

ΑΡΧΕΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Spyros Pournaras

Professor and Director
Laboratory of Clinical Microbiology
ATTIKON University Hospital
Medical School, University of Athens, Greece

Attending Guest Professor
Laboratory of Medical Microbiology and Infection Prevention
University Medical Center, Groningen, The Netherlands

Σκοπός της διάλεξης:

- Η εξοικείωση των φοιτητών με τις μεθόδους μοριακής βιολογίας που έχουν **εφαρμογή**:
 - Στη διάγνωση των λοιμώξεων
 - Τη διερεύνηση της μικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά
 - Στην επιδημιολογική επιτήρηση και έλεγχο των λοιμώξεων
- Η κατανόηση της **αναγκαιότητας και της συνεισφοράς του εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας στην κλινική έρευνα**

A) Μοριακή διάγνωση του λοιμογόνου παράγοντα

- **Εμπορικά** ΚΙΤ:
παρέχουν αξιόπιστα αποτελέσματα λόγω:
 - απλουστευμένης χρήσης
 - βεβαιωμένης επαναληψιμότητας
- **in-house** πρωτόκολλα:
δεν είναι προτυποποιημένα

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

A1) Μοριακή διάγνωση λοιμογόνου παράγοντα: Μέθοδοι Υβριδισμού

Τεχνικές ανίχνευσης των παθογόνων **χωρίς προηγούμενο πολλαπλασιασμό** του στόχου: επιτρέπουν την απευθείας ανίχνευση στο κλινικό δείγμα

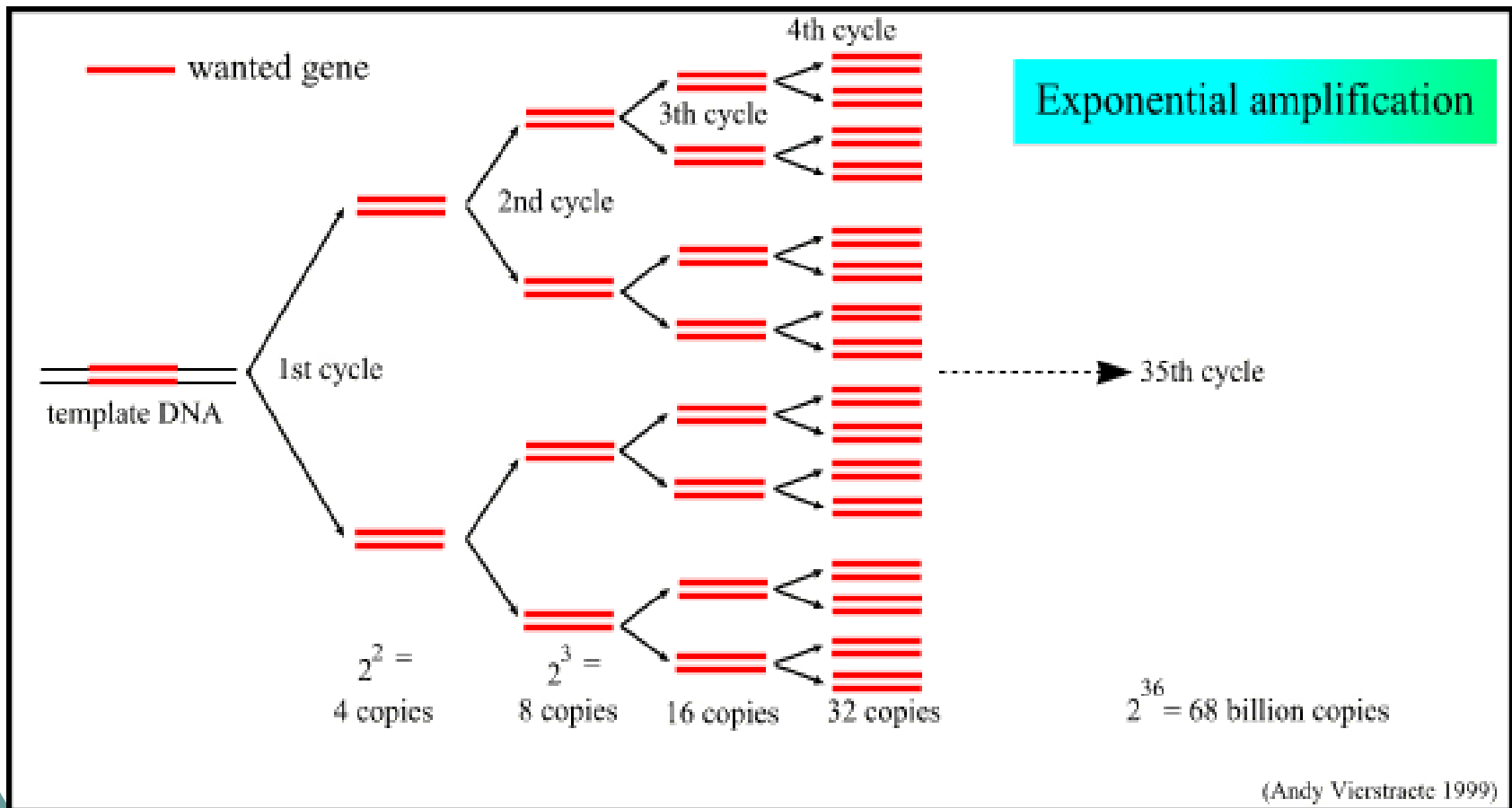
- Βασικό μειονέκτημα η **έλλειψη ευαισθησίας**
- Μετά τον υβριδισμό του ιχνηθέτη στο στόχο το σήμα που εκπέμπεται ενισχύεται και το ελάχιστο ανιχνεύσιμο φορτίο μειώνεται. Ωστόσο, ακόμα και μετά την **ενίσχυση του σήματος**, η ευαισθησία των σχετικών τεχνικών είναι σαφώς υποδεέστερη σε σχέση με τα πρωτόκολλα πολλαπλασιασμού

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

A2) Μοριακή διάγνωση: Μέθοδοι Πολλαπλασιασμού (PCR)

- Οι τεχνικές πολλαπλασιασμού των νουκλεϊκών οξέων επιτρέπουν τη **στοχευμένη διαγνωστική προσπέλαση** ακόμα και αν ο παθογόνος στόχος βρίσκεται σε **μικρή συγκέντρωση** στο δείγμα
- Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (**Polymerase Chain Reaction - PCR**) πλέον χρησιμοποιείται ευρέως τόσο για διαγνωστικούς όσο και για ερευνητικούς σκοπούς
- Εκτός από τον ποιοτικό έλεγχο των κλινικών δειγμάτων, η PCR επιτρέπει **ποσοτικό προσδιορισμό** του φορτίου του παθογόνου (π.χ. **HCV, HIV, HBV**)
- Η PCR είναι πολύτιμη για **βραδέως αναπτυσσόμενα παθογόνα** όπως τα *Mycobacteria*

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

B) Διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών αντοχής στα αντιβιοτικά

- Οι κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές μελέτης της ευαισθησίας των μικροβίων στα αντιβιοτικά χρησιμεύουν για την **εκλογή της θεραπείας** και **δύσκολα μπορούν να αντικατασταθούν από τις μοριακές τεχνικές** παρά το ότι είναι **χρονοβόρες**
- Ωστόσο, οι συμβατικές τεχνικές υστερούν στην ανίχνευση **μοριακών παραγόντων αντοχής** όπως για παράδειγμα στις περιπτώσεις των φαινομενικά ευαίσθητων στην οξακιλίνη *S. aureus* οι οποίοι όμως είναι θετικοί για το γονίδιο *mecA* που κωδικοποιεί για την PBP2a
- Στις περιπτώσεις αυτές η PCR μπορεί να ανιχνεύσει τα **γονίδια αντοχής** ή για τους ιούς συγκεκριμένες **σημειακές μεταλλάξεις** που προσδίδουν αντοχή στα αντιβιοτικά φάρμακα

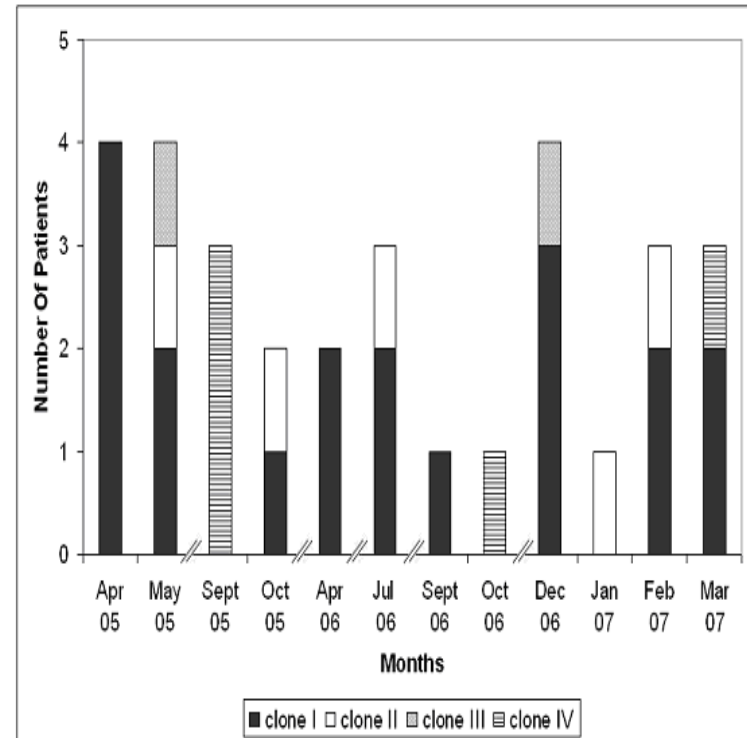
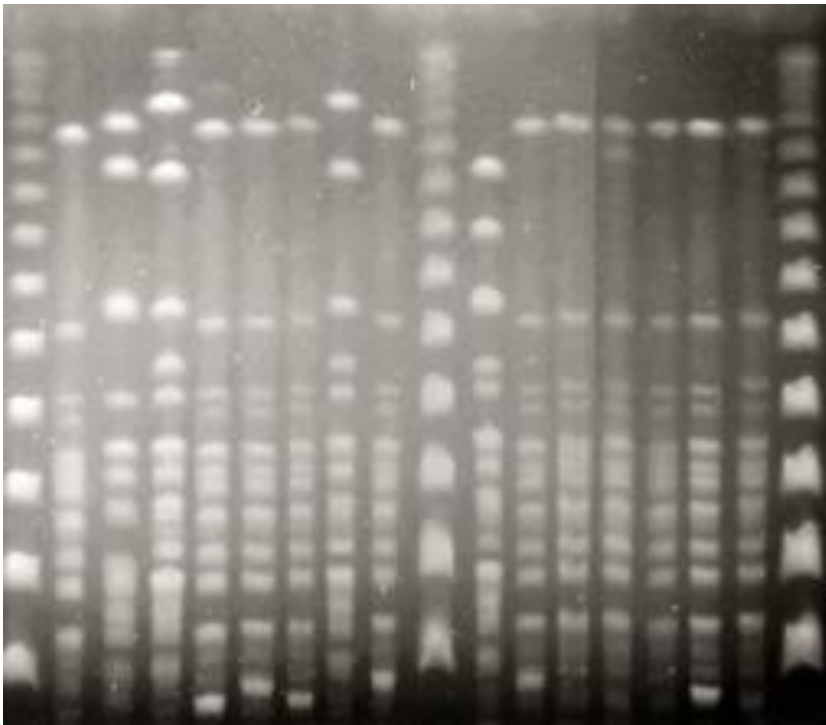
B) Διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών αντοχής στα αντιβιοτικά

- Σημαντικό ωστόσο πλεονέκτημα των συμβατικών μικροβιολογικών μεθόδων ελέγχου της ευαισθησίας, είναι ότι ανιχνεύουν την αντοχή σε έναν αντιμικροβιακό παράγοντα **είτε οφείλεται σε γνωστό μηχανισμό είτε σε καινούριο** σε αντίθεση με τις μοριακές μεθόδους που ανιχνεύουν γνωστούς μόνο μηχανισμούς αντοχής
- Επίσης, η παρουσία ενός γονιδίου αντοχής **δε σημαίνει απαραίτητα** και τη λειτουργική του έκφραση όπως επίσης και η απουσία ενός τέτοιου γονιδίου δεν εξαιρεί την αντοχή στο αντιβιοτικό λόγω άλλου μηχανισμού αντοχής

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Γ) Χρήση των μοριακών μεθόδων για σκοπούς μοριακής επιδημιολογίας.

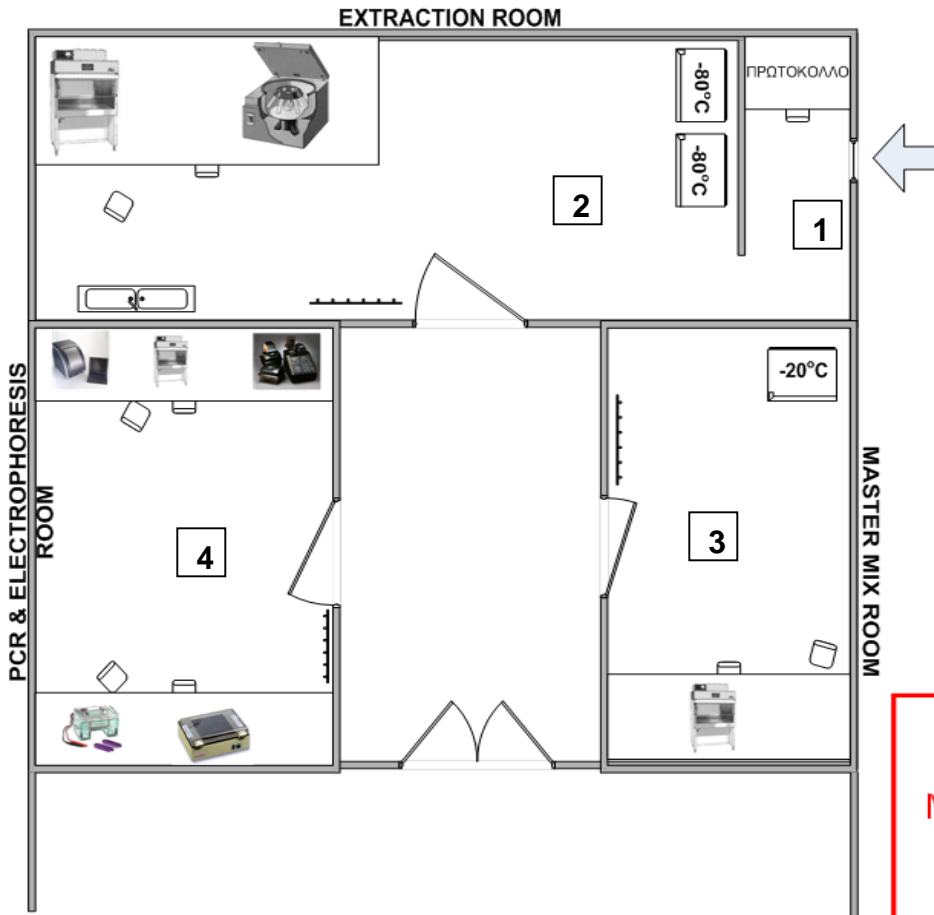
- Η διερεύνηση της συγγένειας των παθογόνων έχει ιδιαίτερη σημασία στη μελέτη της **διασποράς της μικροβιακής αντοχής** και του **ελέγχου των λοιμώξεων**.



ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ:

- Χωροταξική οργάνωση του εργαστηρίου: **PCR** → το DNA που ανιχνεύεται στο εργαστήριο **πολλαπλασιάζεται** δεκάδες διαδοχικές φορές → το τελικό φορτίο του φτάνει σε **εκατομμύρια αντίγραφα** → δυνητικά μπορεί να **επιμολύνει** **κάθε** αντιδραστήριο, όργανο μέχρι και εργαστηριακή μπλούζα.
- Το δεδομένο αυτό δημιουργεί την ανάγκη να χωριστεί το εργαστήριο σε:
 - α) ένα **χώρο παραλαβής του δείγματος και εξαγωγής** του DNA ή RNA
 - β) ένα χώρο πραγματοποίησης της **αντίδρασης** της PCR και **ανάλυσης** των προϊόντων της
 - γ) ξεχωριστό χώρο **προετοιμασίας** των αντιδραστηρίων

ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ II:



Για την αποφυγή επιμολύνσεων κατά το χειρισμό των κλινικών δειγμάτων θα πρέπει να ακολουθείται συγκεκριμένη πορεία μέσα στο εργαστήριο:

1. Παραλαβή – πρωτόκολλο
2. Εξαγωγή DNA στο Extraction room → φύλαξη DNA/RNA στους -80°C .
3. Ετοιμασία PCR master mix στο αντίστοιχο δωμάτιο.
4. Το DNA μπαίνει στο PCR & Electrophoresis Room και η ηλεκτροφόρηση γίνεται στον ίδιο χώρο αλλά σε διαφορετικό πάγκο.

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΛΟΓΟ ΚΡΙΝΕΤΑΙ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΗ Η ΑΛΛΑΓΗ ΠΟΔΙΑΣ ΜΕ ΤΗΝ ΕΙΣΟΔΟ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΧΩΡΟ ΤΟΥ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

Τεχνικές Μοριακής Μικροβιολογίας

- **A. Εξαγωγή και ανάλυση γενωμικού DNA**
- **B. Εξαγωγή και ανάλυση RNA**
- **Γ. Εξαγωγή και ανάλυση πρωτεϊνών**
- **Δ. Ειδικές εφαρμογές:**
 - **Εξαγωγή και ανάλυση πλασμιδιακού DNA**
 - **Ανάλυση του γενώματος των μικροβίων με περιοριστική πέψη και ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο**
 - **Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA**
 - **Ανάλυση αμινοξικής αλληλουχίας**