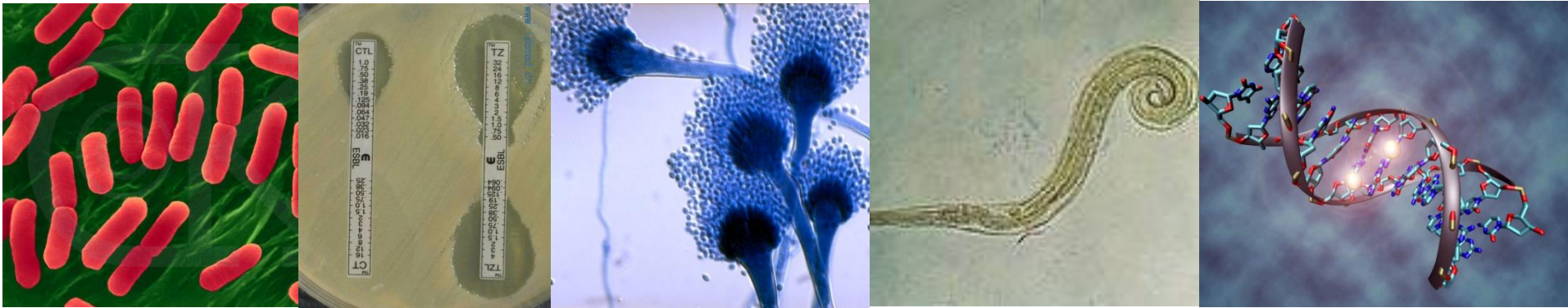




Μικροβιολογική διάγνωση

Χρώση Gram, Καλλιέργειες, Μοριακές Μέθοδοι



Μιράντα Δρογκάρη-Απειρανθίτου

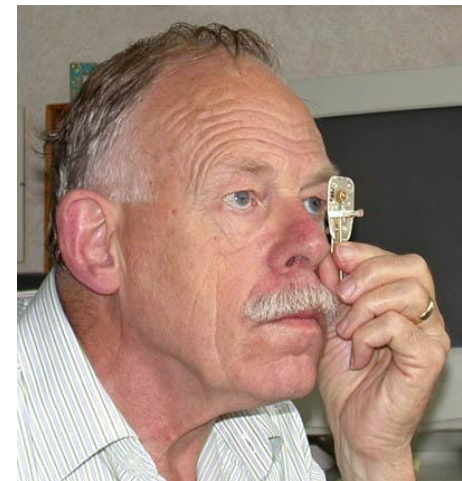
Ιατρός Βιοπαθολόγος

Δ' Παθολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, ΓΝΑ «ΑΤΤΙΚΟΝ»

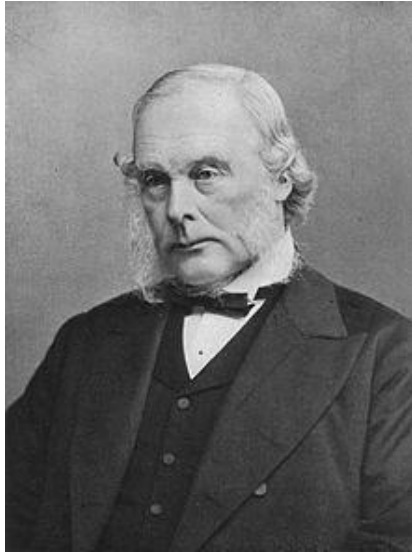
Σύντομη Αναδρομή στη Μικροβιολογία - Οι πρώτες παρατηρήσεις



1673: Ο **Antoni van Leeuwenhoek** περιγράφει μετά από παρατήρηση μικροοργανισμούς που βρίσκονται σε στοματικά δείγματα και στο βρόχινο νερό



Η μικροβιακή θεωρία των λοιμώξεων



1860: Ο **Joseph Lister:**
απολυμαντικά για να
αποφύγει μετάδοση
χειρουργικών λοιμώξεων

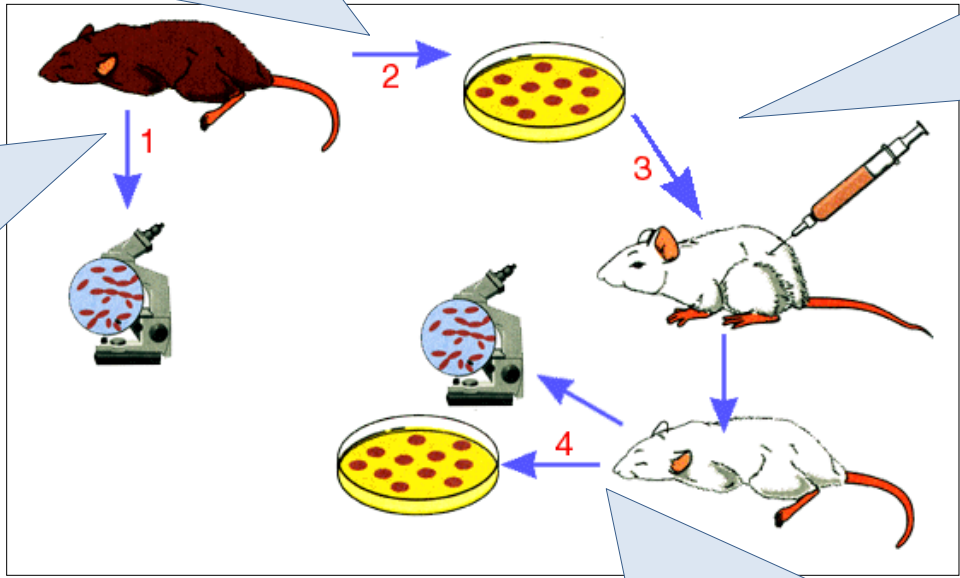


1876: Ο **Robert Koch:** απέδειξε ότι
ο *Bacillus anthracis* προκαλεί
άνθρακα και καθόρισε τα
πειραματικά στάδια “**αξιώματα**”
που αποδεικνύουν ότι
συγκεκριμένα μικρόβια
προκαλούν συγκεκριμένες
λοιμώξεις

Αξιώματα του Koch (Koch's postulates)

The microorganism must be isolated from a diseased organism and grown in pure culture.

The microorganism must be found in abundance in all organisms suffering from the disease.



The cultured microorganism should cause disease when introduced into a healthy organism.

The microorganism must be reisolated from the inoculated, diseased experimental host and identified as being identical to the original specific causative agent.

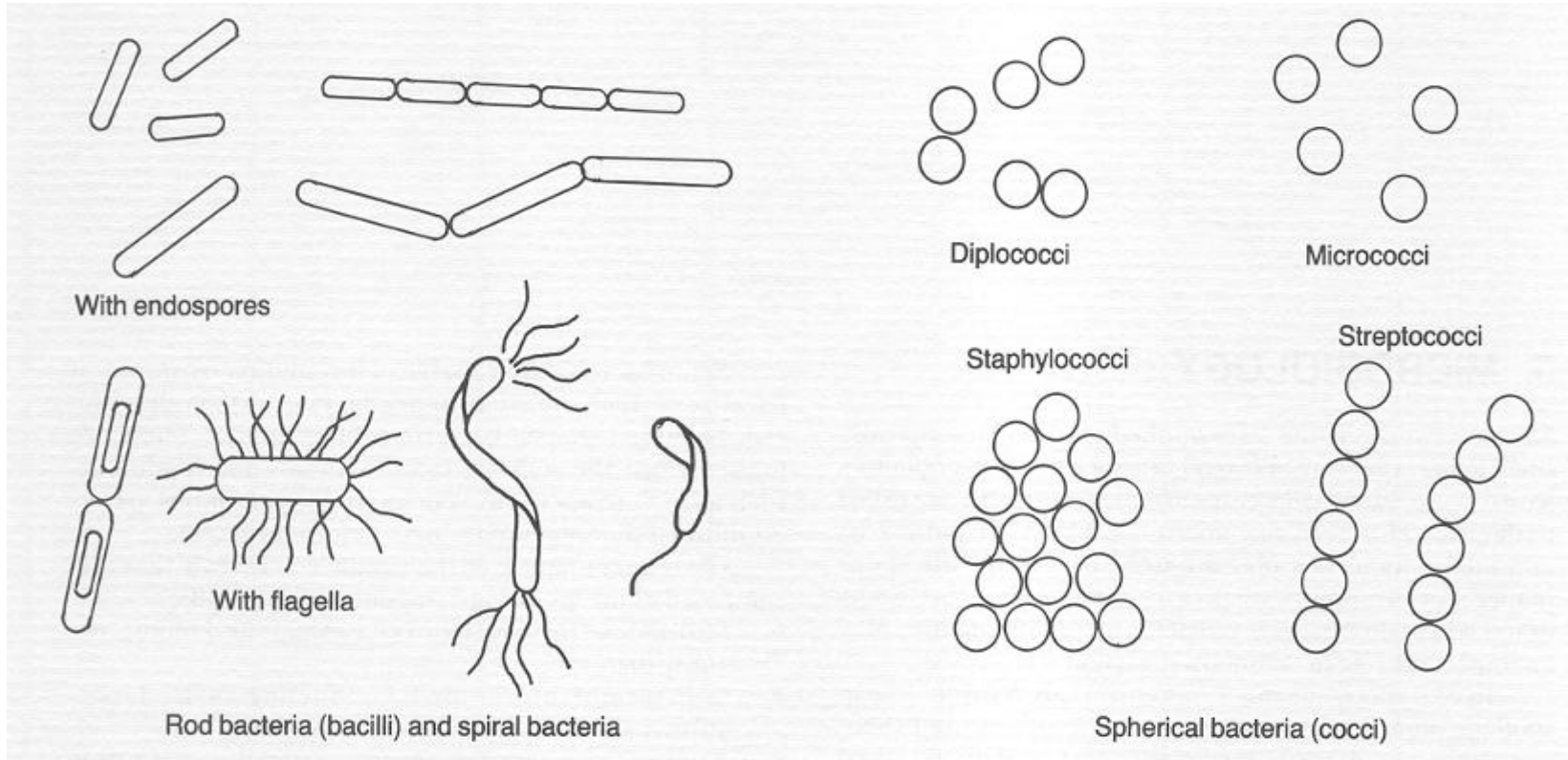
Revised versions of Koch's postulates for the 21st century

by Fredricks and Relman

1. A nucleic acid sequence belonging to a putative pathogen should be present in most cases of an infectious disease. Microbial nucleic acids should be found preferentially in those organs or gross anatomic sites known to be diseased, and not in those organs that lack pathology.
2. Fewer, or no, copies of pathogen-associated nucleic acid sequences should occur in hosts or tissues without disease.
3. With resolution of disease, the copy number of pathogen-associated nucleic acid sequences should decrease or become undetectable. With clinical relapse, the opposite should occur.
4. When sequence detection predates disease, or sequence copy number correlates with severity of disease or pathology, the sequence-disease association is more likely to be a causal relationship.
5. The nature of the microorganism inferred from the available sequence should be consistent with the known biological characteristics of that group of organisms.
6. Tissue-sequence correlates should be sought at the cellular level: efforts should be made to demonstrate specific in situ hybridization of microbial sequence to areas of tissue pathology and to visible microorganisms or to areas where microorganisms are presumed to be located.
7. These sequence-based forms of evidence for microbial causation should be reproducible.

Fredericks DN, Relman DA (1996). "Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates". *Clin Microbiol Rev* 9 (1): 18–33.

Βακτήρια – Βασική διάκριση με βάση το σχήμα



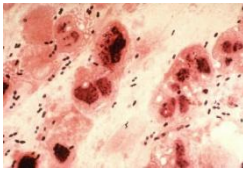
Μικροβιολογικές τεχνικές

Επίπεδα Πληροφορίας

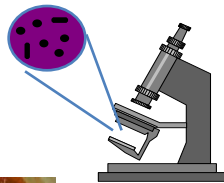
Μακροσκοπική
Πληροφορία



Μικροσκοπική
Πληροφορία



Βιοχημική
Πληροφορία



Ανοσολογική
Πληροφορία



Γενετική
Πληροφορία

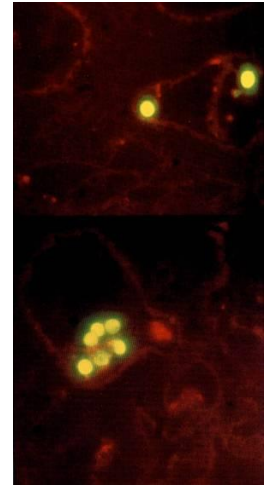
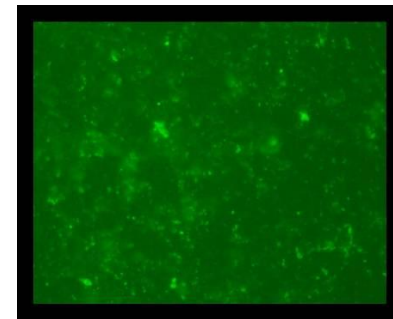
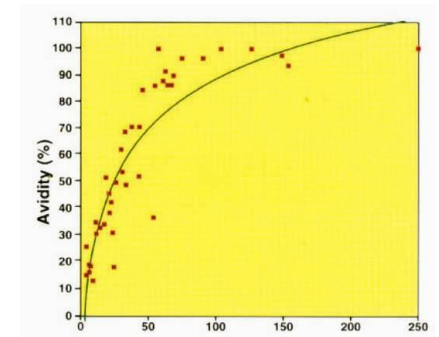


Αξία
Πληροφορίας



Διαγνωστικές ανοσολογικές μέθοδοι

- Συγκολλητιναντιδράσεις
- Ιζηματιναντιδράσεις
- Σύνδεση συμπληρώματος
- Αναστολή αιμολύσεως
- Αναστολή αιμοσυγκολλήσεως
- Ανοσοφθορισμός
- Ραδιοανοσολογικές
- Ανοσοενζυμικές



Ανοσολογικοί αναλυτές



IMMUNOCHEMISTRY*

| THYROID | Ref ¹ | Kit size |
|----------|------------------|----------|
| TSH | 30 400 | 60 tests |
| TSH3 | 30 441 | 60 tests |
| FT4 | 30 401 | 60 tests |
| FT4** | 30 459 | 60 tests |
| FT3 | 30 402 | 60 tests |
| T3 | 30 403 | 60 tests |
| T4 | 30 404 | 60 tests |
| Anti-TPO | 30 461 | 30 tests |
| Anti-Tg | 30 462 | 30 tests |

REPRODUCTION / FERTILITY

| | | |
|--------------|--------|----------|
| Estradiol II | 30 431 | 60 tests |
| FSH | 30 407 | 60 tests |
| HCG | 30 405 | 60 tests |
| LH | 30 406 | 60 tests |
| Prolactin | 30 410 | 60 tests |
| Progesterone | 30 409 | 60 tests |
| Testosterone | 30 418 | 30 tests |

TUMOUR MARKERS

| | | |
|----------|--------|----------|
| TPSA | 30 428 | 60 tests |
| FPSA | 30 440 | 30 tests |
| CEA (S) | 30 453 | 60 tests |
| AFP | 30 413 | 60 tests |
| CA 15-3* | 30 429 | 30 tests |
| CA 19-9™ | 30 427 | 30 tests |
| CA 125™ | 30 426 | 30 tests |

ALLERGY

| | | |
|-------------------------------------|--------|-----------|
| Total IgE | 30 419 | 60 tests |
| Stallertest | 30 800 | 30 tests |
| (Respiratory allergy screening) | | |
| Stallertroph | 30 830 | 10 tests |
| (Food allergy screening) | | |
| Stallergy | 30 801 | 60 strips |
| (Reagent strip for Stallergy tests) | | |
| Stallergy range† | | 10 tests |
| (20 specific IgE available) | | |

OTHERS

| | | |
|------------------|--------|----------|
| Cortisol S | 30 451 | 60 tests |
| Ferritin | 30 411 | 60 tests |
| Protein C | 30 115 | 30 tests |
| vWF | 30 436 | 30 tests |
| B2 Microglobulin | 30 420 | 30 tests |

CARDIAC

EMERGENCY*

| | | |
|------------------|---------|----------|
| Troponin I Ultra | 30 448 | 60 tests |
| Myoglobin | 30 446 | 30 tests |
| CK-MB | 30 421 | 30 tests |
| NT-proBNP | 30 449 | 60 tests |
| NT-proBNP2* | 30 458 | 60 tests |
| Galeclin-3* | 41 1191 | 60 tests |
| hsCRP* | 41 2556 | 60 tests |
| Digoxin | 30 603 | 60 tests |

VENOUS THROMBOEMBOLISM

| | | |
|-------------------------|--------|----------|
| D-Dimer Exclusion™ | 30 442 | 60 tests |
| D-Dimer Exclusion II™** | 30 445 | 60 tests |

BACTERIAL INFECTION

| | | |
|------------------------------------|--------|----------|
| B.R.A.H.M.S PCT (Procalcitonin) | 30 450 | 60 tests |
|------------------------------------|--------|----------|

INFECTIOUS DISEASES*

| HEPATITIS | Ref ¹ | Kit size |
|---------------------------|------------------|----------|
| HBs Ag Ultra | 30 315 | 60 tests |
| HBs Ag Ultra Confirmation | 30 317 | 30 tests |
| Anti-HBs Total Quick | 30 238 | 60 tests |
| Anti-HBc Total II | 30 314 | 60 tests |
| HBc IgM II | 30 439 | 30 tests |
| HBc-Anti HBc | 30 305 | 30 tests |
| HAV IgM | 30 307 | 30 tests |
| Anti-HAV Total | 30 312 | 30 tests |
| Anti-HCV* | 30 308 | 60 tests |

HIV

| | | |
|-------------------------|--------|----------|
| HIV DUO Ultra | 30 443 | 60 tests |
| HIV DUO Quick | 30 447 | 60 tests |
| HIV P24 II | 30 117 | 30 tests |
| HIV P24 II Confirmation | 30 444 | 60 tests |

ToRC

| | | |
|------------------|--------|----------|
| CMV IgG | 30 204 | 60 tests |
| CMV IgM | 30 205 | 30 tests |
| CMV IgG Avidity | 30 203 | 30 tests |
| Rub IgG II | 30 221 | 60 tests |
| Rub IgM | 30 214 | 30 tests |
| Toxo IgG II | 30 210 | 60 tests |
| Toxo IgG Avidity | 30 222 | 30 tests |
| Toxo IgM | 30 202 | 60 tests |
| Toxo Competition | 30 211 | 60 tests |

ANTIGEN DETECTION

| | | |
|--------------------------|--------|----------|
| C. difficile Toxin A & B | 30 118 | 60 tests |
| Chlamydia | 30 101 | 60 tests |
| Chlamydia Blocking Assay | 30 194 | 30 tests |
| Rotavirus | 30 107 | 60 tests |

OTHER SEROLOGIES

| | | |
|-----------------------|--------|----------|
| Lyme IgG and IgM | 30 298 | 60 tests |
| Lyme IgM** | 30 319 | 60 tests |
| Lyme IgG** | 30 320 | 60 tests |
| Measles IgG | 30 219 | 60 tests |
| Mumps IgG | 30 218 | 60 tests |
| Varicella- Zoster IgG | 30 217 | 60 tests |
| H. pylori IgG | 30 192 | 30 tests |
| EBV VCA IgM | 30 237 | 30 tests |
| EBV VCA/EA IgG | 30 236 | 30 tests |
| EBV EBNA IgG | 30 235 | 30 tests |

DETECTION

INDUSTRY***

| | | |
|--------------------------------|--------|----------|
| Campylobacter | 30 111 | 30 tests |
| E. coli O157 | 30 112 | 30 tests |
| UP E. coli O157 (including H7) | 30 122 | 30 tests |
| Listeria species Xpress | 30 224 | 60 tests |
| Listeria Duo | 30 225 | 60 tests |
| Listeria | 30 700 | 60 tests |
| Listeria monocytogenes | 30 704 | 60 tests |
| Salmonella | 30 702 | 60 tests |
| Staph enterotoxin | 30 705 | 30 tests |
| Salmonella Xpress | 30 709 | 60 tests |
| Listeria | 30 123 | 60 tests |
| monocytogenes Xpress | | |
| UP Salmonella | 30 707 | 60 tests |

IMMUNO-CONCENTRATION

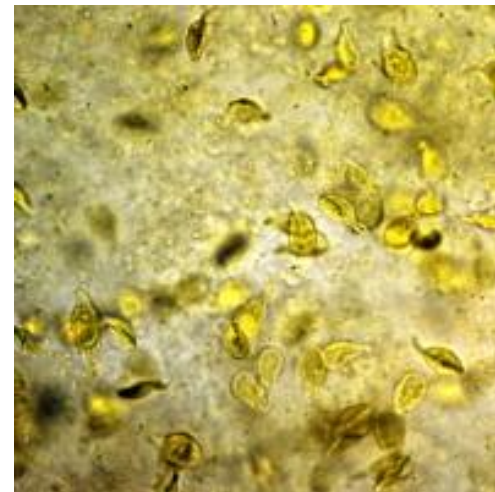
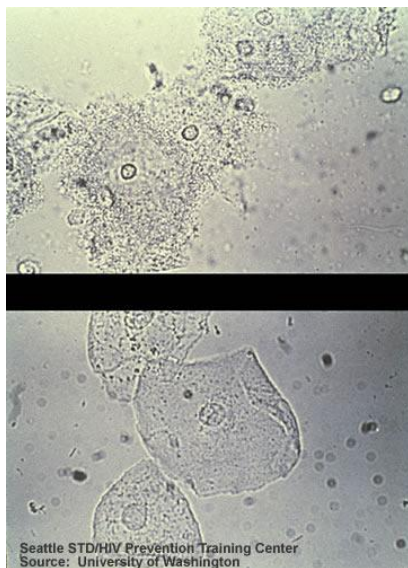
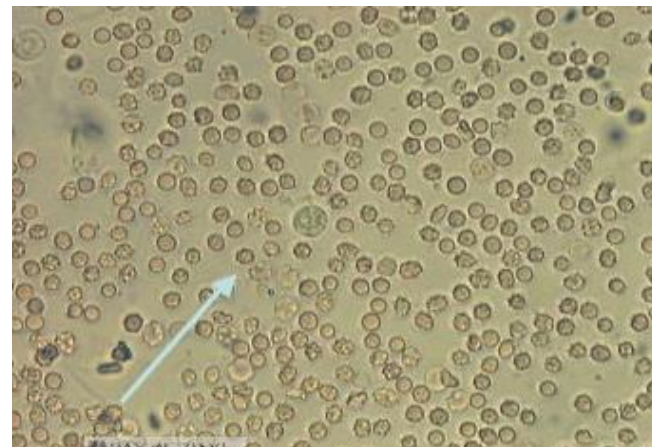
| | | |
|------------------|--------|----------|
| IC E.coli O157 | 30 526 | 30 tests |
| IC Salmonella | 30 435 | 60 tests |
| IC Salmonella II | 30 708 | 60 tests |

* Some of these reagents are under development or have not yet obtained regulatory clearance in some countries. Please contact your local distributor for availability for further information and product availability.
** B21 progressively replaces the previous generation. *** These assays are for industrial applications only.

Μέθοδοι άμεσης εξέτασης

Νωπό παρασκεύασμα

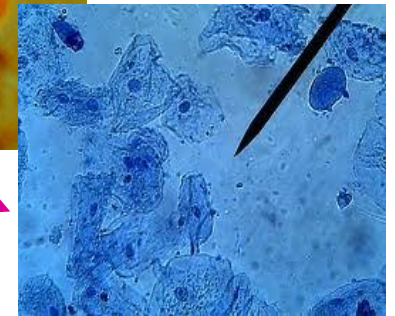
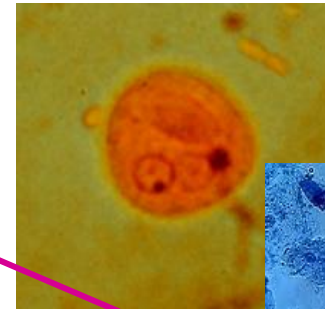
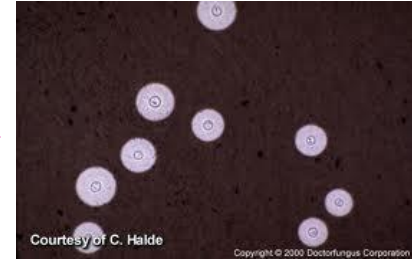
- Ούρα
- Κόπρανα
- Κολπικό έκκριμα



Χρώσεις μικροβίων

Απλές ή γενικές:

- Σινική μελάνη
- Χρώση ιωδίου (Lugol)
- Κυανό μεθυλενίου
- Lactophenol cotton blue

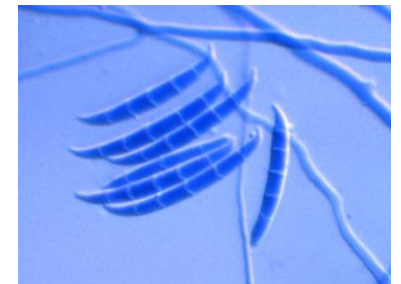


Σύνθετες γενικές χρώσεις:

- χρώση Gram
- οξεάντοχη χρώση (Ziehl-Neelsen)

Ειδικές χρώσεις: σπόρων, ελύτρων, βλεφαρίδων, ρικετσιών, σπειροχαιτών,...

Χρώσεις με φθοριοχρώματα


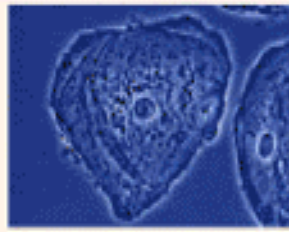
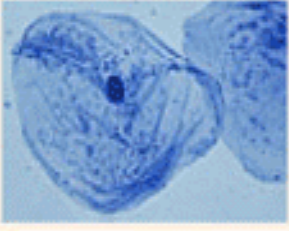

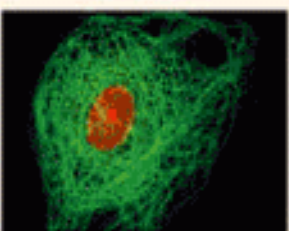
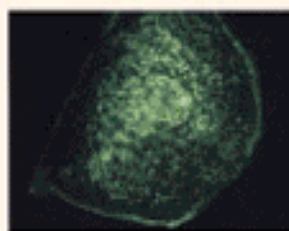


Είδη μικροσκοπίων

- Σύνθετο ή κοινό
- Ηλεκτρονικό
- Αντιθέτου φάσεως
- Πολωτικό
- Σκοτεινού πεδίου
- Φθορισμού
- Στερεοσκοπικό
- Συνεστιακό



Table 7.1 Different Types of Light Microscopy: A Comparison

| Type of Microscopy | Light Micrographs of Human Cheek Epithelial Cells | | Type of Microscopy |
|--|--|---|--|
| <p>Brightfield (unstained specimen). Passes light directly through specimen; unless cell is naturally pigmented or artificially stained, image has little contrast.</p> |  |  | <p>Phase-contrast. Enhances contrast in unstained cells by amplifying variations in density within specimen; especially useful for examining living, unpigmented cells.</p> |
| <p>Brightfield (stained specimen). Staining with various dyes enhances contrast, but most staining procedures require that cells be fixed (preserved).</p> |  |  | <p>Differential-interference-contrast (Nomarski). Like phase-contrast microscopy, it uses optical modifications to exaggerate differences in density.</p> |
| <p>Fluorescence. Shows the locations of specific molecules in the cell. Fluorescent substances absorb short-wavelength, ultraviolet radiation and emit longer-wavelength, visible light. The fluorescing molecules may occur naturally in the specimen but more often are made by tagging the molecules of interest with fluorescent molecules.</p> |  |  | <p>Confocal. Uses lasers and special optics for “optical sectioning.” Only those regions within a narrow depth of focus are imaged. Regions above and below the selected plane of view appear black rather than blurry. This microscope is typically used with fluorescently stained specimens, as in the example here.</p> |

Απλές χρώσεις

Χρωστικές = άλατα που αποτελούνται από ένα θετικό (+) και ένα αρνητικό (-) ιόν

Ένα από τα δύο είναι έγχρωμο (χρωμοφόρο)

Βασικές χρωστικές

Χρώμα στο
θετικό (+) ιόν

Όξινες χρωστικές

χρώμα στο αρνητικό (-)
ιόν

Χρώση κυανού του μεθυλενίου

Χρωστικό διάλυμα

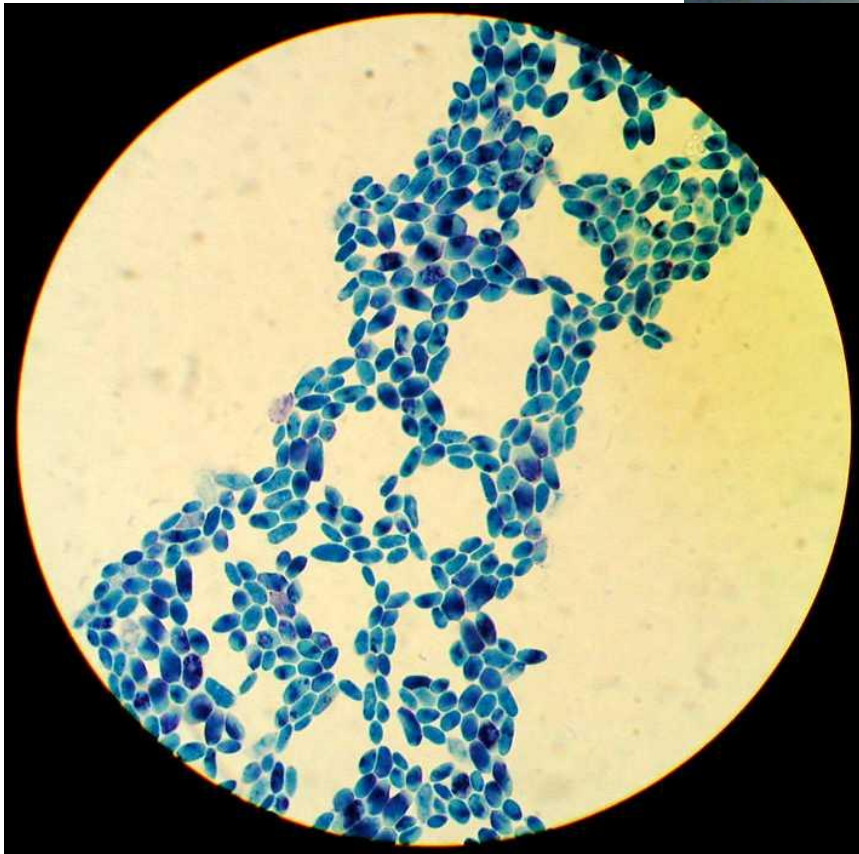
A. Μητρικό διάλυμα

- ✓ Μπλε του μεθυλενίου 1g
- ✓ Αιθυλική αλκοόλη 95° 100ml

B. Διάλυμα εργασίας

- ✓ Υδατικό διάλυμα 1% KOH 1ml
- ✓ dH₂O 99ml
- ✓ Μητρικό διάλυμα 30ml

11:33:57 AM/15-11-2002



Χρώση Gram

Hans Christian Gram, 1884

Χρωστικά διαλύματα

- **Κρυσταλλικό ιώδες** (μπλε χρωστική)
- **Διάλυμα Lugol** (στυπτικό = σταθεροποίηση της χρωστικής στη μικροβιακή μεμβράνη)
- Μείγμα **οινόπνευμα - ακετόνη**
(αποχρωματιστικός διαλύτης)
- **Σαφρανίνη** (κόκκινη χρωστική)



Τεχνική χρώσης Gram

1. Επίστρωση του παρασκευάσματος με κρίκο πάνω σε καθαρή αντικειμενοφόρο πλάκα. Στέγνωμα στον αέρα για λίγα λεπτά.
2. Μονιμοποίηση σε φλόγα. Μεταφορά στη σχάρα της λεκάνης χρώσης.

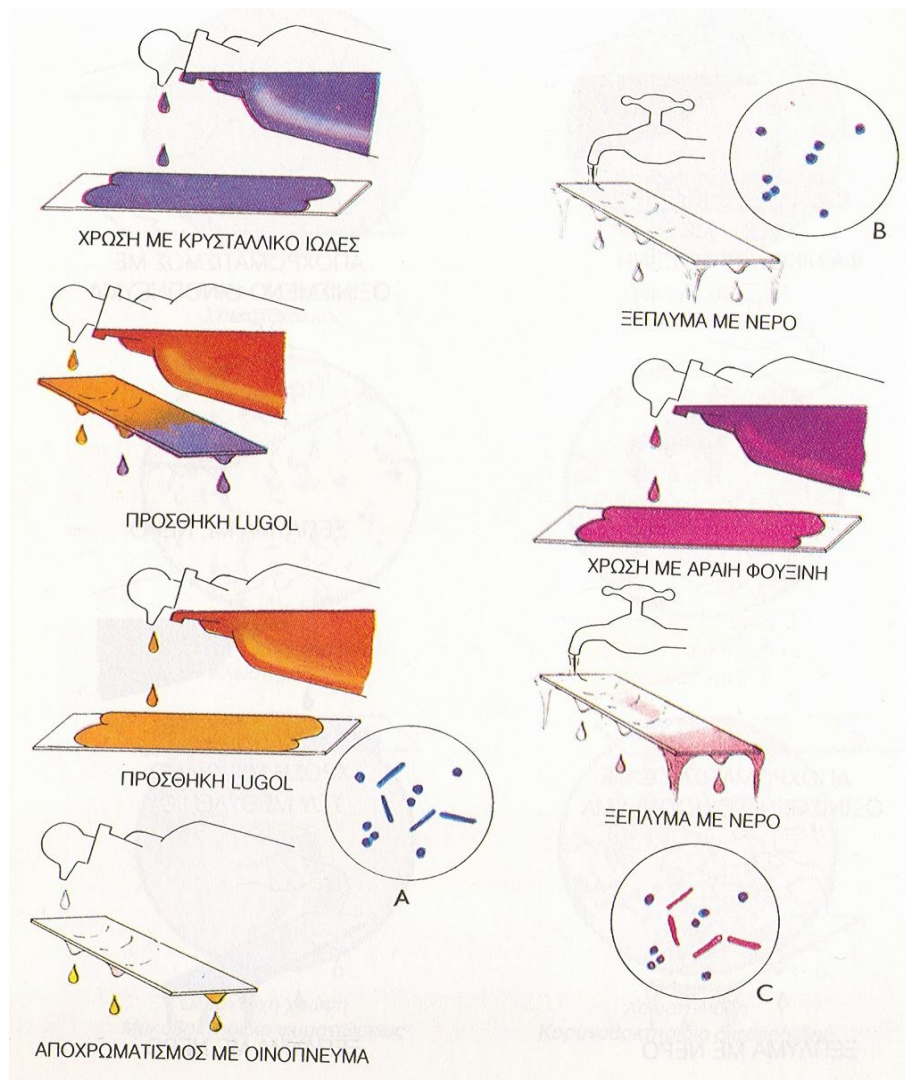
3. Προσθήκη διαλύματος **κρυσταλικού ιώδους** (να καλύψει ΟΛΗ την επιφάνεια της πλάκας). Παραμονή **1 min**. Ξέπλυμα με άφθονο νερό βρύσης. Ελαφρό τίναγμα να στραγγίξει το περίσσειο νερό.

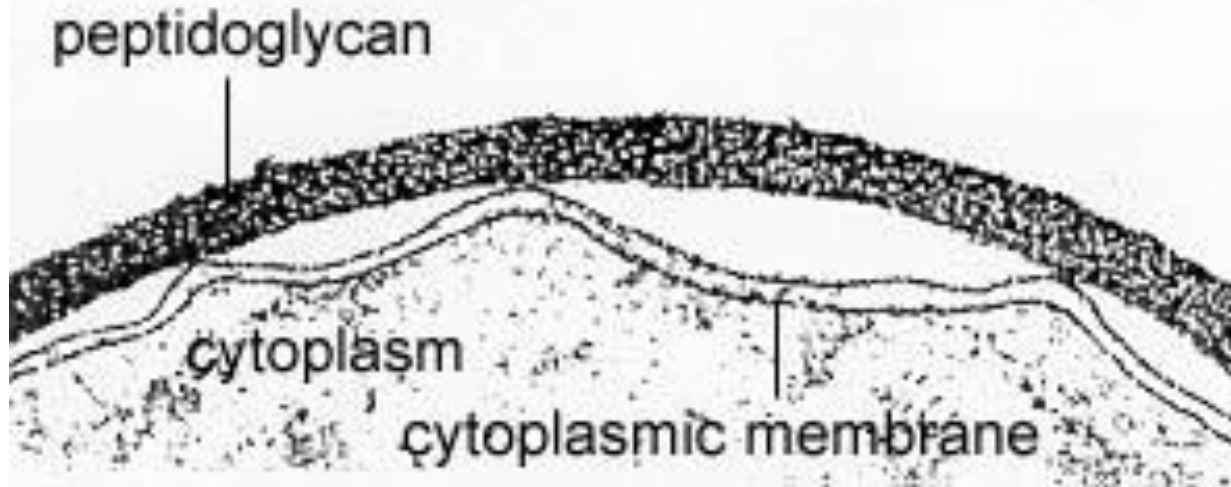
4. Προσθήκη διαλύματος **Lugol**. Παραμονή **1 min**. Ξέπλυμα με άφθονο νερό βρύση.

5. Προσθήκη **αποχρωματιστικού διαλύτη** σε διαδοχικές φάσεις, ενώ ενδιάμεσα ξέπλυμα με νερό βρύσης **μέχρι μακροσκοπικού αποχρωματισμού**. **ΠΡΟΣΟΧΗ:** όχι πάνω από 10 sec.

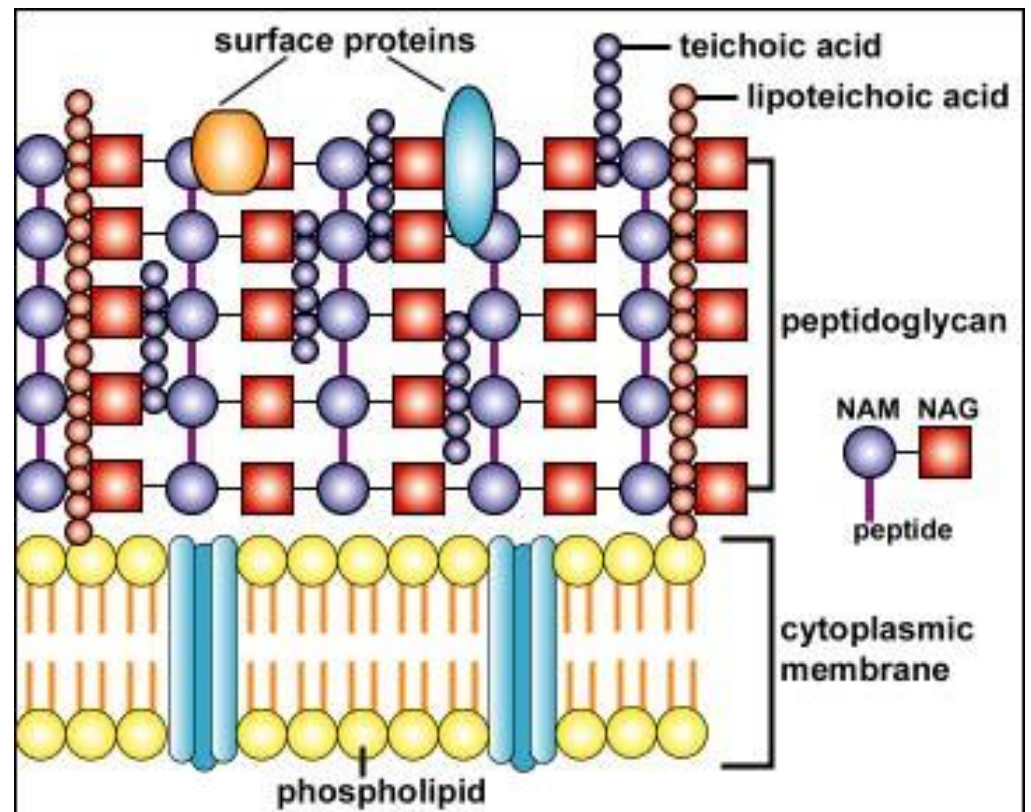
6. Προσθήκη διαλύματος **σαφρανίνης**. Παραμονή **10 sec**. Ξέπλυμα με άφθονο νερό βρύση. Στέγνωμα.

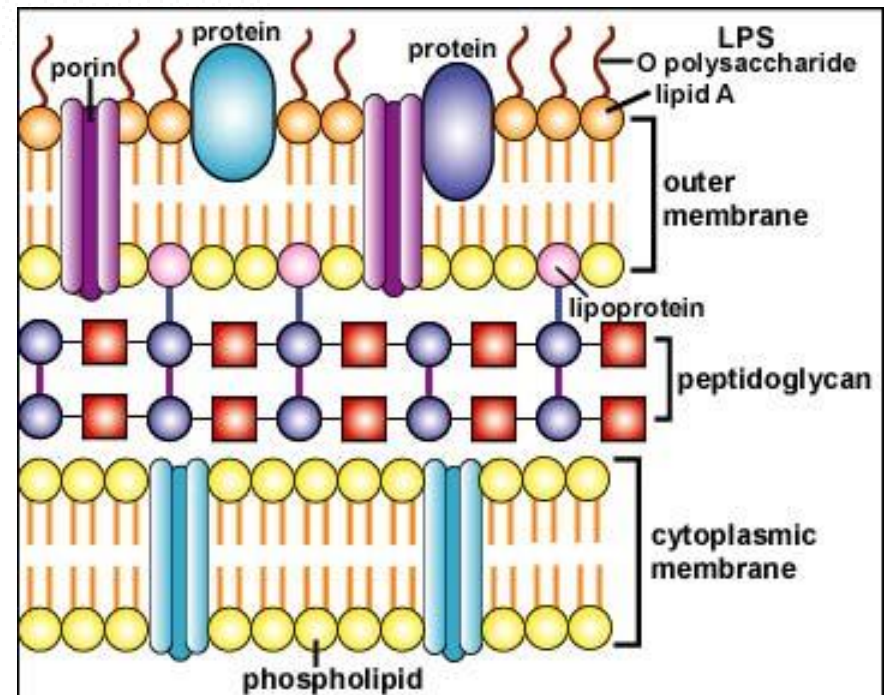
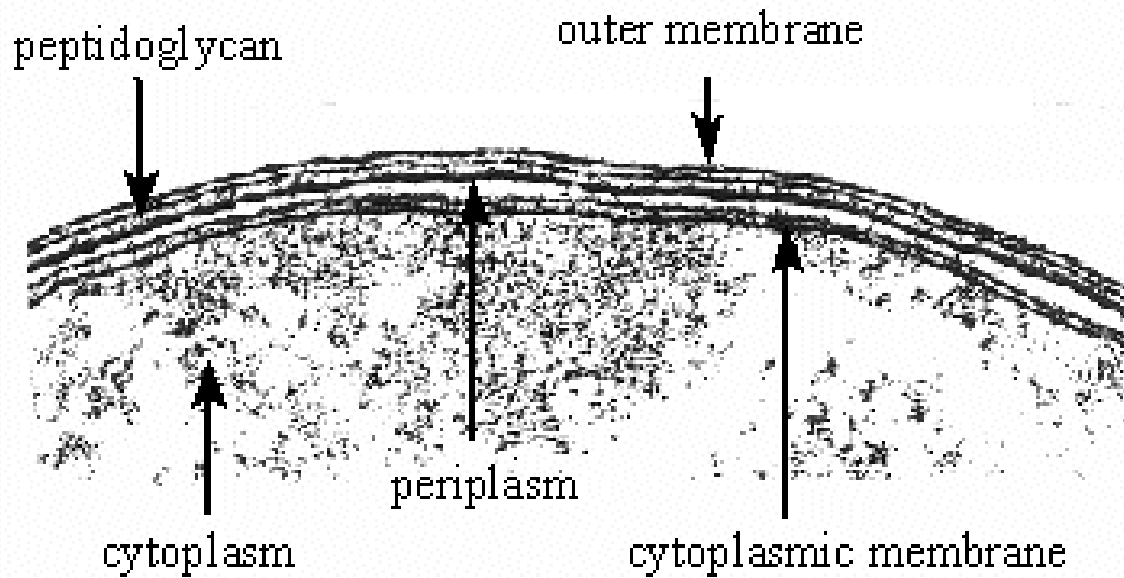
7. Μικροσκόπηση με ελαιοκαταδυτικό φακό.



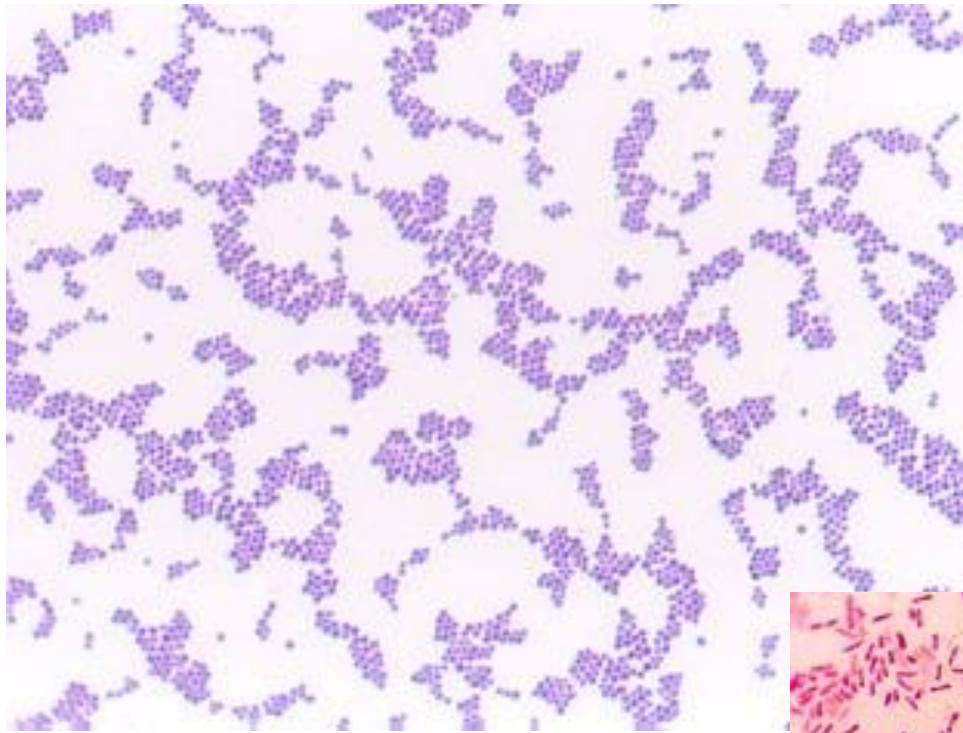


Gram (+)



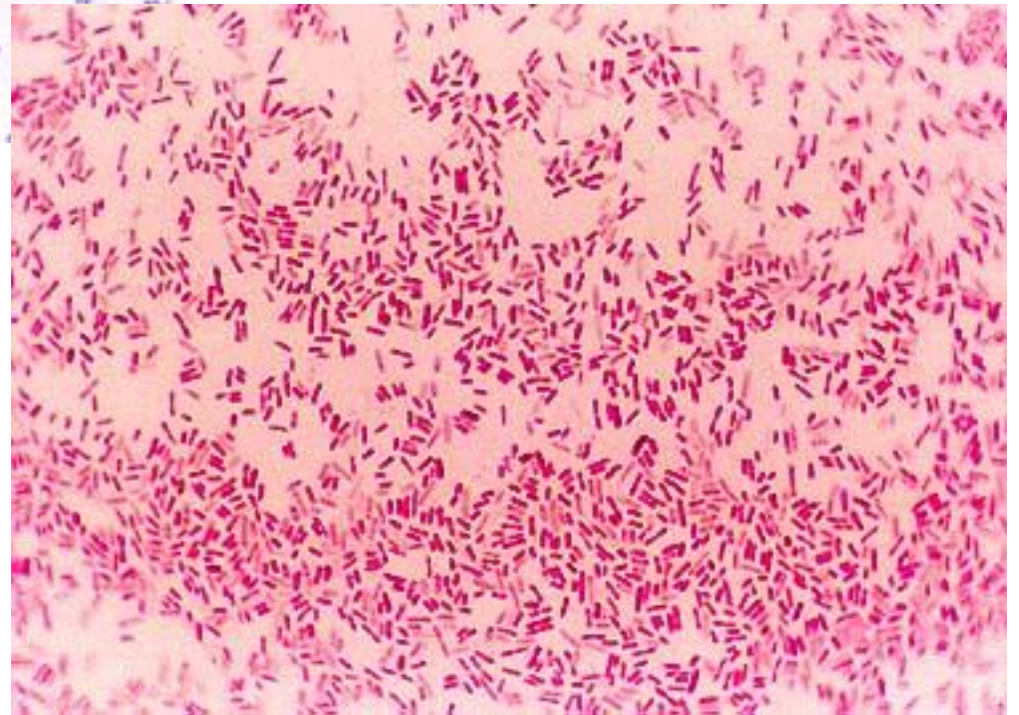


Gram (-)

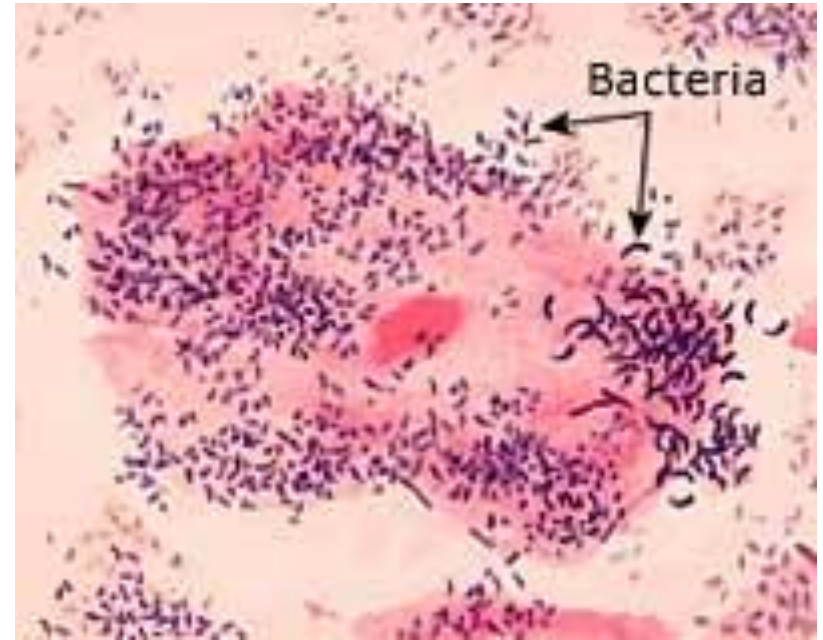
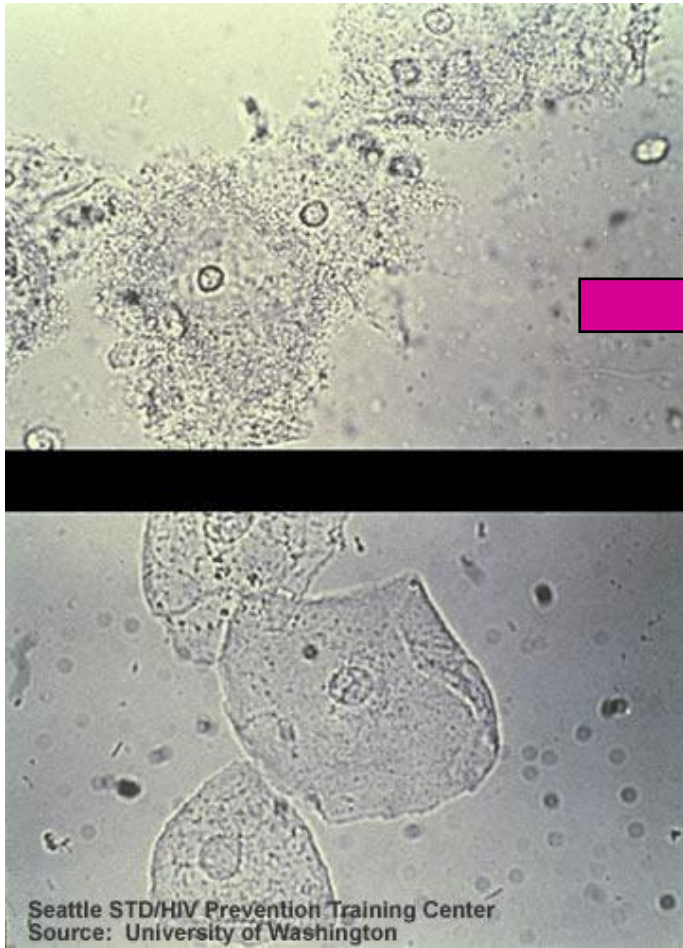


Gram (+)

Gram (-)



Χρώση Gram



Gram-θετικά βακτήρια

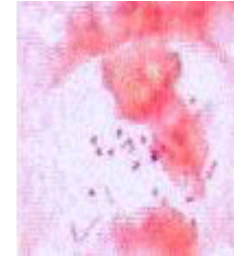


Ομάδες: Staphylococci



Αλυσίδες: Streptococci

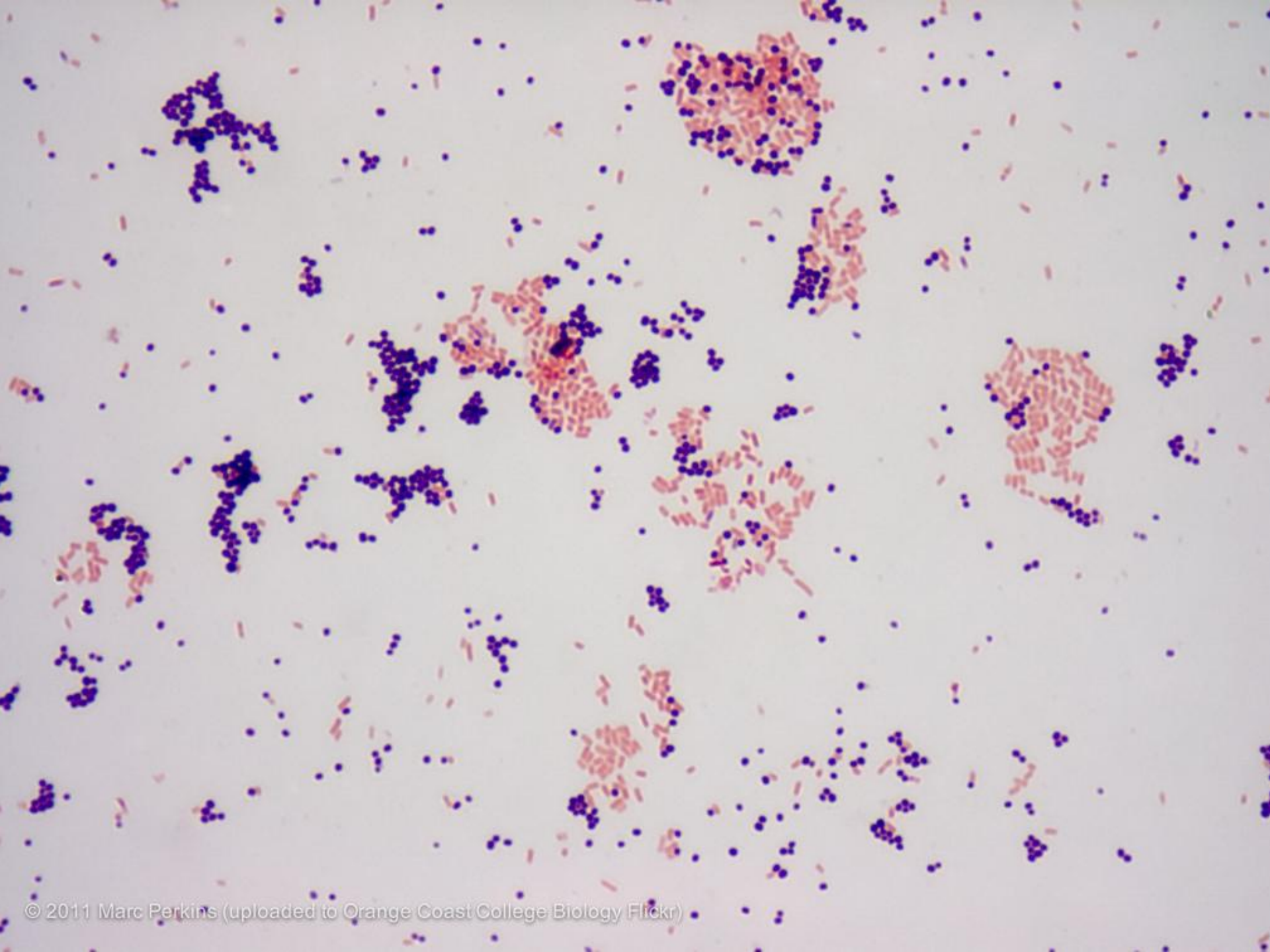
Gram-αρνητικά βακτήρια



Διπλόκοκκοι

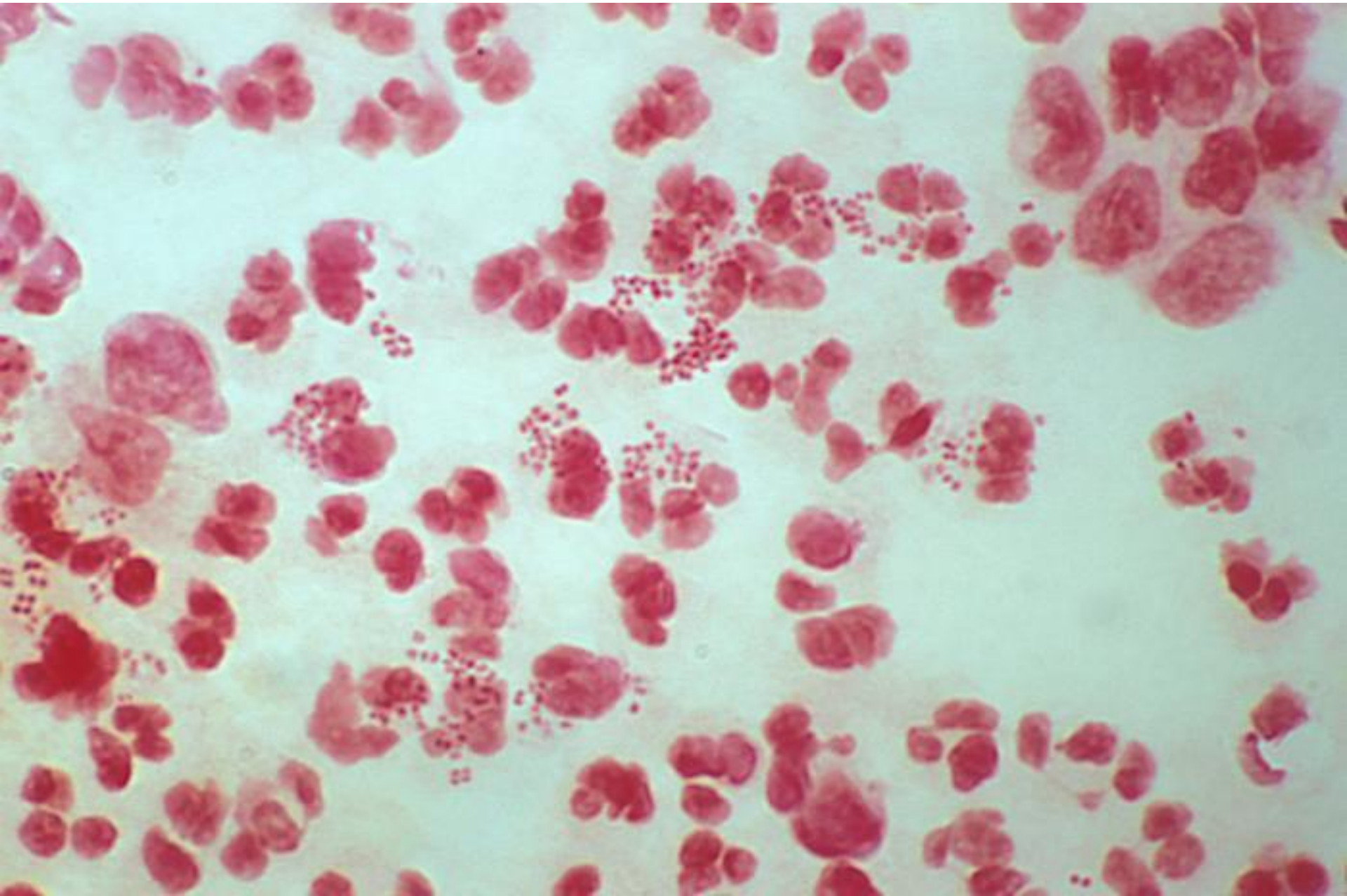


Βακτηρίδια



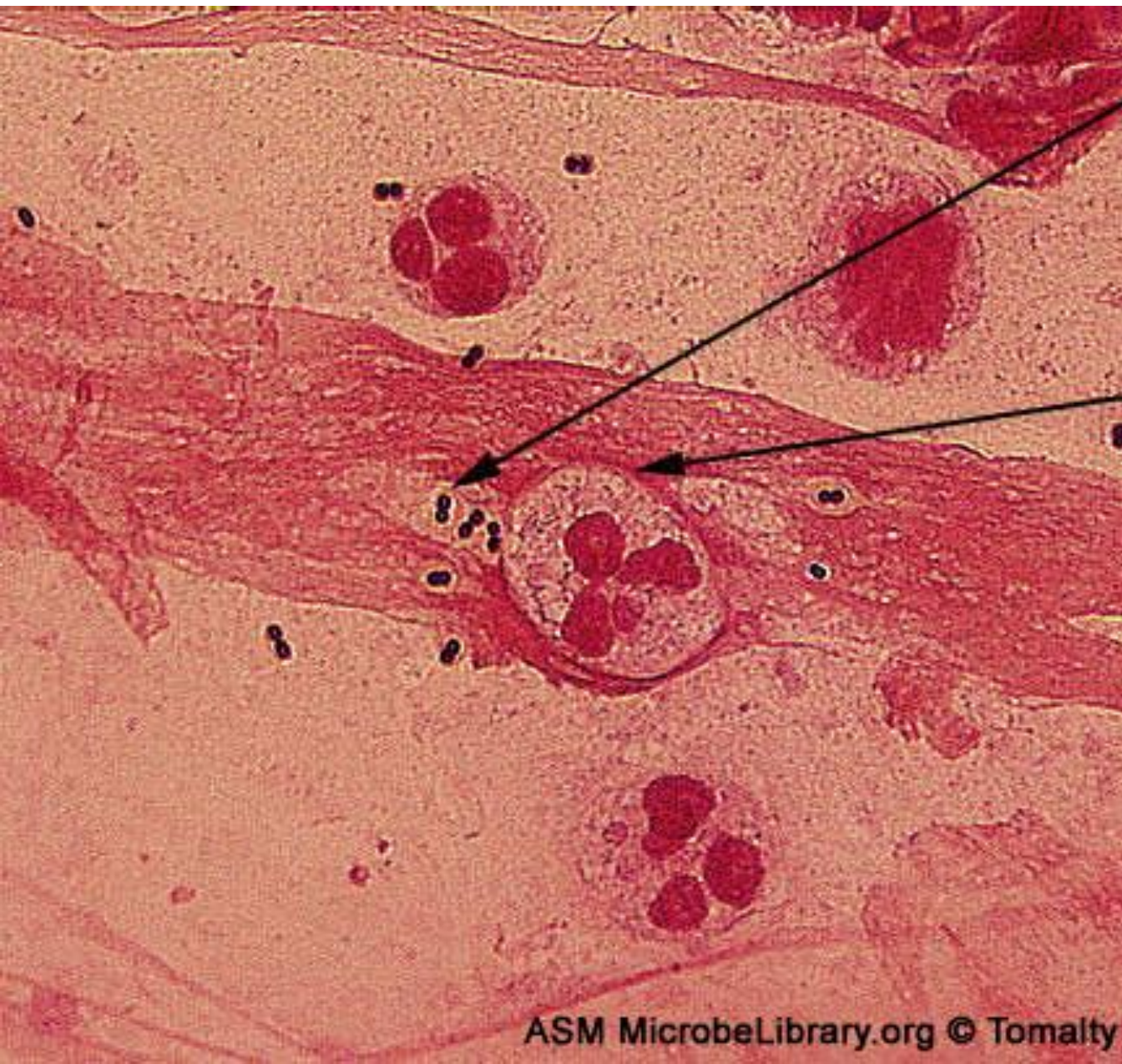
Ουρηθρικό έκκριμα ανδρός

Neisseria gonorrhoeae



Πτύελα από ασθενή με πνευμονία

Streptococcus pneumoniae

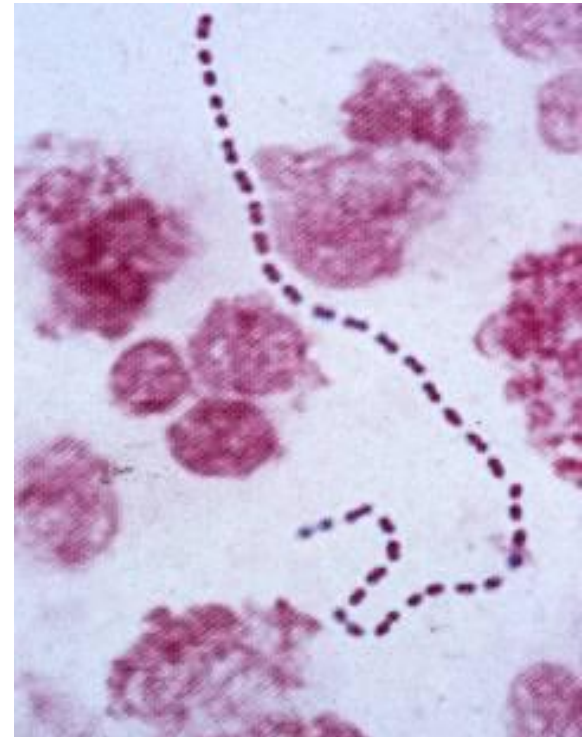


Gram-positive diplococci
surrounded by a capsule
(clear zone)

Polymorphonuclear leukocyte
(note the multi-lobed nucleus)



Ερυσίπελας



Streptococcus pyogenes

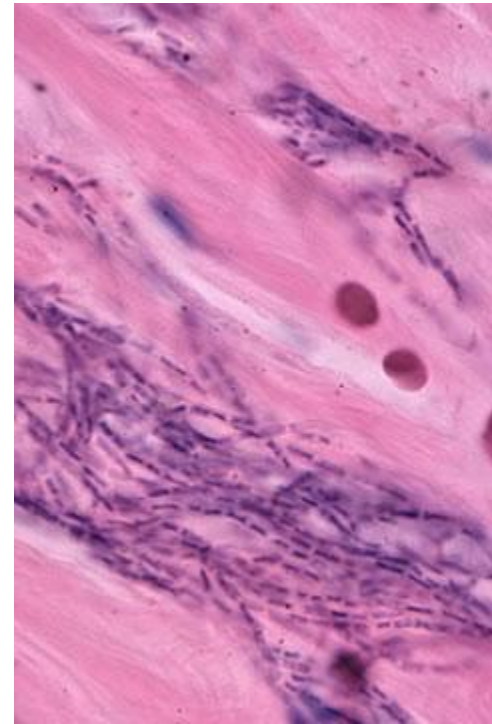
Gram (-)βακτηρίδιο, έχει σχέση με GBS

Campylobacter jejuni





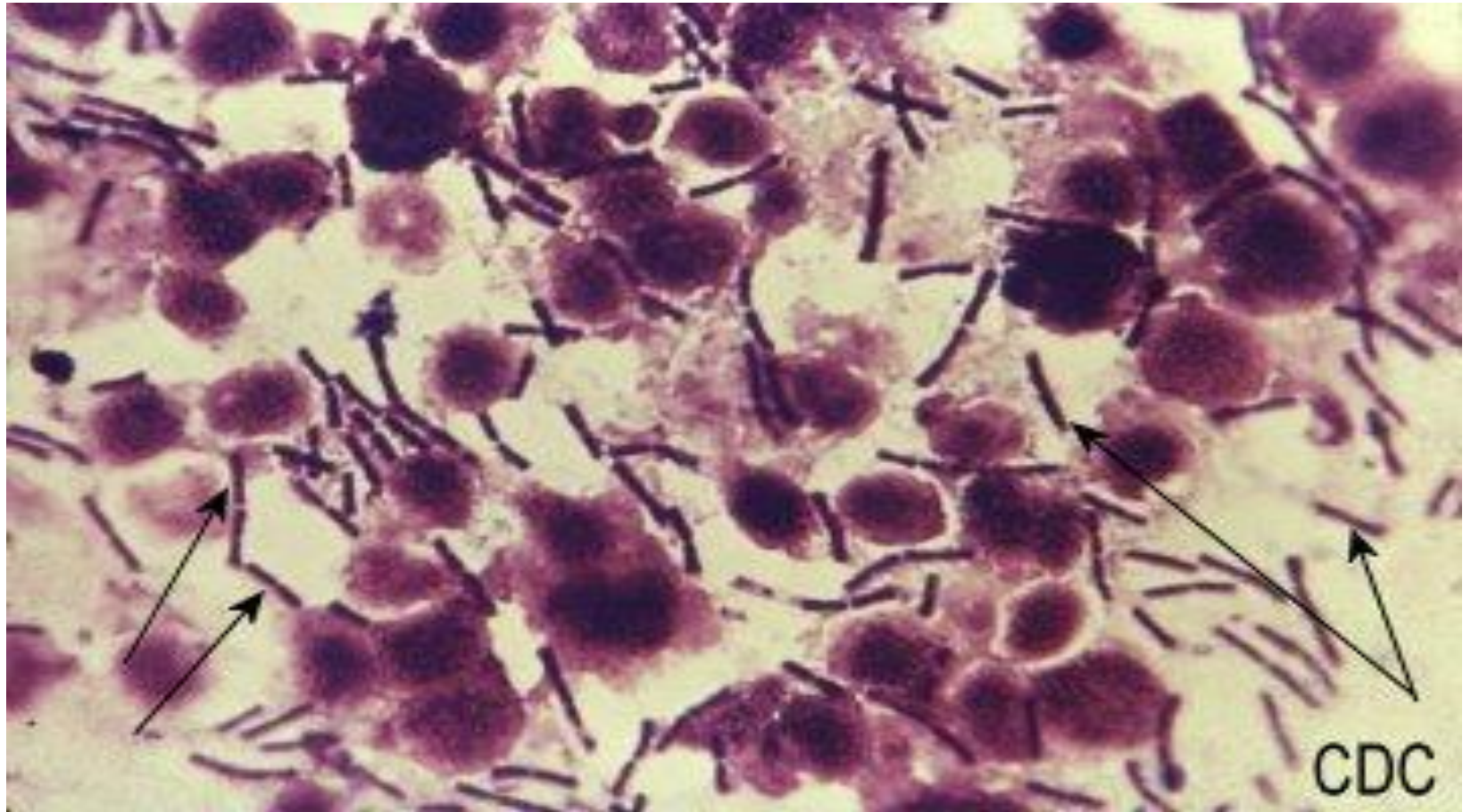
Cutaneous anthrax infection



Bacillus anthracis

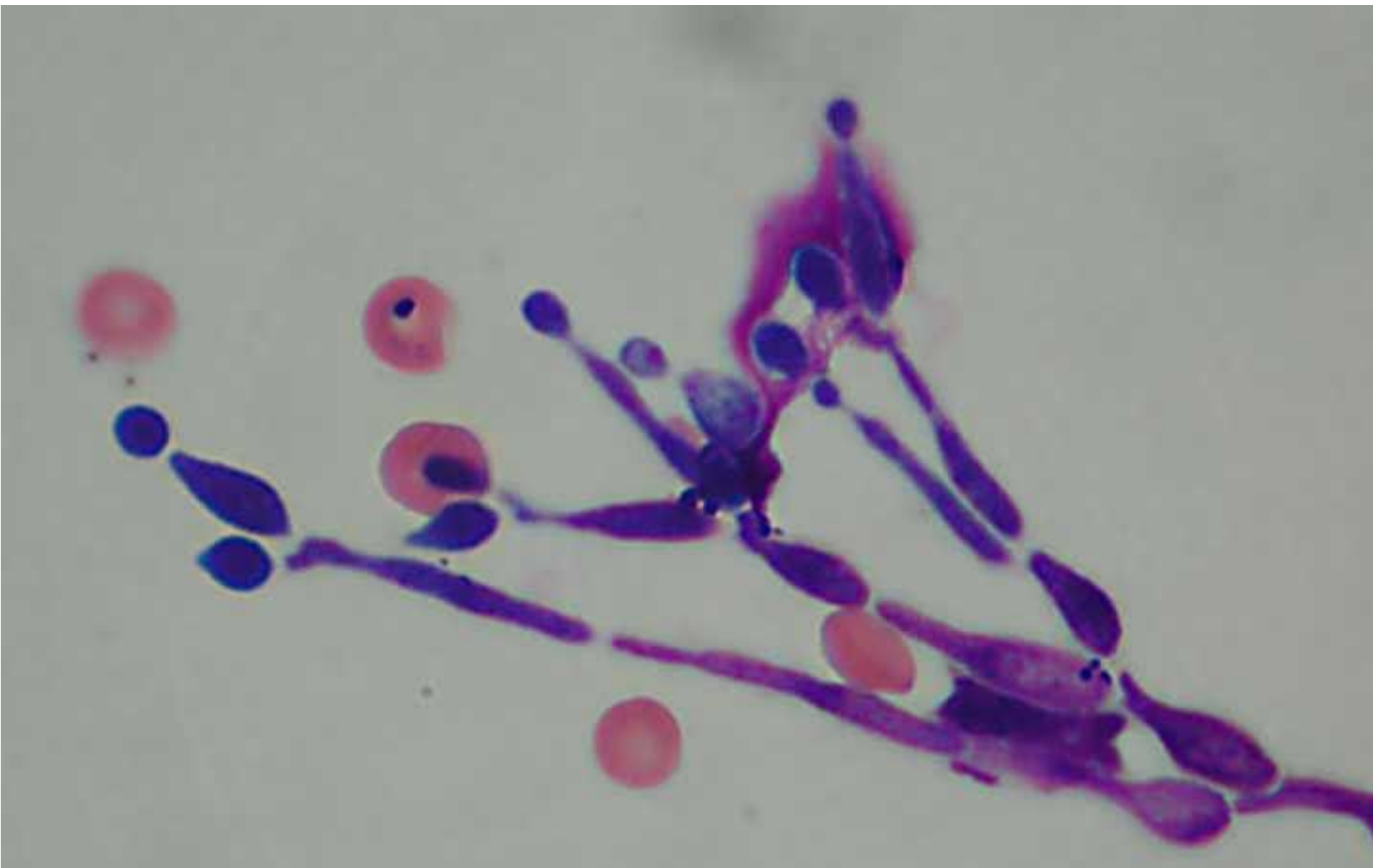
Δερματικός άνθρακας

Bacillus anthracis σε αιμοκαλλιέργεια



ΕΝΥαπό ασθενή με shunt

Candida albicans



Χρώση Ziehl-Neelsen

Χρωστικά διαλύματα

Φαινικούχος φουξίνη (κόκκινη χρωστική)

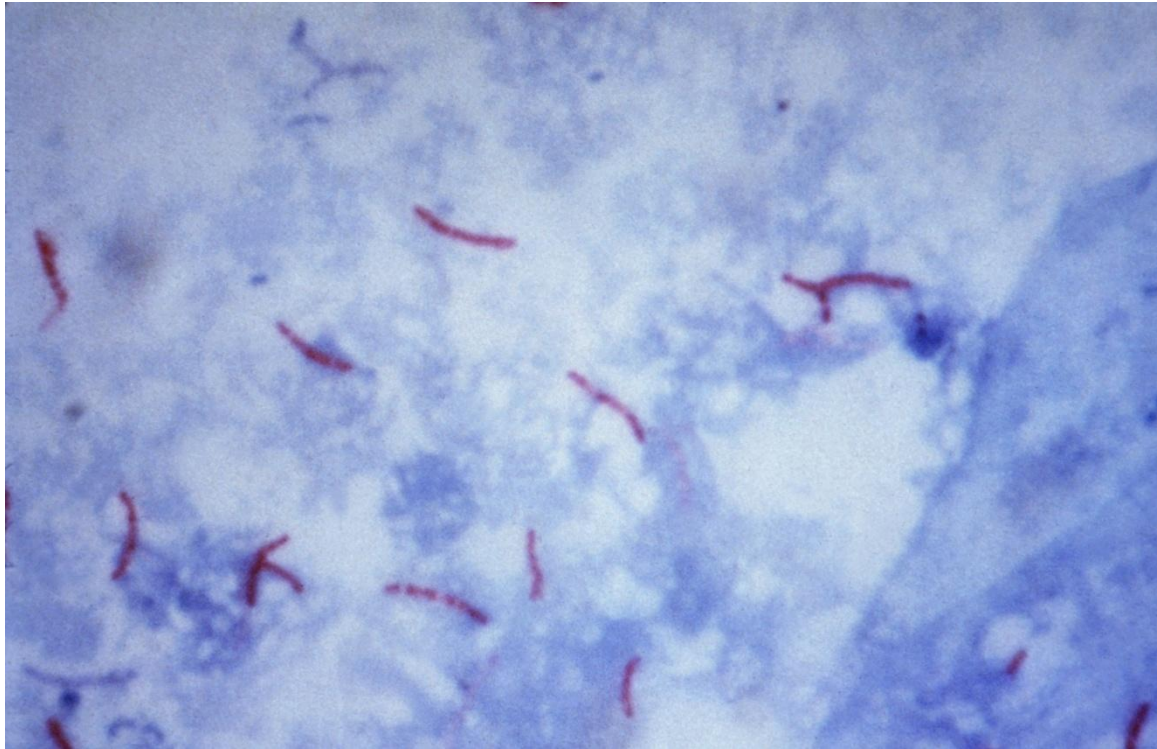
Αποχρωματιστικό διάλυμα

- Πυκνό HCl 3ml
- Αιθυλική αλκοόλη 97ml

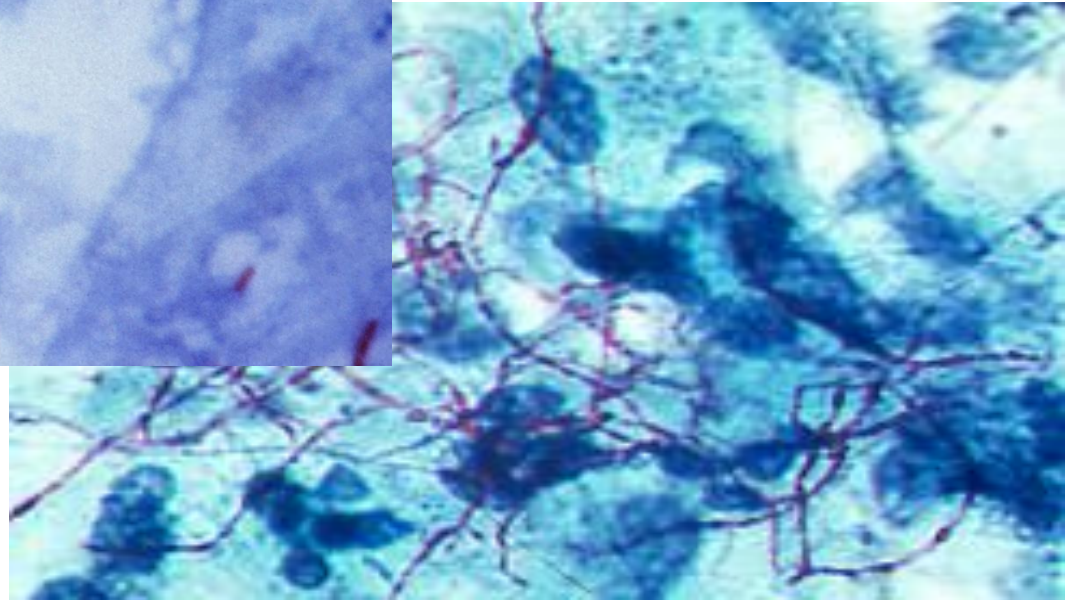
Μπλε του μεθυλενίου κατά Loeffler (μπλε χρωστική)

Οξεάντοχα

Mycobacterium tuberculosis



Nocardia spp
(τροποποιημένη ZN)

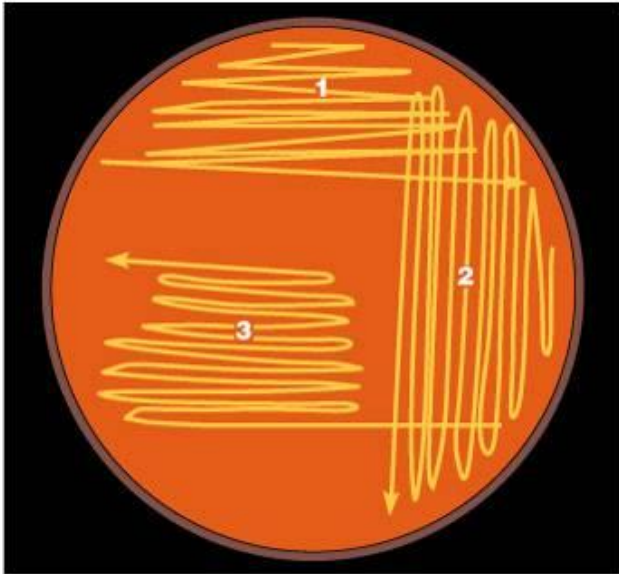


Θρεπτικά υλικά

- Διαλυμένα σε αποσταγμένο νερό
 - Αλκαλικό πεπτονούχο νερό
 - Θρεπτικός ζωμός
 - Ζωμός με σεληνιώδες Νάτριο
 - Ζωμός Thioglycolate (θειογλυκολικός)
 - Ζωμός Müller-Hinton
- Θρεπτικά συστατικά διαλυμένα σε αποσταγμένο νερό και άγαρ.
 - Αιματούχο άγαρ
 - Σοκολατόχρωμο άγαρ
 - Thayer-Martin άγαρ
 - Mac Conkey άγαρ
 - Müller-Hinton άγαρ
 - Salmonella-Shigella άγαρ
 - Εκλεκτικά υλικά



Streak Plate



Μετά από 24 h επώαση στους 37°C



Lac (+)

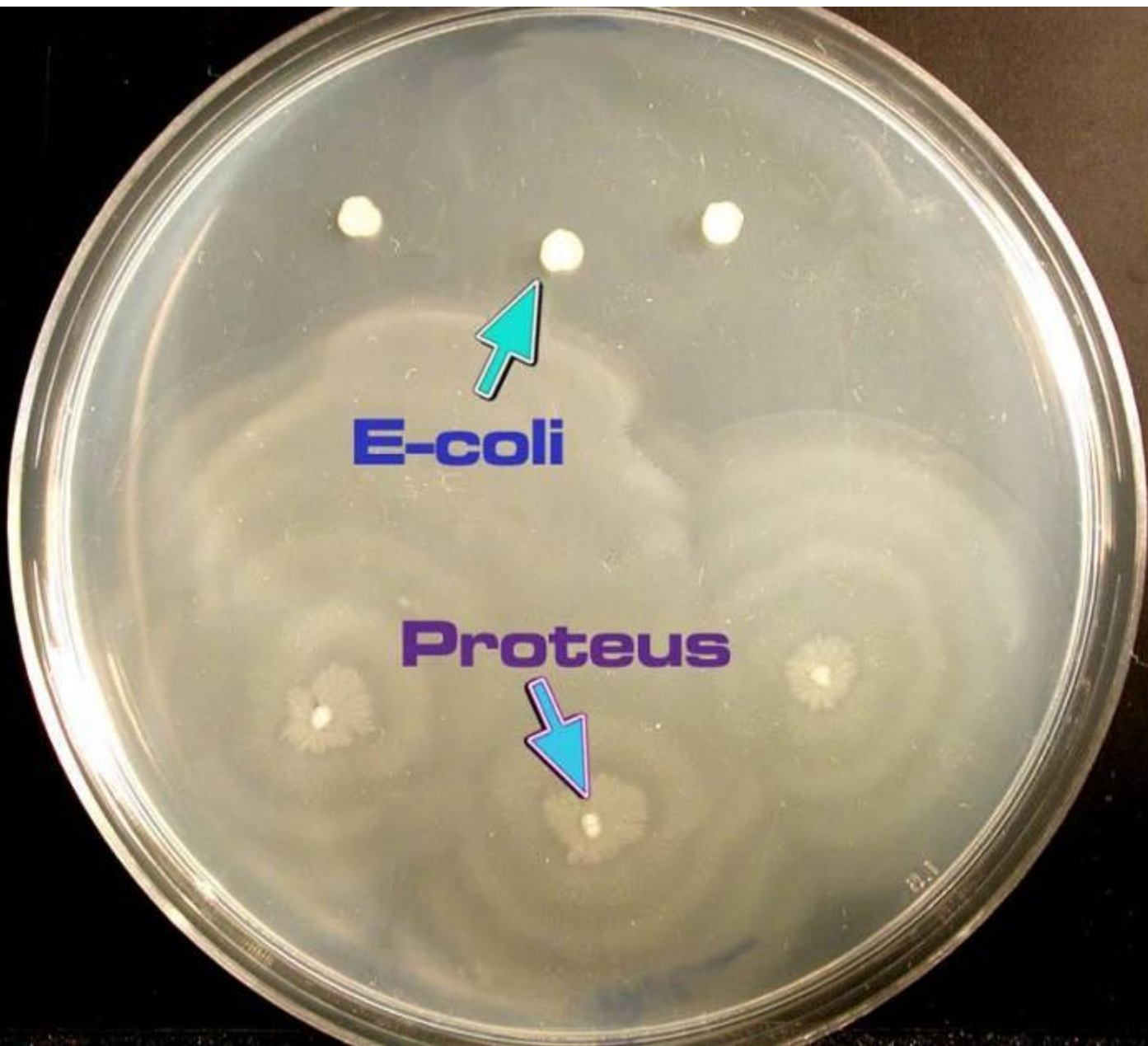


Lac (-)



Mc Conkey





E-coli

Proteus

Παραγωγή βλέννης

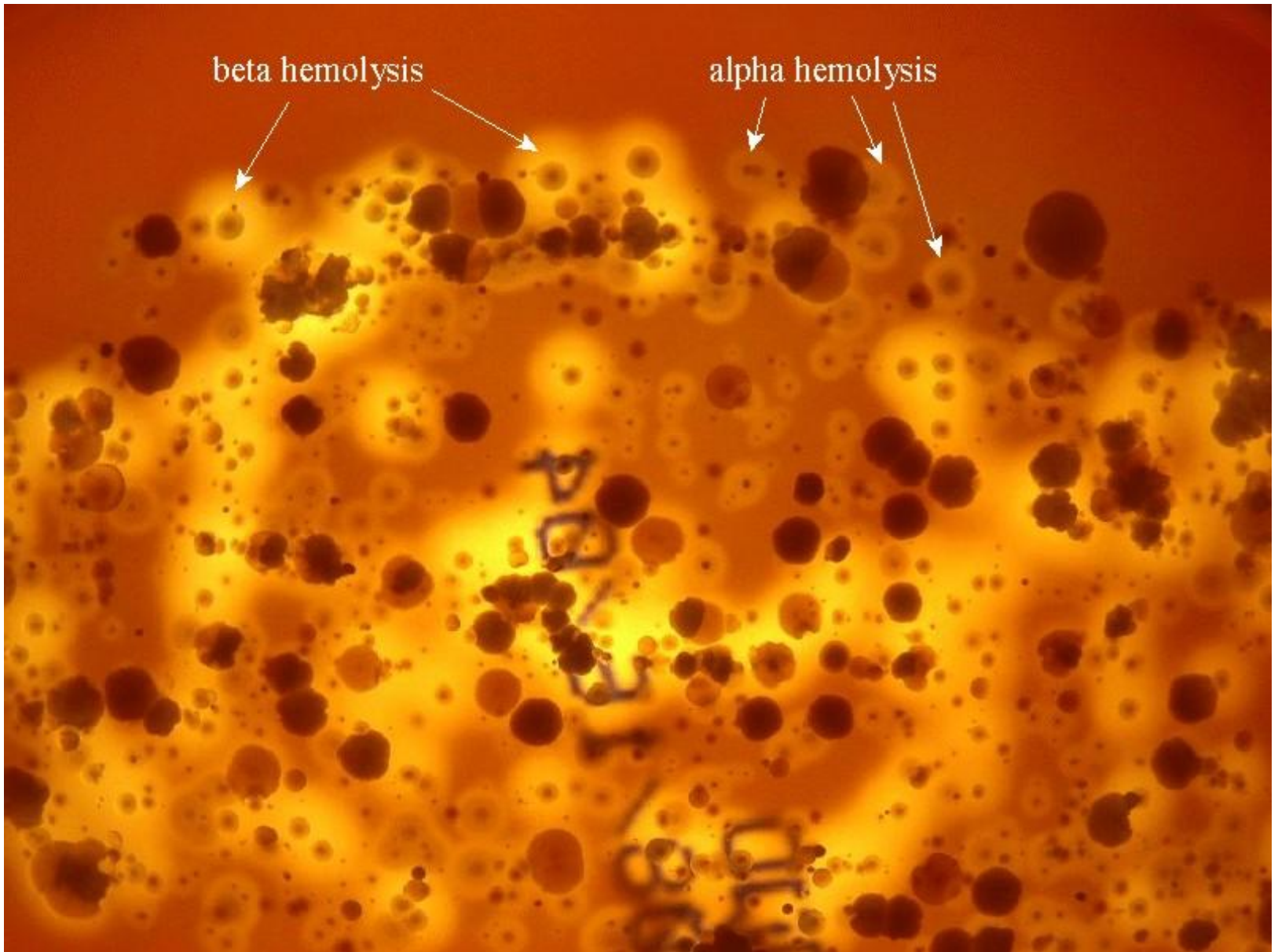


Αιμόλυση



beta hemolysis

alpha hemolysis



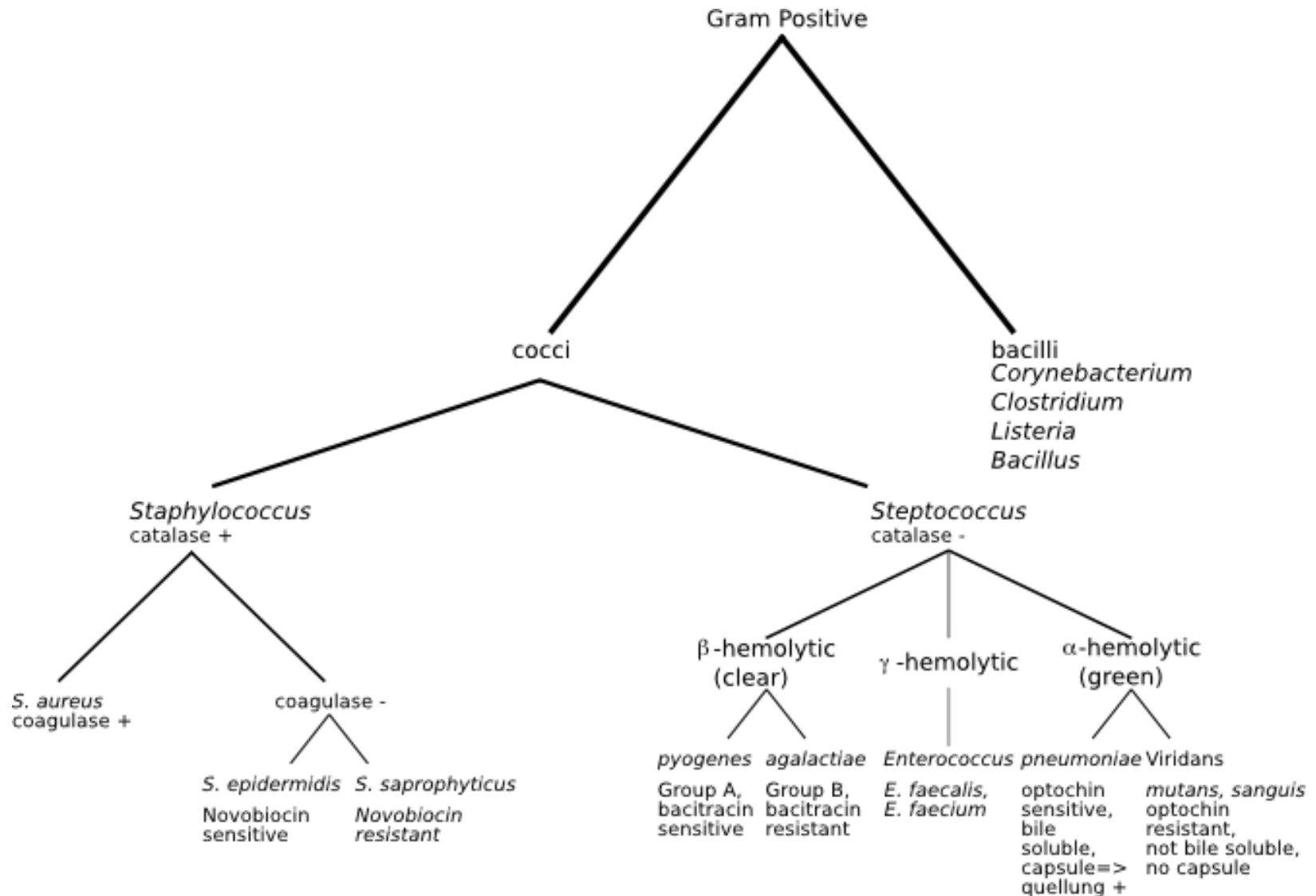
β



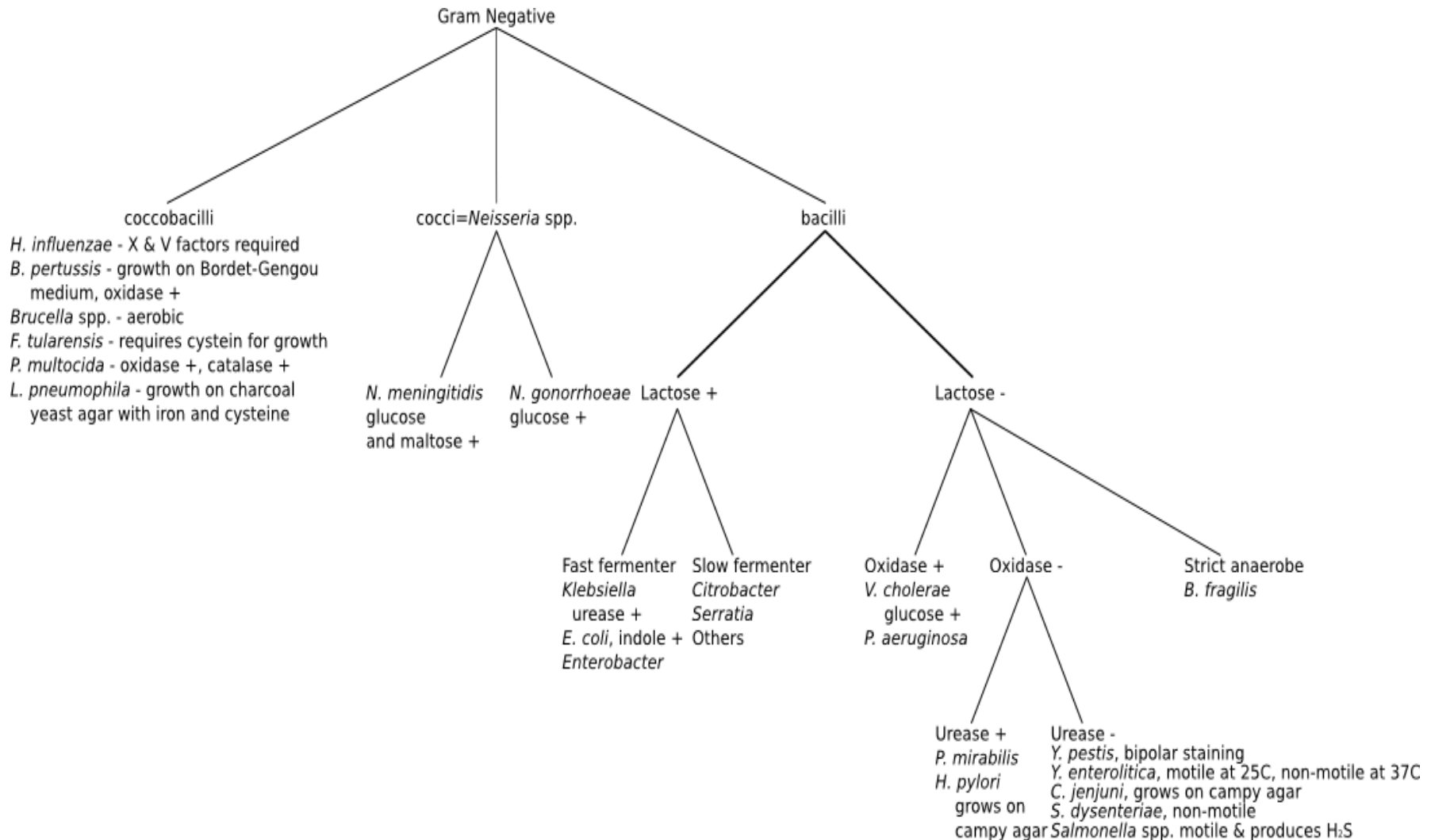
Είδη αιμόλυσης στο αιματούχο άγαρ



Αλγόριθμος ταυτοποίησης Gram +



Αλγόριθμος ταυτοποίησης Gram (-)

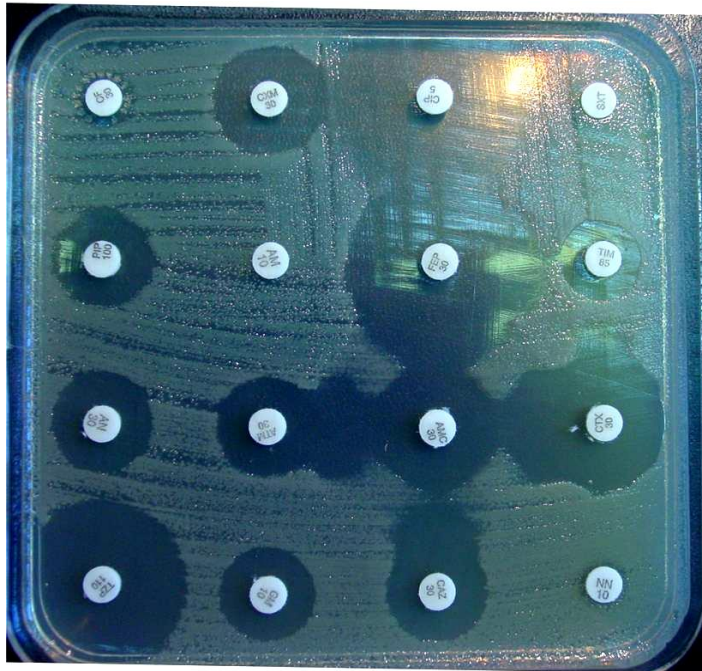


Βιοχημική ταυτοποίηση



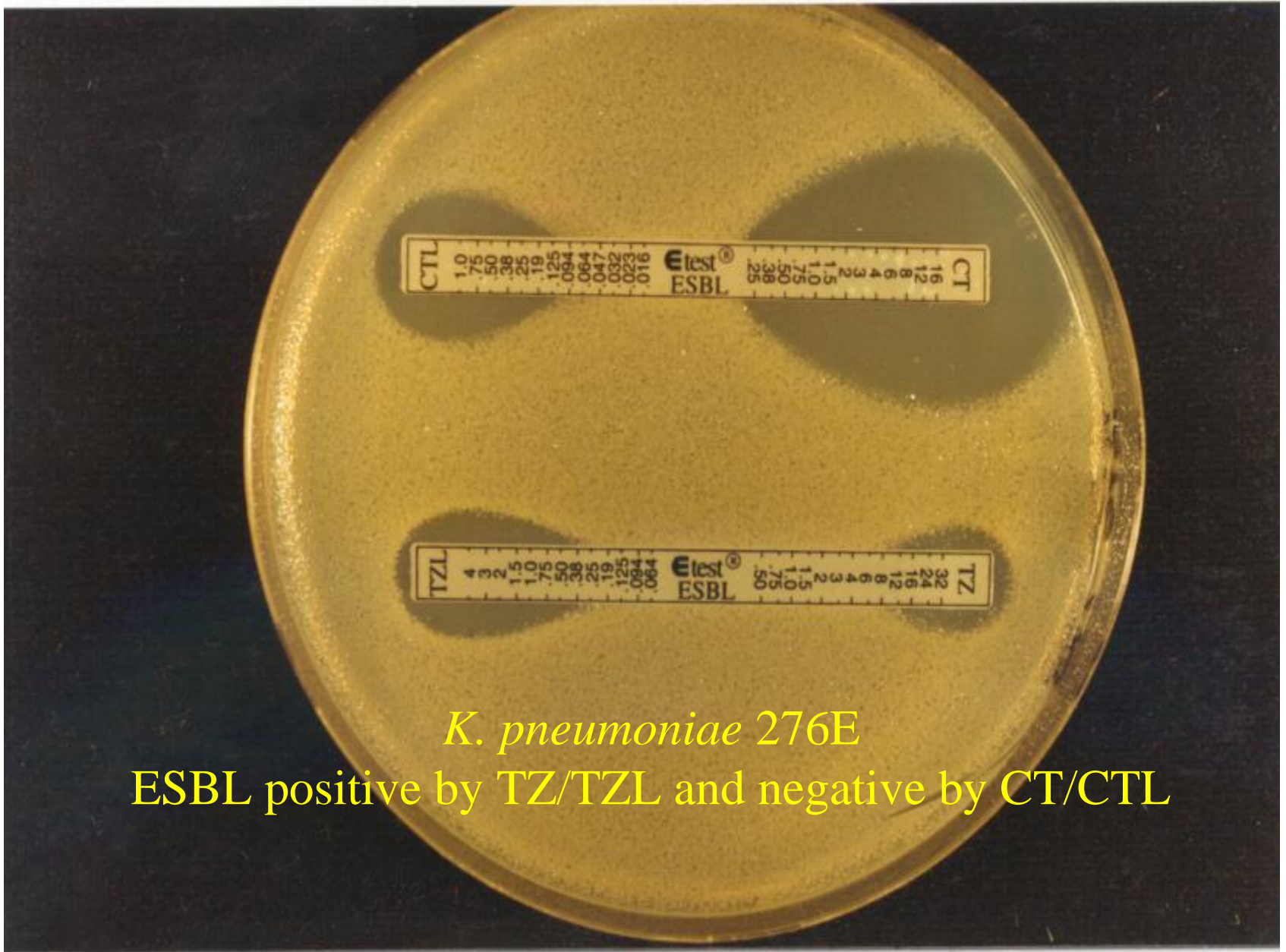
Ανίχνευση ESBLs

Δοκιμή συνέργειας των δύο δίσκων (DDST)



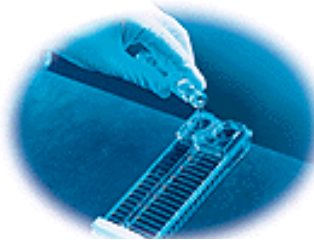
Επιβεβαιωτική δοκιμή με δίσκους (combined discs) ctx/ctx+clav και caz/caz+clav (CLSI)





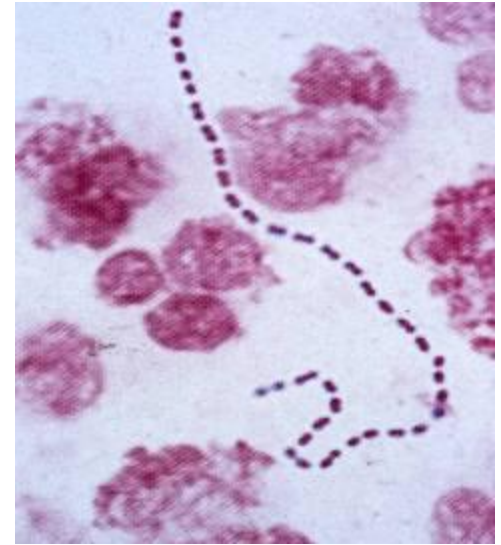
K. pneumoniae 276E
ESBL positive by TZ/TZL and negative by CT/CTL

Σύγχρονο εργαστήριο

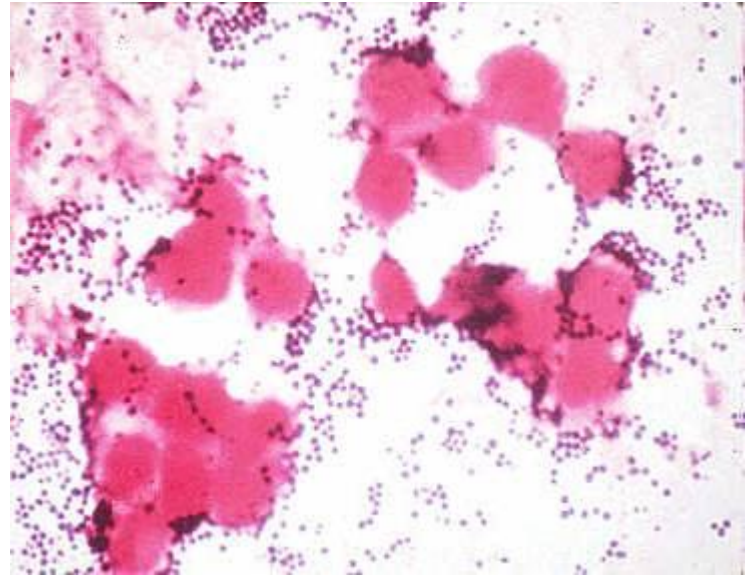




Στρεπτοκοκκική γάγγραινα



Streptococcus pyogenes



Staphylococcus aureus

Σταφυλοκοκική κυτταρίτιδα

Δερματοφυτία ψιλού δέρματος

Κλινική εικόνα

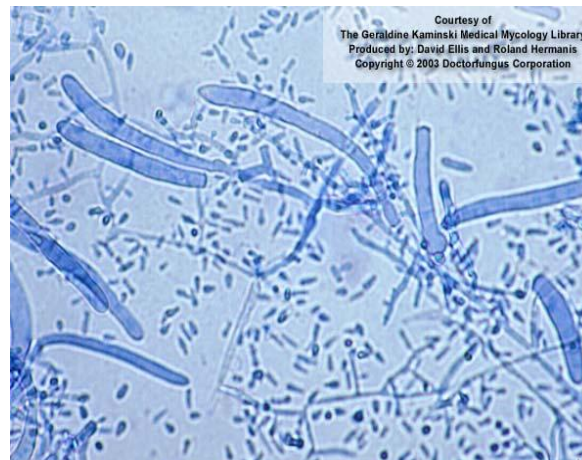
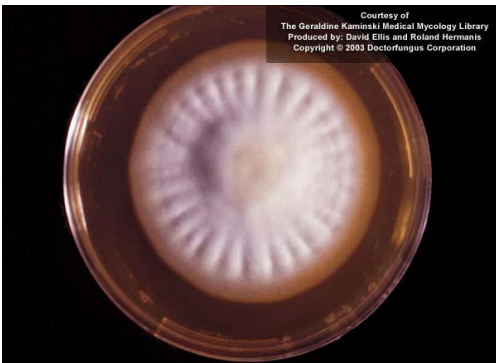


Βλατίδες, κυκλικές πλάκες κοκκιωματώδη οζίδια.

Επέκταση βλάβης φυγοκεντρικά με σχηματισμό χαρακτηριστικών δακτυλιοειδών πλακών.

Τάση ίασης
κεντρικά

Συνήθη αίτια Τριχόφυτα

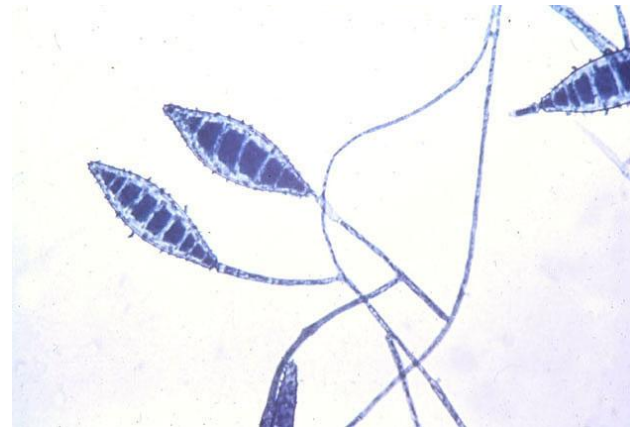


Trichophyton rubrum

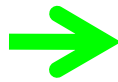


***Trichophyton
mentagrophytes***

Συνήθη αίτια Μικρόσπορα



Microsporium canis



***Microsporium
gypseum***

Εργαστηριακή διάγνωση

Άμεση μικροσκοπική
εξέταση
Λέπια με
ΚΟΗ 10-20%

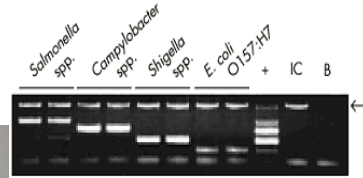


Συνήθειες μοριακές τεχνικές

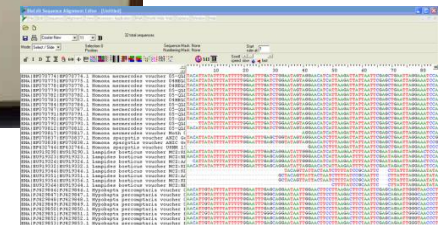
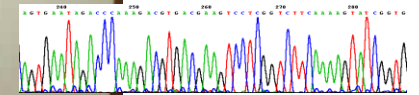
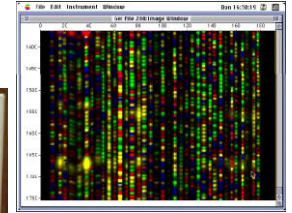
- Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)
 - απλή
 - πολλαπλή (multiplex) PCR
 - η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-PCR)
- Υβριδισμός
- Ηλεκτροφόρηση χρωμοσωμικού DNA μετά από επίδραση περιοριστικών ενζύμων σε συνεχές και παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE)
- Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing)

Ταυτοποίηση με PCR μεθόδους

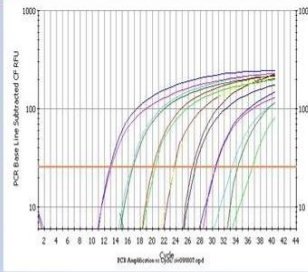
PCR



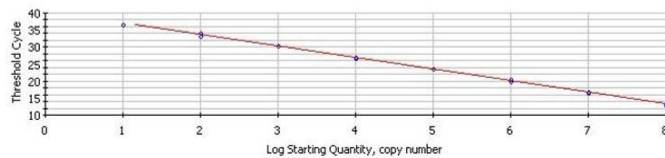
Sequencing



Real-time

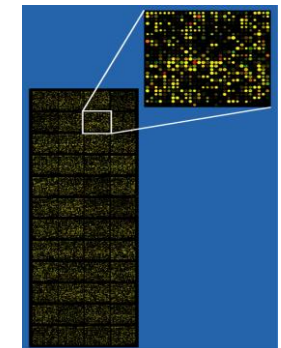
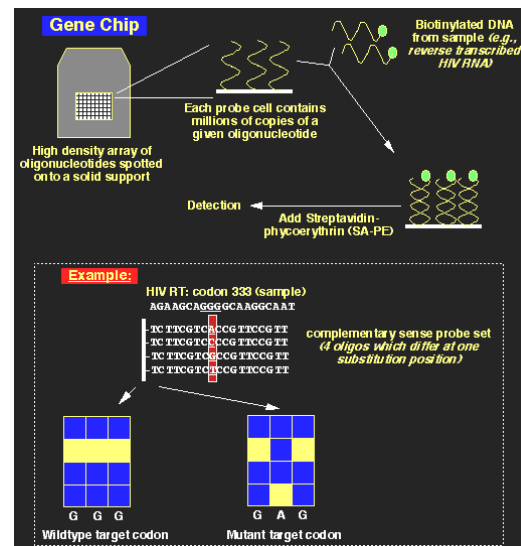


Correlation Coefficient: 0.999 Slope: -3.406 Intercept: 40.546 $Y = -3.406X + 40.546$
 PCR Efficiency: 96.6%



PCR Standard Curve: siv091807.opd

DNA microarrays



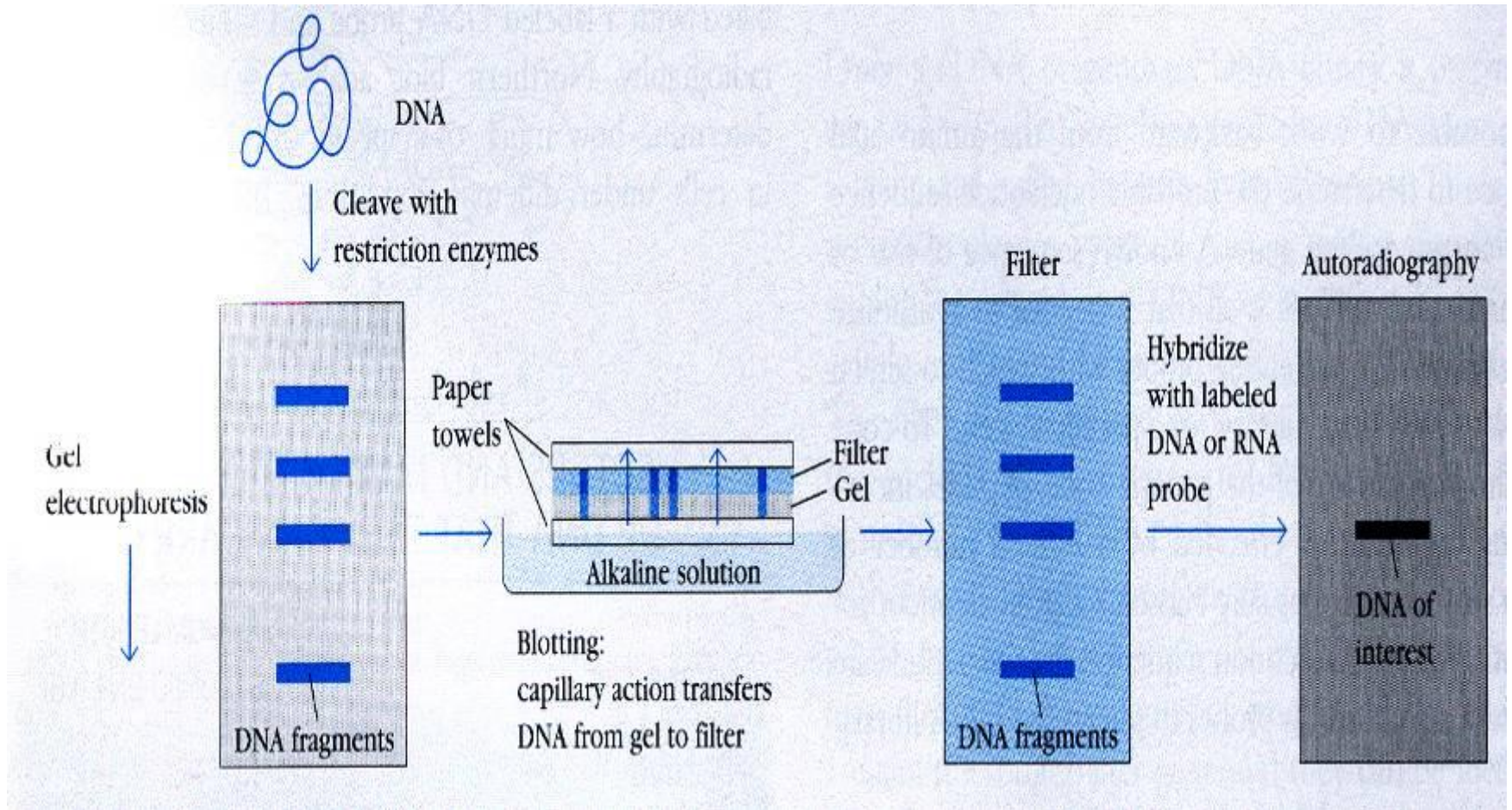
Σκοπός

- Ταξινόμηση μικροοργανισμών
- Ταυτοποίηση νέων μικροοργανισμών
- Κατανόηση παθογόνου δράσης
- Ταχεία διάγνωση λοιμωδών νοσημάτων
- Ταυτοποίηση βακτηριακών κλώνων

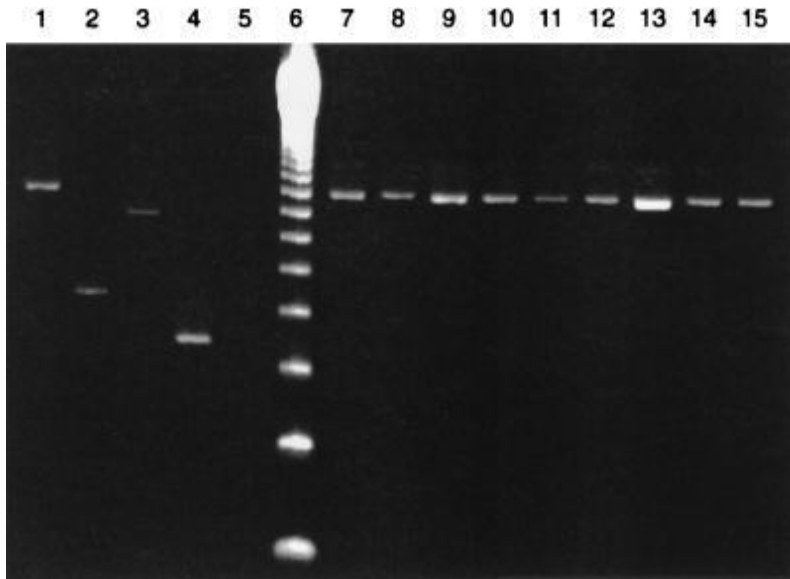
Υβριδισμός

- Colony Blot
- Dot blot
- Southern blot
- **FISH:** Fluorescent In-Situ Hybridization.

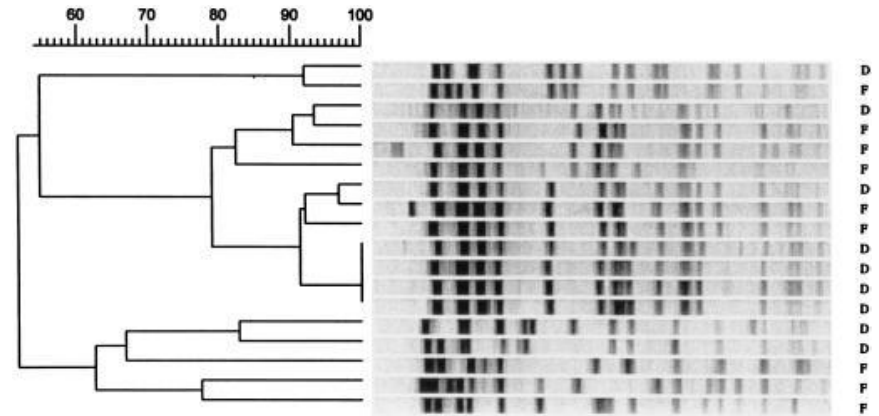
The "Blot" Block



Ταυτοποίηση enterococcal species με μοριακές μεθόδους



PCR με primers για species-specific DNA regions (D-alanine:D-alanine ligase) σε στελέχη που ταυτοποιήθηκαν ως *Enterococcus durans* με φαινοτυπικές μεθόδους



Δενδρόγραμμα ομοιότητας της *Smal* PFGE στελεχών εντεροκόκκου

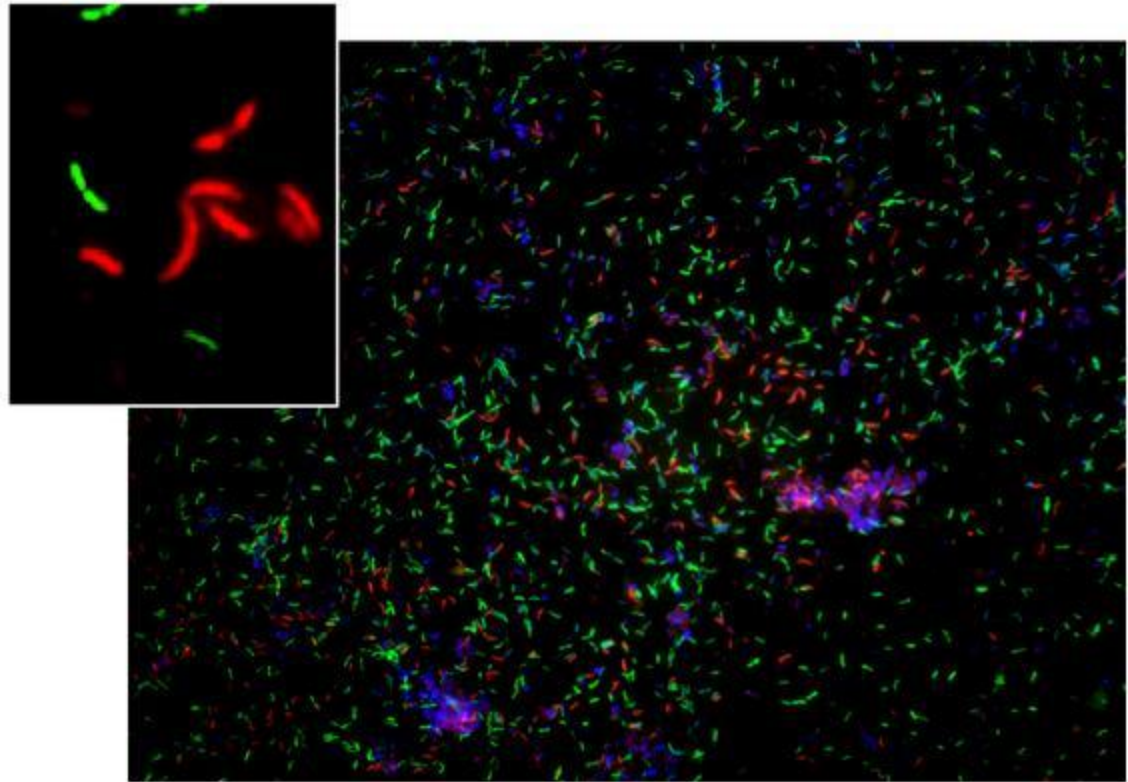
Tsakris et al. J Clin Microbiol 1998; 36:1419-21

FISH

Fluorescence In Situ Hybridization)

στη

Μικροβιολογία



Εφαρμογή

- Ανίχνευση
- Ταυτοποίηση
- Τυποποίηση παθογόνων που αναπτύσσονται δύσκολα ή καθόλου σε τεχνητά θρεπτικά υλικά

DNA-ανιχνευτής

- ⇒ σεσημασμένο τμήμα DNA ή RNA που συνδέεται με υψηλή ειδικότητα σε συμπληρωματικές βάσεις του νουκλεϊνικού οξέος-στόχου.

Επιλογή του DNA-στόχου

- Ο αριθμός των αντιγράφων του στο κύτταρο
- Η γενετική σταθερότητα της αλληλουχίας
- Το μέγεθος του στόχου

Ο στόχος μπορεί να είναι:

- Τμήμα rDNA γονιδίων
- Πλασμίδιο
- Τρανσποζόνιο
- Γονίδιο παραγωγής τοξίνης
- Γονίδιο αντοχής σε αντιβιοτικά

Σήμανση

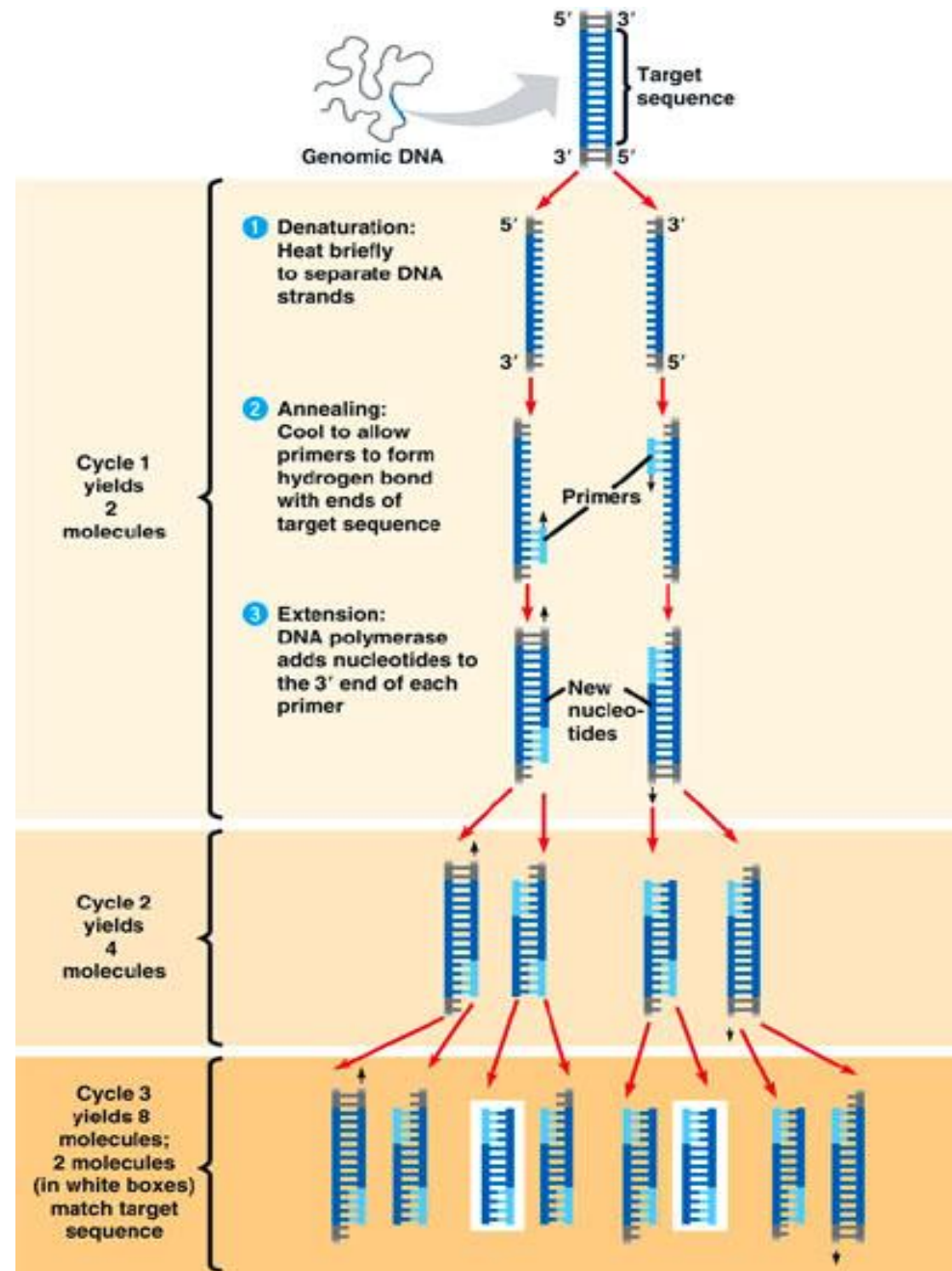
- Ραδιενεργός: ^{32}P , ^{35}S , ^3H , ^{125}I
- Μη ραδιενεργός:
 - Χημειοφωταύγεια.
 - Χρωματομετρική.
 - Φθορίζουσα.

PCR: Polymerase Chain Reaction

Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης

- Ταχύτητα
- Υψηλή ευαισθησία
- Ειδικότητα (;)

Θεωρητικά από 1 αντίγραφο DNA μπορεί να παραχθούν εκατομμύρια αντίγραφα

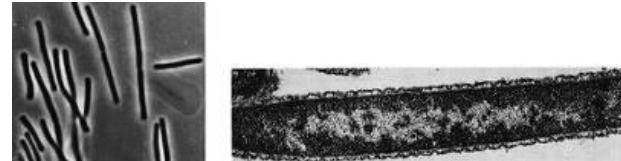


Taq polymerase

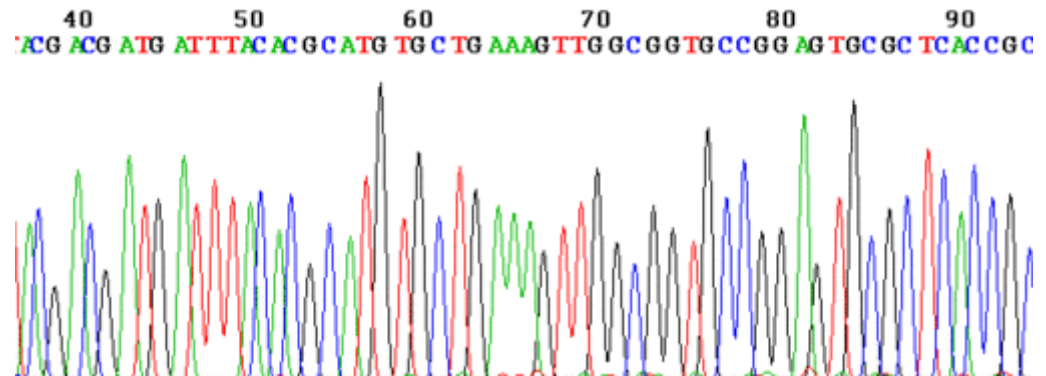
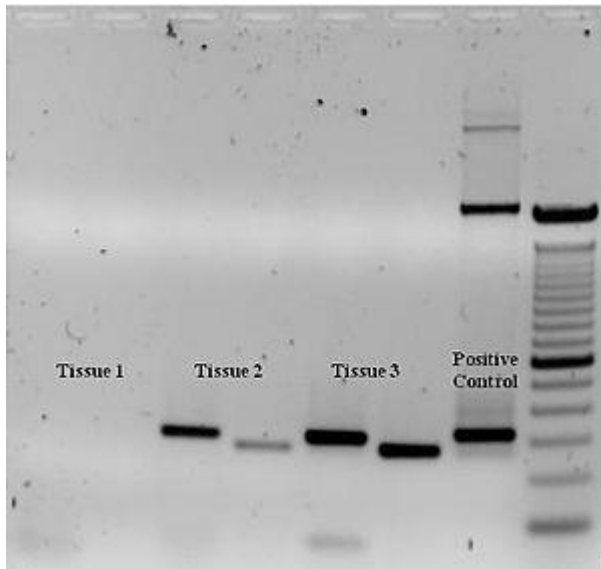
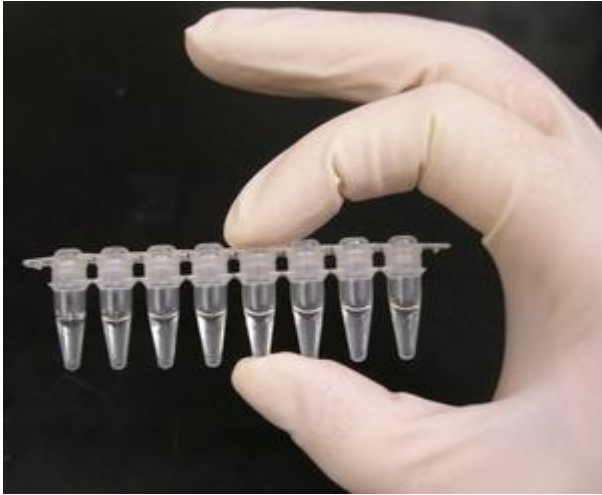


Kary Mullis

Βραβείο Nobel Χημείας
1993



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



Multiple sequence alignment

| | |
|------------|---|
| MME400919 | CCGTCCGCCGCTG-ACACC---GAAGTGCCCGCTCGACTTGCATGTGTTAAGCCTGCCGCCAGCGTTCGCT----- |
| Patient_DD | CCGTCCGCCGCTG-ACACCCCGAAAGGTGCCCGCTCGACTTGCATGTGTTAAGCCTGCCGCCAGCGTTCGCT-CTGAGCCAGG |
| AJ635303 | CCGTCTGCCGCTG-ACCCCGA-AGGG---CCCGCTCGACTTGCATGTGTTAAGCCTGCCGCCAGCGTTCGCT-CTGAGCCAT- |
| AJ785572 | CCGTCTGCCGCTG-ACCCCGA-AGGG---CCCGCTCGACTTGCATGTGTTAAGCCTGCCGCCAGCGTTCGCT-CTGAGCCAT- |
| AJ851087 | CCGTCTGCCGCTG-ACACCAC-AAGGATGCCCGCTCGACTTGCATGTGTTAAGCCTGCCGCCAGCGTTCGCT-CTGAGCCAT- |
| MFU250801 | CCGTCCGCCGCTG---ACCC--GAAAGGTCCCGCTCGACTTGCATGTGTTAAGCCTGCCGCCAGCGTTCGCT-CTGAGCCAGG |
| AY616142 | CCGTCCGCCGCTG---ACCC--GAAGGGCCCGCTCGACTTGCATGTGTTAAGCCTGCC----- |
| MTBJCMA04 | CCGTCCGCCGCTG---ACCC---GAAGGCCCGCTCGACTTGCATGTGTTAAGCCTGCCGCCAGCGTTCGCT |
| AY169421 | CCGTCCGCCGCTTGACACCCG--AAGATGCCCGCTCGACTTGCATGTGTTAAGCCTGGCCGCAGCGTTCGCTTCTGAGCCAGG |

- Σύγχρονη σύγκριση >2 αλληλουχιών
- Difficult for divergent sequences
- **Clustal** is commonly used software
- Structure-based alignment is possible
- Provides the input for phylogenetic analysis

BLASTN 2.2.13 [Nov-27-2005]

| Sequences producing significant alignments: | | | Score (Bits) | E Value |
|---|---------------------------------------|--|---------------------|------------|
| gi 51315280 dbj AB126875.1 | Nocardia aobensis gene for 16S rR... | | 987 | 0.0 |
| gi 51315282 dbj AB126877.1 | Nocardia aobensis gene for 16S rR... | | 979 | 0.0 |
| gi 51315281 dbj AB126876.1 | Nocardia aobensis gene for 16S rR... | | 979 | 0.0 |
| gi 51315284 dbj AB126879.1 | Nocardia aobensis gene for 16S rR... | | 965 | 0.0 |
| gi 37790717 gb AY262320.1 | Nocardia nova clone A9 16S ribosomal | | 946 | 0.0 |
| gi 37790721 gb AY262324.1 | Nocardia paucivorans clone A4 16S ... | | 942 | 0.0 |
| gi 44917400 dbj AB162787.1 | Nocardia nova gene for 16S rRNA, ... | | 940 | 0.0 |
| gi 37790715 gb AY262318.1 | Nocardia nova clone A11 16S riboso... | | 938 | 0.0 |
| gi 37790714 gb AY262317.1 | Nocardia nova clone A12 16S riboso... | | 938 | 0.0 |
| gi 44917397 dbj AB162784.1 | Nocardia nova gene for 16S rRNA, ... | | 936 | 0.0 |

Alignments

>[gi|51315280|dbj|AB126875.1|](#) Nocardia aobensis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:IFM
0137
Length=1515

Score = 987 bits (498), Expect = 0.0
Identities = 498/498 (100%), Gaps = 0/498 (0%)
Strand=Plus/Plus

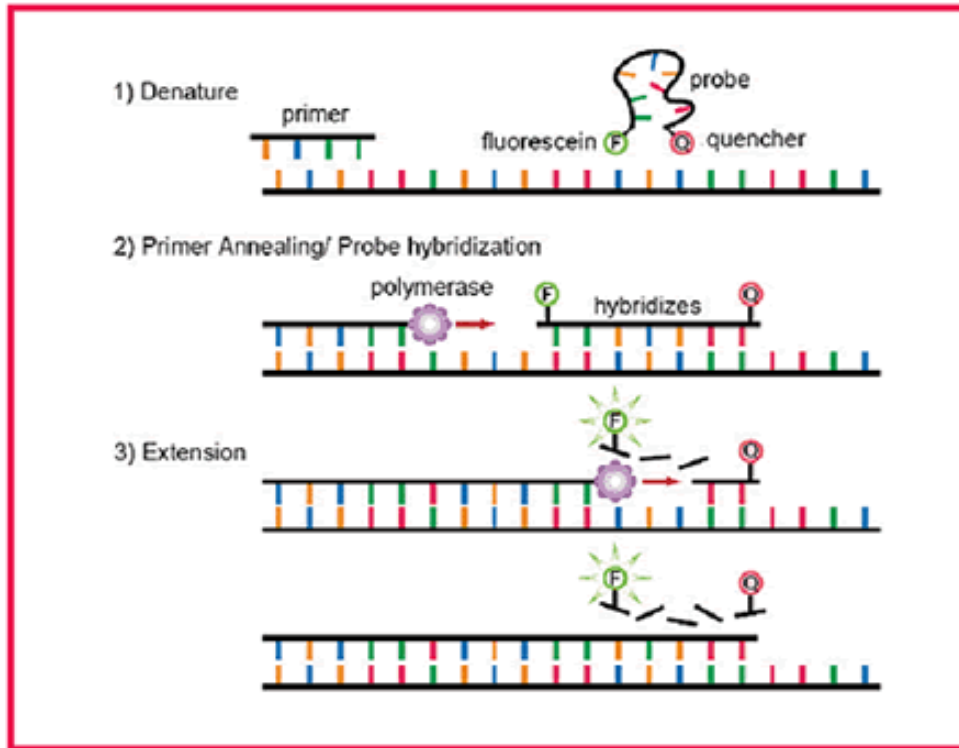
```

Query 1      AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGC 60
            |||
Sbjct 2      AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGC 61

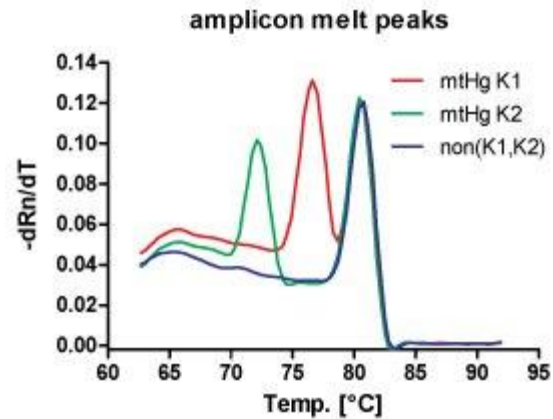
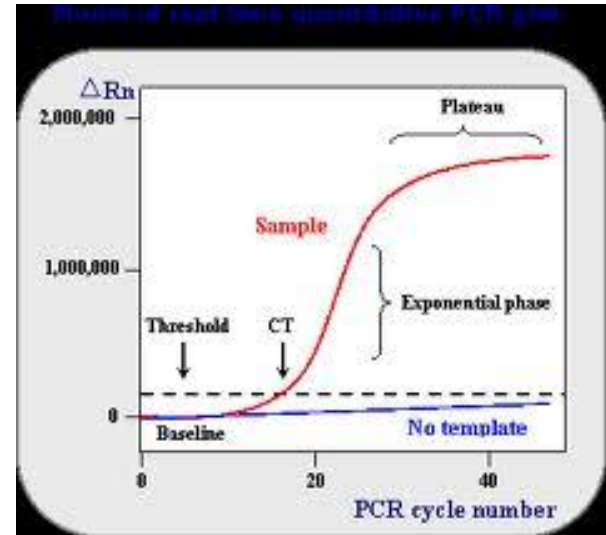
Query 61     GGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCC 120
            |||
Sbjct 62     GGTAAGGCCCTTCGGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCC 121

Query 121    TCGCACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCACCGGTGCGCA 180
            |||
  
```

Real-time PCR



TaqMan® Probe Method



Πότε εφαρμόζεται η PCR στη διάγνωση λοιμώξεων

- Αδυναμία καλλιέργειας του μικροοργανισμού
- Βραδεία ανάπτυξη
- Απαίτηση για πολύ εμπλουτισμένα ή ειδικά υλικά καλλιέργειας
- Μικρός αριθμός παθογόνων στο κλινικό υλικό
- Ανεπαρκείς ορολογικές τεχνικές ή χαμηλός τίτλος Abs
- Ανίχνευση γονιδίων τοξινών και αντοχής σε αντιμικροβιακά

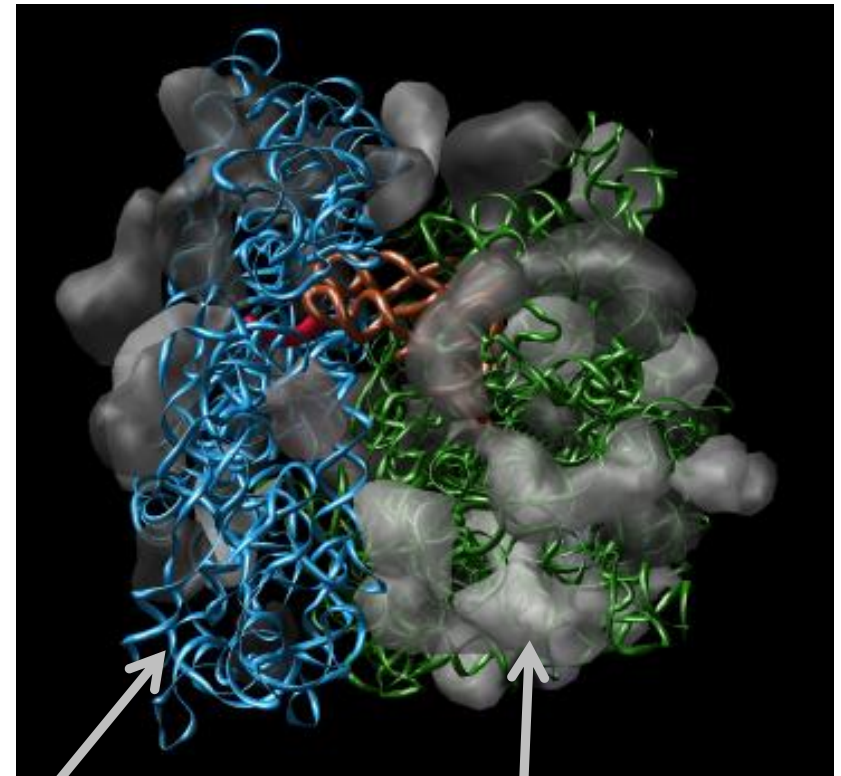
16S rRNA - a *de facto* gold standard for clinical molecular identification

- Biology
 - Universal
 - Highly conserved
 - Long enough (~1500 bp) to provide significant discrimination between many species
 - Bonus: structural information can guide alignment and phylogenetic reconstruction
- History
 - Early work described the usefulness of this gene in taxonomy
 - Many species now represented in databases

70S ribosome

Ribosome architecture

E. coli (1pns / 1pnu) with proteins shown as transparent surfaces and RNA shown as ribbons. Green is large subunit **23S** and **5S rRNA**. Blue is small subunit **16S rRNA**. Orange are two **tRNAs**. Red is mRNA.



16S rRNA

proteins

Άλλα γονίδια

- Mycobacteria
 - Hsp65
 - rpoB (RNA polymerase)
- Fungi
 - Internal Transcribed Spacer (ITS) 1 and 2 regions
 - 26S rRNA

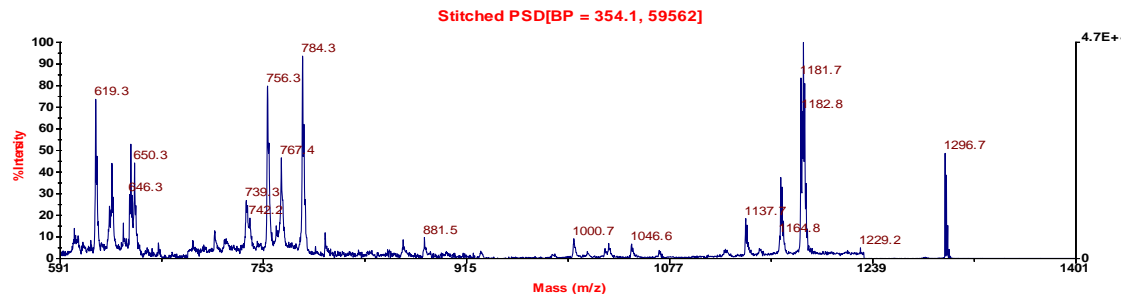
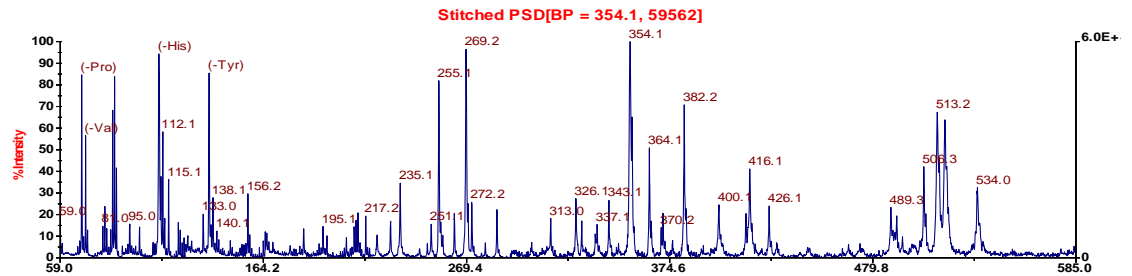
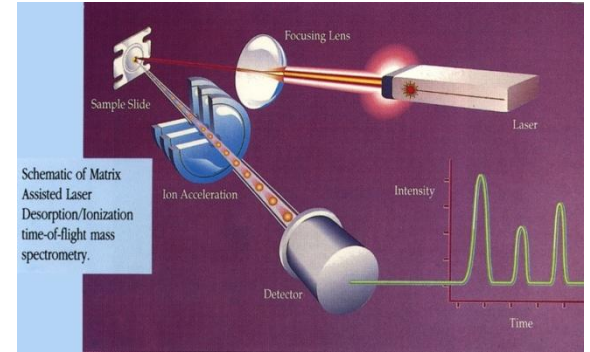
MALDI TOF

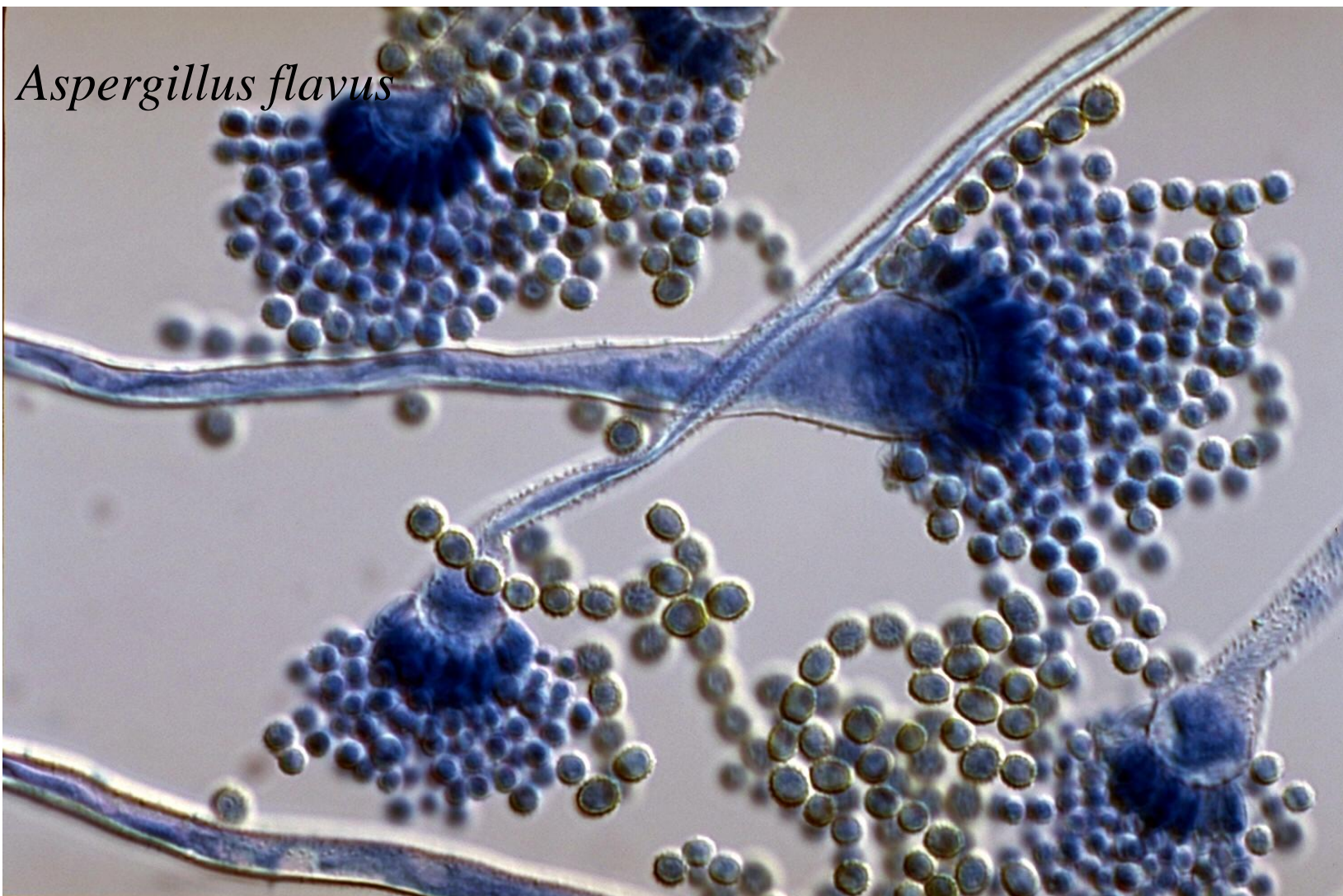
Matrix-assisted laser desorption/ionization

Time-of-flight mass spectrometry



Composite of the focused mass regions from several spectra acquired with different mirror ratios





Ευχαριστώ