

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΣΤΗ ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑ

1,358,633 bps

Ε. Πετεινάκη
Εργαστήριο Μικροβιολογίας
Ιατρικό Τμήμα

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΚΛΙΝΙΚΟΥ

ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

ΕΙΝΑΙ

Η ΓΡΗΓΟΡΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΙΣΤΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

ΤΟΥ ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ

ΣΤΟΧΟΙ

- Έναρξη αιτιολογικής θεραπείας
- Λήψη κατάλληλων μέτρων πρόληψης της διασποράς της λοίμωξης

Γενετική Βακτηρίων

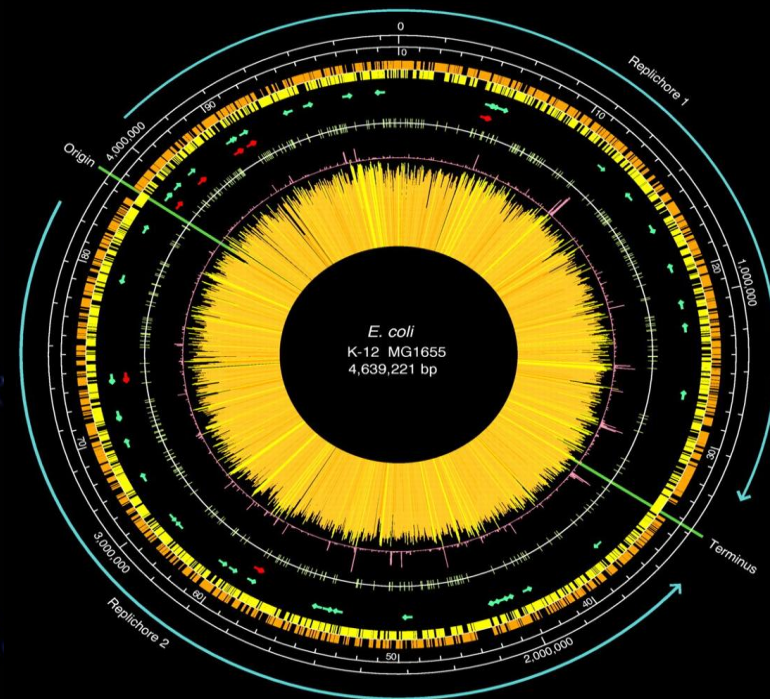
- *Κατανόηση μηχανισμών λειτουργίας ευκαρυωτικών κυττάρων*
- *Ταξινόμηση βακτηρίων*
- *Διάγνωση λοιμωδών νοσημάτων*
- *Επιδημιολογική μελέτη λοιμώξεων*

ανάλυση χρωμοσωμικού DNA :

Μεγαλύτερη σταθερότητα

Ευκολότερη απομόνωση

Πολυμορφισμός



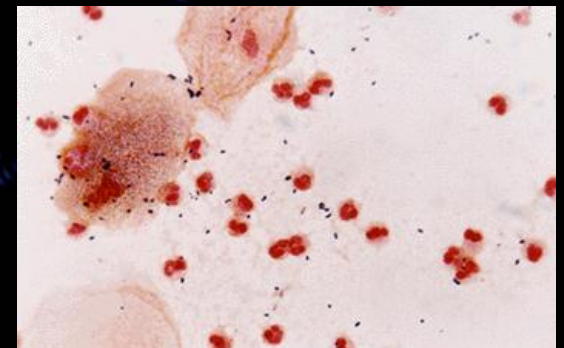
ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ

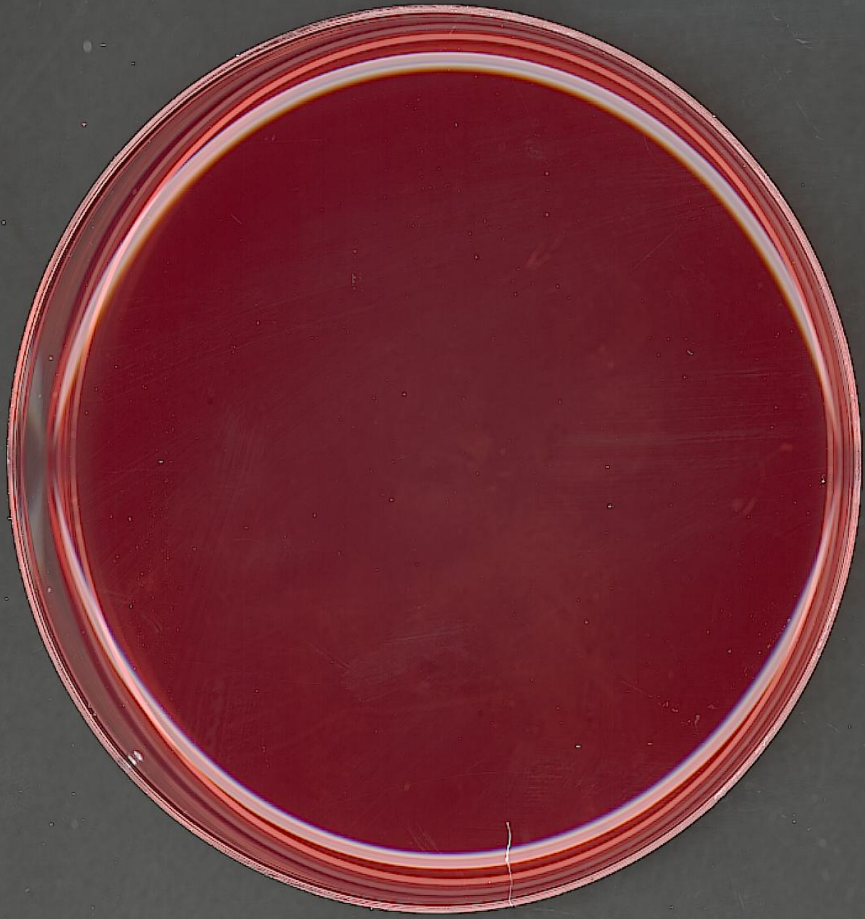
- άμεση μικροσκόπηση του παθολογικού υλικού (πυοσφαίρια-μικροοργανισμοί)
- απομόνωση του μικροοργανισμού με καλλιέργεια
- ταυτοποίηση βάσει φαινοτυπικών και βιοχημικών χαρακτήρων
- έλεγχος της ευαισθησίας του μικροοργανισμού στα αντιβιοτικά
- Ορολογική ανίχνευση Ag ή Abs



ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΗΣΗ

- Περιορισμένη ειδικότητα και ευαισθησία
- Παρουσία μεγάλου αριθμού μικροβίων (10.000/mL βιολογικού υγρού)
- Δυσχερής η μορφολογική αναγνώριση
- Εμπειρία







ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

- Δυσκολίες στην απομόνωση μικροοργανισμών οι οποίοι αναπτύσσονται **βραδέως** και είναι **απαιτητικοί** (*Mycobacterium tuberculosis*, *Kingella* κλπ)

Αδυναμία απομόνωσης του παθογόνου αίτιου λόγω χορήγησης **αντιμικροβιακής θεραπείας**

Αδυναμία διάγνωσης **ιογενών** λοιμώξεων

ΟΡΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

- Η εισαγωγή νεότερων τεχνικών όπως των ορολογικών αντιδράσεων έδωσε λύση σε αρκετές αλλά όχι σε όλες τις περιπτώσεις όπου η απομόνωση του μικροοργανισμού ήταν δύσκολη

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΟΡΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ

- Απουσία αντισωμάτων στην αρχική φάση της νόσου
- Απαραίτητη η λήψη δύο δειγμάτων με διαφορά 15νθημέρου το ένα από το άλλο
- Αδυναμία παραγωγής αντισωμάτων σε άτομα με ανοσοανεπάρκεια
- Συγκεκριμένη αίτηση αντισωμάτων-ανεπαρκής διαγνωστική κάλυψη

Η εισαγωγή των μοριακών μεθόδων στην
κλινική διαγνωστική
έγινε κυρίως
για να επιλυθούν οι αδυναμίες των
συμβατικών μεθόδων,
έτσι ώστε ο λοιμογόνος παράγων να
ταυτοποιείται
αξιόπιστα και γρήγορα

Σύγχρονο Κλινικό Μικροβιολογικό Εργαστήριο

- εξοικείωση με τη χρήση των μοριακών τεχνικών
- επιλογή και σχεδιασμός καταλληλότερης μεθοδολογίας, η οποία κατά κύριο λόγο εξαρτάται από το κλινικό δείγμα
- εμπορικά kits, *in house* μέθοδοι
- περιορισμός του κόστους, ασφάλεια

ΣΥΝΗΘΕΙΣ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (**PCR**)

η τεχνική του **υβριδισμού**

η ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (**PFGE**)

ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (**sequencing**)

Επιλογή Μεθοδολογίας

- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
- Υβριδισμός
- sequencing

στην ανίχνευση γενετικού μικροβιακού υλικού

ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΛΟΙΜΩΞΗΣ

- **Multiplex PCR**
- Ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο
- sequencing

σύγκριση της γενετικής ομοιότητας ανάμεσα σε μικροοργανισμούς

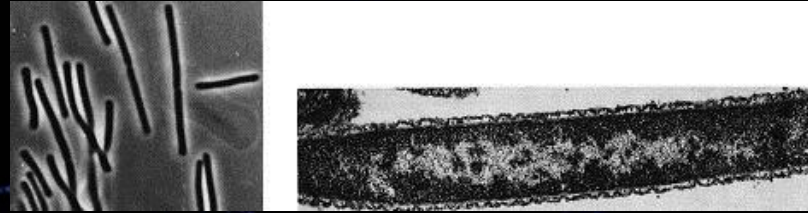
ΠΡΟΛΗΨΗ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ

ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ:

- Χρησιμοποιείται για ανίχνευση-χαρακτηρισμό γενετικού υλικού μικροβίων
- Εξαιρετική ειδικότητα
- Υπολείπεται σε ευαισθησία σε σχέση με την PCR

Thermus aquaticus

PCR

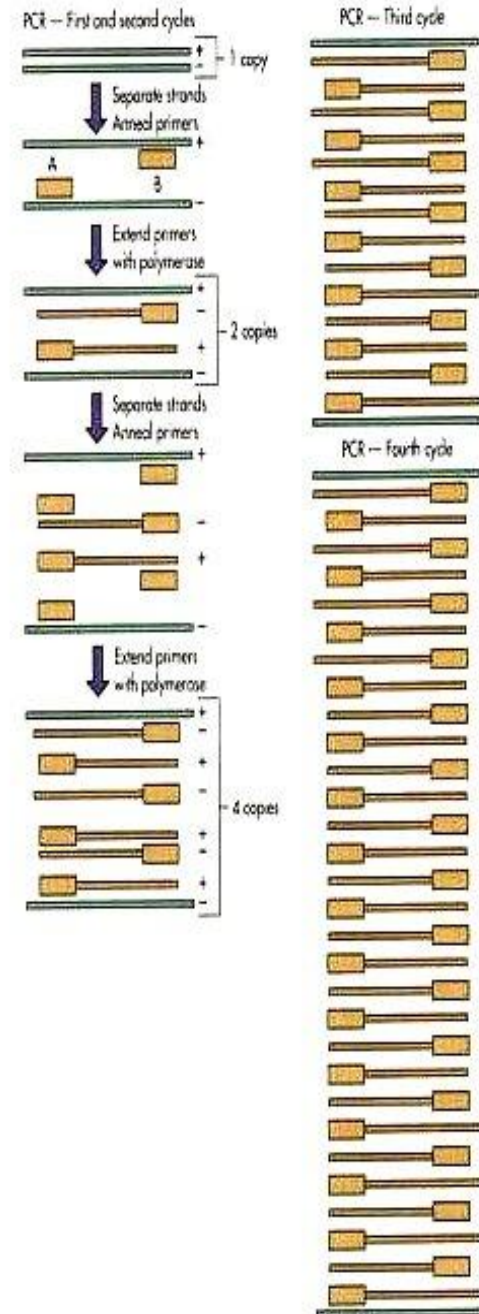


Το βακτήριο *Thermus aquaticus* ανακαλύφθηκε σε νερά θερμοπηγών στο Great Fountain του Lower Geyser Basin στο Yellowstone National Park

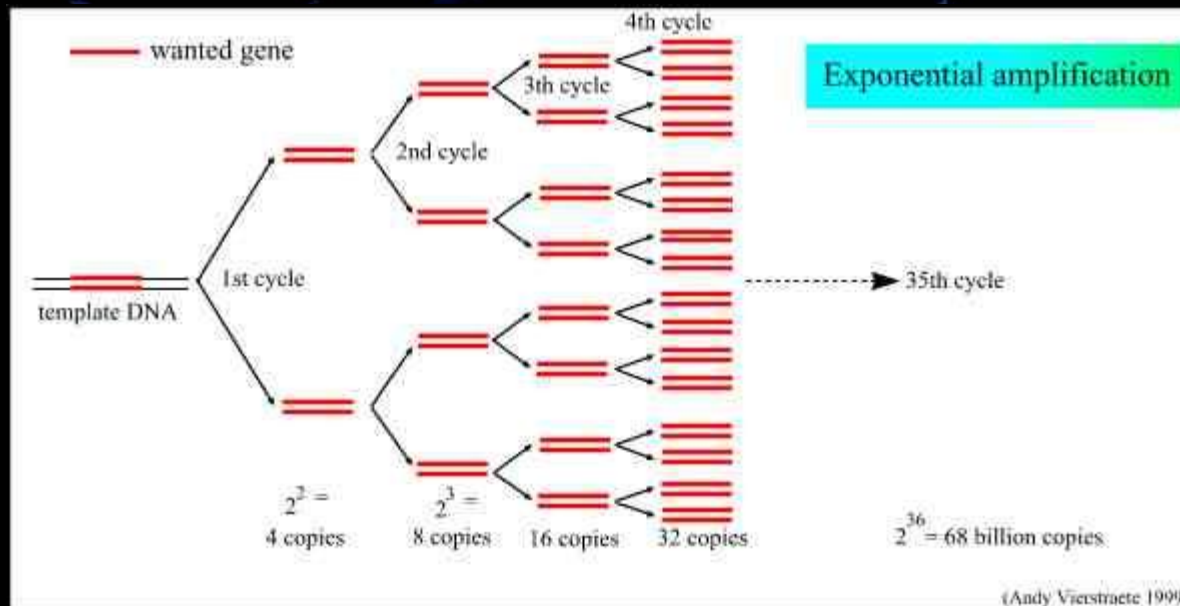
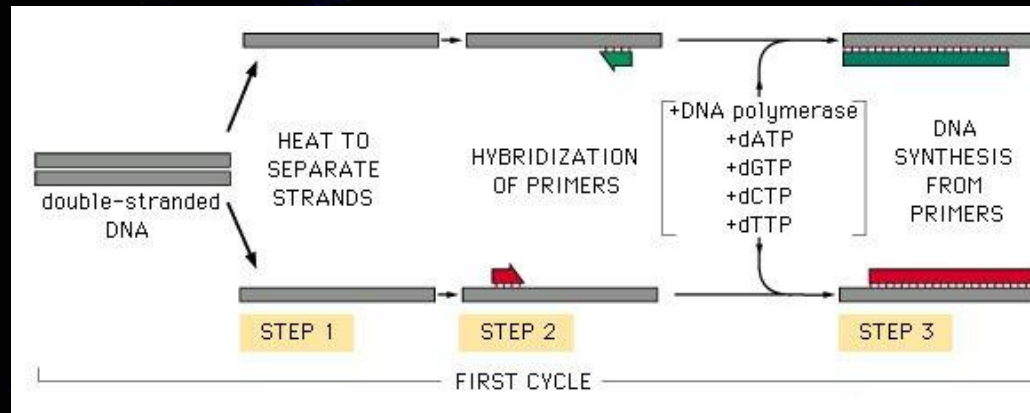
Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης Polymerase Chain Reaction : PCR

- ❖ Ταχύτητα
- ❖ Υψηλή ευαισθησία
- ❖ Ειδικότητα (;)

Θεωρητικά από 1 αντίγραφο DNA
μπορεί να παραχθούν εκατομμύρια
αντίγραφα



Αρχές της PCR



Polymerase Chain Reaction

Πότε εφαρμόζεται η PCR στη διάγνωση λοιμώξεων

- Αδυναμία καλλιέργειας του μικροοργανισμού
- Βραδεία ανάπτυξη
- Απαιτήση για πολύ εμπλουτισμένα ή ειδικά υλικά καλλιέργειας
- Μικρός αριθμός παθογόνων στο κλινικό υλικό
- Ανεπαρκείς ορολογικές τεχνικές ή χαμηλός τίτλος Abs

Παραδείγματα εφαρμογής στη βακτηριολογία

- Νοσήματα αναπνευστικού
- Ανίχνευση με PCR σε κλινικά δείγματα (πτύελα, βρογχικά εκπλύματα, πλευριτικά υγρά, φιάλες καλλιέργειών) *Mycobacterium spp* με εκκινητές για το 16S rDNA και ακολούθως καθορισμός του είδους με υβριδισμό.
- Διάγνωση άτυπης πνευμονίας από *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella spp*

- **Συστηματικές νόσοι**
- Ανίχνευση *Borellia burgdorferi*
- **Νοσήματα ΚΝΣ**
- Εγκεφαλίτιδα από *Treponema pallidum* και *Borellia burgdorferi*
- Μηνιγγίτιδα από *H. influenzae* και *C. neoformans*
- **Νοσήματα ουρογεννητικού**
- Ανίχνευση με PCR *N. gonorrhoeae* και *C. trachomatis*
- Ανίχνευση σε ελκωτικές βλάβες *H. ducreyi*
Treponema pallidum

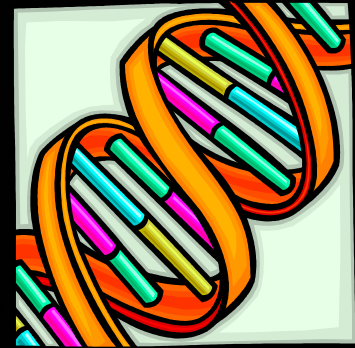
Ιδιαιτερότητες της PCR στη Βακτηριολογία

- Επεξεργασία δείγματος
- Παρουσία **αναστολέων της Taq** πολυμεράσης
- **Ενδοκυττάρια** βακτήρια
- Επιλογή DNA-στόχου
- **Αξιολόγηση** αποτελέσματος!

Ερωτηματικά στη ΤΒ διάγνωση

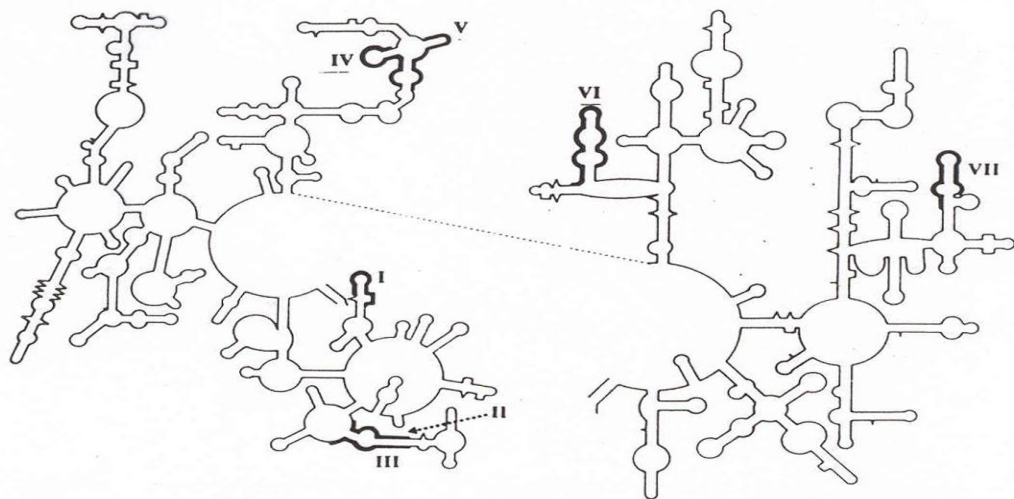
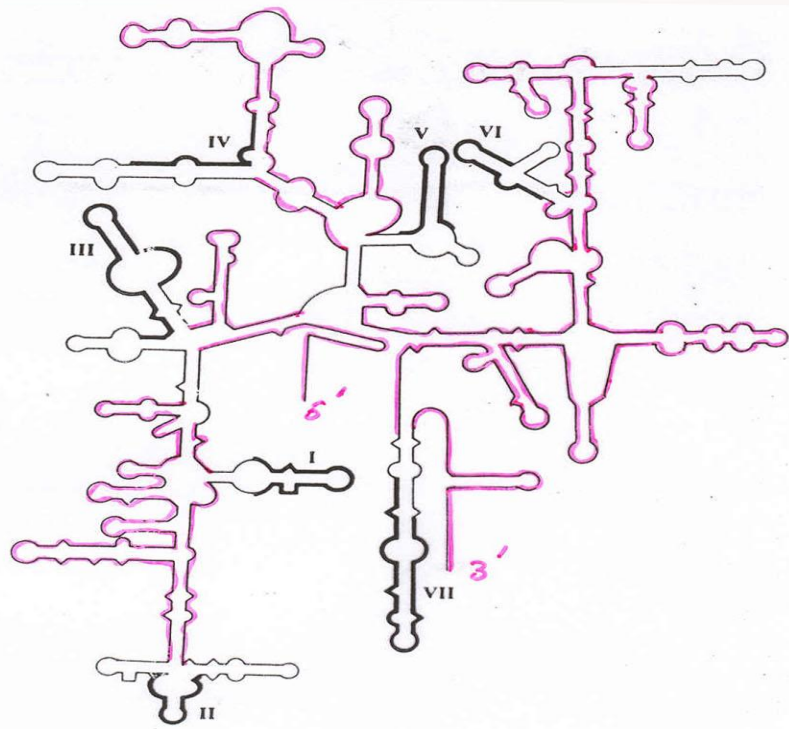
- Είναι μυκοβακτηρίδιο;
- Αν ναι, είναι μυκοβακτηρίδιο φυματίωσης;
- Αν ναι, είναι ευαίσθητο;
- Αν ανήκει στα MOTT (Mycobacterium Other Than Tuberculosis), ποιο είδος είναι και ποια η κλινική του σημασία;

Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).

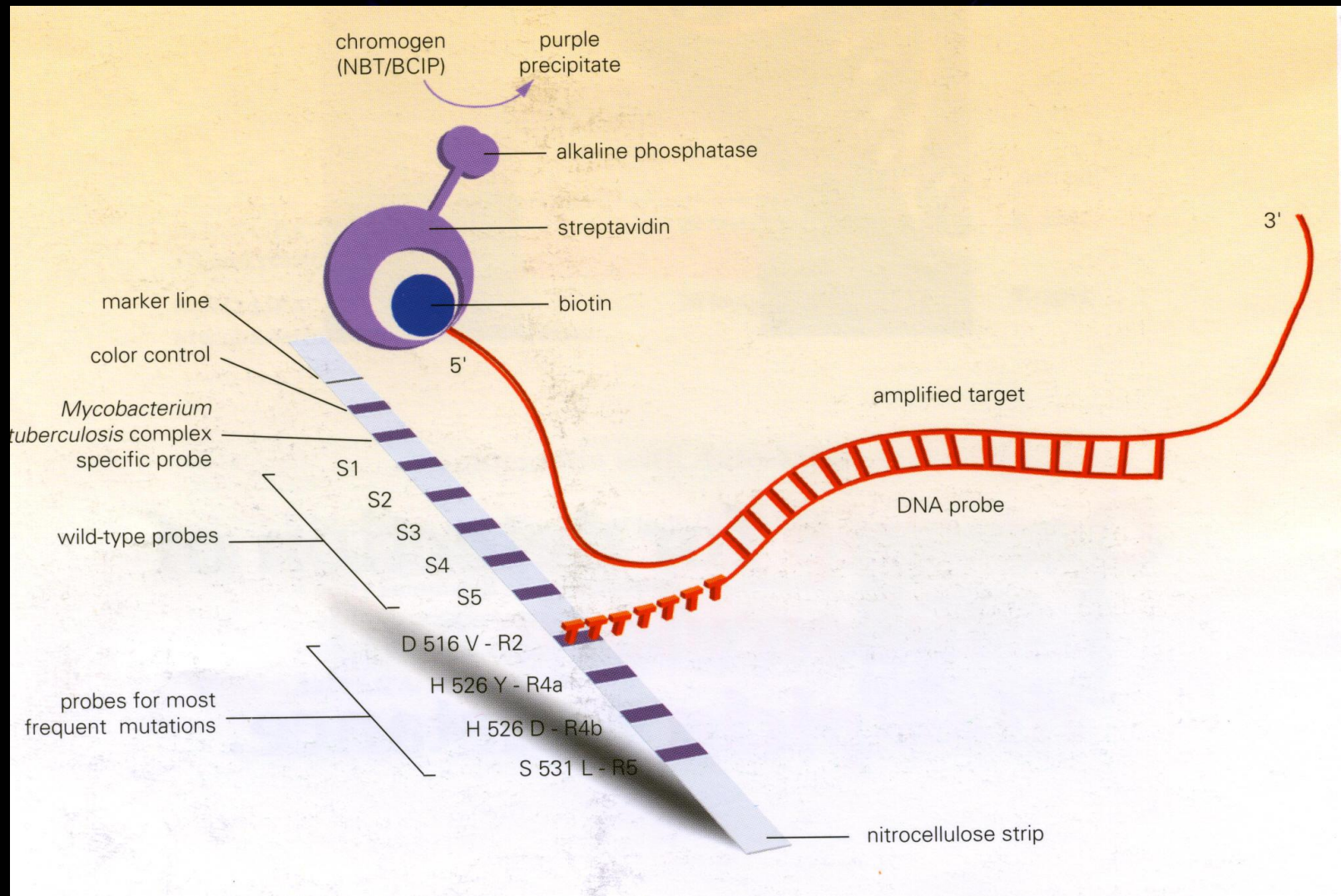


- Δείγματα από το αναπνευστικό και το ουροποιητικό μετά από ρευστοποίηση
- Άλλα υγρά μετά από φυγοκέντρηση
- Πολλαπλασιασμός τμήματος 584 βάσεων στο **16SrDNA**
- **Υβριδισμός** με μη ραδιενεργά σεσημασμένους DNA ανιχνευτές (rDNA).
- Υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα

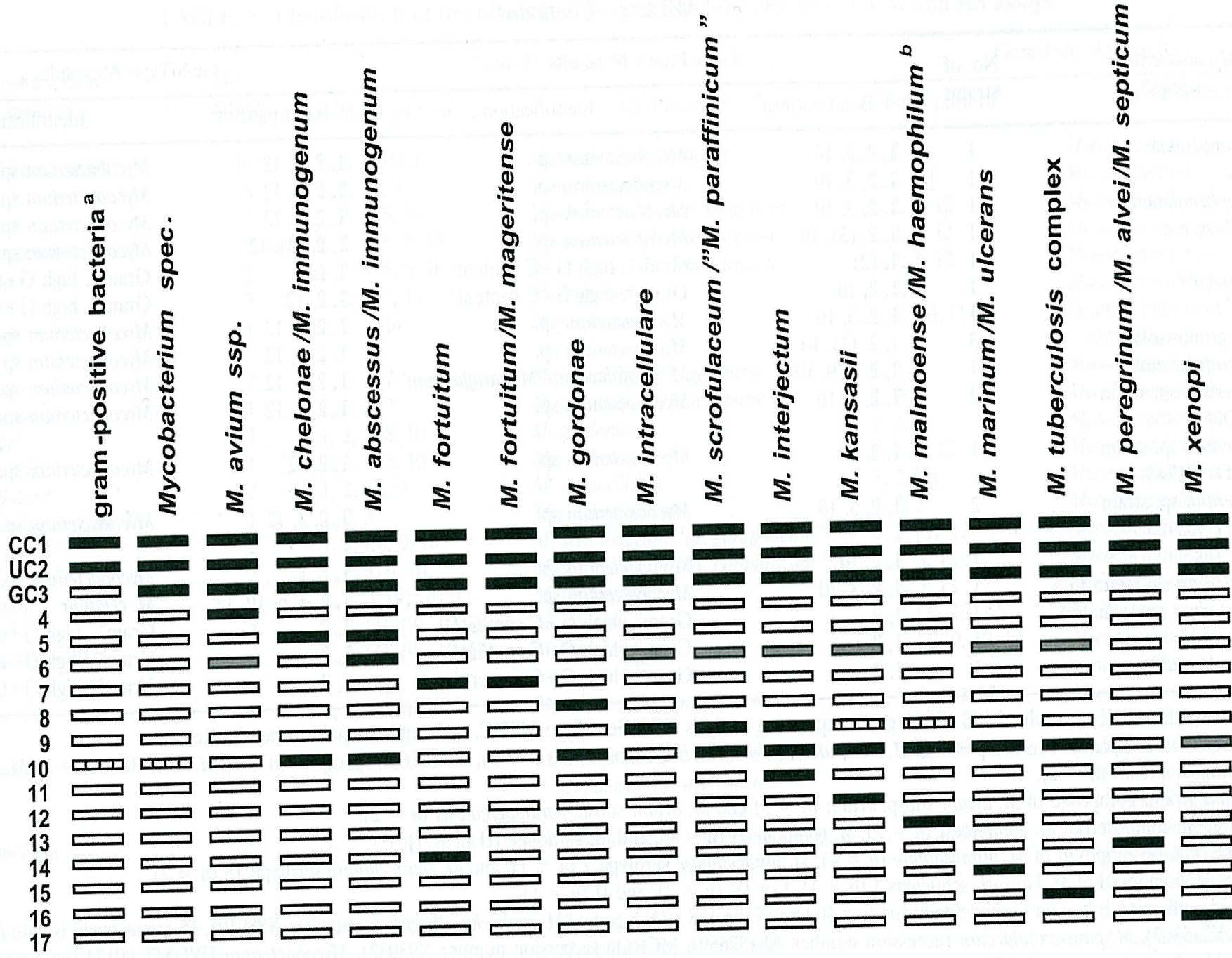
rRNA



INNO-LiPA MTB



(A)



Αξιολόγηση αποτελέσματος PCR

- Θετικά αποτελέσματα με
> 40 κύτταρα/PCR ή
≥1600 cfu/ml
- Θετικά αποτελέσματα και με νεκρά
βακτήρια
- Δεν έχει εφαρμογή στη παρακολούθηση της
θεραπείας



Αναστολή της PCR

- Μη καλή ρευστοποίηση
- Αναστολείς του ενζύμου (αιμοσφαιρίνη)
- Δημιουργία συγκολλήσεων από τα βακτήρια
- Παρουσία βλέννης (πτύελα)

Ανίχνευση μεταλλάξεων που σχετίζονται με αντοχή σε INH- RIF

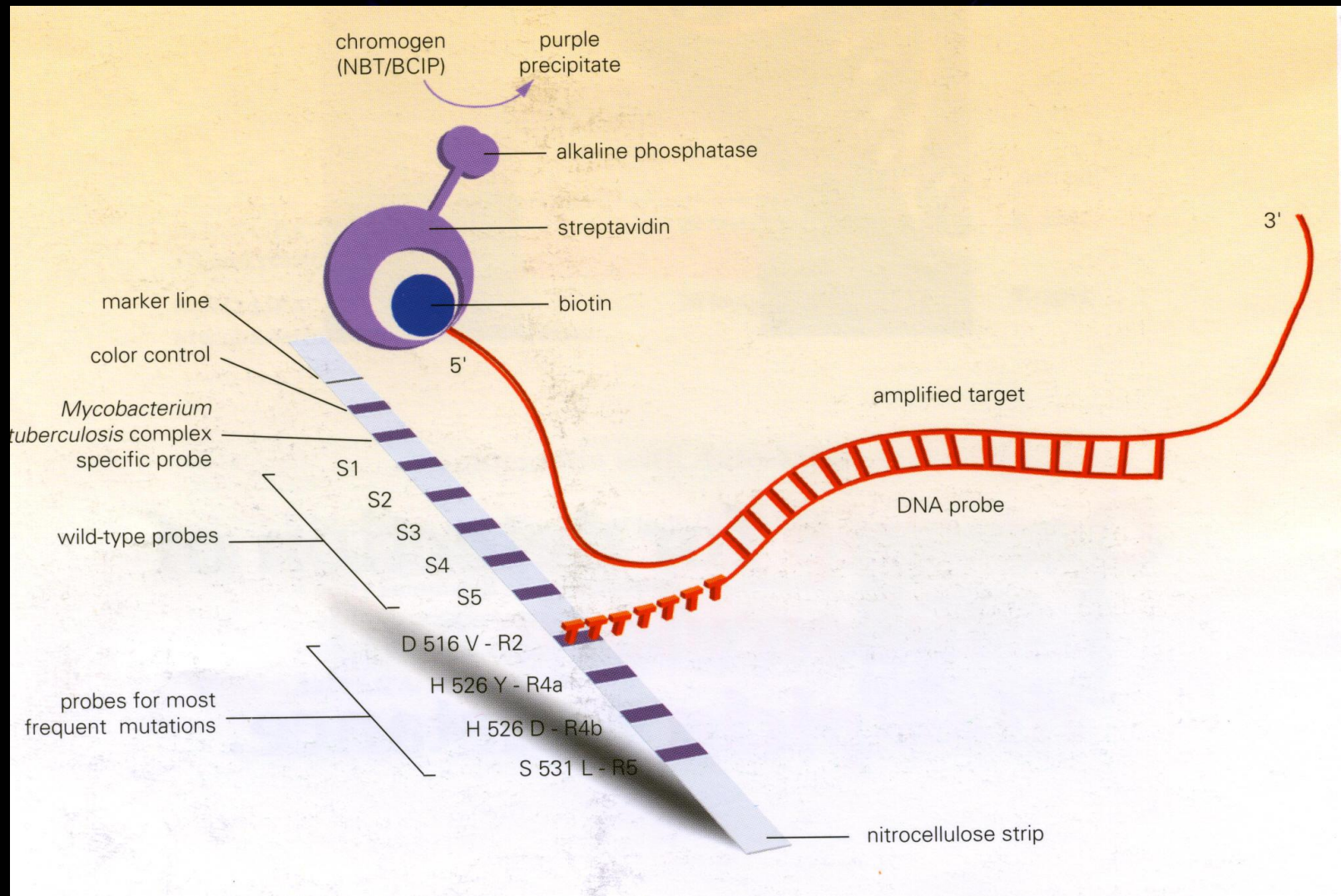
4 ώρες

Ανίχνευση της RIF-R → 90.9%
ευαισθησία

Ανίχνευση της INH-R → 94.4%
ευαισθησία

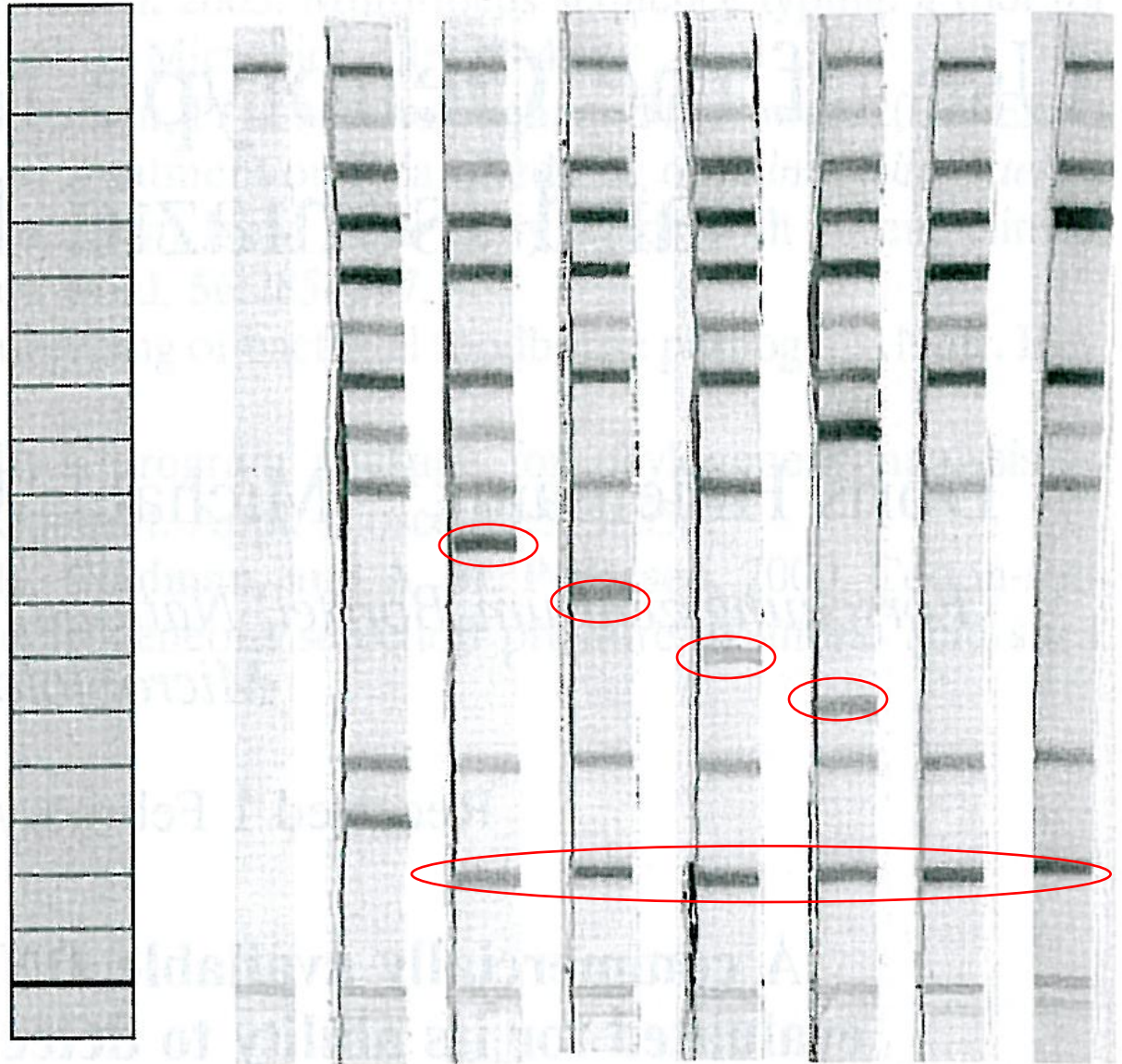
[Genotype MTBDR]

INNO-LiPA MTB



1 2 3 4 5 6 7 8

- Control of the conjugate -
- Amplification control -
- Amplification control MTBC -
- Control *rpoB* -
- rpoB* Wild type 1 -
- rpoB* Wild type 2 -
- rpoB* Wild type 3 -
- rpoB* Wild type 4 -
- rpoB* Wild type 5 -
- rpoB* Mut D516V -
- rpoB* Mut H526Y -
- rpoB* Mut H526D -
- rpoB* Mut S531L -
- Control *katG* -
- katG* wild type -
- katG* S315T1 (ACC) -
- katG* S315T2 (ACA) -



Διάγνωση λοίμωξης ΚΝΣ

- Γρήγορο αποτέλεσμα
- Προηγούμενη αντιμικροβιακή θεραπεία

1,358,633 bps

- 3 κύρια παθογόνα:

(μηνιγγιτιδόκοκκος, αιμόφιλος, πνευμονιόκοκκος)

- Εφαρμογή εκκινητών για μικρόβια σύμφωνα με την επιδημιολογία της λοίμωξης

PCR απευθείας σε κλινικά δείγματα για ανίχνευση μικροβιακού DNA (4 ώρες)

No	PCR σε ENY	κ/α ENY
60	48 (-)	52 (-)
	12 (+)	8 (+)

1,358,633 bps

S. pneumoniae, N. meningitidis, H. influenzae type b

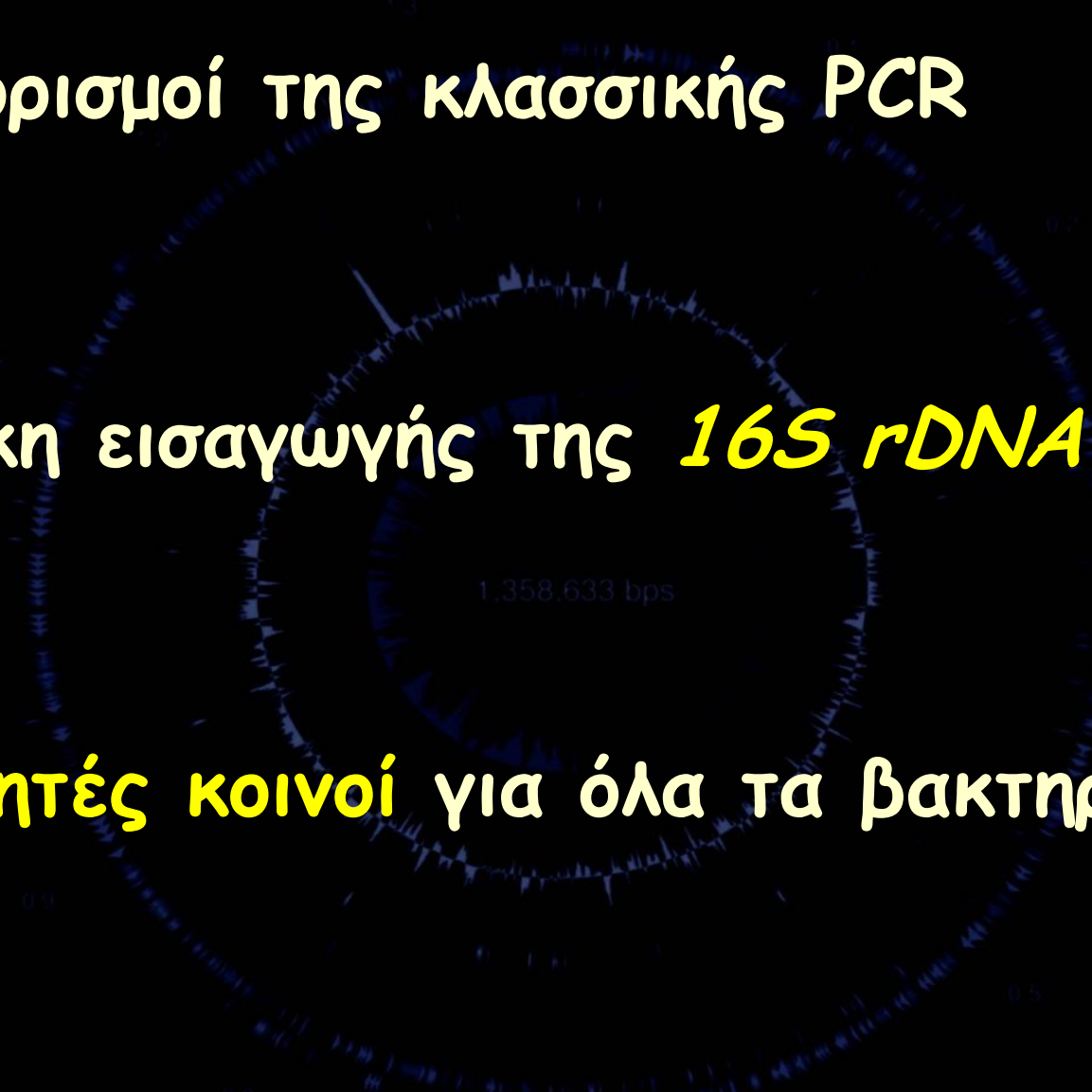
Εξαρτάται η ευαισθησία της PCR από τον αριθμό των
μικροβιακών κυττάρων

Petinaki E. and Dalekos GN. *Res Adv in Microbiol* 2006;6:23-31.

Εισαγωγή της ευρέως φάσματος 16S rDNA

PCR στη διάγνωση των λοιμώξεων

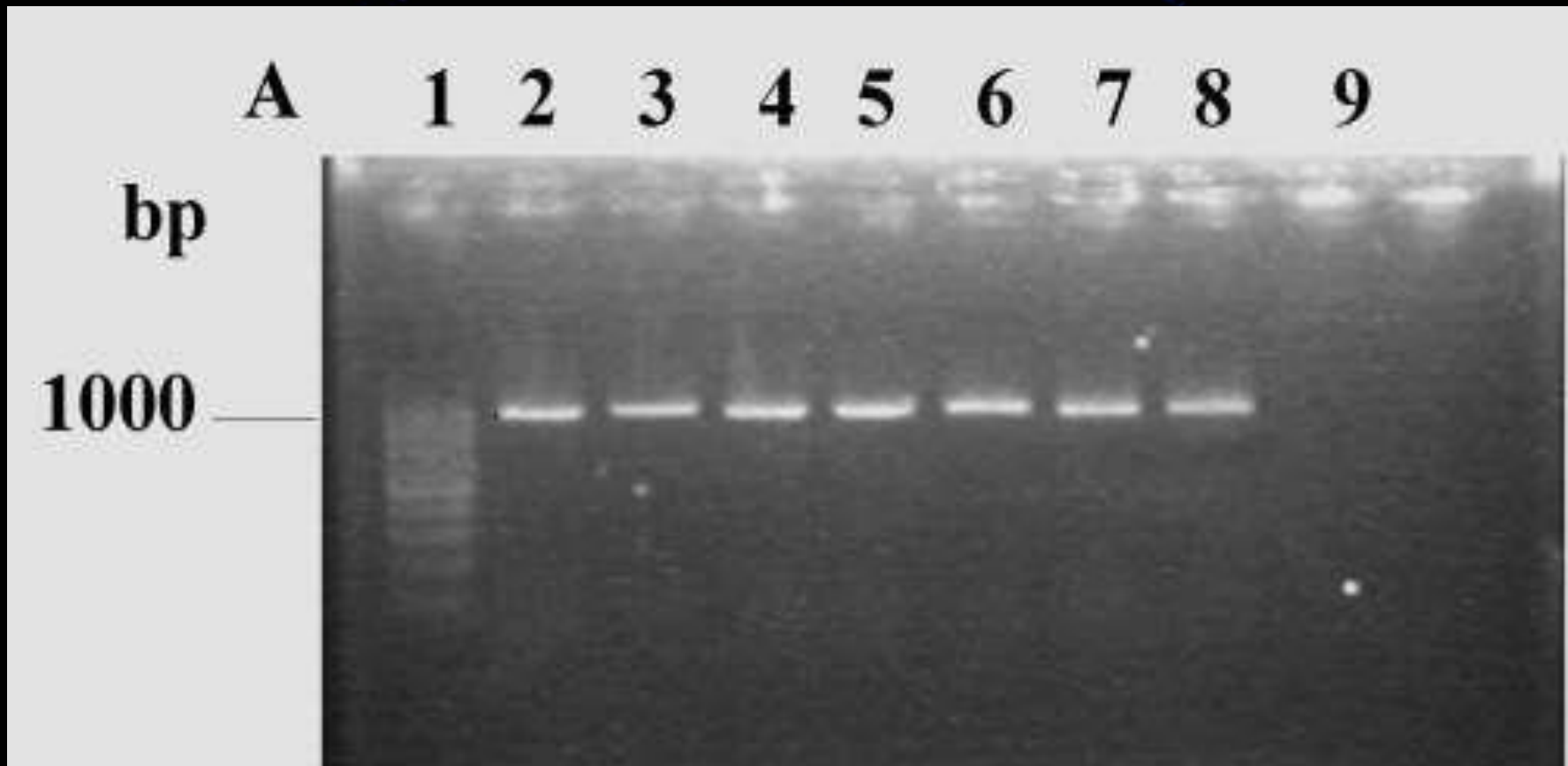
- **μεγάλο φάσμα** μικροοργανισμών
- ταυτοποίηση αξιόπιστη σε επίπεδο **είδους**
- χαρακτηρισμός **νέων** παθογόνων
- δυνατότητα ανίχνευσης **περισσότερων** από ένα είδη μικροοργανισμών
- δυνατότητα εφαρμογής στο εργαστήριο ρουτίνας
- ΕΝΥ, πλευριτικό, αρθρικό, ιστοί, αίμα κλπ

- Περιορισμοί της κλασσικής PCR
 - Ανάγκη εισαγωγής της **16S rDNA PCR**
 - **Εκκινητές κοινοί** για όλα τα βακτηριακά είδη
- 

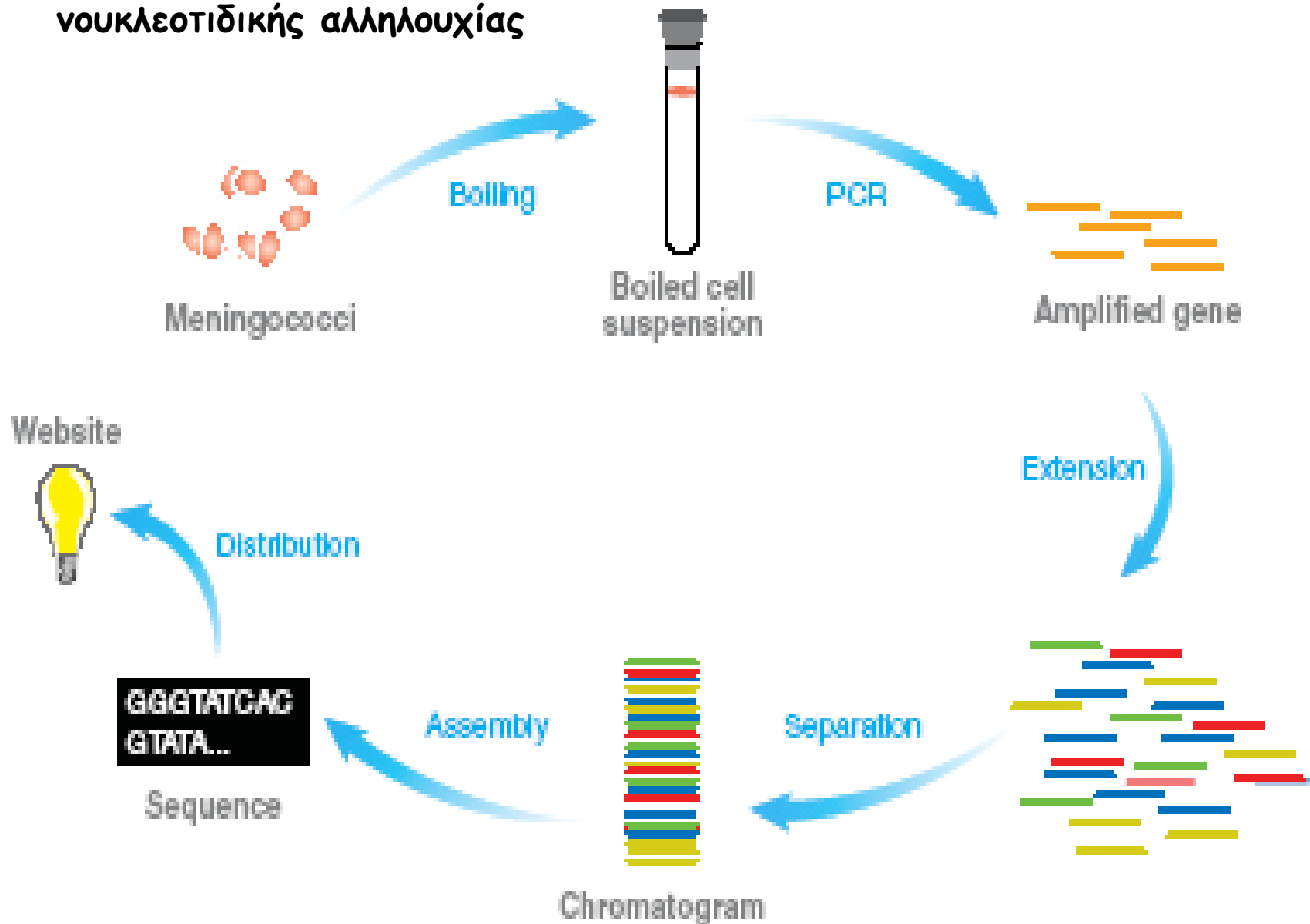
Παράλληλα με την κλασσική καλλιέργεια πρώτο στάδιο (απάντηση σε 4 h)

- Απομόνωση DNA από το δείγμα
- Έλεγχος καταλληλότητας του DNA (ύπαρξη DNA, απουσία αναστολέων)
- Χρησιμοποιείται ζεύγος εκκινητών κοινών για όλα τα μικρόβια (*16S rDNA*)
- **Ύπαρξη ή όχι μικροβιακού DNA**
- Αδυναμία ταυτοποίησης σε επίπεδο γένους και είδους

Προϊόντα PCR μετά από πολλαπλασιασμό του 16S rDNA διαφόρων βακτηρίων. Γραμμή 1: μάρτυρας μοριακών βαρών, 2: *Staphylococcus* spp, 3: *E. Coli*, 4: *Klebsiella* spp, 5: *Enterococcus* spp, 6: *S. pneumoniae*, 7: *Streptococcus* spp, 8: *Pseudomonas* spp, 9: αρνητικός μάρτυρας



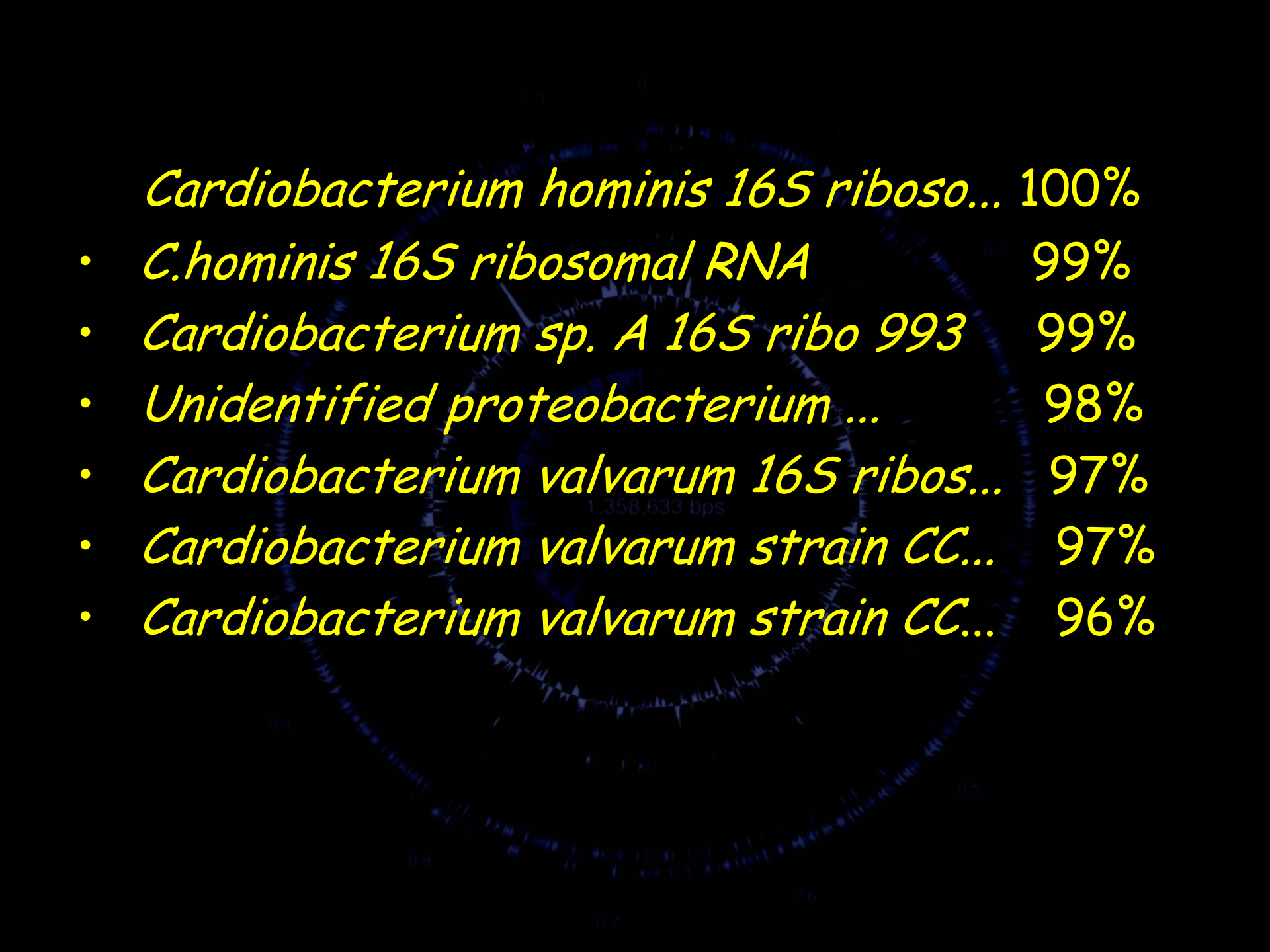
Ταυτοποίηση: ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

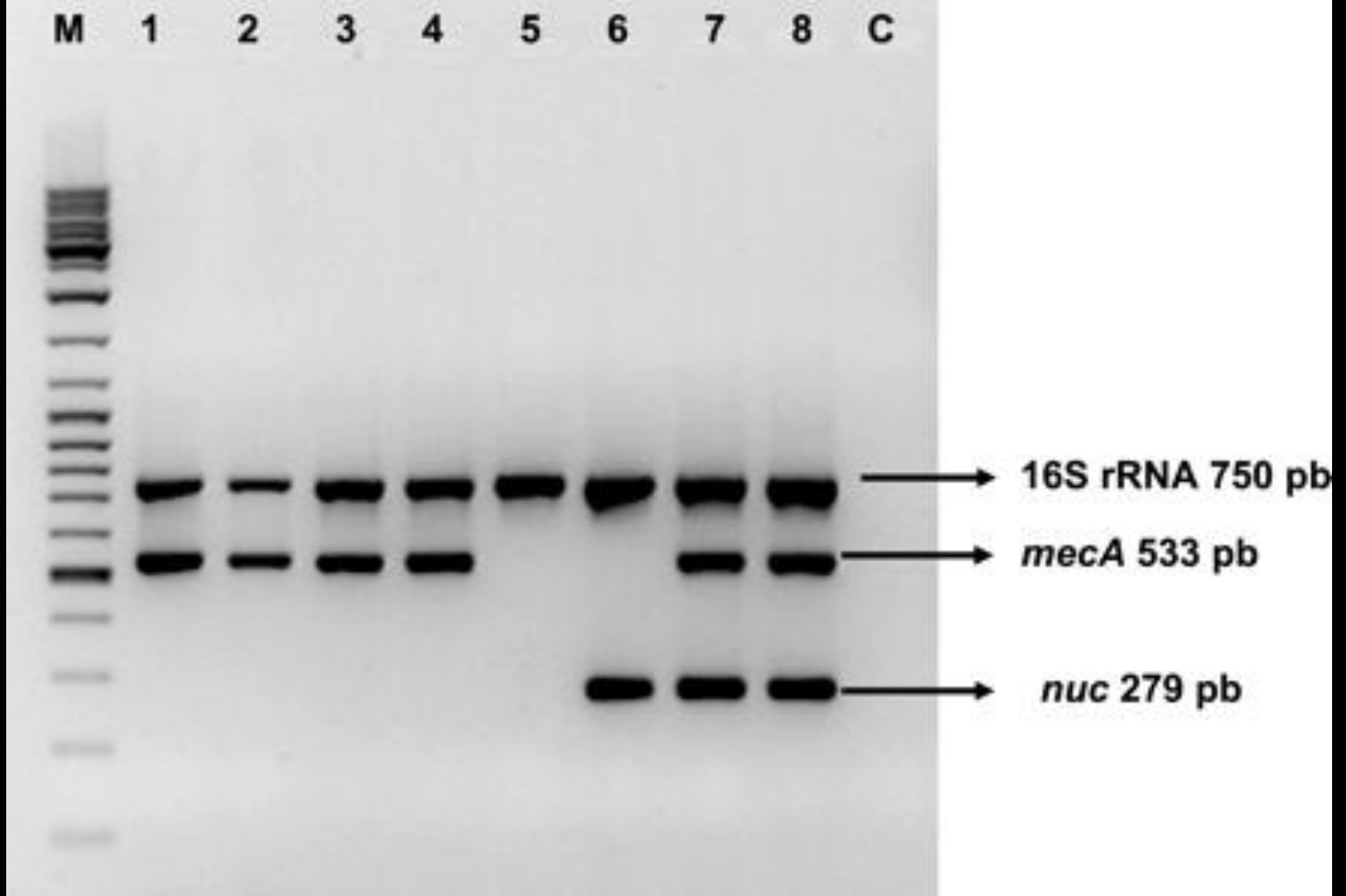


Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

- Ανάλυση κατά Sanger (sequencing)
- Σύγκριση της συγκεκριμένης αλληλουχίας με όλες τις γνωστές μέχρι σήμερα αλληλουχίες μέσω μιας τράπεζας BLAST-GENOME
- Η ομοιότητα πρέπει να είναι πάνω από 97.5% για να είμαστε βέβαιοι ότι το βακτήριο ανήκει στο συγκεκριμένο γένος

• ggaattactg ggcgtaaagc gcacgcaggc ggttgcccaa
gtcagatgtg aaagccccgg gcttaacctg ggaactgcat
ttgaaactgg gcgactagag tatgaaagag gaaagcggaa
tttccagtgt agcagtgaaa tgcgtagata ttggaaggaa
caccgatggc gaaggcagct ttctgggtcg atactgacgc
tcatgtgcga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc
ctggtagtcc acgccctaaa cgatgtcaac taggcgtcgg
gttgttaaag actcggtgcc ggagctaacg cattaagttg
accgcctggg gagtacggcc gcaaggttga aactcaaaga
aattgacggg gaccgcaca agcgggtggag catgtggttt
aattcgatgc aacgcgaaga accttaccag gccttgacat
cctaggaact tggcagagat gccttgggtgc cttcggggaac
ctagagacag gtgttgcatg gctgtcgtca gctcgtgtcg

- 
- Cardiobacterium hominis* 16S riboso... 100%
 - *C.hominis* 16S ribosomal RNA 99%
 - *Cardiobacterium* sp. A 16S ribo 993 99%
 - Unidentified proteobacterium ... 98%
 - *Cardiobacterium valvarum* 16S ribos... 97%
 - *Cardiobacterium valvarum* strain CC... 97%
 - *Cardiobacterium valvarum* strain CC... 96%



Lanes 1-4, MRCoNS; lane 5, MSCoNS; lane 6, MSSA; lanes 7 and 8, MRSA; lane C, negative control

Γιατί να χρησιμοποιούμε την PCR?

- Μεγάλη ευαισθησία (1 copy – 10 copies DNA)
- Ανιχνεύει μικροοργανισμούς που δεν καλλιεργούνται
- Σύντομη μέθοδος (< 24 hrs)

Μειονεκτήματα της PCR

- Απαιτήσεις τεχνολογικές
- Κόστος
- Κίνδυνος επιμολύνσεων
- Αυστηρές συνθήκες εργασίας

Παρουσία DNA στο κλινικό δείγμα Έχει κλινική σημασία ?

- **Νεκρά ή ζωντανά μικροβιακά κύτταρα??**
- **Έλεγχος βιωσιμότητας του μικροοργανισμού**
εκχύλιση RNA από το κλινικό δείγμα, RT-PCR

real-time real-time
real-time PCR
real-time
hardware

- Intuitive programming
- Fast and accurate performance
- Flexibility for multiple users
- Small footprint

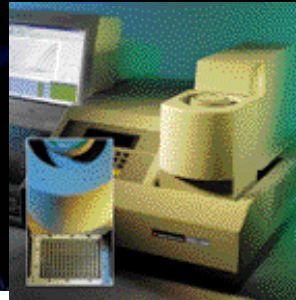


The optical module fits on the iCycler base unit, offering you Real Time Quantitative PCR* capability.

iCycler
BioRad



LightCycler
Roche



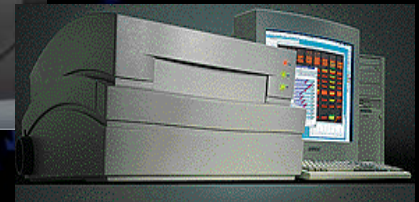
5700
Applied Biosystems



7700
Applied Biosystems



FluorTracker
Stratagene



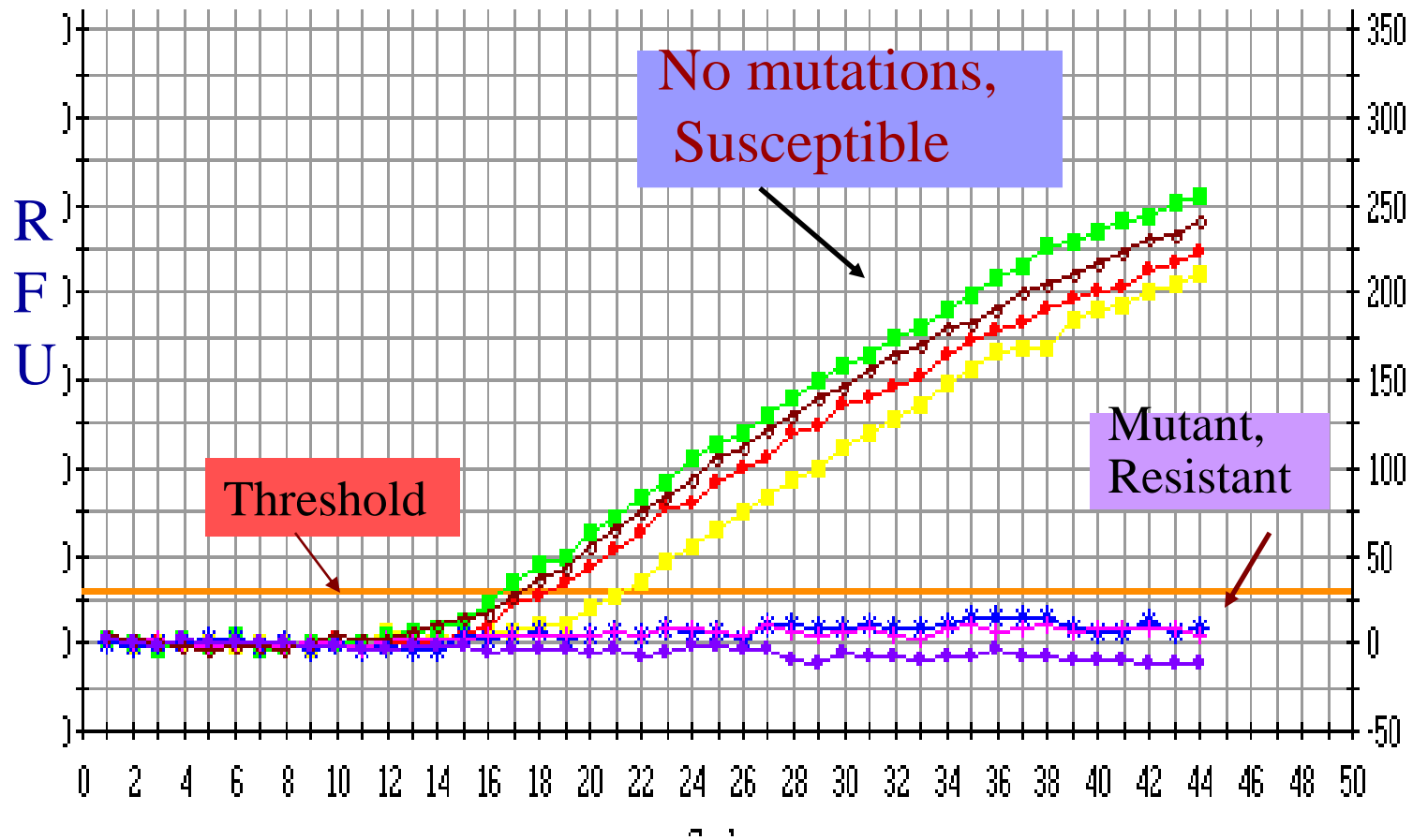
FluorImager
Molecular Dynamics

real-time real-time
real-time



- Προσδιορισμός πραγματικού χρόνου
- Ποσοτικό αποτέλεσμα
- ανιχνευτές που υβριδοποιούνται
- Προσδιορισμός 2 στόχων
- επαναληψιμότητα (CV < 2.0 %)
- χρήση τριχοειδών (10-20ul)
- πολλά δείγματα / 60 minutes
- Κλειστό σύστημα-επιμολύνσεις;

Παράδειγμα ΜΤΒ

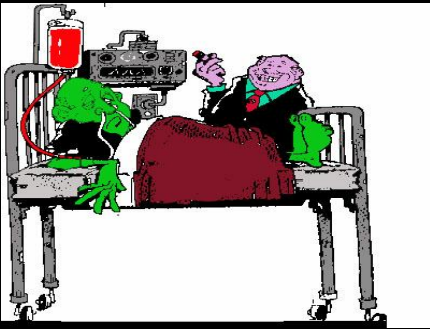


Μειονεκτήματα της *REAL-TIME PCR*

- Περιορισμός στον αριθμό των στόχων που προσδιορίζονται (δύο).
- Η ανάπτυξη νέου πρωτοκόλλου απαιτεί γνώσεις και ικανότητες
- Υψηλό κόστος

Επιδημιολογική μελέτη Ευρωπαϊκή Ένωση

6,1 - 9,9 %



των νοσηλευομένων ασθενών έχουν
ενδονοσοκομειακή λοίμωξη

αίτιο

- Πολυανθεκτικά στελέχη
- Ανοσοκαταστολή

Πολυανθεκτικά παθογόνα βακτήρια:

- MRSA / CA-MRSA
- MR-CNS
- VRE
- *C. difficile*
- MDR GN
 - ESBL producing organisms

M.J. Struelens et al. / *Microbes and Infection* 6 (2004) 1043–1048

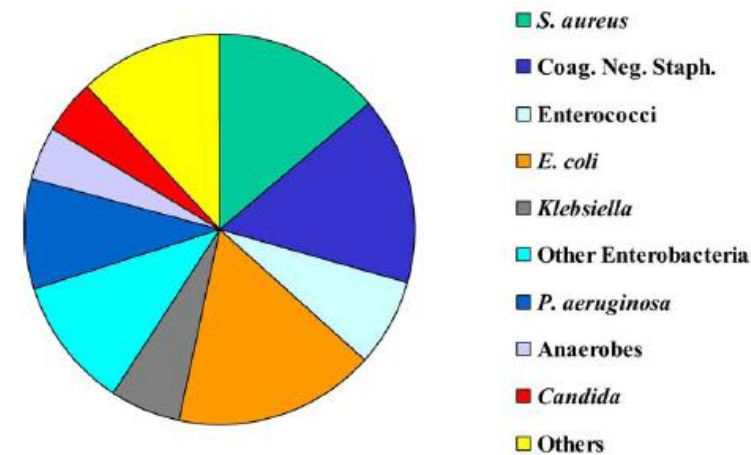
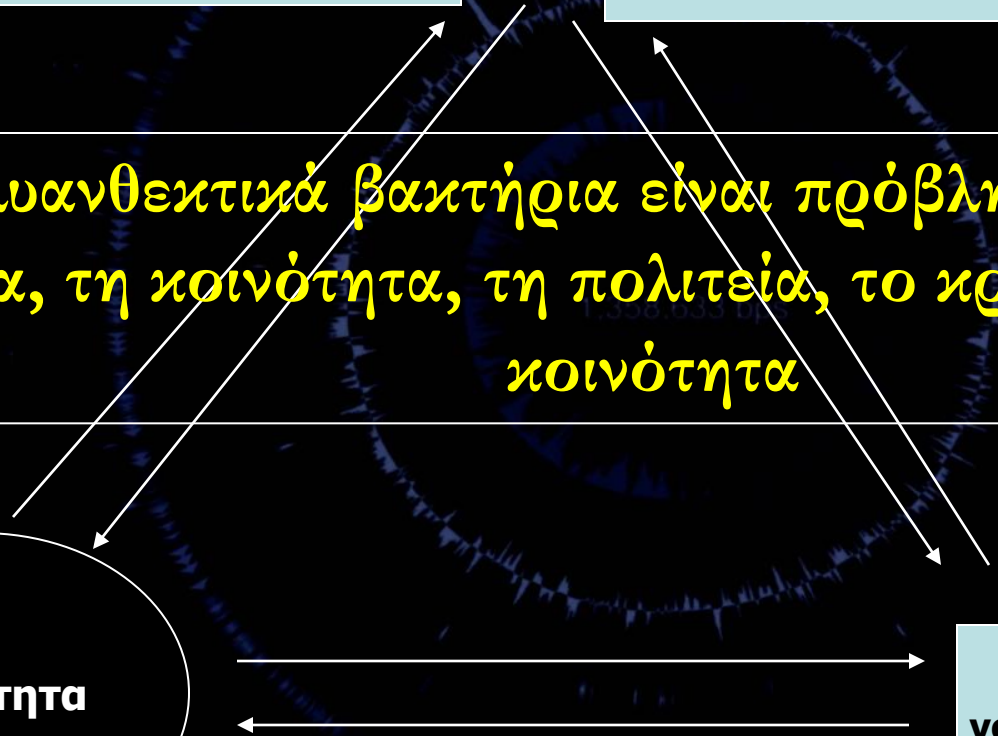


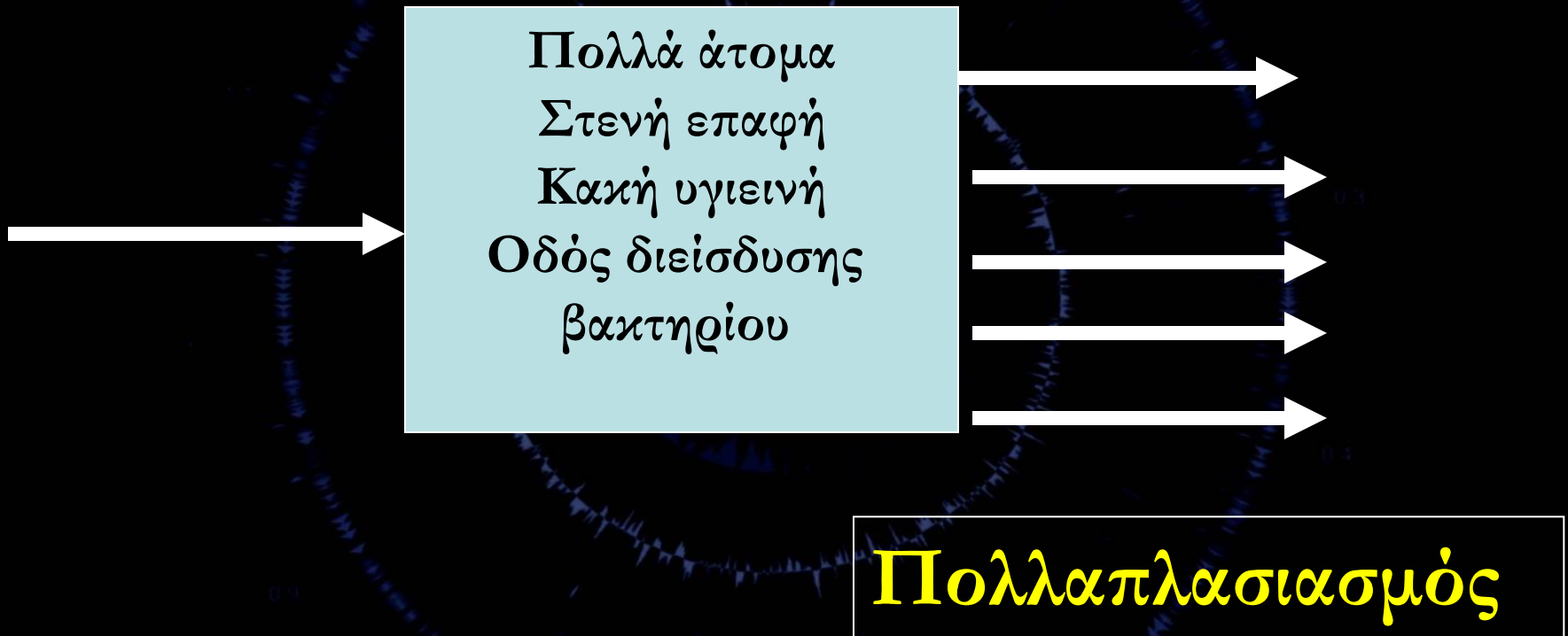
Fig. 1. Microorganisms causing nosocomial bacteraemia, Erasme Hospital, 2002.



Τα πολυανθεκτικά βακτήρια είναι πρόβλημα που αφορά τα ιδρύματα, τη κοινότητα, τη πολιτεία, το κράτος και τη διεθνή κοινότητα



Ποια είναι τα κοινά στοιχεία των επιδημιών;



Νοσοκομειακή λοίμωξη

Εκδήλωση κατά την νοσηλεία



1,358,633 bps

Διαπίστωση κλινικών σημείων λοιμώξεως

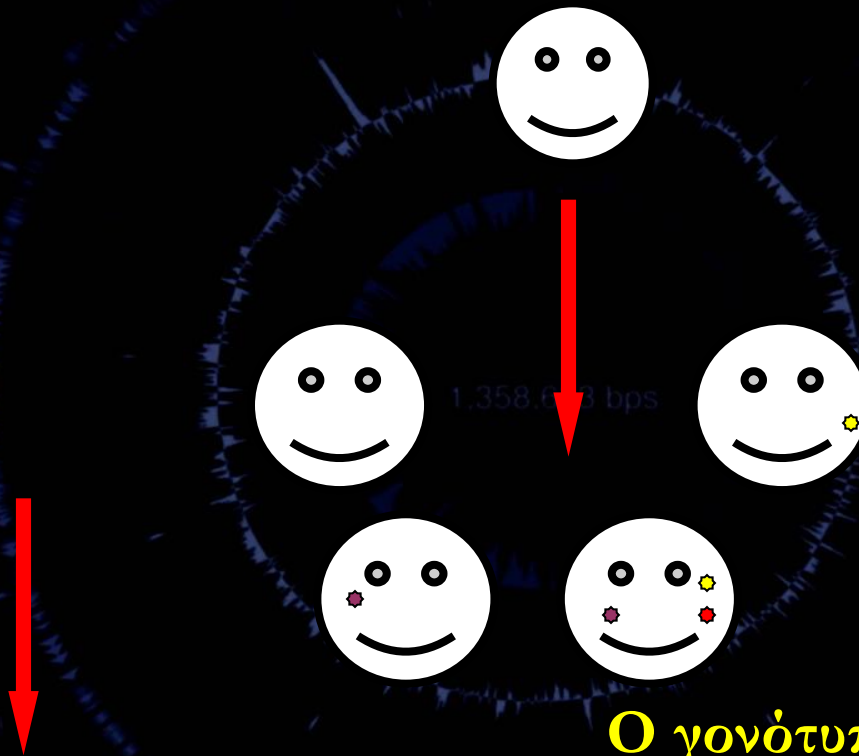
*Απομόνωση μικροοργανισμών από
στείρα κλινικά υλικά*

ΤΙ ΚΑΘΟΡΙΖΟΥΝ ΟΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ;



- Αριθμό κλώνων που διασπείρονται στο νοσοκομείο
- Αριθμό κλώνων που ενέχονται σε λοιμώξεις
- Πηγή διασποράς του κλώνου
- Τρόπους διασποράς

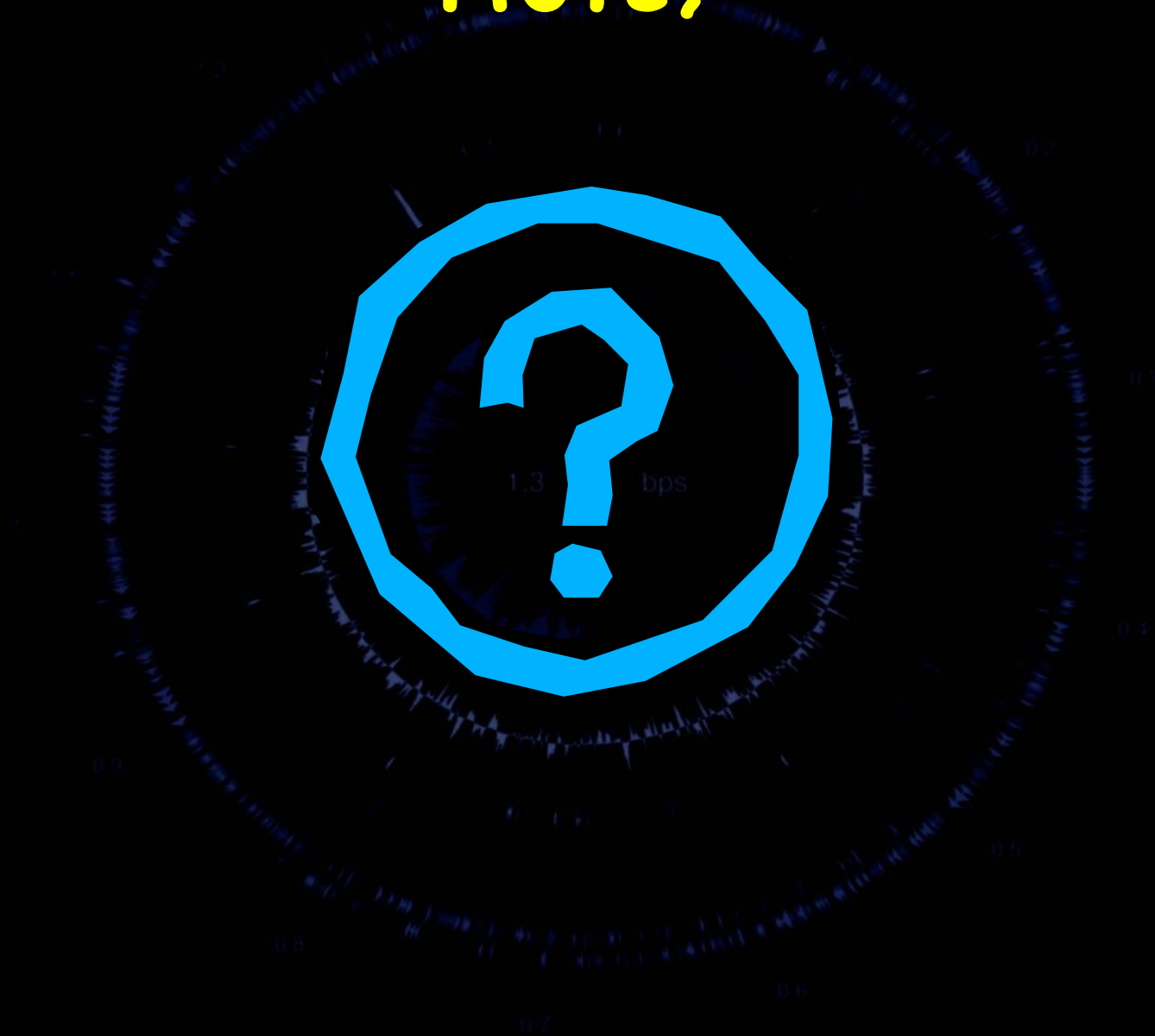
Τι είναι ο κλώνος;



Τα θυγατρικά κύτταρα είναι πιστά αντίγραφα (?) των μητρικών!

Ο γονότυπος πρέπει να συμβάλλει και στην κατανόηση της εξέλιξης των βακτηρίων και στην ταξινόμησή τους

Πότε;



MRSA

ISOLATE

?

VRE



Pulsed - Field Gel Electrophoresis PFGE

Ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό
πεδίο

Περιοριστικά ένζυμα με λίγες θέσεις
αναγνώρισης (π.χ. *SmaI* σε Gram-θετικούς
κόκκους)

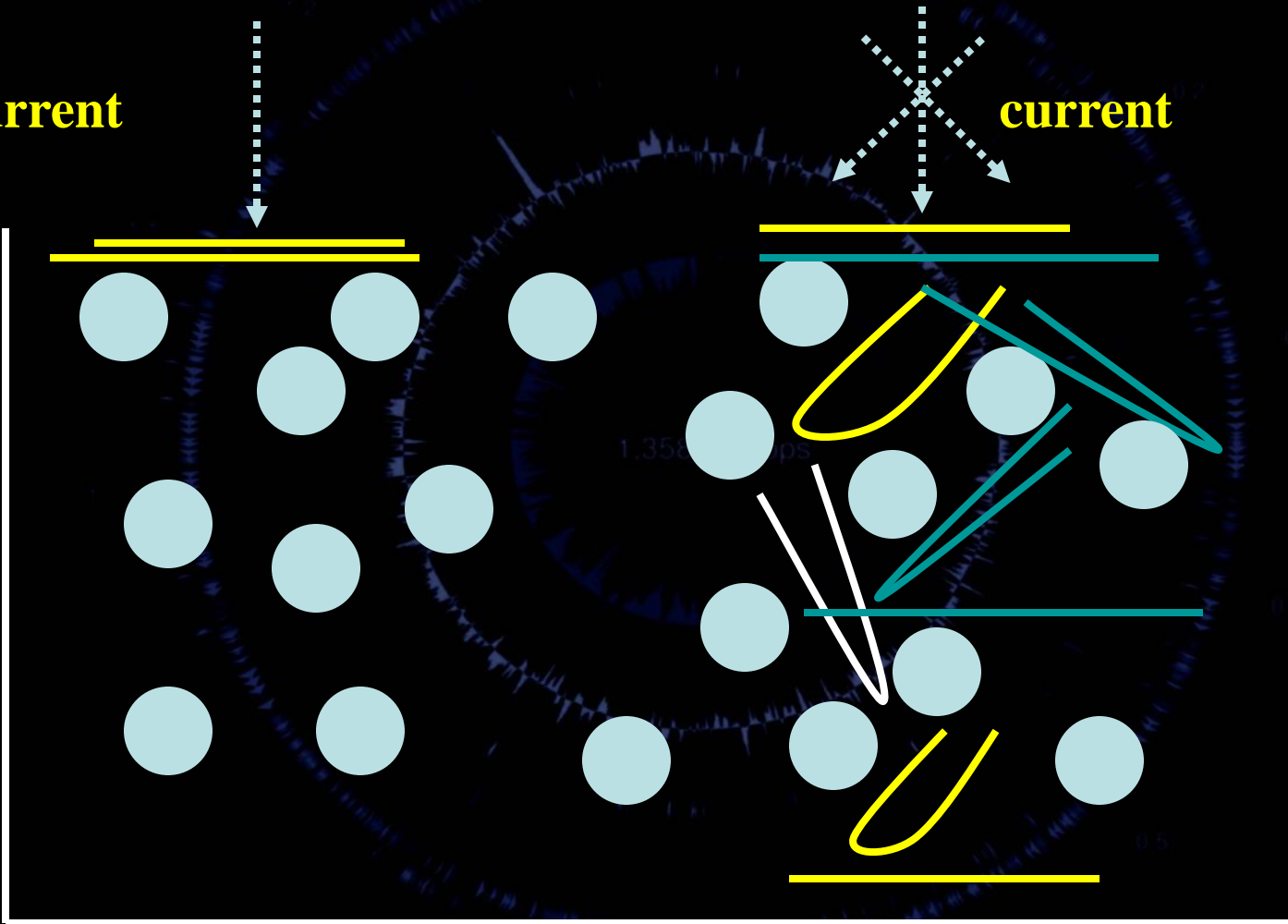
- Ανάλυση σε αгарόζη με ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο πεδίο

classical electrophoresis

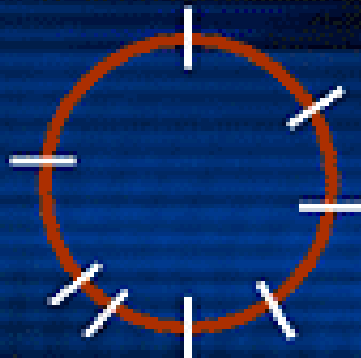
PFGE

current

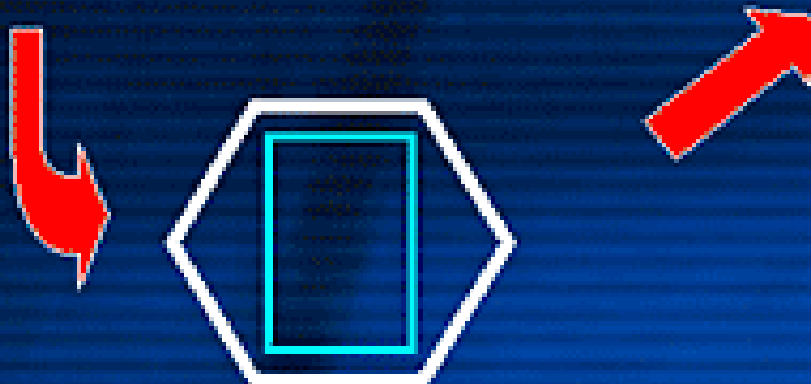
current



Pulsed-Field Gel Electrophoresis

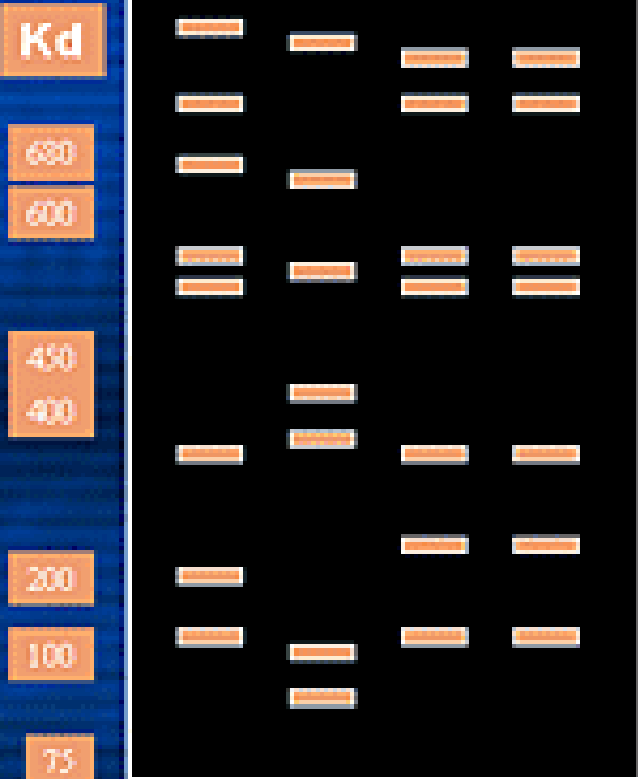


Bacterial chromosomal DNA
Cleaved with an enzyme

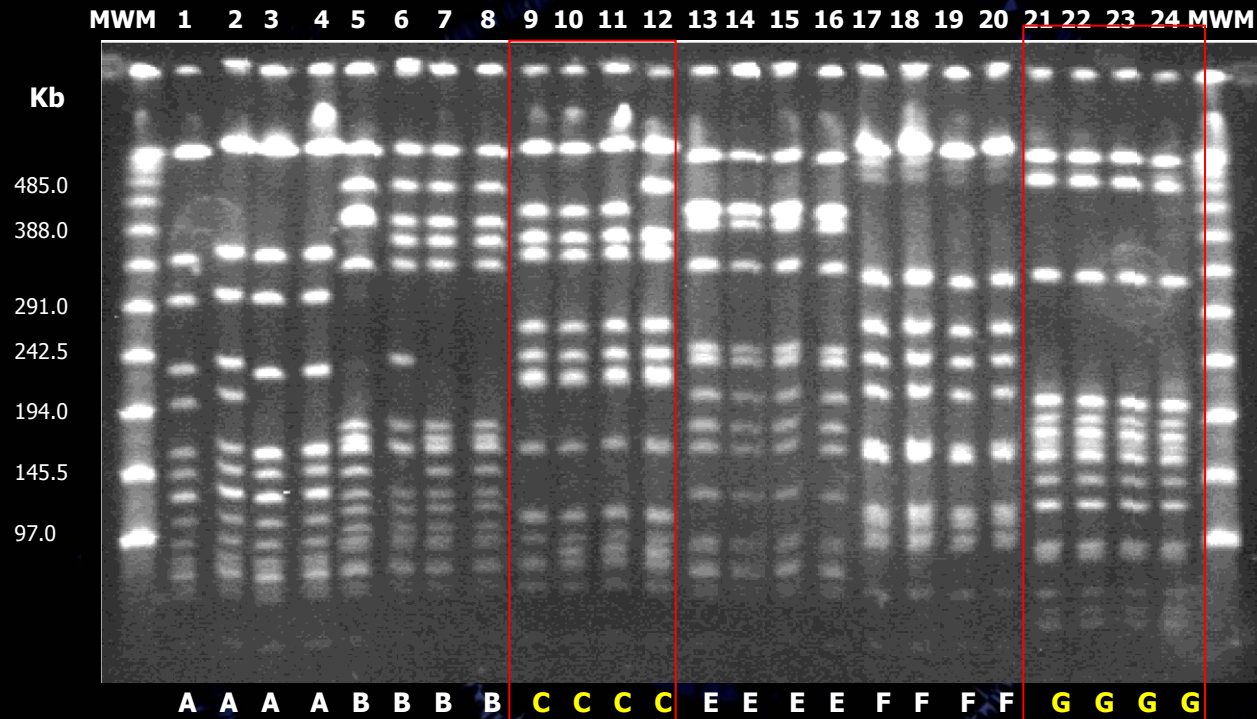


Electrophoresis chamber
Separates DNA fragments

Each lane = one organism



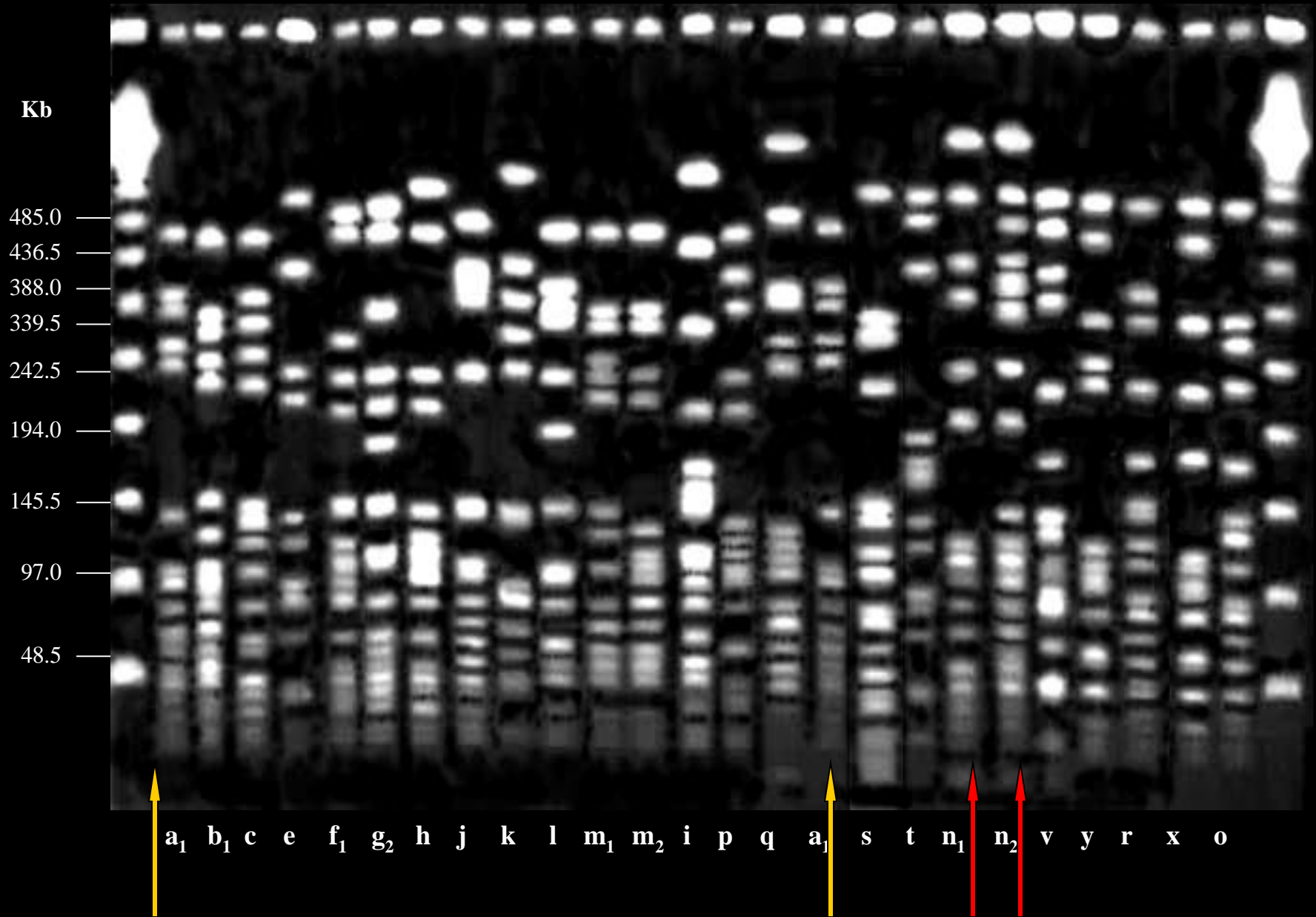
Κλώνοι MRSA στο ΠΓΝΠ



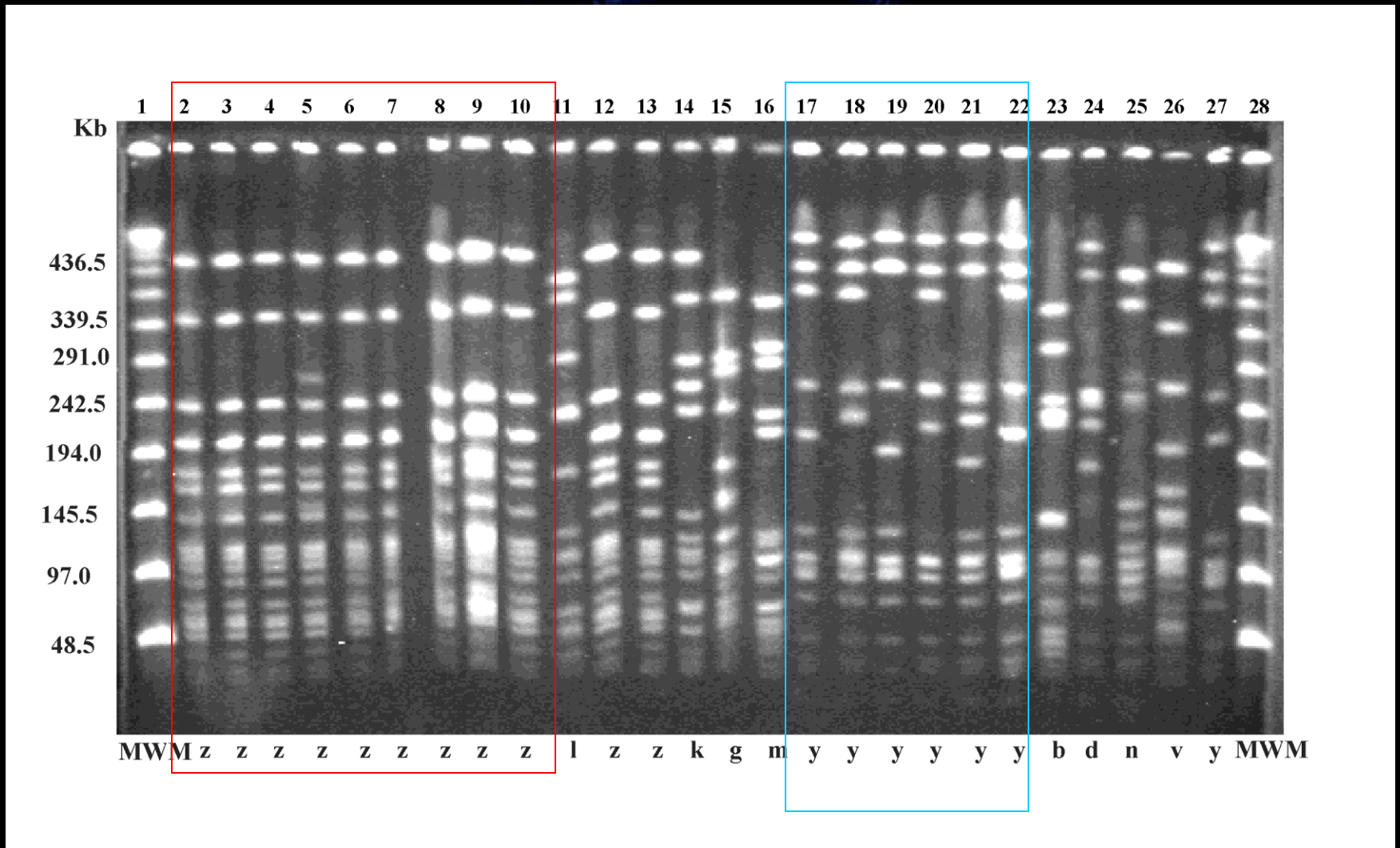
PVL-θετικά

Τυποποίηση MRSE με PFGE

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27

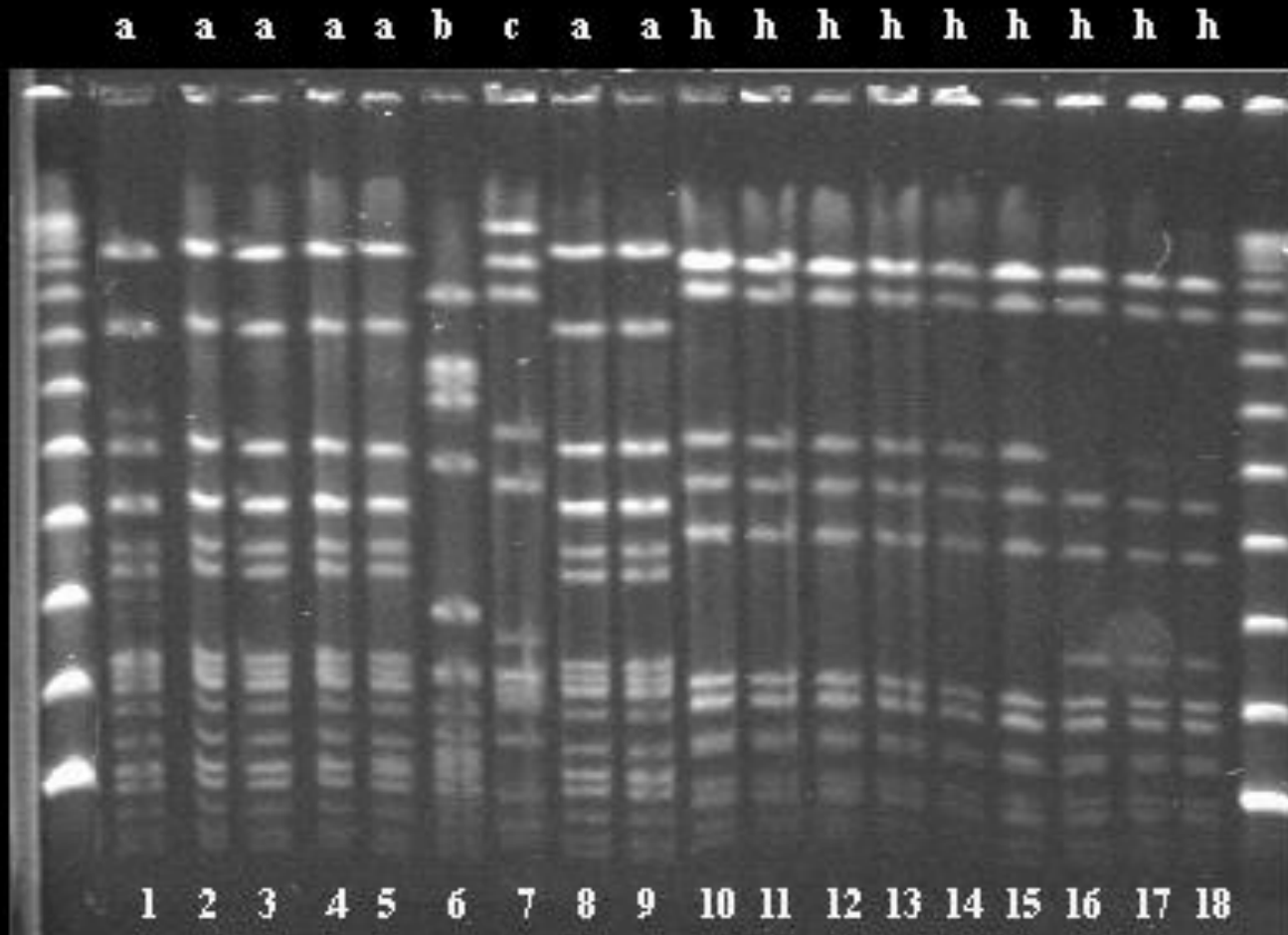


Στη ΜΕΘ νεογνών ΠΓΝΠ 132 MR-CNS: 115 MRSE, 16 MR-*S. haemolyticus* και 1 MR-*S. hominis* (117 slime +)



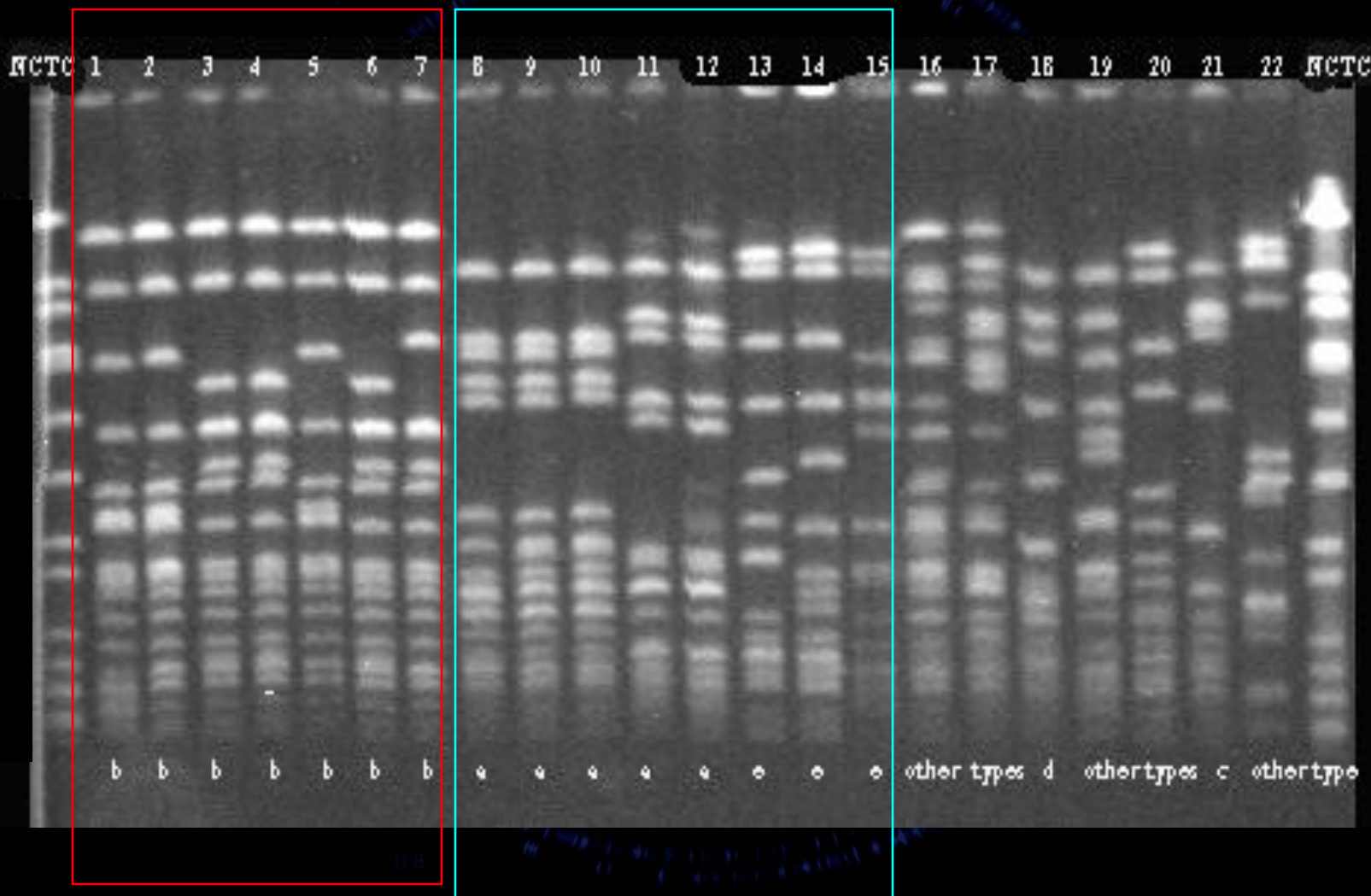
Ανάλυση με PFGE χρωμοσωμικού DNA μετά από επίδραση με *Sma*I

Μονάδα νεογνών 2006-2007



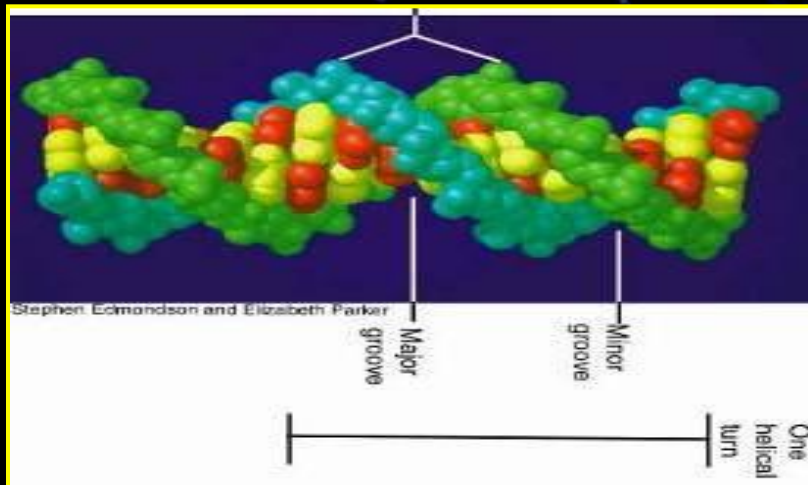
Γραμμές 1-6 και 8-9: *S. epidermidis*. Γραμμές 7 και 10-18: *S. haemolyticus*

Κλώνοι MRSE από βακτηριαίμιες σε ΠΓΝΠ και ΠΠΓΝΙ



ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

- **Μονοτοπική ανάλυση**
 - *SCCmec*: staphylococcal chromosome cassette
 - *sra* typing: γονίδιο που κωδικοποιεί τη πρωτεΐνη A
- **Πολυτοπική ανάλυση**
 - **MLST**: multi locus sequence typing



MLST:

Σύγκριση αλληλουχίας άγνωστου στελέχους με πρότυπο

HT20060998

CACGAAACCGACGAAGAGAATTACAAAAAGCGCATGCTATTTTCAAACATGGTATGACA
CACGAAACAGATGAAGAAATTAACAAAAAGCGCACGCTATTTTCAAACATGGAATGACT

tpi



Μικρόβια για τα οποία εφαρμόζεται η MLST (mlst.net)

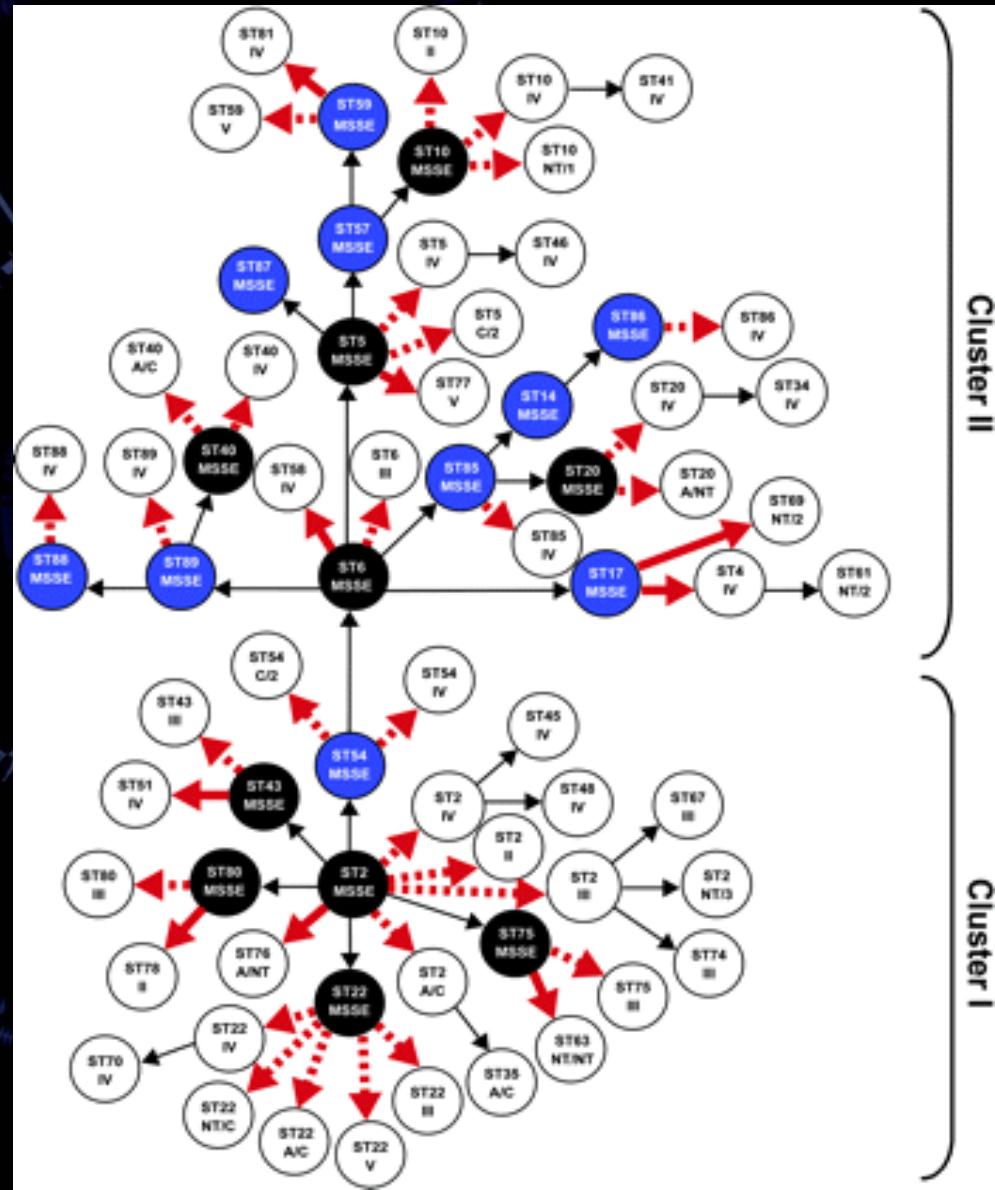
- *B. burgdorferi*
- *B. cereus*
- *B. pseudomallei*
- *C. albicans*
- *C. glabrata*
- *C. krusei*
- *C. tropicalis*
- *C. jejuni*
- *C. neoformans var grubii*
- *E. coli*
- *E. faecalis*
- *E. faecium*
- *H. influenzae*
- *H. pylori*
- *Leptospira spp*
- *M. catarrhalis*
- *N. meningitidis*
- *S. agalactiae*
- ***S. aureus***
- *S. enterica*
- ***S. epidermidis***
- *S. pneumoniae*
- *S. pyogenes*
- *S. suis*
- *V. vulnificus*

Γονίδια-στόχος για MLST

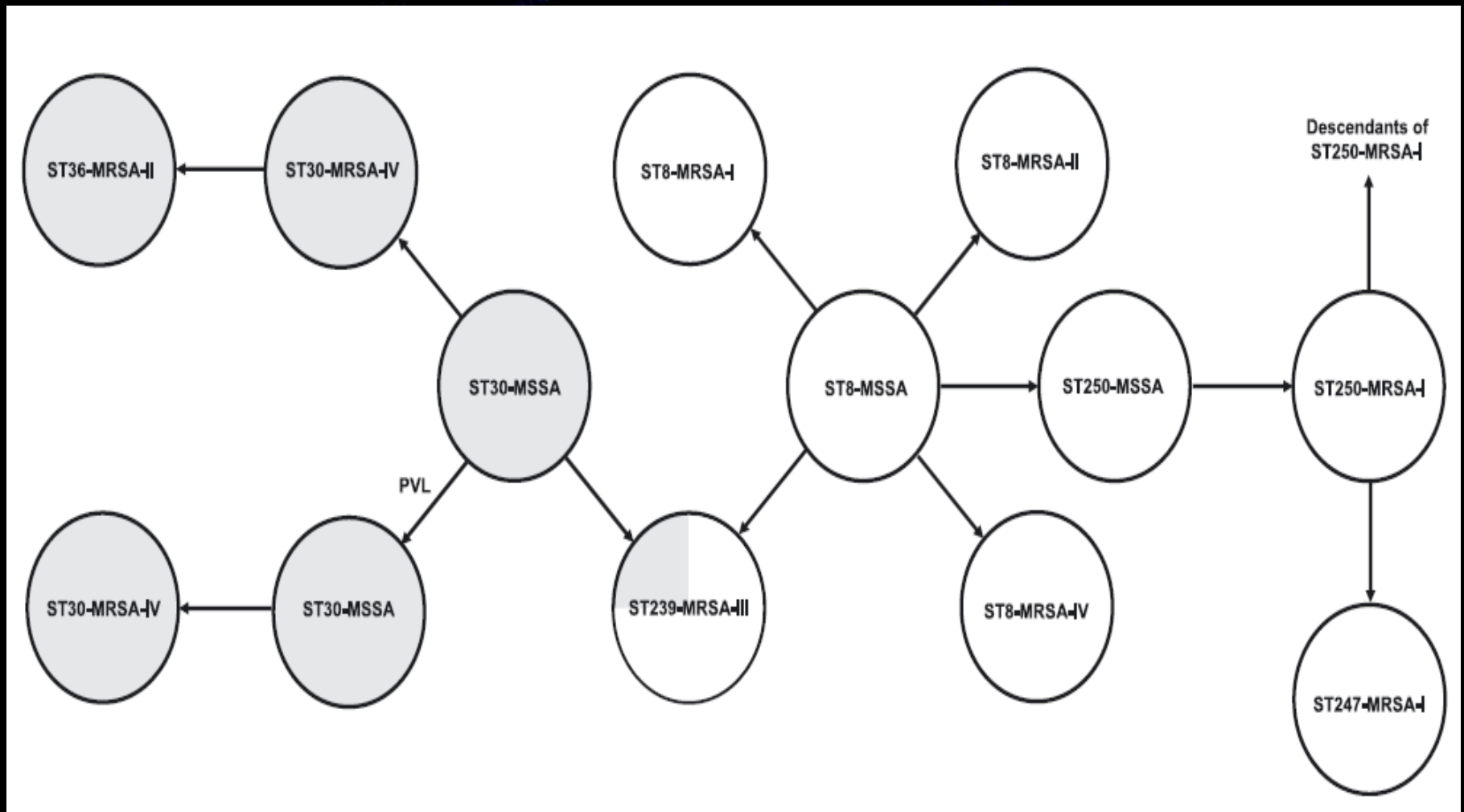
- *S. epidermidis*
 - Carbamate Kinase (*arcC*)
 - Shikimate dehydrogenase (*aroE*)
 - ABC transporter (*gtr*)
 - DNA mismatch repair protein (*mutS*)
 - Pyrimidine operon regulatory protein (*pyrR*)
 - Triosephosphate isomerase (*tpiA*)
 - Acetyl coenzyme A acetyltransferase (*yqiL*)
- *S. aureus*
 - Carbamate kinase (*arcC*)
 - Shikimate dehydrogenase (*aroE*)
 - Glycerol kinase (*glpF*)
 - Guanylate kinase (*gmk*)
 - Phosphate acetyltransferase (*pta*)
 - Triosephosphate isomerase (*tpi*)
 - Acetyl coenzyme A acetyltransferase (*yqiL*)

Εξέλιξη των κλώνων MRSE

56 προσλήψεις της περιοχής *SCC_{mec}*



Staphylococcus aureus



Κλωνικά σύμπλοκα *S. aureus*

ST377

ST239

CC22

CC30

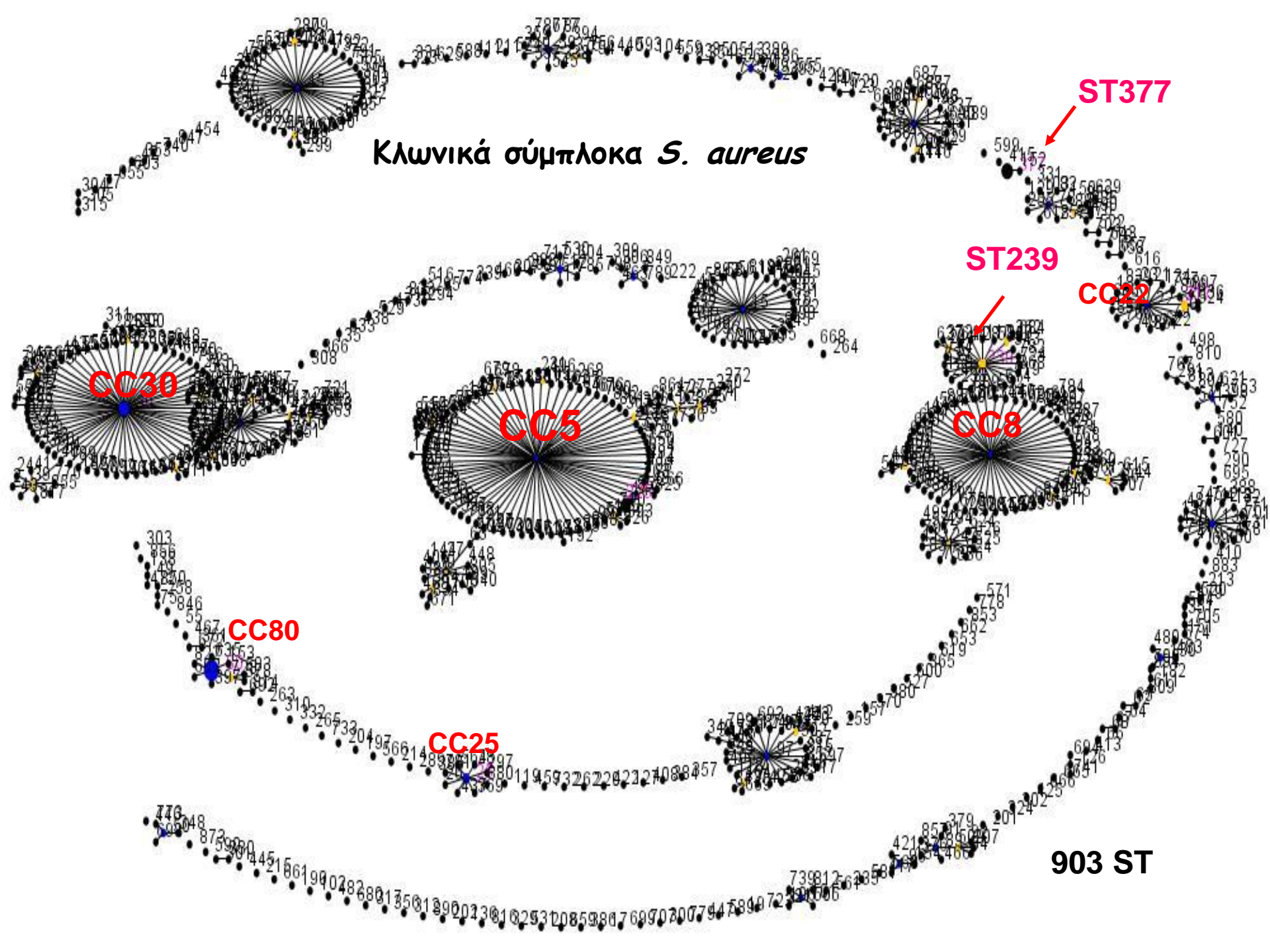
CC5

CC8

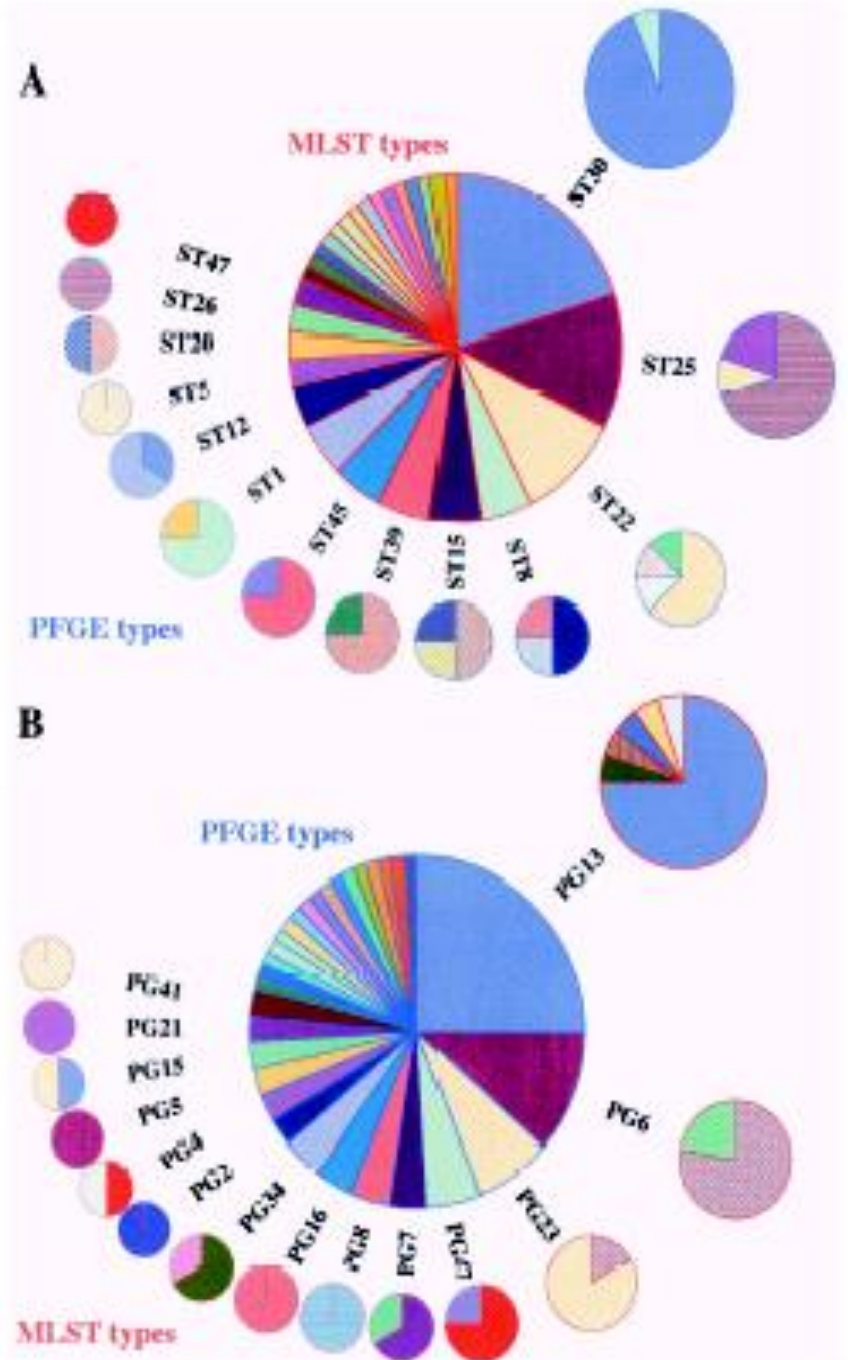
CC80

CC25

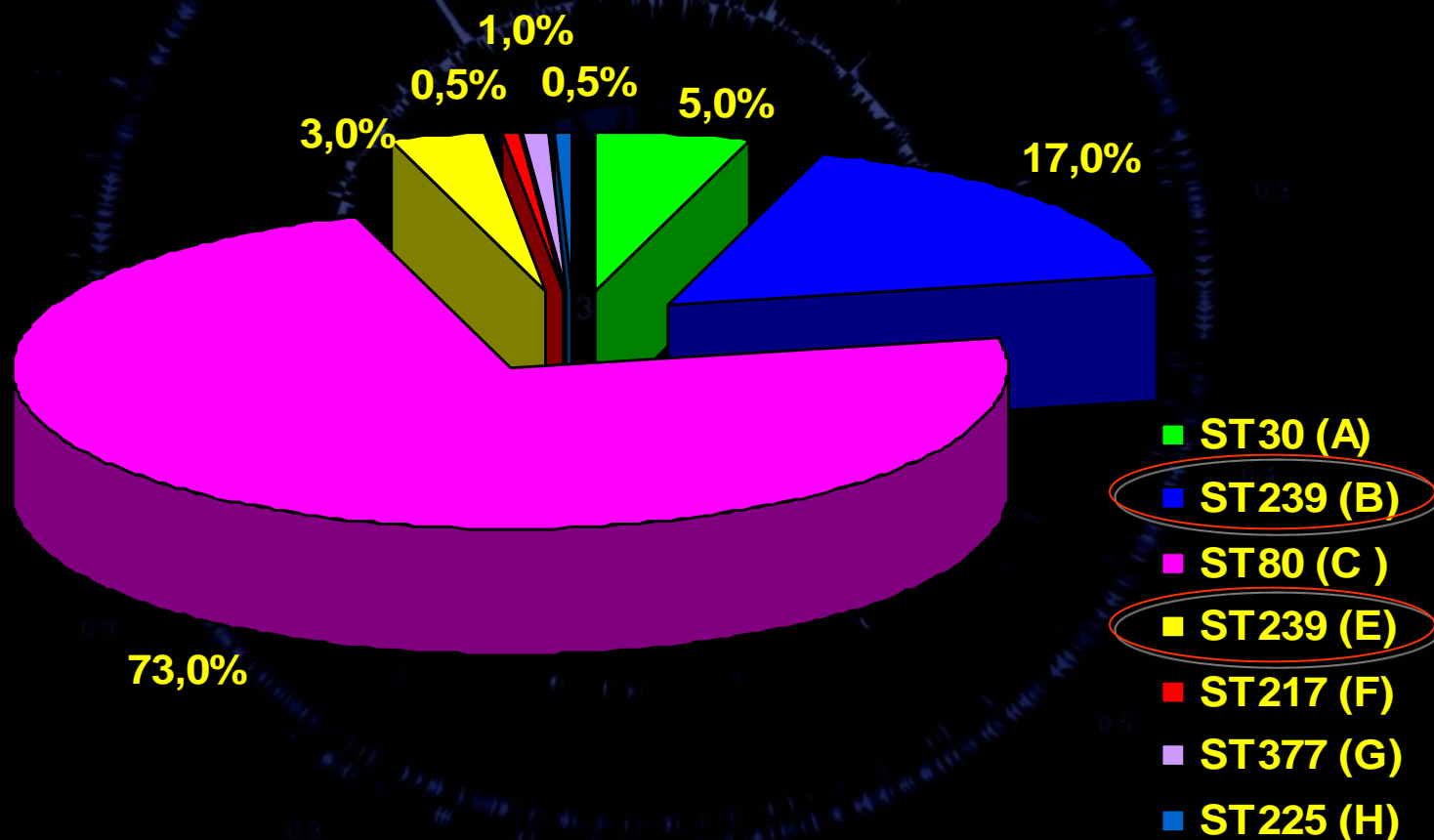
903 ST



Διαχωρισμός
στελεχών που
ανήκουν στον ίδιο
τύπο MLST (A)
και διαχωρισμός
στελεχών που
ανήκουν στον ίδιο
τύπο PFGE (B)
JCM:40:3764



Κλώνοι MRSA από 2001-2006



Μέθοδος

PFGE

MLST

επαναληψιμότητα

+++

+++

**διαχωριστική
ικανότητα**

+++

++++

εξοπλισμός

++

+

χρόνος

++

+++



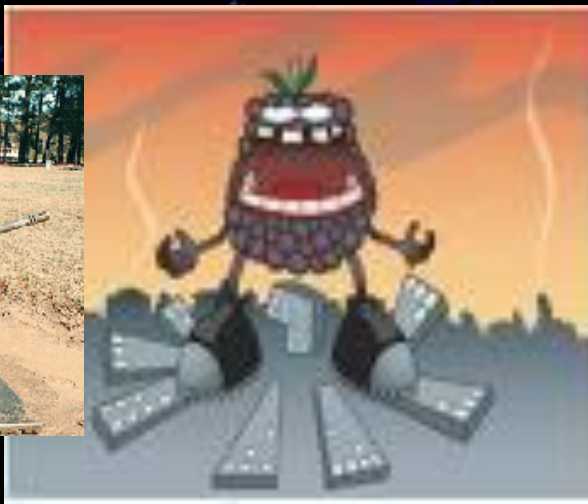
Επιλογή μεθόδου



- Σε περιορισμένη έκταση (νοσοκομείο):
PCR
- Σε μεγαλύτερη περιοχή: **PCR και PFGE**
- Διεθνώς: ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, ενός ή πολλαπλών γονιδίων.

Ανάγκη επιδημιολογικής επιτήρησης για λοιμώξεις!!

- Έλεγχος λοιμώξεων παγκόσμια
- Προσδιορισμός ομολογίας και πολυμορφισμού μεταξύ των βακτηρίων
- Μελέτη της εξέλιξης των βακτηρίων
- Συνεργασία σε παγκόσμια κλίμακα



Πότε;

- Ταυτοποίηση βακτηριακών κλώνων
- Ομαδοποίηση
- Συγκριτική μελέτη στελεχών
- Άμεση συσχέτιση με επιδημιολογικά στοιχεία

ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ

ΜΥΘΟΣ
ή
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ???

Ερωτήματα

- Εφαρμογή στο εργαστήριο ρουτίνας και σε ποιες περιπτώσεις ???
- Κόστος??
- Εμπορικά kits ή *in house* μέθοδοι??



Πλεονεκτήματα των μοριακών τεχνικών έναντι των κλασσικών τεχνικών στη διάγνωση

- Ταχύτητα στην ανίχνευση-ταυτοποίηση του λοιμογόνου παράγοντα
- Σημαντική βοήθεια στη κατανόηση της παθογένειας των λοιμώξεων
- Ανίχνευση νέων παθογόνων

Μειονεκτήματα των μοριακών τεχνικών έναντι των κλασσικών τεχνικών

- υψηλό κόστος
- εξειδικευμένο προσωπικό
- κατάλληλος εξοπλισμός

1.358.633 bps



Αξιολόγηση του αποτελέσματος

- Απαιτεί εμπειρία
- Συνδυασμό με τα αποτελέσματα των κλασσικών-φαινοτυπικών μεθόδων
- Επικοινωνία με τον κλινικό ιατρό

