



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

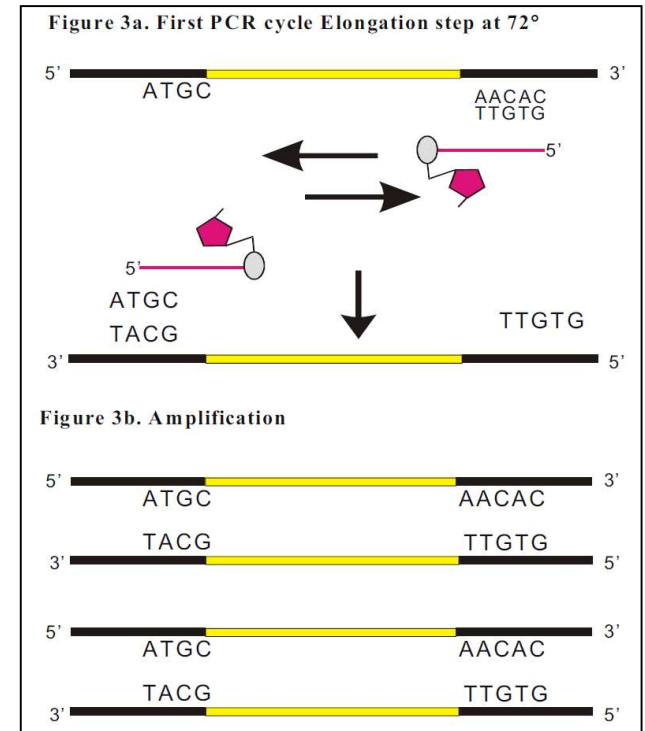
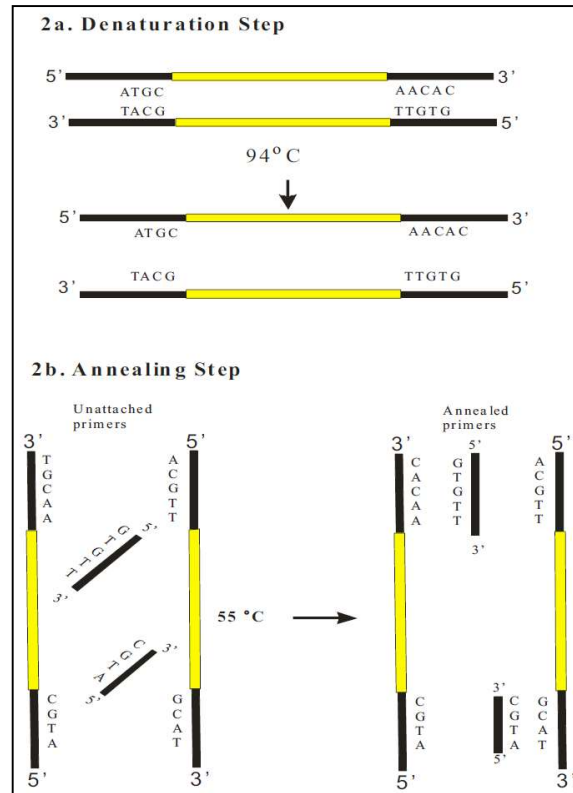
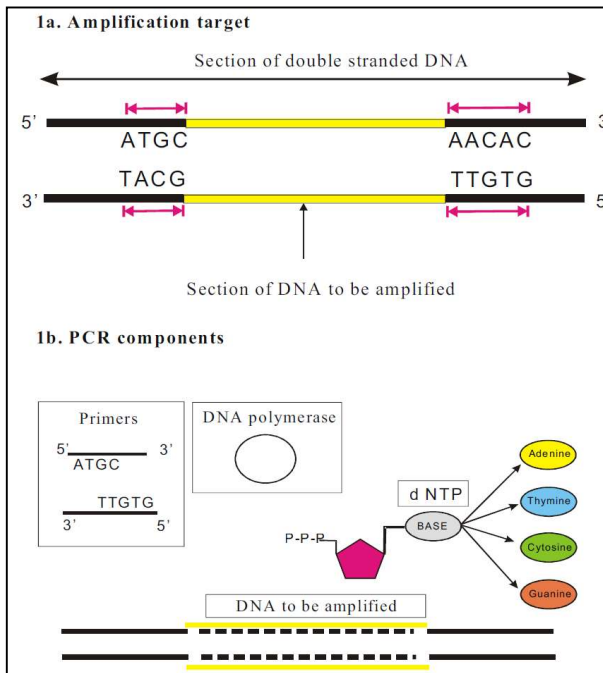
Πτώση της θερμοκρασίας ($\sim 50^{\circ}\text{C}$) → Οι εκκινητές προσκολλώνται στα μονόκλινα μόρια DNA.

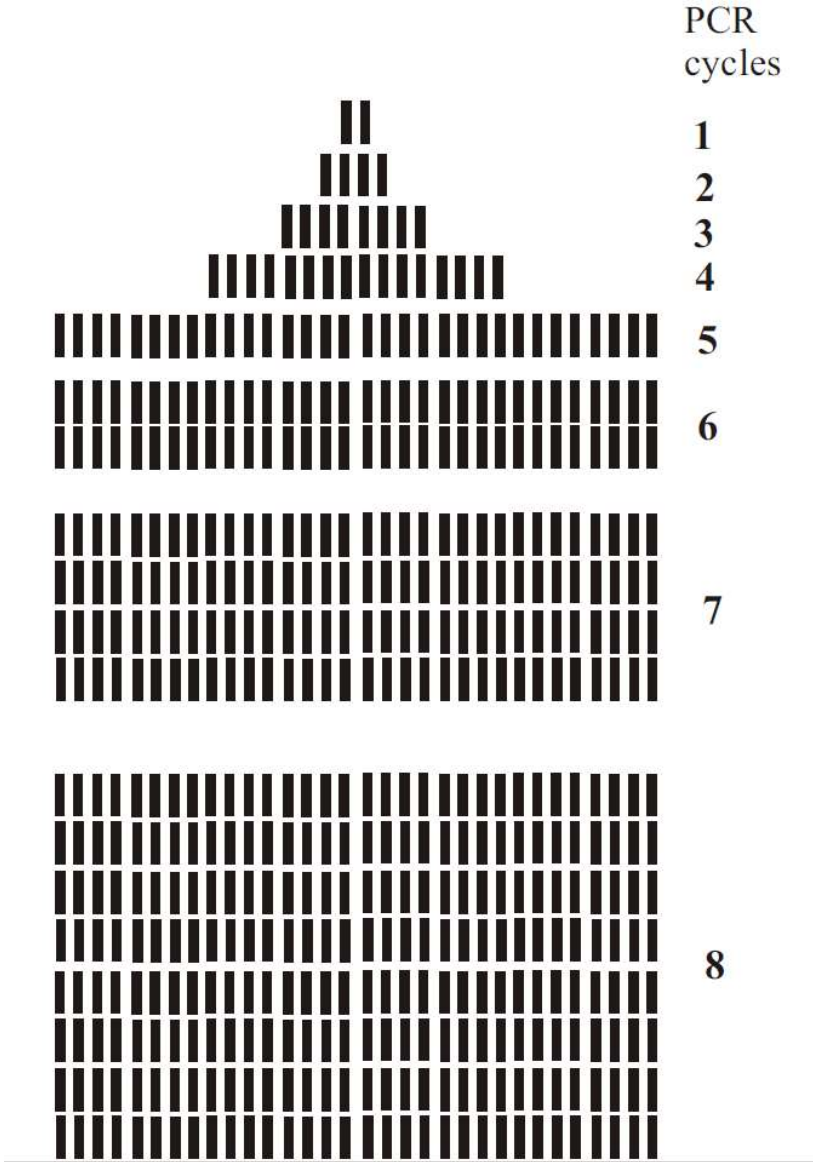
3) Επιμήκυνση

Θέρμανση στους 72°C → Αντιγραφή κάθε κλώνου παρουσία θερμοανθεκτικής πολυμεράσης (Taq DNA polymerase), δεοξυριβονουκλεοτιδίων, ρυθμιστικού διαλύματος και μαγνησίου (Mg^{2+})

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

PCR





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.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 (≥ 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 00 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

Basic Local Alignment Search Tool

BLAST finds regions of similarity between biological sequences. The program compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance.

[Learn more](#)

Introducing: Magic-BLAST

NEWS

Magic-BLAST is a new tool for mapping large sets of next-generation RNA or DNA sequencing runs against a whole genome or transcriptome.

Wed, 24 Aug 2016 11:00:00 EST

[More BLAST news...](#)

Web BLAST



Nucleotide BLAST
nucleotide ▶ nucleotide

Nucleotide BLAST



blastx
translated nucleotide ▶ protein



tblastn
protein ▶ translated nucleotide



Protein BLAST
protein ▶ protein

BLAST Genomes

Enter organism common name, scientific name, or tax.id

Search

[Human](#)

[Mouse](#)

[Rat](#)

[Microbes](#)

Standalone and API BLAST



Download BLAST

Get BLAST databases and executables



Use BLAST API

Call BLAST from your application



Use BLAST in the cloud

Start an instance at a cloud provider

BLAST® >> blastn suite

blastn **blastp** **blastx** **tblastn** **tblastx** BLASTN programs selected

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [Clear](#) [Query subrange](#)

X72700 From
To

Or, upload file Δεν επιλέχθηκε κανένα αρχείο. [Help](#)

Job Title
Enter a descriptive title for your BLAST search [Help](#)

Align two or more sequences [Help](#)

Choose Search Set

Database Human genomic + transcript Mouse genomic + transcript Others (nr etc.):
Nucleotide collection (nr/nt) [Help](#)

Organism [Optional](#)
Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown [Help](#) Exclude [+](#)

Exclude [Optional](#) Models (XM/XP) Uncultured/environmental sample sequences

Limit to [Optional](#) Sequences from type material

Entrez Query [Optional \[YouTube\]\(#\) \[Create custom database\]\(#\)
Enter an Entrez query to limit search \[Help\]\(#\)](#)

Program Selection

Optimize for Highly similar sequences (megablast)
 More dissimilar sequences (discontiguous megablast)
 Somewhat similar sequences (blastn)
Choose a BLAST algorithm [Help](#)

BLAST Search database **Nucleotide collection (nr/nt)** using **Megablast (Optimize for highly similar sequences)**
 Show results in a new window

[+ Algorithm parameters](#)

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,^a Gisele Peirano,^{a,b} Christine Lascols,^d Tracie Lloyd,^a Deirdre L. Church,^{a,b} and Johann D. D. Pitout^{a,b,c}

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

Carbapenemase gene	Amplicon size (bp)	Primer sequences ^a	Reference
<i>bla</i> _{KPC}	900	5'-TGTCACGTGATCGCCGTC-3' 5'-CTCAGTGCCTACAGAAAACC-3'	19
<i>bla</i> _{IMP}	587	5'-GAAGGCGTTTATGTTTACATAC-3' 5'-GTACGTTTCAAGAGTGATGC-3'	15
<i>bla</i> _{VIM}	389	5'-GTTTGGTCGCATATCGCAAC-3' 5'-AATGCCGAGCACCAGGATAG-3'	15
<i>bla</i> _{NDM}	782	5'-GCAGCTTGTCCGCCATGCGGGC-3' 5'-GGTCGCGAAGCTGAGCACCCGCAT-3'	12
<i>bla</i> _{OXA-48-like}	438	5'-GCGTGGTTAAGGATGAACAC-3' 5'-CATCAAGTTCAACCCAACCG-3'	17

^a The first and second primers for each gene are forward and reverse primers, respectively.

Επιλογή στόχου ↔ επιλογή μεθόδου

- Όλοι οι στόχοι δεν είναι κατάλληλοι για όλες τις μεθοδολογίες
 - Γνωρίζουμε την ακριβή νουκλεοτιδική αλληλουχία του στόχου μας;
 - Θέλουμε να ανιχνεύσουμε στόχο που μπορεί να έχει σημειακές μεταλλαγές;
 - RNA στόχοι

RNA στόχοι

- Το RNA δεν αυτοδιπλασιάζεται
 - Μετατροπή σε cDNA μέσω της αντίστροφης μεταγραφάσης
- Πιο ευαίσθητο μόριο, πιο ευάλωτο σε ενζυμικές «επιθέσεις»
 - Δυσκολότερη απομόνωση

RNA στόχοι

- Ανίχνευση RNA ιών
- Ανίχνευση ζώντων μικροοργανισμών
 - Αποτελεσματικότητα θεραπείας
- Ανίχνευση έκφρασης γονιδίων
- Ποσοτικοποίηση έκφρασης
 - Αλλαγές στην έκφραση

Επιλογή μεθόδου ανίχνευσης

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

Κριτήρια επιλογής μεθόδου ανίχνευσης

- 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 ενδελεχής βιβλιογραφική αναζήτηση

Ορισμοί

- Ευασθησία (sensitivity): η πιθανότητα σωστής θετικής διάγνωσης της ασθένειας
- Ειδικότητα (specificity): η πιθανότητα σωστής αρνητικής διάγνωσης της ασθένειας
- Θετική προγνωστική αξία (PPV): η πιθανότητα όταν το τεστ είναι θετικό το υποκείμενο να είναι πράγματι ασθενής
- Αρνητική προγνωστική αξία (NPV): η πιθανότητα όταν το τεστ είναι αρνητικό, το υποκείμενο να είναι υγιές

Η διαγνωστική αξία μιας μεθόδου εξαρτάται από την ευαισθησία και την ειδικότητα, αλλά και από τον επιπολασμό της νόσου στον πληθυσμό που εξετάζουμε

		Predicted condition			
		Predicted Condition positive	Predicted Condition negative		
Total population				Prevalence = $\frac{\Sigma \text{Condition positive}}{\Sigma \text{Total population}}$	
True condition	condition positive	True positive	False Negative (Type II error)	True positive rate (TPR), Sensitivity, Recall = $\frac{\Sigma \text{True positive}}{\Sigma \text{Condition positive}}$	False negative rate (FNR), Miss rate = $\frac{\Sigma \text{False negative}}{\Sigma \text{Condition positive}}$
	condition negative	False Positive (Type I error)	True negative	False positive rate (FPR), Fall-out = $\frac{\Sigma \text{False positive}}{\Sigma \text{Condition negative}}$	True negative rate (TNR), Specificity (SPC) = $\frac{\Sigma \text{True negative}}{\Sigma \text{Condition negative}}$
Accuracy (ACC) = $\frac{\Sigma \text{True positive} + \Sigma \text{True negative}}{\Sigma \text{Total population}}$		Positive predictive value (PPV), Precision = $\frac{\Sigma \text{True positive}}{\Sigma \text{Test outcome positive}}$	False omission rate (FOR) = $\frac{\Sigma \text{False negative}}{\Sigma \text{Test outcome negative}}$	Positive likelihood ratio (LR+) = $\frac{\text{TPR}}{\text{FPR}}$	Diagnostic odds ratio (DOR) = $\frac{\text{LR+}}{\text{LR-}}$
		False discovery rate (FDR) = $\frac{\Sigma \text{False positive}}{\Sigma \text{Test outcome positive}}$	Negative predictive value (NPV) = $\frac{\Sigma \text{True negative}}{\Sigma \text{Test outcome negative}}$	Negative likelihood ratio (LR-) = $\frac{\text{FNR}}{\text{TNR}}$	

Η διαγνωστική αξία μιας μεθόδου εξαρτάται από την ευαισθησία και την ειδικότητα, αλλά και από τον επιπολασμό της νόσου στον πληθυσμό που εξετάζουμε

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

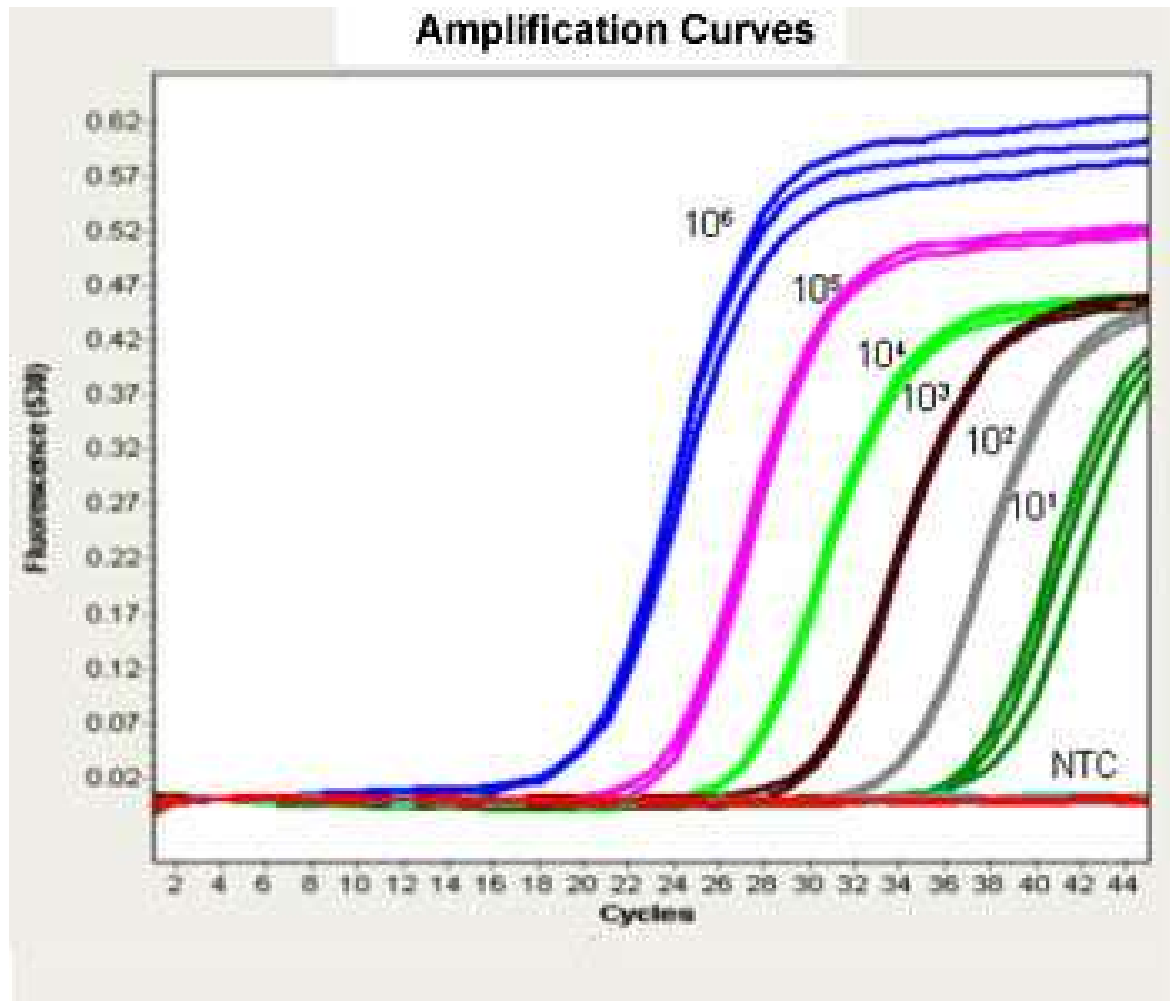
Real-Time PCR

- 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

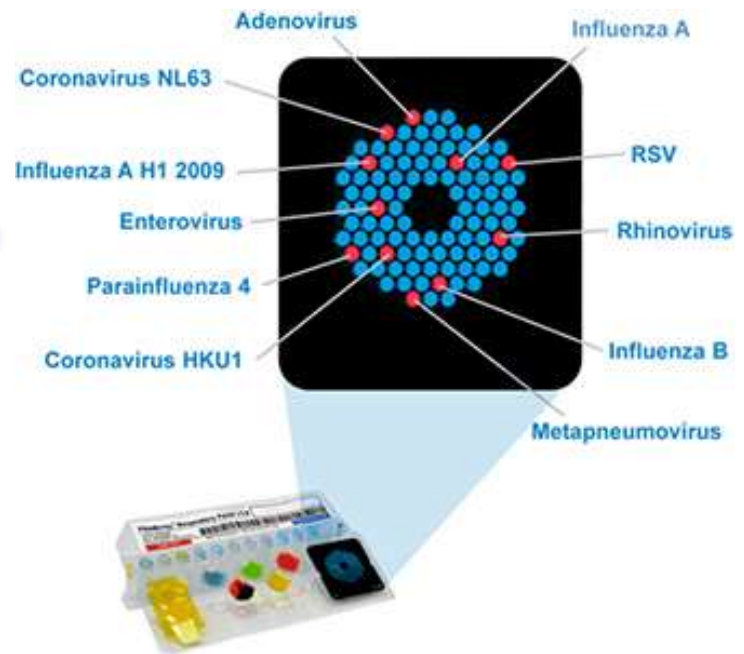
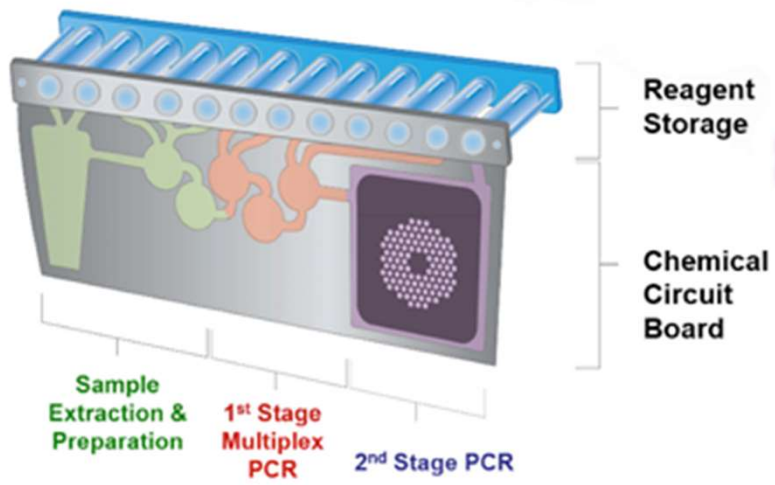
Συνδιασμός πολυπλεκτικής, εμφωλεασμένης PCR πραγματικού χρόνου και μικροσυστοιχιών

- 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



Διαθέσιμα πάνελ

Respiratory panel

20 targets: 17 viruses, 3 bacteria

BCID panel

27 targets: 19 bacteria, 5 fungi, 3 resistances

Gastro Intestinal
panel

22 targets: 13 bacteria, 4 parasites, 5 viruses

Meningitis
Encephalitis panel

16 targets: 6 bacteria, 8 viruses, 2 fungi

Blood Culture ID Panel

Κλινικό δείγμα: θετική αιμοκαλλιέργεια

Gram + Bacteria:

Enterococcus spp.

L. monocytogenes

Staphylococcus

S. aureus

Streptococcus spp.

S. agalactiae (Group B)

S. pyogenes (Group A)

S. pneumoniae

Antibiotic Resistance:

mecA

Van A/B

KPC

Gram - Bacteria :

A. baumannii

Enterobacteriaceae

Enterobacter cloacae
Complex

E. coli

H. influenzae

K. oxytoca

K. pneumoniae

N. meningitidis

P. aeruginosa

Proteus

S. marcescens

Fungi:

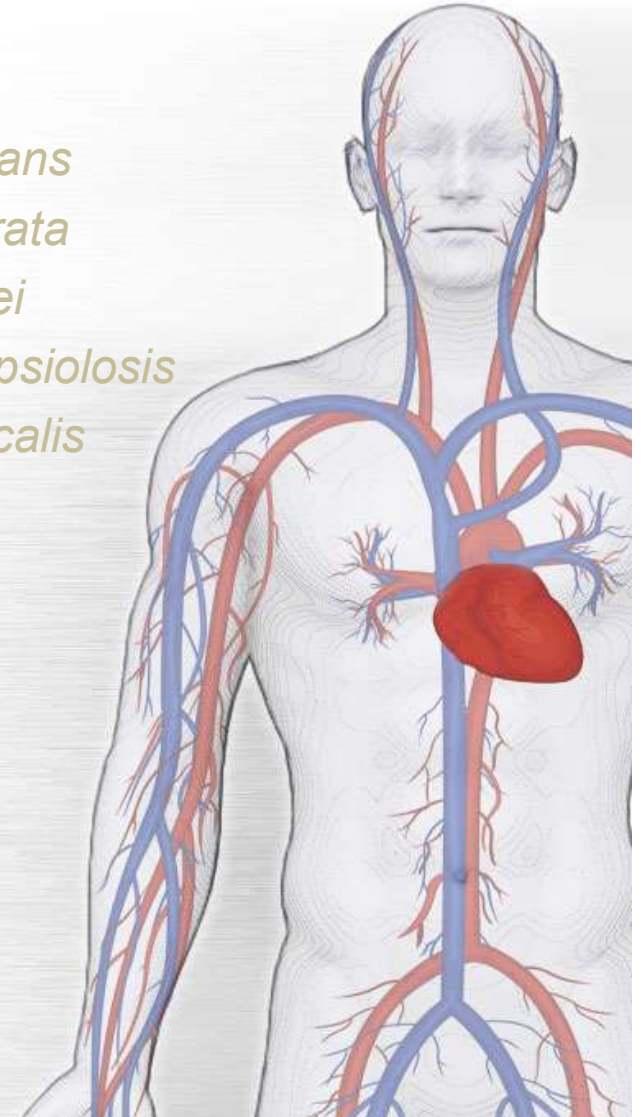
C. albicans

C. glabrata

C. krusei

C. parapsilosis

C. tropicalis



Meningitis / Encephalitis

Κλινικό δείγμα: ENY

Bacteria:

E. coli

H. influenzae

L. monocytogenes

N. meningitidis

S. agalactiae

S. pneumoniae

Fungi:

Cryptococcus

neoformans / gattii

Viruses:

Cytomegalovirus (CMV)

Enterovirus

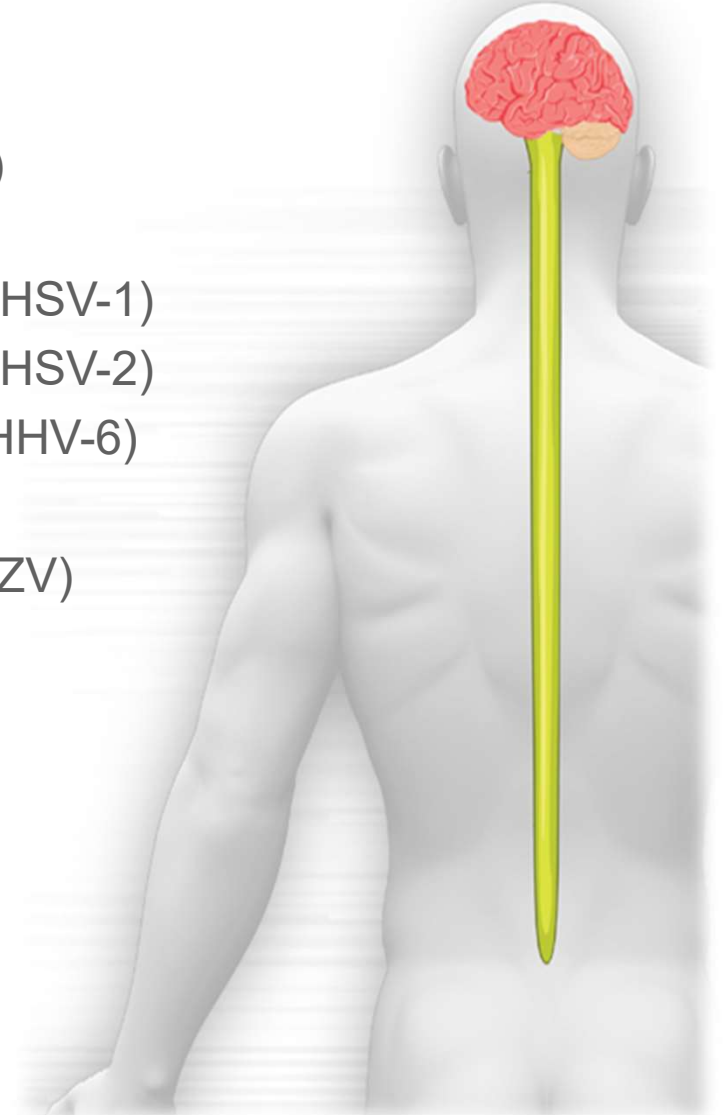
Herpes simplex type 1 (HSV-1)

Herpes simplex type 2 (HSV-2)

Human herpesvirus 6 (HHV-6)

Parechovirus

Varicella zoster virus (VZV)



Respiratory Panel

**Κλινικό δείγμα: Ρινοφαρυγγικό επίχρισμα
(στυλεός και υλικό μεταφοράς γρίπης)**

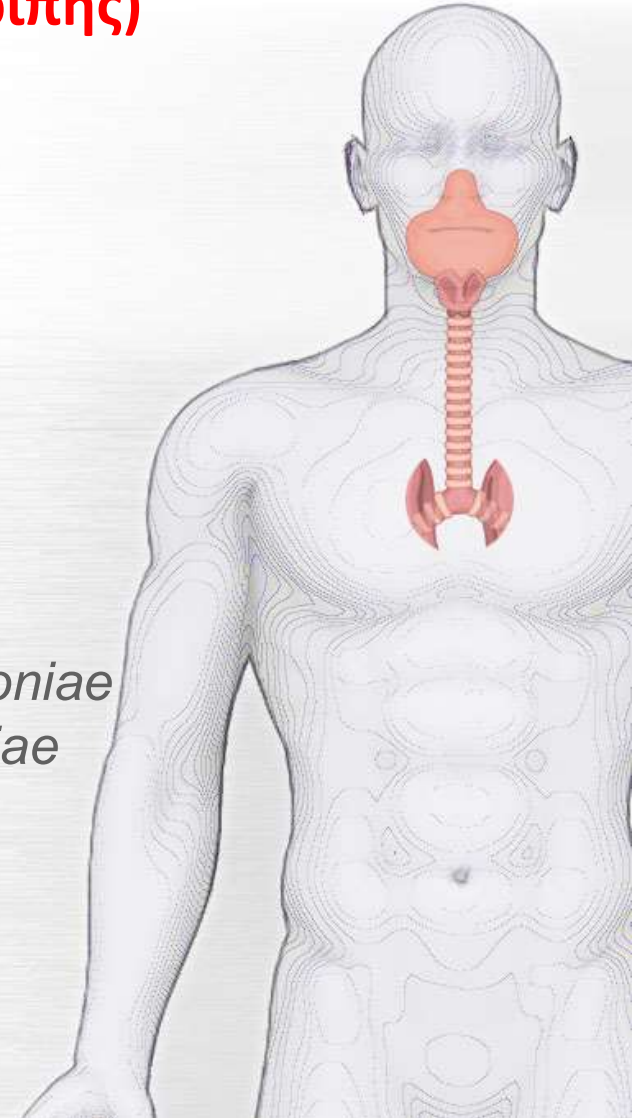
Viral

Adenovirus
Coronavirus 229E
Coronavirus HKU1
Coronavirus OC43
Coronavirus NL63
Human Metapneumovirus
Human Rhinovirus/
Enterovirus
Influenza A
Influenza A/H1
Influenza A/H1-2009
Influenza A/H3
Influenza B

Parainfluenza 1
Parainfluenza 2
Parainfluenza 3
Parainfluenza 4
RSV

Bacterial

Bordetella pertussis
Chlamydophila pneumoniae
Mycoplasma pneumoniae



Pneumonia Panel: 30 Pathogens, 7 ABR Markers (υπό ανάπτυξη)

Κλινικό δείγμα: BAL, πτύελα

Atypical Bacteria (semi-quantitative)

Acinetobacter calcoaceticus-baumannii complex

Serratia marcescens

Proteus spp.

Klebsiella pneumoniae

Enterobacter aerogenes /

Enterobacter cloacae complex

Escherichia coli

Haemophilus influenzae

Moraxella catarrhalis

Pseudomonas aeruginosa

Staphylococcus aureus

Stenotrophomonas maltophilia

Streptococcus pneumoniae

Klebsiella oxytoca

Streptococcus pyogenes

Streptococcus agalactiae

Typical Bacteria (qualitative)

Legionella pneumophila

(removed *Legionella* spp. assay)

Mycoplasma pneumoniae

Chlamydomphila pneumoniae

Viruses

Influenza A

Influenza B

Respiratory Syncytial virus

Human Rhinovirus/Enterovirus

Human Metapneumovirus

Parainfluenza virus

Adenovirus

Coronavirus

MERS-CoV

Fungi

Pneumocystis jirovecii

Aspergillus spp.

Cryptococcus spp.

ABR Markers

mecA/C – MREJ (MRSA)

KPC (Carbapenem resistance)

NDM (Carbapenem resistance)

Oxa48-like (Carbapenem resistance)

CTX-M (ESBL resistance)

VIM (Carbapenem resistance)

IMP (Carbapenem resistance)

GI Panel

Κλινικό δείγμα: κόπρανα

Bacteria:

Aeromonas
Campylobacter
Clostridium difficile (Toxin A/B)
Plesiomonas shigelloides
Salmonella
Vibrio
Vibrio cholerae
Yersinia enterocolitica

Diarrheagenic *E. coli* / *Shigella*

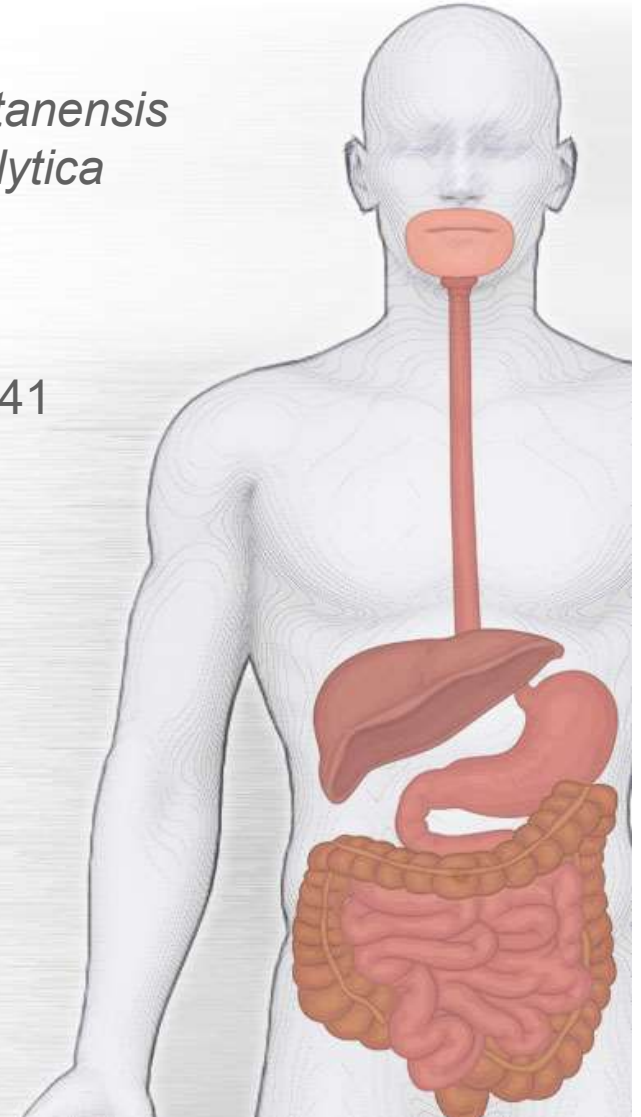
E. coli O157
Enteroaggregative *E. coli* (EAEC)
Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)
Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)
Shiga-like toxin-producing *E. coli* (STEC)
Shigella/Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

Protozoa:

Cryptosporidium
Cyclospora cayetanensis
Entamoeba histolytica
Giardia lamblia

Viruses:

Adenovirus F 40/41
Astrovirus
Norovirus GI/GII
Rotavirus A
Sapovirus



Αποτελέσματα



 FilmArray® Respiratory Panel	 BIO FIRE
www.BioFireDx.com	

Run Summary	
Sample ID: RYNAND0232	Run Date: 21 Jun 2013 7:34 PM
Detected: Influenza A H1-2009 Respiratory Syncytial Virus	Controls: Passed
Equivocal: None	

Result Summary	
Not Detected	Adenovirus
Not Detected	Coronavirus 229E
Not Detected	Coronavirus HKU1
Not Detected	Coronavirus NL63
Not Detected	Coronavirus OC43
Not Detected	Human Metapneumovirus
Not Detected	Human Rhinovirus/Enterovirus
✓ Detected	Influenza A H1-2009
Not Detected	Influenza B
Not Detected	Parainfluenza Virus 1
Not Detected	Parainfluenza Virus 2
Not Detected	Parainfluenza Virus 3
Not Detected	Parainfluenza Virus 4
✓ Detected	Respiratory Syncytial Virus
Not Detected	<i>Bordetella pertussis</i>
Not Detected	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>
Not Detected	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>

Run Details	
Pouch: Respiratory Panel v1.7	Protocol: NPS v2.0
Run Status: Completed	Operator: KMRAP
Serial No.: 00345787z	Instrument: ITI FA "FA2004"
Lot No.: 114612	

Αποτελέσματα

			
www.BioFireDx.com			
Run Summary			
Sample ID:	SDY_9621_LED_50_6	Run Date:	29 May 2013 3:41 PM
Organisms Detected:	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Controls:	Passed
Applicable Antimicrobial Resistance Genes:	KPC - Detected		
Result Summary - Interpretations			
Antimicrobial Resistance Genes			
✓ Detected	KPC (carbapenem-resistance gene)		
⊗ N/A	<i>mecA</i> (methicillin-resistance gene)		
⊗ N/A	<i>vanA/B</i> (vancomycin-resistance genes)		
<p>NOTE: Antimicrobial resistance can occur via multiple mechanisms. A Not Detected result for the FilmArray antimicrobial resistance gene assays does not indicate antimicrobial susceptibility. Subculturing is required for species identification and susceptibility testing of isolates.</p>			
Gram Positive Bacteria			
Not Detected	<i>Enterococcus</i>		
Not Detected	<i>Listeria monocytogenes</i>		
Not Detected	<i>Staphylococcus</i>		
Not Detected	<i>Staphylococcus aureus</i>		
Not Detected	<i>Streptococcus</i>		
Not Detected	<i>Streptococcus agalactiae</i> (Group B)		
Not Detected	<i>Streptococcus pneumoniae</i>		
Not Detected	<i>Streptococcus pyogenes</i> (Group A)		
Gram Negative Bacteria			
Not Detected	<i>Acinetobacter baumannii</i>		
✓ Detected	<i>Enterobacteriaceae</i>		
Not Detected	<i>Enterobacter cloacae</i> complex		
Not Detected	<i>Escherichia coli</i>		
Not Detected	<i>Klebsiella oxytoca</i>		
✓ Detected	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
Not Detected	<i>Proteus</i>		
Not Detected	<i>Serratia marcescens</i>		
Not Detected	<i>Haemophilus influenzae</i>		
Not Detected	<i>Neisseria meningitidis</i>		
Not Detected	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
Yeast			
Not Detected	<i>Candida albicans</i>		
Not Detected	<i>Candida glabrata</i>		
Not Detected	<i>Candida krusei</i>		
Not Detected	<i>Candida parapsilosis</i>		
Not Detected	<i>Candida tropicalis</i>		
Run Details			
Pouch:	BCID Panel	Protocol:	BCID
Run Status:	Completed	Operator:	RJones
Serial No.:	00631374	Instrument:	FA2075
Lot No.:	125313		

LightCycler Septifast test (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)

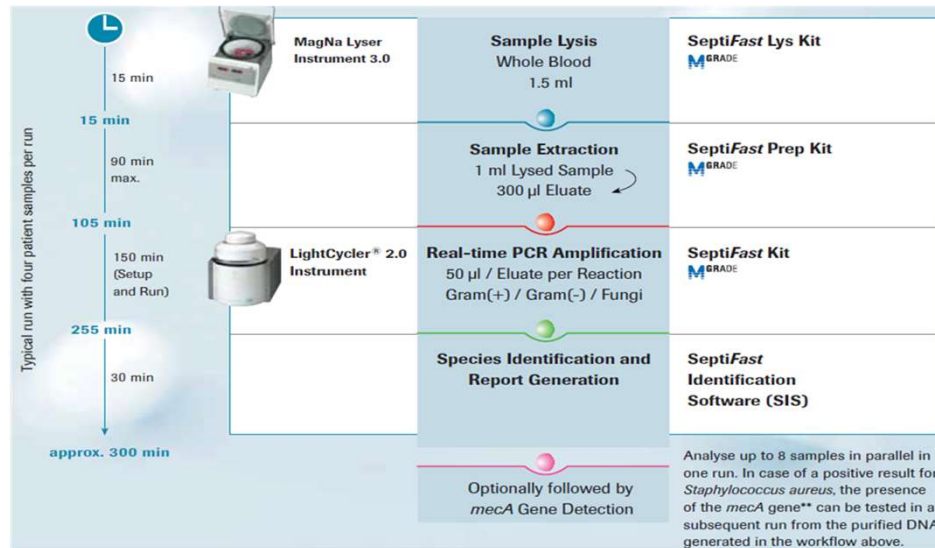


Table 1 Pathogens detectable using LightCycler® SeptiFast test

Gram-negative bacteria	Gram-positive bacteria	Fungi
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Klebsiella (pneumoniae/oxytoca)</i>	Coagulase-negative staphylococci ^a	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Enterobacter (cloacae/aerogenes)</i>	<i>Streptococcus</i> spp. ^b	<i>Candida glabrata</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		

^a Single probe detects a group of staphylococcal pathogens including *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*

^b Single probe detects a group of streptococcal pathogens including *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. mitis*

LightCycler Septifast test (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)

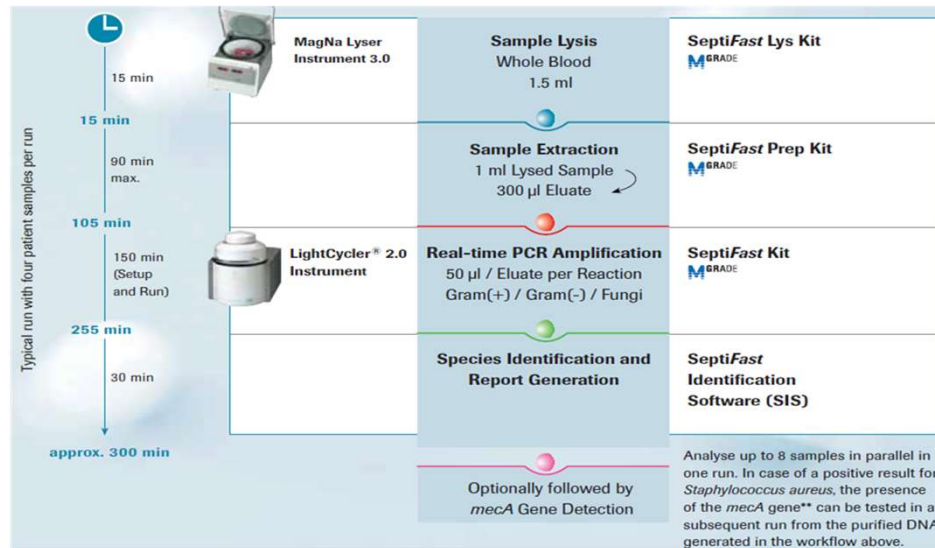


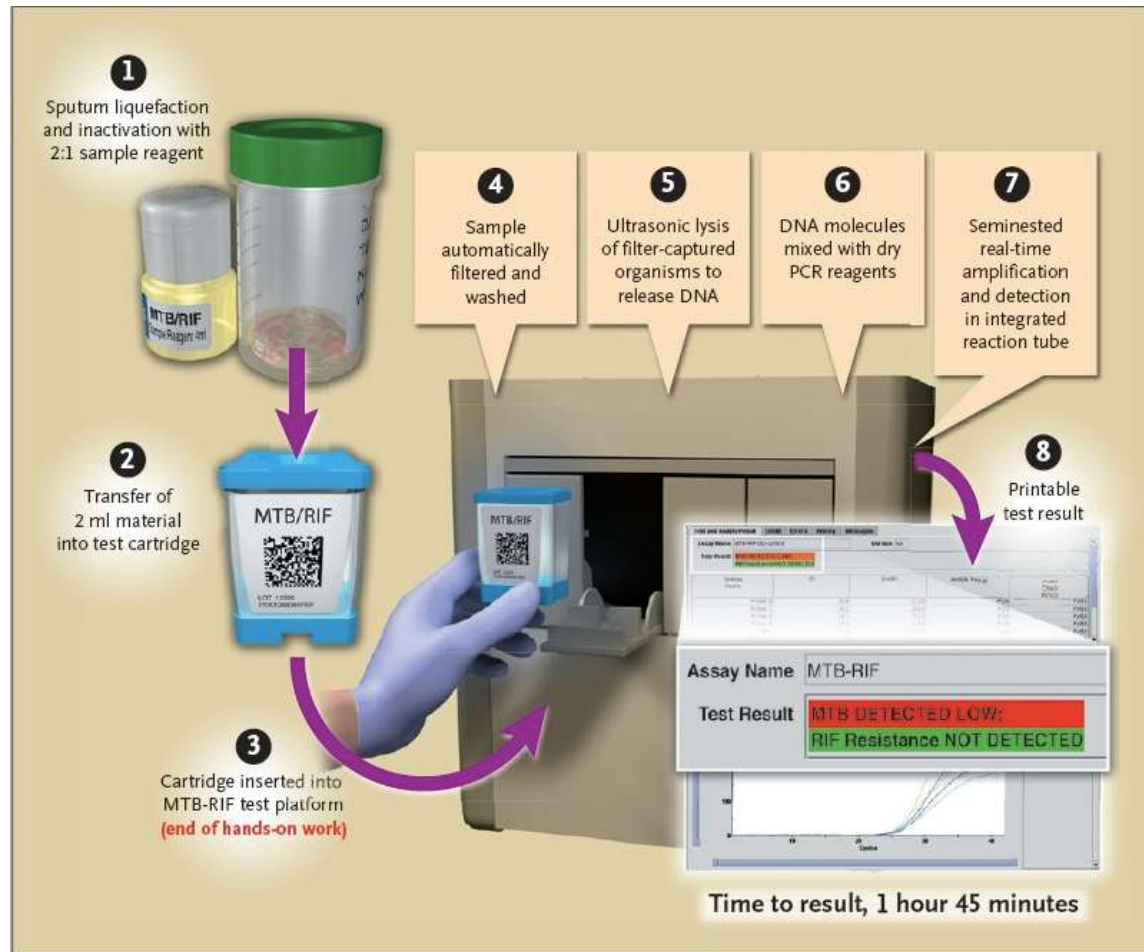
Table 1 Pathogens detectable using LightCycler® SeptiFast test

Gram-negative bacteria	Gram-positive bacteria	Fungi
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Klebsiella (pneumoniae/oxytoca)</i>	Coagulase-negative staphylococci ^a	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Enterobacter (cloacae/aerogenes)</i>	<i>Streptococcus</i> spp. ^b	<i>Candida glabrata</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		

^a Single probe detects a group of staphylococcal pathogens including *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*

^b Single probe detects a group of streptococcal pathogens including *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. mitis*

Σύστημα Cepheid GeneXpert



PCR με αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcriptase, RT PCR)

- Πολλαπλασιασμός RNA στόχου
- Το RNA μετατρέπεται σε cDNA με αντίστροφη μεταγραφάση
- Το cDNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την Taq-πολυμεράση και με δύο ειδικούς PCR εκκινητές δημιουργείται το δίκλωνο cDNA
- Το δίκλωνο cDNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την συνήθη τεχνική της PCR

PCR με αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcriptase, RT PCR)

- Ανίχνευση ζώντων μικροοργανισμών
- Ποσοτικοποίηση έκφρασης γονιδίων
- Ανίχνευση RNA ιών

Ασύμμετρη PCR

- Παραγωγή μονόκλωνου DNA με τη χρήση άνισων (ασύμμετρων) συγκεντρώσεων των δύο εκκινητών
- Χρησιμοποιείται για DNA-sequencing
- Στους πρώτους κύκλους παράγεται δίκλωνο DNA
- Σταδιακά ο μικρής συγκέντρωσης εκκινητής εξαντλείται και παράγεται πλεόνασμα της μιας αλυσίδας

Nested (επάλληλη) PCR

- Δύο φάσεις πολλαπλασιασμού:
 - 1^η φάση: Πολλαπλασιασμός του στόχου με ένα ζεύγος εκκινητών
 - 2^η φάση: Χρησιμοποίηση του προϊόντος της 1^{ης} φάσης για την ενίσχυση ενός μικρότερου στόχου, εσωτερικού του πρώτου, με δεύτερο ζεύγος εκκινητών
- Κατάλληλη για πολλαπλασιασμό μικρών ποσοτήτων στόχου
- Υψηλή ειδικότητα
- Μεγάλη πιθανότητα επιμόλυνσης

Πολυπλεκτική (multiplex) PCR

- Ταυτόχρονη ανίχνευση περισσότερων του ενός στόχων
 - Χρήση 2 ή περισσότερων ζευγών εκκινητών
 - Προσεκτικός σχεδιασμός εκκινητών (παρόμοιες θερμοκρασίες τήξης)
 - Το μοριακό μέγεθος των προϊόντων πρέπει να διαφέρει έτσι ώστε να διακρίνεται

PCR ευρέος φάσματος (broad-spectrum PCR)

- Πολλαπλασιασμός συντηρημένων περιοχών του γονιδιώματος (π.χ. 16S rRNA, nuclear ribosomal ITS region μυκήτων)
- Ανίχνευση μεγάλου εύρους μικροοργανισμών
 - Χαρακτηρισμός νέων ειδών
 - Ανίχνευση απαιτητικών παθογόνων
 - Εφαρμογή απ' ευθείας σε κλινικό δείγμα (;)
- Ταυτοποίηση με αλληλούχιση του προϊόντος PCR

The Expansion of the Microbiological Spectrum of Brain Abscesses with Use of Multiple 16S Ribosomal DNA Sequencing

Mouhamad Al Masalma,¹ Fabrice Armougom,¹ W. Michael Scheld,⁴ Henri Dufour,² Pierre-Hugues Roche,³ Michel Drancourt,¹ and Didier Raoult¹

¹Pôle des Maladies Infectieuses, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille and URMITE, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 6236, Institut pour la Recherche et le Développement 198, Université de la Méditerranée, ²Service de Neurochirurgie, Hôpital de la Timone, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, and ³Service de Neurochirurgie, Hôpital Sainte-Marguerite, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Marseille, France; and ⁴Department of Internal Medicine, Division of Infectious Diseases and International Health, University of Virginia Health System, Charlottesville, Virginia

(See the editorial commentary by DiGiulio and Relman on pages 1179–81)

Background. Brain abscess is commonly treated using empirically prescribed antibiotics. Thus, a comprehensive study of bacterial organisms associated with brain abscess is essential to define the best empirical treatment for this life-threatening condition.

Methods. We prospectively compared cultures to single and multiple sequenced 16S ribosomal DNA polymerase chain reaction amplifications (by cloning and/or pyrosequencing) of cerebral abscesses in 20 patients from 2 hospitals in Marseilles, France, during the period January 2005 through December 2007.

Results. The obtained cultures identified significantly fewer types of bacteria (22 strains) than did molecular testing (72 strains; $P = .017$, by analysis of variance test). We found that a patient could exhibit as many as 16 different bacterial species in a single abscess. The obtained cultures identified 14 different species already known to cause cerebral abscess. Single sequencing performed poorly, whereas multiple sequencing identified 49 species, of which 27 had not been previously reported in brain abscess investigations and 15 were completely unknown. Interestingly, we observed 2 patients who harbored *Mycoplasma hominis* (an emerging pathogen in this situation) and 3 patients who harbored *Mycoplasma faucium*, which, to our knowledge, has never been reported in literature.

Conclusions. Molecular techniques dramatically increased the number of identified agents in cerebral abscesses. *Mycoplasma* species are common and should be detected in this situation. These findings led us to question the accuracy of the current empirical treatment of brain abscess.

RESEARCH ARTICLE

16S Ribosomal Ribonucleic Acid Gene Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of Bloodstream Infections: A Systematic Review and Meta-Analysis

Guoming Su¹✉, Zhuqing Fu²✉, Liren Hu³, Yueying Wang¹, Zuguo Zhao², Weiqing Yang¹*

Conclusion

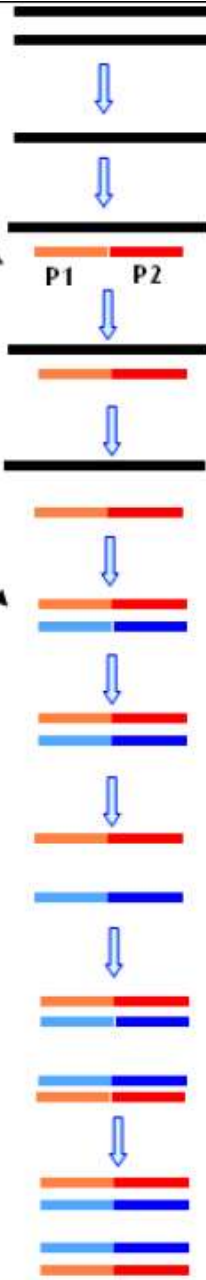
Existing data suggest that 16S rRNA gene PCR test is a **practical tool** for the rapid screening of sepsis. **Further prospective studies are needed** to assess the diagnostic value of PCR amplification and DNA microarray hybridization of 16S rRNA gene in the future.

Αλυσιδωτή αντίδραση λιγκάσης (Ligase Chain Reaction, LCR)

- DNA λιγκάση αντί πολυμεράσης
- 2 ζεύγη ολιγονουκλεοτιδίων
- Υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία
- Ιδανική για την ανίχνευση σημειακών μεταλλαγών
 - Διάκριση *L. monocytogenes* και *L. innocua*

Addition of two pairs of probes

P1 P2
P3 P4



DNA is denatured to produce single stranded target template

First probe pair hybridizes with the target in end-to-end fashion

The two probes are ligated by DNA ligase

DNA is denatured to separate the two strands

Second probe pair binds to the ligated probes

The bound probes are ligated

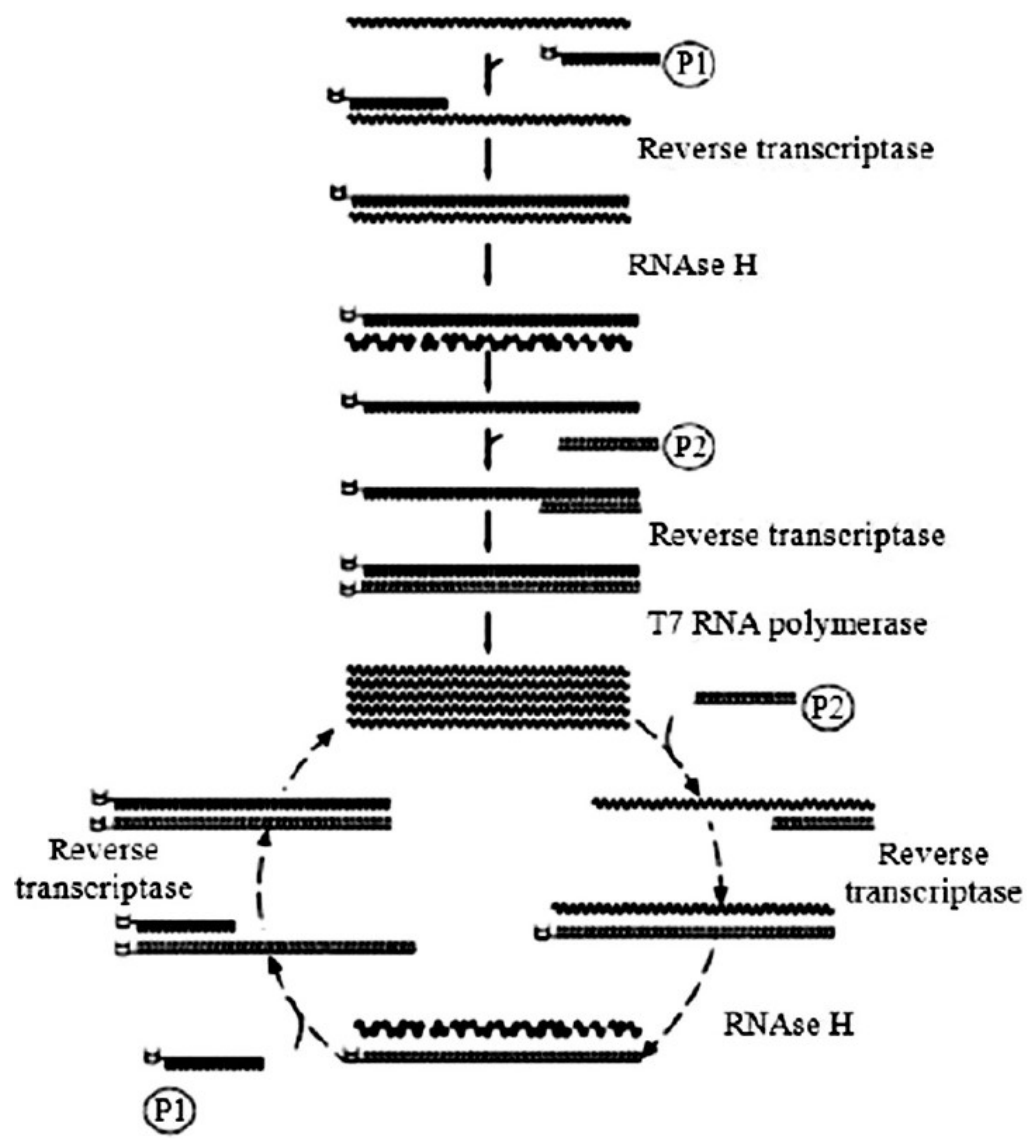
The two strands are separated by heating

Probe pairs bind to newly formed target strands

Probe pairs are ligated resulting in production of two copies

Εξαρτώμενος από την αλληλουχία πολλαπλασιασμός νουκλεϊκού οξέος (Nucleic Acid Sequence Based Amplification, NASBA)

- Ανίχνευση κυρίως RNA στόχων
- Ισοθερμική μέθοδος, δεν απαιτείται θερμοκυκλοποιητής
 - Ο πολλαπλασιασμός πραγματοποιείται στους 41° C
- Τρία ένζυμα (ανάστροφη μεταγραφάση, RNase H και T7 DNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση)
- Μεγαλύτερη απόδοση (περισσότερα αντίγραφα) από την PCR
- Ενίσχυση μέσω μεταγραφής (TMA)



Ισοθερμικός πολλαπλασιασμός μέσω βρόγχου (Loop Mediated Isothermal Amplification, LAMP)

- Ισοθερμική μέθοδος
 - 60-65° C, 45-60 min
- *Bacillus stearothermophilus* (Bst) DNA πολυμεράση
 - Αυτοκυκλική μετατόπιση αλυσίδας
- 4 ζεύγη εκκινητών
 - 2 εσωτερικοί και 2 εξωτερικοί
 - 6 διακριτές αλληλουχίες του στόχου.

Ισοθερμικός πολλαπλασιασμός μέσω βρόγχου (LAMP)

- Αύξηση συγκέντρωσης νεοσυντιθέμενου DNA
 - Σχηματίζεται πυροφωσφορικό μαγνήσιο ως παραπροϊόν
- Αύξηση θολερότητας διαλύματος
 - Παρακολούθηση της αντίδρασης μέσω θολοσίμετρου

Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification in detection of *Clostridium difficile* in stool samples: a meta-analysis

Chen Wei, Liu Wen-En, Li Yang-Ming, Luo Shan, Zhong Yi-Ming

Department of Clinical Laboratory, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, China

Submitted: 31 March 2014
Accepted: 29 June 2014

Arch Med Sci 2015; 11, 5: 927–936
DOI: 10.5114/aoms.2015.54846
Copyright © 2015 Termedia & Banach

Abstract

Introduction: *Clostridium difficile* infection (CDI) remains a diagnostic challenge for clinicians. More recently, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) has become readily available for the diagnosis of CDI, and many studies have investigated the usefulness of LAMP for rapid and accurate diagnosis of CDI. However, the overall diagnostic accuracy of LAMP for CDI remains unclear. In this meta-analysis, our aim was to establish the overall diagnostic accuracy of LAMP in detection of *Clostridium difficile* (CD) in stool samples.

Material and methods: A search was done in PubMed, MEDLINE, EMBASE and Cochrane Library databases up to February 2014 to identify published studies that evaluated the diagnostic role of LAMP for CD. Methodological quality was assessed according to the quality assessment for studies of diagnostic accuracy (QUADAS) instrument. The sensitivities (SEN), specificities (SPE), positive likelihood ratio (PLR), negative likelihood ratio (NLR) and diagnostic odds ratio (DOR) were pooled statistically using random effects models. Statistical analysis was performed by employing Meta-Disc 1.4 software. Summary receiver operating characteristic (SROC) curves were used to summarize overall test performance. Funnel plots were used to test the potential publication bias.

Result: A total of 9 studies met inclusion criteria for the present meta-analysis. The pooled SEN and SPE for diagnosing CD were 0.93 (95% CI: 0.91–0.95) and 0.98 (95% CI: 0.98–0.99), respectively. The PLR was 47.72 (95% CI: 15.10–150.82), NLR was 0.07 (95% CI: 0.04–0.14) and DOR was 745.19 (95% CI: 229.30–2421.72). The area under the ROC was 0.98. Meta-regression indicated that the total number of samples was a source of heterogeneity for LAMP in detection of CD. The funnel plots suggested no publication bias.

Conclusions: The LAMP meets the minimum desirable characteristics of a diagnostic test of SEN, SPE and other measures of accuracy in the diagnosis of CD, and it is suitable as a rapid, effective and reliable stand-alone diagnostic test for diagnosis of CDI, potentially decreasing morbidity and nosocomial spread of CD.

Key words: *Clostridium difficile*, loop-mediated isothermal amplification, meta-analysis.

Corresponding author:

Prof. Liu Wen-en MD, PhD
Department
of Clinical Laboratory
Xiangya Hospital
of Central South University
87 Xiangya Road
Changsha
Hunan 410008, China
Phone: +86 731 84327437
Fax: +86 731 84327332
E-mail: liuwenen@gmail.com

Ενίσχυση μετά από εκτόπιση αλυσίδας (Sequence Displacement Amplification, SDA)

- Ισοθερμική μέθοδος
- Πολύπλοκη τεχνική
 - Κατεργασία του δείγματος με ενδονουκλεάσες περιορισμού
 - Χρήση dATPας (α-θειο υποκατεστημένα νουκλεοτίδια)
- Ο πολλαπλασιασμός βασίζεται στην επιμήκυνση των τμημάτων περιορισμού από ειδική DNA πολυμεράση (exo-Klenow)
- Ταυτοποίηση *Mycobacterium tuberculosis* απ' ευθείας από κλινικά δείγματα.
 - Εμπορική μέθοδος BDProbeTec

Μέθοδοι ιχνηθετών

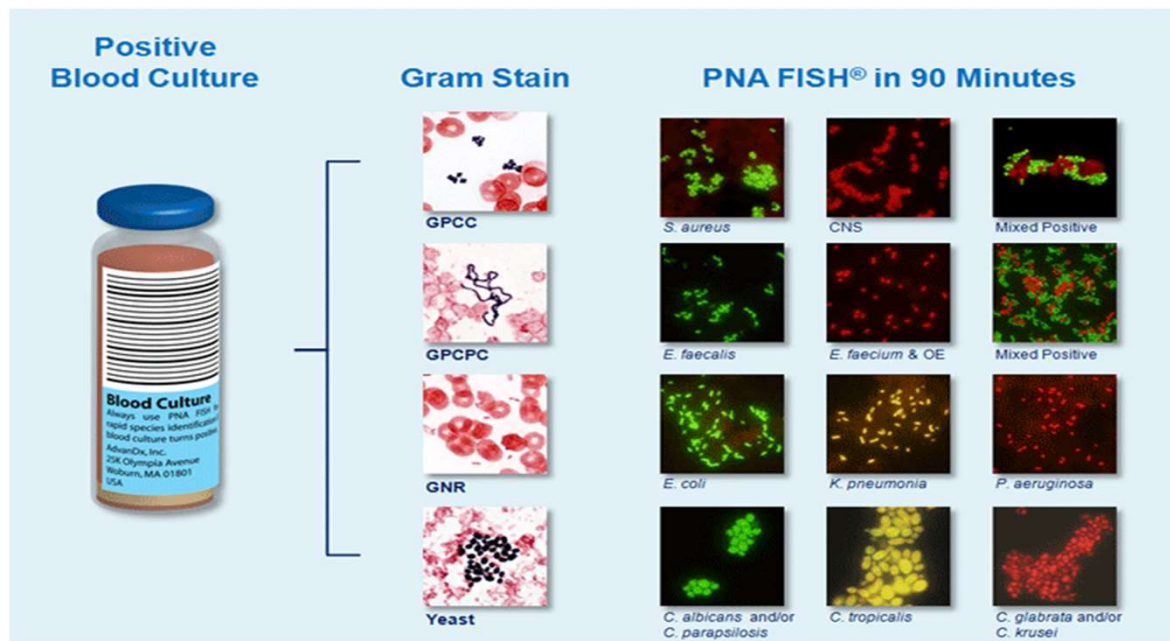
Φθορίζων εντοπισμένος υβριδισμός (Fluorescent in Situ Hybridisation, FISH)

- DNA ή RNA ιχνηθέτες σημασμένοι με φθοριοφόρο μόριο
- Εντοπισμός συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA σε κύτταρα και προσδιορισμός του αριθμού τους
 - Αναγνώριση μεταθέσεων, ελλείψεων, διπλασιασμών και ανασυνδυασμών χρωμοσωμάτων
- Μικροσκόπιο φθορισμού

PNA FISH

(Peptide Nucleic Acid Fluorescent In Situ Hybridization)

- Θετική αιμοκαλλιέργεια
- PNA ιχνηθέτες (DNA-μιμητικά πεπτίδια, με γλυκίνη αντί ριβόζης ή δεοξυριβόζης)
- Υβριδισμός με rRNA βακτηρίων και μυκήτων



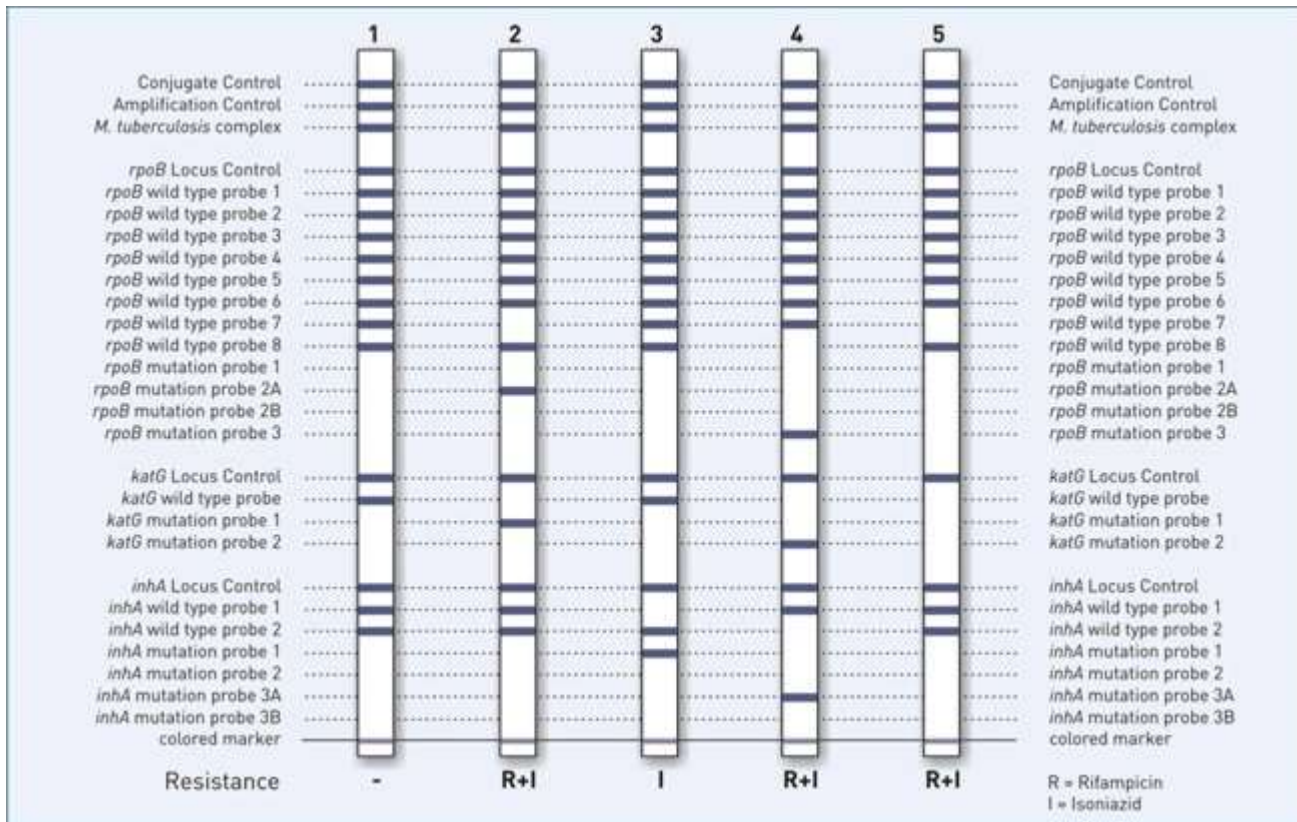
PNA FISH

- **Πλεονεκτήματα**
 - υψηλή ευαισθησία/ειδικότητα
 - μικρό κόστος
 - ευκολία χρήσης
 - μικρός χρόνος λήψης αποτελέσματος (≈ 20 λεπτά)
- **Μειονεκτήματα**
 - ανίχνευση περιορισμένου αριθμού παθογόνων
 - εξάρτηση από χρώση gram
 - δεν ανιχνεύονται μηχανισμοί αντοχής σε αντιβιοτικά

Υβριδισμός ιχνηθέτη σε ταινία (line probe assay, LiPA)

- Καθήλωση ιχνηθετών σε προκαθορισμένες θέσεις ταινίας νιτροκυτταρίνης
 - Σχηματίζονται παράλληλες εγκάρσιες γραμμές στην ταινία (δεν φαίνονται)
- Υβριδοποίηση με PCR προϊόντα σημασμένα με βιοτίνη
- Θετική αντίδραση → γίνονται εμφανείς οι γραμμές
- Ανίχνευση αντοχής *M. tuberculosis* και διαφοροποίηση μελών *M. tuberculosis* complex
 - HAIN GenoType MTBDRplus, GenoType MTBDR, GenoType MTBC

GenoType MTBDRplus

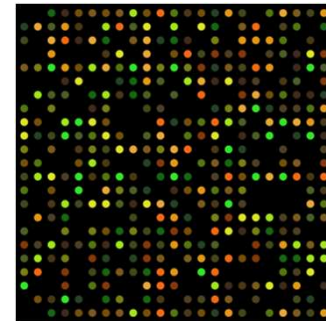


Μικροσυστοιχίες (microarrays)

- Ανίχνευση και ταυτοποίηση παθογόνων
- Ανίχνευση ειδικών χαρακτήρων (γονιδίων αντοχής, παθογονικότητας)
- Δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης πολλών στόχων
 - Η ενίσχυση των στόχων βελτιώνει την ευαισθησία

Μικροσυστοιχίες (microarrays)

- cDNA, με ιχνηθέτες μεγέθους έως μερικές χιλιάδες ζεύγη βάσεων
- Ολιγονουκλεοτιδικές συστοιχίες, με ιχνηθέτες μικρά (25–30μερή) ή μεγαλύτερα (60–70μερή) ολιγονουκλεοτίδια.
- Σήμανση συνήθως με φθορίζουσες χρωστικές
 - Ανίχνευση με μικροσκόπιο φθορισμού
 - Ανάλυση με εργαλεία βιοπληροφορικής



Φασματομετρία μάζας (mass spectrometry)

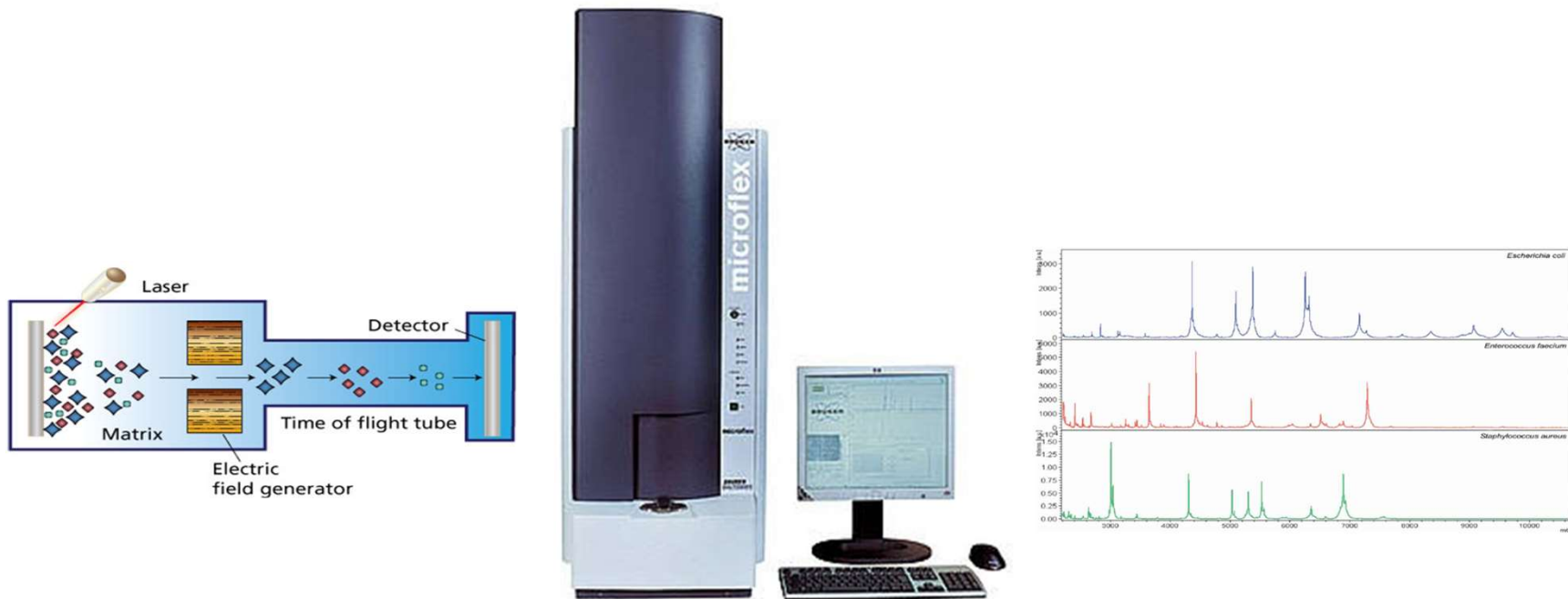
- Προσδιορισμός μάζας του δείγματος
 - Ιονισμός δείγματος
 - Διαχωρισμός ιόντων ανάλογα με τη μάζα και το φορτίο
- MALDI-TOF-MS
 - Ταυτοποίηση μεγάλου αριθμού παθογόνων
 - Ανίχνευση μηχανισμών αντοχής
 - Πολύ μικρός χρόνος λήψης αποτελέσματος (≈ 5 λεπτά)
 - Ακρίβεια
 - Εύκολη χρήση
 - Χαμηλό κόστος/εξέταση
 - Εφαρμογή από καθαρή αποικία
 - Απέευθείας από θετική αιμοκαλλιέργεια, ENY και ούρα

MALDI-TOF-MS

(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry)

(bioMerieux, France or Bruker Daltonics Germany)

Η ταυτοποίηση προκύπτει από τη σύγκριση του πρωτεϊνικού «αποτυπώματος» των παθογόνων (βακτηρίων και μυκήτων) με βάση δεδομένων



Next Generation Sequencing

- Αλληλούχιση μεγάλης απόδοσης
 - Παράλληλος προσδιορισμός μεγάλου αριθμού αλληλουχιών (χιλιάδες ή εκατομμύρια)
- Χρήση πολλών μεθοδολογιών
 - Αλληλούχιση με ημιαγωγό
 - Αλληλούχιση με pyrosequencing
 - Αλληλούχιση με ligation
 - Αλληλούχιση με reversible terminators



May/June 2016 Volume 7 Issue 3 e00444-16

RESEARCH ARTICLE



Whole-Genome Sequencing for Routine Pathogen Surveillance in Public Health: a Population Snapshot of Invasive *Staphylococcus aureus* in Europe

David M. Aanensen,^{a,b} Edward J. Feil,^c Matthew T. G. Holden,^{d,e} Janina Dordel,^{e,f} Corin A. Yeats,^{a,b} Artemij Fedosejev,^{a,b} Richard Goater,^b Santiago Castillo-Ramírez,^g Jukka Corander,^h Caroline Colijn,ⁱ Monika A. Chlebowicz,^j Leo Schouls,^k Max Heck,^k Gerlinde Pluister,^k Raymond Ruimy,^l Gunnar Kahlmeter,^m Jenny Åhman,^m Erika Matuschek,^m Alexander W. Friedrich,^j  Julian Parkhill,^e Stephen D. Bentley,^e Brian G. Spratt,^a Hajo Grundmann,^{j,n} ESCMID Study Group on Molecular Epidemiological Markers (ESGEM), European Staphylococcal Reference Laboratory Working Group†

Συστήματα ανίχνευσης παθογόνων από θετική αιμοκαλλιέργεια

Table 1. Current molecular techniques for detection of bloodstream infection, performed on positive blood cultures

Assay/ manufacturer	Technique	Anti-microbial resistance genes	Detectable pathogens	Detection limit (CFU/ml)	Turn- around time (h)	Costs equipment/ test and supplies	Sensitivity/ specificity
PNA-FISH (AdvanDX, MA, USA)	Fluorescence-based hybridization with PNA probes	None	<i>S. aureus</i> , CoNS, <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. tropicalis</i>	NA	1.5-3	\$/++	>98%/>98%
AccuProbe [104,105] (Gen-Probe Inc., CA, USA)	Chemiluminescent DNA probes detect rRNA	None	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , enterococci, streptococci group A and B	NA	2.5	\$\$\$/+++	72%/>99%
Nanosphere Verigene BC-GP	Multiplex PCR	<i>mecA</i> , <i>vanA</i> , <i>vanB</i>	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. lugdunensis</i> , <i>S. anginosus</i> group, <i>S. agalactiae</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Listeria</i> spp., <i>Micrococcus</i> spp.	NA	2.5	\$/++	>98%/>98%
MALDI-TOF (bioMérieux, France or Bruker Daltonics, Germany)	Mass spectral signal recognition, laser desorption ionisation, mass spectrometry	None	Same pathogens as usually detected by blood cultures. Limitations in presence of polymicrobial bacteraemia or with some closely related organisms (for example, viridians <i>Streptococcus</i> spp., <i>Streptococcus pneumoniae</i> identified as <i>Streptococcus parasanguinis</i> , <i>Shigella sonnei</i> identified as <i>E. coli</i>)	NA	<1-2	\$\$\$/+	>76%/>96% (genus level)
Plex-ID (Abbott, USA)	Multiplex PCR detected by electrospray ionization mass spectrometry	<i>mecA</i> , <i>van</i>	Same pathogens as usually detected by blood cultures. High positive agreement with MALDI-TOF	NA	<3	\$\$\$\$/+++	NA/NA
Hyplex Bloodscreen (BAG, Germany)	Multiplex PCR, hybridization on ELISA plate	<i>mecA</i> , <i>van</i>	MSSA, MRSA, <i>S. epidermidis</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Klebsiella</i> spp.	NA	3	\$/++	>96%/>92%
Prove-It Sepis (Mobidiag, Finland)	Multiplex PCR + hybridization on microarray	<i>mecA</i>	CoNS, <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. dysgalactiae</i> ss. <i>Equisimilis</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> , Enterobacteriaceae, <i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Serratia marcescens</i> , <i>Campylobacter</i> spp., <i>H. influenzae</i> , <i>Neisseria</i> spp., <i>Kingella kingae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> ,	NA	3	\$/++	>94%/98%
Black-Light (BlackBio, Spain)	Broad-range PCR and pyrosequencing	NA	Multiple sepsis pathogens, including <i>Candida</i> spp., <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus niger</i>	NA	4	\$\$\$/+++	NA/NA
StaphPlex system (Qiagen, CA, USA)	Multiplex PCR + bead-based suspension array	<i>Tuf</i> , <i>nuc</i> , <i>mecA</i> , <i>aacA</i> , <i>ermA</i> , <i>ermC</i> , <i>tetM</i> , <i>tetK</i>	18 <i>Staphylococcus</i> genes (<i>S. aureus</i> and most clinically relevant coagulase negative staphylococci)	NA	5	\$\$\$/+++	72-100%/>95%
Staph SR (BD GeneOhm, CA, USA)	Real-time multiplex PCR	<i>mecA</i>	<i>S. aureus</i> (MRSA/MSSA detection)	NA	2.5-3	\$/++	>95%/>85%
Gene Xpert MRSA/MSSA (Cepheid, CA, USA)	Real-time multiplex PCR	<i>SCCmec</i> , <i>mecA</i>	<i>S. aureus</i> (MRSA/MSSA detection)	NA	1	\$\$\$/+++	>98%/>98%
KeyPath (Microphage, USA)	Real-time pathogen-specific PCR	<i>mecA</i> , <i>nuc</i>	<i>S. aureus</i> (MRSA/MSSA detection)	NA	<5	\$/++	100%/100%

\$. <35,000 dollars; \$\$, <75,000 dollars; \$\$\$, <200,000 dollars; \$\$\$\$, >200,000 dollars; +, <10 dollars; ++, 10 to 50 dollars; +++, >50 dollars. CFU, colony forming unit; CoNS, coagulase-negative staphylococci; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight; MRSA, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; MSSA, methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*; NA, not available; PCR, Polymerase chain reaction; PNA-FISH, peptide nucleic acid-fluorescence *in situ* hybridization.

Συστήματα ανίχνευσης παθογόνων από ολικό αίμα

Table 2. Current molecular techniques for detection of bloodstream infection, performed directly on whole blood

Assay/ manufacturer	Technique	Anti-microbial resistance genes	Detectable pathogens	Detection limit (CFU/ml)	Turn- around time (h)	Costs equipment/ test and supplies	Sensitivity/ specificity
SepsiTest (Molzym, Germany)	Broad-range PCR + sequencing	None	>300 different pathogens	20-40 for <i>S. aureus</i>	8-12	\$\$\$+++	82%/86-90%
Woo (SIRS-Lab, Germany)	Multiplex PCR + gel electrophoresis	<i>mec</i> , <i>vanA</i> , <i>vanB</i> , <i>vanC</i> , <i>bla_{SHV}</i>	<i>S. pyogenes</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. agalactiae</i> , viridans-group streptococci species, <i>S. aureus</i> , CoNS, <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. maltophilia</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Prevotella buccae</i> , <i>P. melaninogenica</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i>	3-10	8	\$\$\$++	NA/NA
LightCycler SeptiFast (Roche, Germany)	Multiplex real-time PCR	<i>mecA</i>	<i>S. aureus</i> , CoNS, <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus</i> spp. (<i>S. pyogenes</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. mitis</i>), <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i>	3-30	6	\$\$+++	60-95%/74-99%#
Plex-ID (Abbott, USA)	Multiplex PCR detected by electrospray ionization mass spectrometry	<i>mecA</i> , <i>vanA</i> , <i>vanB</i> , <i>vanC</i> , <i>bla_{SHV}</i>	Multiple pathogens and bioagents, including <i>Yersinia pestis</i> , <i>Bacillus anthracis</i> . Separate dedicated assays for viruses or yeasts/fungi	NA	8-12	\$\$\$\$++	NA/NA
WAPChip [106] (Eppendorf Array Technologies, Belgium)	Multiplex PCR + hybridization on a cartridge-containing microarray	<i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{OXA}</i> , carbapenemases ^a , <i>mecA</i>	<i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. maltophilia</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Legionella pneumophila</i>	>10	5-8	NA	NA/NA
MagicPlex (SeeGene, Korea)	Multiplex real-time PCR	<i>vanA</i> , <i>VanB</i> , <i>mecA</i>	73 Gram-positive (30 <i>Staphylococcus</i> spp., 40 <i>Streptococcus</i> spp., 3 <i>Enterococcus</i> spp.), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> . Separate dedicated assays for viruses	NA	3-4	NA	NA/NA

^aSensitivity and specificity varies depending on the pathogen of interest. ^b7 OXA-23, 6 OXA-58, 5 OXA-48, 5 VIM-2, 4 VIM-4, 3 KPC-2, 3 IMP-13, 2 VIM-1, 2 OXA-72, 1 VIM-like, 1 IMP-4, 1 OXA-40. \$, <35,000 dollars; \$\$, <75,000 dollars; \$\$\$, <200,000 dollars; \$\$\$\$, >200,000 dollars; +, <10 dollars; ++, 10 to 50 dollars; +++, >50 dollars. CFU, colony forming unit; CoNS, coagulase-negative staphylococci; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight; MRSA, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; MSSA, methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*; NA, not available; PCR, Polymerase chain reaction; PNA-FISH, peptide nucleic acid-fluorescence in situ hybridization.

Μοριακές τεχνικές για την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό μικροοργανισμών

Ι.Δ. Κυριαζής, Μ.Ε. Καμπούρης, Κ. Πουλάς, Γ.Π. Πατρινός
ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2014, 31 (1): 23-40.

Πίνακας 1. Συγκριτικός πίνακας των βασικών σύγχρονων μοριακών μεθόδων.

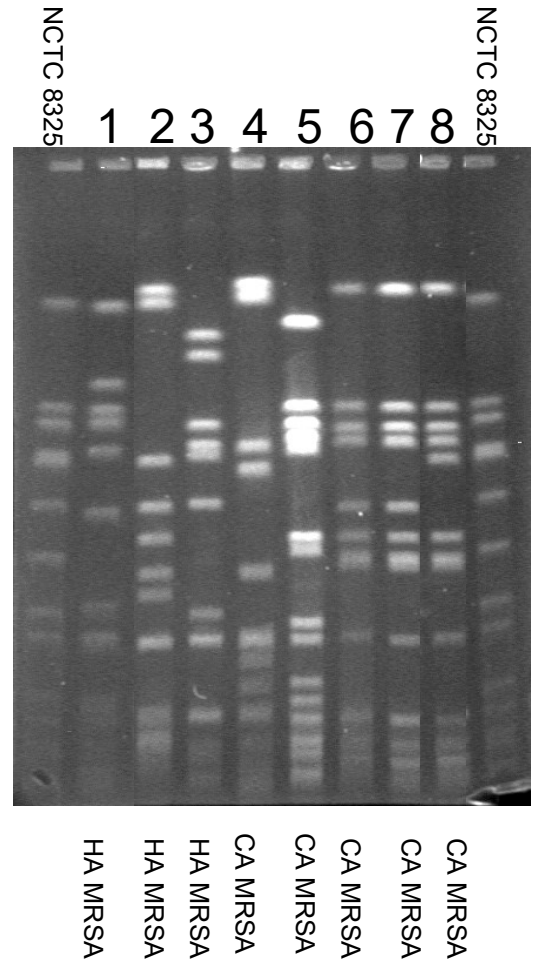
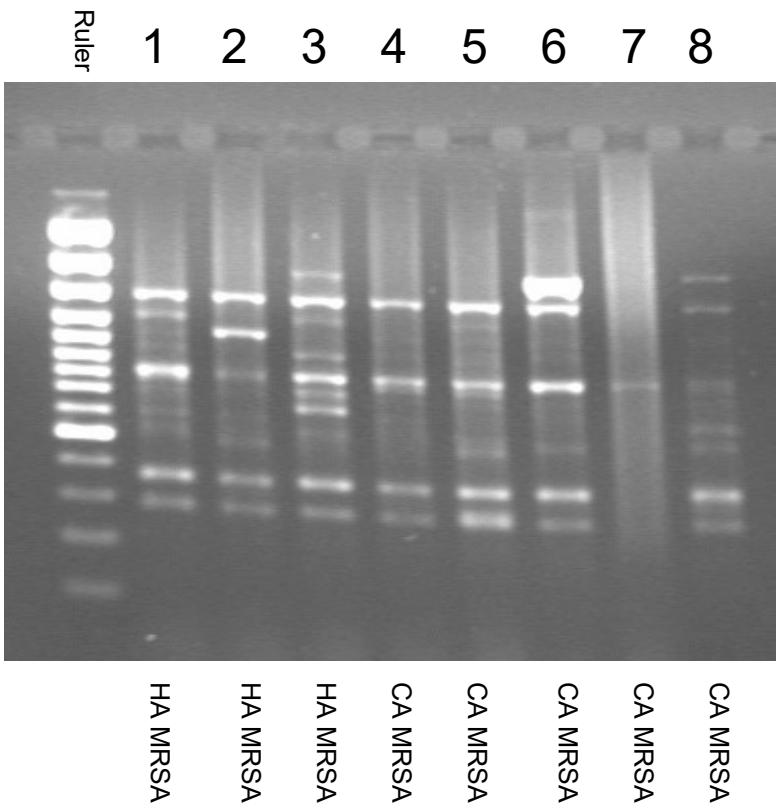
Μοριακή μέθοδος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Τεχνικές κυκλικής ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων	<ul style="list-style-type: none"> - Κατάλληλες για την ανίχνευση ευρείας ποικιλίας παθογόνων μέσω πολλαπλών διαφορετικών τροποποιήσεων - Κατάλληλες για μεγάλη ποικιλία δειγμάτων - Σε σχέση με τις ορολογικές μεθόδους είναι πιο ειδικές και πιο ευαίσθητες 	<ul style="list-style-type: none"> - Επιμόλυνση δειγμάτων οδηγεί σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα - Περισσότερο δαπανηρές από τις ορολογικές μεθόδους - Απαιτούν σχολαστικές τεχνικές εργασίας και ποιοτικό έλεγχο - Απαιτούνται ξεχωριστές εγκαταστάσεις και ειδικά όργανα
Τεχνικές ισοθερμικών αντιδράσεων	<p>Σε σύγκριση με την PCR:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Αρκετά αποτελεσματικές τεχνικές - Οι τεχνικές με κυρίαρχο προϊόν RNA παρουσιάζουν χαμηλή πιθανότητα επιμόλυνσης 	<p>Σε σύγκριση με την PCR:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Δαπανηρές
Φθορίζων εντοπισμένος/επιτόπιος υβριδισμός (FISH)	<ul style="list-style-type: none"> - Επιτρέπει την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων άμεσα δίχως πρωθύστερη ενίσχυσή τους - Οικονομική - Μέτριες τεχνικές απαιτήσεις - Το τεχνικό μέρος της ανάλυσης είναι ταχύ - Δεν παρατηρείται επιμόλυνση στο εργαστήριο - Συνήθως πολύ ειδική 	<ul style="list-style-type: none"> - Χαμηλή ευαισθησία - Η εξέταση των δειγμάτων είναι χρονοβόρα εκτός αν υπάρχει αυτόματο μικροσκόπιο, που είναι αρκετά δαπανηρό
Τεχνικές ανάλυσης γονοτύπου	<ul style="list-style-type: none"> - Ιδανικές για ανίχνευση μικροβιακής αντοχής και στελεχών υψηλού κινδύνου - Ο προσδιορισμός αλληλουχίας προσδίδει ακριβή στοιχεία και μεγάλο όγκο δεδομένων - Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για φυλογενετικές αναλύσεις 	<ul style="list-style-type: none"> - Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας απαιτεί ακριβό εξοπλισμό και τεχνική αρτιότητα - Επίπονη τεχνική
Φασματοσκοπία μάζας	<ul style="list-style-type: none"> - Κατάλληλη για τυποποίηση - Επιτρέπει την ανίχνευση γνωστών και νέων μεταλλάξεων - Εξαιρετικά ταχεία σε σχέση με τον προσδιορισμό της αλληλουχίας - Κατάλληλη για την ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων 	<ul style="list-style-type: none"> - Όχι κατάλληλη για την ανάλυση μεγάλων ολιγονουκλεοσιδικών αλληλουχιών λόγω χαμηλής ευαισθησίας - Η μέθοδος MALDI είναι επιρρεπής σε επιμολύνσεις μετάλλων
Μικροσυστοιχίες	<ul style="list-style-type: none"> - Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων και αντισωμάτων - Πολύ καλή ευαισθησία - Ικανότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης διαφορετικών παθογόνων - Κατάλληλη για την ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων 	<ul style="list-style-type: none"> - Υπερβολικά δαπανηρή για να προσαρμοστεί ως διαγνωστική τεχνική ρουτίνας - Συνήθως χρειάζεται στάδιο ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων πριν από την ανάλυση

Ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο

- Ηλεκτροφόρηση μεγάλων τμημάτων DNA
 - συνήθως θραυσμάτων που έχουν παραχθεί μετά από πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες χαμηλής συχνότητας (rare cutters) σε ολικό DNA (συνήθως βακτηρίων αλλά και μυκήτων).
- Τυποποίηση κάτω από το επίπεδο του είδους
- Προσδιορισμός γενετικής συσχέτισης μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους

RAPD vs PFGE

Staphylococcus aureus



Τυποποίηση πολυτοπικής αλληλούχισης

- Τυποποίηση με βάση τις διαφορές αλληλουχίας σε πολλούς γενετικούς τόπους
 - (συνήθως 7–10 διαφορετικά γονίδια βασικού μεταβολισμού)
 - Προσδιορίζεται ένα προφίλ αλληλίων για κάθε στέλεχος
 - Τυποποίηση βακτηρίων και χαρακτηρισμός κλώνων σε ευρεία κλίμακα
- MLMT (multilocus microsatellite typing)
 - Τυποποίηση ευκαρυωτικών παθογόνων
- MLEE (multilocus enzyme electrophoresis)

Οπτικοποίηση και καταγραφή αποτελέσματος

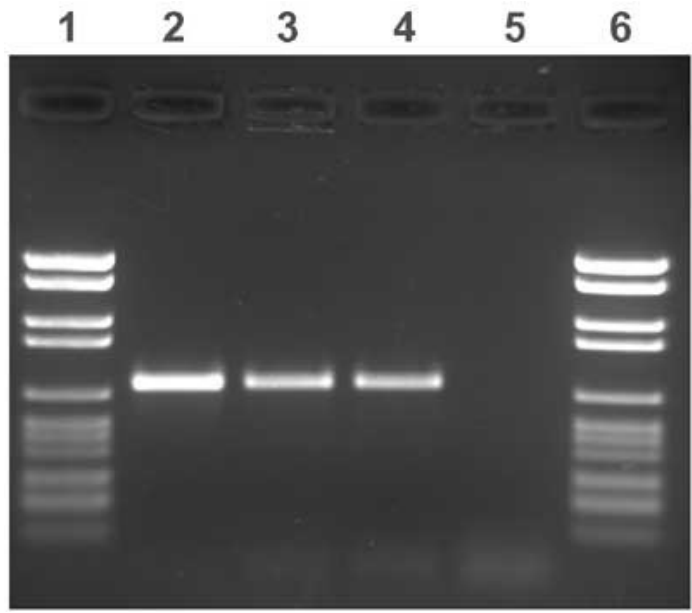
Χημικοί ιχνηθέτες πραγματικού χρόνου

- Taqman
 - Φθοριοφόρο μόριο στο 5' άκρο, μόριο παρεμπόδισης φθορισμού στο 3' άκρο
 - Διαχωρισμός φθοριοφόρου μορίου από το μόριο παρεμπόδισης μέσω εξωνουκλεολυτικής δράσης Taq DNA πολυμεράσης στους 60° C
 - Αύξηση φθορισμού σε συνάρτηση με τον αριθμό κύκλων → ποσοτικοποίηση
 - Διαφορετικά φθοριφόρα → multiplex R-T PCR
- Molecular beacons (μοριακοί φάροι)
 - Φθοριοφόρο μόριο και μόριο παρεμπόδισης σε κοντινή απόσταση → απουσία φθορισμού
 - Υβριδοποίηση στο DNA στόχο → απομάκρυνση των δύο μορίων και φθορισμός
 - Κατάλληλοι για καμπύλες τήξης
- FRET
 - Μεταφορά ενέργειας φθορισμού με αντήχηση
- Scorpion
 - Μοριακός φάρος συνδεδεμένος με εκκινητή

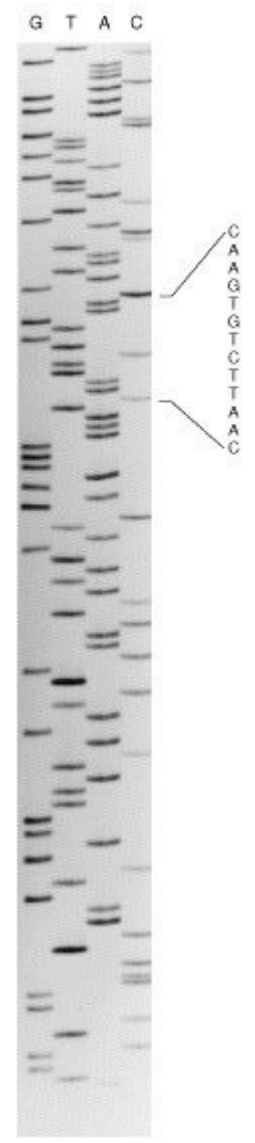
Άλλες μέθοδοι οπτικοποίησης

- Παρεμβαλλόμενες χρωστικές
 - Βρωμιούχο αιθίδιο
 - Μοριακοί ιχνηθέτες (SYBR GREEN, SYBR GOLD)
- Χρώση αργύρου
- Αυτοραδιογραφία
- Αποτύπωση (blotting) (Southern Blot για DNA και Northern Blot για RNA)

Παρεμβαλόμενες χρωστικές- Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης



Αυτοραδιγραφία





- Ποια μεθοδολογία θα επιλέξουμε αν δεν γνωρίζουμε τη νουκλεοτιδική αλλά την αμινοξική αλληλουχία του στόχου μας;

- Ποιο στόχο θα επιλέξουμε να ανιχνεύσουμε για την παρακολούθηση θεραπείας έναντι HIV;

- Γιατί πιστεύετε ότι η PCR είναι η ευρύτερα διαδεδομένη μοριακή διαγνωστική μέθοδος;

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. PRINCIPLES OF MOLECULAR MICROBIOLOGY TESTING METHODS

Donna Wolk, PhD, MHA, MT; Shawn Mitchell, MMSc, MT;
and Robin Patel, MD, FRCP(C)

INFECTIOUS DISEASE CLINICS OF NORTH AMERICA, 2001; 15 (4)

2. Μοριακές τεχνικές για την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό μικροοργανισμών

Ι.Δ. Κυριαζής, Μ.Ε. Καμπούρης, Κ. Πουλάς, Γ.Π. Πατρινός

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, 2014, 31 (1): 23-40

3. Emerging Technologies for the Clinical Microbiology Laboratory

Blake W. Buchan, Nathan A. Ledebouer

Clinical Microbiology Reviews p. 783–822