



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»

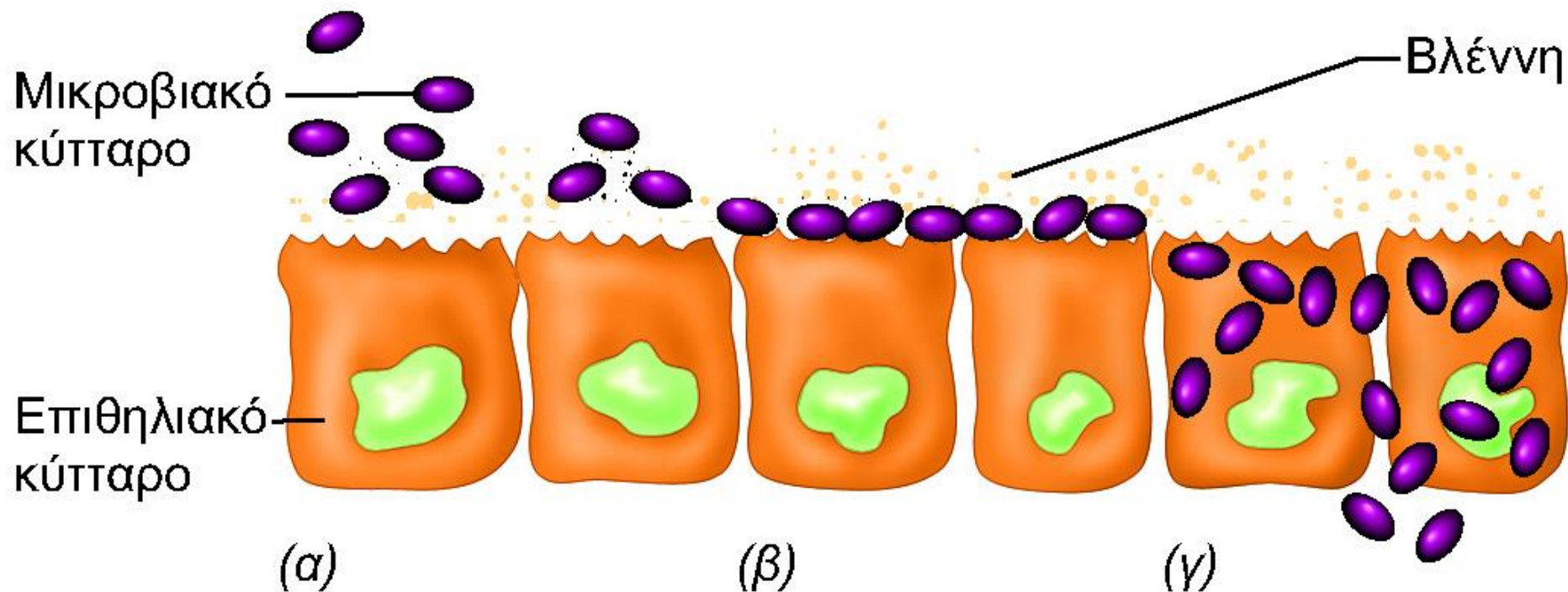
Μοριακή διάγνωση παθογόνων μικροοργανισμών

Επίκουρος Καθηγητής Δημήτρης Μόσιαλος

- Το ανθρώπινο σώμα είναι συνεχώς εκτεθειμένο σε μικροοργανισμούς. Εκατοντάδες διαφορετικά είδη μικροοργανισμών, αναπτύσσονται πάνω και μέσα στο σώμα μας και αποτελούν την φυσιολογική χλωρίδα. Οι περισσότεροι από αυτούς δεν είναι βλαβεροί.
- Οι οργανισμοί που ζουν πάνω και μέσα σε ένα ξενιστή και είναι βλαβεροί ονομάζονται παράσιτα. Τα μικροβιακά παράσιτα ονομάζονται παθογόνοι μικροοργανισμοί. Το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης ξενιστή-παρασίτου εξαρτάται από την παθογονικότητα του παρασίτου αλλά και την ανθεκτικότητα του ξενιστή.
- Οι όροι μόλυνση και ασθένεια δεν είναι ταυτόσημοι. Μόλυνση είναι η ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού στον ξενιστή ανεξάρτητα από το εάν προκαλεί βλάβη στο ξενιστή ή όχι. Στην περίπτωση που προκαλεί βλάβη τότε ονομάζεται μικροβιακή ασθένεια

Το ανθρώπινο σώμα είναι ευνοϊκό ενδιαίτημα για τους μικροοργανισμούς

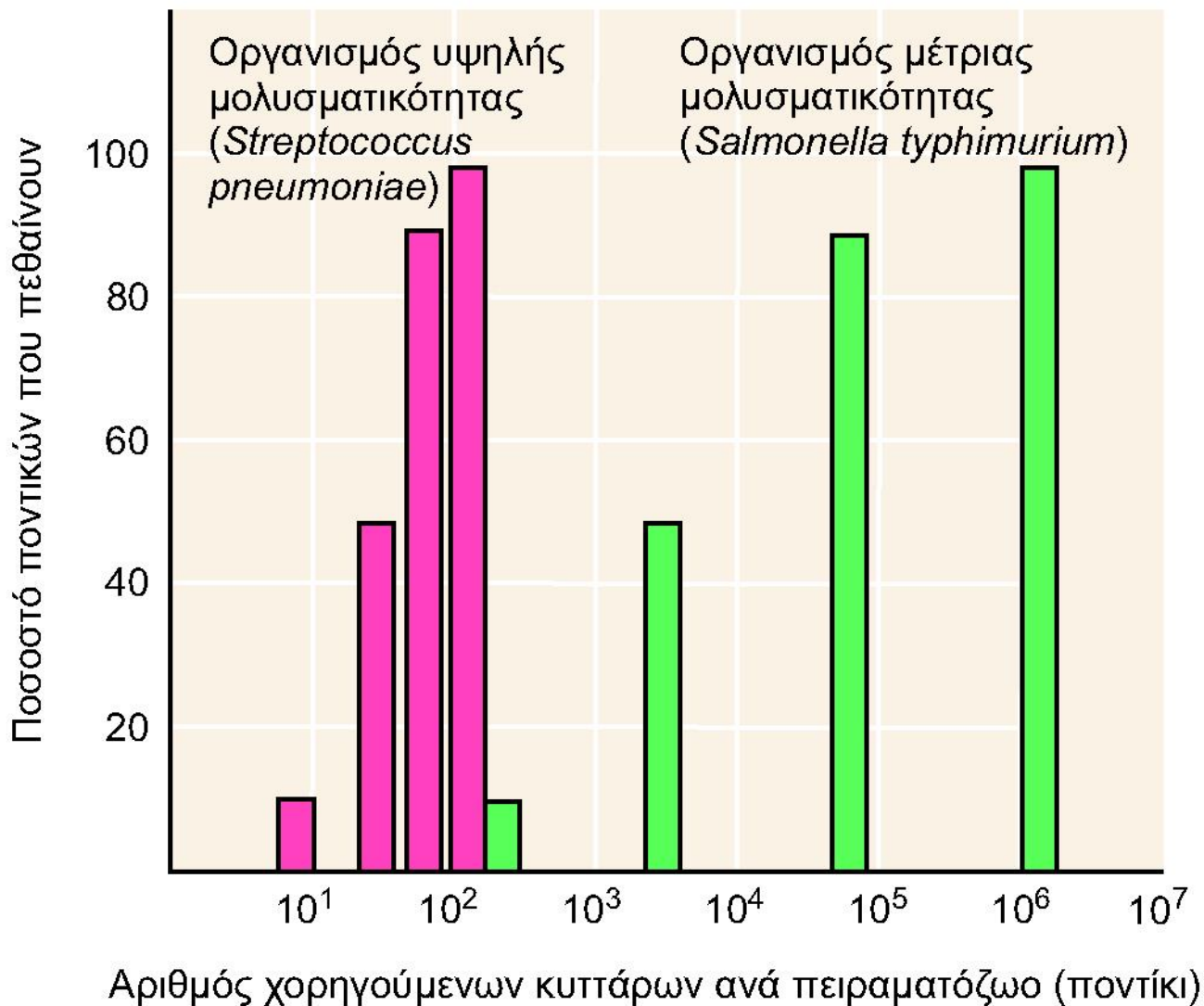
- Το ανθρώπινο σώμα είναι πλούσιο σε οργανικά θρεπτικά συστατικά και αυξητικούς παράγοντες που χρειάζονται οι χημειοργανότροφοι μικροοργανισμοί και παρέχει σχετικά σταθερές συνθήκες (pH, οσμωτική πίεση, θερμοκρασία)
- Κάθε όργανο και περιοχή του σώματος παρέχει διαφορετικές συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη συγκεκριμένων μικροοργανισμών. Για παράδειγμα το σχετικά ξηρό δέρμα ευνοεί την ανάπτυξη του *Staphylococcus aureus* και το οξυγονωμένο περιβάλλον των πνευμόνων ευνοεί την ανάπτυξη του υποχρεωτικά αερόβιου βακτηρίου *Mycobacterium tuberculosis*
- Η μόλυνση συχνά ξεκινά από τους βλεννογόνους υμένες. Βρίσκονται σε πολλά μέρη του σώματος όπως το στόμα, τον φάρυγγα, αναπνευστικό σύστημα, το γαστρεντερικό και το ουρογεννητικό.



Εικόνα 21.1 Αλληλεπίδραση βακτηρίων με βλεννογόνους υμένες. (α) Χαλαρή σχέση. (β) Προσκόλληση. (γ) Διείσδυση στα επιθηλιακά κύτταρα κάτω από τη στιβάδα της βλέννης.

Βλαβερές αλληλεπιδράσεις ανθρώπου-μικρόβιων

- Πολλοί μικροοργανισμοί όχι απλώς μολύνουν αλλά βλάπτουν τον ξενιστή τους χρησιμοποιώντας διαφορετικές στρατηγικές για να αυξήσουν την μολυσματικότητα τους (virulence). Η μολυσματικότητα μπορεί να εκτιμηθεί πειραματικά από μελέτες του LD₅₀ (lethal dose₅₀).
- Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί όταν διατηρούνται για μεγάλο διάστημα σε εργαστηριακές καλλιέργειες γίνονται λιγότερο μολυσματικοί εξαιτίας της επικράτησης μη-μολυσματικών μεταλλαγμάτων στον μικροβιακό πληθυσμό.
- Η μολυσματικότητα οφείλεται στην ικανότητα των παθογόνων να προκαλούν ασθένειες μέσω της τοξικότητάς τους (*Clostridium tetani*) και της ικανότητάς τους να εισβάλλουν στον ξενιστή και να αντιμετωπίζουν την ανοσολογική του απόκριση (*Streptococcus pneumoniae*).



Εικόνα 21.15 Συγκριτικές διαφορές στη μικροβιακή μολυσματικότητα, με βάση τον αριθμό των κυττάρων *Streptococcus pneumoniae* και *Salmonella typhimurium* που απαιτούνται για να θανατωθούν πειραματόζωα.

Παράγοντες μολυσματικότητας και τοξίνες

- Πολλοί μολυσματικοί παράγοντες είναι ένζυμα (πχ πρωτεάσες, λιπάσες, υαλουρονιδάση) που επιτρέπουν στο παθογόνο να αποικίσει τον ξενιστή και να αναπτυχθεί μέσα σε αυτόν.
- Οι διάφορες τοξίνες είναι επίσης μολυσματικοί παράγοντες που ενισχύουν την τοξικότητα του παθογόνου και προκαλούν άμεση βλάβη στον ξενιστή
- Οι τοξίνες διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες τις εξωτοξίνες, και τις ενδοτοξίνες.

Εξωτοξίνες

- Οι εξωτοξίνες είναι πρωτεΐνες που απελευθερώνονται εξωκυτταρικά κατά την διάρκεια ανάπτυξης του παθογόνου. Δεν παραμένουν μόνο στο σημείο μόλυνσης του παθογόνου αλλά μπορούν να μεταφερθούν σε άλλα όργανα και ιστούς του ξενιστή.
- Οι περισσότερες εξωτοξίνες ανήκουν σε μία από τις 3 κατηγορίες: κυτταρολυτικές, τοξίνες A-B και υπεραντιγονικές τοξίνες. Οι κυτταρολυτικές δρουν ενζυμικά και προκαλούν λύση του κυττάρου, οι τοξίνες A-B αποτελούνται από δύο υπομονάδες. Η υπομονάδα B συνήθως δεσμεύεται σε συγκεκριμένο κυτταρικό υποδοχέα και μεταφέρει την υπομονάδα A μέσα στο κύτταρο-στόχο. Οι υπεραντιγονικές τοξίνες υπερδιεγείρουν την ανοσοαπόκριση του ξενιστή με αποτέλεσμα εκτεταμένες φλεγμονώδεις αποκρίσεις.

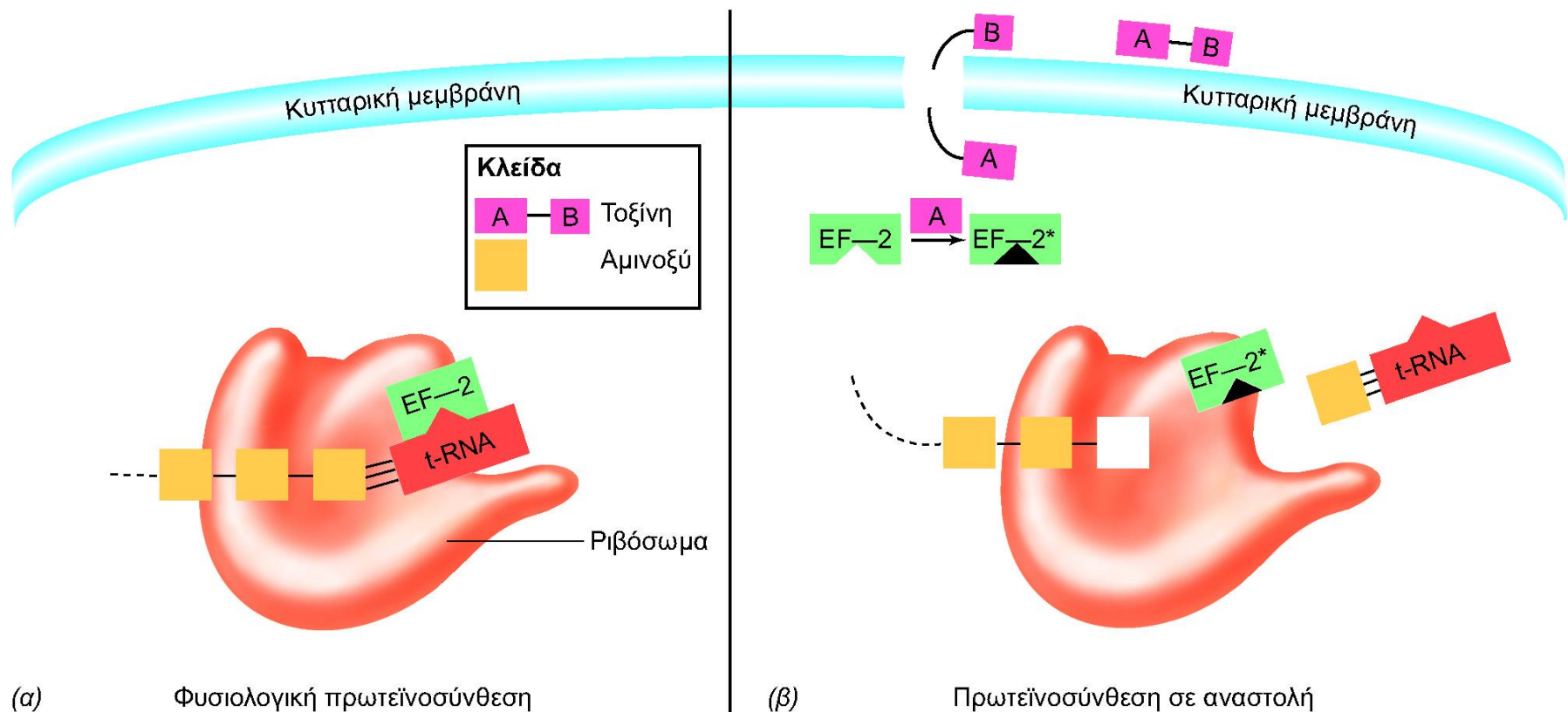
Κυτταρολυτικές τοξίνες

- Οι κυτταρολυτικές τοξίνες δρουν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων προκαλούν την λύση τους και κατά συνέπεια κυτταρικό θάνατο. Η δράση τους μπορεί να ανιχνευθεί με ερυθροκύτταρα για αυτό συχνά ονομάζονται αιμολυσίνες. Ένα παθογόνο που παράγει αιμολυσίνες εάν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο που περιέχει αίμα θα δώσει αποικίες που περιβάλλονται από ζώνη αιμόλυσης (καταστροφή των ερυθροκυττάρων που περιέχονται στο θρεπτικό μέσο).
- Οι κυτταρολυτικές τοξίνες επιδρούν στα φωσφολιπίδια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του ξενιστή. Επειδή το φωσφολιπίδιο λεκιθίνη αποτελεί συχνά υπόστρωμα τους ονομάζονται και λεκιθινάσες ή φωσφολιπάσες. Αυτό δεν σημαίνει ότι όλες οι αιμολυσίνες είναι φωσφολιπάσες καθώς μπορεί να δρουν σε άλλα συστατικά της μεμβράνης (πχ στερόλες)



Τοξίνη της διφθερίτιδας

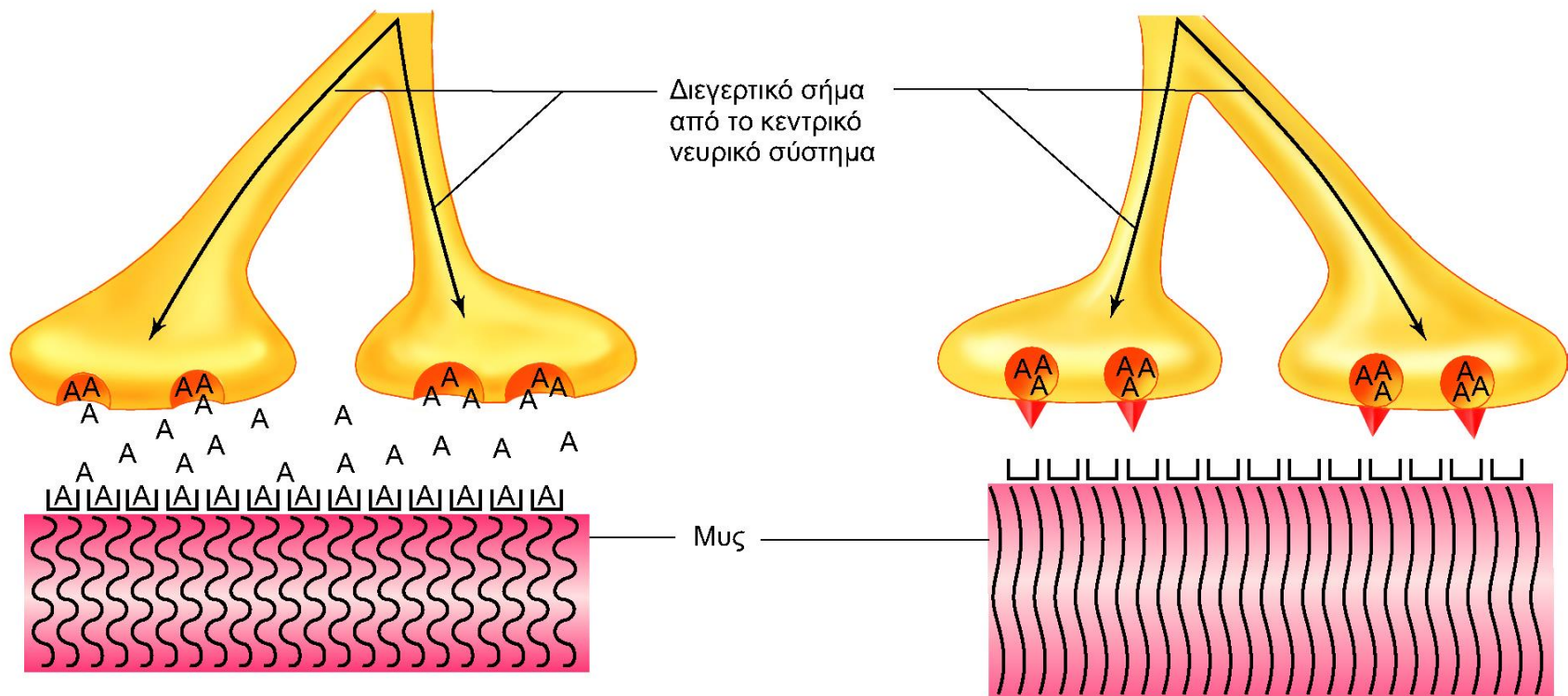
- Η τοξίνη αυτή παράγεται από το βακτήριο *Corynebacterium diphtheriae* και ανήκει στις A-B τοξίνες. Η τοξίνη αυτή εκκρίνεται από το βακτήριο ως ένα πολυπεπτίδιο 62 kDa. Το τμήμα του πολυπεπτιδίου που αντιστοιχεί στην υπομονάδα B δεσμεύεται σε έναν υποδοχέα του ξενιστή. Μετά την δέσμευση, πρωτεόλυση του πολυπεπτιδίου επιτρέπει την είσοδο της υπομονάδας A μέσα στο κύτταρο. Η υπομονάδα A αδρανοποιεί τον παράγοντα επιμήκυνσης-2 με αποτέλεσμα την καταστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης.
- Η παραγωγή της τοξίνης γίνεται μόνο από στελέχη τα οποία έχουν υποστεί τροποποίηση φάγου (που διαθέτει το γονίδιο *tox*) και μόνο σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου.
- Η εξωτοξίνη A που παράγεται από την *Pseudomonas aeruginosa* έχει παρόμοιο τρόπο δράσης



Εικόνα 21.18 Δράση της τοξίνης της διφθερίτιδας, την οποία παράγει το *Corynebacterium diphtheriae*. (α) Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο παράγοντας επιμήκυνσης 2 (EF-2) συνδέεται με το ριβόσωμα και το φέρνει σε επαφή με ένα φορτισμένο tRNA. (β) Η τοξίνη της διφθερίτιδας συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη, όπου διασπάται. Η υπομονάδα A που προκύπτει από τη διάσπαση αυτή μεταφέρεται στον ενδοκυτταρικό χώρο, όπου καταλύει την προσθήκη ριβοζυλιωμένου ADP στον παράγοντα επιμήκυνσης 2 (EF-2*). Ο τροποποιημένος παράγοντας επιμήκυνσης 2 δεν μπορεί πλέον να συμμετάσχει στην προσθήκη αμινοξέων στην αυξανόμενη πεπτιδική αλυσίδα, η διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης σταματά και επέρχεται θάνατος του κυττάρου.

Τοξίνες του τétανου και αλλαντίασης

- Οι τοξίνες αυτές παράγονται από τα υποχρεωτικά αναερόβια βακτήρια *Chlostridium tetani* και *Clostridium botulinum*. Το *Clostridium botulinum* σπάνια αναπτύσσεται στο σώμα αλλά αντιθέτως αναπτύσσεται και παράγει τοξίνη σε μη καλώς συντηρημένα τρόφιμα. *Chlostridium tetani* αναπτύσσεται σε βαθιές πληγές που του παρέχουν αναερόβιες συνθήκες. Η τοξίνη της αλλαντίασης ανήκει στις A-B τοξίνες, είναι από τις πιο επικίνδυνες γνωστές τοξίνες και προκαλεί τον θάνατο λόγω αναπνευστικής ανεπάρκειας καθώς μπλοκάρει τον νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη εμποδίζοντας την **σύσπαση των αναπνευστικών μυών**. Αντίθετα η τοξίνη του τétανου μπλοκάρει τον νευροδιαβιβαστή γλυκίνη που παράγεται από **ανασταλτικούς νευρώνες** που φυσιολογικά εμποδίζουν την ακατάσχετη μυϊκή συστολή με αποτέλεσμα την **συνέχιση σύσπαση** των μυών και τον **θάνατο λόγω ασφυξίας**.



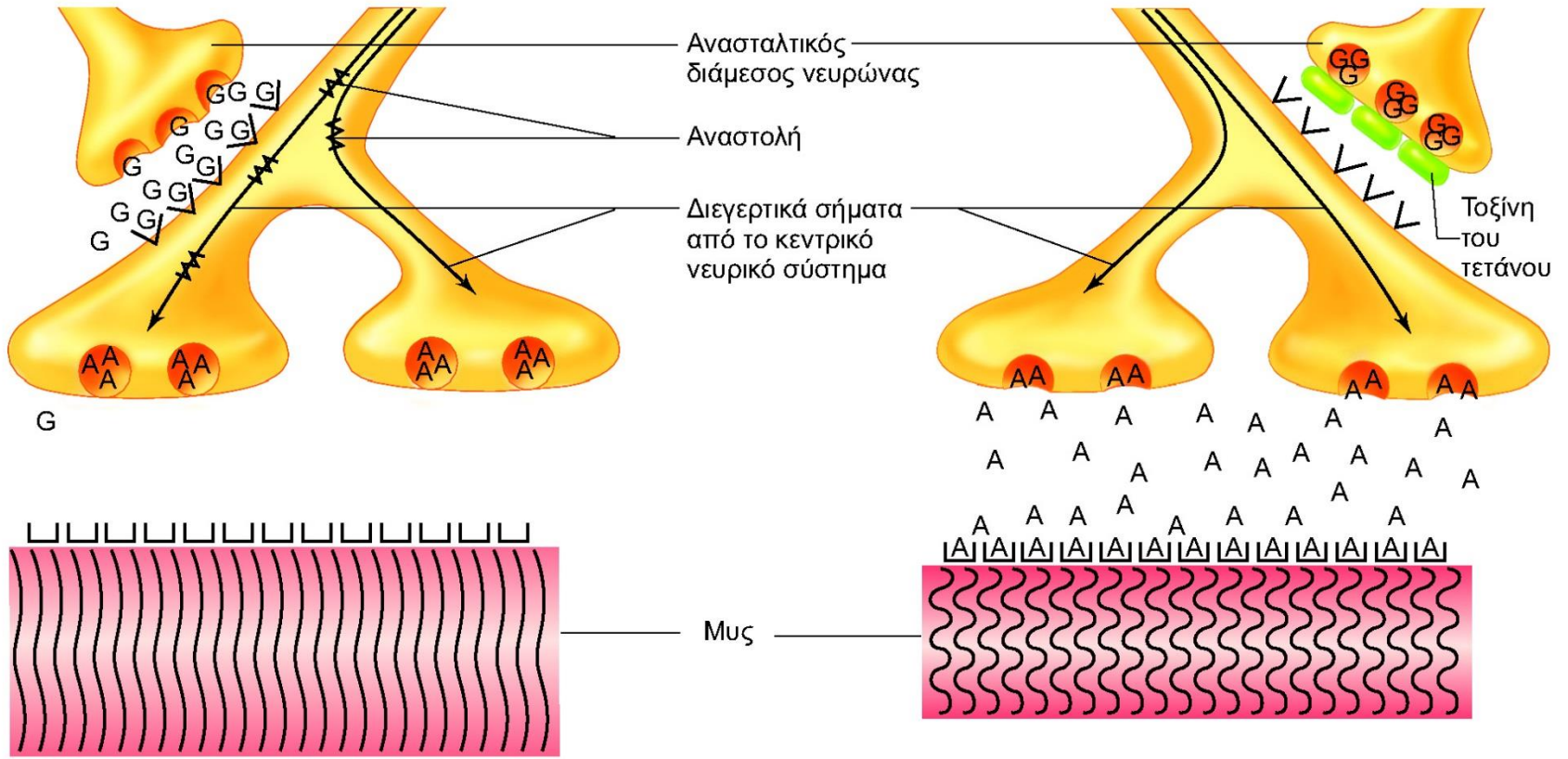
Φυσιολογικές συνθήκες
 Η ακετυλοχολίνη (A) προκαλεί
 συστολή των μυϊκών ινών

(α)

Αλλαντίαση
 Η αλλαντοτοξίνη, ▲, εμποδίζει την
 απελευθέρωση της A, αναστέλλοντας έτσι
 τη μυϊκή συστολή

(β)

Εικόνα 21.19 Δράση της αλλαντοτοξίνης, η οποία παράγεται από το *Clostridium botulinum*. (α) Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η διέγερση από το κεντρικό νευρικό σύστημα καταλήγει στη νευρομυϊκή σύναψη και έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ακετυλοχολίνης (A) από τα κυστίδια των νευρικών απολήξεων στην τελική κινητική πλάκα. Στη συνέχεια, η ακετυλοχολίνη συνδέεται με ειδικούς υποδοχείς στη μεμβράνη του μυϊκού κυττάρου, προκαλώντας συστολή του τελευταίου. (β) Η αλλαντοτοξίνη δρα στην τελική κινητική πλάκα, παρεμποδίζοντας την απελευθέρωση ακετυλοχολίνης (A) από τα κυστίδια, «καταργώντας» στην πράξη τη νευρική διέγερση. Αποτέλεσμα της δράσης αυτής είναι η μη αντιστρεπτή χάλαση του μύος και τελικά η μυϊκή παράλυση (👁️ Τμήμα 29.5).



Φυσιολογικές συνθήκες

Η γλυκίνη (G) που απελευθερώνεται από τους ανασταλτικούς διάμεσους νευρώνες σταματά την απελευθέρωση ακετυλοχολίνης (A) και επιφέρει χάλαση των μυών (α)

Τέτανος

Η τετανοτοξίνη δεσμεύεται στους ανασταλτικούς διάμεσους νευρώνες, εμποδίζοντας την απελευθέρωση γλυκίνης και τη χάλαση των μυών (β)

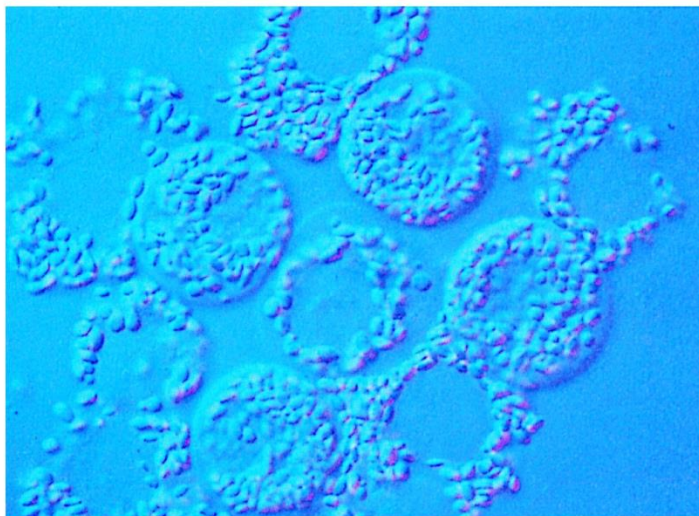
Εικόνα 21.20 Δράση της τετανοτοξίνης, την οποία παράγει το *Clostridium tetani*. (α) Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η χάλαση των μυών οφείλεται στη γλυκίνη (G) που απελευθερώνουν ορισμένοι διάμεσοι ανασταλτικοί νευρώνες. Η γλυκίνη αποδιεγείρει τους κινητικούς νευρώνες, κάτι που με τη σειρά του σημαίνει ότι διακόπτεται η απελευθέρωση ακετυλοχολίνης (A) στη νευρομυϊκή σύναψη. (β) Η τετανοτοξίνη δεσμεύεται σε διάμεσους ανασταλτικούς νευρώνες, εμποδίζοντας την απελευθέρωση γλυκίνης από τα συναπτικά κυστίδια. Έτσι, διακόπτεται η ροή ανασταλτικών σημάτων προς τους κινητικούς νευρώνες και η απελευθέρωση ακετυλοχολίνης στη νευρομυϊκή σύναψη είναι συνεχής και αδιάκοπη, με αποτέλεσμα να προκαλείται μη αντιστρεπτή συστολή των μυών και σπαστική παράλυση (🔗 Τμήμα 27.8 και Εικόνα 27.19).

Ενδοτοξίνες

- Τα Gram-αρνητικά βακτήρια παράγουν λιποπολυσακχαρίτες ως μέρος της εξωτερικής επιφάνειας του κυτταρικού τους τοιχώματος που σε κάποιες περιπτώσεις δρουν ως τοξίνες και λέγονται ενδοτοξίνες. Οι ενδοτοξίνες είναι πυρετογόνες γιατί διεγείρουν την απελευθέρωση από τα κύτταρα του ξενιστή κάποιων πρωτεϊνών (ενδογενή πυρετογόνα) που επηρεάζουν το θερμορυθμιστικό κέντρο του εγκεφάλου προκαλώντας πυρετό. Σε κάποιες περιπτώσεις προκαλούν διάρροια, πτώση του αριθμού των αιμοπεταλίων, των λεμφοκυττάρων και των λευκοκυττάρων καθώς και γενική φλεγμονή. Σε μεγάλες δόσεις μπορεί να προκαλέσουν θάνατο λόγω νέκρωσης ιστών και αιμορραγικού σοκ. Σε κάθε περίπτωση είναι λιγότερο τοξικές από τις εξωτοξίνες

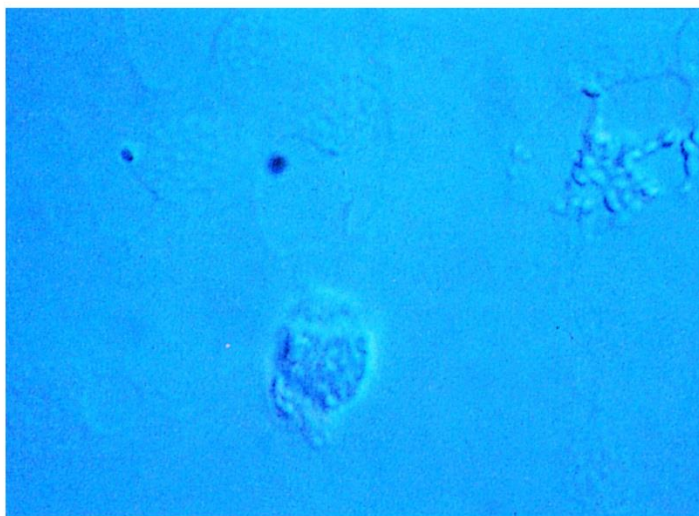
Εργαστηριακή δοκιμή *Limulus* για ενδοτοξίνη

- Επειδή οι ενδοτοξίνες είναι πυρετογόνα, φαρμακευτικές ουσίες όπως αντιβιοτικά και ενδοφλέβια διαλύματα πρέπει να μην τις περιέχουν. Για αυτό το λόγο αναπτύχθηκε μια εργαστηριακή δοκιμή ανίχνευσης ενδοτοξινών που χρησιμοποιεί αμοιβαδοκύτταρα του θαλάσσιου αρθρόποδου *Limulus polyphemus*. Οι ενδοτοξίνες προκαλούν λύση των κυττάρων αυτών σε απειροελάχιστες ποσότητες οπότε η δοκιμή αυτή χαρακτηρίζεται από εξαιρετική ευαισθησία. Η λύση των κυττάρων μπορεί να μετρηθεί ποσοτικά με την χρήση ενός φασματοφωτομέτρου. Προσοχή πρέπει να δοθεί ώστε να μην υπάρξει μόλυνση των διαλυμάτων και των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται από Gram-αρνητικά βακτήρια αφού ακόμα και 10 pg/ml ενδοτοξίνης μπορούν να ανιχνευθούν με την μέθοδο αυτή.



A. O. Tzianabos and R. D. Millham

(α)



A. O. Tzianabos and R. D. Millham

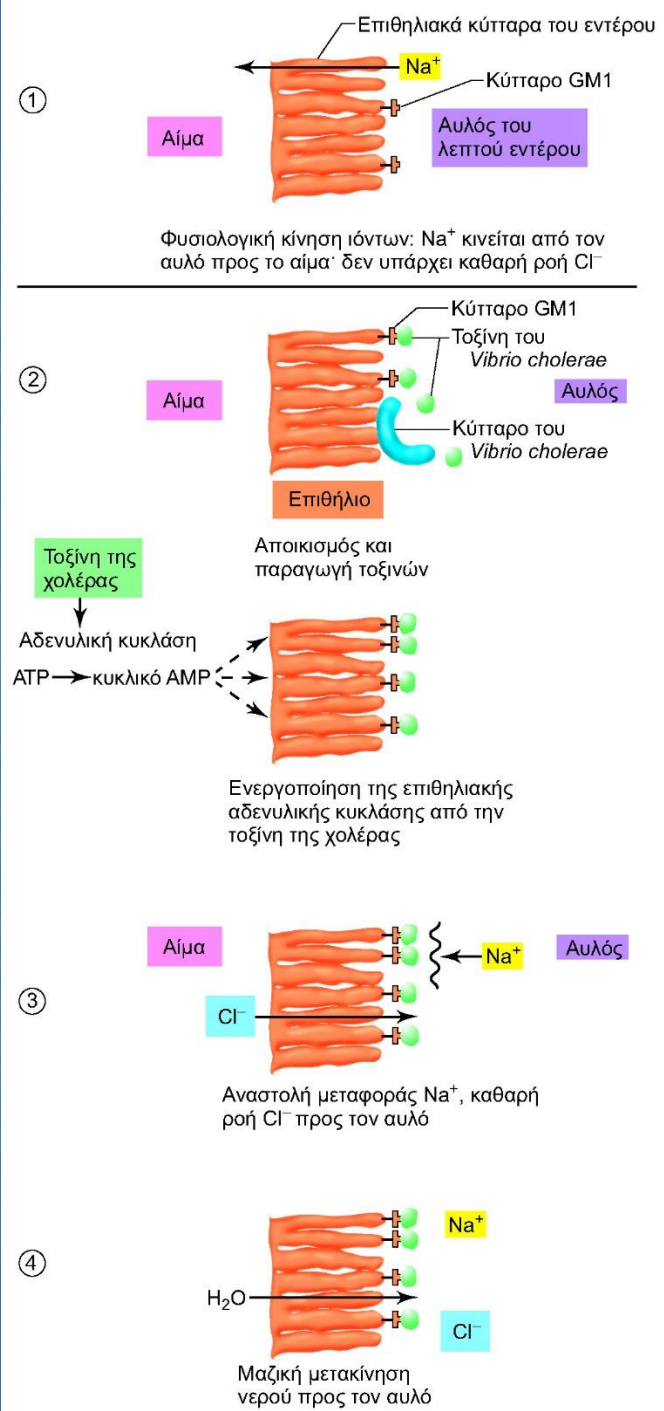
(β)

Εικόνα 21.22 Μικροφωτογραφίες αμοιβαδοκυττάρων *Limulus*. (α) Φυσιολογικά αμοιβαδοκύτταρα. (β) Αμοιβαδοκύτταρα που έχουν εκτεθεί σε βακτηριακό λιποπολυσακχαρίτη. Η παρουσία λιποπολυσακχαρίτη προκαλεί αποκοκκίωση των κυττάρων, ιδιότητα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση λιποπολυσακχαριτών σε κάποιο υπό έλεγχο διάλυμα.

Εντεροτοξίνες

- Οι εντεροτοξίνες επιδρούν στο λεπτό έντερο προκαλώντας μαζική έκκριση νερού που οδηγεί σε διάρροια. Παράγονται από διάφορα βακτήρια όπως αυτά που προκαλούν τροφικές δηλητηριάσεις (*Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*) και άλλα εντεροπαθογόνα (*Salmonella enteritidis*, *Vibrio cholera*)
- Η τοξίνη της χολέρας που παράγεται από το *Vibrio cholera* είναι η καλύτερα μελετημένη εντεροτοξίνη. Ανήκει στις A-B τοξίνες και ενεργοποιεί το ένζυμο αδενυλική κυκλάση με αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή cAMP. Στα θηλαστικά το μόριο αυτό εμπλέκεται στην δράση ορμονών, σε ανοσοαποκρίσεις (αλλεργικές αντιδράσεις) και φλεγμονές. Στην περίπτωση της χολέρας αυξημένα επίπεδα cAMP οδηγούν σε μεγάλη έκκριση ιόντων χλωρίου και διττανθρακικών από τα κύτταρα του λεπτού εντέρου. Η αλλαγή της συγκέντρωσης των ιόντων οδηγεί σε ακατάσχετη διάρροια και σε κάποιες περιπτώσεις στο θάνατο λόγω αφυδάτωσης

Εικόνα 21.21 Δράση της εντεροτοξίνης της χολέρας. (1) Φυσιολογική διαδικασία κίνησης των ιόντων στο έντερο και αποικισμός του επιθηλίου από το *Vibrio cholerae*, ακολουθούμενος από δέσμευση της εντεροτοξίνης με τους γαγγλιοζίτες GM1 των κυττάρων του ξενιστή. (2) Η δράση της τοξίνης A-B έγκειται στην ενσωμάτωση στο κυτταρόπλασμα των ξενιστικών κυττάρων της υπομονάδας A, η οποία ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση. Το γεγονός αυτό οδηγεί (3) στη διακοπή της φυσιολογικής ροής Na^+ προς τα έσω και (4) στην απώλεια νερού προς τον αυλό και την εμφάνιση διάρροιας. Η αντιμετώπιση της χολέρας γίνεται με αναπλήρωση ιόντων και ενυδάτωση. Η χρήση αντιβιοτικών μπορεί να περιορίσει την ανάπτυξη του *V. cholerae* και να μειώσει τη διάρκεια της νόσου, αλλά δεν επηρεάζει καθόλου την τοξίνη που έχει ήδη παραχθεί.



Παράγοντες που επηρεάζουν την ανθεκτικότητα ενός ξενιστή

- Η ικανότητα ενός παθογόνου να προκαλεί ασθένεια ποικίλει ανάλογα με το ζωικό είδος που μολύνει και τον τρόπο επιμόλυνσης (πχ ο άνθρακας σκοτώνει αγελάδες, πρόβατα αλλά όχι τα πτηνά. Είναι θανατηφόρο παθογόνο στον άνθρωπο μόνο όταν μολύνει το αναπνευστικό του σύστημα μέσω αναπνοής)
- Άλλοι παράγοντες που καθορίζουν την ανθεκτικότητα σε ένα παθογόνο είναι: η ηλικία (υπερευαισθησία των ηλικιωμένων σε λοιμώξεις του αναπνευστικού), το στρες (η έκκριση κορτιζόνης μειώνει την αντίσταση σε λοιμώξεις) και η διαίτα (πχ φτωχή σε πρωτεΐνες διατροφή προκαλεί ευκαιριακές λοιμώξεις και μειωμένη ανθεκτικότητα στο *Vibrio cholera*).
- Γενετικές διαφορές από άτομο σε άτομο (πχ CCR5-Δ32 και μόλυνση με HIV, δρεπανοκυτταρική αναιμία και ελονοσία)

Γενικοί αμυντικοί μηχανισμοί του ξενιστή

Η λυσοζύμη στα δάκρυα και σε άλλες εκκρίσεις διασπά το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων

Η φυσιολογική χλωρίδα ανταγωνίζεται τα παθογόνα

Το δέρμα είναι ένας φυσικός φραγμός, παράγει λιπαρά οξέα με αντιμικροβιακή δράση και η φυσιολογική χλωρίδα του εμποδίζει τον αποικισμό παθογόνων

Η ταχεία μεταβολή του pH αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό μικροβίων

Η περιοδική έκπλυση της ουροποιητικής οδού με τα ούρα, την προφυλάσσει από τον αποικισμό

Απομάκρυνση σωματιδίων και μικροοργανισμών με την ταχεία διέλευση αέρα πάνω από τα τριχίδια και τους κροσσούς του ρινοφάρυγγα

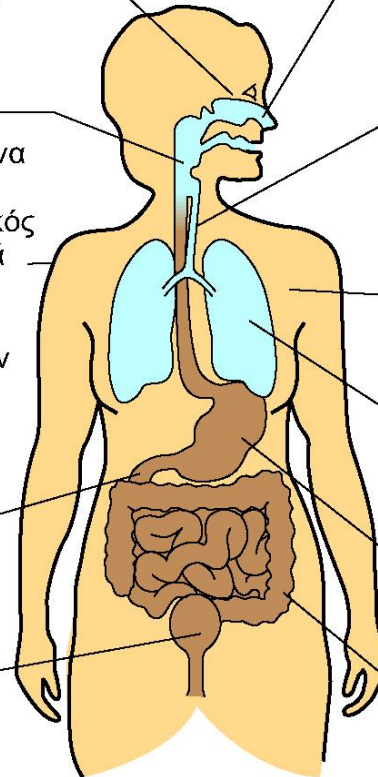
Η βλέννη και το κροσσωτό επιθήλιο στην τραχεία παγιδεύουν και ωθούν μικροοργανισμούς έξω από το σώμα

Διάφορες πρωτεΐνες του αίματος αναστέλλουν τη μικροβιακή ανάπτυξη

Η βλέννη και τα φαγοκύτταρα στους πνεύμονες αποτρέπουν τον αποικισμό

Η οξύτητα του περιβάλλοντος στο στομάχι (pH 2) αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των μικροβίων

Η φυσιολογική χλωρίδα ανταγωνίζεται τα παθογόνα



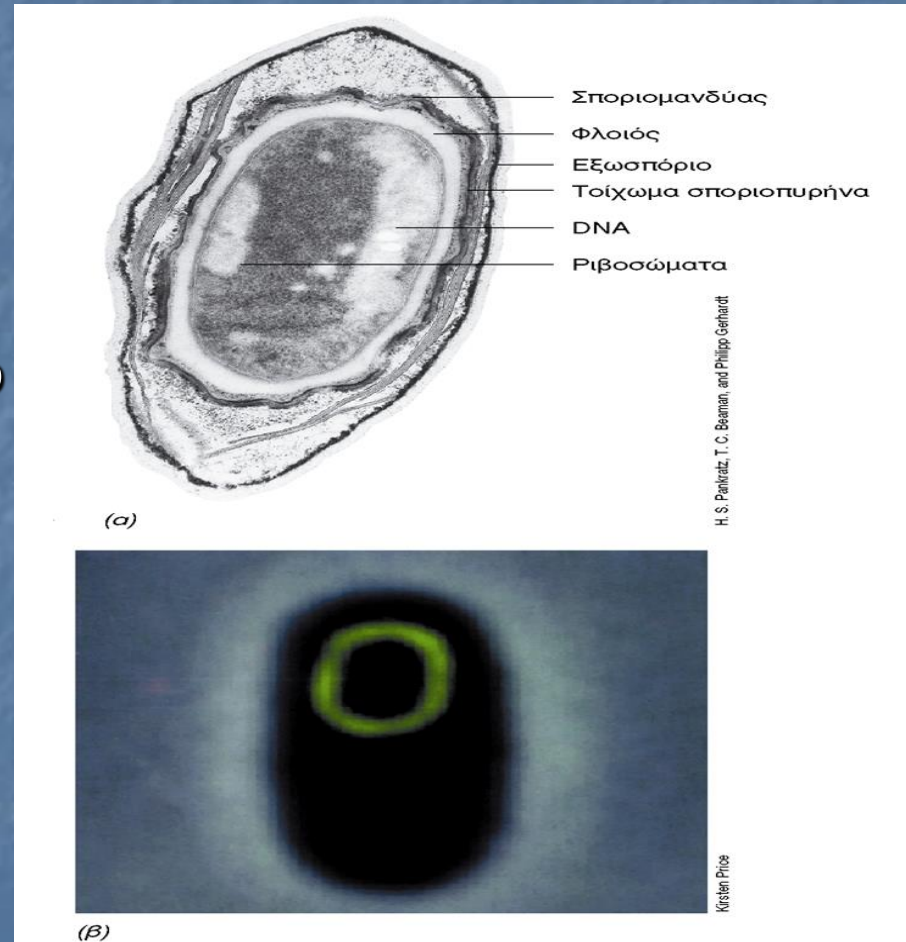
Εικόνα 21.23 Φυσικοί, χημικοί και ανατομικοί φραγμοί προστασίας έναντι των λοιμώξεων.

«Κλασσική» διαγνωστική βακτηριολογία

- Σωστή δειγματοληψία (ασηπτικές συνθήκες) και χειρισμός του δείγματος (κόπρανα, αίμα, ούρα, πτύελα κτλ).
- Τα 5 βασικά βήματα της κλασσικής προσέγγισης (ενοφθαλισμός, επώαση, διαχωρισμός, επιθεώρηση, ταυτοποίηση)
- Ενοφθαλισμός σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα (γενικά, επιλεκτικά, διαφοροδιαγνωστικά)
- Επώαση στις σωστές συνθήκες (π.χ θερμοκρασία, αναερόβιες συνθήκες)
- Διαχωρισμός αποικιών με ξεχωριστά μορφολογικά χαρακτηριστικά
- Επιθεώρηση από εξειδικευμένο προσωπικό
- Ταυτοποίηση (τουλάχιστον σε επίπεδο είδους αν όχι στελέχους)

Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά στην διάγνωση

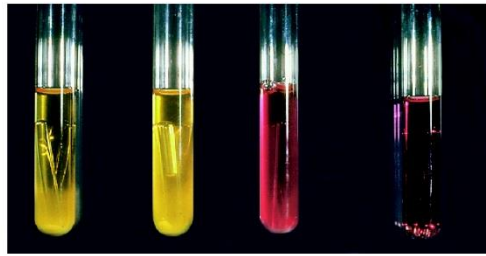
- Μορφολογία αποικιών (σχήμα, υφή, χαρακτηριστικές χρωστικές)
- Μικροσκοπική παρατήρηση μετά από χρώση (χρώση κατά Gram, οξεοάντοχη χρώση, χρώση ενδοσπορίων)
- Πολλές φορές στην κλασσική διαγνωστική επιβεβαίωση απαιτείται και με βιοχημικές μεθόδους



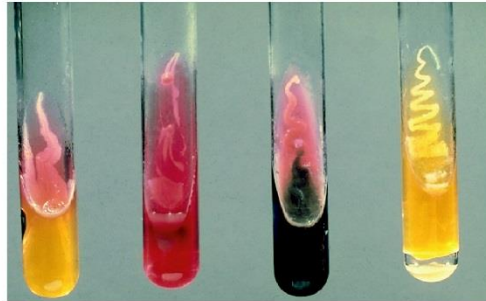
Εικόνα 4.60 Το βακτηριακό ενδοσπόριο. (α) Ηλεκτρονικό μικρογράφημα διέλευσης ενός ώριμου ενδοσπορίου από *Bacillus megaterium*. (β) Μικροφωτογραφία φθορισμού ενός κυττάρου *Bacillus subtilis* που υφίσταται εκβλάστηση. Το πράσινο χρώμα οφείλεται στην ειδική χρώση μιας πρωτεΐνης εκβλάστησης στον σποριομανδύα.

Βιοχημικές μέθοδοι ταυτοποίησης παθογόνων

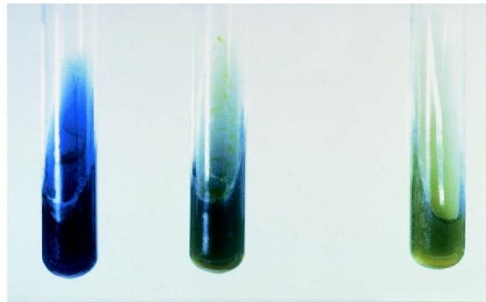
- Τα βακτήρια που απομονώνονται από ένα κλινικό δείγμα πρέπει να ταυτοποιηθούν από τις βιοχημικές τους ιδιότητες που τα διαχωρίζουν από τα υπόλοιπα βακτηριακά είδη ή γένη. Η δημιουργία ενός «μεταβολικού προφίλ» είναι μια επίπονη, χρονοβόρα διαδικασία που απαιτεί μια σειρά ενζυμικών μετρήσεων και χρήσης πολλών διαφορετικών θρεπτικών υποστρωμάτων.
- Η σμίκρυνση των δοκιμών αυτών οδήγησε σε σημαντική μείωση του χρόνου ταυτοποίησης και εξοικονόμησης αντιδραστηρίων. Υπάρχουν στο εμπόριο διαφορετικά «kit» τα οποία χρησιμοποιούνται κατά κόρον για την βιοχημική ταυτοποίηση βακτηρίων
- Τα περισσότερα από αυτά περιέχουν τουλάχιστον 20-30 διαφορετικά θρεπτικά μέσα και ενζυμικά υποστρώματα επιλεγμένα έτσι ώστε να ταυτοποιούν συγκεκριμένες ομάδες βακτηρίων ή βακτηριακά είδη.



(α)



(β)



(γ)



(δ)



(ε)

Εικόνα 24.7 Διαγνωστικές μέθοδοι βασισμένες στην ανάπτυξη μικροοργανισμών και στις χρωματικές αλλαγές σε διάφορα θρεπτικά μέσα, που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση οργανισμών από κλινικά δείγματα. (α) Χρήση διαφορετικού θρεπτικού μέσου για τον προσδιορισμό της ζύμωσης σακκάρων. Η παραγωγή οξέων υποδηλώνεται από τη χρωματική μεταβολή pH-μετρικών δεικτών που έχουν προστεθεί στο υγρό θρεπτικό υλικό. Η παραγωγή αερίου υποδηλώνεται με την εμφάνιση φυσαλλίδας στο ανεστραμμένο φιαλίδιο που βρίσκεται μέσα στον δοκιμαστικό σωλήνα. Από αριστερά προς τα δεξιά: Δείγμα με οξύ, με οξύ και αέριο, αρνητικό δείγμα, μη ενοφθαλμισμένο. (β) Συμβατικός διαγνωστικός έλεγχος για την παρουσία εντεροβακτηρίων σε θρεπτικό μέσο που ονομάζεται άγαρ τριών σακκάρων-σιδήρου (TSI). Ο ενοφθαλμισμός γίνεται τόσο στην επιφάνεια της κορυφής του θρεπτικού μέσου όσο και με βύθιση του υλικού ενοφθαλμισμού στον πυθμένα του στερεού άγαρ. Το θρεπτικό μέσο περιέχει μικρή μόνο ποσότητα γλυκόζης, αλλά μεγάλες ποσότητες λακτόζης και σακχαρόζης. Οι οργανισμοί που μπορούν να ζυμώσουν μόνο τη γλυκόζη σχηματίζουν οξέα αποκλειστικά στον πυθμένα, ενώ εκείνοι που ζυμώνουν λακτόζη και σακχαρόζη παράγουν οξέα και στην κορυφή του θρεπτικού μέσου. Ο σχηματισμός αερίου υποδηλώνεται με τη ρήξη του άγαρ στον πυθμένα. Ο σχηματισμός υδροθείου (είτε από αποικοδόμηση πρωτεϊνών είτε από την αναγωγή θειοθειικών στο θρεπτικό μέσο) υποδηλώνεται από την εμφάνιση μαύρης χροιάς, λόγω της αντίδρασης του υδροθείου με τα ιόντα δισθενούς σιδήρου του θρεπτικού μέσου. Από αριστερά προς τα δεξιά: Ζύμωση μόνο γλυκόζης, αρνητική αντίδραση, σχηματισμός υδροθείου, ζύμωση γλυκόζης και άλλου σακκάρου. (γ) Μέτρηση της κατανάλωσης κητρικού οξέος από *Salmonella* σε άγαρ κητρικού οξέος Simmons. Η αλλαγή του pH μεταβάλλει το χρώμα κατάλληλου δείκτη. Από αριστερά προς τα δεξιά: θετικό, αρνητικό, μη ενοφθαλμισμένο. (δ) Κιτς (kits) με διάφορα θρεπτικά μέσα για την ταυτοποίηση οργανισμών σε κλινικά δείγματα. Η αρχή της μέθοδου είναι ίδια με την περίπτωση (α), αλλά υλικά και σκεύη βρίσκονται σε μικρότερη κλίμακα μεγέθους, ώστε να είναι δυνατή η ταυτόχρονη διεξαγωγή πολλών διαφορετικών δοκιμασιών. Στην εικόνα φαίνονται τέσσερις σειρές, με διαφορετικές καλλιέργειες η κάθε μία. (ε) Άλλο κιτ για καλλιεργητικές δοκιμασίες. Στη συγκεκριμένη προσδιορίζεται η χρήση σακκάρων σε μη ζυμωτικούς οργανισμούς.

Βιοχημικές μέθοδοι ταυτοποίησης παθογόνων (συνέχεια)

- Τα περισσότερα από αυτά τα «κιτ» δίνουν αποτελέσματα μετά από 18-24 ώρες επώασης. Η ακρίβεια ταυτοποίησης των «κιτ» είναι της τάξεως του 90-99% η οποία είναι συγκρίσιμη με αυτή των κλασικών μεθόδων. Τα περισσότερα από αυτά είναι σχεδιασμένα για την ταυτοποίηση εντεροβακτηρίων αλλά υπάρχουν διαθέσιμα και άλλα που ταυτοποιούν *Campylobacter*, *Listeria*, αναερόβια βακτήρια, Gram-θετικά βακτήρια κτλ.
- Υπάρχουν κάποια αυτοματοποιημένα συστήματα (πχ το Vitek από την εταιρεία bioMérieux) τα οποία τα οποία ελέγχουν συνεχώς τις αλλαγές των βιοχημικών αντιδράσεων, δημιουργούν αυτόματα το βιοχημικό προφίλ και το συγκρίνουν με την βάση δεδομένων που υπάρχει ενσωματωμένη στο σύστημα και βγάζουν το αποτέλεσμα της ταυτοποίησης. Ένα άλλο αυτοματοποιημένο σύστημα (το MIS από την εταιρεία Microbial-ID) χρησιμοποιεί αέρια χρωματογραφία για να δημιουργήσει το προφίλ των λιπαρών οξέων των βακτηρίων και το συγκρίνει με την βάση δεδομένων προκειμένου να γίνει ταυτοποίηση

Μειονεκτήματα κλασσικής διαγνωστικής βακτηριολογίας

- Χρονοβόρα διαδικασία (τουλάχιστον 24-48 ώρες, σε κάποιες περιπτώσεις και εβδομάδα π.χ *Mycobacterium tuberculosis*).
- Αρκετά μεγάλη πιθανότητα λάθους ειδικά αν στηρίζεται μόνο σε μορφολογικά χαρακτηριστικά και όχι ΚΑΙ βιοχημικά.
- Απαιτείται η ανάπτυξη του παθογόνου κάτι που δεν είναι πάντα εφικτό καθώς πρέπει να χρησιμοποιηθούν εξαρχής τα κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα
- Υπάρχει η πιθανότητα ακόμα και να αναπτύσσεται φυσιολογικά το παθογόνο στα θρεπτικά υποστρώματα να μην συμβεί (βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα)

Βιώσιμα αλλά μη-καλλιεργήσιμα (VNC) βακτήρια

- Όπως αναφέρθηκε αρκετά βακτηριακά είδη υπάρχουν σε μια κατάσταση όπου ενώ είναι ζωντανά δεν μπορούν να καλλιεργηθούν με τις κλασσικές μικροβιολογικές μεθόδους. Η είσοδος σε αυτή την κατάσταση είναι μια στρατηγική επιβίωσης που ακολουθείται από βακτήρια που δεν σποριώνονται. Τα βακτήρια σε αυτή την κατάσταση έχουν διαφορετική μορφολογία
- Η ύπαρξη των βακτηρίων αυτών και η διαφοροποίησή τους από νεκρά βακτήρια μπορεί να δείχτεί με την βοήθεια κυτταρολογικών μεθόδων πχ χρήση χρωστικών που φθορίζουν. Άλλος τρόπος διάκρισης είναι η χρήση του ιώδους του ιοδονιτροτετραζολίου το οποίο ανάγεται από τα VNC βακτήρια και σχηματίζει αδιάλυτα συσσωματώματα που διακρίνονται στο μικροσκόπιο.
- Τα VNC βακτήρια επανέρχονται στην κατάσταση όπου μπορούν να καλλιεργηθούν μετά από αλλαγές της θερμοκρασίας ή διαθεσιμότητα θρεπτικών στο περιβάλλον.

Μέθοδοι ανίχνευσης παθογόνων βασισμένες στα νουκλεϊκά οξέα

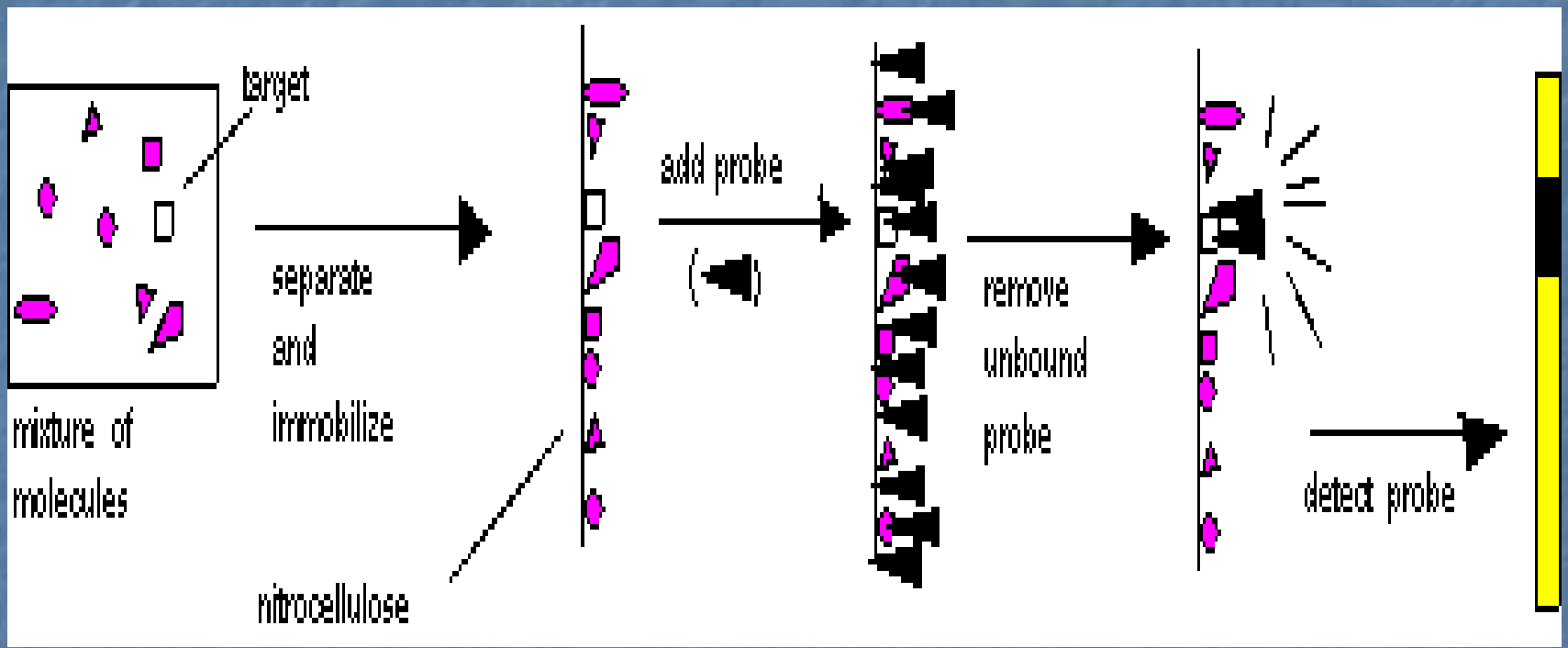
- Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν να ανιχνευτούν και με μεθόδους βασισμένες στα νουκλεϊκά οξέα και πιο συγκεκριμένα του DNA. Η ανίχνευση γονιδίων των παθογόνων γίνεται με τον υβριδισμό DNA-DNA (Southern blotting). Επισημασμένα ολιγονουκλεοτίδια (ιχνηθέτες) υβριδίζονται με το DNA του παθογόνου και ο υβριδισμός ανιχνεύεται με αυτοραδιογραφία ή χρωματομετρικά.
- Το γεγονός ότι τα βακτηριακά γονίδια που κωδικοποιούν 16S rRNA βρίσκονται σε πολλά αντίτυπα και είναι χαρακτηριστικά του κάθε είδους επιτρέπει την μεγαλύτερη ευαισθησία και εξειδίκευση της μεθόδου.

Στύπωμα κατά Southern

- Αναπτύχθηκε από τον E.M. Southern το 1975.
- Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση συγκεκριμένων τμημάτων DNA σε ένα δείγμα
- Το DNA μπορεί να είναι ένα ή και περισσότερα γονίδια ακόμα και ολόκληρο γονιδιόμα (π.χ ιού)

Βήματα Μεθόδου

1. Διαχωρισμός μείγματος μορίων DNA
2. Τα μόρια ακινητοποιούνται σε μια μεμβράνη
3. Προστίθεται ο ιχνηθέτης
4. Απομακρύνεται η περίσσια του ιχνηθέτη
5. Ανίχνευση της θέσης υβριδισμού του ιχνηθέτη

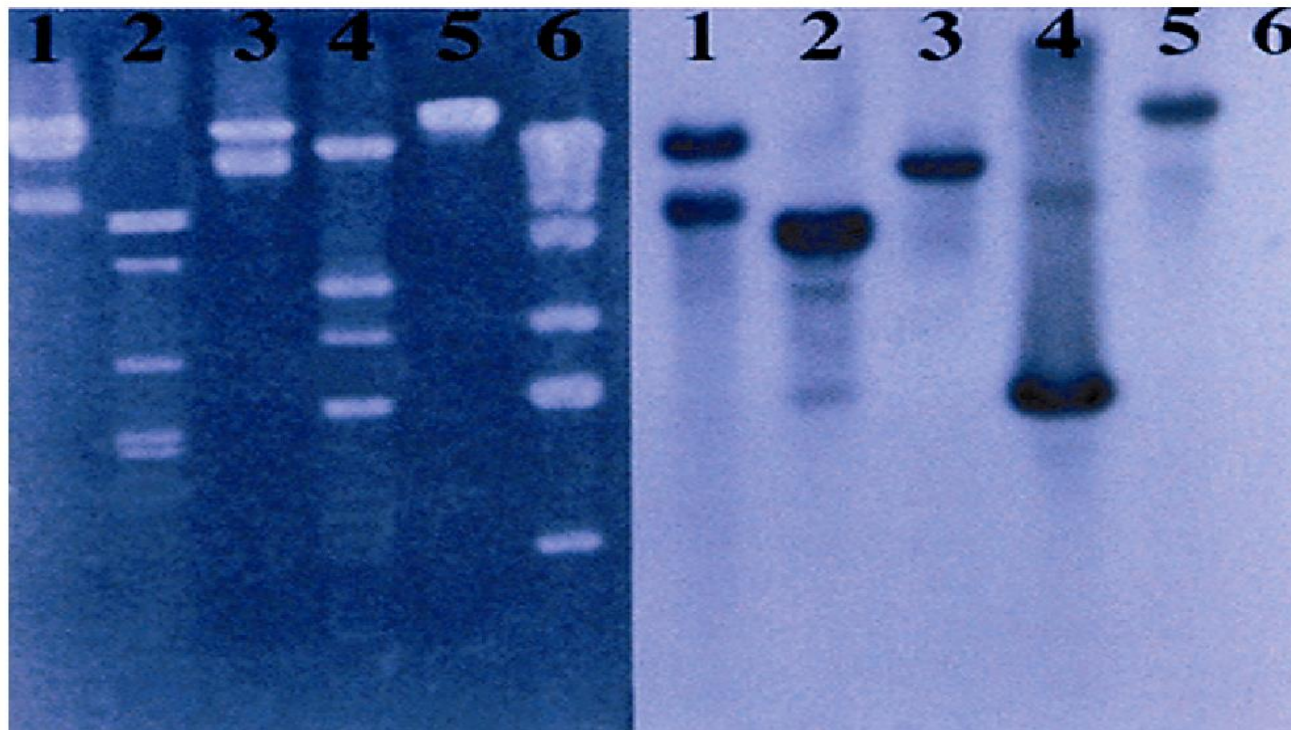


I. Απομόνωση, θρυμματισμός και διαχωρισμός του DNA

- Απομόνωση του DNA με χημική λύση των βακτηριακών κυττάρων (σε αλκαλικό pH)
- Κόψιμο του DNA με την χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών σε διαφορετικά μεγέθη
- Διαχωρισμός των τμημάτων του DNA σε πήκτωμα (συνήθως αγαρόζης) με ηλεκτροφόρηση
- Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το μέγεθος των τμημάτων του DNA, την συγκέντρωση της αγαρόζης, την τάση του ηλεκτρικού πεδίου

Στύπωμα (blotting)

- Μεταφορά του DNA από το πήκτωμα σε στερεό υπόβαθρο.
- Το υπόβαθρο είναι μεμβάνη νιτροκυτταρίνης ή θετικά φορτισμένη Nylon μεμβράνη
- Κατά την διάρκεια της μεταφοράς το DNA αποδιατάσσεται και παραμένει σε αυτή την κατάσταση.
- Προστίθεται ο ιχνηθέτης και πραγματοποιείται ο υβριδισμός, απομακρύνεται η περίσσεια του και πραγματοποιείται η ανίχνευση του (αυτοραδιογραφία ή ανίχνευση μέσω ενζυμικής αντίδρασης)

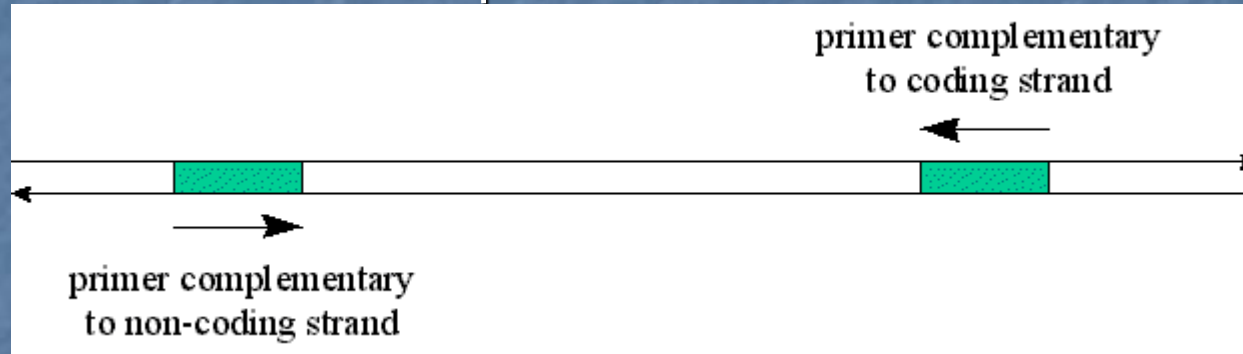


Laurie Achenbach

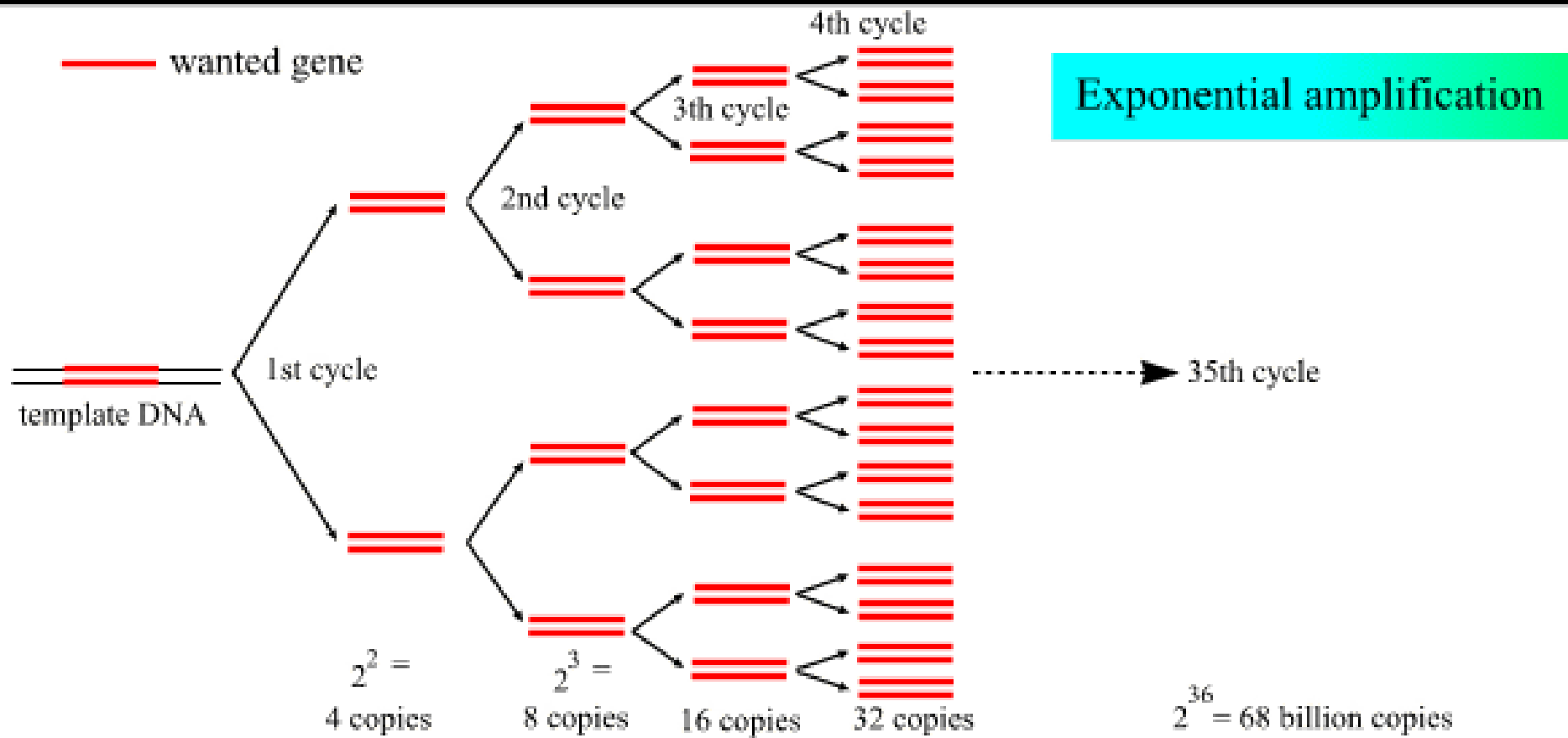
Εικόνα 10.37 Στύπωμα κατά Southern. (Αριστερά) Ηλεκτροφόρηση μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Καθαρὰ μόρια DNA προερχόμενα από διάφορα πλασμίδια υπέστησαν επεξεργασία με περιοριστικά ένζυμα και έπειτα υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση. (Δεξιά) Στύπωμα κατά Southern του πηκτώματος DNA που φαίνεται στα αριστερά. Η υβριδοποίηση του στυπώματος έγινε με ραδιενεργά σημασμένο ανιχνευτή. Η ανίχνευση της θέσης των ζωνών πραγματοποιείται με αυτοραδιογραφία ακτίνων X. Ας σημειωθεί πως μόνο μερικά από τα μόρια DNA έχουν αλληλουχίες συμπληρωματικές με αυτές του σημασμένου ανιχνευτή. Η στήλη 6 περιείχε DNA που χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης μεγέθους, ενώ καμία από τις ζώνες στον ανιχνευτή δεν υβριδοποιήθηκε.

PCR - Polymerase Chain Reaction

- Η PCR είναι μία *in vitro* τεχνική για την ενίσχυση μιας περιοχής του DNA μεταξύ δύο περιοχών γνωστής αλληλουχίας με την χρήση ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών.



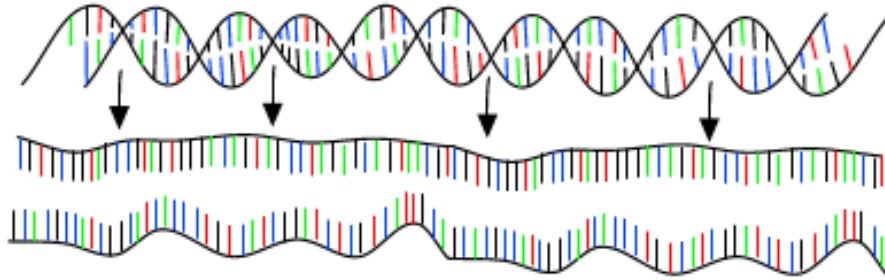
- Οι εκκινητές υβριδίζονται σε συμπληρωματικές περιοχές των αποδιαταγμένων κλώνων του DNA στόχου
 - Αυτό έχει αποτέλεσμα την σύνθεση πολλαπλών αντιγράφων του DNA μέσα από μια διαδικασία πολλών κύκλων επιμήκυνσης .



(Andy Vierstraete 1999)

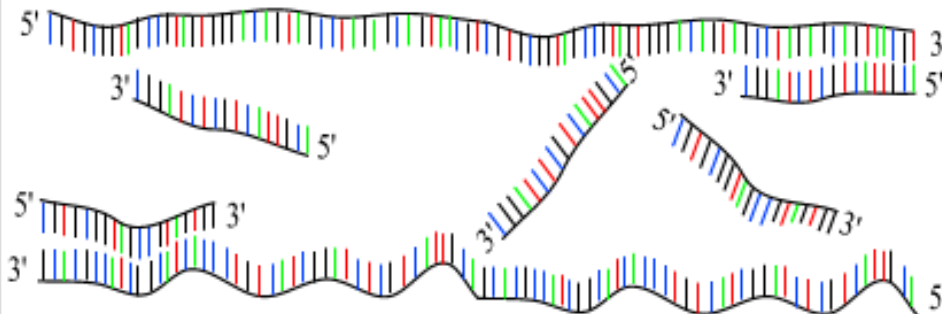
PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

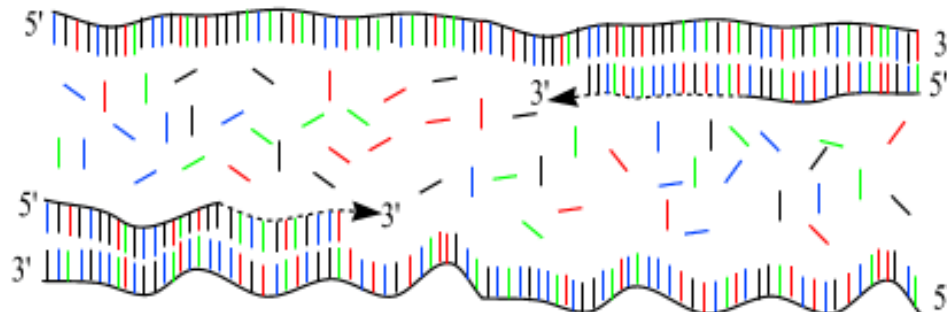
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

2 minutes 72 °C

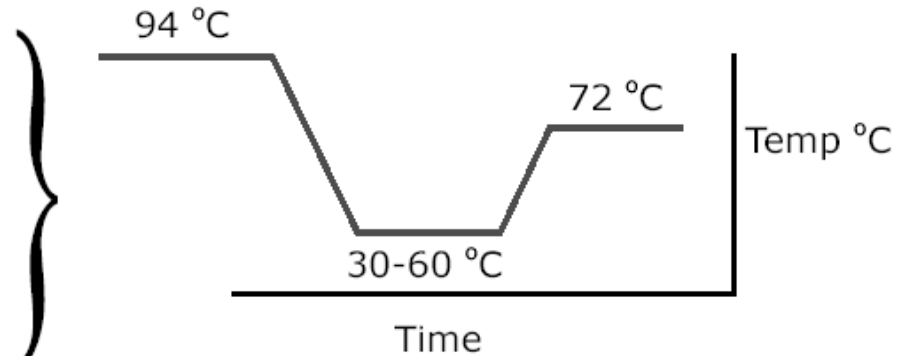
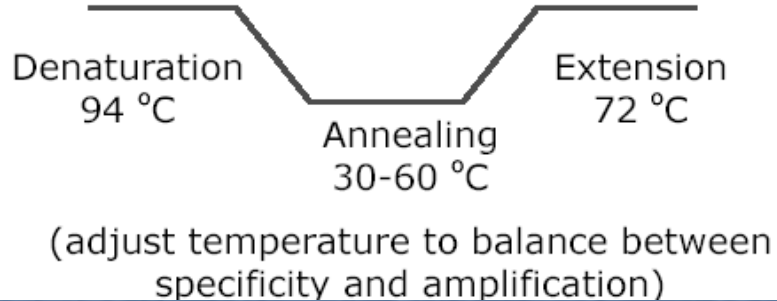
only dNTP's

PCR reaction contains

- Target DNA (example: environmental DNA)
- 2 primers (20-30 nts long)
- Thermostable DNA polymerase
- Nucleotides (dNTPs)
- Mg^{2+} (cofactor for DNA polymerase)

Mix is subjected to temperature cycling

Each cycle



Επιλογή εκκινητών

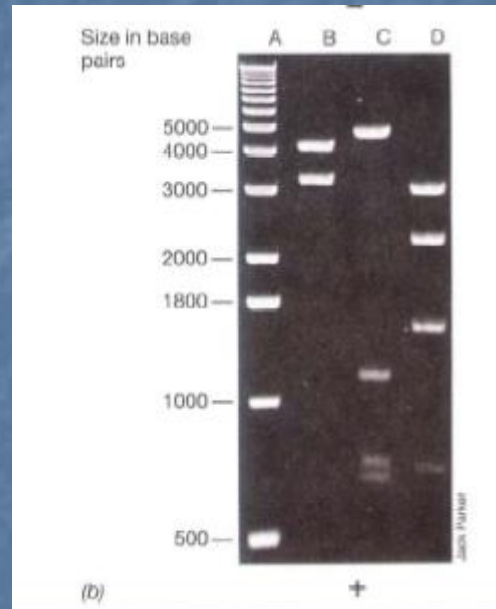
- Η σωστή επιλογή καθορίζει την επιτυχία ή όχι της ενίσχυσης. Συμπληρωματικότητα με τον DNA στόχο (μεγάλη εξειδίκευση ενίσχυσης)
- Για τον σχεδιασμό λαμβάνονται υπόψη και οι δύο κλώνοι του DNA στόχου (forward, reverse primers)
 - Ποσοστό G-C, T_m , θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών
 - Μη συμπληρωματικότητα μεταξύ των εκκινητών (αποφυγή primer dimers)

DNA Πολυμεράση

- Το ένζυμο που αντιγράφει το DNA χρησιμοποιώντας ως σημείο εκκίνησης τα ζεύγη των εκκινητών
- Πρέπει να είναι θερμοανθεκτική π.χ Taq, Pfu. (Υψηλή θερμοκρασία για την αποδιάταξη του DNA.)
- Πηγές θερμοανθεκτικοί μικροοργανισμοί π.χ *Thermus aquaticus*
- Σημαντική και η υψηλή πιστότητα κατά την αντιγραφή (λάθη κατά την αντιγραφή επηρεάζουν κάποιες εφαρμογές)

Οπτικοποίηση αποτελεσμάτων PCR

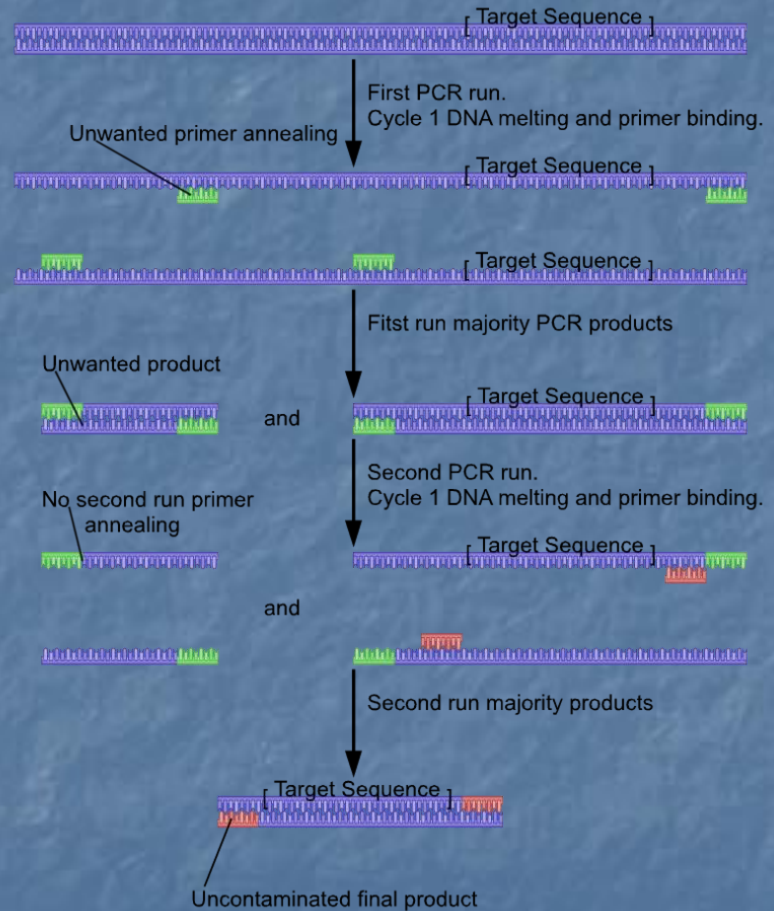
- Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης



Nested PCR

Μεγαλύτερη εξειδίκευση
(αποφυγή παραπροϊόντων).

Βασίζεται στην χρήση
δευτέρου εσωτερικού ζεύγους
εκκινητών

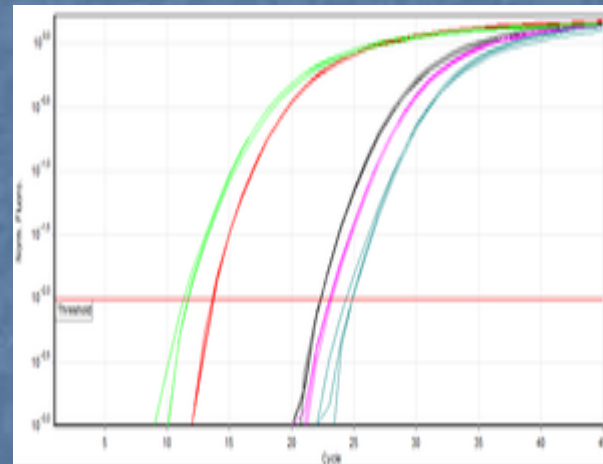


Multiplex PCR

- Ταυτόχρονη χρήση πολλαπλών ζευγών εκκινητών σε μια αντίδραση PCR.
- Ενίσχυση πολλαπλών στόχων (είτε γονίδια του ίδιου βακτηρίου, άρα πιο ακριβής ανίχνευση, είτε γονίδια διαφορετικών βακτηρίων άρα ταυτόχρονη διάγνωση περισσότερων του ενός παθογόνων)
- Σημαντικό είναι οι εκκινητές να σχεδιαστούν με τέτοιο τρόπο ώστε να υβριδίζονται στην ίδια θερμοκρασία και να είναι όσο τον δυνατόν πιο εξειδικευμένοι

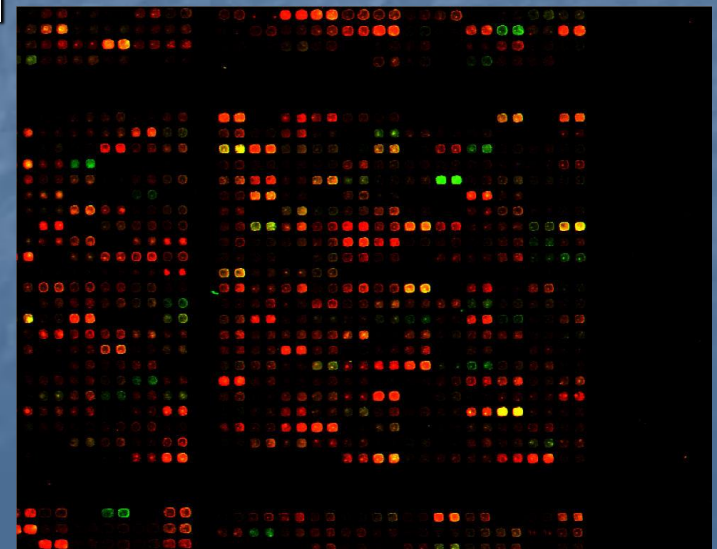
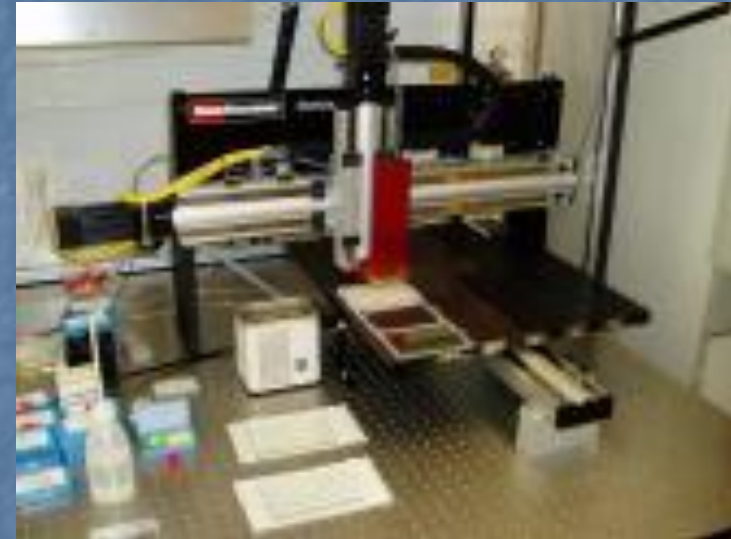
Real-Time PCR (qRT-PCR)

- Χρήση εκκινητών προσδεμένων με φθορίζουσες χρωστικές (SYBR Green).
- Ανίχνευση προϊόντων σε πραγματικό χρόνο (δεν χρειάζεται ηλεκτροφόρηση)
- Ποσοτικοποίηση προϊόντων (αριθμός αντιγράφων DNA στόχου)



Μικροσυστοιχίες DNA (DNA microarrays)

- Η βασική αρχή πάνω στην οποία στηρίζονται οι μικροσυστοιχίες DNA είναι ο υβριδισμός DNA- DNA. Η τεχνολογία αυτή δανείστηκε την φωτολιθογραφία από την κατασκευή μικροεπεξεργαστών ηλεκτρονικών υπολογιστών για την «εκτύπωση» DNA ολιγονουκλεοτιδίων σε γυαλί ή πλαστική μεμβράνη. Με αυτό τον τρόπο ολιγονουκλεοτίδια τα οποία αντιπροσωπεύουν ολόκληρο το γονιδίωμα ενός μικροοργανισμού μπορούν να τοποθετηθούν σε συστοιχίες πάνω σε ένα DNA chip. Η τεχνολογία αυτή χρησιμοποιείται τις περισσότερες φορές για μελέτες γονιδιακής έκφρασης (transcriptomics) σε επίπεδο ολόκληρου γονιδιώματος.
- Τα ολιγονουκλεοτίδια που αποτελούν την μικροσυστοιχία συνθέτονται είτε *in situ*, είτε με PCR και στην συνέχεια τοποθετούνται πάνω στο DNA chip. Επισημασμένο DNA του δείγματος που εξετάζεται υβριδίζεται με τα ολιγονουκλεοτίδια της μικροσυστοιχίας.



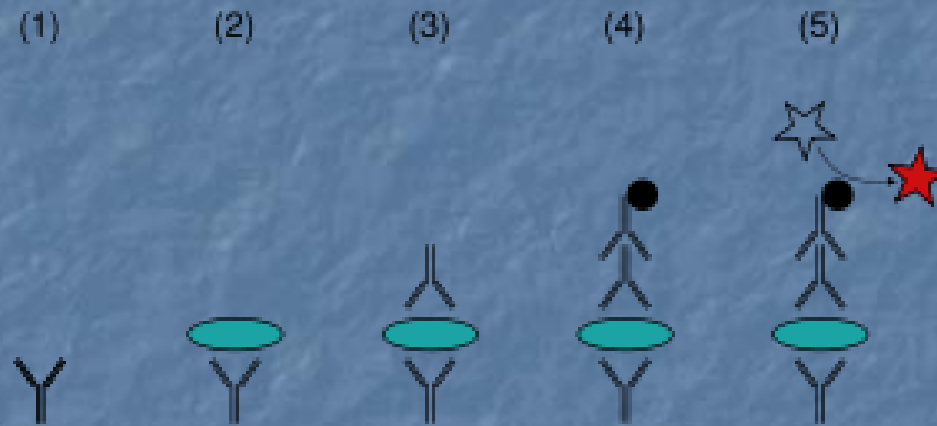
Μικροσυστοιχίες DNA (συνέχεια)

- Στο εμπόριο είναι διαθέσιμες μικροσυστοιχίες DNA για διάφορους μικροοργανισμούς (*Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) με πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες αυτές που διαθέτει η εταιρεία Affymetrix.
- DNA micro array methodology-Flash animation:
<http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/chip/chip.html>

Μέθοδοι ανίχνευσης παθογόνων που βασίζονται στα αντισώματα

- Η μέθοδος ενζυμοσύνδετης ανοσοαπορρόφησης (ELISA) είναι η πιο ευρέως διαδεδομένη μέθοδος ανίχνευσης παθογόνων με την χρήση αντισωμάτων. Υπάρχουν διαθέσιμα στο εμπόριο αρκετά κιτ που χρησιμοποιούν την *sandwich ELISA* για την ανίχνευση παθογόνων.
- Σε ένα πλαστικό πιάτο το οποίο είναι καλυμμένο με αντισώματα τοποθετείται το δείγμα αντιγόνου (βακτήριο ή τοξίνη) όπου και δεσμεύεται από το αντίσωμα. Στην συνέχεια προστίθεται ποσότητα του ίδιου αντισώματος και τέλος ένα σύμπλοκο αντισώματος- ενζύμου (αλκαλική φωσφατάση, περοξειδάση από ραπανάκι) το οποίο συνδέεται με το πρώτο αντίσωμα. Η περίσσεια αντισωμάτων ξεπλένεται και στην συνέχεια προστίθεται υπόστρωμα το οποίο μετατρέπεται από το ένζυμο του συμπλόκου σε προϊόν που ανιχνεύεται χρωματομετρικά.

Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου sandwich ELISA



Ανοσοκαθίζηση (Immunoprecipitation)

- Η μέθοδος αυτή άρχισε να χρησιμοποιείται πρόσφατα για την ανίχνευση παθογόνων και κερδίζει συνεχώς έδαφος.
- Η αρχή της μεθόδου είναι παρόμοια με αυτή της sandwich ELISA με την διαφορά ότι το αντίσωμα που αντιδρά με το αντιγόνο αντί να σχηματίζει σύμπλοκο με κάποιο ένζυμο, σχηματίζει σύμπλοκο με σωματίδια χρωματιστού latex.
- Το δείγμα τοποθετείται σε ένα πλαστικό stick μιας χρήσης και εάν περιέχει το αντιγόνο αντιδρά με το αντίσωμα με το latex με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ίζήματος το οποίο λόγω των χρωματιστών σωματιδίων φαίνεται με το μάτι. Σε ένα δεύτερο θάλαμο του stick υπάρχει αντίσωμα που αναγνωρίζει το αντίσωμα με τα σωματίδια latex και σχηματίζει και αυτό ίζημα. Η μέθοδος είναι εξαιρετικά γρήγορη (10-15 λεπτά) αλλά απαιτεί εμπλουτισμό του δείγματος.
- Ιστοσελίδα που το περιγράφει (<http://neogen.com>)