



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ



ΠΓΝ ΑΤΤΙΚΟΝ

# ΑΡΧΕΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Spyros Pournaras

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

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

# Μοριακές vs συμβατικές μέθοδοι

- Βελτίωση ευαισθησίας-ειδικότητας
- Βελτίωση χρόνου λήψης αποτελέσματος
  - Ανίχνευση παθογόνων απ' ευθείας από το κλινικό δείγμα
  - Ανίχνευση απαιτητικών ή βραδέως αναπτυσσόμενων παθογόνων
- Ανίχνευση παθογόνων που δεν καλλιεργούνται

**Σωστός σχεδιασμός**

**Σωστή αξιολόγηση αποτελέσματος**

# Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Πολλαπλασιασμός γνωστών αλληλουχιών σε τρία βήματα:

## 1) Αποδιάταξη

Θέρμανση στους 94°C → οι δύο κλώνοι αποχωρίζονται

## 2) Υβριδοποίηση

Πτώση της θερμοκρασίας (~50°C) → Οι εκκινητές προσκολλώνται στα μονόκλινα μόρια DNA.

## 3) Επιμήκυνση

Θέρμανση στους 72°C → Αντιγραφή κάθε κλώνου παρουσία θερμοανθεκτικής πολυμεράσης (Taq DNA polymerase), δεοξυριβονουκλεοτιδίων, ρυθμιστικού διαλύματος και μαγνησίου (Mg<sup>2+</sup>)

Επανάληψη για 30 κύκλους → Εκθετική αύξηση του αριθμού των μορίων DNA ( $2^{30}$ )

PCR  
cycles

1

2

3

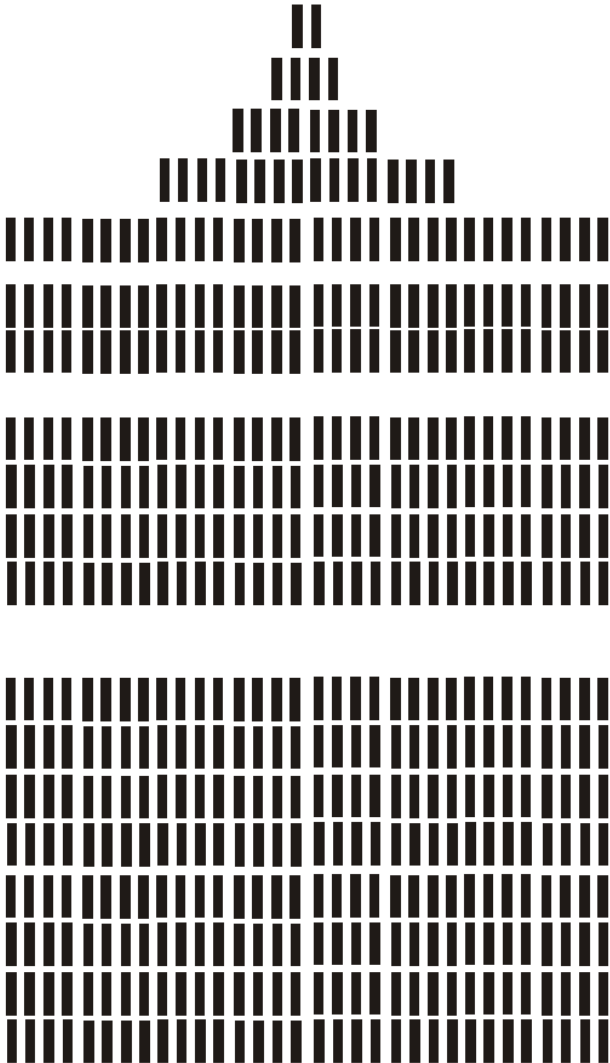
4

5

6

7

8



# Σχεδιασμός εκκινητών

- Συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια συμπληρωματικά για τα δύο αντιπαράλληλα άκρα της αλληλουχίας-στόχου
- Καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την επιτυχία της PCR.
- Βέλτιστο μήκος 20-26 βάσεις (bp)
- Περιεκτικότητα σε βάσεις G, C 40-60%
- Αποφυγή συμπληρωματικών αλληλουχιών εντός του κλώνου των εκκινητών, ειδικά στο 3' άκρο
- Αποφυγή συμπληρωματικών αλληλουχιών των εκκινητών με μη επιθυμητές αλληλουχίες DNA
- Απόρριψη των εκκινητών που έχουν ομολογία με ανεπιθύμητες περιοχές άνω του 70%
- Αποφυγή επανάληψης των G και C στο 3' άκρο των εκκινητών (πχ GCCCC, GGGG)
- Δυνατότητα σχεδιασμού εκφυλισμένων (degenerated) εκκινητών

[www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/),

<http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html>

# Επιλογή στόχου

- Μοριακό μέγεθος: 400-2000 ζεύγη βάσεων (bp)
  - Τμήματα μικρότερα από 75 bp δεν μπορούν να διακριθούν από τα διμερή των εκκινητών (primer dimers)
  - Τμήματα μεγαλύτερα των 3000 bp απαιτούν ειδικά πρωτόκολλα πολλαπλασιασμού
- Αποφεύγουμε τις περιοχές με >4 επαναλήψεις βάσεων
- Επιλέγουμε περιοχές με περιεκτικότητα σε GC 50-60%.

# Στόχοι μεγάλου μοριακού μεγέθους ( $\geq 3000$ bp)

- Όσο μεγαλύτερο το μοριακό μέγεθος της αλληλουχίας-στόχου, τόσο αυξάνεται ο χρόνος πολλαπλασιασμού
- Αυξημένη πιθανότητα ενσωμάτωσης λανθασμένου νουκλεοτιδίου → πολυμεράση με ικανότητα διόρθωσης (proofreading)
  - Η Taq πολυμεράση ενσωματώνει ένα λάθος νουκλεοτίδιο κάθε 9000 (δηλαδή 1 κάθε 400 μετά από 30 κύκλους).
- Η έκθεση της μήτρας DNA σε υψηλή θερμοκρασία για μεγάλο χρονικό διάστημα επηρεάζει την ποιότητα του DNA
  - Ελάττωση του χρόνου αποδιάταξης σε 10 sec
- Αυξημένη τάση σχηματισμού δευτεροταγών μορφών
  - Προσθήκη dimethyl sulfoxide (DMSO)

# Σκοπός εφαρμογής της μεθόδου

- Ανίχνευση «ειδικού» στόχου
  - Αναζήτηση ενός γονιδίου αντοχής → ο στόχος είναι ολόκληρη ή μέρος της αλληλουχίας του συγκεκριμένου γονιδίου
- Ανίχνευση ευρέος φάσματος στόχων
  - Αναζήτηση βακτηριακού DNA σε κλινικό δείγμα → επιλογή αλληλουχίας-στόχου συντηρημένης μεταξύ των βακτηρίων (16S rRNA)
- Τυποποίηση βακτηριακών στελεχών
  - Χαρακτηρισμός κάτω από το επίπεδο είδους
  - Διερεύνηση επιδημιών



# Ταυτόχρονη ενίσχυση πολλών στόχων (πολυπλεκτική PCR)

- Επιλέγουμε αλληλουχίες χωρίς μεγάλη ομολογία μεταξύ τους
- Οι αλληλουχίες-στόχοι πρέπει να έχουν διαφορετικό μοριακό μέγεθος, ώστε να μπορούν να διαχωριστούν
- Οι εκκινητές πρέπει να μπορούν να υβριδοποιηθούν στο στόχο στην ίδια θερμοκρασία

## Laboratory Detection of *Enterobacteriaceae* That Produce Carbapenemases

J Clin Microbiol. 2012 Dec;50(12):3877-80

Diana Doyle,<sup>a</sup> Gisele Peirano,<sup>a,b</sup> Christine Lascols,<sup>d</sup> Tracie Lloyd,<sup>a</sup> Deirdre L. Church,<sup>a,b</sup> and Johann D. D. Pitout<sup>a,b,c</sup>

TABLE 1 Primers for the detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases

Carbapenemase gene	Amplicon size (bp)	Primer sequences <sup>a</sup>	Reference
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	900	5'-TGTCACTGTATCGCCGTC-3' 5'-CTCAGTGCCTACAGAAAACC-3'	19
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	587	5'-GAAGGCGTTTATGTTTCATAC-3' 5'-GTACGTTTCAAGAGTGATGC-3'	15
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	389	5'-GTTTGGTCGCATATCGCAAC-3' 5'-AATGCGCAGCACCAGGATAG-3'	15
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	782	5'-GCAGCTTGTCCGCCATGCGGGC-3' 5'-GGTCGCGAAGCTGAGCACCCGCAT-3'	12
<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	438	5'-GCGTGGTTAAGGATGAACAC-3' 5'-CATCAAGTTCAACCCAACCG-3'	17

<sup>a</sup> The first and second primers for each gene are forward and reverse primers, respectively.

# Επιλογή μεθόδου ανίχνευσης

Σκοπός εφαρμογής όλων των διαγνωστικών μεθόδων είναι η βελτίωση της περίθαλψης του ασθενούς

# Κριτήρια επιλογής μεθόδου ανίνευσης

- Αξιοπιστία
  - Υψηλή ευαισθησία
  - Υψηλή ειδικότητα
  - Ευκολία εφαρμογής
- Σύντομος χρόνος λήψης αποτελέσματος
- Χαμηλό κόστος
  - Μια ακριβή μέθοδος είναι πιθανό να ελαττώνει το χρόνο νοσηλείας, με αποτέλεσμα την ελάττωση του συνολικού κόστους περίθαλψης

**Το πρώτο βήμα για την επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου είναι η ενδεδειγμένη βιβλιογραφική αναζήτηση**

# **Μέθοδοι πολλαπλασιασμού**

# Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

- Επαναλαμβανόμενοι κύκλοι ενίσχυσης επιλεγμένων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων
- Η πιο διαδεδομένη μέθοδος πολλαπλασιασμού στόχου
- Εμπορικά kit vs. in house PCR
- Ευέλικτη μέθοδος
  - Πολλές παραλλαγές
  - Εφαρμογές σε ευρύτατο φάσμα διαγνωστικών εξετάσεων
- Ανίχνευση γενετικού υλικού και όχι ζώντων μικροοργανισμών
- Ανίχνευση προϊόντος τελικού σημείου

# PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR, qPCR)

- Σύντομος χρόνος λήψης αποτελέσματος
- Πολλαπλασιασμός και ανίχνευση προϊόντος στο ίδιο κλειστό σωληνάριο
- Το προϊόν πολλαπλασιασμού ανιχνεύεται σε πραγματικό χρόνο με χρήση φθορίζουσας ουσίας
- Ποσοτικοποίηση DNA
  - Αναλογία αρχικού αριθμού αντιγράφων στόχου με τον πρώτο κύκλο που το προϊόν ενίσχυσης είναι ανιχνεύσιμο

# Real-Time PCR

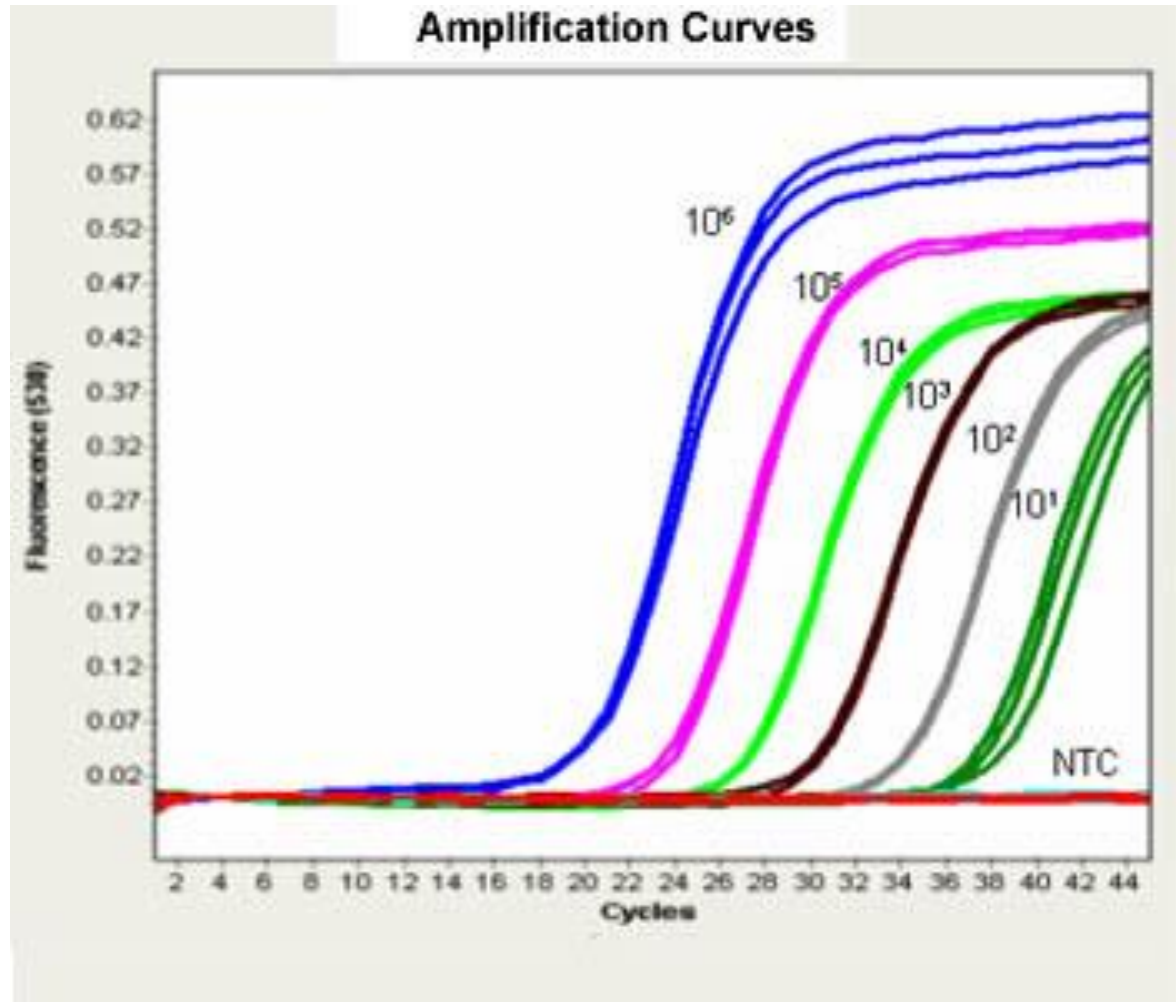
- Διαδικασία:
  - Απομόνωση γενετικού υλικού (ενσωματωμένη στο σύστημα ή ανεξάρτητη)
  - Πολλαπλασιασμός στόχου
  - Ανίχνευση στόχου
- Ανίχνευση παθογόνων απ'ευθείας από κλινικό δείγμα
- Ανίχνευση παθογόνων από θετική καλλιέργεια
- Ειδικοί (species-specific) ή γενικοί (βακτηριακό rRNA) στόχοι
- Συνδυάζεται με άλλες τεχνικές για την ανίχνευση του στόχου
  - Ανοσοανίχνευση
  - Φθορισμός
  - Μικροσυστοιχίες

# Real-Time PCR

- Πλεονεκτήματα:
  - Ταχύτητα (εξαρτάται από το σύστημα)
  - Ποσοτικοποίηση παθογόνων
  - Δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης γονιδίων αντοχής
- Μειονεκτήματα
  - Ανίχνευση γενετικού υλικού και όχι ζώντων μικροοργανισμών
  - Επιμολύνσεις/αναστολές αντίδρασης
  - Μέθοδοι που χρησιμοποιούν γενικούς στόχους: Χαμηλότερη ευαισθησία
  - Εξειδικευμένο προσωπικό (ταχύτητα?)
  - Υψηλό κόστος



# Ποσοτικοποίηση



Φθορισμός σε σχέση με τον αριθμό αντιγράφων στο αρχικό δείγμα

# Σύστημα συνδρομικής διάγνωσης FilmArray (BioFire)

- Εφαρμογή απ' ευθείας στο κλινικό δείγμα
- Εύκολο στη χρήση, πλήρως αυτοματοποιημένο σύστημα
  - Hands-on time ~ 2min
- Ταχεία ανίχνευση πολλαπλών στόχων
  - Χρόνος λήψης αποτελέσματος ~ 1 ώρα
- Υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα



# Μεθοδολογία

## Συνδιασμός πολυπλεκτικής, εμφωλιασμένης PCR πραγματικού χρόνου και μικροσυστοιχιών

---

- Πολυπλεκτική PCR: Ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών στόχων
  - PCR πραγματικού χρόνου: Ταυτόχρονος πολλαπλασιασμός και ανίχνευση του στόχου
- ↓

## Ταχεία ανίχνευση

---

- Εμφωλιασμένη (nested) PCR: Κάθε στόχος ανιχνεύεται με χρήση δύο ζευγών εκκινητών, σε δύο επάλληλες PCR
  - Μικροσυστοιχίες (microarrays): Ανίχνευση με ιχνηθέτες
- ↓

**Υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα**