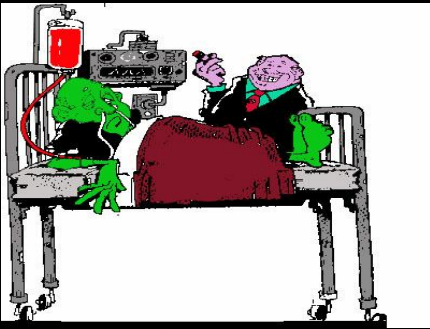


# Επιδημιολογική μελέτη Ευρωπαϊκή Ένωση

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

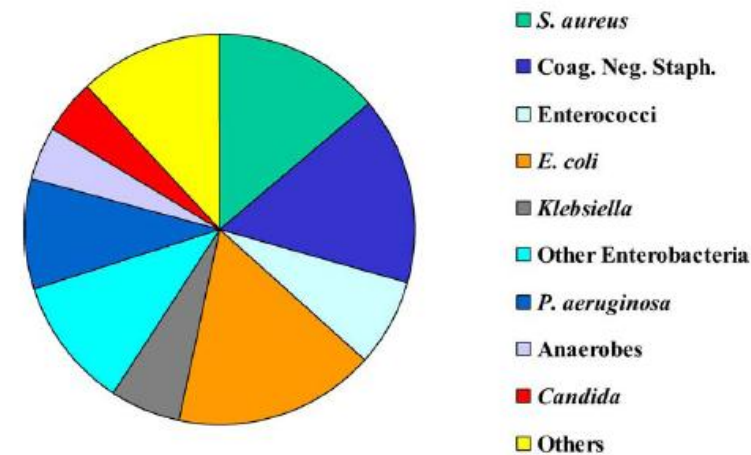


Fig. 1. Microorganisms causing nosocomial bacteraemia, Erasme Hospital, 2002.



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*

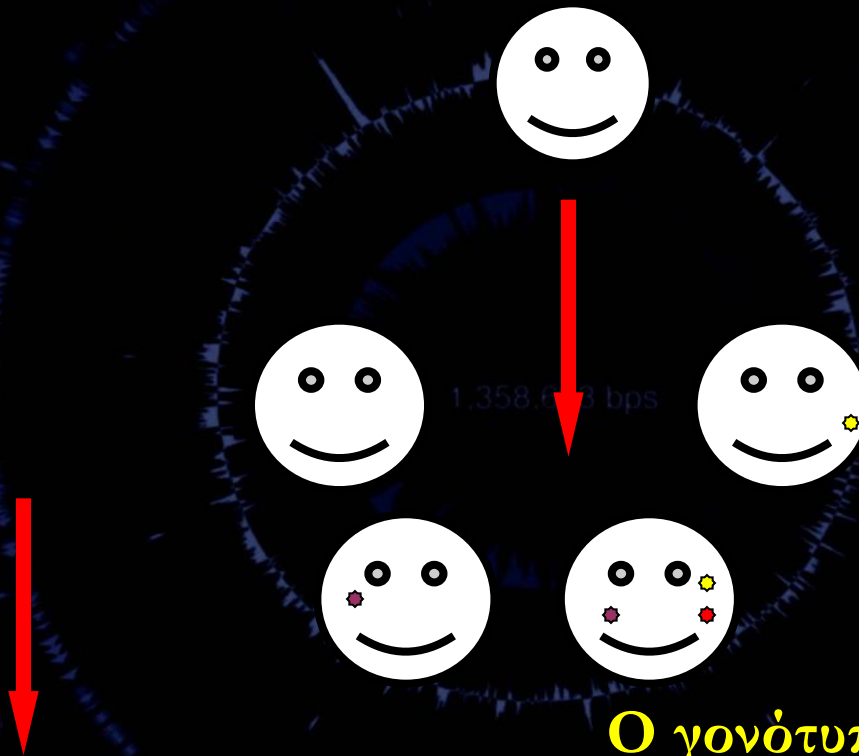
*Απομόνωση μικροοργανισμών από  
στείρα κλινικά υλικά*

# 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;

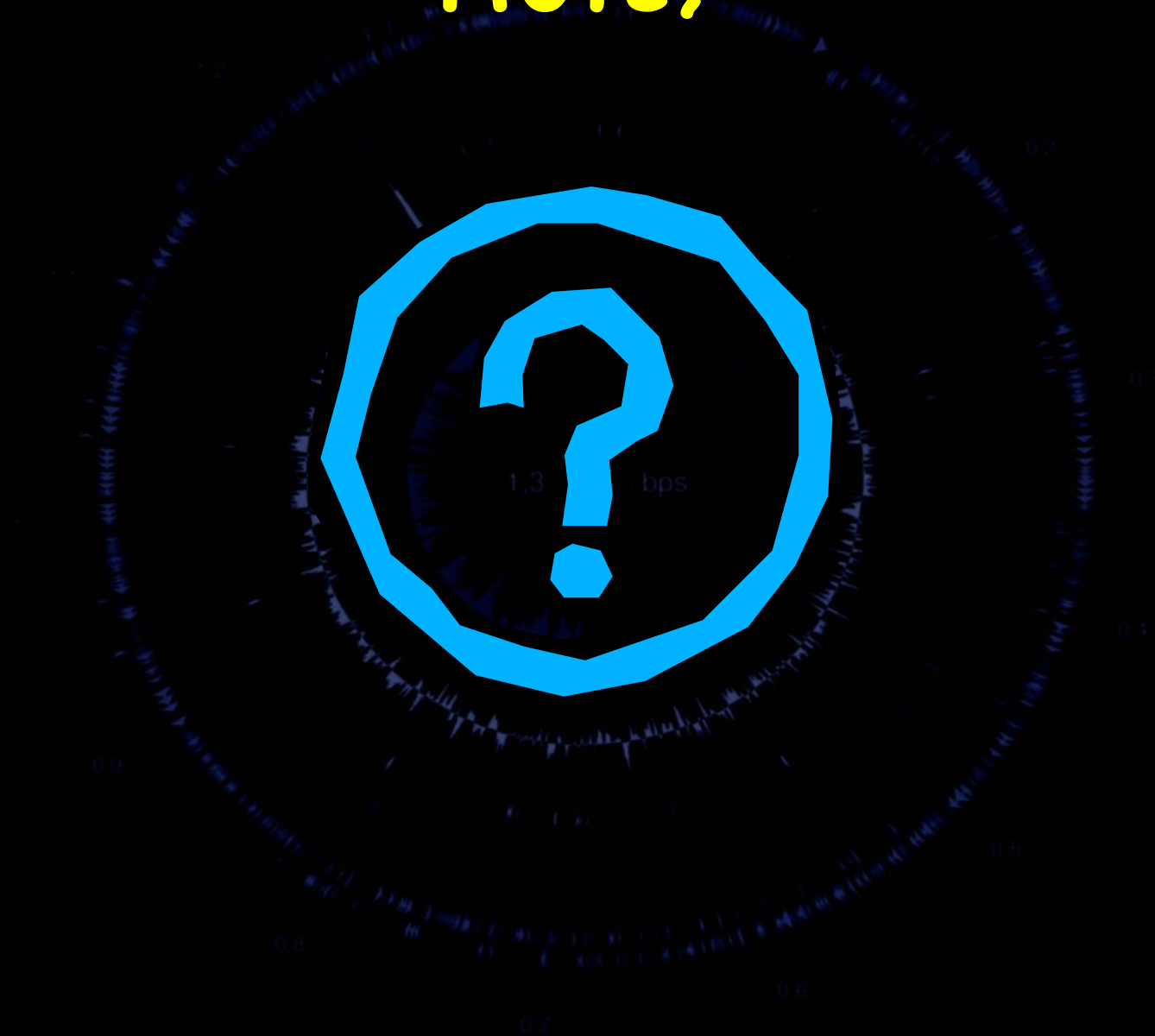


Τα θυγατρικά κύτταρα είναι πιστά αντίγραφα (?) των μητρικών!

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)

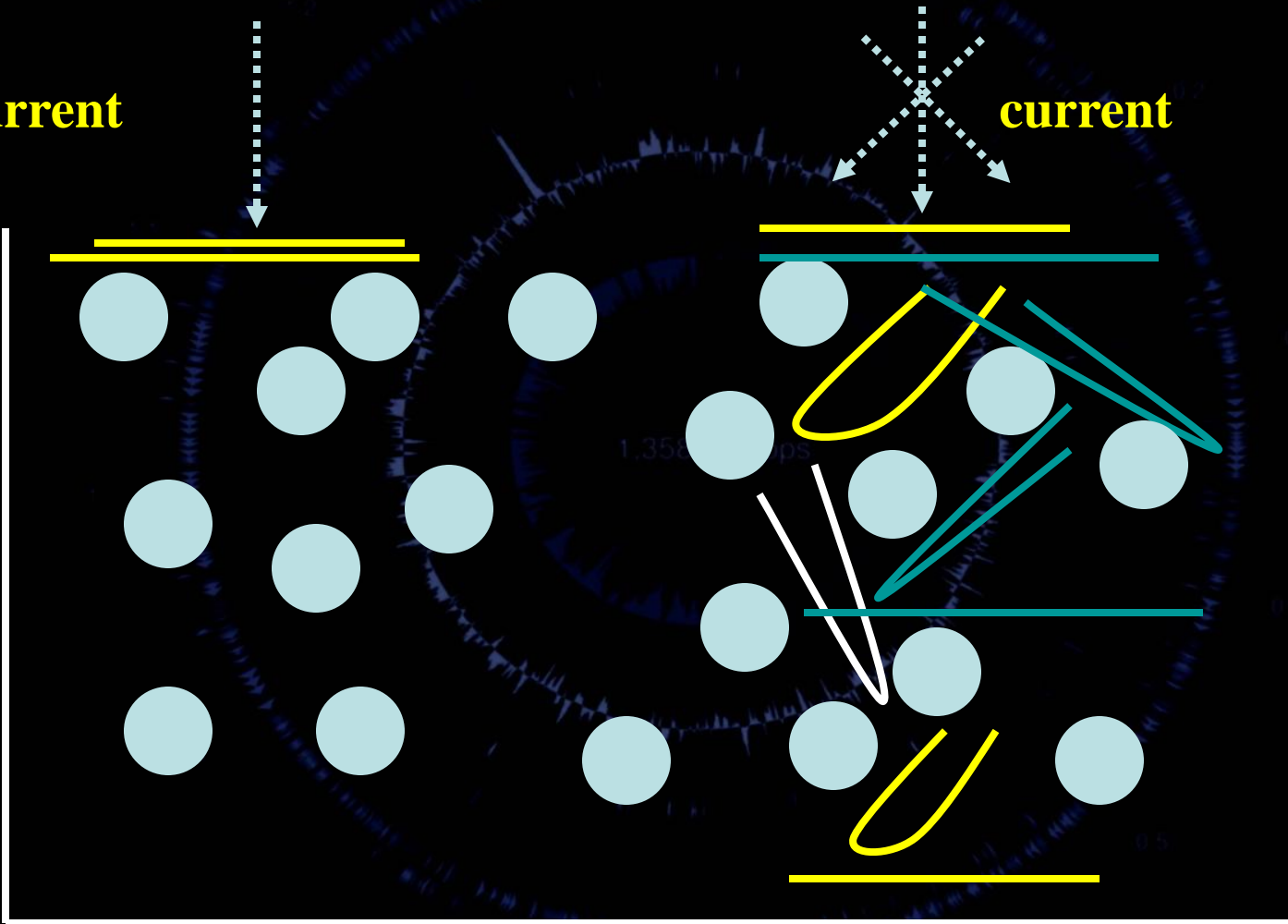
- Ανάλυση σε αгарόζη με ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο πεδίο

# classical electrophoresis

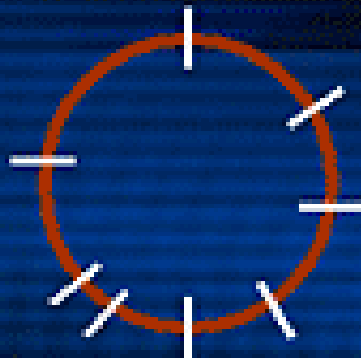
# PFGE

current

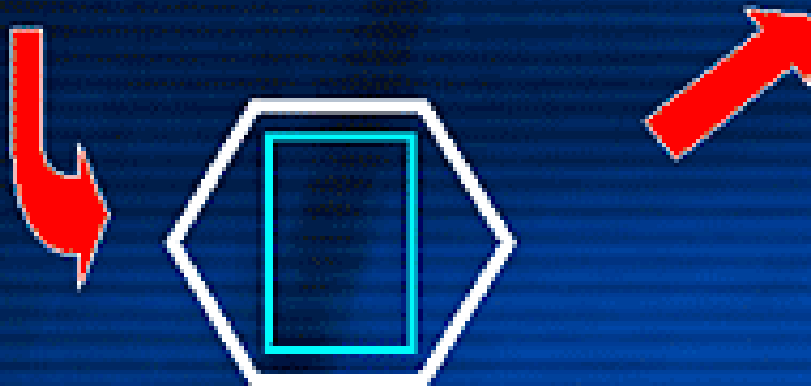
current



# Pulsed-Field Gel Electrophoresis

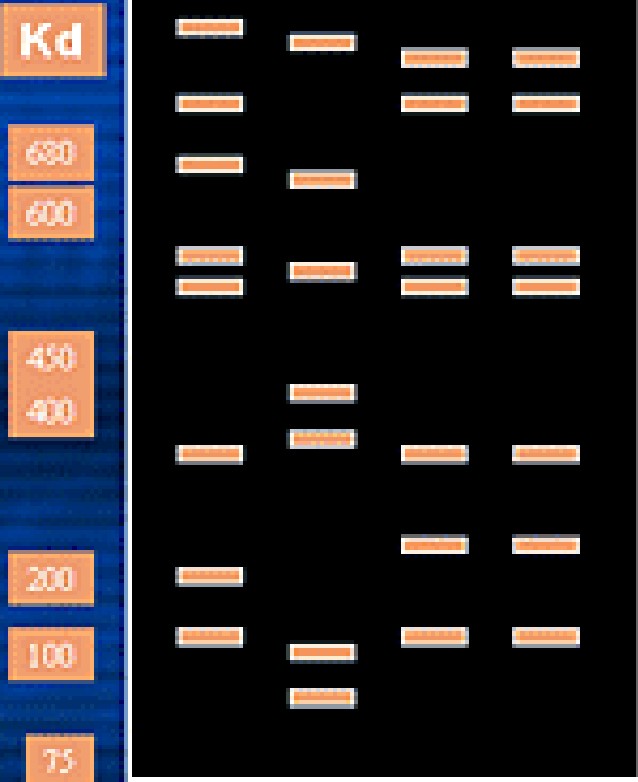


Bacterial chromosomal DNA  
Cleaved with an enzyme

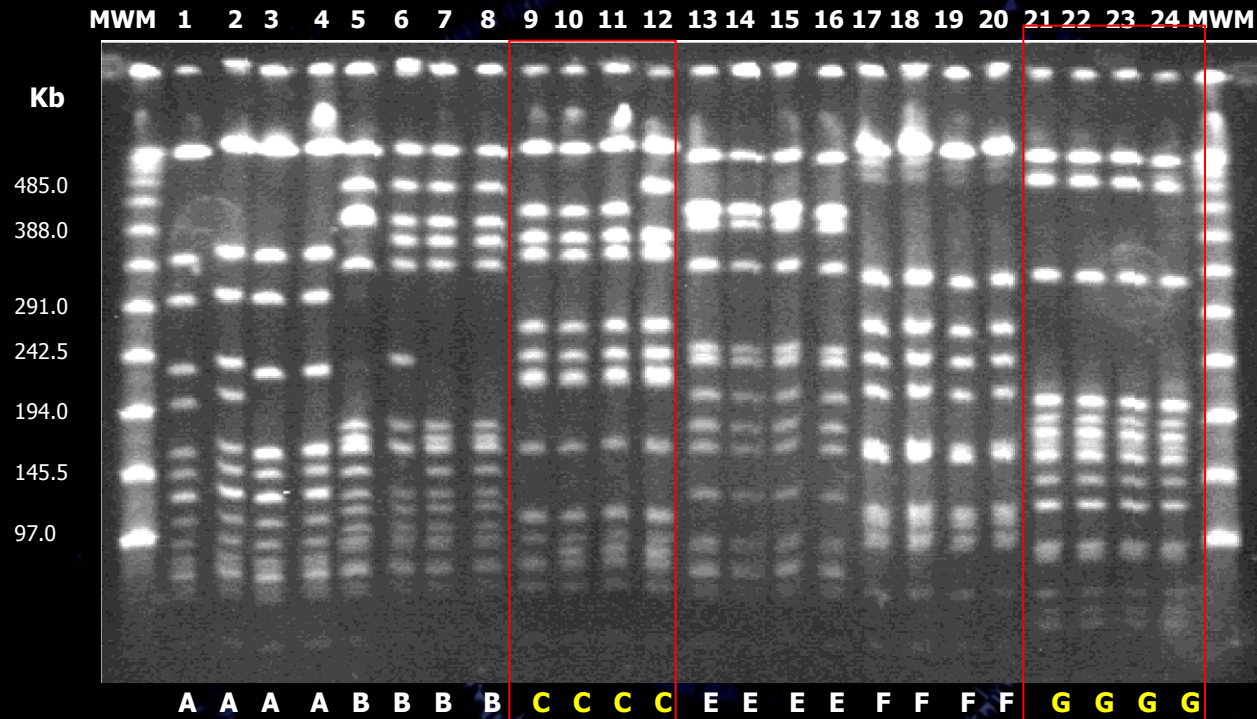


Electrophoresis chamber  
Separates DNA fragments

Each lane = one organism



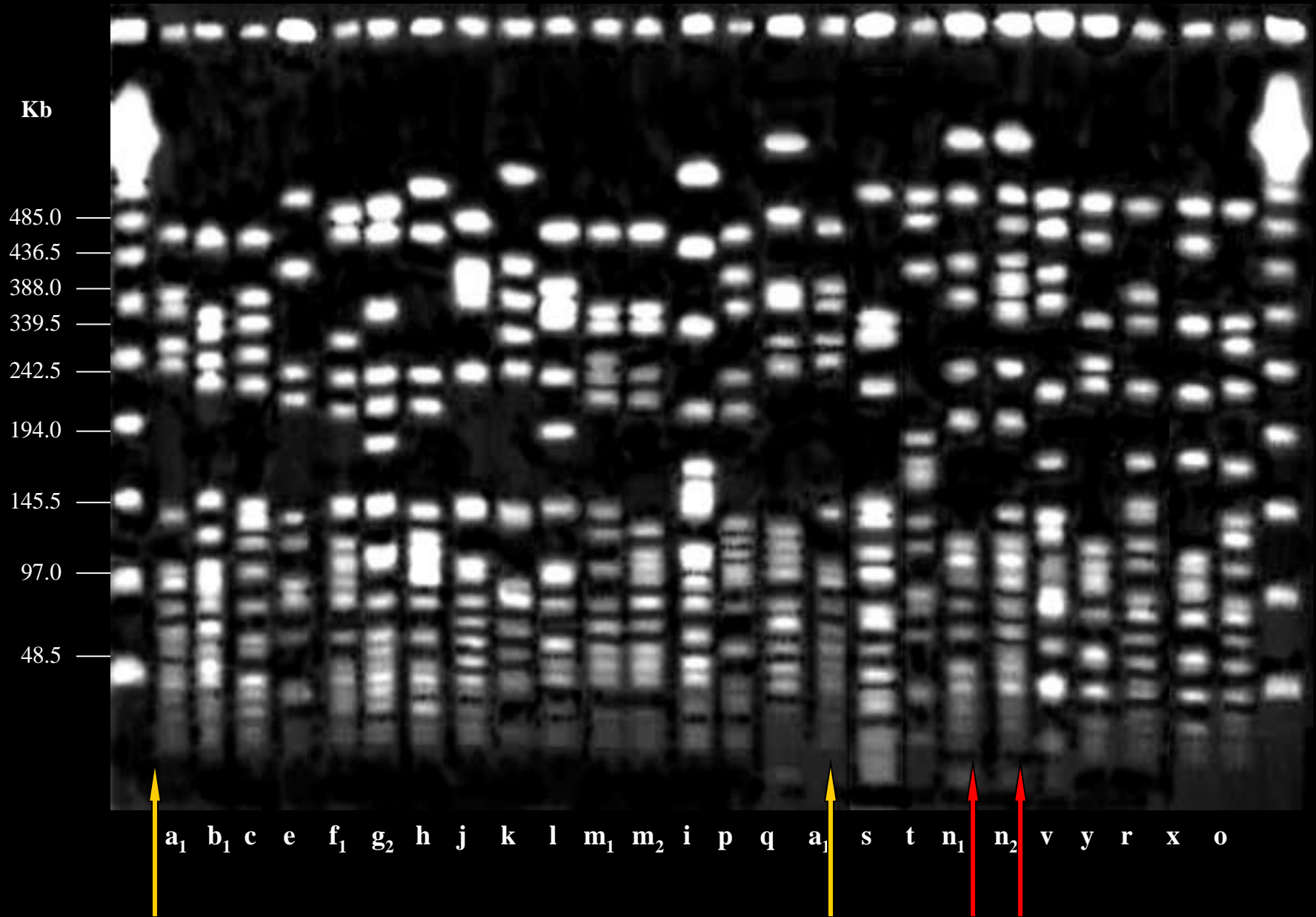
# Κλώνοι MRSA στο ΠΓΝΠ



**PVL-θετικά**

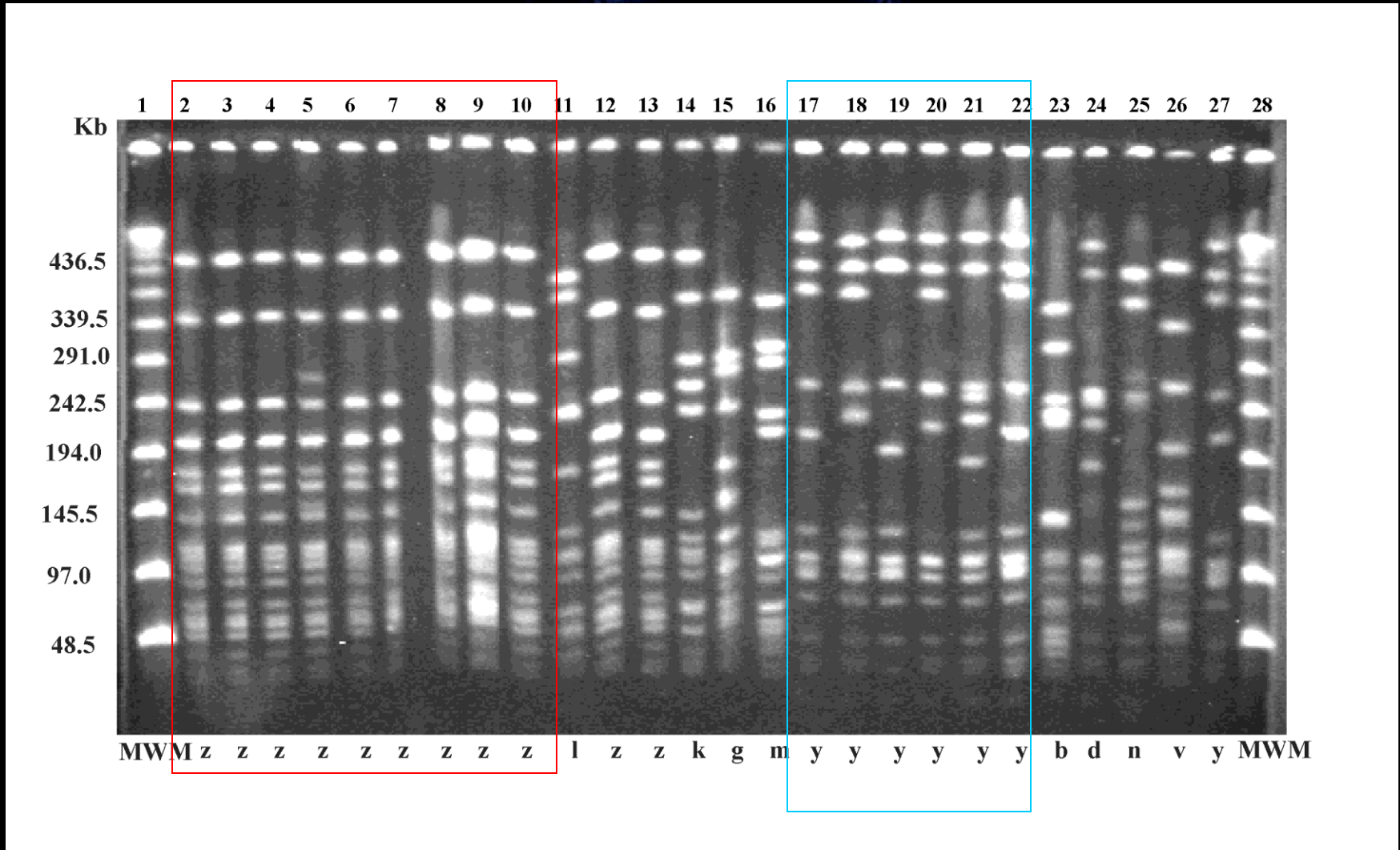
# Τυποποίηση MRSE με PFGE

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 +)**





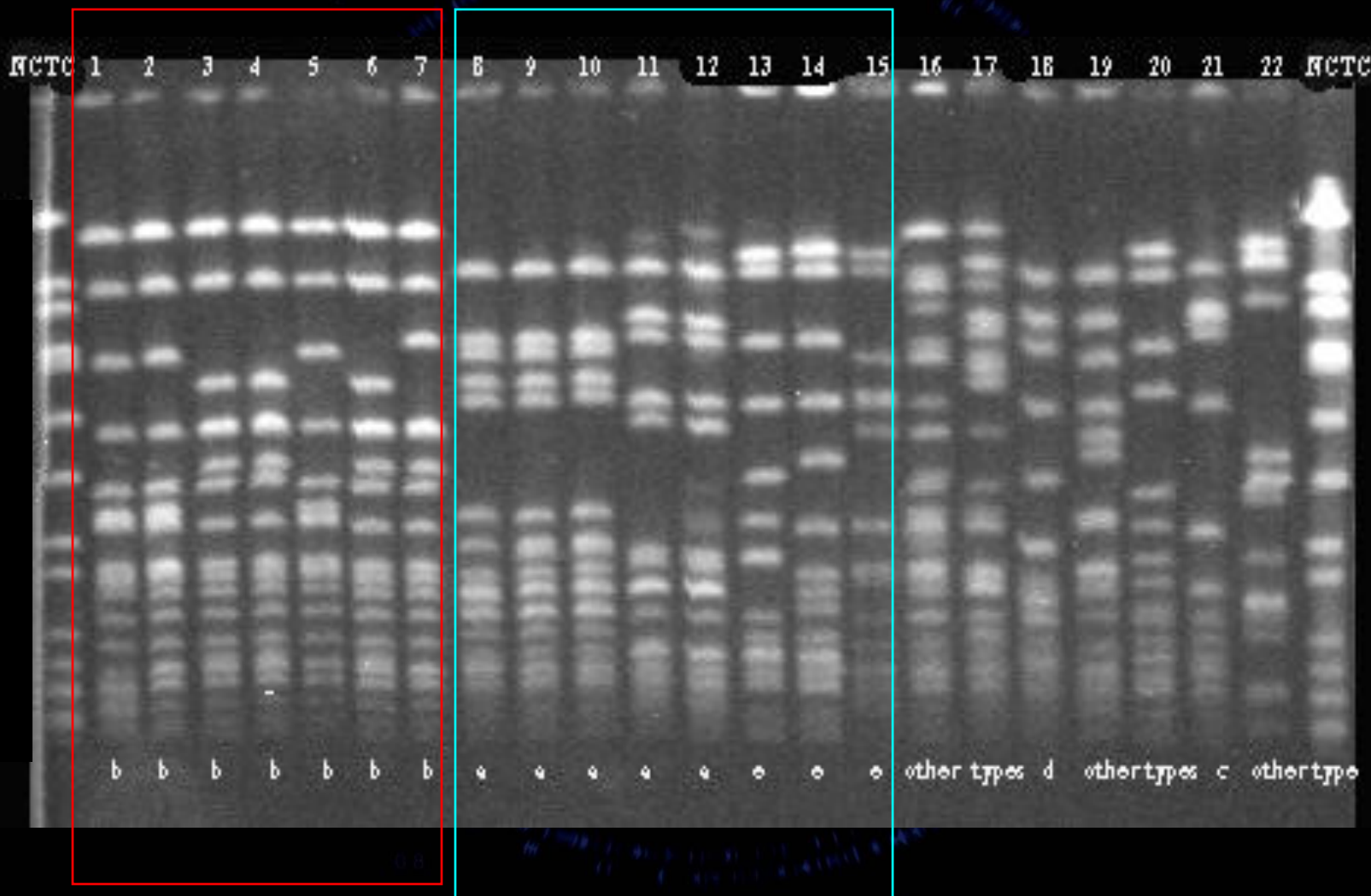
# Ανάλυση με PFGE χρωμοσωμικού DNA μετά από επίδραση με *Sma*I

Μονάδα νεογνών 2006-2007



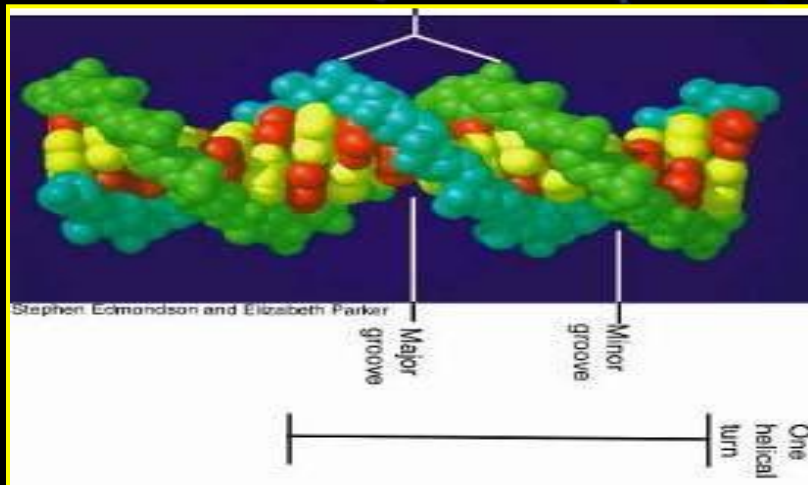
Γραμμές 1-6 και 8-9: *S. epidermidis*. Γραμμές 7 και 10-18: *S. haemolyticus*

# Κλώνοι MRSE από βακτηριαιμίες 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*

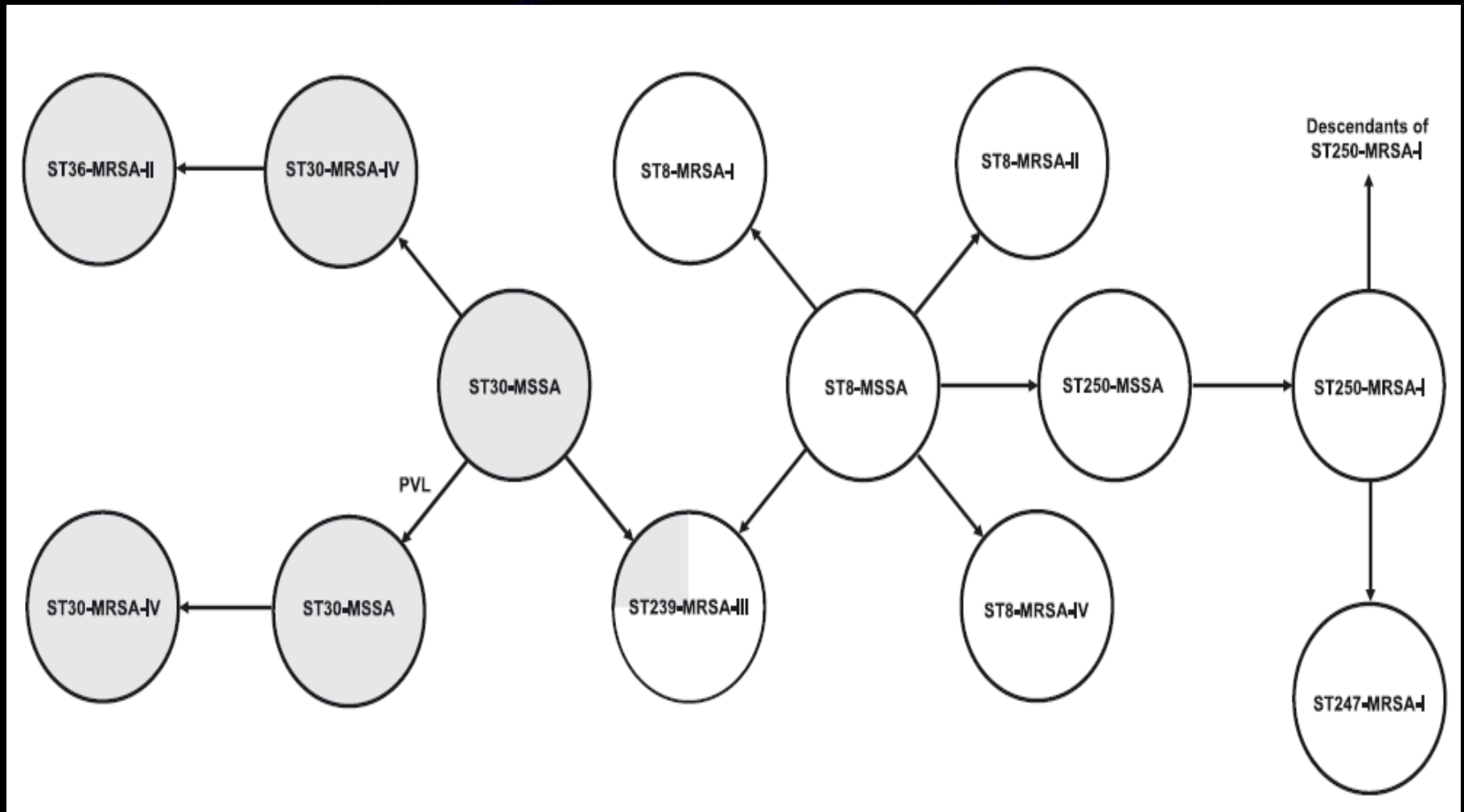
# Γονίδια-στόχος για MLST

- *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*)





# *Staphylococcus aureus*





Κλωνικά σύμπλοκα *S. aureus*

ST377

ST239

CC22

CC30

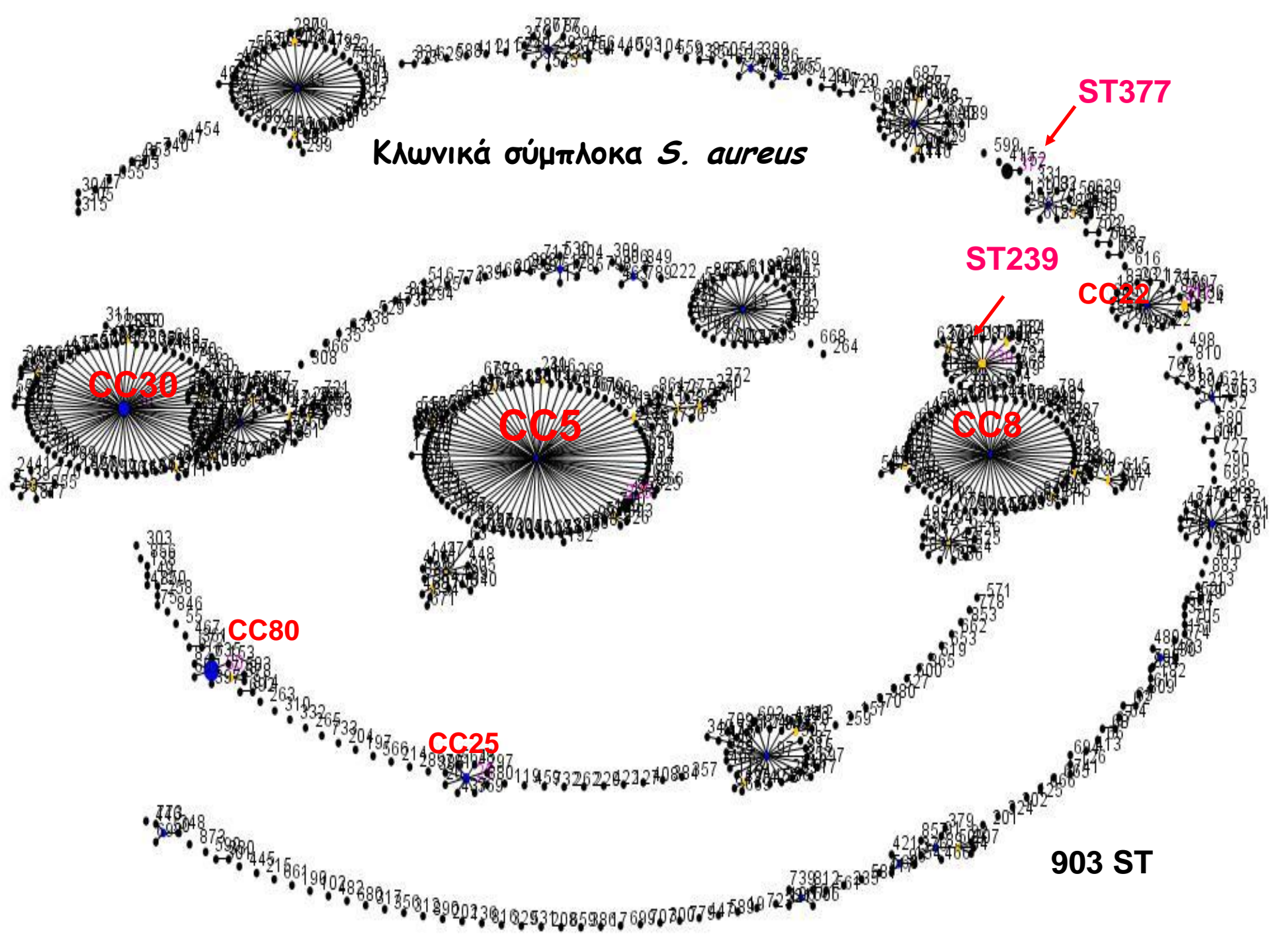
CC5

CC8

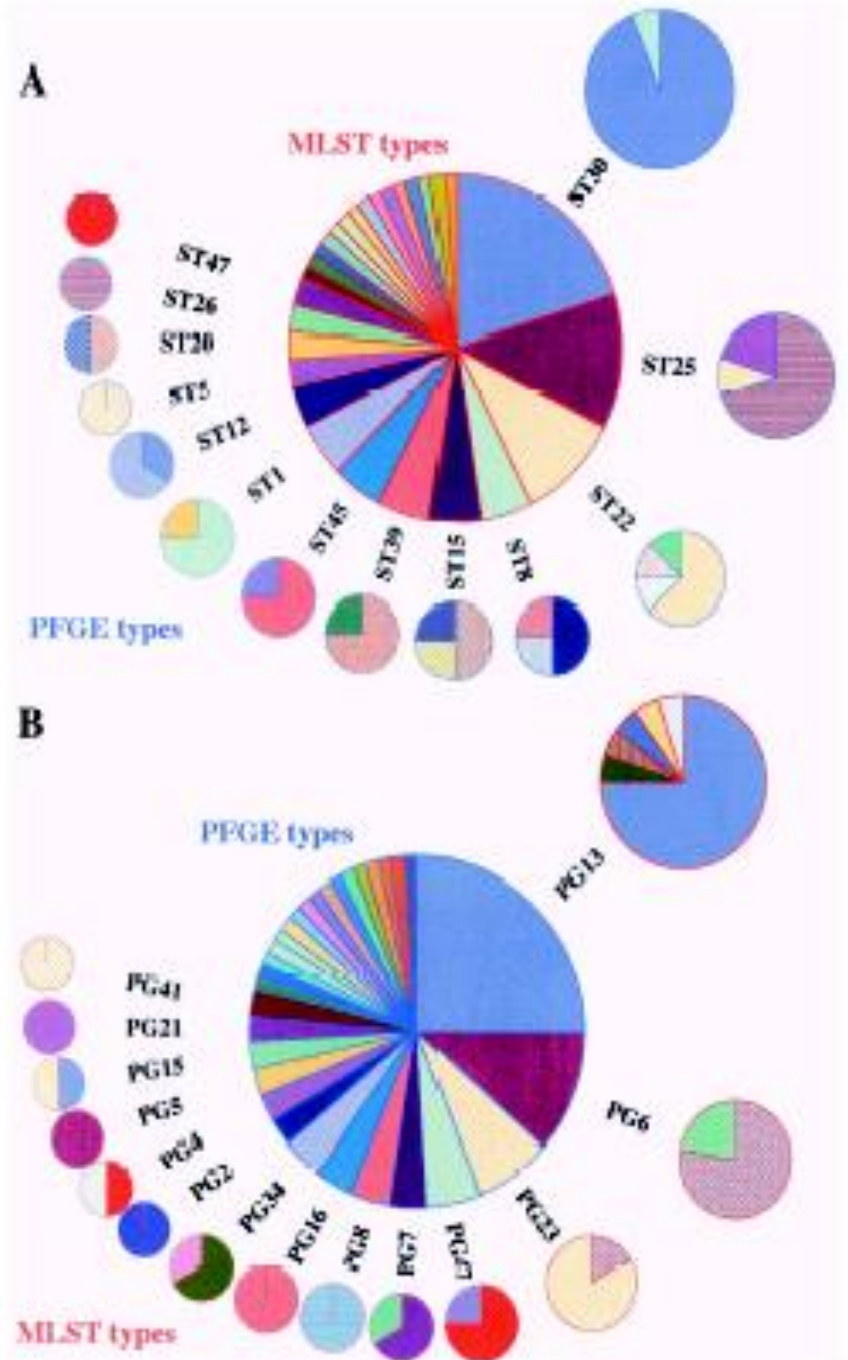
CC80

CC25

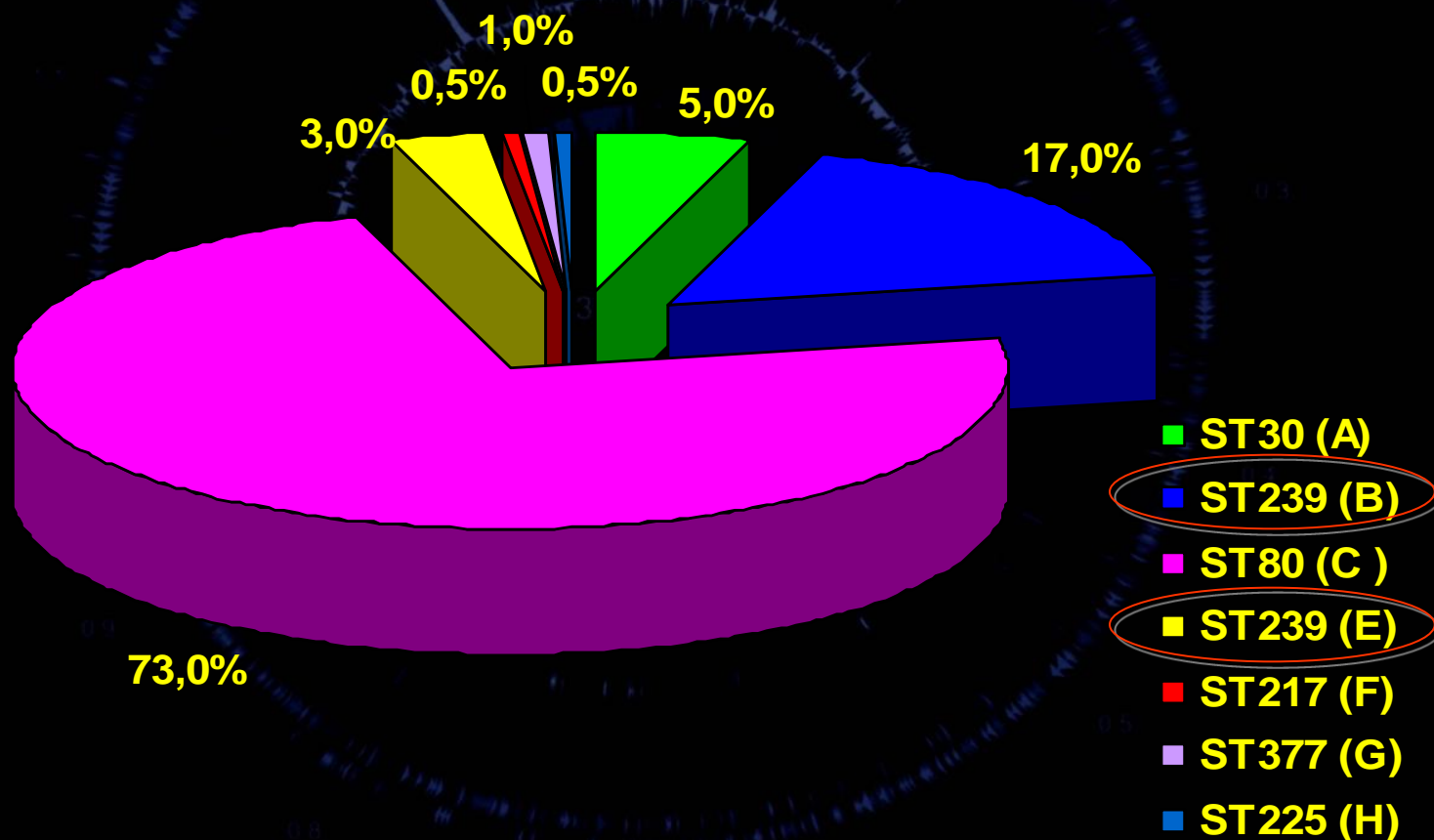
903 ST



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

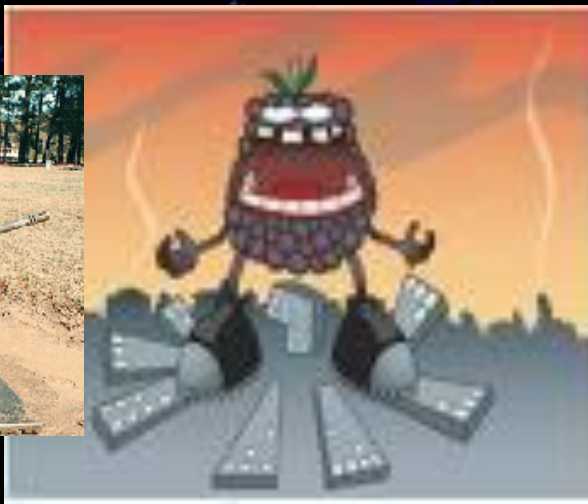


- Σε περιορισμένη έκταση (νοσοκομείο):  
**PCR**
- Σε μεγαλύτερη περιοχή: **PCR και PFGE**
- Διεθνώς: ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, ενός ή πολλαπλών γονιδίων.



# 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 κλασικών 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

