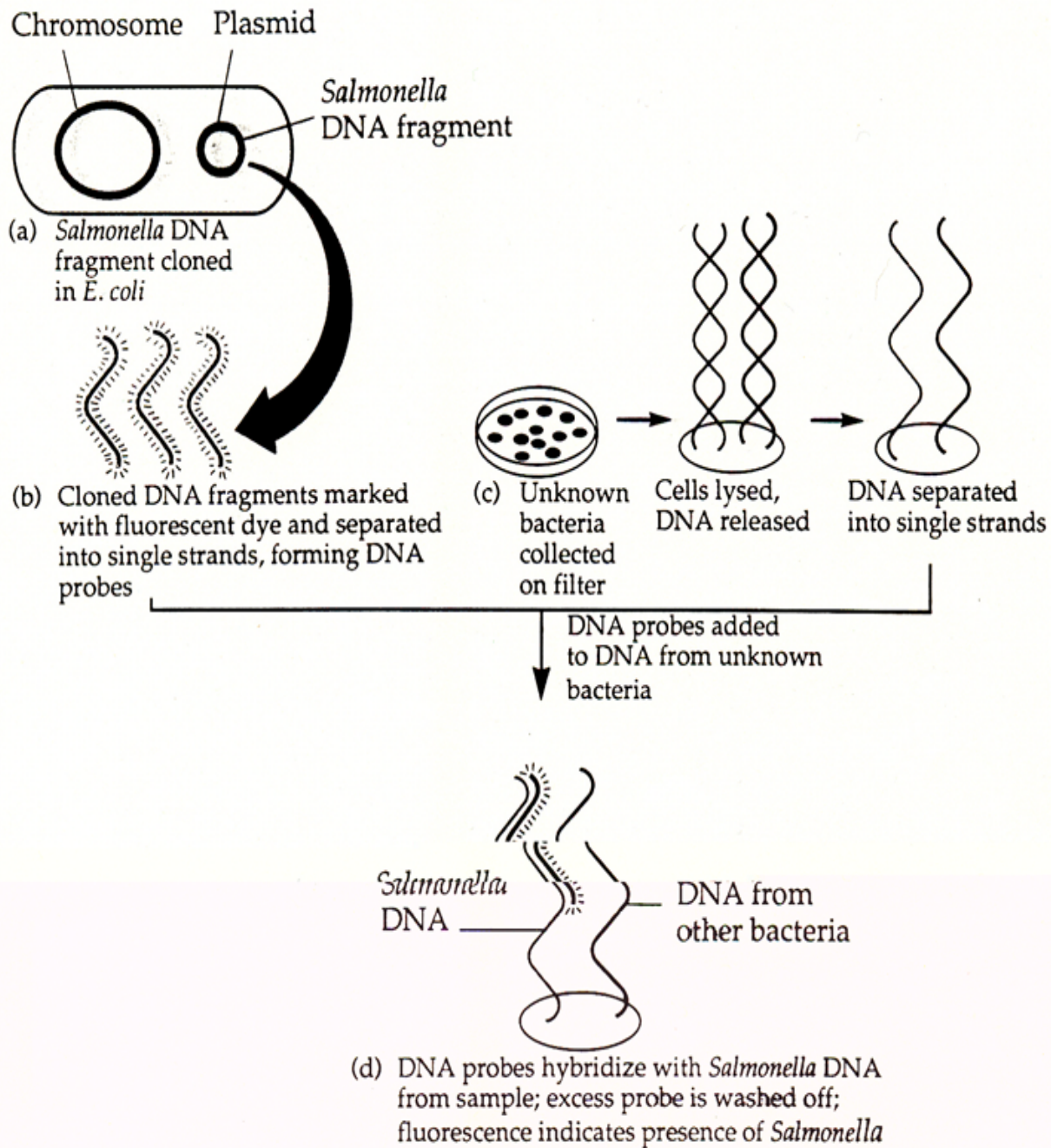
# Leading uses

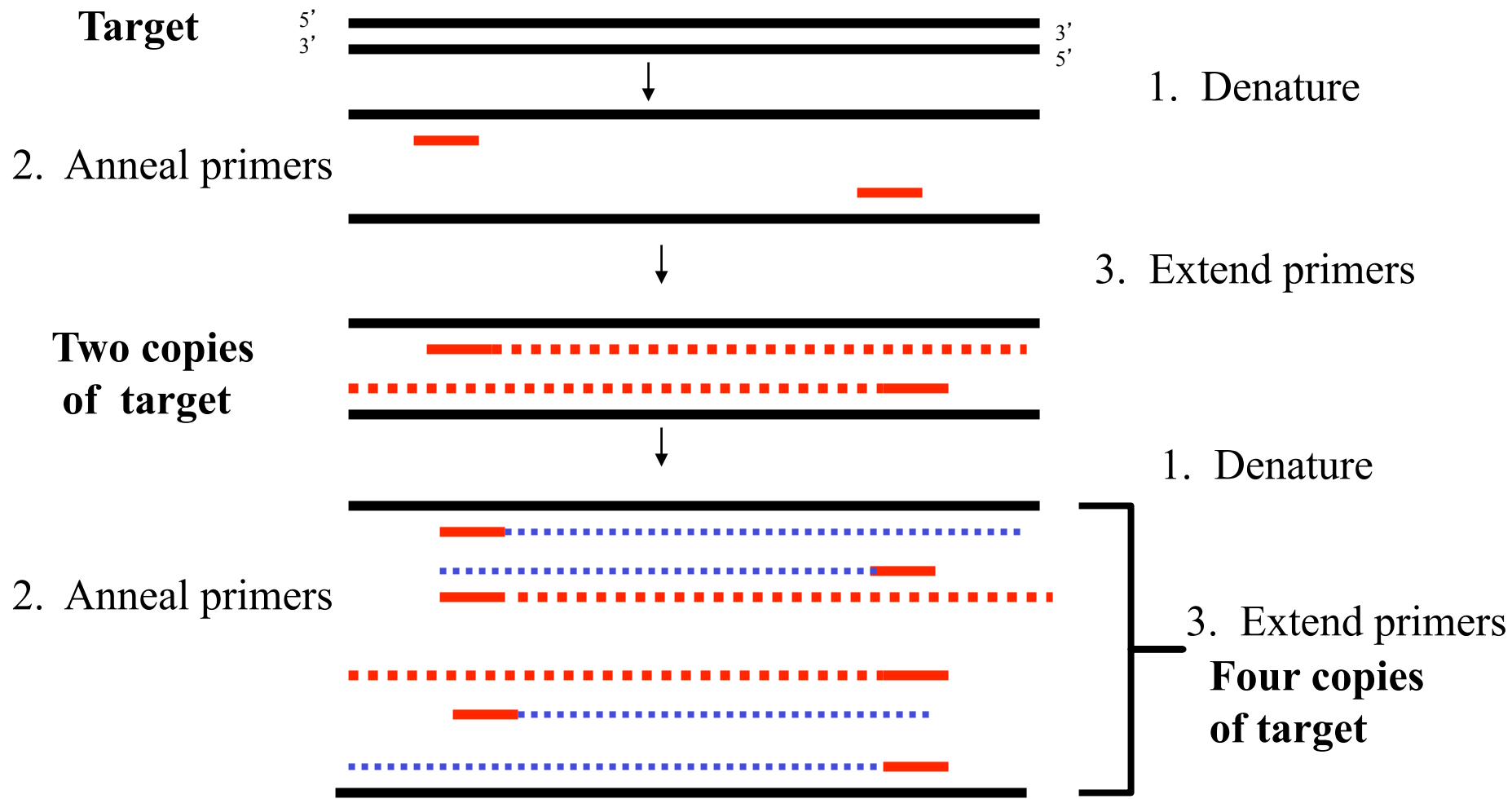
## Nucleic acid based tests IV

- ❖ Molecular epidemiology
  - ❖ Πηγή νοσοκομειακών ή/και *community-based outbreaks* επιδημιών
  - ❖ Έλεγχος/πρόβλεψη μολυσματικότητας – ρυθμού διασποράς
- ❖ Επιβεβαίωση καλλιέργειας

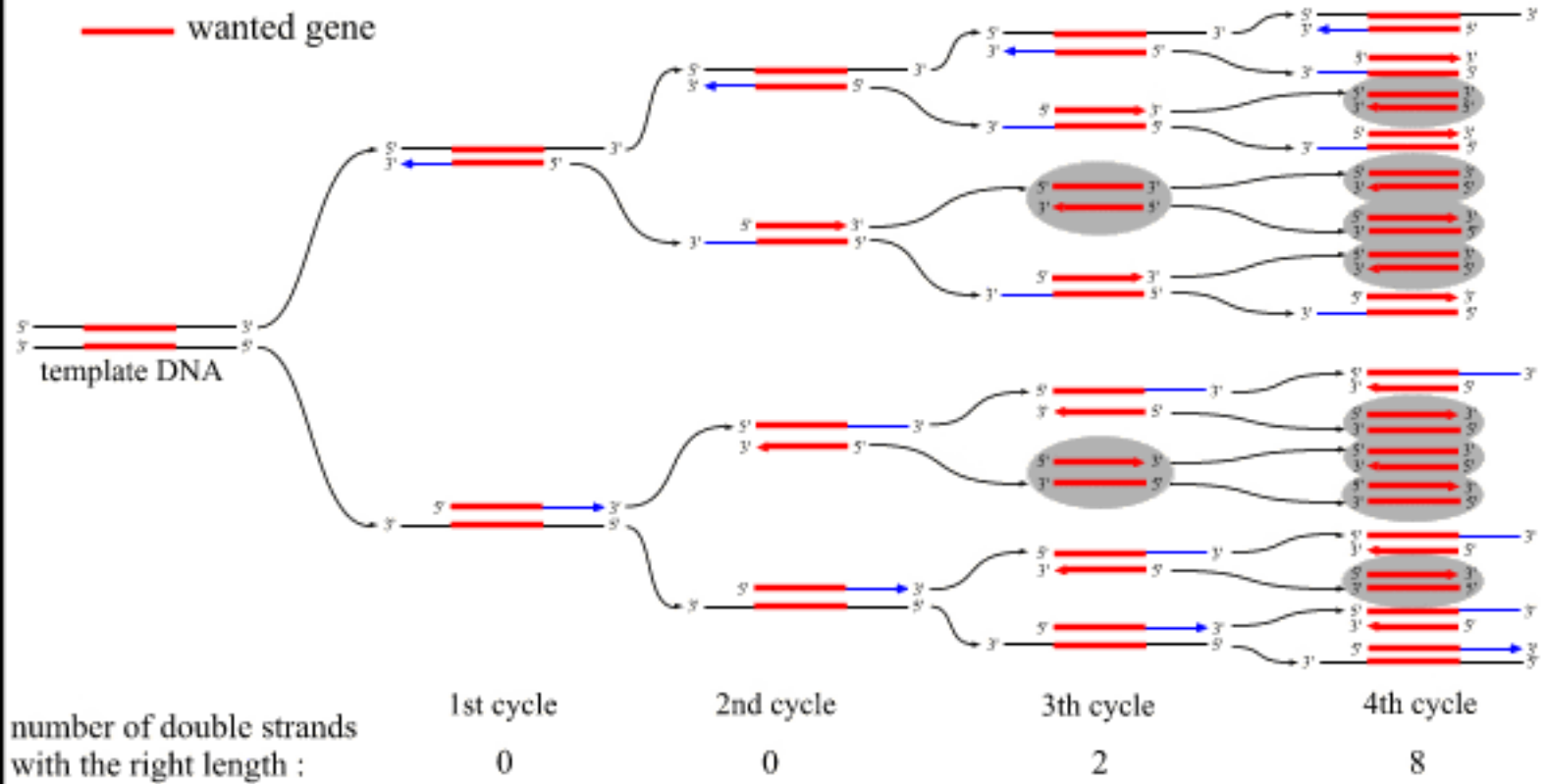
# Τύποι Μοριακών Τεχνικών Νουκλεϊκών οξέων

- ❖ Μέθοδοι άμεσου υβριδισμού (*Direct probes*) – κυρίως για ταυτοποίηση/τυποποίηση παρά για ανίχνευση καθώς δεν είναι τόσο ευαίσθητες όσο οι amplification methods
- ❖ Amplification methods – μεγαλύτερη ευαισθησία και ακρίβεια
  - ❖ *Target amplification*
  - ❖ *Probe amplification*
  - ❖ *Signal amplification*
  - ❖ *Combinations of the above*





## The first 4 cycles of PCR in detail



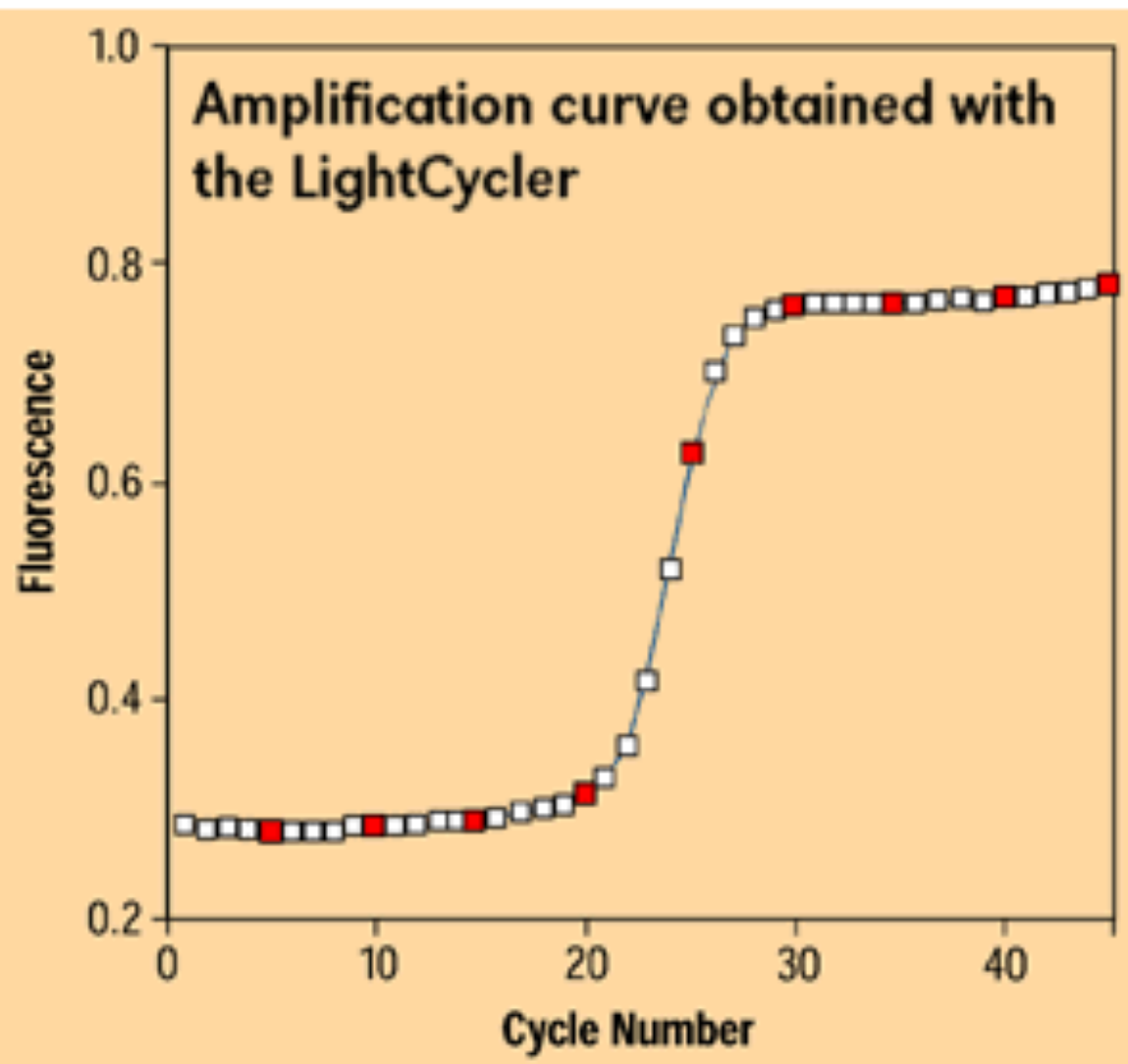
(Andy Vierstraete 2001)

Cycle 5 10 15 20 25 30 45



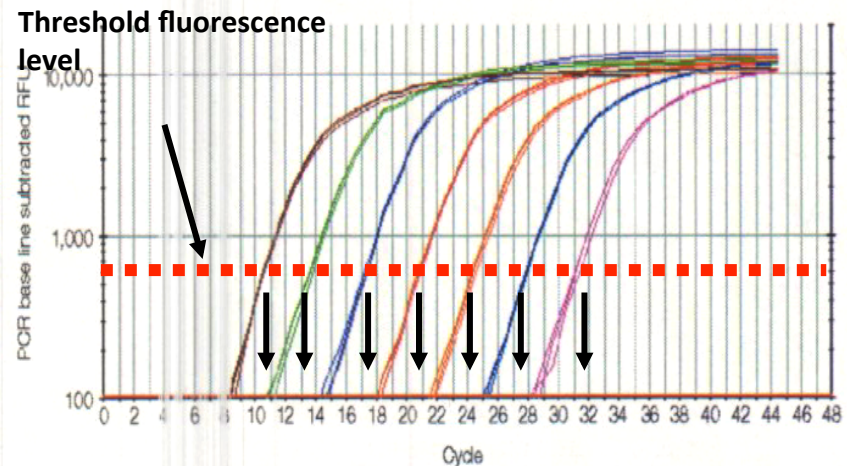
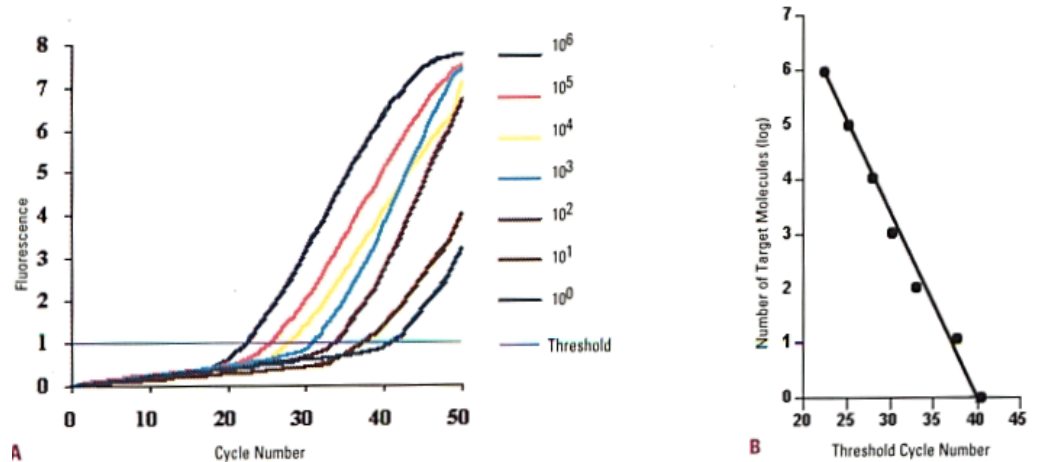
Agarose  
Gel

Conventional PCR



# Quantitative PCR (qPCR)

- A threshold level of fluorescence is determined based on signal and background.
- Input is inversely proportional to “threshold” cycle (cycle at which fluorescence crosses the threshold fluorescence level).



# Τύποι Μοριακών Τεχνικών Νουκλεϊκών οξέων II

- ❖ Μέθοδοι αλληλούχισης (*sequencing*)
  - ❖ *Sanger (population) sequencing*
  - ❖ *Next Generation sequencing methods (massive parallel sequencing, deep/ultra deep sequencing etc..)*

# Πλεονεκτήματα (The 4S)

- ❖ Μεγάλη ευαισθησία (*High sensitivity*)
  - ❖ Θεωρητικά μπορεί να ανιχνευθεί η παρουσία ενός και μόνο παθογόνου μικροοργανισμού (single cell/molecule)
- ❖ Υψηλή ειδικότητα (*High specificity*)
  - ❖ ανίχνευση συγκεκριμένων *genotypes*
  - ❖ ανίχνευση *drug resistance*
  - ❖ πρόβλεψη μολυσματικότητας
- ❖ Ταχύτητα (*Speed*)
  - ❖ Πιο γρήγορα από τις συμβατικές μεθόδους καλλιέργειας για συγκεκριμένα παθογόνα
- ❖ Ευκολία (*Simplicity*)
  - ❖ Αυτοματοποιημένες μέθοδοι/δοκιμασίες

# Μειονεκτήματα

- ❖ Κόστος
- ❖ Η μεγάλη ειδικότητα απαιτεί την ύπαρξη κλινικών δεδομένων πριν τη μοριακή διερεύνηση.
- ❖ Υψηλή εξειδίκευση άρα και ανάγκη εξειδικευμένου προσωπικού
- ❖ Νέοι λοιμογόνοι/παθογόνοι παράγοντες
- ❖ Υψηλή ειδικότητα ? Συχνά προκαλεί ερωτήματα για την κλινική σημασία του αποτελέσματος

# Παραδείγματα

## Μοριακές μέθοδοι στη διάγνωση λοιμώξεων

Ιολογία	HSV, CMV, EBV, VZV, HHV type 6, 7, 8 Respiratory viruses (such as INF, RSV, PNV, Adenovirus, Rhinovirus) SARS-CoV, AIV, HIV, HBV, HCV, HPV Rotavirus, Norovirus, Enteric adenoviruses, Enterovirus
Βακτηριολογία	C. trachomatis, N. gonorrhoeae, B. pertussis, M. tuberculosis, nontuberculous, Mycobacteria, T. whipplei, B. henselae, genital Mycoplasmata, C. burnettii M. pneumoniae, C. pneumoniae, Legionella spp., N. meningitidis, S. pneumoniae
Παρασιτολογία	Plasmodium spp, T. gondii
Μυκητολογία	P. Jiroveci, Aspergillus spp

# Εκπαιδευτικοί στόχοι

- ❖ Εισαγωγή (Λοιμώδη Νοσήματα – Μοριακή Διάγνωση)
  - ❖ Γιατί μοριακή Διάγνωση – Πλεονεκτήματα vs Μειονεκτήματα
- ❖ Μοριακή διαγνωστική και Ιογενείς λοιμώξεις
  - ❖ Εφαρμογές στην Κλινική πράξη

# Δοκιμασίες Μοριακής Διαγνωστικής στις Ιογενείς Λοιμώξεις

## Ποιοτικές δοκιμασίες

- ❖ Διάγνωση, έλεγχος μεταγγίσεων, έλεγχος αντοχής, έλεγχος για γενετικούς παράγοντες που σχετίζονται με τη νόσο, εκτίμηση γονότυπου HCV

## Ποσοτικές δοκιμασίες

- ❖ Διάγνωση, πρόγνωση εξέλιξης της νόσου, εκτίμηση χρονικής περιόδου για έναρξη θεραπείας
- ❖ Αξιολόγηση αποτελεσματικότητας θεραπείας

**Μοριακή Ανίχνευση  
ϊικών λοιμογόνων  
παραγόντων  
και Έλεγχος Μεταγγίσεων**

# Μοριακή Ανίχνευση Ιϊκών λοιμογόνων παραγόντων και Έλεγχος Μεταγγίσεων

## Μέθοδοι Διάγνωσης/Ανίχνευσης Ιογενών Λοιμώξεων

- ❖ Ανίχνευση αντισωμάτων έναντι των ιών (μέθοδοι τύπου ELISA και Western Blot)
- ❖ Ανίχνευση αντιγόνων του ιού
- ❖ Ανίχνευση και των 2 παραπάνω
- ❖ Καλλιέργεια των ιών
- ❖ Ανίχνευση του HIV-RNA, HBV-DNA ή του HCV-RNA, αφού έχει προηγηθεί πολλαπλασιασμός τμήματος του γονιδιώματος του ιού (*Nucleic Acid Testing, NAT*)

# Ορολογικές μέθοδοι και Έλεγχος Μεταγγίσεων

- ❖ Οι ορολογικές μέθοδοι διακρίνονται σε:
  - ❖ 1) μεθόδους γενικευμένης εξέτασης (screening test) και
  - ❖ 2) σε επιβεβαιωτικές (confirmatory tests)
- ❖ Προκειμένου να τεκμηριωθεί η οροθετικότητα ενός ατόμου απαιτείται το θετικό αποτέλεσμα και των 2 μεθόδων
- ❖ Τα χαρακτηριστικά των screening test είναι η υψηλή ευαισθησία (~100%) και για αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται και για τον έλεγχο του αίματος

# Μοριακές Διαγνωστικές μέθοδοι και Έλεγχος Μεταγγίσεων

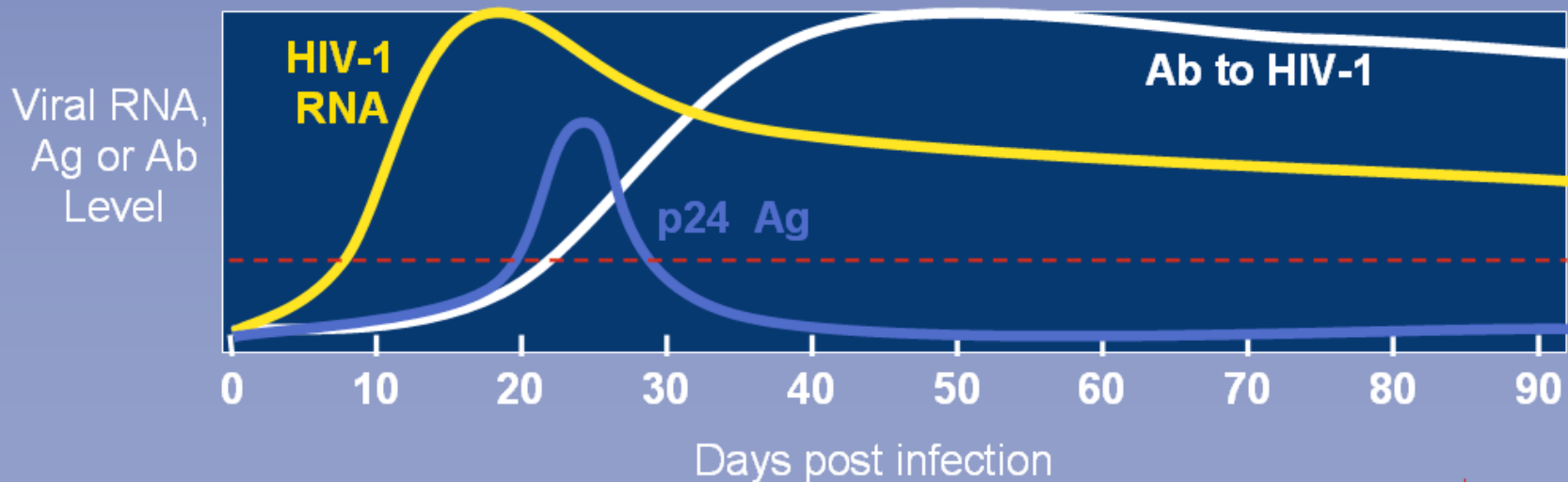
- ❖ Σε περίπτωση αδιευκρίνιστου αποτελέσματος με ορολογικές μεθόδους
- ❖ Σε περιπτώσεις που οι ορολογικές μέθοδοι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν (έλεγχος νεογνών)
- ❖ Όταν απαιτείται έγκαιρη διάγνωση (επαγγελματική έκθεση, έλεγχος μεταγγίσεων/μεταμοσχεύσεων)

# Διαγνωστικό Παράθυρο

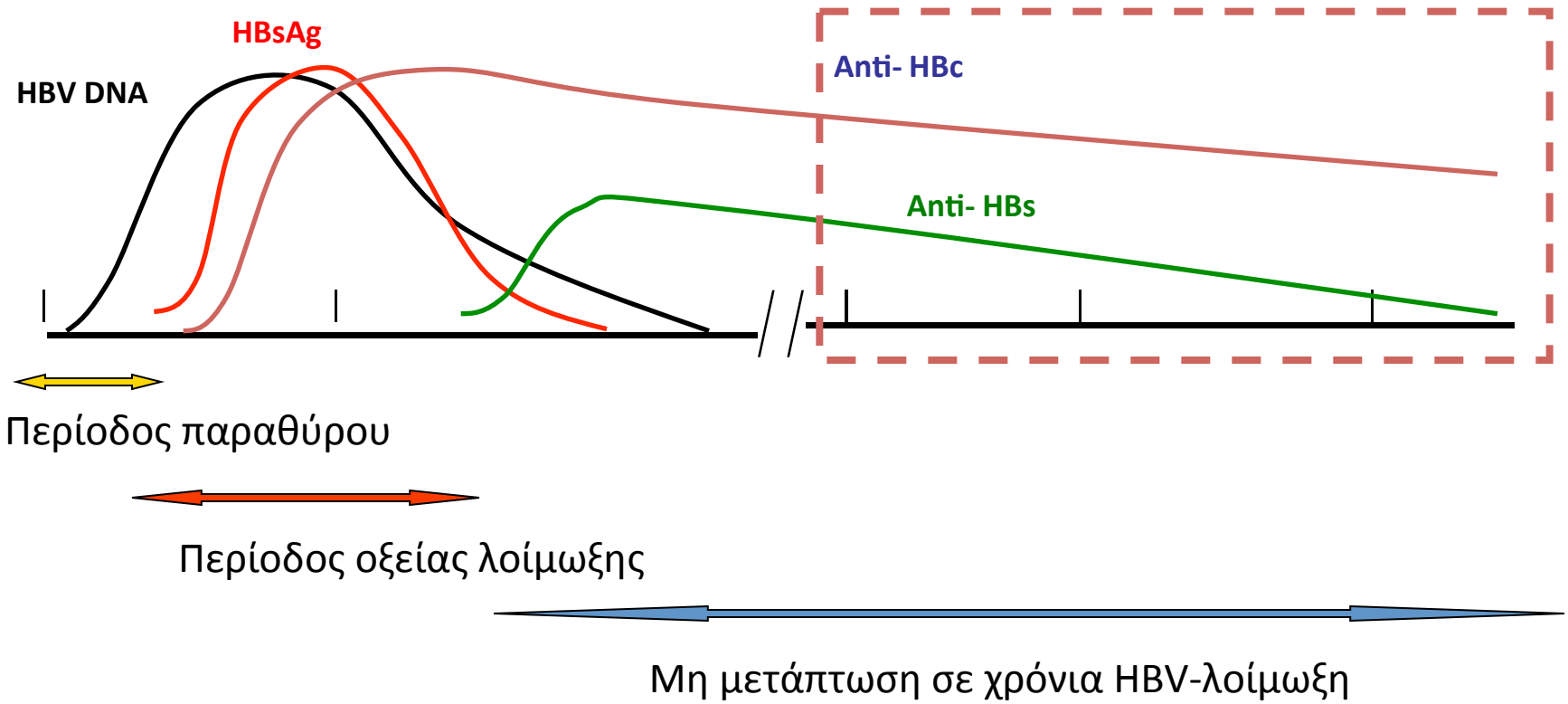
- ❖ Παρότι οι μέθοδοι ανίχνευσης αντισωμάτων παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα, ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα στον έλεγχο των ιϊκών λοιμώξεων (HIV, HCV, HBV) είναι το **διαγνωστικό παράθυρο**

# Δείκτες οξείας HIV-λοίμωξης

- Τα αντισώματα ανιχνεύονται 22 περίπου ημέρες μετά την μόλυνση.
- Το p24 Ag ανιχνεύεται 17 περίπου ημέρες μετά την μόλυνση.
- Το ιϊκό RNA ανιχνεύεται 11 περίπου ημέρες μετά την μόλυνση.

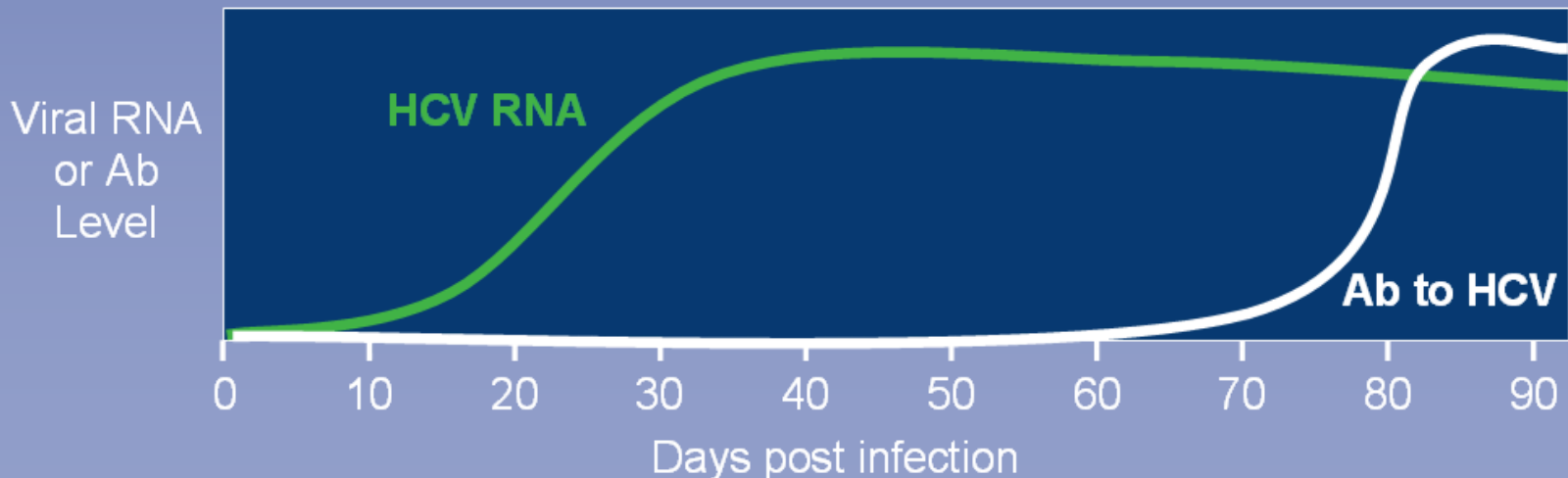


# Φυσική ιστορία HBV-λοίμωξης



# Δείκτες οξείας ΗCV-λοίμωξης

- Τα αντισώματα ανιχνεύονται 80 περίπου ημέρες μετά την μόλυνση.
- Το ιϊκό RNA ανιχνεύεται περίπου 23 ημέρες μετά την μόλυνση.



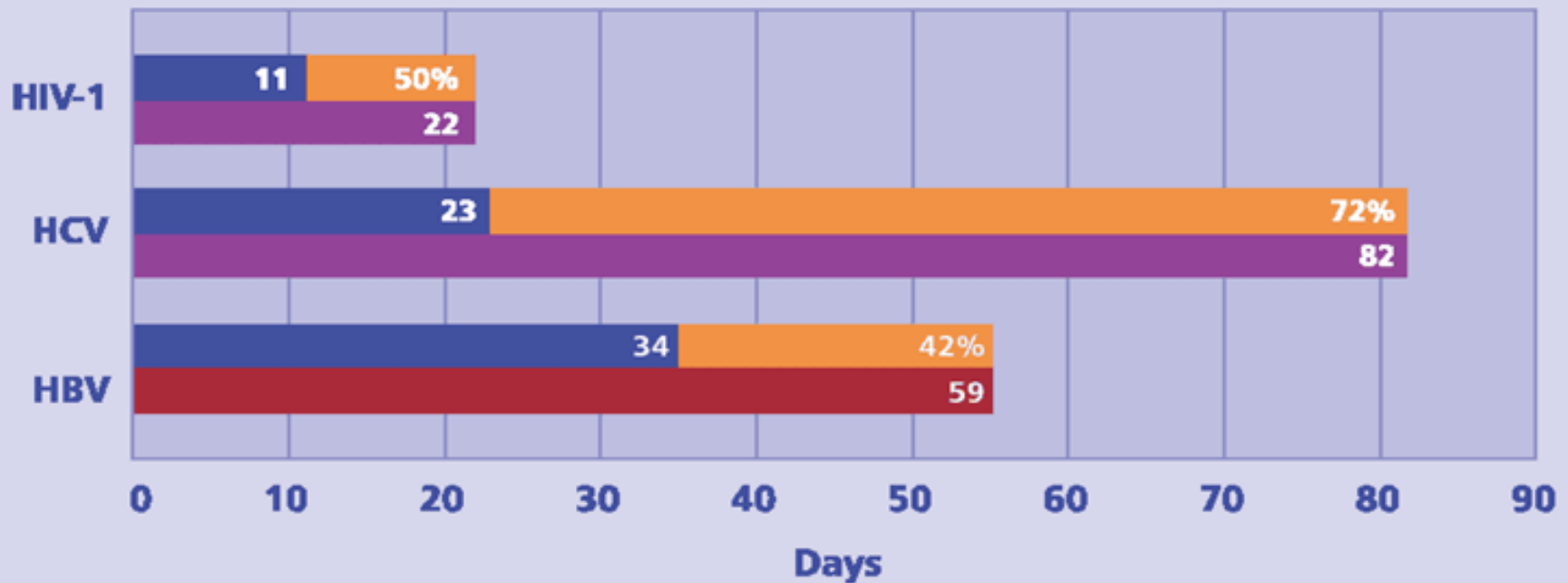
# Τρόποι αντιμετώπισης του κινδύνου μετάδοσης λοιμώξεων στο διαγνωστικό παράθυρο

- ❖ Προκειμένου να μειωθεί ο κίνδυνος μετάδοσης λοιμώξεων κατά την περίοδο του διαγνωστικού παραθύρου είναι απαραίτητο να ανιχνεύσουμε το γενετικό υλικό των ιών, που αποτελεί τον πιο πρώιμο δείκτη κατά το στάδιο της οξείας λοίμωξης
- ❖ Για αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι ανίχνευσης του HIV-RNA, HCV-RNA και HBV-DNA (Nucleic acid testing, NAT)

# Μέθοδοι NAT

	Days of Infection to Procleix Detection	Ab or Ag Detection	Reduction of Window by NAT
HIV-1	11	22	50%
HCV	23	82	72%
HBV	34	59	42%

- Procleix Detection
- Ab Detection
- Reduction
- Ag Detection



# Μέθοδοι NAT

## Χαρακτηριστικά γνωρίσματα

- ❖ Τεχνολογία αιχμής στον έλεγχο του αίματος
- ❖ Ανιχνεύει πολύ χαμηλά επίπεδα RNA ή DNA ιού τα οποία μπορεί να μην είναι ανιχνεύσιμα με τη χρήση άλλων σύγχρονων εγκεκριμένων ορολογικών δοκιμασιών
- ❖ Υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα για νουκλεϊκά οξέα ιών

## Πλεονεκτήματα

- ❖ Παρέχει επιπλέον επίπεδο ασφάλειας στην παγκόσμια διακίνηση αίματος
- ❖ Ανιχνεύει τη μόλυνση νωρίτερα από άλλες μεθόδους διαλογής

# Κατηγοριοποίηση NAT μεθόδων

**Nucleic acid Testing (NAT) amplification methods**  
διαχωρίζονται ανάλογα με τη μεθοδολογία που χρησιμοποιούν σε:

- ❖ Target amplification systems
- ❖ Probe amplification systems
- ❖ Signal amplification

# Target Amplification Methods

## PCR

- ❖ PCR using specific probes
- ❖ RT PCR
- ❖ Nested PCR-increases sensitivity, uses two sets of amplification primers, one internal to the other
- ❖ Multiplex PCR-two or more sets of primers specific for different targets
- ❖ Arbitrarily Primed PCR/Random Primer PCR

**NASBA** - Nucleic Acid Sequence-Based Amplification

**TMA** – Transcription Mediated Amplification

**SDA** - Strand Displacement Amplification

# Signal and Probe Amplification Methods

## Signal Amplification

- ❖ **bDNA** – Branched DNA probes
- ❖ **Hybrid Capture** – Anti-DNA-RNA hybrid antibody

## Probe Amplification

- ❖ **LCR** – Ligase Chain Reaction
- ❖ **Cleavase Invader** – FEN-1 DNA polymerase (cleavase)

# Μεθοδολογία NAT στην Ελλάδα

Την έγκριση για την εκτέλεση του Μοριακού Ελέγχου του αίματος στην Ελλάδα έχουν πάρει τα συστήματα NAT δύο συγκεκριμένων εταιρειών:

- ❖ ROCHE DIAGNOSTICS (COBAS AMPLISCREEN, COBAS s201 SYSTEM, COBAS TaqScreen MPX).
- ❖ CHIRON INC. (PROCLEIX ULTRIO TIGRIS).

Οι τεχνικές NAT που χρησιμοποιούν τα παραπάνω συστήματα στηρίζονται στις μεθόδους της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR), της Real-Time PCR (RT-PCR) και της Transcription Mediated Amplification (TMA) και ανιχνεύουν ταυτόχρονα τους ιούς HIV, HBV, HCV.

# Βασικές αρχές μεθοδολογίας Transcription mediated amplification (TMA)

- ❖ Η μέθοδος ανιχνεύει ταυτόχρονα 3 ιούς (HIV, HBV, HCV)
- ❖ Σε κάθε αντίδραση υπάρχει εσωτερικός μάρτυρας (Internal Quality control, IC)
- ❖ Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος ακολουθεί διαχωριστική αντίδραση για τον προσδιορισμό του ιού
- ❖ Η ανίχνευση του στόχου πραγματοποιείται με ειδικούς ανιχνευτές σε κάθε ιό

# Βασικές αρχές μεθοδολογίας Transcription mediated amplification (TMA)

## Βήμα 1

### Δέσμευση στόχου

- Hybridization
- Wash away plasma components

## Βήμα 2

### Πολ/σιασμός

- Transcription Mediated Amplification (TMA)

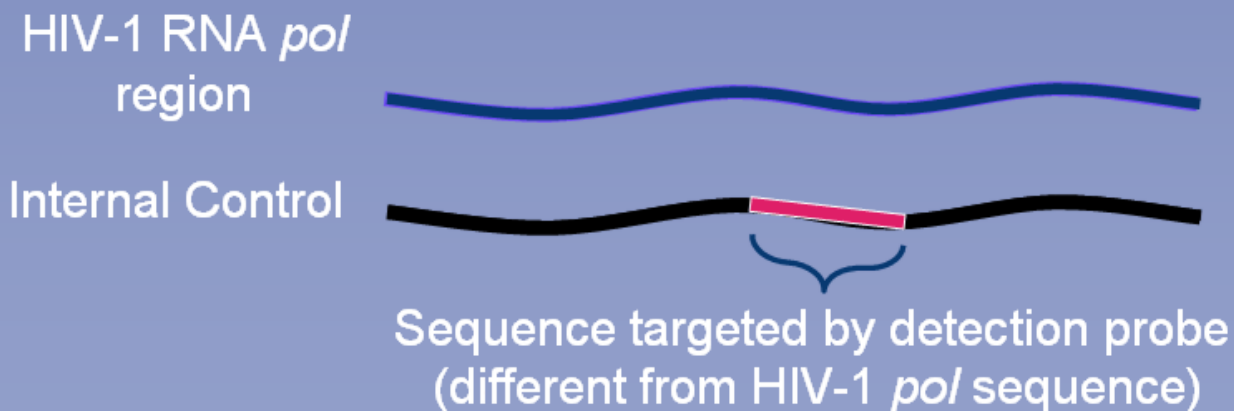
## Βήμα 3

### Ανίχνευση

- Hybridization Protection Assay (HPA)
- Dual Kinetic Assay (DKA)

# Εσωτερικός μάρτυρας (*Internal control, IC*)

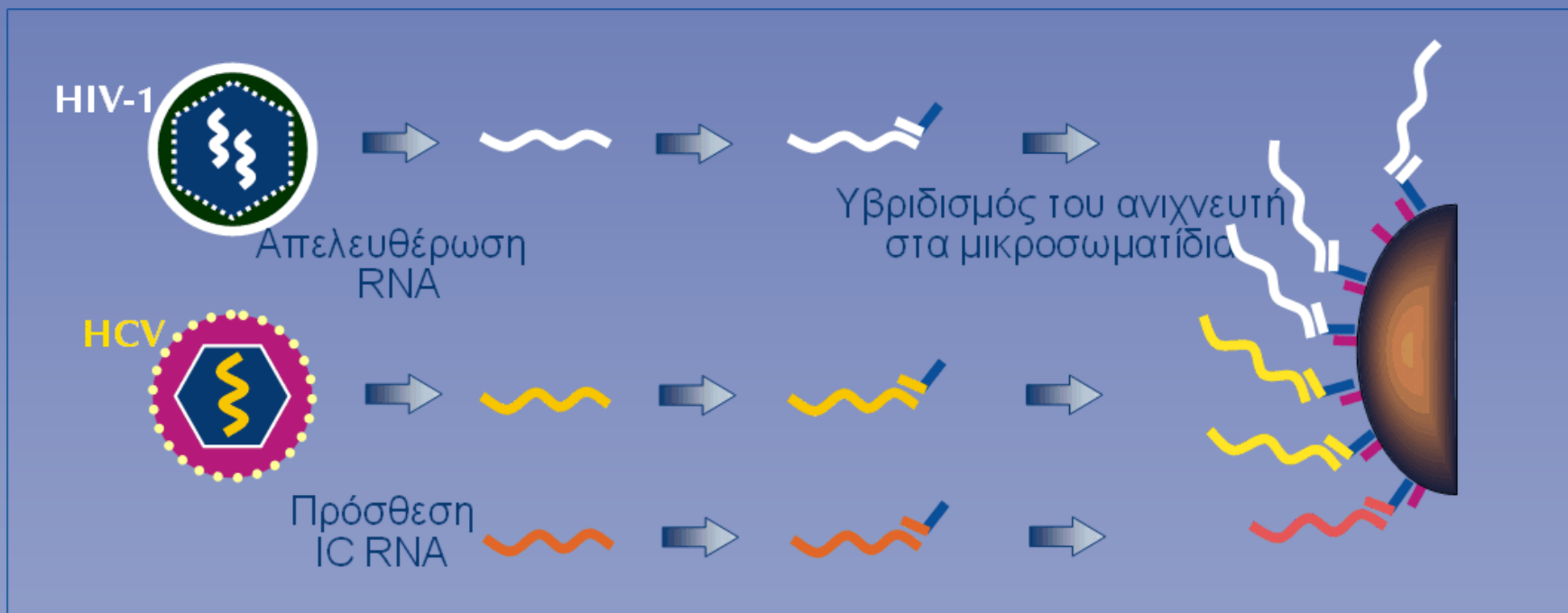
- Ένα μόριο RNA παρόμοιο με την περιοχή *pol* του HIV-1
- Περιέχει μια ελαφρώς διαφορετική νουκλεοτιδική αλληλουχία ώστε να είναι δυνατή η διαφορετική ανίχνευσή του από ένα συμπληρωματικό ανιχνευτή



# Εσωτερικός μάρτυρας (*Internal control, IC*)

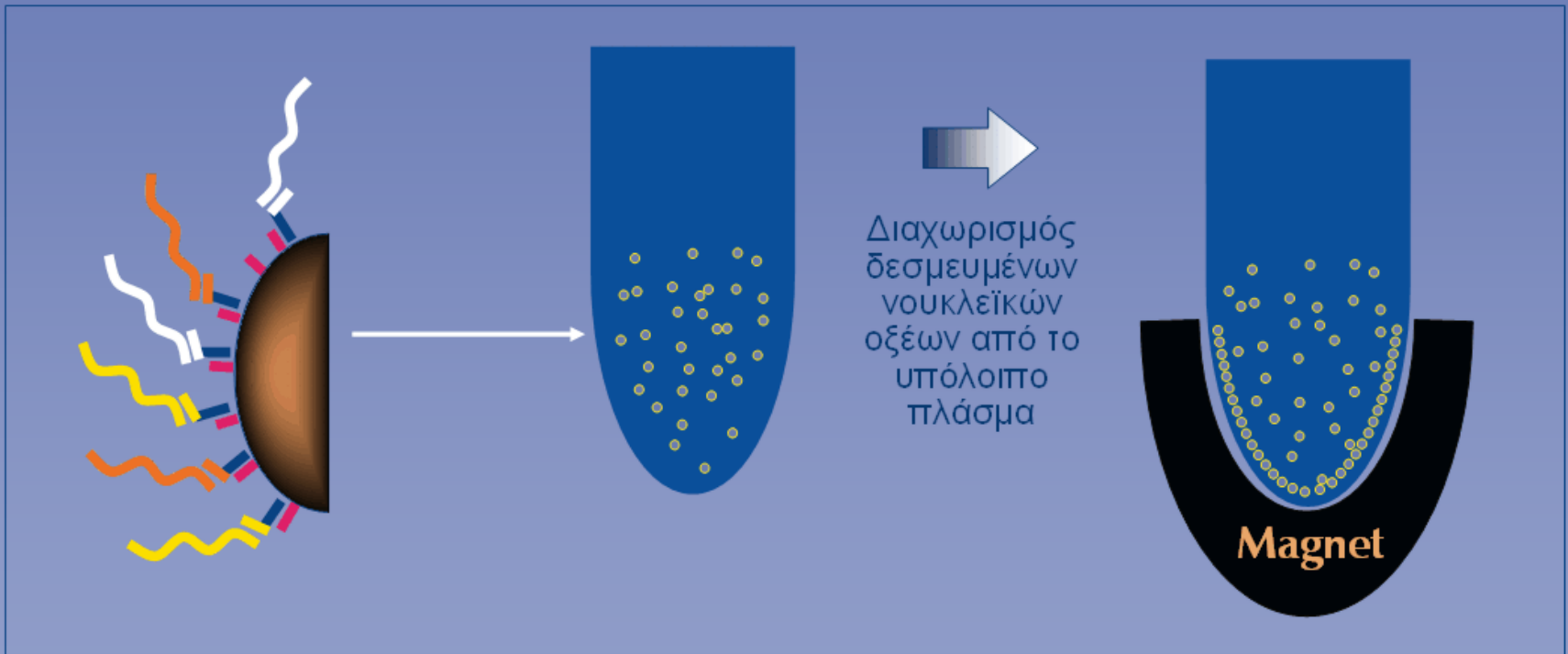
- Ελέγχει την σωστή εκτέλεση της δοκιμασία σε κάθε σωληνάριο και σε κάθε βήμα της ξεχωριστά (δέσμευση στόχου, πολλαπλασιασμός, ανίχνευση)
- Αποτελεί ένα στόχο μικρής συγκέντρωσης ώστε να ανιχνεύει μικρές αλλαγές στην αποτελεσματικότητα του πολλαπλασιασμού που οφείλεται σε τυχόν προβλήματα του δείγματος ή των αντιδραστηρίων.
- Δεν ελέγχει την λύση των ιικών σωματιδίων

# Βήμα 1: Δέσμευση Στόχου (Target Capture, TC)



Λύση ιϊκών σωματιδίων και δέσμευση των ανιχνευτών στα μαγνητικά μικροσωματίδια

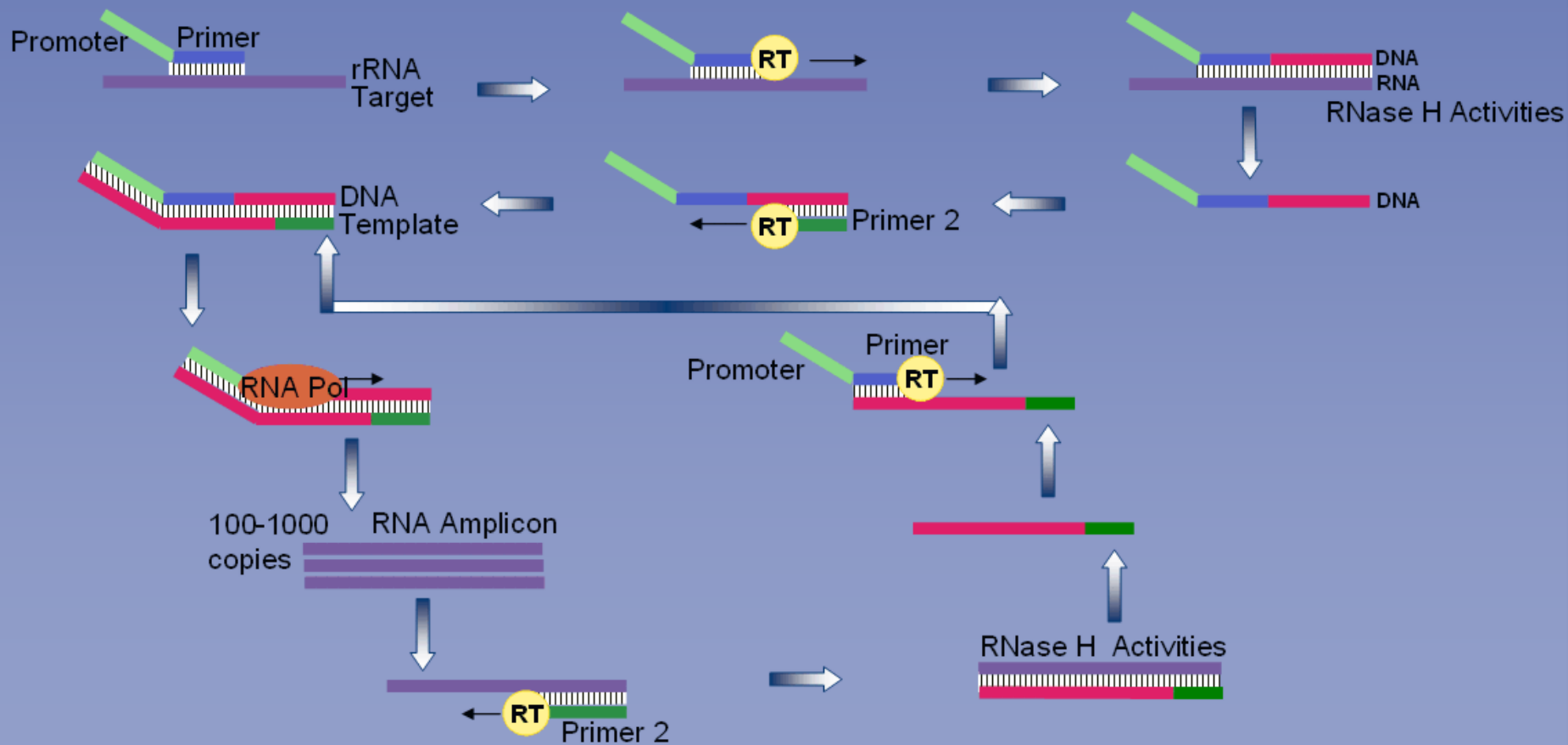
# Βήμα 1: Δέσμευση Στόχου (Target Capture, TC)



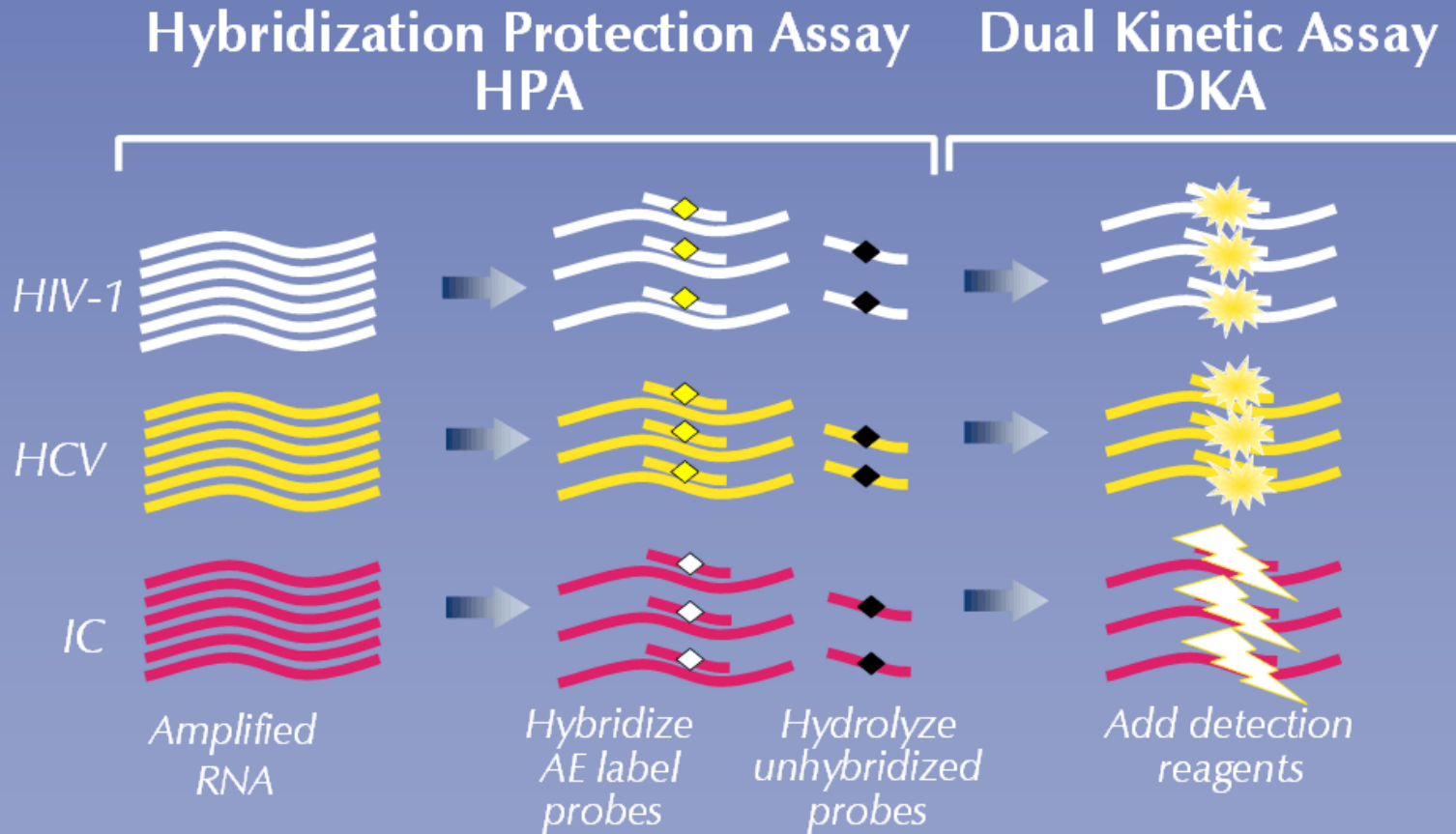
Το πλύσιμο απομακρύνει τα συστατικά του πλάσματος και μη ειδικά DNA/RNA υβρίδια

Όχι ξεχωριστοί χειρισμοί για απομόνωση και καθαρισμό

# Transcription Mediated Amplification (TMA)

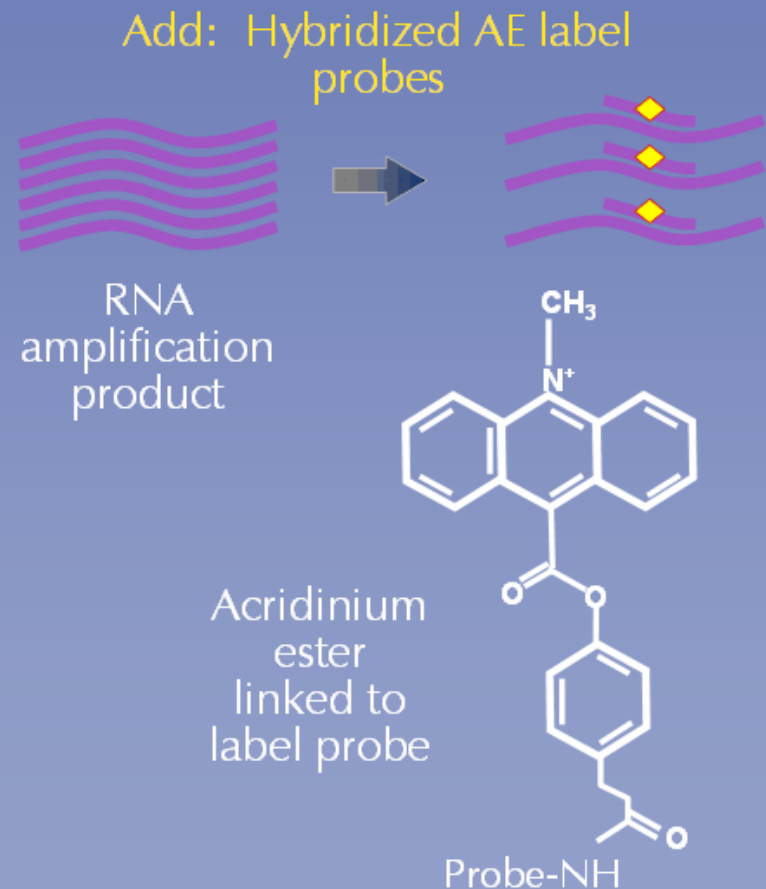


# Βήμα 3: Ανίχνευση — HPA και DKA



# Δοκιμασία Προστασίας με Υβριδισμό (Hybridization Protection Assay, HPA)

- Κάθε ανιχνευτής έχει σημανθεί με ένα μόριο Εστέρα της Ακριδίνης (ΑΕ).
- Ο κάθε ανιχνευτής που έχει σημανθεί με ΑΕ υβριδίζεται στο RNA amplicon.



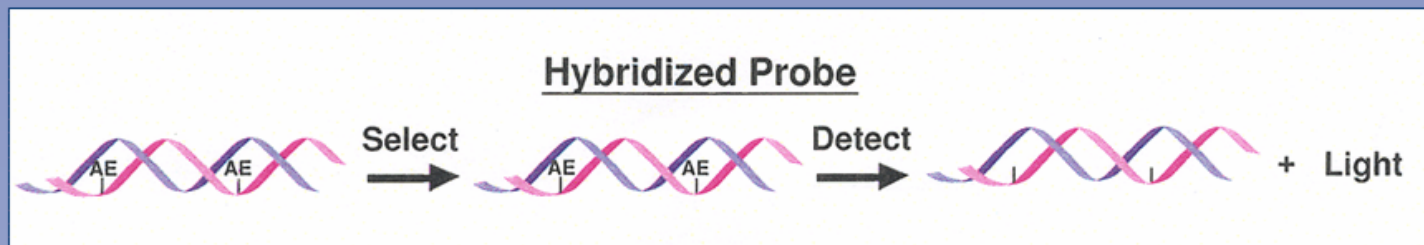
# Διαδικασία Επιλογής (Selection Process)

- Ο ανιχνευτής που έχει υβριδισθεί διαχωρίζεται από εκείνον που δεν έχει με χημική υδρόλυση.

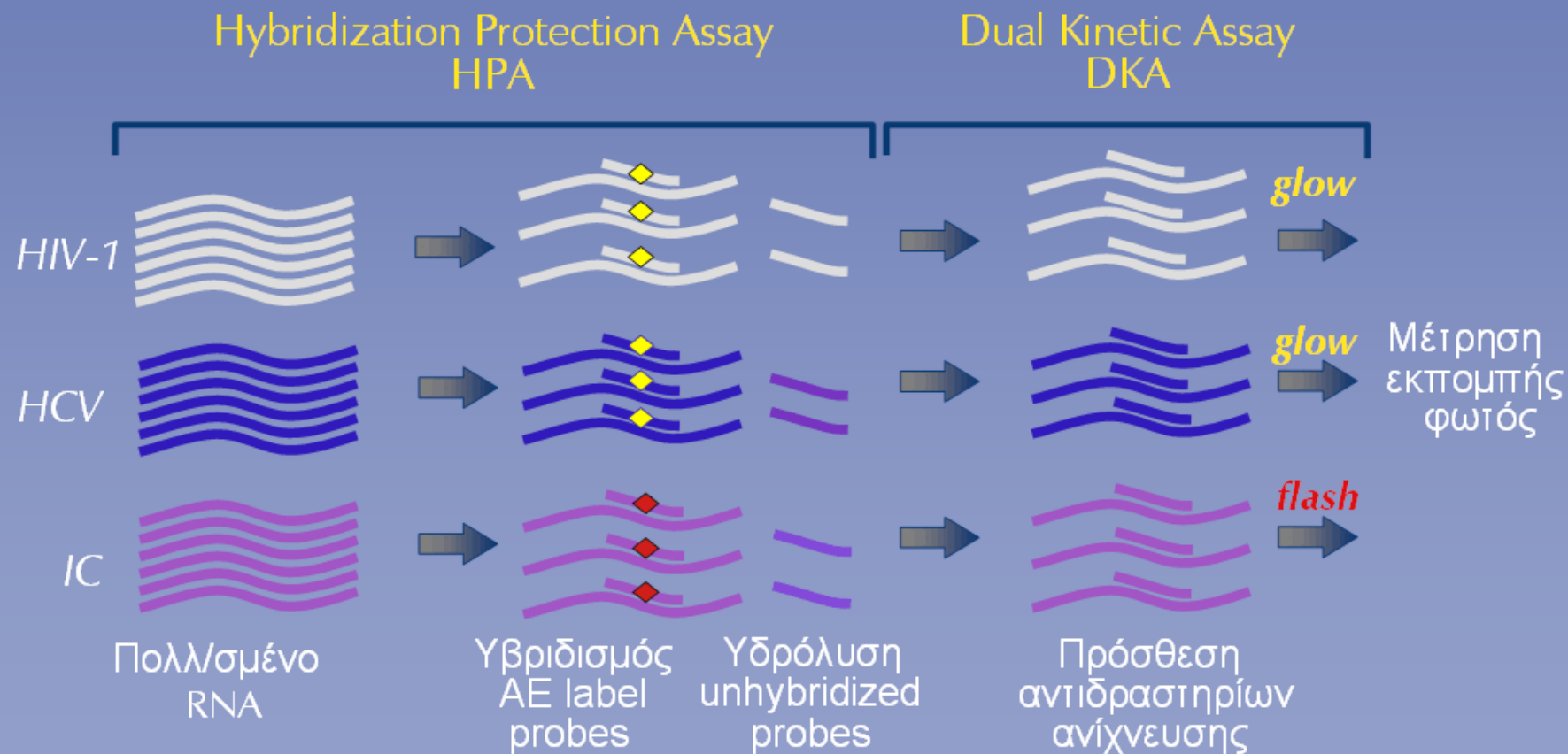
Προστίθεται διάλυμα επιλογής (Selection Reagent)

Ο ΑΕ υδρολύεται από τα μονόκλιωνα probes ( γρήγορη υδρόλυση)

Ο ΑΕ στα δίκλιωνα υβρίδια προστατεύεται μέσα στην δομή της διπλής έλικας (αργή υδρόλυση)

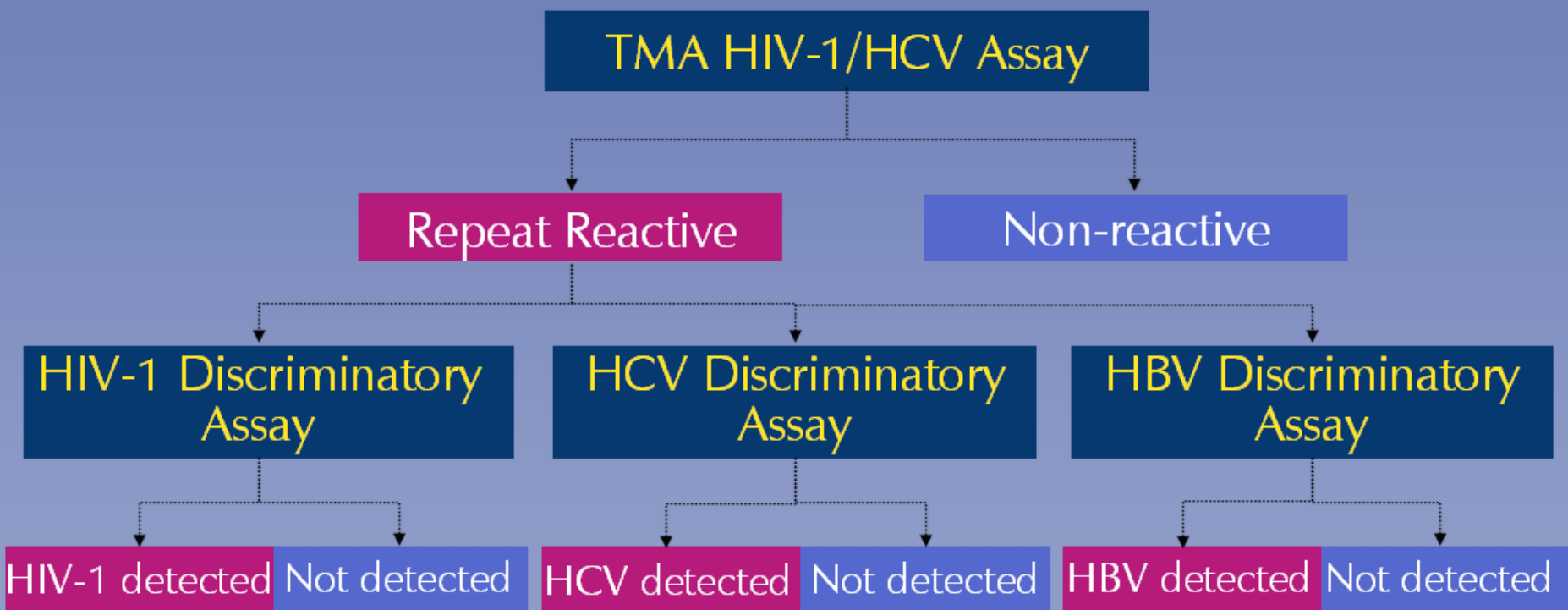


# Ανίχνευση — HPA και DKA



# Chiron NAT Blood Testing Assay

## TMA Discriminatory Assays



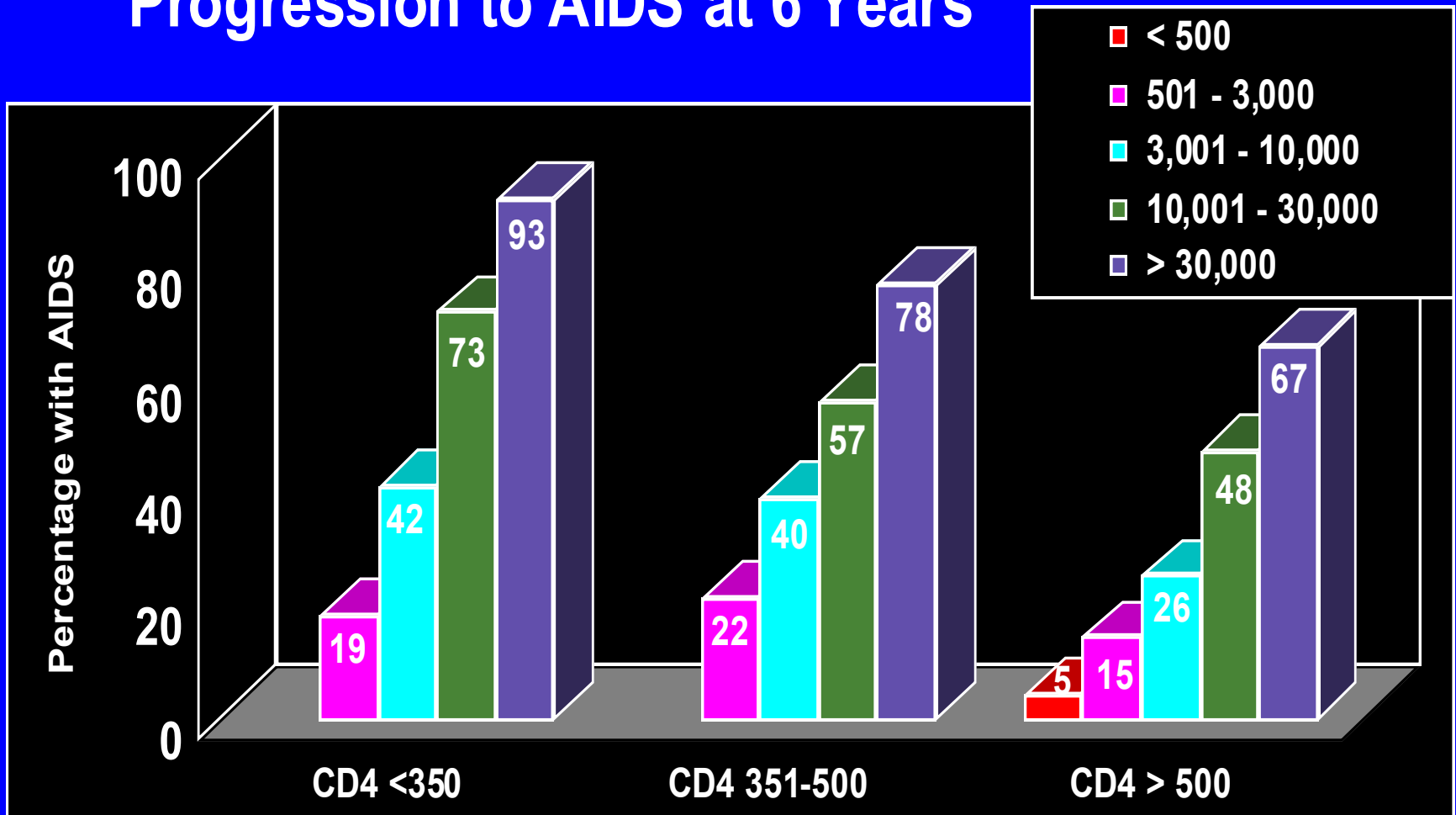
# Σύνοψη – Συμπεράσματα - Πλεονεκτήματα

- ❖ Σημασία υψηλής ευαισθησίας
- ❖ Χρήση εσωτερικού μάρτυρα
- ❖ Εφαρμογή σε διαπιστευμένα εργαστήρια
- ❖ Τεχνολογία αιχμής (δυνατότητα ανάλυσης πολλών δειγμάτων)

**Ποσοτικές δοκιμασίες  
HIV-1 RNA,  
HCV-RNA, HBV-DNA**

# Πρόγνωση για ανάπτυξη AIDS: HIV RNA, CD4

## Progression to AIDS at 6 Years



# Σημασία ποσοτικοποίησης HIV-1 RNA

- ✓ Το HIV-1 RNA στο πλάσμα αντικατοπτρίζει τα επίπεδα του ιικού πολλαπλασιασμού
- ✓ Προγνωστικός δείκτης για ανάπτυξη νόσου
- ✓ Κριτήριο για έναρξη θεραπείας
- ✓ Δείκτης αξιολόγησης αποτελεσματικότητας θεραπείας και, συνεπώς της κλινικής πορείας ενός ασθενούς
- ✓ Δείκτης για ανάπτυξη αντοχής του ιού στη θεραπεία

# Μεθοδολογία που εφαρμόζεται για την ποσοτικοποίηση του μικρού RNA ή DNA

## Μέθοδοι ενίσχυσης στόχου

- ✓ Real-time PCR, ή real-time RT-PCR
- ✓ End-point PCR
- ✓ NASBA

## Μέθοδοι ενίσχυσης σήματος

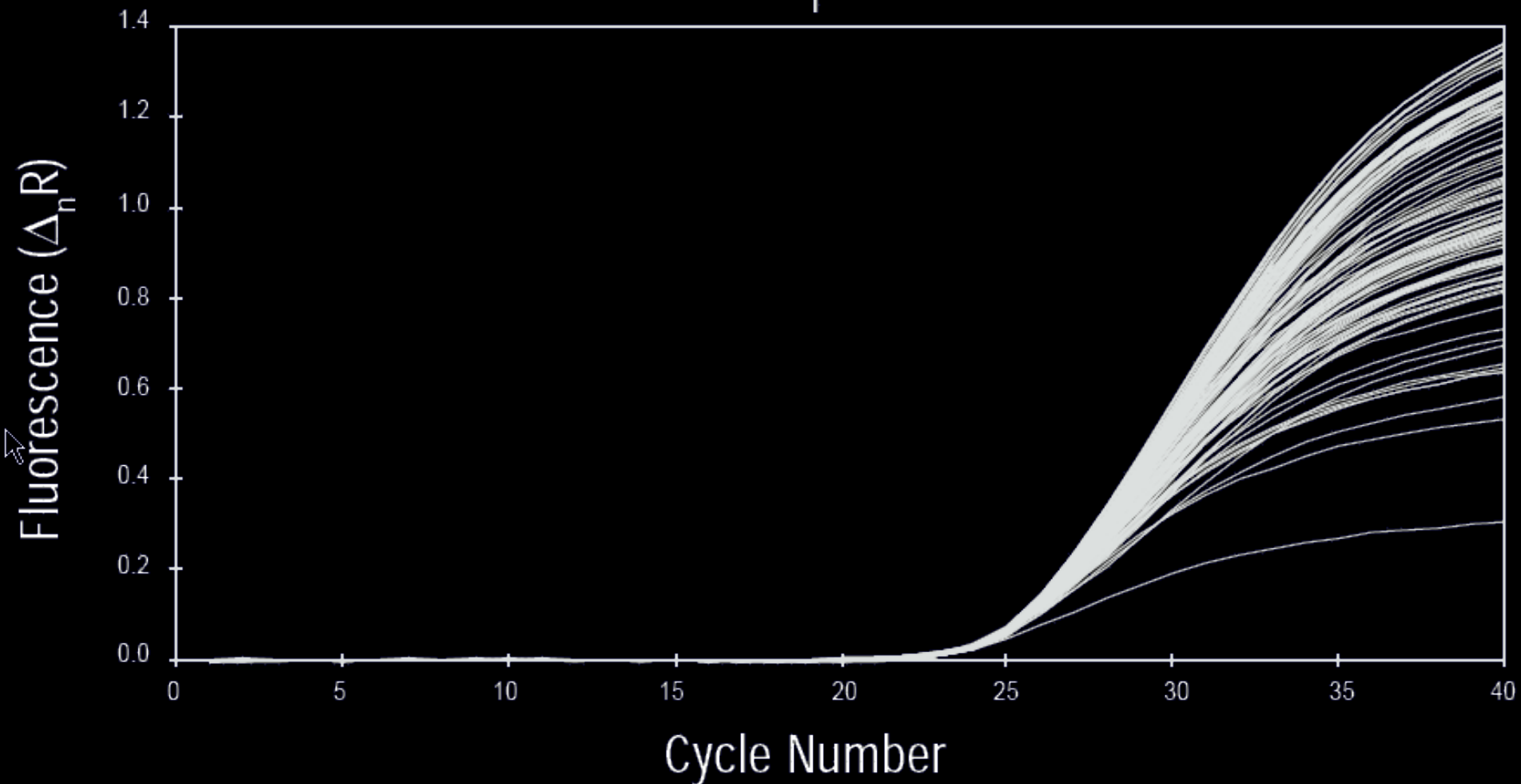
- ✓ Branched-DNA (b-DNA)

# Real-time PCR

- ✓ Η real-time PCR ή RT-PCR εφαρμόζεται με επιτυχία για τον ποσοτικό προσδιορισμό του HIV-RNA, HBV-DNA και HCV-RNA χρησιμοποιώντας ανιχνευτές φθορισμού
- ✓ Η ποσοτικοποίηση με real-time PCR παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα όπως μεγάλο εύρος ποσοτικοποίησης ( $> 6 \log$ ), υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα
- ✓ Η ποσοτικοποίηση επιτυγχάνεται με εξωτερικά πρότυπα (standards) με διεθνή βαθμονόμηση (IU/mL)

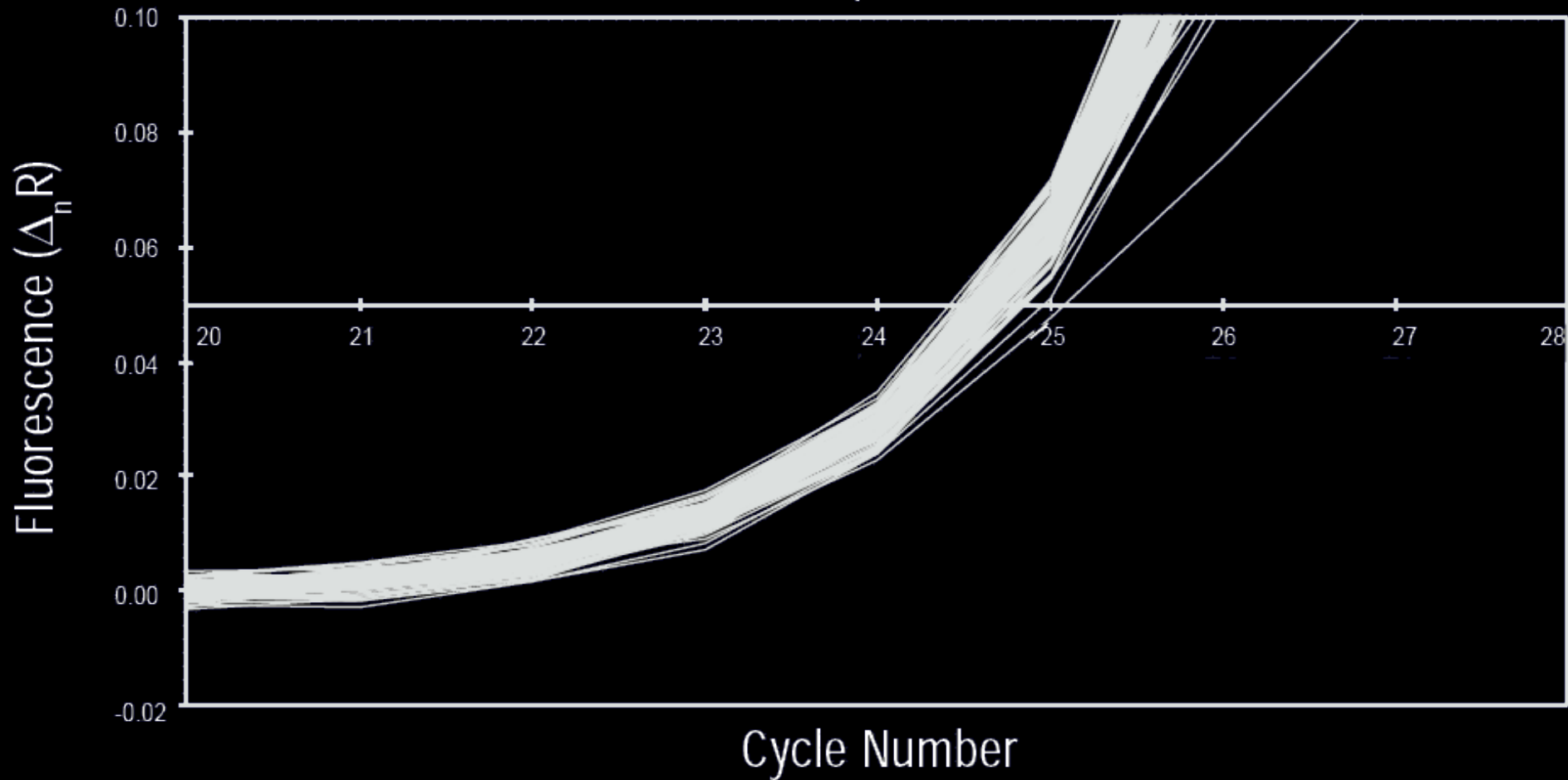
# Real-time PCR

Variable PCR Plateau  
96 replicates



# Real-time PCR

Variable PCR Plateau  
96 replicates

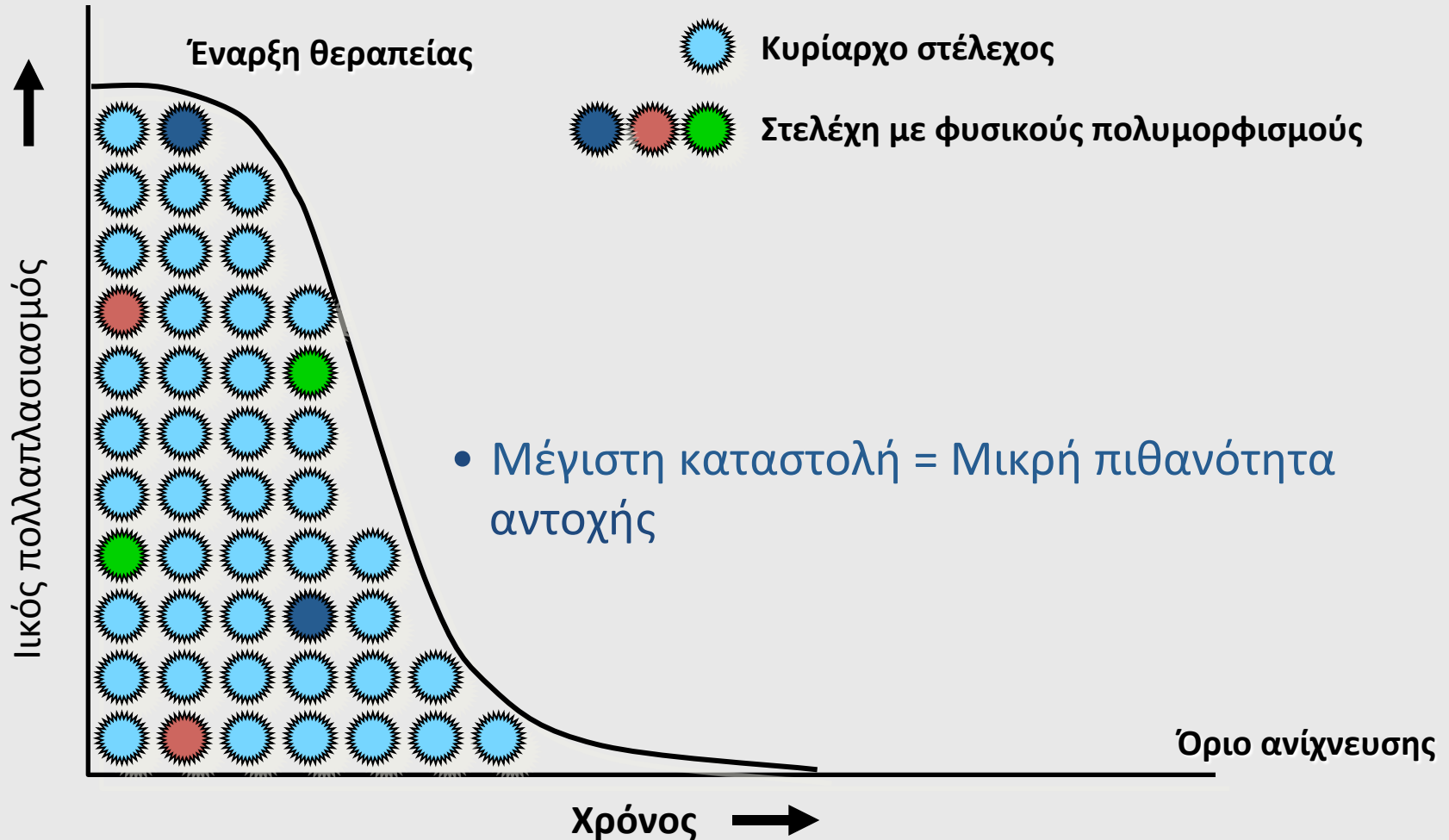


**Γονοτυπικός  
Έλεγχος Αντοχής  
στην Αντιρετροϊκή Θεραπεία**

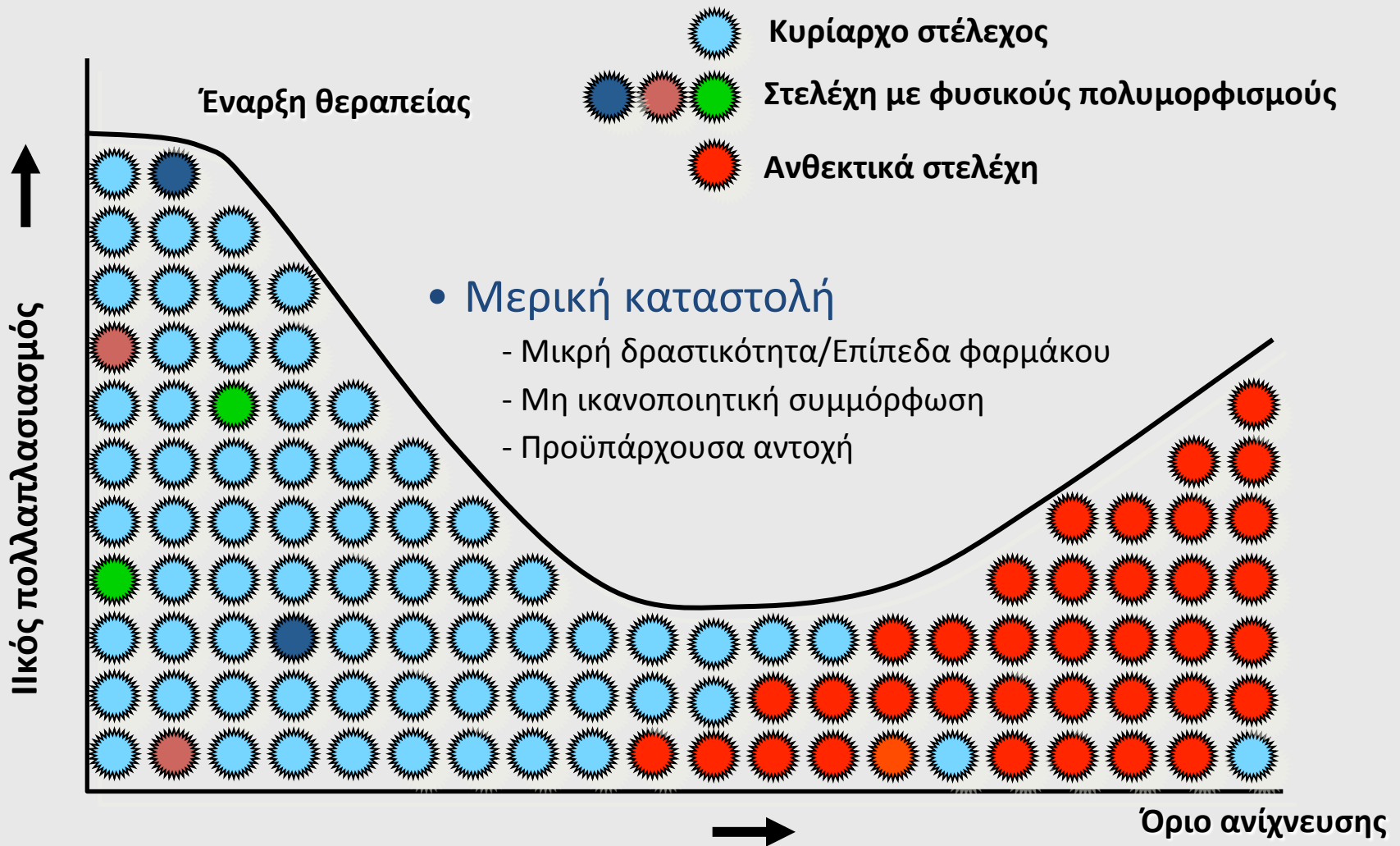
# Ορισμός Αντοχής στην Αντιρετροϊκή Θεραπεία

- ❖ Ως αντοχή στην αντιρετροϊκή θεραπεία ορίζεται ως η ικανότητα του ιού να πολλαπλασιάζεται παρουσία θεραπείας
- ❖ Η αντοχή αναπτύσσεται, κυρίως, ως συνέπεια της μερικής καταστολής του ιικού πολλαπλασιασμού
- ❖ Η αντοχή μπορεί να προέλθει και από μετάδοση ανθεκτικών στελεχών (αιτία μη-ανταπόκρισης)

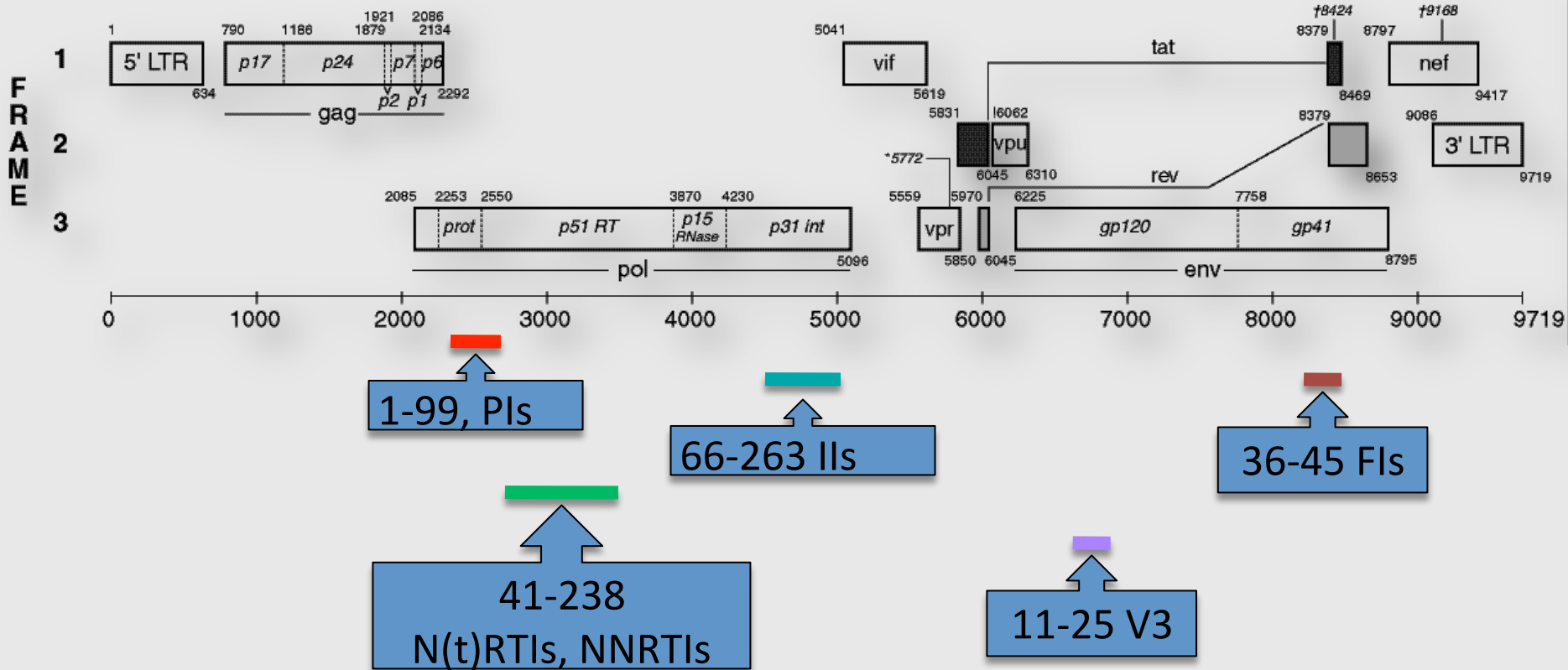
# Καταστολή ιϊκού πολ/σμού και αντοχή (I)



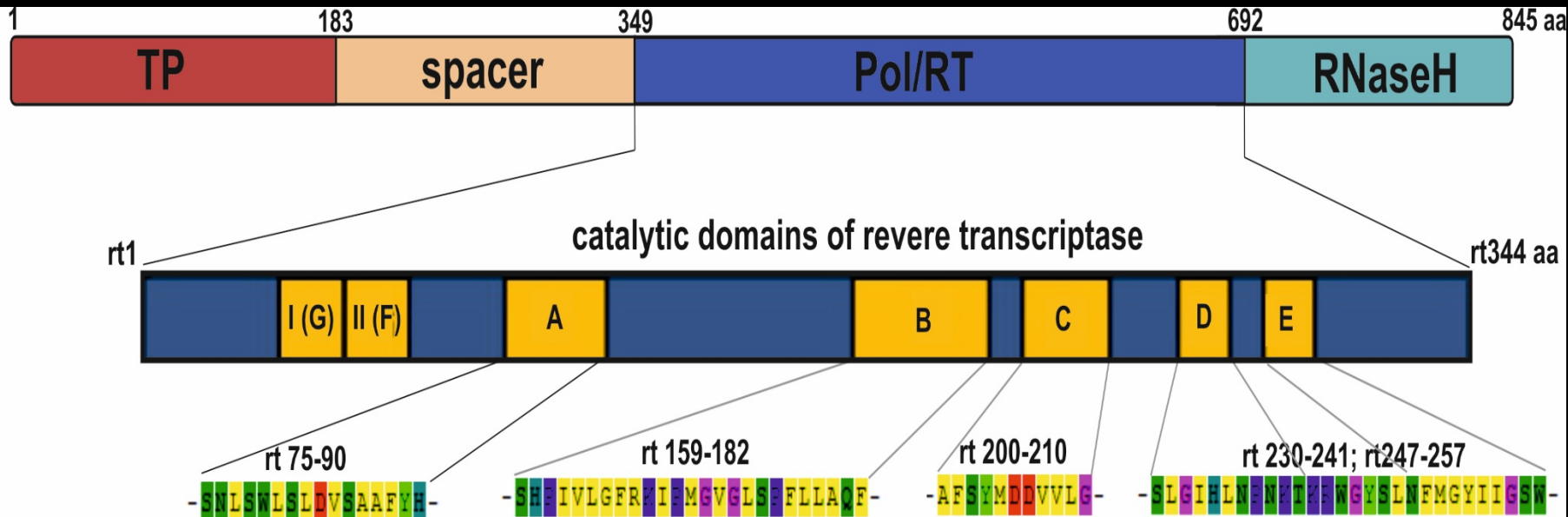
# Καταστολή ιϊκού πολ/σμού και αντοχή (II)



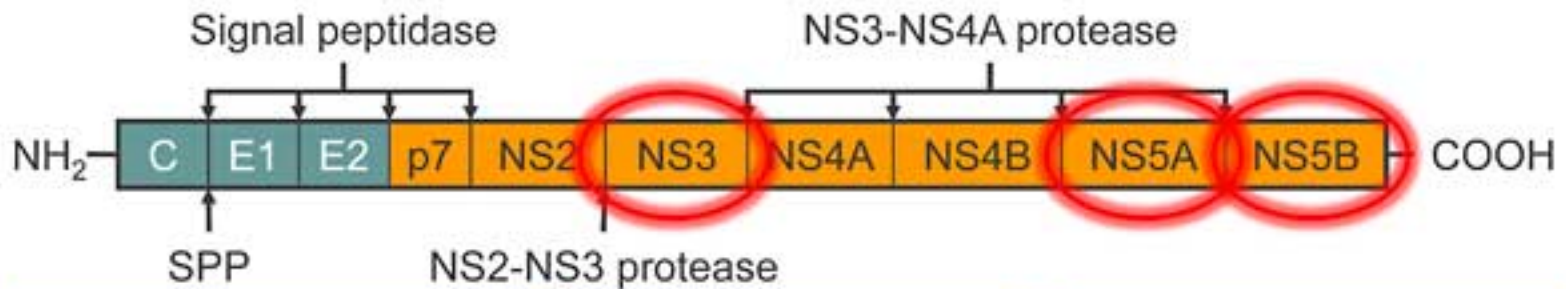
# Περιοχές που αναπτύσσεται η αντοχή HIV-1



# Περιοχές που αναπτύσσεται η αντοχή HBV



# Περιοχές που αναπτύσσεται η αντοχή HCV



## NS3/4A protease inhibitors\*

Telaprevir  
 Boceprevir  
 BI 201335  
 TMC435  
 Danoprevir (R7227/ITMN-191)  
 GS 9256  
 BMS 650032  
 ACH 1625  
 ABT 450

\*Phase II/III

## NS5A inhibitors

BMS-790052  
 ABT-267

## NS5B polymerase inhibitors

### Nucleoside

Mericitabine (R7128)  
 IDX-184  
 PSI-7977

### Non-nucleoside

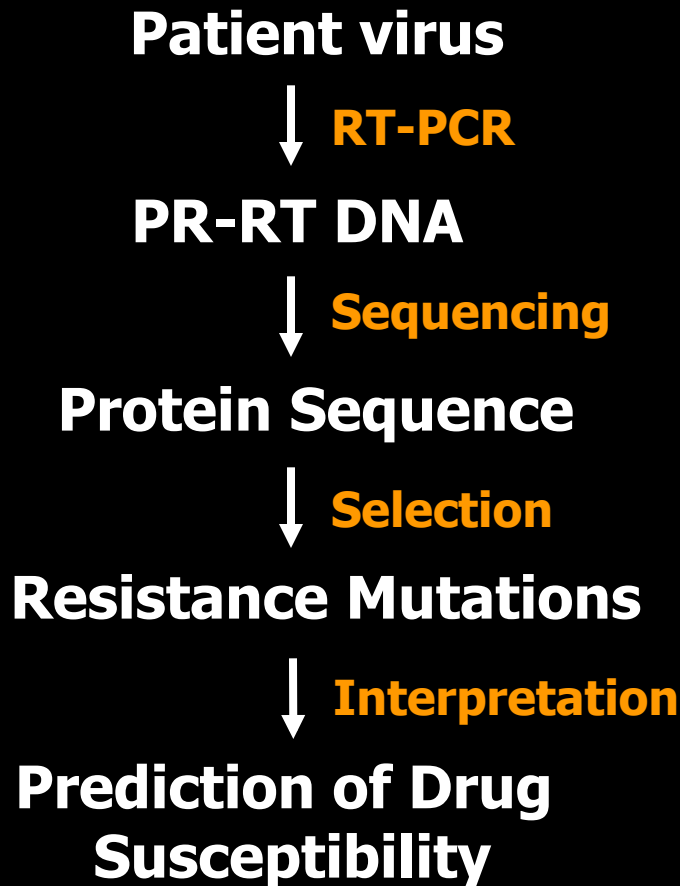
ABT-333  
 ANA598  
 GS 9190  
 BI 207127  
 Filibuvir  
 ABT-072  
 VX-222

# Μέθοδοι εκτίμησης της Αντοχής

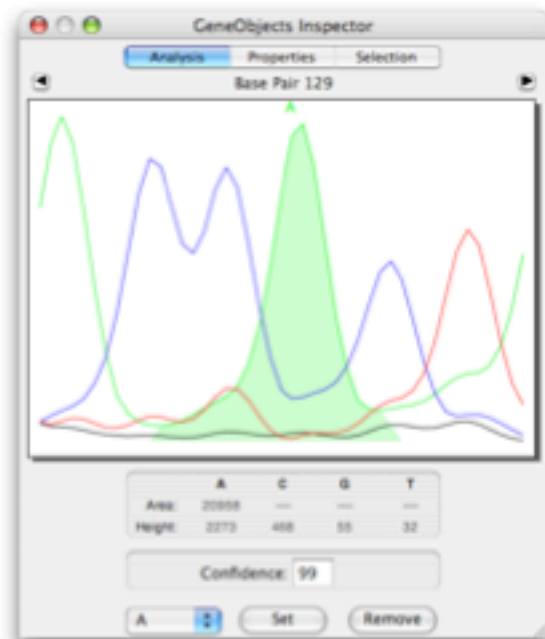
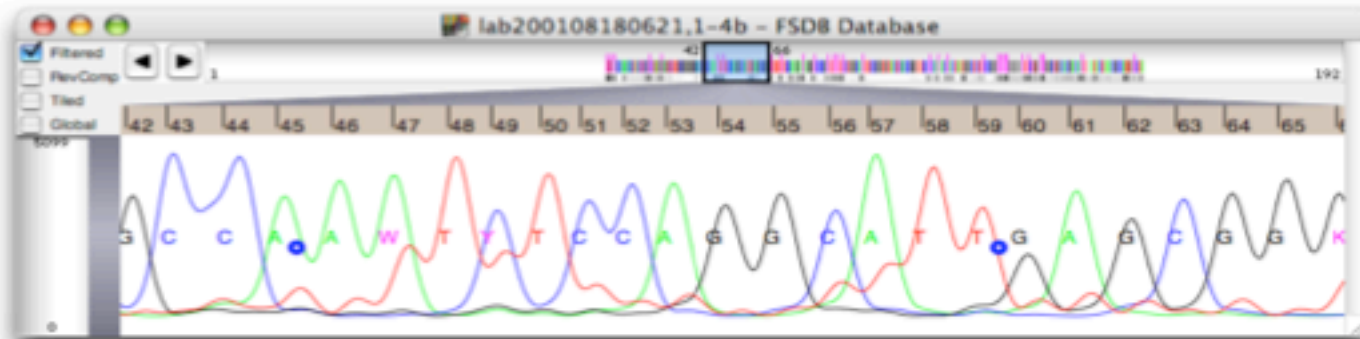
- ❖ Γονοτυπικές μέθοδοι – Αλληλούχιση γονιδιώματος
  - ❖ Ταυτοποίηση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας
  - ❖ Εκτίμηση επιπέδων αντοχής από το γονότυπο
- ❖ Φαινοτυπικές μέθοδοι
  - ❖ Άμεση ταυτοποίηση των επιπέδων αντοχής του ιού *in vitro*
- ❖ *Εικονικού φαινότυπου*
  - ❖ Έμμεση εκτίμηση φαινοτυπικής αντοχής από το γονότυπο
- ❖ *Εκτίμηση τροπισμού*
  - ❖ Φαινοτυπικές μέθοδοι
  - ❖ Εκτίμηση τροπισμού με γονοτυπικές μεθόδους

# Γονοτυπική Αντοχή

## Διάγραμμα ροής εργασίας



# Γονοτυπική Αντοχή Data Analysis



# Γονοτυπική Αντοχή Report

## TRUGENE<sup>®</sup> HIV-1 Guidelines<sup>™</sup> Rules 13.0 RESISTANCE REPORT

Sample ID: 160000181  
Patient ID: 1613166  
Referral Name: John Doe  
DOB: 11/26/1974  
Physician: Dr. John Doe  
Referral: Opti-Report  
Report Date: 2/24/2012

State Central Labs  
2000 West 10th Street, Suite 100  
Anchorage, Alaska 99503



Type: Reference Testing - Abnormal  
Original Report  
Date: 02/24/2012  
Time: 10:44:01 AM  
Lab: 200-484-2447  
Fax: 200-705-9900

Resistance associated RT Mutations: L102I, K103N, T215YV

Nucleoside and Nucleotide RT Inhibitors	Resistance Interpretation
abacavir (ABC)	No Change of Resistance
didanosine (ddI)	No Change of Resistance
lamivudine (3TC) / emtricitabine (FTC)	No Change of Resistance
stavudine (d4T)	Resistance
tenofovir (TDF)	No Change of Resistance
zidovudine (ZDV)	Resistance

NonNucleoside RT Inhibitors	Resistance Interpretation
efavirenz (EFV)	Resistance
nevirapine (NVP)	Resistance

Resistance associated RTI Mutations: L181L, M41L\*, L63P\*, A71T

Protease Inhibitors	Resistance Interpretation
amprenavir (APV) / tipranavir (TPV)	Resistance
APV or TPV**	No Change
atazanavir (ATV)	No Change of Resistance
ATV**	No Change of Resistance
darunavir + cobicistat (JGRO)	No Change of Resistance
indinavir (IDV)	Resistance
IDV**	Resistance (Resistance)
lopinavir + ritonavir (LPV)	No Change of Resistance
lopinavir (LPV)	Resistance (Resistance)
saqvinavir + ritonavir (SQV)	No Change of Resistance
tipranavir + ritonavir (TPV)	No Change of Resistance

\*\* Tipranavir, darunavir, atazanavir, and lopinavir are not tested for resistance in this assay.

\* This mutation is associated with resistance to efavirenz (EFV) and nevirapine (NVP).

## TRUGENE<sup>®</sup> HIV-1 Guidelines<sup>™</sup> Rules 13.0 RESISTANCE REPORT

Sample ID: 165000182  
Patient ID: 1613166  
Referral Name: John Doe  
DOB: 11/26/1974  
Physician: Dr. John Doe  
Referral: Opti-Report  
Report Date: 2/24/2012

State Central Labs  
2000 West 10th Street, Suite 100  
Anchorage, Alaska 99503



Type: Reference Testing Laboratory  
Sample Report  
2000 West 10th Street, Suite 100  
Anchorage, Alaska 99503  
Tel: 200-484-2447  
Fax: 200-705-9900

Mutation Details for Nucleoside and Nucleotide RT Inhibitors

L102I (I102V)  
RTI: 100% (100%)  
This mutation is associated with resistance to abacavir (ABC) and didanosine (ddI).  
Reference: [http://www.hiv-drugresistance.org/rti-resistance/rti-mutations/102i](#)

K103N (K103R)  
RTI: 100% (100%)  
This mutation is associated with resistance to abacavir (ABC) and didanosine (ddI).  
Reference: [http://www.hiv-drugresistance.org/rti-resistance/rti-mutations/103n](#)

T215YV (T215Y)  
RTI: 100% (100%)  
This mutation is associated with resistance to abacavir (ABC) and didanosine (ddI).  
Reference: [http://www.hiv-drugresistance.org/rti-resistance/rti-mutations/215yv](#)

L181L (L181V)  
RTI: 100% (100%)  
This mutation is associated with resistance to efavirenz (EFV) and nevirapine (NVP).  
Reference: [http://www.hiv-drugresistance.org/rti-resistance/rti-mutations/181l](#)

M41L\* (M41I)  
RTI: 100% (100%)  
This mutation is associated with resistance to efavirenz (EFV) and nevirapine (NVP).  
Reference: [http://www.hiv-drugresistance.org/rti-resistance/rti-mutations/41l](#)

L63P\* (L63R)  
RTI: 100% (100%)  
This mutation is associated with resistance to efavirenz (EFV) and nevirapine (NVP).  
Reference: [http://www.hiv-drugresistance.org/rti-resistance/rti-mutations/63p](#)

A71T (A71V)  
RTI: 100% (100%)  
This mutation is associated with resistance to efavirenz (EFV) and nevirapine (NVP).  
Reference: [http://www.hiv-drugresistance.org/rti-resistance/rti-mutations/71t](#)

Mutations associated with resistance to efavirenz (EFV) and nevirapine (NVP): L181L, M41L\*, L63P\*, A71T.

Mutation Details for NonNucleoside RT Inhibitors

EFV (EFV)  
RTI: 100% (100%)  
This mutation is associated with resistance to efavirenz (EFV) and nevirapine (NVP).  
Reference: [http://www.hiv-drugresistance.org/rti-resistance/rti-mutations/efv](#)

NVP (NVP)  
RTI: 100% (100%)  
This mutation is associated with resistance to efavirenz (EFV) and nevirapine (NVP).  
Reference: [http://www.hiv-drugresistance.org/rti-resistance/rti-mutations/nvp](#)

EFV (EFV)  
RTI: 100% (100%)  
This mutation is associated with resistance to efavirenz (EFV) and nevirapine (NVP).  
Reference: [http://www.hiv-drugresistance.org/rti-resistance/rti-mutations/efv](#)

Mutations associated with resistance to efavirenz (EFV) and nevirapine (NVP): L181L, M41L\*, L63P\*, A71T.

Mutation Details for Protease Inhibitors

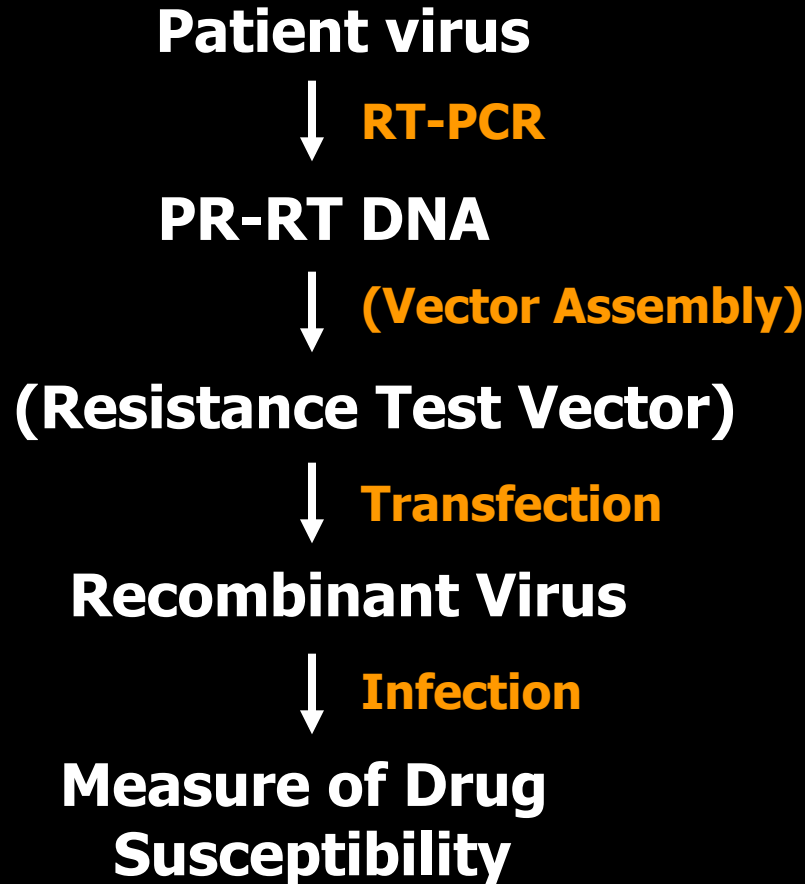
Tipranavir (TPV) and Darunavir (DRV) are not tested for resistance in this assay.

ATV (ATV)  
RTI: 100% (100%)  
This mutation is associated with resistance to atazanavir (ATV) and darunavir (DRV).  
Reference: [http://www.hiv-drugresistance.org/rti-resistance/rti-mutations/atv](#)

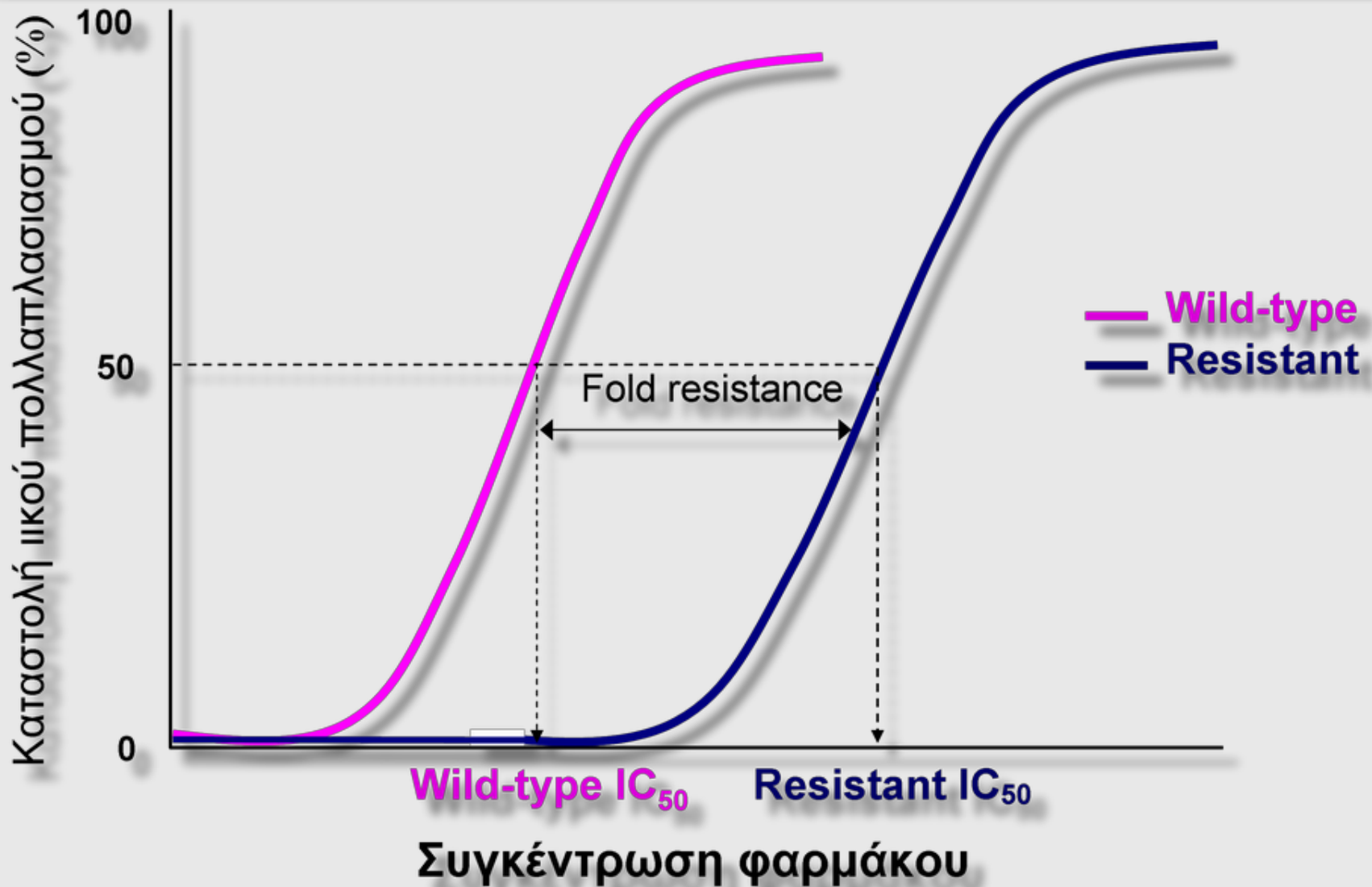
ATV (ATV)  
RTI: 100% (100%)  
This mutation is associated with resistance to atazanavir (ATV) and darunavir (DRV).  
Reference: [http://www.hiv-drugresistance.org/rti-resistance/rti-mutations/atv](#)

# Φαινοτυπική Αντοχή

## Διάγραμμα ροής εργασίας



# Εκτίμηση φαινοτυπικής αντοχής



DRUGS		FOLD CHANGE <sup>1</sup>	CUT-OFF <sup>2</sup>		RESISTANCE ANALYSIS <sup>3</sup>	CLINICAL NOTES <small>see p2 for details</small>	
<b>NRTI / NtRTI mutations: 41L, 43E, 44A, 70R, 74V, 118I, 181C, 203K, 208Y, 211K, 215F, 219Q, 223E, 228H</b>							
NRTI/NtRTI	Retrovir®	Zidovudine	13,8	1,9	14,4	REDUCED RESPONSE	
	Epivir®	Lamivudine	5,4	1,1	3,7	MINIMAL RESPONSE	
	Videx®	Didanosine	2,9	1,3	3,0	REDUCED RESPONSE	
	Hivid®	Zalcitabine	1,4	3,0		SUSCEPTIBLE	
	Zerit®	Stavudine	1,7	1,1	2,2	REDUCED RESPONSE	
	Ziagen®	Abacavir	3,6	2,1		RESISTANT	Note 1
	Emtriva®	Emtricitabine	7,6	3,7		RESISTANT	
	Viread®	Tenofovir DF	2,6	1,0	2,0	MINIMAL RESPONSE	

<b>NNRTI mutations: 135T, 181C, 190A</b>							
NNRTI	Viramune®	Nevirapine	72,3	5,2		RESISTANT	
	Rescriptor®	Delavirdine	29,6	7,7		RESISTANT	
	Sustiva® , Stocrin®	Efavirenz	13,3	3,4		RESISTANT	

<b>PI mutations: 10V, 33F, 46I/L, 50L, 58E, 63P, 71L, 82A, 90M, 93L</b>							
PI	Crixivan®	Indinavir	16,1	0,8	2,2	MINIMAL RESPONSE	
	Crixivan®; boosted	Indinavir /r	16,1	4,1 *	21,2 *	REDUCED RESPONSE	
	Norvir®	Ritonavir	50,2	2,4		RESISTANT	
	Viracept®	Nelfinavir	23,5	1,0	1,5	MINIMAL RESPONSE	
	Invirase®	Saquinavir	3,5	0,7 *	1,0 *	MINIMAL RESPONSE	
	Invirase®; boosted	Saquinavir /r	3,5	1,1 *	12,0 *	REDUCED RESPONSE	
	Agenerase®	Amprenavir	7,6	0,7	1,4	MINIMAL RESPONSE	
	Agenerase®; boosted	Amprenavir /r	7,6	0,9	6,5	MINIMAL RESPONSE	
	Lexiva®, Telzir®	Fosamprenavir	7,6	1,8		RESISTANT	Note 2
	Kaletra®	Lopinavir /r	13,4	10,0	61,6	REDUCED RESPONSE	
	Reyataz®	Atazanavir	Rules-Based Interpretation			RESISTANT	Note 2
	Aptivus®	Tipranavir	1,0	1,6		SUSCEPTIBLE	

DRUGS		DATABASE MATCHES	0.3 1 10 100 (>100)				FC (95% confidence limits)	CCO 1	CCO 2	BCO
<b>NRTI / NtRTI mutations: 41L, 43E, 44A, 70R, 74V, 118I, 181C, 203K, 208Y, 211K, 215F, 219Q, 223E, 228H</b>										
Zidovudine	AZT	242					13,8 (11,7-16,3)	1,9	14,4	
Lamivudine	3TC	51					5,4 (4,2-6,9)	1,1	3,7	
Didanosine	ddl	10					2,9 (1,8-4,6)	1,3	3,0	
Zalcitabine	ddC	13					1,4 (0,8-2,4)			3,0
Stavudine	d4T	88					1,7 (1,5-2,0)	1,1	2,2	
Abacavir	ABC	20					3,6 (2,8-4,5)			2,1
Emtricitabine	FTC	21					7,6 (4,9-11,8)			3,7
Tenofovir DF	TDF	30					2,6 (2,1-3,1)	1,0	2,0	
<b>NNRTI mutations: 135T, 181C, 190A</b>										
Nevirapine	NVP	184					72,3 (67,7-77,1)			5,2
Delavirdine	DLV	130					29,6 (23,1-38,0)			7,7
Efavirenz	EFV	82					13,3 (9,8-18,2)			3,4
<b>PI mutations: 10V, 33F, 46I/L, 50L, 58E, 63P, 71L, 82A, 90M, 93L</b>										
Indinavir	IDV	127					16,1 (13,5-19,2)	0,8	2,2	
Indinavir/r	IDV/r	127					16,1 (13,5-19,2)	4,1*	21,2*	
Ritonavir	RTV	81					50,2 (40,1-62,8)			2,4
Nelfinavir	NFV	107					23,5 (19,9-27,9)	1,0	1,5	
Saquinavir	SQV	307					3,5 (3,1-4,0)	0,7*	1,0*	
Saquinavir/r	SQV/r	307					3,5 (3,1-4,0)	1,1*	12,0*	
Amprenavir	APV	12					7,6 (4,2-13,7)	0,7	1,4	
Amprenavir/r	APV/r	12					7,6 (4,2-13,7)	0,9	6,5	
Fosamprenavir	908	12					7,6 (4,2-13,7)			1,8
Lopinavir/r	LPV/r	16					13,4 (8,5-21,1)	10,0	61,6	
Atazanavir	ATV		Rules-based interpretation				RESISTANT			
Tipranavir	TPV	5					1,0 (0,6-1,7)			1,6

\* these cut-offs are further being refined to improve precision

**Apostolos Beloukas**

**[beloukas@liverpool.ac.uk](mailto:beloukas@liverpool.ac.uk)**

**[abeloukas@teiath.gr](mailto:abeloukas@teiath.gr)**



**Σας ευχαριστώ**