

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΩΝ ΕΠΙΔΗΜΙΩΝ ΑΠΟ ΙΟΓΕΝΗ ΑΙΤΙΑ



ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΣΙΑΦΑΚΑΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΕΚΠΑ, ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ

ΜΕΡΟΣ 1^ο

- ▶ Τι είναι οι Ιοί;
- ▶ Πως εμφανίστηκαν οι Ιοί;
- ▶ Πόσο παλιοί είναι οι Ιοί;
- ▶ Πως ανακαλύφθηκαν οι Ιοί; Ορόσημα στην Ιολογία και στις Ιογενείς Λοιμώξεις
- ▶ Πως εξελίχθηκαν και εξελίσσονται οι Ιοί;
- ▶ Η επίδραση των ιών στις ανθρώπινες κοινωνίες
- ▶ Γιατί συμβαίνουν οι Ιογενείς Ασθένειες, οι Επιδημίες και οι Πανδημίες;
 - Παραδείγματα: ο Ιός της Γρίπης, ο Εντεροϊός D68
- ▶ Ιοί που είναι ωφέλιμοι

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ

- ▶ *Εργαστηριακές Μέθοδοι στην Ιολογία: Παρελθόν, Παρόν και Μέλλον*
 - *Ο ρόλος του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας*
 - *Απομόνωση Ιών*
 - *Ανίχνευση Ιών: Έμμεση και Άμεση*
 - *Μοριακές Μέθοδοι: Σκοπός*
 - *Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR)*
 - *Πέρα από την PCR: Αλληλούχηση (Sequencing)*
 - *Εφαρμογές Μοριακών Μεθόδων στην Ιολογία*

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ

- ▶ Η Εξέλιξη των Μοριακών Μεθόδων
- ▶ Συνδρομική Διάγνωση
- ▶ Πέρα από τη Συνδρομική Ανίχνευση:
 - Το παράδειγμα των Εντεροϊών
 - Επίπεδα Ανάλυσης των Μοριακών Μεθόδων
 - Αναδυόμενοι/Επανεμφανιζόμενοι Ιοί
 - ✓ Παράδειγμα: Ιοί του Αναπνευστικού
- ▶ Το μέλλον των Μοριακών Μεθόδων

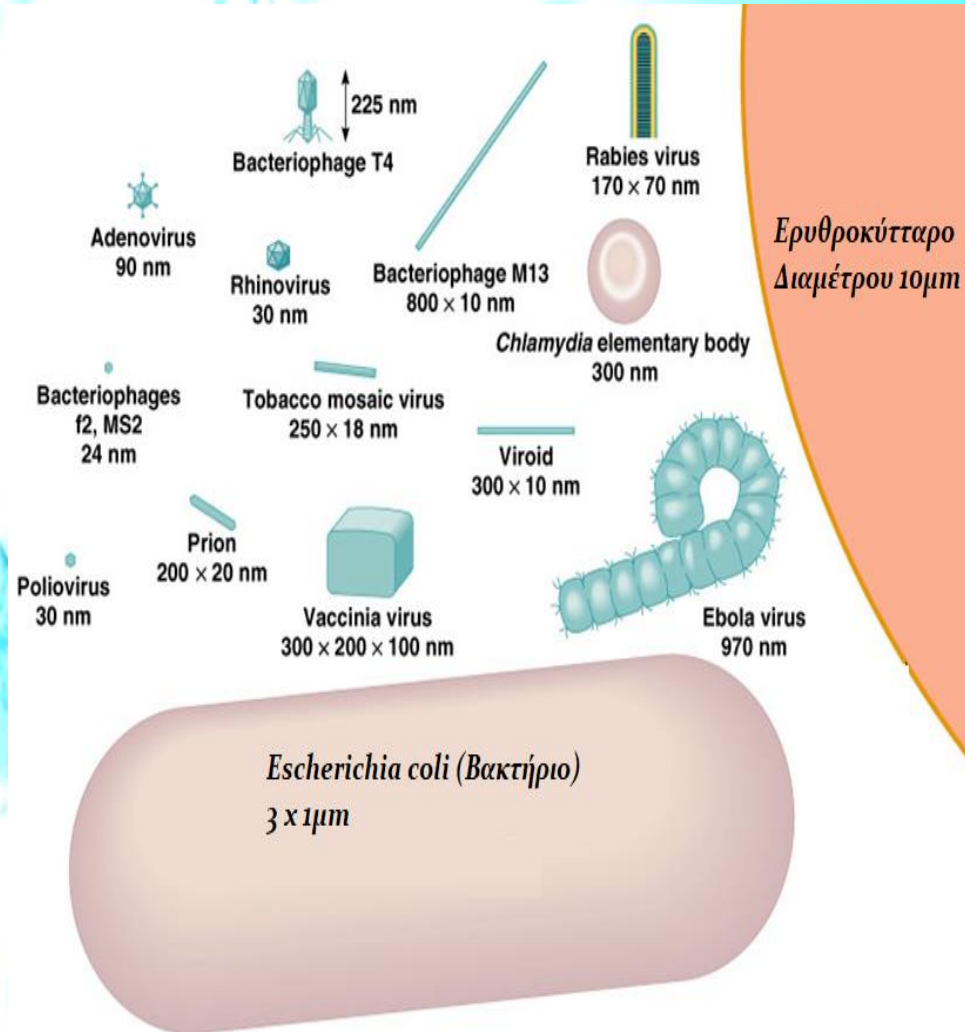
ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΙΟΙ;

Πολύ Μικρά «Παράσιτα» που
Επιβιώνουν Μόνο μέσα σε
Κύτταρα



**Διαφορές με υπόλοιπους
μικροοργανισμούς**

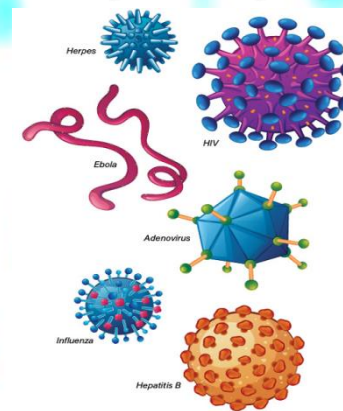
- Οι μικρότεροι σε μέγεθος λοιμογόννοι παράγοντες
- Δεν είναι Κύτταρα
- Δεν έχουν δικό τους Μεταβολισμό – Εξαρτώνται πλήρως από τους μεταβολικούς μηχανισμούς του κυττάρου που έχουν προσβάλει



**ΠΟΛΛΑ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΜΕΓΕΘΗ ΚΑΙ
ΣΧΗΜΑΤΑ**

ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΙΟΙ;

Τελικά, είναι ζωντανοί οργανισμοί, ή όχι;



Ιδιότητες Ζωντανών Οργανισμών

Αναπνέουν

Έχουν Μεταβολισμό

Μεγαλώνουν

Αναπαράγονται

Κληρονομικότητα

Ιδιότητες των Ιών

Δεν αναπνέουν

Δεν έχουν μεταβολισμό

Δε μεγαλώνουν

Αναπαράγονται!

Κληρονομικότητα!

ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΙΟΙ;

Τελικά, είναι ζωντανοί οργανισμοί, ή όχι;

- Ορισμός ζωντανού οργανισμού: «The unit element of a continuous lineage with an individual evolutionary history» (Luria et al. 1978)



Οι ιοί πολλαπλασιάζονται, η πορεία της εξέλιξής τους μπορεί να ανευρεθεί και δεν περιορίζονται σε ένα μόνο οργανισμό-ξενιστή, ή ένα είδος, γένος ή φύλο ξενιστών

ΔΗΛΑΔΗ ΕΙΝΑΙ ΖΩΝΤΑΝΟΙ?

ΟΧΙ!

Ακροβατούν στο Σύνορο μεταξύ Ζώντος και «Μη-Ζώντος» Κόσμου

ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΙΟΙ; Όλοι Έχουμε Ιούς!

Βακτήρια



Ιός Βακτηρίων – Βακτηριοφάγος

Ζώα



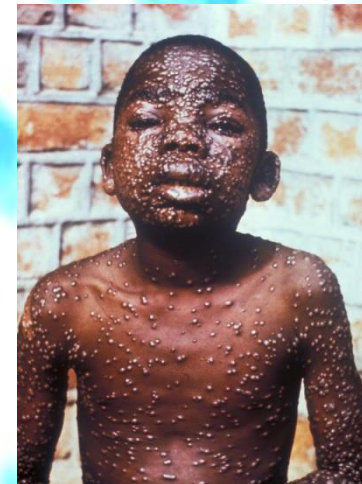
Ιός Ασθένειας Ποδών και Στόματος (FMDV)

Φυτά



Ιός της Μωσαϊκής του Καπνού (TMV)

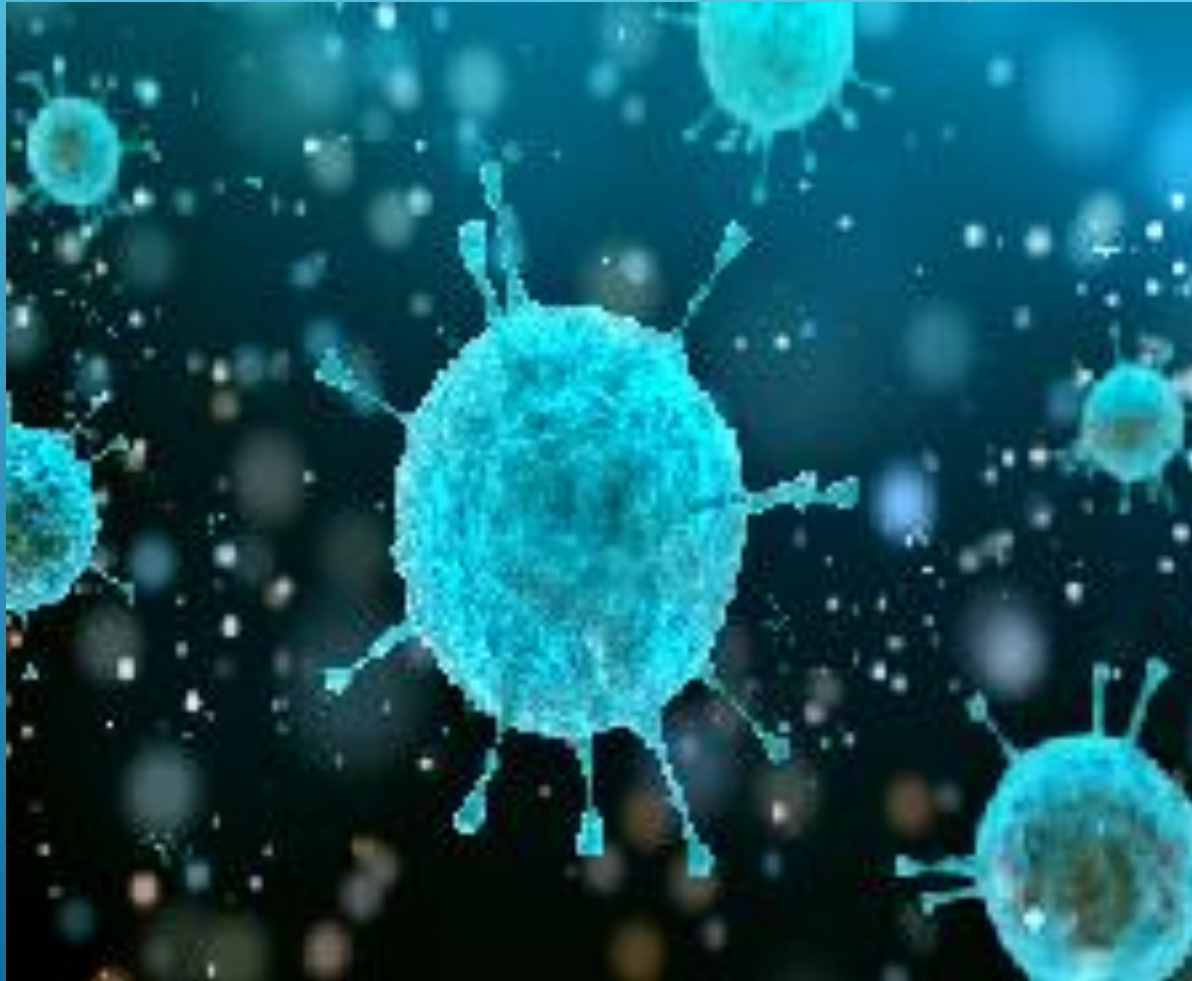
Άνθρωπος



Ιός Ευλογιάς

ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΙΟΙ;

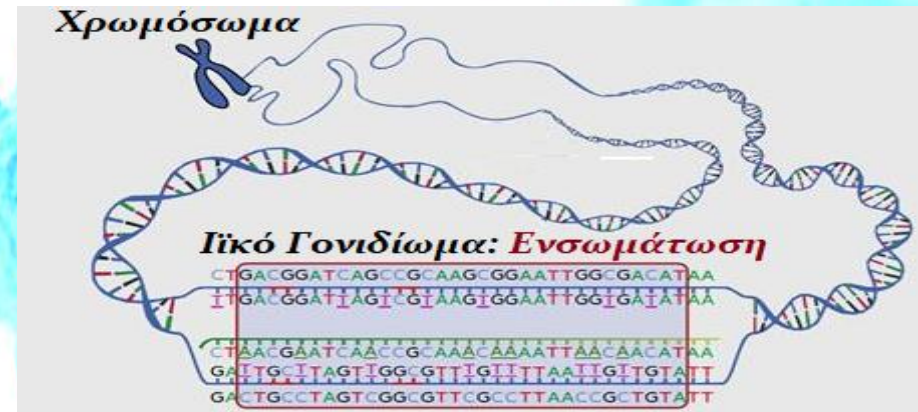
Οι Ζωντανοί Οργανισμοί Επιβιώνουν
σε Έναν Ωκεανό από Ιούς!



ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΙΟΙ;

Οι Ζωντανοί Οργανισμοί Επιβιώνουν σε Έναν Ωκεανό από Ιούς!

- Καταπίνουμε και Εισπνέουμε Εκατομμύρια Ιούς συνέχεια!
- Φέρουμε το Γενετικό Υλικό πολλών Ιών στα δικά μας Γονίδια
- Υπάρχουν Ιοί που προσβάλλουν περισσότερα από ένα είδη οργανισμών

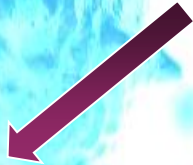


Ζωνοόσοι: Μετάδοση Ιογενών Λοιμώξεων μέσω ενδιάμεσου ξενιστή (π.χ. έντομα, ζώα, κ.λ.π.)

ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΙΟΙ;

Οι Ζωντανοί Οργανισμοί Επιβιώνουν σε Έναν Ωκεανό από Ιούς!

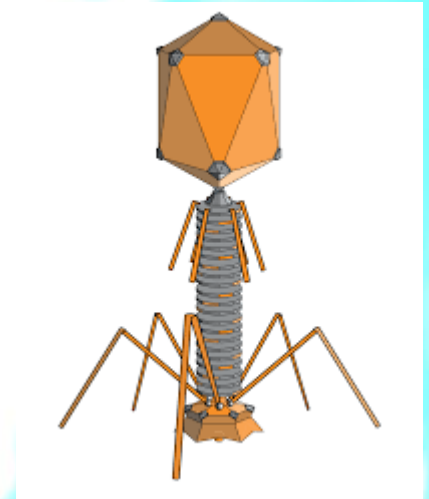
- Περισσότεροι από 10^{30} Βακτηριοφάγοι στα Παγκόσμια Αποθέματα Νερού



1000x Μεγαλύτερη Βιομάζα
από εκείνη των Ελεφάντων



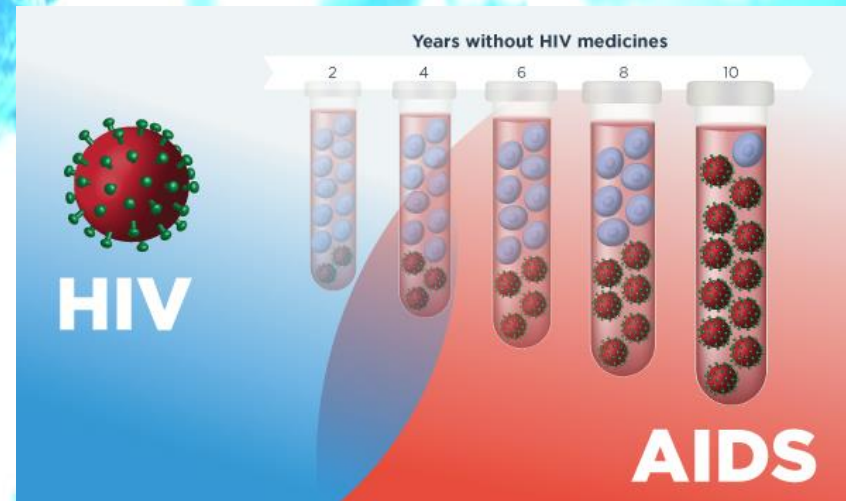
Μήκος όλων των Βακτηριοφάγων:
200 Εκατομμύρια Έτη Φωτός!



- Πάνω από 10^{16} διαφορετικά Γονιδιώματα του ιού HIV (AIDS)



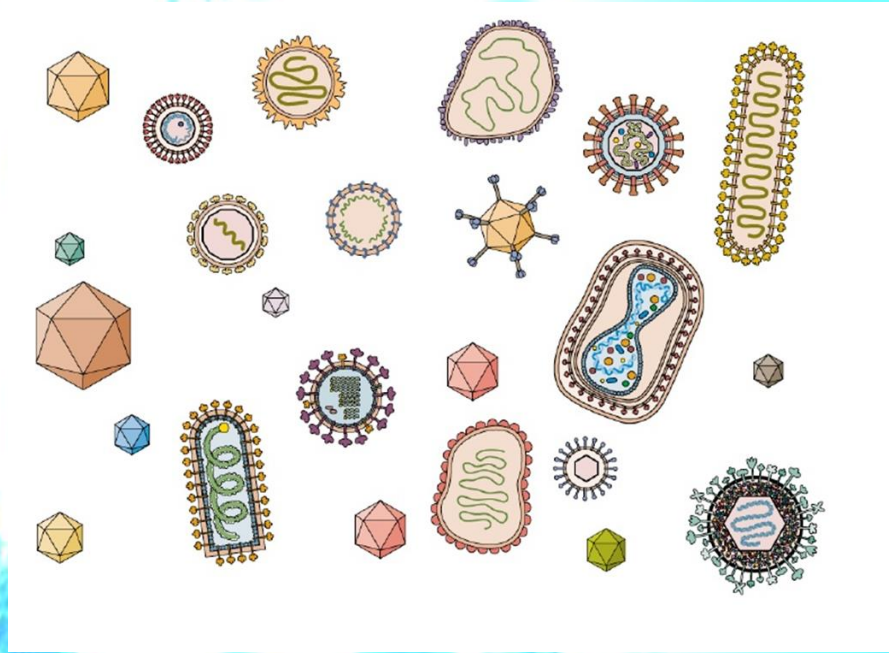
Μεγάλη πιθανότητα για στελέχη ανθεκτικά
σε κάθε είδος φαρμάκου που έχουμε σήμερα



ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΙΟΙ;

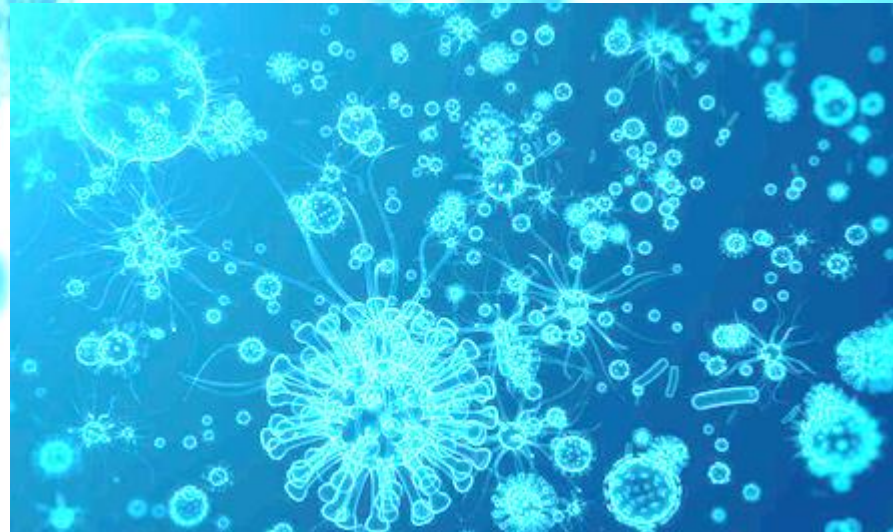
- 40000 Ιοί Βακτηρίων, Φυτών και Ζώων που ταξινομούνται σε 3 Τάξεις, 73 Οικογένειες, 287 Γένη και 1950 Είδη

(μέχρι πρόσφατα... Συνεχώς ανακαλύπτουμε νέα στελέχη, είδη, οικογένειες, κ.λ.π....)



- Αμέτρητοι Ιοί που δεν έχουμε ανακαλύψει ακόμα
- Πάνω από 10^6 ιϊκά σωματίδια ανά ml θαλασσινού νερού!

(Μελέτη του 2019: Πάνω από 200.000 διαφορετικά είδη ιών στους ωκεανούς).

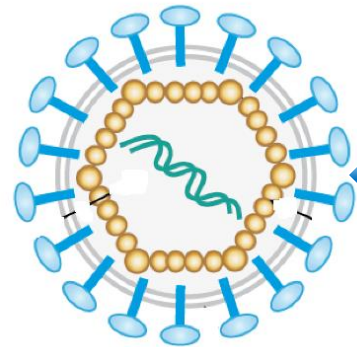


ΠΩΣ ΕΜΦΑΝΙΣΤΗΚΑΝ ΟΙ ΙΟΙ;

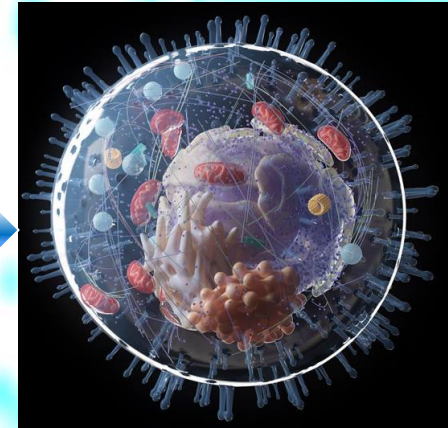
ΔΕΝ ΥΠΑΡΧΕΙ ΣΑΦΗΣ ΑΠΑΝΤΗΣΗ

ΠΙΘΑΝΕΣ ΘΕΩΡΙΕΣ:

- Πρόδρομες Μοριακές Μορφές Κυτταρικών Οργανισμών;



Ιός



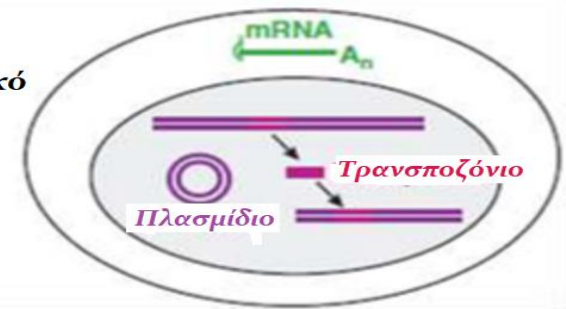
Κύτταρο

- Κυτταρική Προέλευση: Από Συστατικά του κυττάρου που πολλαπλασιάζονται ανεξάρτητα; (mRNA, τρανσποζόνια, πλασμίδια)

Προκαρυωτικό
Κύτταρο



Ευκαρυωτικό
Κύτταρο

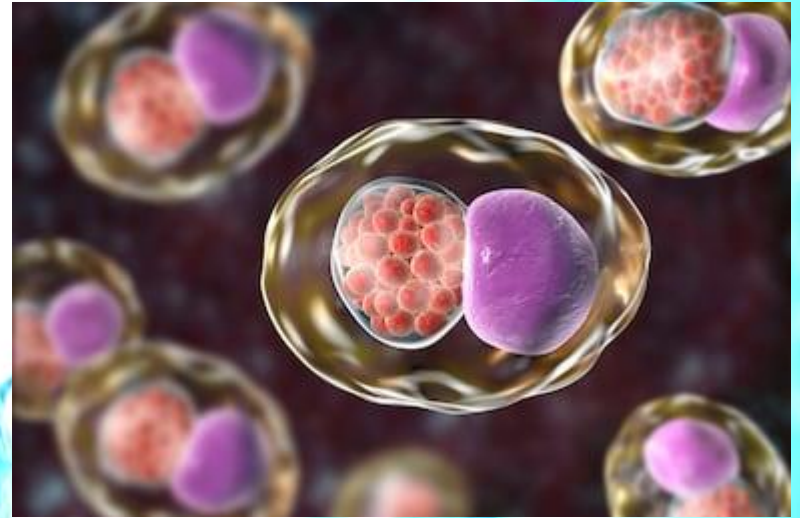


ΠΩΣ ΕΜΦΑΝΙΣΤΗΚΑΝ ΟΙ ΙΟΙ;

ΔΕΝ ΥΠΑΡΧΕΙ ΣΑΦΗΣ ΑΠΑΝΤΗΣΗ

ΠΙΘΑΝΕΣ ΘΕΩΡΙΕΣ:

- Εκφυλισμός *Ενδοκυττάρων*
Μικροοργανισμών; (Π.χ. Χλαμύδια,
Ρικέτσια)



Πολλές βιολογικές διαδικασίες έχουν συμβάλει

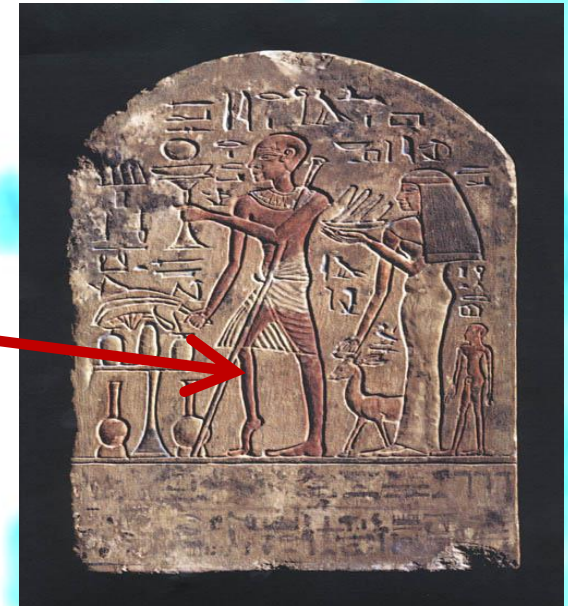
Ο Τροπισμός* των Ιών ίσως σχετίζεται με την προέλευσή τους

* «Προτίμηση» (Προσαρμογή) σε συγκεκριμένα κύτταρα, ιστούς, οργανισμούς

ΠΟΣΟ ΠΑΛΙΟΙ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΙΟΙ;

Από τότε που υπάρχουν οι ανθρώπινες κοινωνίες

- Αρχαία Αίγυπτος, 1403-1365 π.Χ.:
Αρχαιότερη απεικόνιση Ιογενούς
Λοίμωξης, Ένδειξη Πιθανής
Παραλυτικής Πολιομυελίτιδας



- Κωδικός Εσνούννα, Αρχαία Μεσοποταμία, 23^{ος} αιώνας π.Χ.:
Καταγραφή μετάδοσης **Λύσσας**
από σκύλο σε άνθρωπο



ΠΟΣΟ ΠΑΛΙΟΙ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΙΟΙ;

Από τότε που υπάρχουν οι ανθρώπινες κοινωνίες

- Αρχαία Αίγυπτος, 1157 π.Χ.:
Θάνατος Ραμσή 5^{ου} από **Ευλογιά**



- Ομήρου Ιλιάδα: «Αλλά τρομάζω
μη κακό μεγάλο εκεί μας έβρη,
που είν' ο Έκτωρ αρχηγός και
ωσάν φωτιά μανίζει...» **Λύσσα;**



ΠΟΣΟ ΠΑΛΙΟΙ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΙΟΙ;

Από τότε που υπάρχουν οι ανθρώπινες κοινωνίες

- Ινδία 1000 π.Χ., Κίνα 10^{ος} Αιώνας μ.Χ.: Ρινική εμφύσηση σκόνης από κρούστα εξανθημάτων **ευλογιάς** (1^η απόπειρα μορφής εμβολιασμού)



van Neerven, Joost. (2014). Mucosal immunity: barriers, bugs, and balance.

- Αθήνα 430-426 π.Χ., Λοιμός: **Αιμορραγικός Πυρετός Έμπολα;** (Αναφορά από Θουκυδίδη ότι προήλθε από την Αιθιοπία). Απώλεια 1/4-1/3 πληθυσμού (έως 100000 νεκροί)



Για 1^η φορά ο Θουκυδίδης περιέγραψε με υπέροχο τρόπο την ΑΝΟΣΙΑ

Μεγάλη η συμβολή του Ιπποκράτη στην καταπολέμηση της επιδημίας

ΠΩΣ ΑΝΑΚΑΛΥΦΘΗΚΑΝ ΟΙ ΙΟΙ

Πρώτος Ιός που ανακαλύφθηκε

Tobacco Mosaic Virus (TMV)

(Iwanowski 1892, Beijerinck 1898)



Εκχύλισμα
«Άρρωστου»
Φυτού



Φίλτρο Pasteur Chamberland

Κατακράτηση βακτηρίων λόγω
μικροσκοπικής διαμέτρου
πόρων πορσελάνης

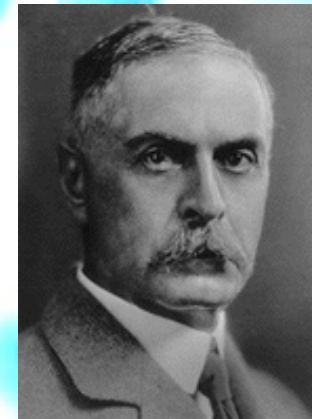
Μετάδοση Ασθένειας

ΠΩΣ ΑΝΑΚΑΛΥΦΘΗΚΑΝ ΟΙ ΙΟΙ

Ιός Κίτρινου Πυρετού: Μετάδοση σε
Εθελοντές με δείγματα ορού ασθενών
φιλτραρισμένα με φίλτρο Chamberland
(Walter Reed, 1902)



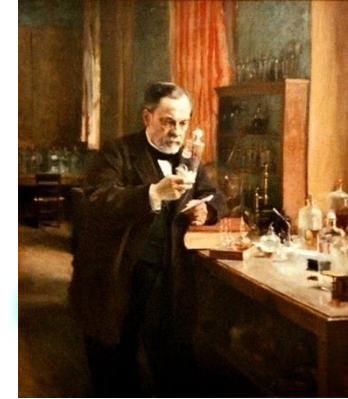
Ανακάλυψη Poliovirus: 1909 (K.
Landsteiner & E. Popper) – Μετάδοση σε
πειραματόζωα με φιλτραρισμένο
εκχύλισμα εγκεφάλου νεκρών



K. Landsteiner

ΑΛΛΑ ΟΡΟΣΗΜΑ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ & ΣΤΙΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

- 1885: Εμβόλιο κατά της λύσσας πριν την ανακάλυψη των ιών



Louis Pasteur

- 1915-17: Ανακάλυψη Βακτηριοφάγων



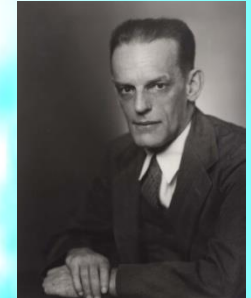
Twort and D'Herelle

- 1918: Πανδημική Ισπανική Γρίπη (H1N1) – 40 εκατομμύρια νεκροί



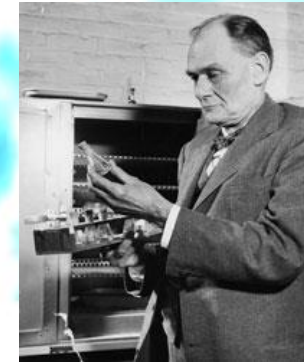
ΑΛΛΑ ΟΡΟΣΗΜΑ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ & ΣΤΙΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

- 1937: Καλλιέργεια Ιού Κιτρίνου Πυρετού σε αυγά όρνιθας και παραγωγή εμβολίου



Max Theiler

- 1949: Καλλιέργεια σε κύτταρα – βάση για τεχνικές απομόνωσης ιών και ανάπτυξη εμβολίων



J. Enders

- 1955: Εισαγωγή αδρανοποιημένου εμβολίου κατά της πολιομυελίτιδας



J. Salk

ΑΛΛΑ ΟΡΟΣΗΜΑ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ & ΣΤΙΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ

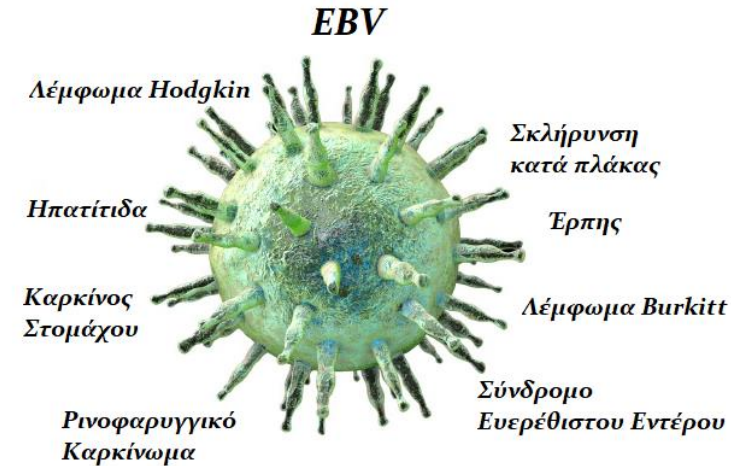
ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

- 1961: Εισαγωγή στοματικού εξασθενημένου εμβολίου κατά της πολιομυελίτιδας



Ο Α. Sabin εμβολιάζει
παιδί με OPV

- 1964: 1^η σύνδεση ενός ιού, του ερπητοϊού Epstein-Barr (EBV) με μορφές καρκίνου στον άνθρωπο

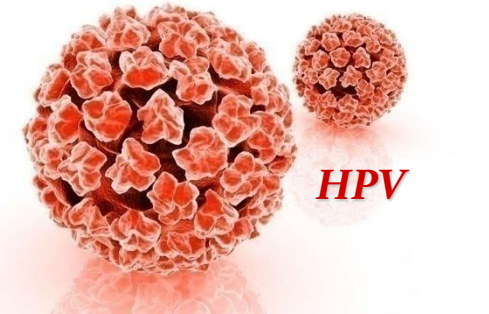


- 1976: 1^η επίσημη καταγραφή αιμορραγικού πυρετού Ebola



ΑΛΛΑ ΟΡΟΣΗΜΑ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ & ΣΤΙΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

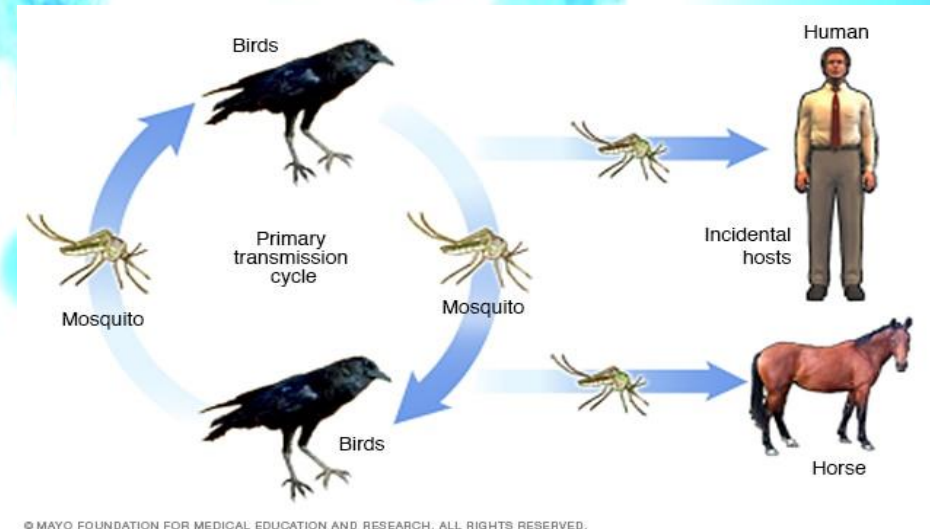
- 1983: Σύνδεση στελεχών Ιού Ανθρωπίνων Κονδυλωμάτων (HPV) με καρκίνο τραχήλου μήτρας



- 1984: Ανακάλυψη Ιού Άνθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας (HIV) → **AIDS**

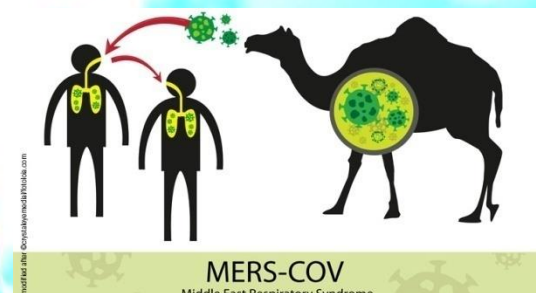


- 1999: Πρώτο καταγραφέν περιστατικό λοίμωξης από τον Ιό του Δυτικού Νείλου



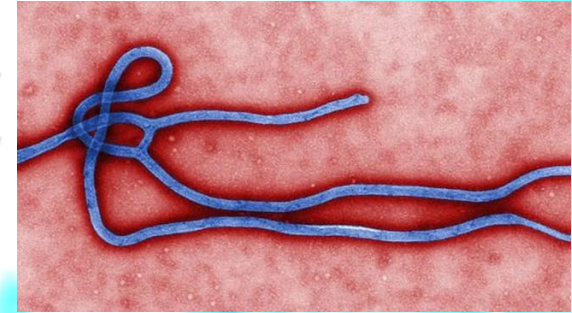
ΑΛΛΑ ΟΡΟΣΗΜΑ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ & ΣΤΙΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

- 2003: Σοβαρό Οξύ Αναπνευστικό Σύνδρομο (SARS) από ένα νέο είδος Κοροναϊού
- 2005-2007: Σοβαρές επιδημίες από τους ιούς Chikungunya και Δάγγειου Πυρετού
- 2009-2010: Νέα Πανδημία Γρίπης H1N1 των χοίρων
- 2012: Καταγραφή σοβαρού Αναπνευστικού Συνδρόμου Μέσης Ανατολής (MERS), προκαλείται από κοροναϊό, μετάδοση από



ΑΛΛΑ ΟΡΟΣΗΜΑ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ & ΣΤΙΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

- 2014: Στην Αφρική η μεγαλύτερη επιδημία Ebola που έχει καταγραφεί στην ιστορία, με πάνω από 11000 νεκρούς

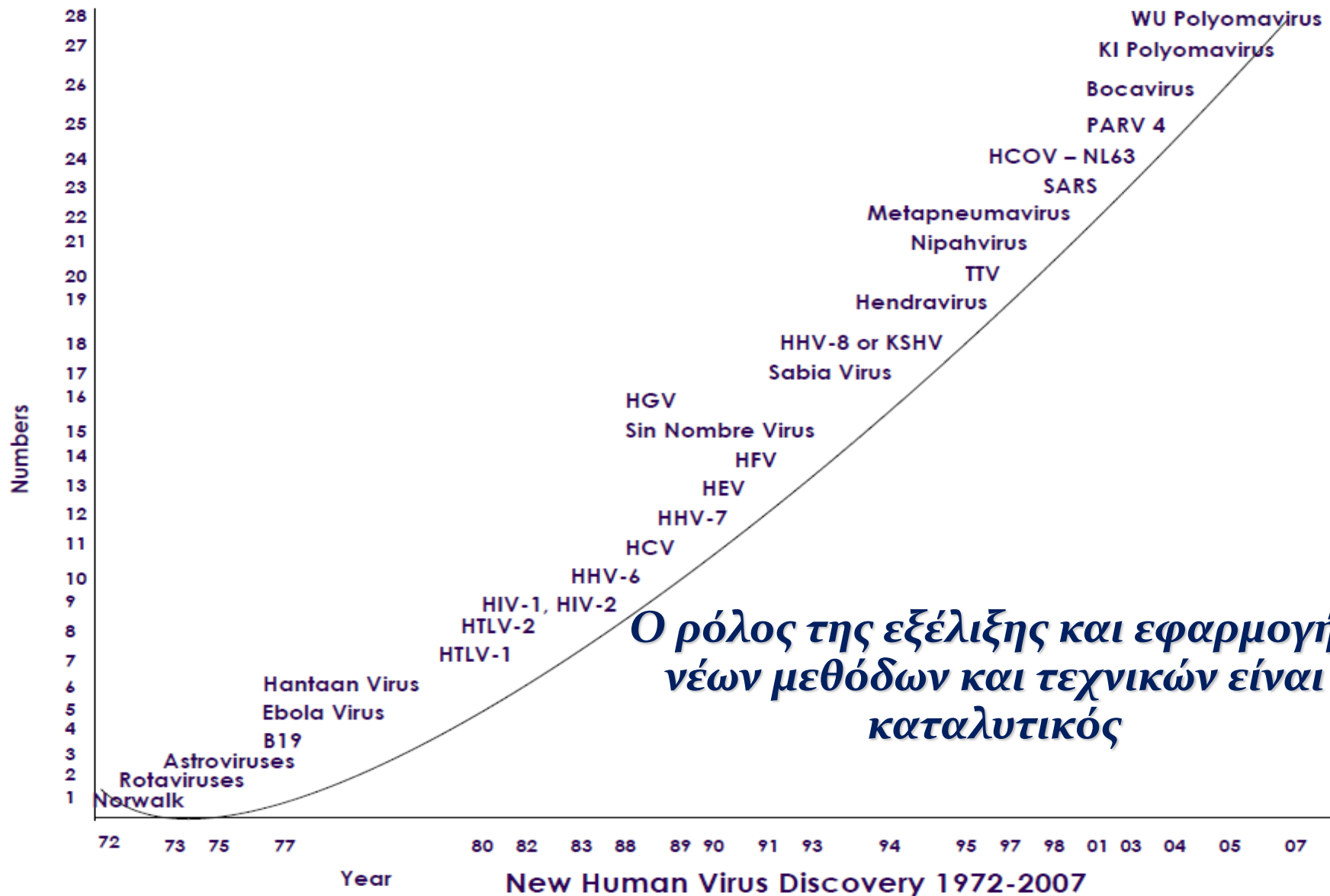


- 2016: Ιός Ζίκα, παγκόσμια κατάσταση εκτάκτου ανάγκης (προγεννητική μικροκεφαλία, νευρολογικές επιπλοκές)



Συνεχώς ανακαλύπτονται νέοι ιοί και στελέχη τους, καθώς και διευκρινίζεται περισσότερο η σύνδεσή τους με σύνδρομα και ασθένειες των οποίων η αιτιολογία ήταν μέχρι πρότινος άγνωστη

ΣΥΝΕΧΕΙΣ ΑΝΑΚΑΛΥΨΕΙΣ ΝΕΩΝ ΙΩΝ



ΠΩΣ ΕΞΕΛΙΧΘΗΚΑΝ & ΕΞΕΛΙΣΣΟΝΤΑΙ ΟΙ ΙΟΙ;

- Συνεχής αλλαγή των ιών με σκοπό την **ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ** τους στον **ΞΕΝΙΣΤΗ** τους και την τελική τους **ΕΠΙΒΙΩΣΗ**

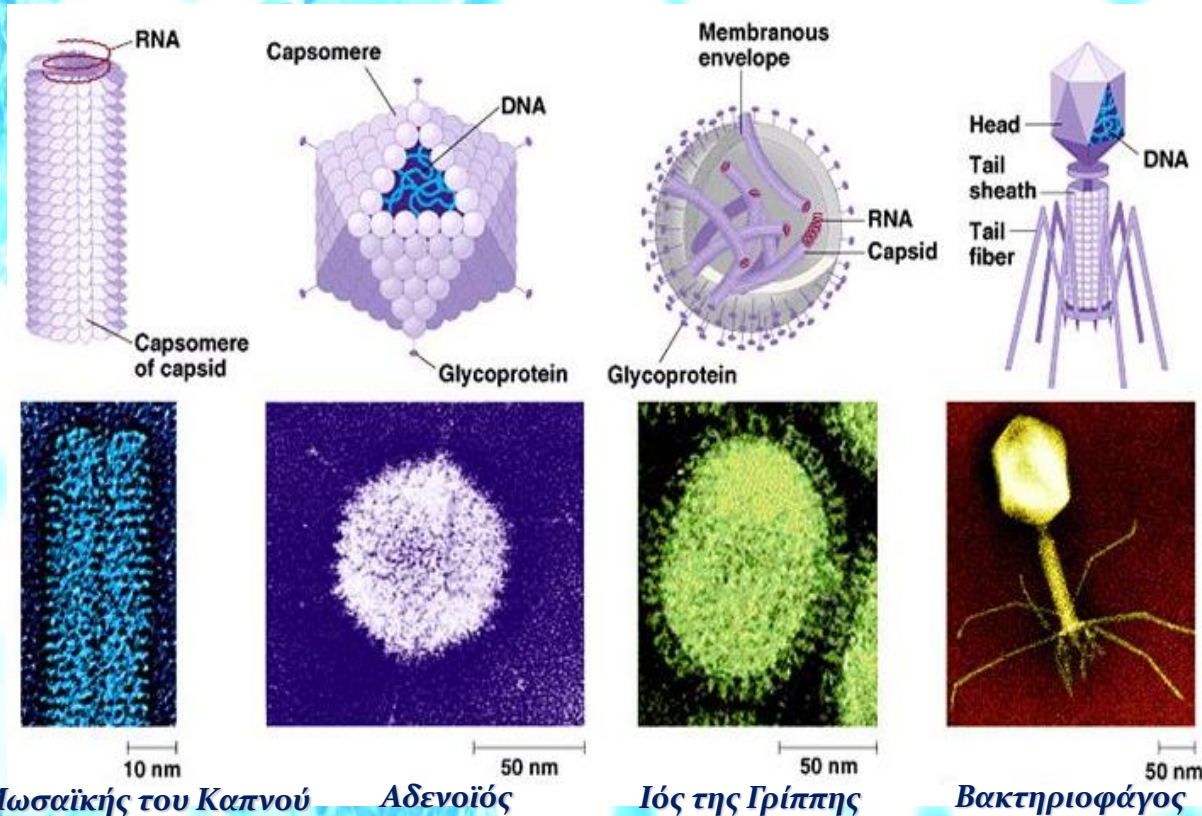
Ξενιστής:

Φυτά

Ζώα

Ζώα

Βακτήρια



Ιός της Μωσαϊκής του Καπνού

Αδενοϊός

Ιός της Γρίπης

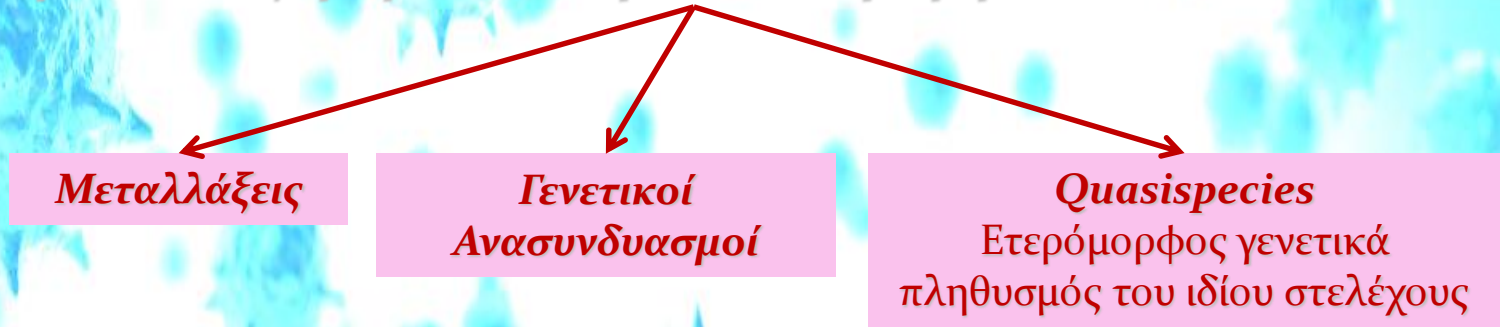
Βακτηριοφάγος

- Πιο πολύπλοκοι οι ιοί των πιο απλών στη δομή βακτηρίων
- Πιο απλοί οι ιοί των περισσότερο πολύπλοκων ανωτέρων οργανισμών (ισχυρότερη εξελικτική πίεση εδώ, π.χ. Ανοσοποιητικό Σύστημα Ανωτέρων Οργανισμών)

Οι ιοί «σμιλεύθηκαν» στην εξελικτική τους πορεία από την αλληλεπίδρασή τους με τον ξενιστή τους για να ΠΡΟΣΑΡΜΟΣΘΟΥΝ και να ΕΠΙΒΙΩΣΟΥΝ

ΠΩΣ ΕΞΕΛΙΧΘΗΚΑΝ & ΕΞΕΛΙΣΣΟΝΤΑΙ ΟΙ ΙΟΙ;

- 2 Κύριες κινητήριες δυνάμεις της επιβίωσης/εξέλιξής τους:
 - Μεγάλος αριθμός απογόνων σε μικρό χρονικό διάστημα
 - Εξαιρετικά υψηλή Γενετική Ποικιλομορφία

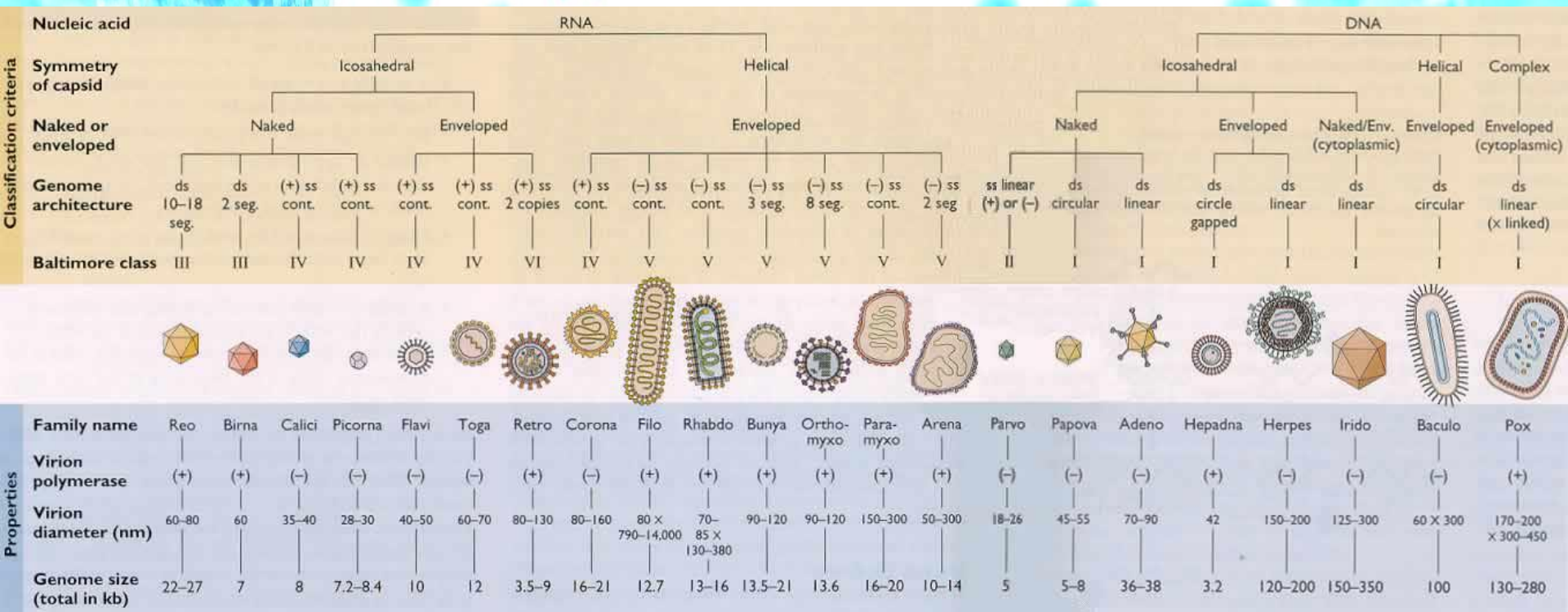


Οι ιοί είναι Απλές «Δαρβινικού» Τύπου Μηχανές
ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΛΥΤΕΡΑ ΠΡΟΣΑΡΜΟΣΜΕΝΟΥ

Η Γενετική Ποικιλομορφία χρειάζεται για να επιλεγεί ο
ΚΑΛΥΤΕΡΑ ΠΡΟΣΑΡΜΟΣΜΕΝΟΣ σε μια χρονική στιγμή!

ΠΩΣ ΕΞΕΛΙΧΘΗΚΑΝ & ΕΞΕΛΙΣΣΟΝΤΑΙ ΟΙ ΙΟΙ;

- Η Γενετική Ποικιλομορφία των ιών, το υπόβαθρο στο οποίο δρα η Φυσική Επιλογή, είναι ασύγκριτα μεγαλύτερη από τη Γενετική Ποικιλομορφία ΟΛΩΝ ΜΑΖΙ των προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών του πλανήτη



Γενική Ταξινόμηση Μερικών Σημαντικών Κατηγοριών Ιών των Ζώων

(Συνολικά 7 Κατηγορίες Ιών με βάση το είδος του γενετικού τους υλικού, όταν στον υπόλοιπο έμβιο κόσμο το είδος του γενετικού υλικού είναι **ENA** - το **DNA**)

ΠΩΣ ΕΞΕΛΙΧΘΗΚΑΝ & ΕΞΕΛΙΣΣΟΝΤΑΙ ΟΙ ΙΟΙ;

ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗ ΠΙΕΣΗ
(π.χ. Ανοσοποιητικό Σύστημα, Αντιϊκές Ουσίες)

ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ



**ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ
ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ**

ΦΥΣΙΚΗ ΕΠΙΛΟΓΗ

Επιβίωση του
Καλύτερα
Προσαρμοσμένου



Επικράτηση λίγων στελεχών που **ΤΥΧΑΙΝΕΙ**
να είναι τα καλύτερα προσαρμοσμένα τη
συγκεκριμένη χρονική στιγμή

***Οι περισσότερες μεταλλάξεις είναι καταστροφικές για την επιβίωση του ιού, αλλά η πολύ μεγάλη Γεν. Ποικιλομορφία με τον πολύ υψηλό αριθμό απογόνων (έως και πολλές χιλιάδες ιοί από ΕΝΑ κύτταρο) αυξάνουν τις πιθανότητες για ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ ΚΑΛΥΤΕΡΟΥ**

Οι ιοί ΔΕΝ ΣΚΕΦΤΟΝΤΑΙ!

ΑΠΟΤΕΛΟΥΝ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΤΩΝ ΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ ΤΗΣ ΖΩΗΣ!

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΩΝ ΣΤΙΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΚΟΙΝΩΝΙΕΣ

Δηλαδή οι ιοί είναι πάντα επικίνδυνοι για την υγεία;

ΟΧΙ!

- Η συντριπτική τους πλειοψηφία έχουν αμελητέα, έως καμία επίδραση στην υγεία μας

Υπάρχουμε χάρη στο μεγάλο μας όπλο που εξελίχθηκε για να πολεμήσει κάθε μορφής «εισβολέα»:

Το ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

- Εάν το Ανοσοποιητικό Σύστημα είναι σε καταστολή (Μεταμόσχευση, Καρκίνος, AIDS, Κατάθλιψη/Ψυχικές Διαταραχές), ακόμα και η πιο ασήμαντη και συνηθισμένη ιογενής λοίμωξη μπορεί να αποβεί **ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΑ**

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΩΝ ΣΤΙΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΚΟΙΝΩΝΙΕΣ

Οι ιοί θέλουν τον ξενιστή τους για να επιβιώσουν!

Δεν τους «συμφέρει»:

- Να είναι πολύ πετυχημένοι ως παράσιτα και να σκοτώνουν τον ξενιστή τους
- Ή πολύ αδύναμοι και να τους υπερνικά το αμυντικό σύστημα (π.χ. ανοσοποιητικό) του ξενιστή τους

Αλληλοεξάρτηση



Συμβίωση



Συχνότερο

Παρασιτισμός



Ασθένεια

Συμβαίνουν και τα 3!

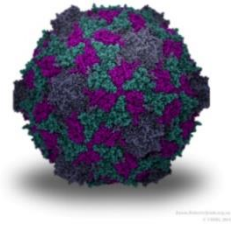
Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΩΝ ΣΤΙΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΚΟΙΝΩΝΙΕΣ



Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΩΝ ΣΤΙΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΚΟΙΝΩΝΙΕΣ

Γενικοί Τύποι Ιογενών Λοιμώξεων

**Ασυμπτωματικές/Υποκλινικές
Λοιμώξεις (Πλειοψηφία)**



Χρόνιες Λοιμώξεις

Οξείες Λοιμώξεις

**Λανθάνουσες Λοιμώξεις
(Επιμονή Ιϊκού Γεν. Υλικού στο
Κύτταρο - Ξενιστή)**

**Ερπητικές
Λοιμώξεις**



Παραδείγματα

ΚΑΡΚΙΝΟΣ

**HIV
(AIDS)**



Ηπατίτιδα B, C HPV

EBV

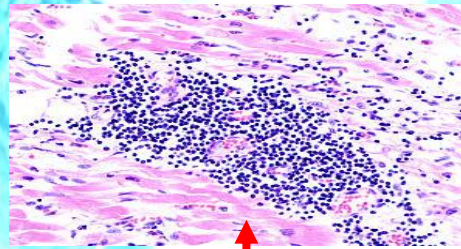
Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΩΝ ΣΤΙΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΚΟΙΝΩΝΙΕΣ

Παραδείγματα Οξείων Ιογενών Λοιμώξεων του Ανθρώπου

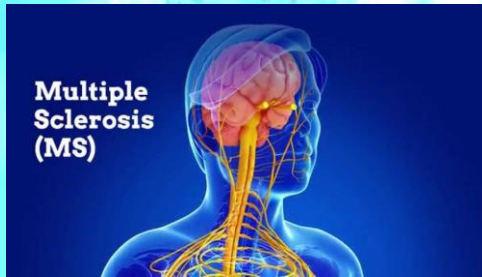


Χρόνια Ιογενής Καρδιομυοπάθεια

Πολλές ακόμα σοβαρές ασθένειες με πιθανή ιογενή αιτιολογία που αναμένεται να διερευνηθούν



Σκλήρυνση κατά Πλάκας (MS)



ΧΡΟΝΙΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Σύνδρομο Χρονίας Κοπώσεως (CFS)

CHRONIC FATIGUE SYNDROME SYMPTOMS

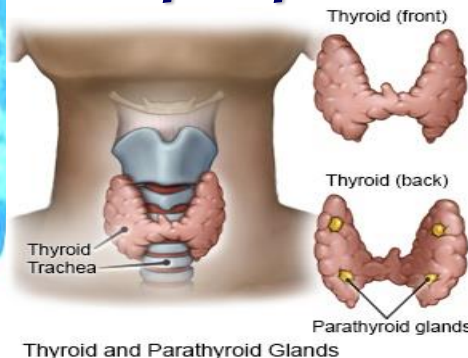


Myasthenia Gravis

How Do You Get Myasthenia Gravis?



Αυτοάνοση Θυροειδίτιδα



Τύπου 1 Διαβήτης



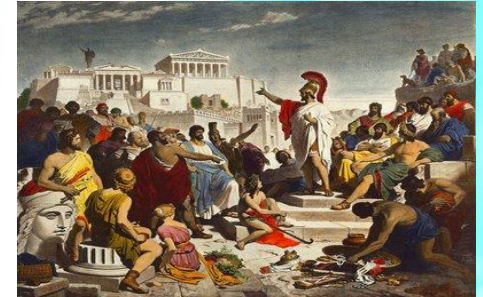
Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΩΝ ΣΤΙΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΚΟΙΝΩΝΙΕΣ

Γιατί τότε συμβαίνουν οι ασθένειες;

Γιατί συμβαίνουν επιδημίες με καταστροφικές για τον άνθρωπο συνέπειες; (κοινωνικές, πολιτισμικές, οικονομικές, εθνικές)

Π.χ.:

- Λοιμός Αθήνας: 1/3 του πληθυσμού εξαφανίστηκε, καταστράφηκε η Αθηναϊκή Ηγεμονία
- «Εισαγωγή» Ευλογιάς, Ιλαράς και Τύφου από κατακτητές στους ιθαγενείς στην Κεντρική και Νότια Αμερική – Μεξικό: Μείωση πληθυσμού από 20 σε 3 εκατομ. Μεταξύ 1518 & 1568
- Πανδημία Γρίπης, 1918: 40 εκατομμύρια νεκροί



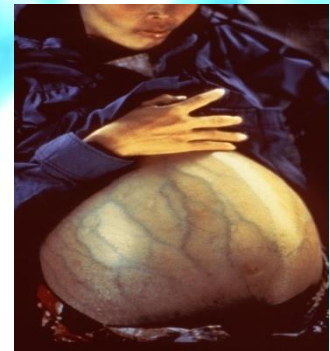
Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΩΝ ΣΤΙΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΚΟΙΝΩΝΙΕΣ

Γιατί τότε συμβαίνουν οι ιογενείς ασθένειες;

Γιατί συμβαίνουν επιδημίες με καταστροφικές για τον άνθρωπο συνέπειες; (κοινωνικές, πολιτισμικές, οικονομικές, εθνικές)

Π.χ.:

- **Ετήσια Επιδημία Γρίπης: 400000 νεκροί ετησίως**
- **Ηπατίτιδα Β, Ηπατίτιδα C: 350 & 170 εκατομμύρια άνθρωποι προσβεβλημένοι αντίστοιχα, πάνω από 1 εκατομμύριο νεκροί συνολικά το 2016**
- **HIV (AIDS): 38 εκατομμύρια άνθρωποι, 770000 θάνατοι το 2018**



Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΩΝ ΣΤΙΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΚΟΙΝΩΝΙΕΣ

Γιατί τότε συμβαίνουν οι ιογενείς ασθένειες;

Γιατί συμβαίνουν επιδημίες με καταστροφικές για τον άνθρωπο συνέπειες; (κοινωνικές, πολιτισμικές, οικονομικές, εθνικές)

Γενικά:

**ΝΕΟΙ ΤΥΠΟΙ ΙΩΝ Ή ΚΑΙ ΝΕΟΙ ΙΟΙ ΕΡΧΟΝΤΑΙ ΣΕ ΕΠΑΦΗ
ΜΕ ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ**

Δηλ. απουσία
Ανοσίας

ΙΟΓΕΝΗΣ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

ΑΝΘΡΩΠΟΓΕΝΗΣ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ, ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ, ΠΑΝΔΗΜΙΕΣ

ΑΝΘΡΩΠΟΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

- Οικολογία και Σύγχρονες Μέθοδοι Γεωργίας

- Μόλυνση Περιβάλλοντος, Κλιματικές Αλλαγές (?), Αποψίλωση Δασών, Τεχνητή Ύδρευση, Αναδασώσεις, Θεομηνίες



Μεταβολές Οικοσυστημάτων -
Αλλοίωση Περιβάλλοντος
Ενδημίας Εντόμων και Ζώων που
είναι Φορείς Ιών



Επαφή για 1η Φορά
με Νέους
Παθογόνους Ιούς



ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ, ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ, ΠΑΝΔΗΜΙΕΣ

ΑΝΘΡΩΠΟΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

- Ιατρικές/Χειρουργικές Παρεμβάσεις



Παράδειγμα:

- Μεταμοσχεύσεις Οργάνων
- Ανοσοκατασταλτικά Φάρμακα

Ανάδυση ερπητοϊών όπως ο
CMV

ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ, ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ, ΠΑΝΔΗΜΙΕΣ

ΑΝΘΡΩΠΟΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

- **Ανθρώπινο Ήθος**

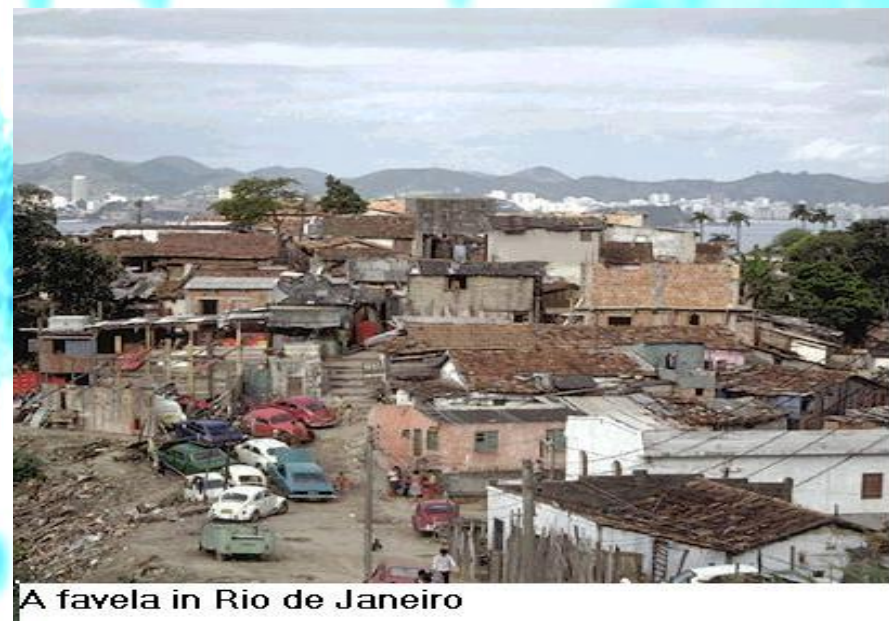
- Αλλαγές στη συμπεριφορά του ανθρώπου (σεξουαλική απελευθέρωση, χρήση ενδοφλέβιων ουσιών, κ.ά.) αποτέλεσαν γόνιμο έδαφος για τη μετάδοση και επικράτηση πολλών ιών (π.χ. HIV, HBV, ερπητοϊοί, papilloma, κ.λ.π.)



ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ, ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ, ΠΑΝΔΗΜΙΕΣ

ΑΝΘΡΩΠΟΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

- Αλλαγές στα Δημογραφικά Χαρακτηριστικά των Ανθρωπίνων Πληθυσμών – Πληθυσμιακή Αύξηση, Συνωστισμός σε Μεγαλουπόλεις, Μετανάστευση, Ένδεια



Κυρίως για Αερογενώς και
Υδατογενώς Μεταδιδόμενους Ιούς

ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ, ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ, ΠΑΝΔΗΜΙΕΣ

ΑΝΘΡΩΠΟΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

- Κοινωνικές Ταραχές, Πόλεμοι → Χαλάρωση και Ανεπάρκεια Μέσων Δημόσιας Υγείας



ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ, ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ, ΠΑΝΔΗΜΙΕΣ

ΑΝΘΡΩΠΟΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

- Εισαγωγή και Εξάπλωση Νέων Παθογόνων Μικροοργανισμών σε Πληθυσμούς κατά τη Μετανάστευση Ανθρώπων και Ζώων – Φορέων Ιών σε Φυσικές Καταστροφές και Πολέμους
- Τεχνικές Μαζικής Επεξεργασίας και Παραγωγής Τροφίμων



ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ, ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ, ΠΑΝΔΗΜΙΕΣ

ΑΝΘΡΩΠΟΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

- Ταχύτητα και Ευκολία Μέσων Μεταφοράς Προϊόντων και Συγκοινωνίας → Ταχύτατη Εξάπλωση → Επιδημίες/Πανδημίες



ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ, ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ, ΠΑΝΔΗΜΙΕΣ

ΑΝΘΡΩΠΟΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

- Αναποτελεσματικότητα Υπηρεσιών Δημόσιας Υγείας (π.χ. Ιός Marburg στην Αγκόλα, 2004-2005)



ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ, ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ, ΠΑΝΔΗΜΙΕΣ

ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

- Εξαιρετική Γενετική Πλαστικότητα:

- Μεταλλάξεις
- Γενετικός Ανασυνδυασμός

**Γενετική
Ποικιλομορφία**



ΚΑΙ ΣΕ ΤΕΛΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ:

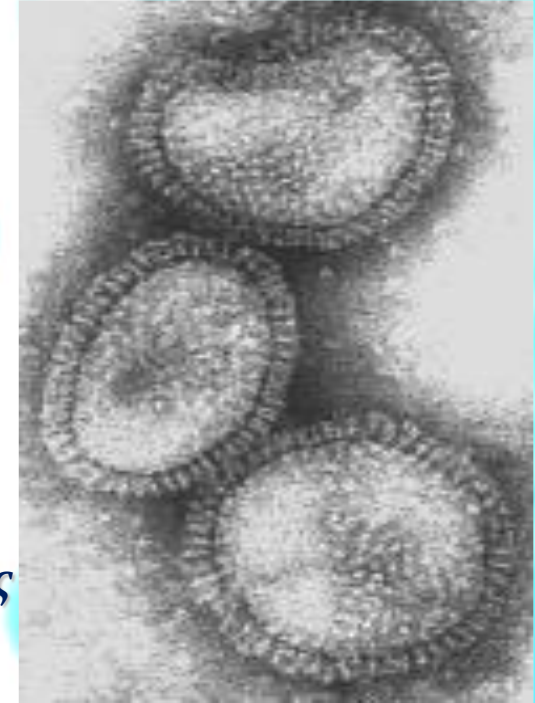
- Διάρρηξη των φραγμών ως προς το είδος του ξενιστή ενός ιού (π.χ. HIV: μεταφορά από πρωτεύοντα στον άνθρωπο, influenza: εξάπλωση από πτηνά, ζώα κ.λ.π. στον άνθρωπο και πρόκληση πανδημιών)
- Διαφυγή Αμυντικών Μηχανισμών (π.χ. Ανοσοποιητικό)
- Ανθεκτικότητα σε Αντιϊκές Ουσίες
- Υψηλό Λοιμογόνο Δυναμικό

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ: Ο ΙΟΣ ΤΗΣ ΓΡΙΠΠΗΣ

- Οικογένεια *Orthomyxoviridae*

- Γένη:

- ✓ *Influenza A* → Άνθρωπος
→ Πτηνά
→ Άλλα Θηλαστικά (π.χ. χοίροι)
} **Πιο Συχνή
Επιδημίες
Πανδημίες**
- ✓ *Influenza B* → Άνθρωπος
→ Φώκιες
} **Λιγότερο Συχνή,
Επιδημίες, Όχι
Πανδημίες**
- ✓ *Influenza C* → Άνθρωπος
→ Χοίροι
} **Σπάνια
Τοπικές Επιδημίες**
- ✓ *Influenza D* → Βοοειδή
→ Χοίροι



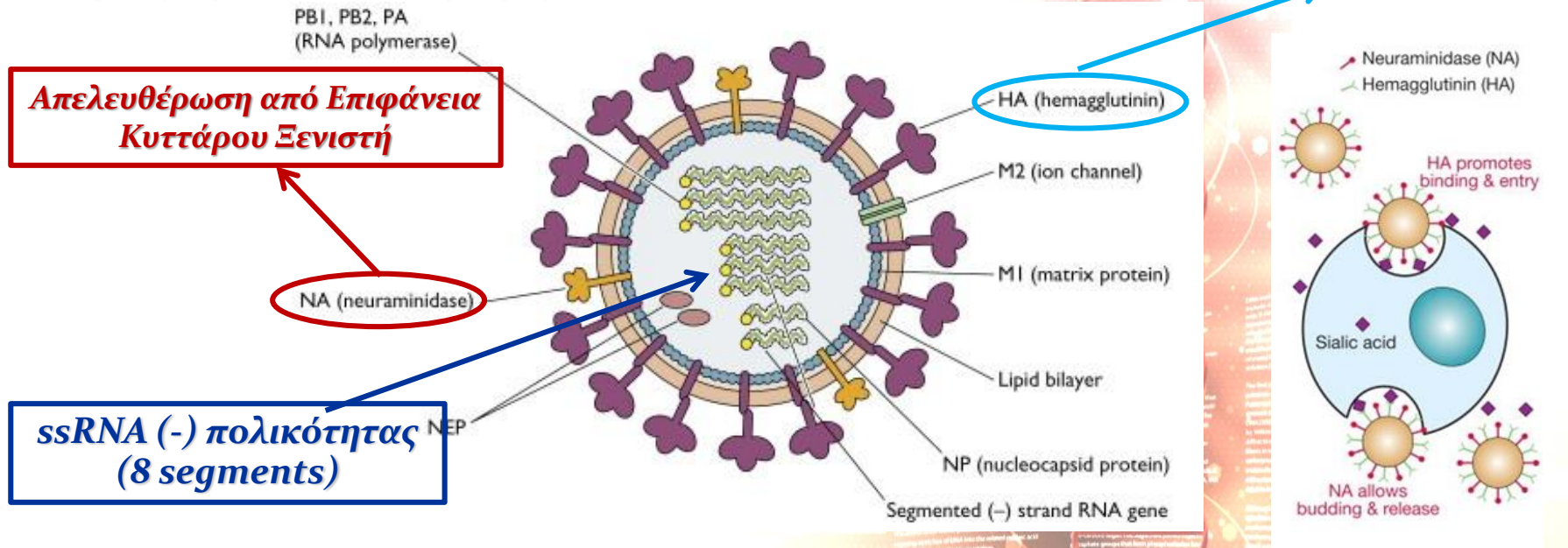
- 400.000 Θάνατοι παγκοσμίως (ιδίως σε ευπαθείς ομάδες)

- **Παθογένεια:**

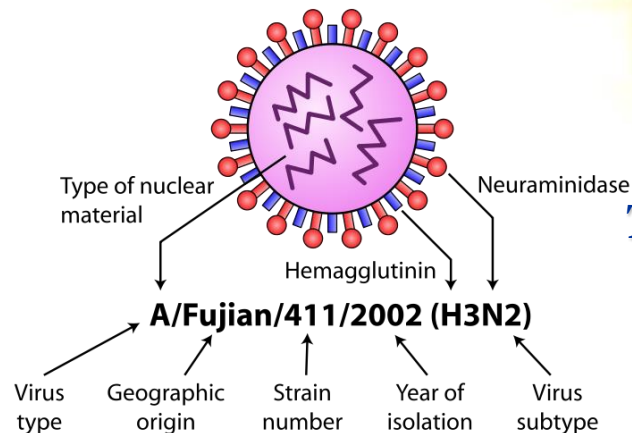
- ✓ Κυρίως Λοίμωξη Επιθηλίου του Αναπνευστικού
- ✓ Μπορεί να προκαλέσει και νευρολογικά, ή άλλα συμπτώματα
- ✓ Έκκριση κυτταροκινών συμβάλλει στα συμπτώματα
- ✓ Συχνή 2γενής βακτηριακή λοίμωξη

ΙΟΣ ΤΗΣ ΓΡΙΠΠΗΣ: Ο ΜΟΝΙΜΟΣ ΠΡΩΤΑΓΩΝΙΣΤΗΣ

- Ελυτροφόρος, Πλειομορφικός



✓ *Influenza A* → 18 H Υπότυποι (HA), 11 N Υπότυποι (NA)

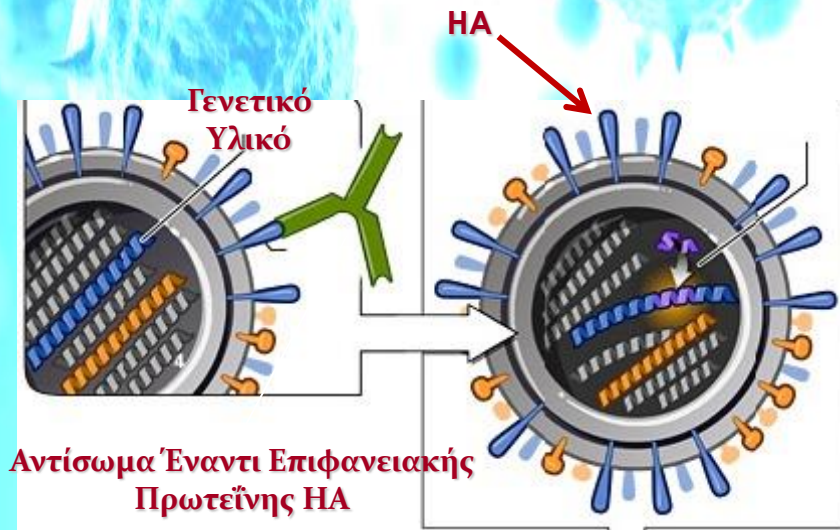


Τρόπος Ονομασίας Στελεχών

ΙΟΣ ΤΗΣ ΓΡΙΠΠΗΣ: ΤΟ ΑΕΝΑΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ

Γενετική Ποικιλομορφία

- Influenza A: Αντιγονική Απόκλιση (Antigenic Drift)



Αντισώματα του Ανθρώπου δεν αναγνωρίζουν πλέον τη Μεταλλαγμένη Μορφή της HA



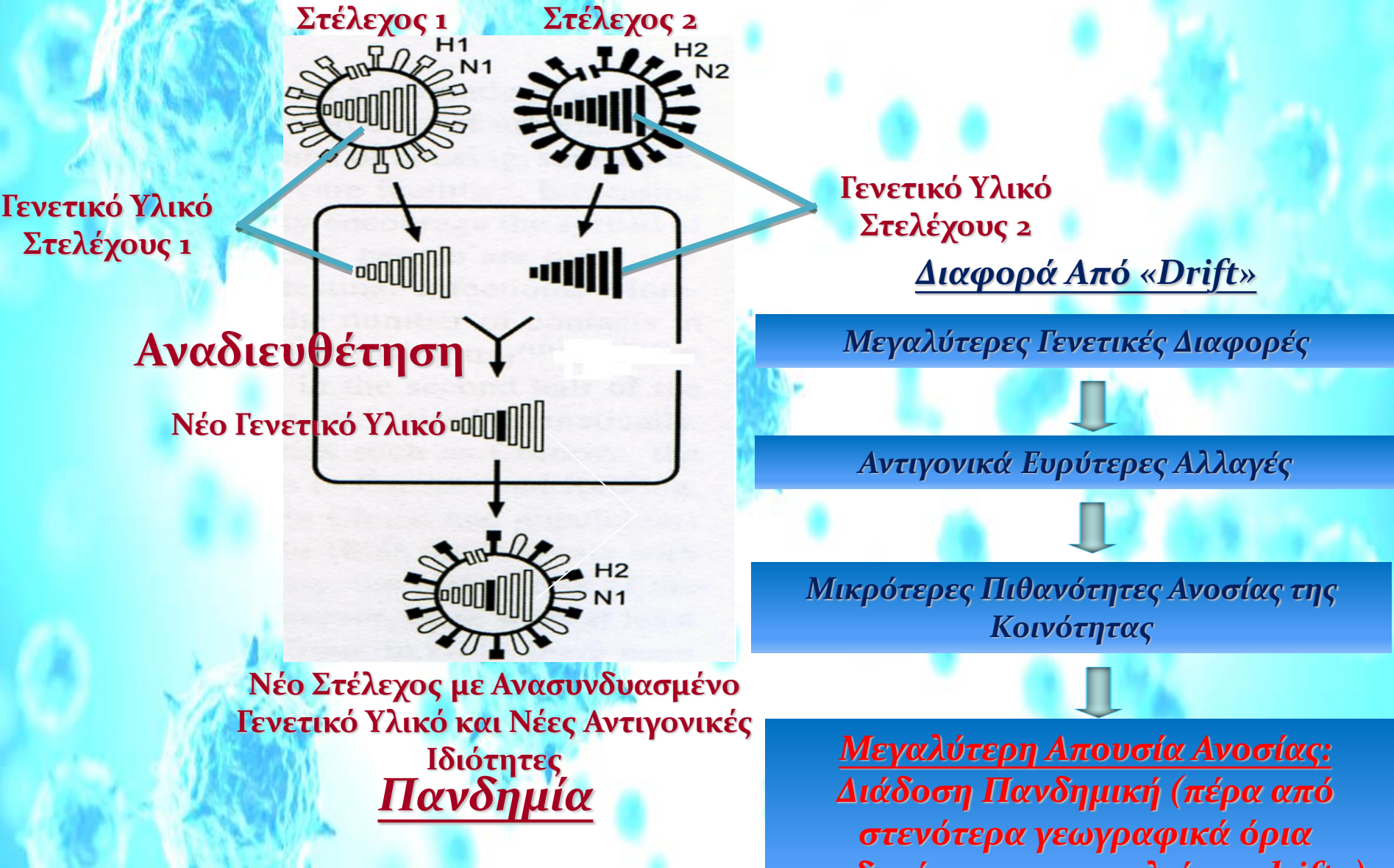
Νέο Στέλεχος με Μεταλλαγμένο Γενετικό Υλικό και Νέες Αντιγονικές Ιδιότητες

ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ

ΙΟΣ ΤΗΣ ΓΡΙΠΠΗΣ: ΤΟ ΑΕΝΑΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ

Γενετική Ποικιλομορφία

- Influenza A: Αντιγονική Εκτροπή (Antigenic Shift)

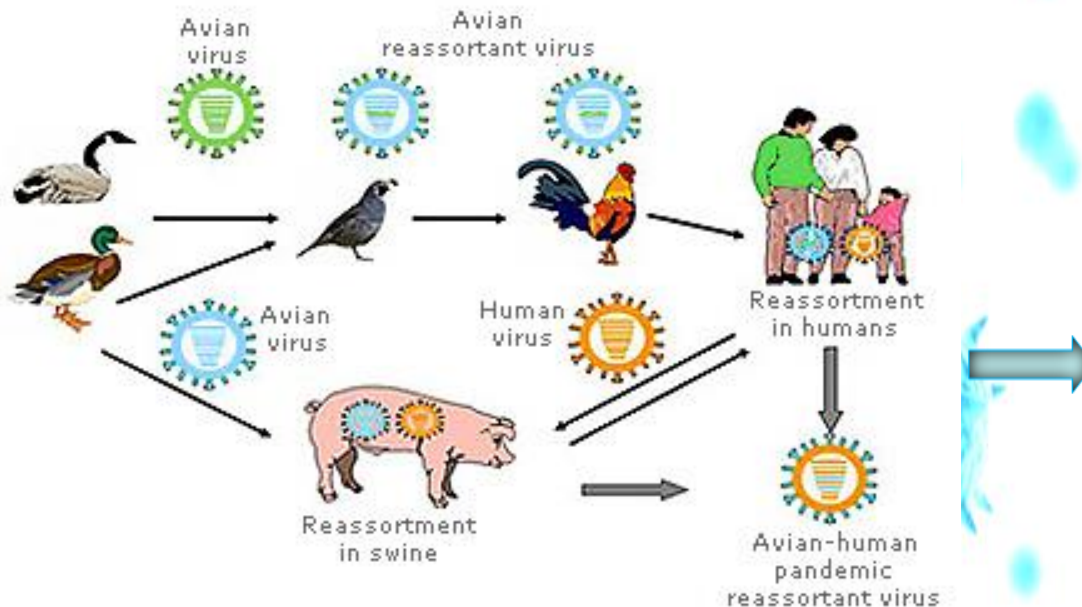


ΙΟΣ ΤΗΣ ΓΡΙΠΠΗΣ: ΤΟ ΑΕΝΑΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ

- Influenza A: Αντιγονική Εκτροπή (Antigenic Shift)

Σημείο Κλειδί: ΑΛΛΑΓΗ ΞΕΝΙΣΤΗ

Generation of a Pandemic Influenza Strain



Source: CDC | Influenza Division, Centers for Disease Control and Prevention. Modified from Emergence of H5N1 influenza virus and control options. (Emerging Infectious Diseases ▪ www.cdc.gov/eid ▪ Vol. 12, No. 1, January 2006)

ΠΑΝΔΗΜΙΑ



Ανασυνδυασμός Γεν. Υλικού «Ανθρώπινου»
Στελέχους με Γεν. Υλικό Στέλεχους από Χοίρο ή
Πτηνό για Δημιουργία ΠΑΝΔΗΜΙΚΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ
(Ο ανασυνδυασμός γίνεται ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ)

ΙΟΣ ΤΗΣ ΓΡΙΠΠΗΣ: ΤΟ ΑΕΝΑΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ

Γνωστές Πανδημίες

Πανδημία	Η/νία	Θάνατοι	Υπεύθυνος Υπότυπος
1889 flu pandemic (Asiatic/Russian Flu)	1889–1890	1 εκατομμύριο	H ₃ N ₂ ή H ₂ N ₂
1918 flu pandemic (Spanish flu)	1918–1920	20-100 εκατομμύρια	H ₁ N ₁
Asian Flu	1957–1958	1-1.5 εκατομμύρια	H ₂ N ₂
Hong Kong Flu	1968–1969	0.75-1 εκατομμύριο	H ₃ N ₂
Russian flu	1977–1978	Άγνωστο	H ₁ N ₁
2009 flu pandemic	2009– 2010	18,000	H ₁ N ₁



1918–1920



1957–1958



1968



2009–2010

ΕΝΑ ΑΛΛΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ: ΕΝΤΕΡΟΪΟΣ D68

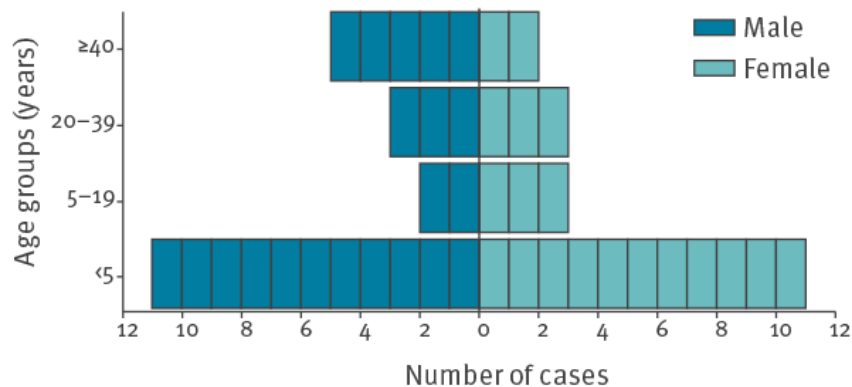
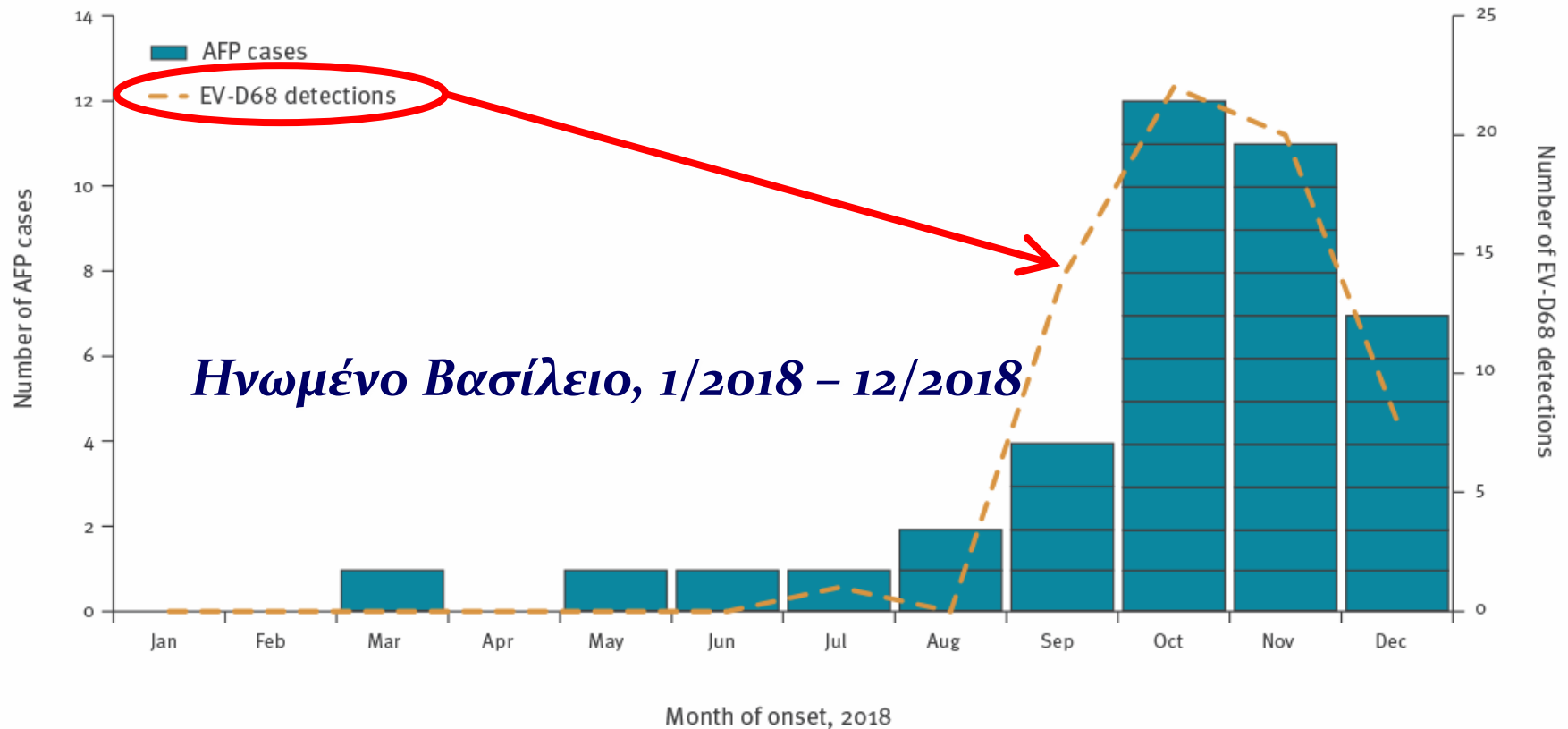
- **Ανακάλυψη:**
 - 1962 (Καλιφόρνια)
- **Κλινικές Εκδηλώσεις - Επιδημιολογία:**
 - Έως 2014: Σποραδικά περιστατικά (699)
 - Αύγουστος 2014: Αυξημένος Αριθμός Κρουσμάτων EV-D68 με Οξεία Λοίμωξη Κατωτέρου Αναπνευστικού αρχικά στις ΗΠΑ
 - Ομάδες κρουσμάτων Οξείας Χαλαρής Παράλυσης κατά τη διάρκεια της επιδημίας: 2 στη Νορβηγία, 1 στη Γαλλία, 25 στις ΗΠΑ (Κολοράντο, Καλιφόρνια)



Μεταλλάξεις στην Ιϊκή Πρωτεΐνη που αναγνωρίζεται από το Ανοσοποιητικό → Διαφυγή από Ανοσοποιητικό → ΕΠΙΒΙΩΣΗ & ΕΠΙΚΡΑΤΗΣΗ Νέων Λοιμογόνων Στελεχών, Επιδημία

**ΙΟΣ ΠΟΥ ΣΥΝΔΥΑΖΕΙ ΤΗΝ ΕΥΚΟΛΙΑ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΤΩΝ ΡΙΝΟΪΩΝ
(Κοινό Κρυολόγημα!) ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΑΘΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ
ΠΟΛΙΟΪΩΝ
ΕΝΑΣ ΠΟΛΙΟΪΟΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ!**

EV-D68: ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΟ ΠΑΘΟΓΟΝΟ



• 40 Περιστατικά Χαλαρής Παράλυσης

(Euro Surveill. 2019;24(6)pii=1900093)

ΙΟΙ: ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ

Οι ιοί είναι παράγωγα των ίδιων των Μηχανισμών της Ζωής!

Ακροβατούν μεταξύ ζωής και ανυπαρξίας



Επηρεάζουν θετικά και αρνητικά τη ζωή μας

Οι αρνητικές τους συνέπειες είναι καταστροφικές για τον πολιτισμό και τις κοινωνίες μας εάν ο άνθρωπος δεν προσέχει και δεν είναι σε επαγρύπνηση

Η κατανόησή τους, η πρόληψη των ασθενειών που προκαλούν και η αντιμετώπισή τους συμβαδίζει με την προστασία του περιβάλλοντος και της ζωής!

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

Ο ΠΟΛΥΔΙΑΣΤΑΤΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΣΘΕΝΗΣ

Κλιν.
Ενδείξεις

Ιστορικό



ΙΑΤΡΟΣ



ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ

Είδος Κλινικού
Δείγματος

Χρόνος Λήψης &
Μεταφορά.
Δείγματος

Είδος Εξέτασης

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**



Ο ΠΟΛΥΔΙΑΣΤΑΤΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

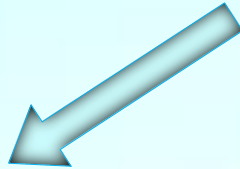


ΑΣΘΕΝΗΣ



ΚΟΙΝΩΝΙΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ



ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ



Βασική Έρευνα Βιολογίας των Ιών

Εμβόλια

Αντιϊκές Ουσίες



Παλαιότερες Μέθοδοι

Ακόμα Χρήσιμες

Όχι για όλους τους Ιούς

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ



Διάγνωση

Ανακάλυψη Νέων Στελεχών ή/και Ιών

Επιδημιολογία

Βασική Έρευνα Βιολογίας των Ιών

Εμβόλια

Αντιϊκές Ουσίες

Ατιολογική Σύνδεση με
Αδιάγνωστες/Χρόνιες Ασθένειες

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ

- *Ενδοκυττάρια Παράσιτα:*
 - Ενοφθαλμισμός Πειραματοζώων.

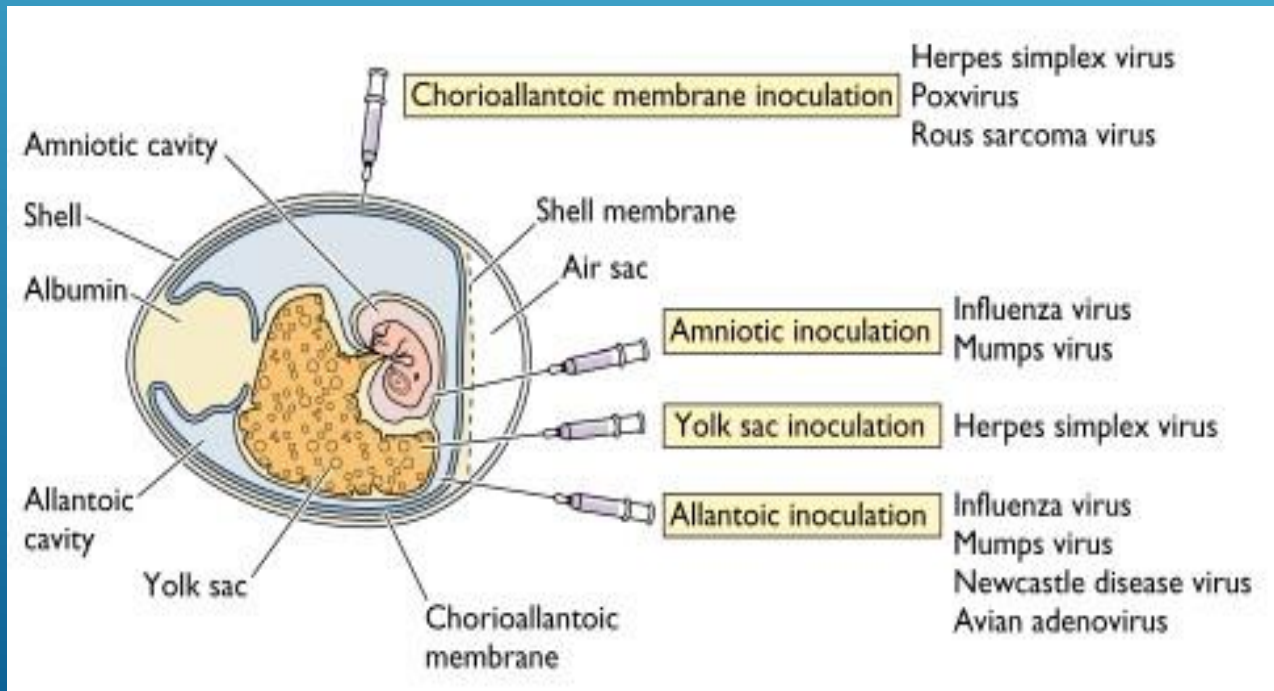


ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ

■ *Ενδοκυττάρια Παράσιτα:*

- Εμβρυοφόρα Αυγά (Ακόμα χρησιμοποιούνται για εμβόλιο κατά γρίπης).



Θάνατος Εμβρύου

Βλάβες στα Εμβρυϊκά
Κύτταρα

Βλάβες στις
Μεμβράνες – Περιοχές
Ενοφθαλμισμού

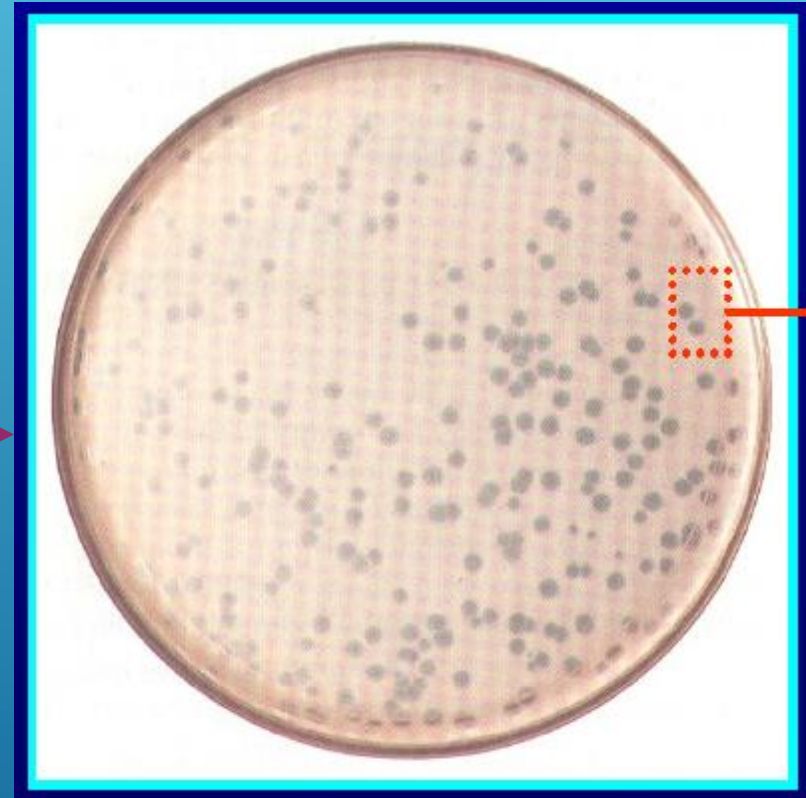
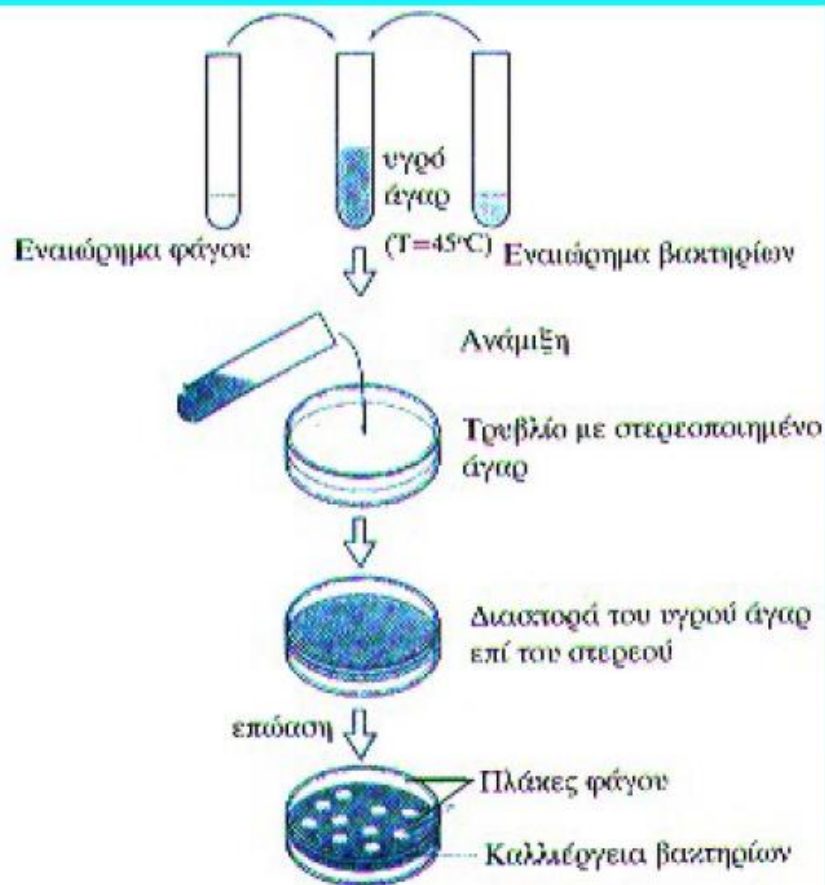
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

■ *Ενδοκυττάρια Παράσιτα:*

• Κυτταροκαλλιέργειες:

- Οι βακτηριοφάγοι σχηματίζουν «πλάκες» σε στρώμα βακτηριακών κυττάρων:

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ



Κάθε Πλάκα → 1 Σωματίδιο Φάγου

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ

■ *Ενδοκυττάρια Παράσιτα:*

- Κυτταροκαλλιέργειες:

- ✓ Πρωταρχικές Κυτταρικές Σειρές → Τεμάχια ιστών, διαρκούν λίγες γενεές.
 - Κατάλληλες για μελέτες παθοφυσιολογίας στον ξενιστή.
- ✓ Διπλοειδικές Κυτταρικές Σειρές → Ανθρώπινα εμβρυϊκά κύτταρα, διαρκούν 100 γενεές, για καλλιέργεια ιών που απαιτούν ανθρώπινα κύτταρα (π.χ. Καλλιέργεια και παραγωγή εμβολίου λύσσας)
- ✓ Συνεχείς Κυτταρικές Σειρές → Καρκινικά κύτταρα, απώλεια ελέγχου πολλαπλασιασμού, διατήρηση επ' αόριστον.
 - Κατάλληλες για διάγνωση.

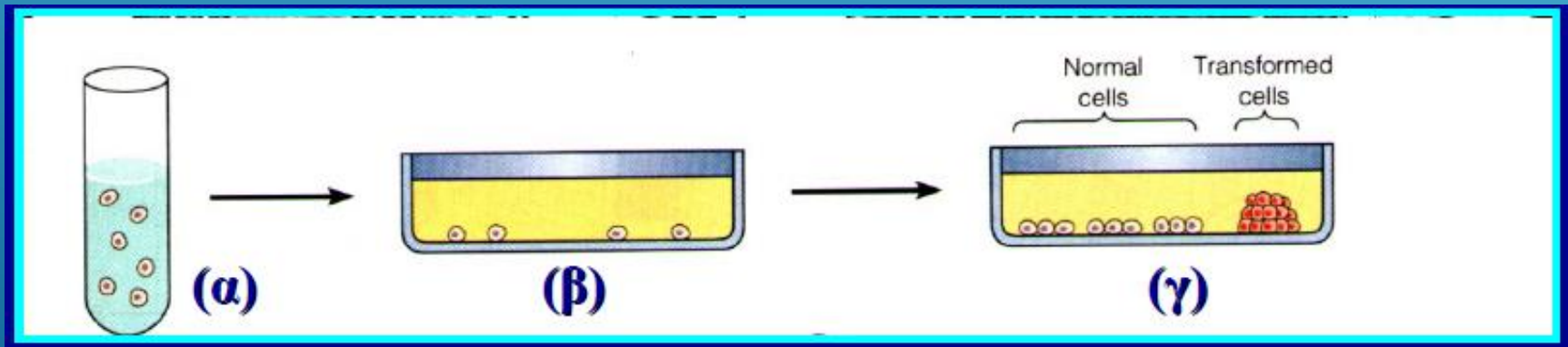
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ

■ *Ενδοκυττάρια Παράσιτα:*

- Κυτταροκαλλιέργειες:

- α) Παραγωγή εναιωρήματος κυττάρων με συγκεκριμένη συγκέντρωση – Επεξεργασία με ειδικά ένζυμα (π.χ. Τρυψίνη)
- β) Εμβολιασμός κυττάρων σε στερεό υπόστρωμα
- γ) Δημιουργία μονοστρωματικής κυτταροκαλλιέργειας.



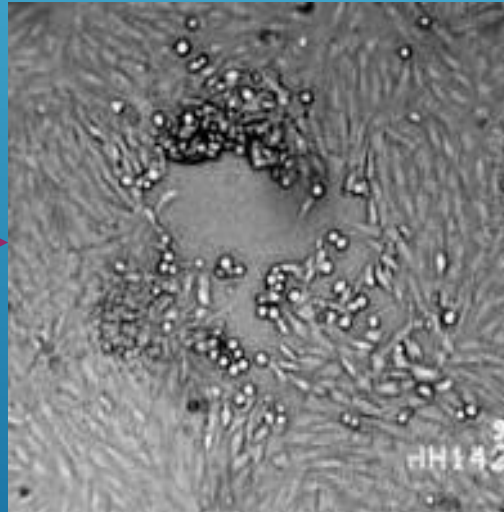
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ

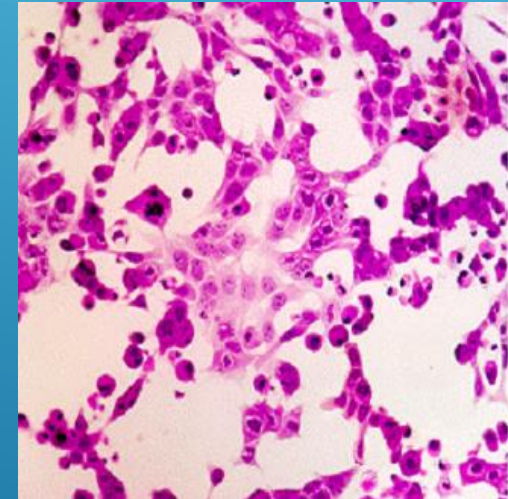
■ *Ενδοκυττάρια Παράσιτα:*

- **Κυτταροκαλλιέργειες:**

Πολλοί ιοί προκαλούν «Κυτταροπαθογόνο Δράση» → μορφολογικές, βιοχημικές αλλοιώσεις κυττάρων που οδηγούν σε αλλαγή σχήματος, αποκόλληση κυττάρων από υπόστρωμα, σύντηξη σε πολυπύρηννα γιγαντιαία κύτταρα, κ.λ.π.



*Κυτταροπαθογόνος
δράση εντεροϊών*



*Κυτταροπαθογόνος
δράση αδενοϊών*

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΕΜΜΕΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

Ορολογικές (IgG-IgM)

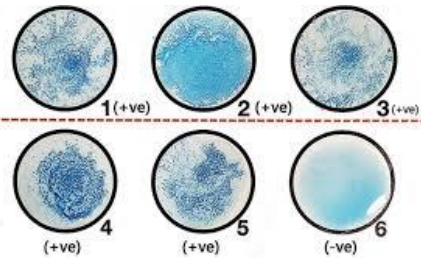
ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ!

«Παράθυρο» & επιμονή IgM μετά οξεία φάση

Μειωμένη Ειδικότητα & Ευαισθησία

Πολλοί Ορότυποι

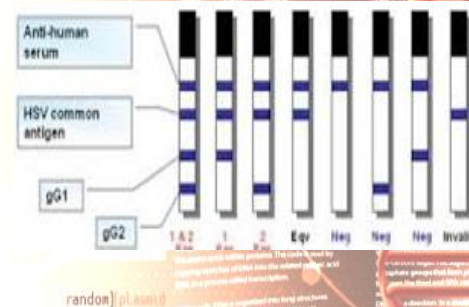
Συνεχώς Νέα Στελέχη, Ορότυποι



Συγκολλητινοαντίδραση



Ανοσοχρωματογραφία



Ανοσοαποτύπωση



Αυτόματη ELISA

Προβληματικές στη Διάγνωση, αλλά

Μερικές Φορές Χρήσιμες

Ταχείες με Υψηλή
Θετική Προγνωστική
Αξία
(π.χ. Ανοσοχρ. Γρίπη)

Ταχείες και Αποτελεσματικές ως
Μέθοδοι Διαλογής σε λίγες περιπτώσεις
(Π.χ. Έλεγχος Ηπατιτιδών - HIV,
TORCH)

Σημαντικό το Ορολογικό Προφίλ
Ασθενή σε συγκεκριμένες
περιπτώσεις (π.χ. HBV Λοίμωξη)

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΕΜΜΕΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

Ορολογική/Ανοσολογική Διάγνωση

Παραδείγματα Προβλημάτων

Ορολογική Διάγνωση
Λοιμώξεων από Εντεροϊούς

>100 Ορότυποι Κυκλοφορούν

«Παράθυρο» & επιμονή IgM μετά οξεία φάση

Αναδυόμενοι Ορότυποι & Στελέχη

Παρωχημένη Εξέταση που Ζητείται Ακόμα από Κλινικές!
Νεότερες Μέθοδοι → Νέα Δεδομένα → Ανάγκη Επικοινωνίας με Κλινική

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΕΜΜΕΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

Ορολογική/Ανοσολογική Διάγνωση

Παραδείγματα Προβλημάτων

Ορολογικό Προφίλ HBV

Παρακολούθηση
Χρόνιων Φορέων

Θεραπεία
Παρακολ. Ιϊκού Φορτίου

Αναζωπύρωση
HBe "Pre-Core" Mutants

Κρυφή
("Occult") HBV Λοίμωξη

Λύση: Μόνο με Νεότερες Μοριακές Μεθόδους Προσδιορισμού Ιϊκού φορτίου

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΕΜΜΕΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

Ορολογική/Ανοσολογική Διάγνωση

Παραδείγματα Προβλημάτων

Ορολογικό Προφίλ
HCV, HIV

Ψευδώς Θετικά?

Ορομετατροπή?

Ασθενώς (+) με
Μέθοδο Διαλογής

Θεραπεία
Παρακολ. Ιϊκού Φορτίου

Επιβεβαίωση με Western Blot

Συχνά Αμφίβολα Αποτελέσματα

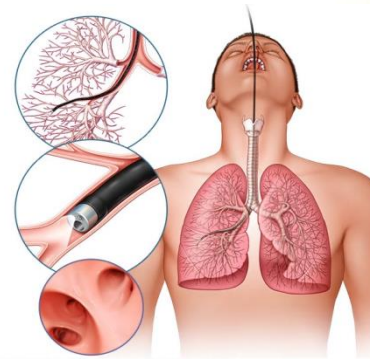
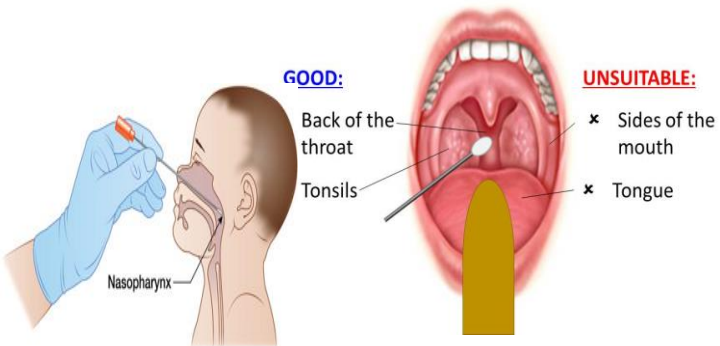
INNO-LIA Patterns							Results
3+	1+	±	47	17	15	TmpA	
■	■	■	■	■	■	■	positive
■	■	■	■	■	■	■	positive
■	■	■	■	■	■	■	positive
■	■	■	■	■	■	■	positive
■	■	■	■	■	■	■	positive
■	■	■	■	■	■	■	positive
■	■	■	■	■	■	■	indeterminate
■	■	■	■	■	■	■	indeterminate
■	■	■	■	■	■	■	negative
■	■	■	■	■	■	■	negative
■	■	■	■	■	■	■	negative

Λύση: Μόνο με Νεότερες Μοριακές Μεθόδους Προσδιορισμού Ιϊκού φορτίου

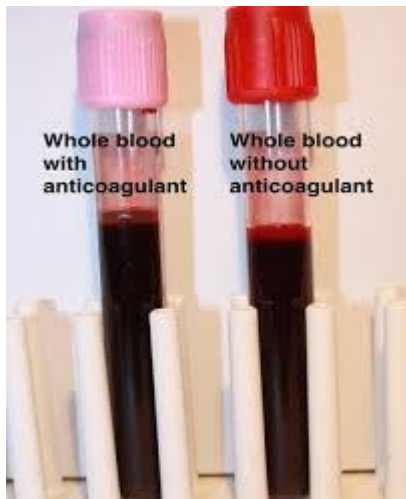
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΑΜΕΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

ΚΛΙΝΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ



Ρινο-/Φαρυγγικό Επίχρισμα



Αίμα (Ολικό, Πλάσμα, Ορός)

Πτύελα, Βρογχικές Εκκρίσεις, BAL



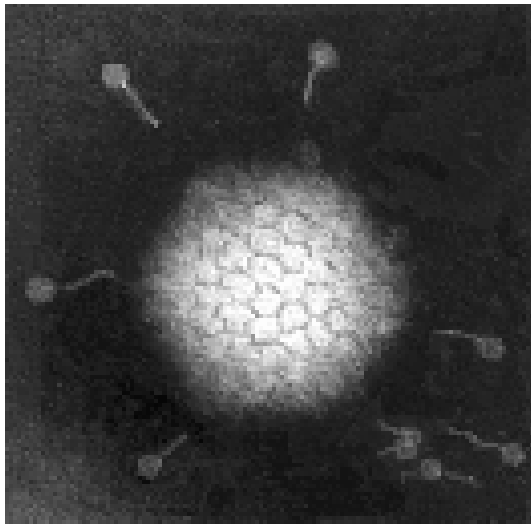
Άλλα Βιολογικά Υγρά και Δείγματα (ΕΝΥ, Ούρα, Κόπρανα, κ.λ.π.)

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

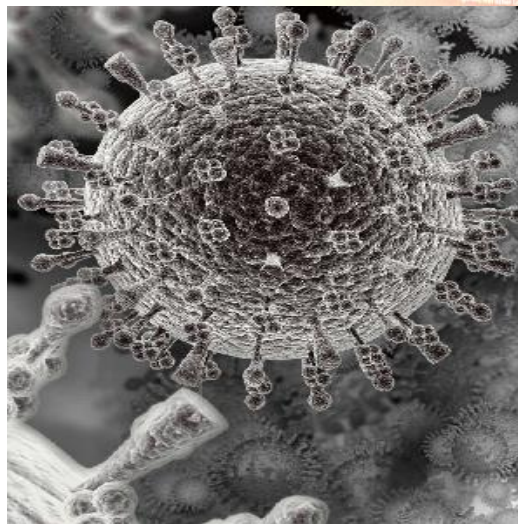
ΑΜΕΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

Ηλεκτρονικό
Μικροσκόπιο

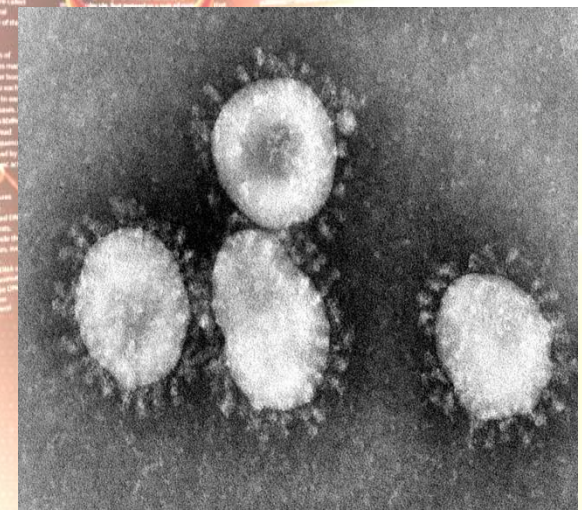
Μορφολογία Ιικών Σωματιδίων
Δύσκολη και Αμφίβολης Ευαισθησίας Τεχνική



Adenovirus



Influenza



Coronavirus

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΑΜΕΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

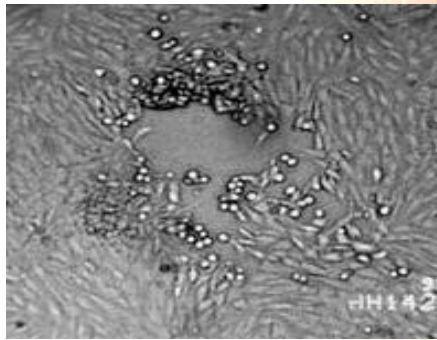
Κυτταροκαλλιέργειες

Μειωμένη Ευαισθησία

Μειωμένη Ειδικότητα

Δυσκολία

Χρονοβόρες (4-14 Ημέρες)



Κυτταροπαθογόνος δράση ιών

Προβληματικές στη Διάγνωση, αλλά

**Ακόμα
Χρήσιμες/Απαραίτητες**

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ

**Πλήρης Μελέτη &
Χαρακτηρισμός
Γικών Σωματιδίων**

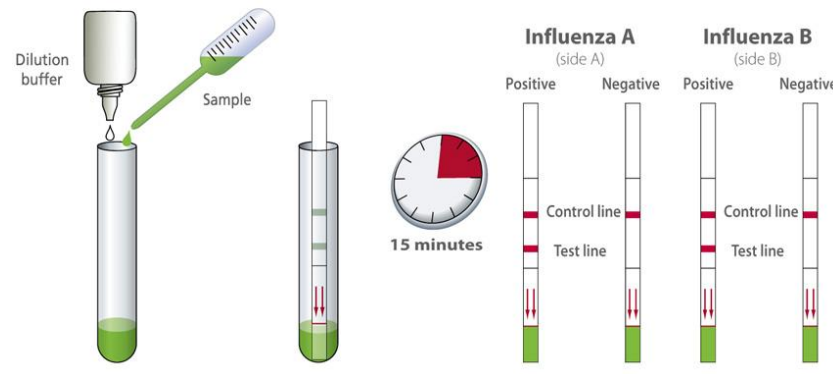
**Τεκμηρίωση & Ολοκλήρωση
Ανακάλυψης Νέων Στελεχών,
Γονοτύπων & Ιών**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΑΜΕΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

Ανοσοχρωματογραφία

Influ A&B Respi-Strip



- **Πλεονεκτήματα:**

→ «Point-of-Care» Εξέταση

→ Ταχεία Μέθοδος (~15min)

- **Μειονεκτήματα:**

→ Ειδικότητα, Θετική Προγνωστική Αξία ↑↑

→ Ευαισθησία, Αρνητική Προγνωστική Αξία ↓↓
(Εξαρτάται από ομάδα ασθενών, είδος δείγματος, επιδημική περίοδο, κ.λ.π.)

→ Δεν εφαρμόζεται σε όλους του ιούς (π.χ. Ρινο-/Εντεροϊοί)

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

Νεότερες Μέθοδοι στη Διαγνωστική Ιολογία

Μοριακές Μέθοδοι

Αυξημένη
Ευαισθησία
Ειδικότητα

Μειωμένος
Χρόνος

Πολυπλεκτική Εφαρμογή
(Ταυτόχρονη Ανίχνευση
Πολλών Διαφορετικών Στόχων)

Πλήρης
Χαρτογρ. Γεν. Υλικού
(π.χ. Λοιμογ. Δυναμικό)

Για Όλα και Νέα
Στελέχη/Ορότυπους

Σωστή Κλινική Απόφαση

Θεραπεία
Καλή Πρόγνωση

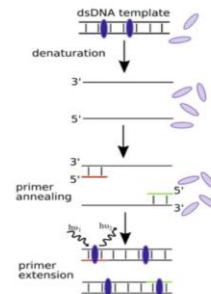
Πρόληψη

Επιδημιολογία

Αποτελούν τη Βάση για τη Σύγχρονη Διάγνωση και Έρευνα στην Ιολογία

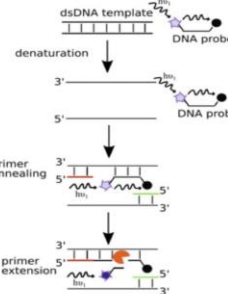


Fluorescent dye-based real-time PCR



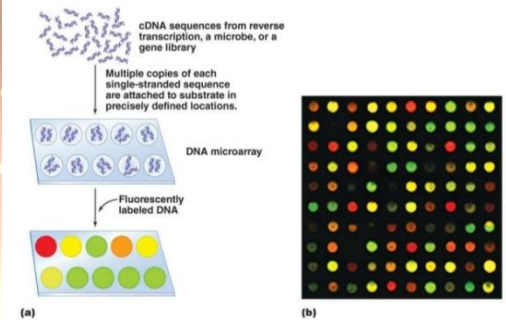
Key:
○ ground state fluorophore
● excited state fluorophore
● fluorescence quencher

DNA probe-based real-time PCR



☆ quenched fluorophore
● excited state fluorophore
● Taq polymerase

Figure 8.8 DNA microarray.



© 2015 Pearson Education, Inc.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

◆ Μοριακές Μέθοδοι:

■ Γενετικός Κώδικας

Καθολικός

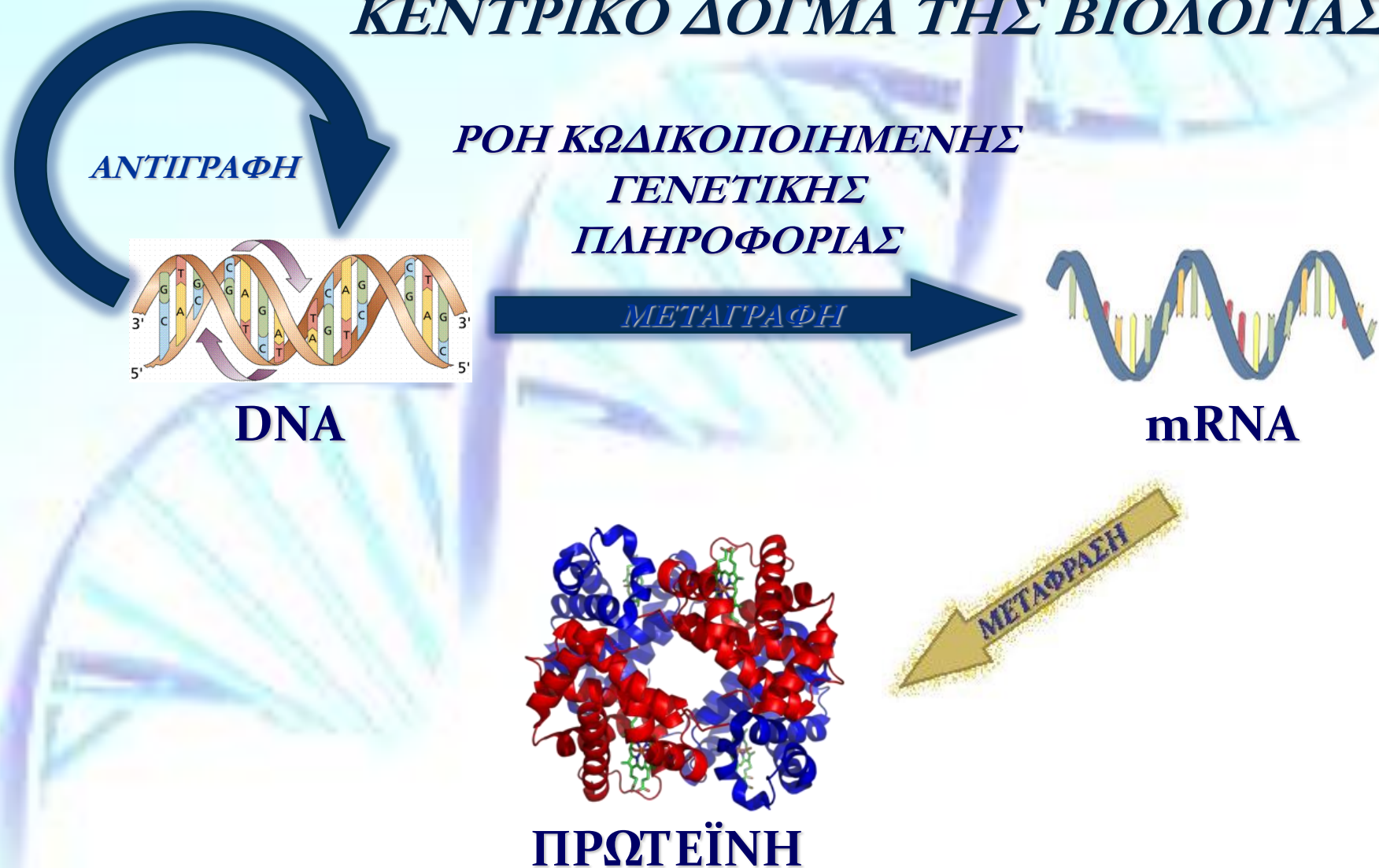
Υποδηλώνει την εξειδικευμένη
σχέση Γονοτύπου – Φαινοτύπου

ΒΑΣΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ
ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΚΩΔΙΚΑΣ: ΘΕΜΕΛΙΟΣ ΛΙΘΟΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΔΟΓΜΑ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΚΩΔΙΚΑΣ: ΘΕΜΕΛΙΟΣ ΛΙΘΟΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

ΙΟΣ

1η Βάση Κωδικονίου

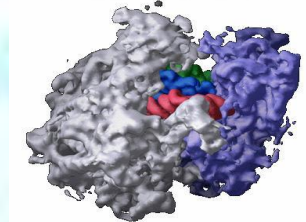
	U	C	A	G	
U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr STOP STOP	Cys Cys STOP Trp	U C A G
C	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G
A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G
G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G

3η Βάση Κωδικονίου

ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΟ

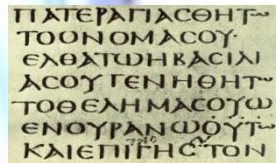


ΠΡΩΤΕΪΝΗ



Α Alpha (ai-fah)	Β Beta (bay-tah)	Γ Gamma (gam-ah)	Δ Delta (dei-ta)	Ε Epsilon (ep-si-lon)	Ζ Zeta (zey-tah)
Η Eta (ay-tah)	Θ Theta (thay-tah)	Ι Iota (eye-o-tah)	Κ Kappa (cap-pah)	Λ Lambda (lamb-dah)	Μ Mu (mew)
Ν Nu (new)	Ξ Xi (xie)	Ο Omicron (om-i-cron)	Π Pi (pie)	Ρ Rho (roh)	Σ Sigma (sig-mah)
Τ Tau (taw)	Υ Upsilon (up-si-lon)	Φ Phi (fie)	Χ Chi (kie)	Ψ Psi (sigh)	Ω Omega (oh-may-gah)

ΠΡΟΤΑΣΗ



ΚΕΦΑΛΑΙΟ



ΒΙΒΛΙΟ

ΑΛΦΑΒΗΤΟ

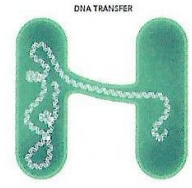
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ

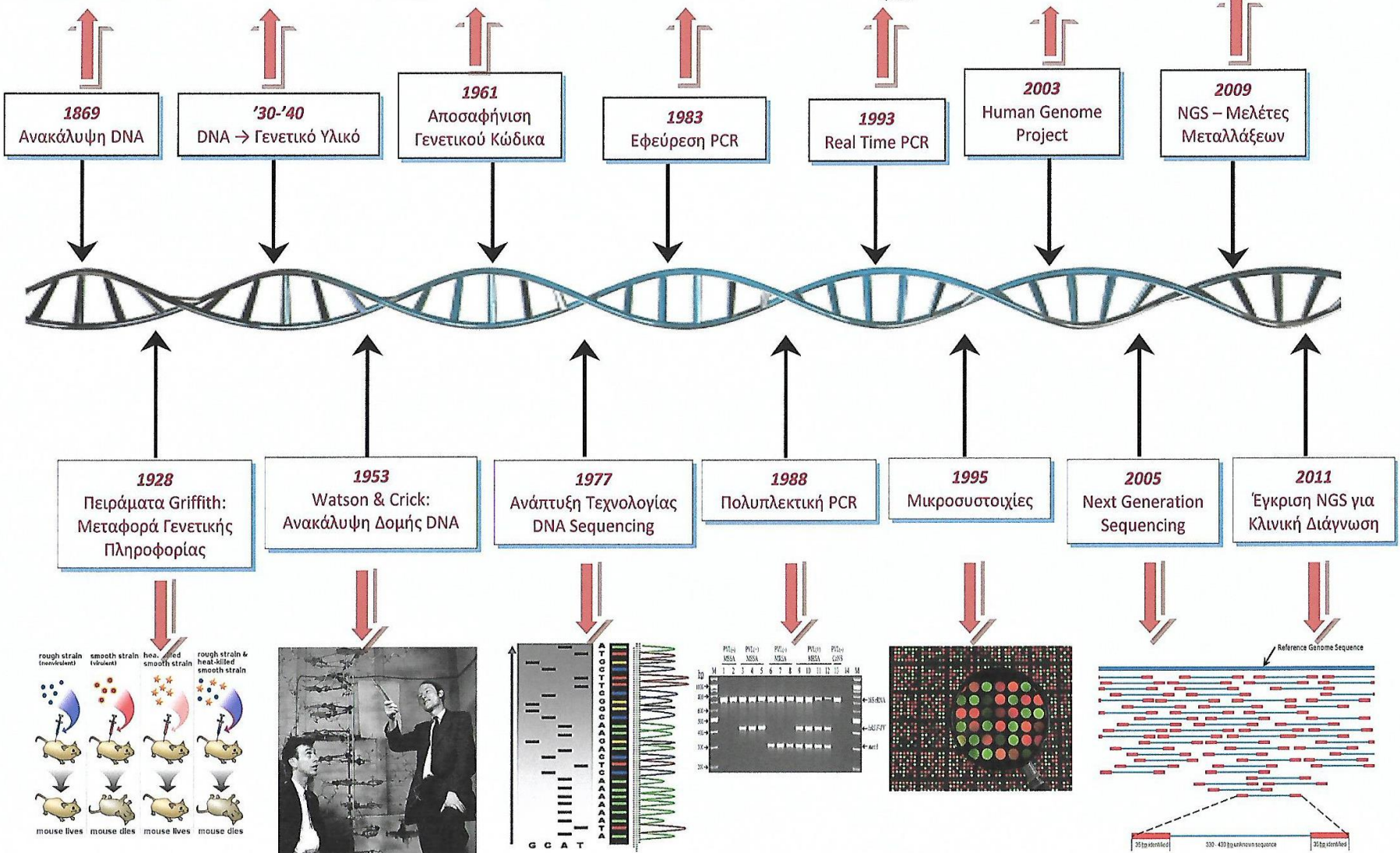
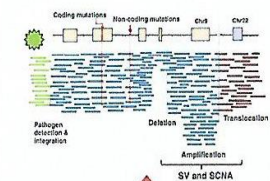
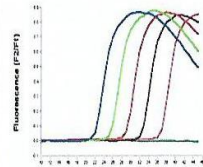
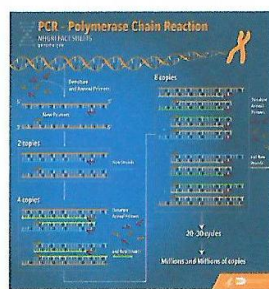
- ◆ Προσπαθούμε να μιμηθούμε “*in vitro*” την αλληλουχία των γεγονότων του κεντρικού δόγματος που οδηγούν από το γενετικό υλικό στη διαφορική έκφραση του φαινοτύπου που αντιστοιχεί στη γονιδιακή του σύσταση για:
 - Διάγνωση των Ιογενών Ασθενειών
 - Επιδημιολογία των Ιών
 - Μελέτη της Βιολογίας των Ιών
 - Χαρτογράφηση των Φαινομένων Γενετικής Ποικιλομορφίας των Ιών
 - Ένδειξη πιθανών Επιδημικών/Πανδημικών φαινομένων
 - Νέο Λοιμογόνο Δυναμικό
 - Μελέτη Εξέλιξης των Ιών
 - Σχεδιασμό Θεραπευτικών Μέσων με βάση το γενετικό υπόβαθρο των ιών που την προκαλούν
 - Γονιδιακή Θεραπεία: Χρήση Ιών ως Φορείς Γονιδίων
 - Παραγωγή Εμβολίων
 - Ανακάλυψη Νέων Ιών και Αναγνώριση Επανεμφανιζομένων
 - ...



Εξέλιξη Μοριακών Τεχνικών



		Second Letter				
		T	C	A	G	
First Letter	T	TTT Phe	TCT Ser	TAT Tyr	TGT Cys	Third Letter
	T	TTC Phe	TCC Ser	TAC Taa	TGA Stop	
	T	TTA Leu	TTG Leu	TAA Stop	TGG Trp	
	T	TTG Leu	TTT Phe	TGA Stop	TTT Phe	
First Letter	C	CTT Leu	CTC Leu	CAT His	CGT Arg	Third Letter
	C	CTC Leu	CTG Leu	CAC His	CGA Arg	
	C	CTA Leu	CTT Leu	CAA Gln	CGG Arg	
	C	CTG Leu	CTC Leu	CAG Gln	CGC Arg	
First Letter	A	ATT Ile	ACT Thr	AAA Lys	AGT Ser	Third Letter
	A	ATC Ile	ACC Thr	AAA Lys	AGA Ser	
	A	ATA Ile	ATG Met	AAA Lys	AGC Ser	
	A	ATG Met	ATC Ile	AAA Lys	AGT Ser	
First Letter	G	GTT Val	GCT Ala	GAT Asp	GGT Gly	Third Letter
	G	GTC Val	GCA Ala	GAT Asp	GGC Gly	
	G	GTA Val	GCG Ala	GAT Asp	GGT Gly	
	G	GTC Val	GCT Ala	GAT Asp	GGC Gly	

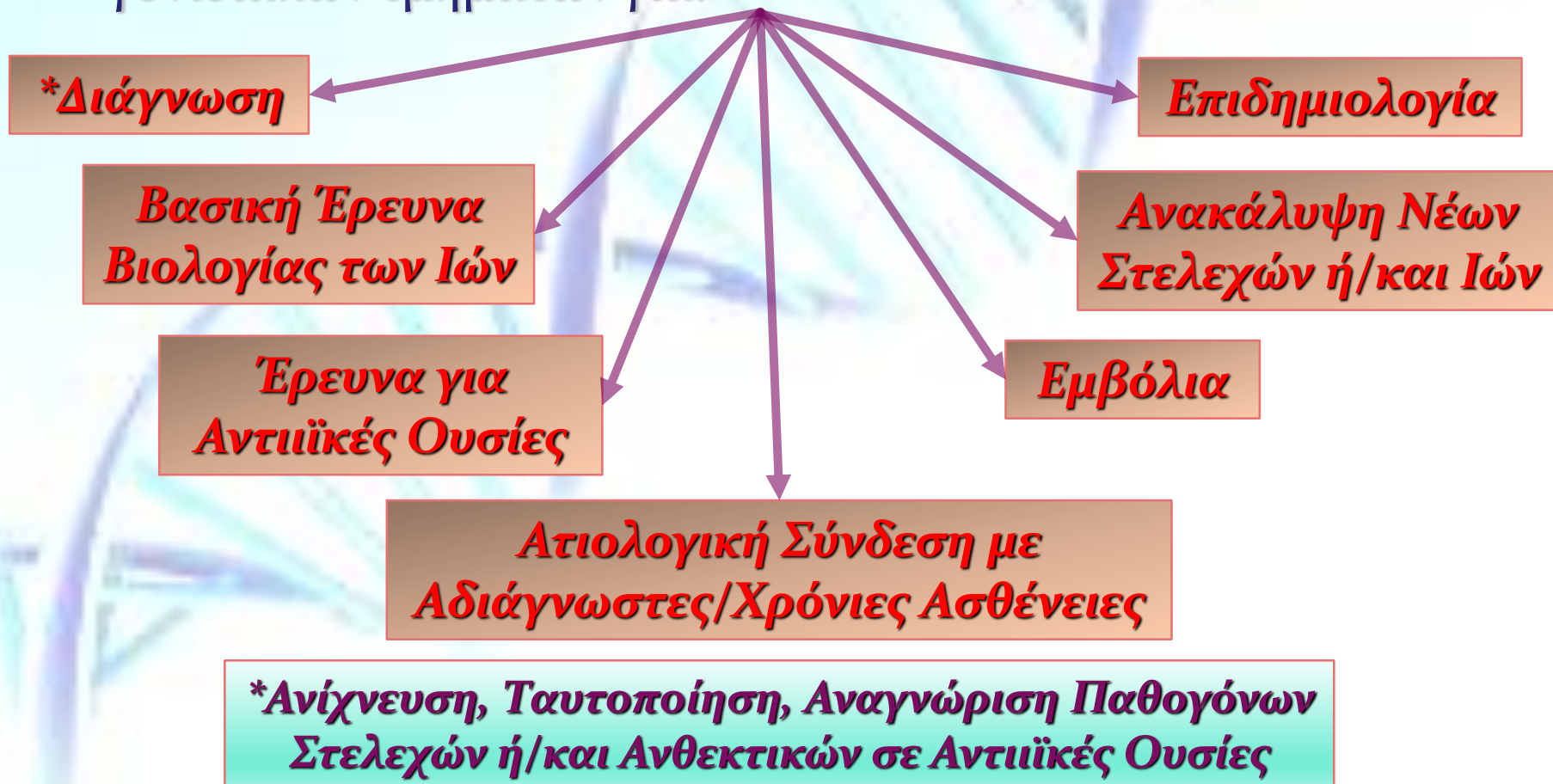


ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Η ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΗ ΒΑΣΗ ΤΩΝ ΠΕΡΙΣΣΟΤΕΡΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ

◆ *In vitro* κλωνοποίηση τμημάτων γενετικού υλικού για:

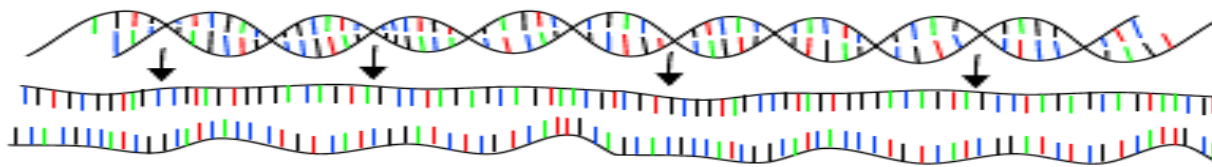
- Ειδική ανίχνευση και ποσοτική ενίσχυση γονιδίων, ή γονιδιακών τμημάτων για:



ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

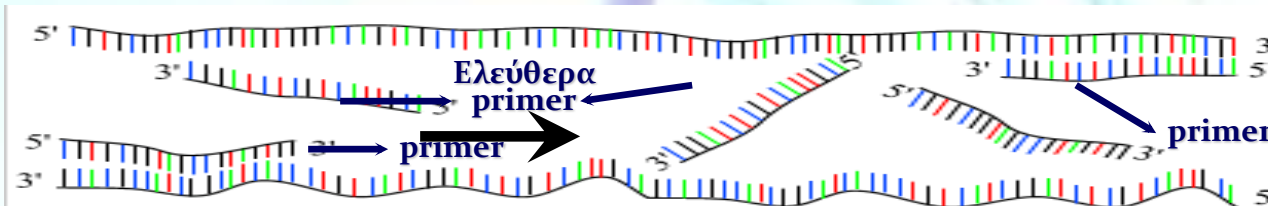
◆ Διαφορετικά Στάδια Μεθόδου:

1. Στάδιο Μετουσίωσης (Denaturation): Μετουσίωση DNA-στόχου (μετατροπή δικλώνου DNA σε μονόκλωνο)



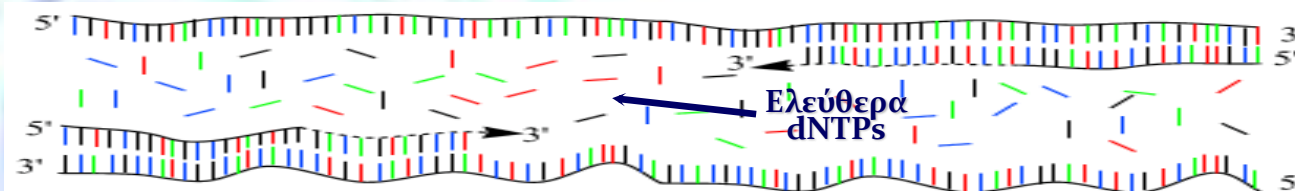
92-95°C για ~30sec

2. Στάδιο Υβριδισμού (Annealing): Υβριδισμός των εκκινητικών μορίων στους αντίστοιχους κλώνους του DNA-στόχου



Τα=45-65°C, αναλόγως περιεκτικότητας των primer σε G/C), για 30sec-2min

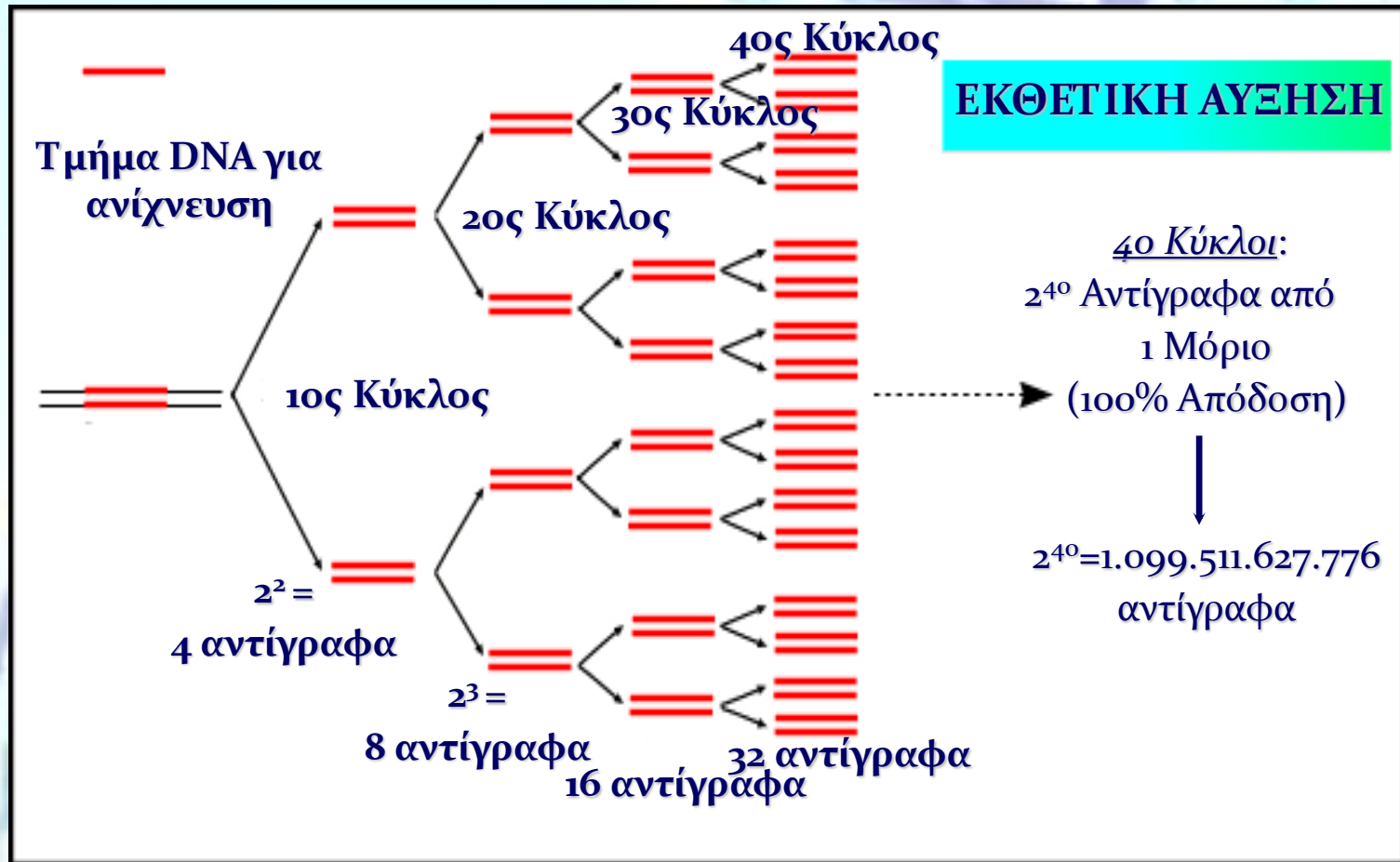
3. Στάδιο Επέκτασης Εκκινητικών Μορίων (Extension): Δημιουργία θυγατρικού κλώνου



72°C (θερμοκρασία βέλτιστης απόδοσης θερμοάντοχης DNA πολυμεράσης) για 30sec-2min

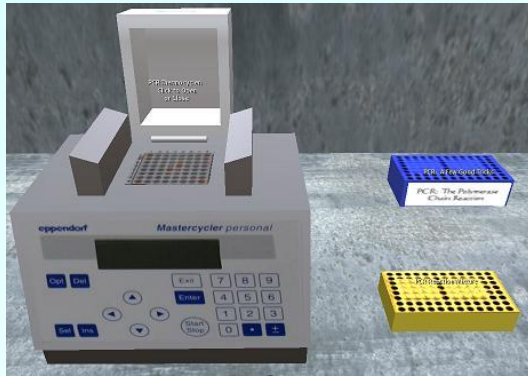
ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

- ◆ 3 στάδια x 30-45 κύκλους
- ◆ Γεωμετρική πρόοδος αύξησης (Ημισυντηρητικός Πολλαπλασιασμός DNA):
 2^{ν} τελικός αριθμός αντιγράφων ($\nu = \text{Αριθμός Κύκλων}$)



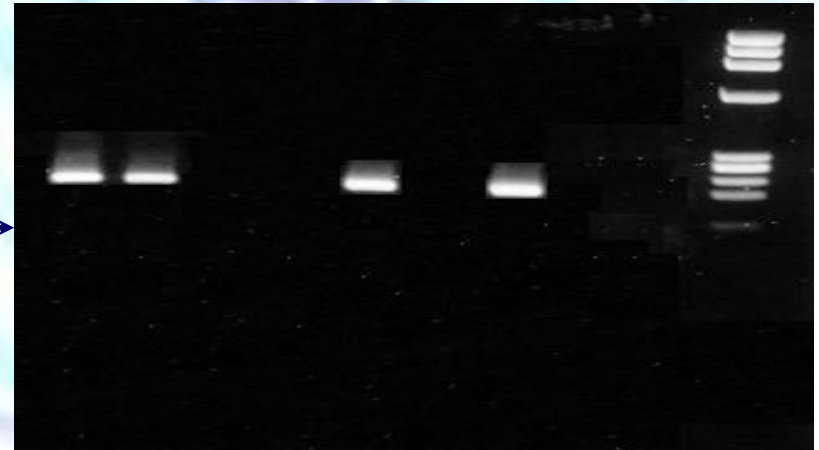
ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

♦ Ανίχνευση Αποτελεσμάτων (Συμβατική PCR):



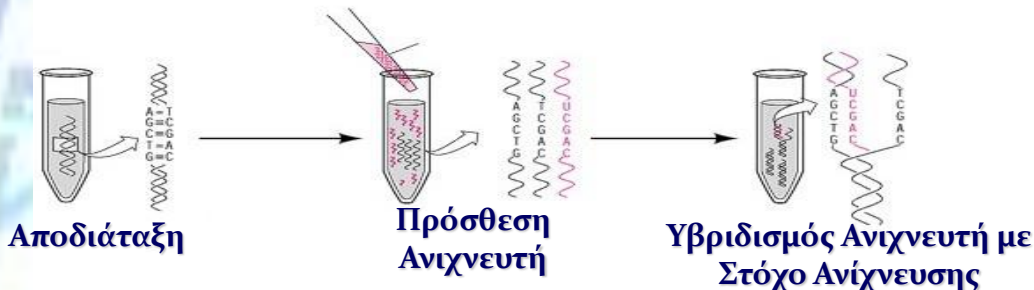
Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9



Αποτελέσματα PCR για την ανίχνευση του ιού Epstein-Barr (EBV) σε δείγματα ENY ασθενών με AIDS. M: Μάρτυρας Μοριακού Βάρους. Στήλες 1-9: Δείγματα Ασθενών

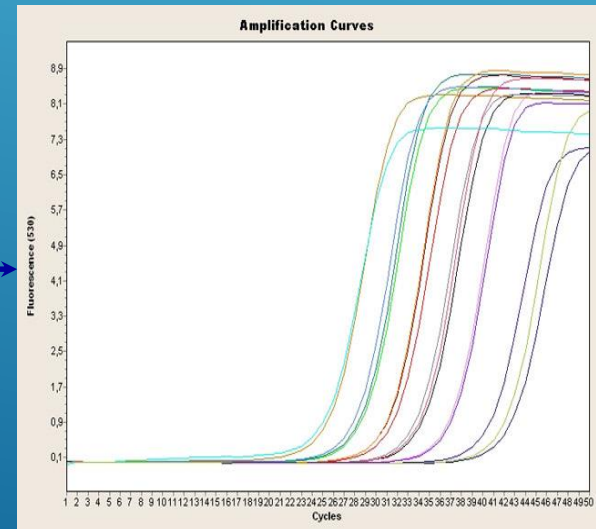
Υβριδισμός



ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

◆ PCR Πραγματικού Χρόνου (Real Time PCR):

- Ανίχνευση ή/και Ποσοτικοποίηση Φθορισμού κατά τη διάρκεια και όχι στο τέλος (Συμβατική PCR) της αντίδρασης
- **Φθορίζοντες Ιχνηθέτες** → Ειδικός Υβριδισμός με παραγόμενο προϊόν → Παραγόμενος φθορισμός ανάλογος πληθυσμού παραγομένων αλληλουχιών:



ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

◆ PCR Πραγματικού Χρόνου (Real Time PCR):

- Τέσσερις Βασικές Τεχνολογίες Ανίχνευσης:

ΜΗ ΕΙΔΙΚΗ

- ο **SYBR Green 1**: ds-DNA intercalating/minor-groove binding dye
 - ✓ Δεσμεύεται σε ds-DNA
 - ✓ Μόνο R&D

ΕΙΔΙΚΕΣ (ΒΑΣΙΖΟΝΤΑΙ ΣΤΟΝ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟ ΙΧΝΗΘΕΤΩΝ – PROBES)

- ο **Ιχνηθέτες TaqMan**
 - ✓ Εύκολοι στο σχεδιασμό
- ο **Γειτνιάζοντες Ιχνηθέτες**
 - ✓ Καμπύλες Τήξης (Melting Curves) (↑ Δυνατότητα Γονοτ. Ταυτοποίησης)
- ο **Molecular Beacons**
 - ✓ Πλεονεκτήματα Ιχνηθετών
 - ✓ Πολύπλοκος σχεδιασμός

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

◆ Πλεονεκτήματα Real-Time PCR έναντι Συμβατικής PCR:

- Δεν επηρεάζεται από μη-ειδικά προϊόντα
- Η παραγωγή των προϊόντων παρακολουθείται συνεχώς σε κάθε κύκλο και όχι μόνο στο τέλος
- Καμμία επεξεργασία μετά το τέλος της αντίδρασης (↓ χρόνος, ↑ ευκολία, ↓ επιμολύνσεις)
- Συντομότεροι κύκλοι (30 min – 2 ώρες)
- Μεγάλο εύρος ποσοτικοποίησης
- Ακόμα μεγαλύτερη ειδικότητα, ευαισθησία & επαναληψιμότητα

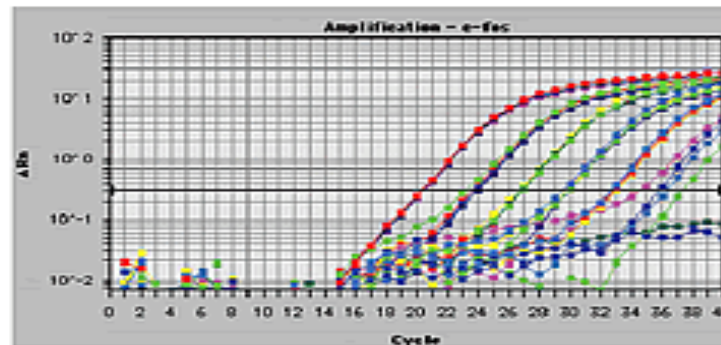
ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

◆ Ποσοτική PCR:

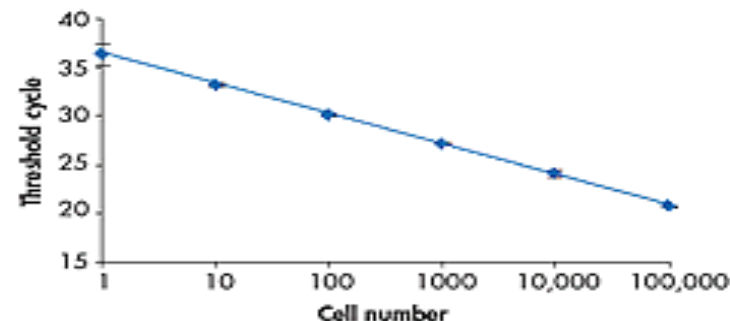
- Συμβατική PCR: Μόνο ανίχνευση με υβριδισμό
- Real - Time PCR

Ανίχνευση Φθορισμού:
Δυνατότητα Αντικειμενικού
Προτύπου Ποσοτικοποίησης
με Βαθμονομημένο Πρότυπο

A



B



ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

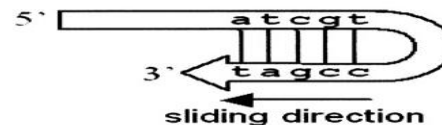
◆ Βελτιστοποίηση Ευαισθησίας/Ειδικότητας:

- Ειδική σύνδεση εκκινητών/ιχνηθετών, εξαρτώμενη από:
 - ο Σωστό σχεδιασμό εκκινητών για:
 - ✓ αποφυγή υβριδισμού μεταξύ των 2 (A) ή ενδογενούς υβριδισμού (hairpin loop) (B)

A Primer-to-primer annealing



B Hairpin structure



- ✓ ανίχνευση όλων των πιθανών στελεχών εντός μίας ταξινομικής ομάδας – γένους ή είδους (ειδικός υβριδισμός σε εξαιρετικά συντηρημένες φυλογενετικά περιοχές)
- ο **Ta** (Θερμοκρασία Υβριδισμού Εκκινητών)
- ο Συγκέντρωση (10-100pmol/ δείγμα)

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

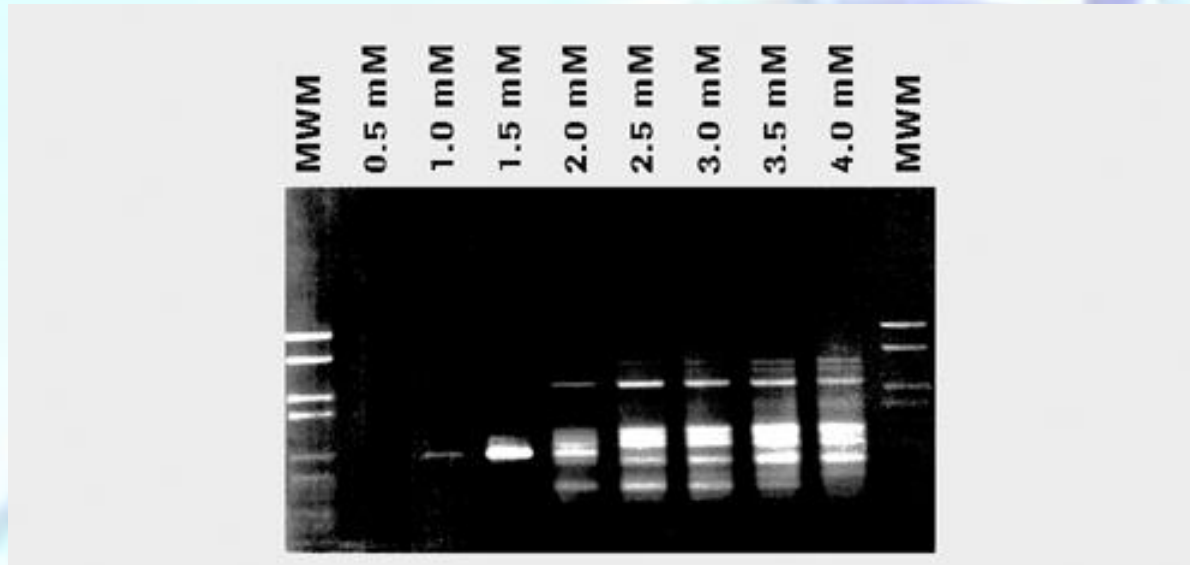
◆ Βελτιστοποίηση Ευαισθησίας/Ειδικότητας:

- Συγκέντρωση ιόντων Mg^{2+} (1.5-2.5mM)
 - Αριθμός κύκλων (25-50) (Κλειστό, «πεπερασμένο» σύστημα η κάθε αντίδραση)
 - Συγκέντρωση θερμοάντοχου ενζύμου Taq πολυμεράση (1.5-3u ανά δείγμα)
 - Συγκέντρωση DNA-στόχου
 - Καταπολέμηση Αναστολέων
- } Αποτελεσματική Μέθοδος Εκχύλισης
-
- **Κεντρική Ιδέα:** Δημιουργία Συνθηκών για Φυσική Επιλογή (Επιβίωση του Καλύτερου, δηλ. του ειδικού προϊόντος που αντιστοιχεί στο γονίδιο, ή παθογόνο μικροοργανισμό που θέλουμε να ανιχνεύσουμε) ΚΑΙ στο δοκιμαστικό σωλήνα

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

◆ Βελτιστοποίηση Ευαισθησίας/Ειδικότητας:

- Παράδειγμα: Συγκέντρωση ιόντων Mg^{2+} (1.5-2.5mM)

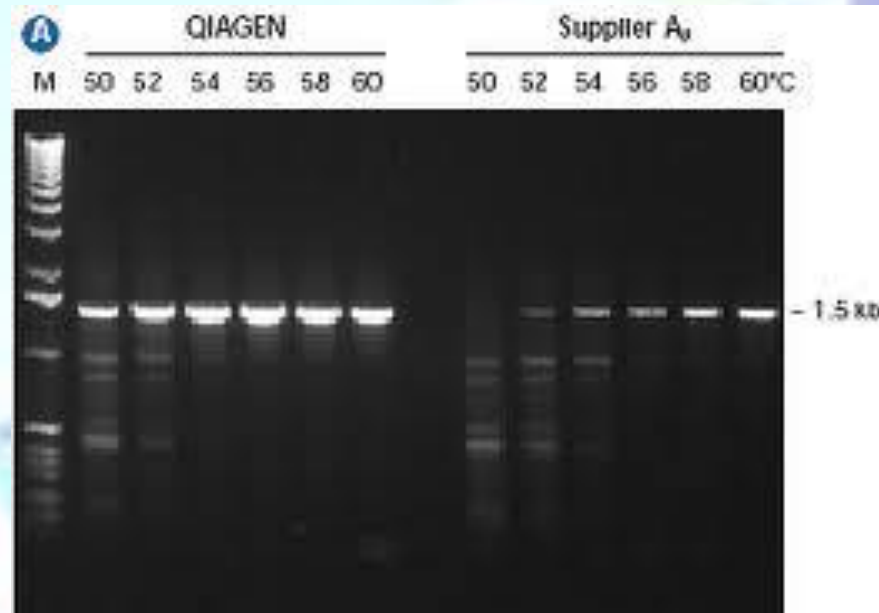


Συγκέντρωση αρκετά χαμηλή για να μην υπάρχουν
μη ειδικά προϊόντα, αρκετά υψηλή για τη δράση της
θερμοάντοχης Taq DNA Πολυμεράσης

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

◆ Βελτιστοποίηση Ευαισθησίας/Ειδικότητας:

- Παράδειγμα: Θερμοκρασία υβριδισμού εκκινητών



Τα αρκετά υψηλή για να μην υπάρχουν μη ειδικά προϊόντα (ύστερα από ατελή υβριδισμό), αρκετά χαμηλή για να υπάρχει ειδικός υβριδισμός

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

◆ Πλεονεκτήματα:

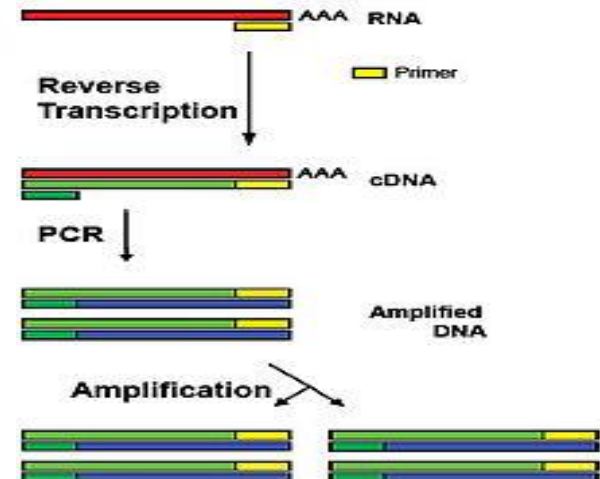
- Ταχύτητα, Ευαισθησία, ειδικότητα
- Ανίχνευση μεταλλάξεων που σχετίζονται με ασθένειες
- Ανίχνευση μικροοργανισμών → Χρόνιες Λοιμώξεις
- Ανίχνευση μικροβιακού γενετικού υλικού χαμηλού τίτλου → πολύπλοκα κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα (π.χ. μυοκαρδιακός ιστός, δείγματα ιστού μονιμοποιημένα με φορμαλίνη και παραφίνη, E.N.Y. κ.λ.π.)
- Ανίχνευση μη-κυτταροπαθογόνων ιών, ή άλλων σπανίων μικροοργανισμών που αναπτύσσονται δύσκολα σε καλλιέργειες
- Βάση → εφαρμογή μοριακών τεχνικών για την περαιτέρω ταχεία και αξιόπιστη ταυτοποίηση των μικροοργανισμών
- Βάση → διεξαγωγή σημαντικών ερευνών σχετικά με το γενετικό υλικό και τις αλλοιώσεις του που οδηγούν σε ασθένειες (π.χ. καρκίνος)
- Βάση → διεξαγωγή σημαντικών ερευνών σχετικά με το γενετικό υλικό και τα βιολογικά χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών που ρυθμίζονται γονοτυπικά (τροπισμός, παθογένεια, επιδημιολογία, κ.λ.π.)

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

◆ Αντίστροφη Μεταγραφή (Reverse Transcription) PCR (RT-PCR):

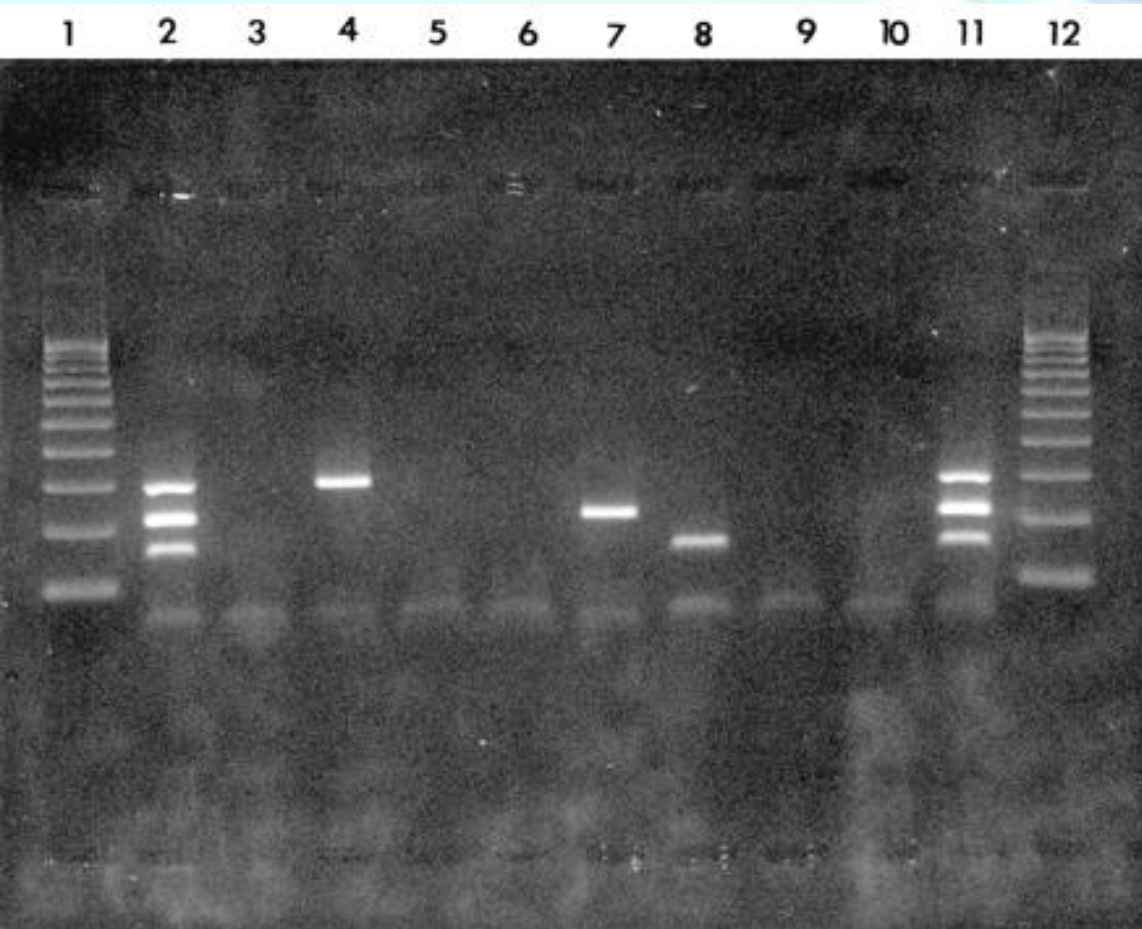
- Ανίχνευση RNA- και όχι DNA-στόχου
- Προηγείται το στάδιο της **Αντίστροφης Μεταγραφής** για μετατροπή του RNA σε DNA (complementary – cDNA) για την επακόλουθη εφαρμογή της PCR
- Ανίχνευση ιών με γενετικό υλικό RNA (π.χ. picorna ιοί, ιοί influenza, κ.λ.π.), ανίχνευση mRNA βακτηρίων, κ.λ.π.
- Ανίχνευση mRNA (γονιδιακής έκφρασης)

*Αντίστροφη Μεταγραφή
(Reverse Transcriptase):
Ένζυμο Κλειδί*



ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

◆ Πολυπλεκτική (Multiplex) PCR: Ταυτόχρονη ανίχνευση περισσοτέρων του ενός DNA-στόχων με την αντίστοιχη χρησιμοποίηση περισσοτέρων του ενός ζεύγους primer:



Multiplex-PCR για ανίχνευση HSV-1, VZV και EV σε δείγματα ΕΝΥ.

Στήλες 1 και 12: Μάρτυρας MB.

Στήλες 2 και 11: HSV-1, VZV και EV.

Στήλες 3, 5, 6, 9 και 10: Αρνητικά.

Στήλες 4, 7, 8: HSV-1 (στήλη 4), VZV (στήλη 7), και εντεροϊό (στήλη 8).

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

◆ Επανεντοπισμένη (Nested) PCR:

- *Ευαισθησία & Ειδικότητα* απλής PCR ↑↑ (ανίχνευση μικροβιακού γενετικού υλικού σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα που χαρακτηρίζονται από χαμηλό τίτλο π.χ. ΕΝΥ, περικαρδιακό υγρό, δείγματα λυμάτων, κ.λ.π.).
- Εκτελείται πρώτα μία απλή PCR με ένα συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητικών μορίων.
- Στη συνέχεια, μικρή ποσότητα του προϊόντος της πρώτης PCR χρησιμοποιείται για μία 2η PCR, κατά την οποία χρησιμοποιείται ένα δεύτερο ζεύγος εκκινητικών μορίων που η αλληλουχία τους είναι συμπληρωματική προς αντίστοιχες αλληλουχίες **εσωτερικά** του τμήματος DNA που πολλαπλασιάσθηκε με την πρώτη PCR:

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

◆ Επανεντοπισμένη (Nested) PCR:

NESTED PRIMER PCR:

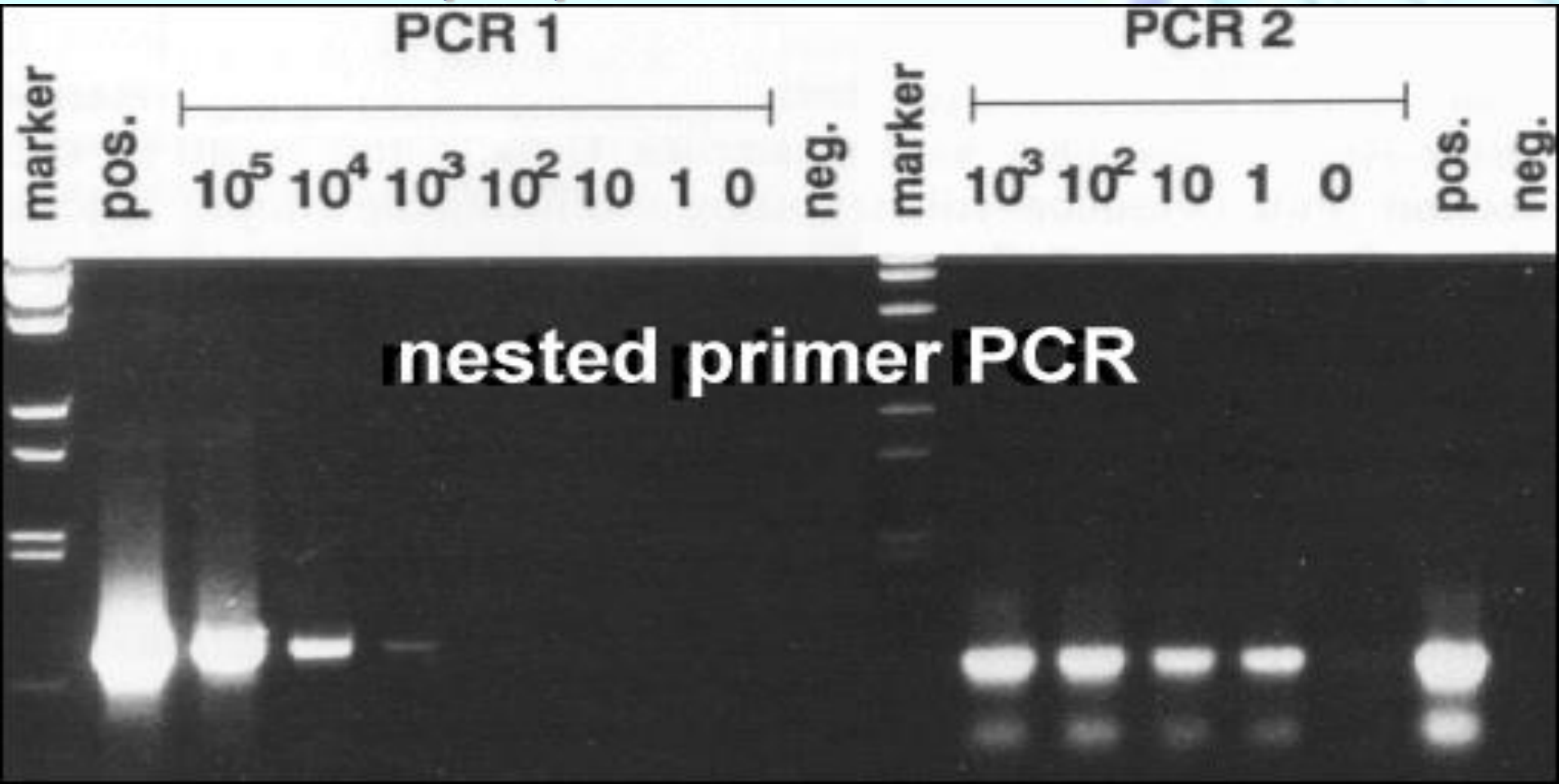


1F και 1R: Ζεύγος Εκκινητικών Μορίων 1ης PCR

2F και 2R: Ζεύγος Εκκινητικών Μορίων 2ης PCR

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

◆ Επανεντοπισμένη (Nested) PCR:



Αυξημένη ευαισθησία της Nested PCR στην ανίχνευση διαφορετικών αραιώσεων DNA του *Chicken anaemia virus* (CAV). Η πρώτη PCR₁ ανιχνεύει έως και 10³ μόρια DNA-στόχου, ενώ η δεύτερη PCR ανιχνεύει έως και 1 μόριο DNA.

ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΗΝ PCR:

ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ (SEQUENCING) ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

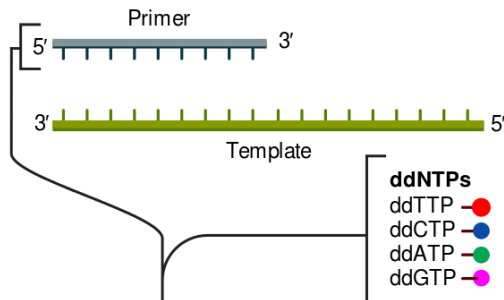
- ◆ Υπέρτατος βαθμός ανάλυσης γενετικού υλικού, χαρτογράφησης γονιδίων, ταυτοποίησης – τυποποίησης (Θυμ. *ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΚΩΔΙΚΑΣ*)

SEQUENCING

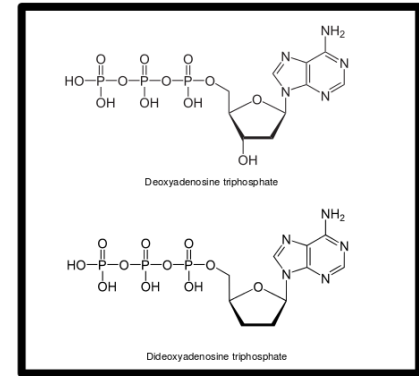
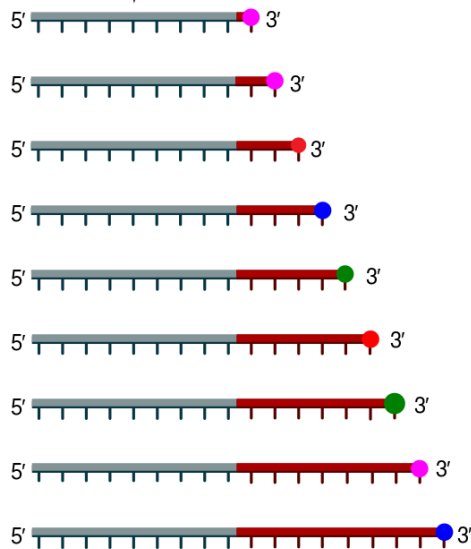
Πρωτότυπη Μέθοδος "Sanger"

① Μείγμα Αντίδρασης

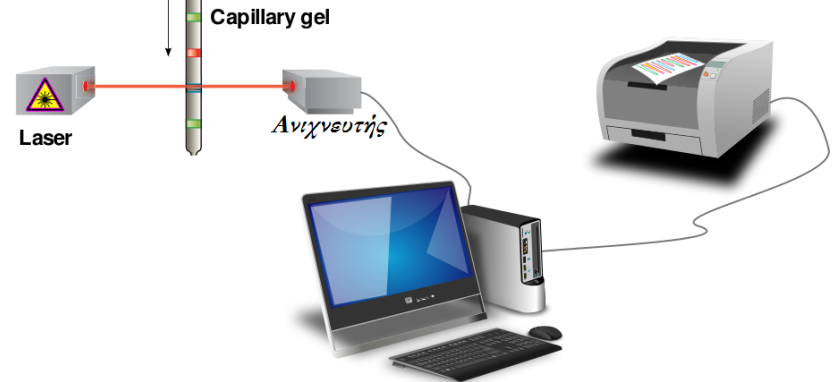
- ▶ Εκκινητές και DNA
- ▶ ddNTPs με φθορίζουσες χρωστικές
- ▶ DNA πολυμεράση
- ▶ dNTPs



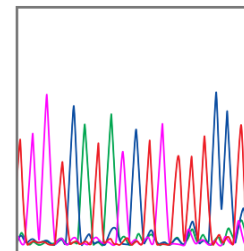
② Δημιουργία Αντιγράφου και Τεματισμός Επιμήκυνσης Συμπληρωματικού κλώνου



③ Ηλεκτροφόρηση σε Τριχοειδή Διαχωρισμός των Παράχθέντων Τμημάτων DNA ανάλογα με το μήκος τους



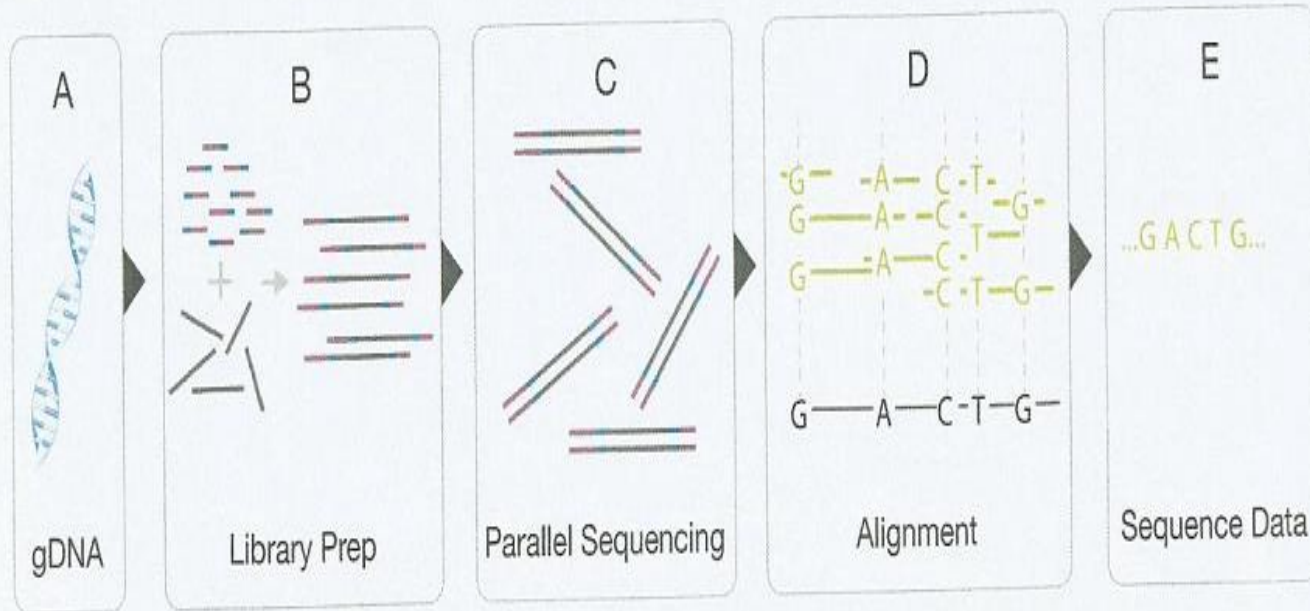
④ Ανίχνευση των φθορίζουσών χρωστικών με laser και προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με κατάλληλο λογισμικό



Χρωματόγραμμα

SEQUENCING

Πιο Σύγχρονες Μέθοδοι – Next Generation Sequencing



Illumina

- A. *Εκχυλισμένο Γενομικό DNA*
- B. *Η προετοιμασία του δείγματος προκαλεί τη θραύση του γενομικού DNA και προσθέτει τους "προσαρμογείς" για τη δημιουργία μίας βιβλιοθήκης*
- C. *Κάθε θραύσμα DNA εντός κάθε βιβλιοθήκης αλληλουχείται παράλληλα με τα υπόλοιπα*
- D. *Οι αλληλουχίες από όλα τα θραύσματα συναρμολογούνται με βάση μία γενομική αλληλουχία αναφοράς*
- E. *Η αλληλουχία ολοκληρω του γονιδιώματος παράγεται από την κοινή αλληλουχία που προέρχεται από την πολλαπλή στοίχιση των αλληλουχιών των θραυσμάτων*

**Adapters: Ολιγονουκλεοτίδια συγκεκριμένης αλληλουχίας στα οποία ενώνονται τα θραύσματα του γενομικού DNA και προσδένονται, στη συνέχεια, σε αυτά οι εκκινητές για την αντίδραση της αλληλούχησης*

SEQUENCING

Πιο Σύγχρονες Μέθοδοι – Next Generation Sequencing

Σύγκριση Παραδοσιακής “Sanger” Αλληλούχησης με NGS

Table 1: Illumina NGS and CE-Based Sanger Sequencing for Small Genomes

Parameter	MiSeq System	Sanger Sequencing
Strains to be sequenced	4*	4
Genome size	3 Mb	3 Mb
Time for sample prep	1.5 hours	weeks
Sequencing time	2 days	243 days**
Price per genome†	\$249 USD	\$84,000 USD
Project price†	< \$995 USD	> \$336,000 USD
Coverage depth per genome	> 583 x	7 x
On instrument data analysis?	Yes	No

* Can sequence up to 75 strains per run at 30x coverage

**Assumes single 3730xl instrument running 24 hr/day

† Excluding sample prep

SEQUENCING

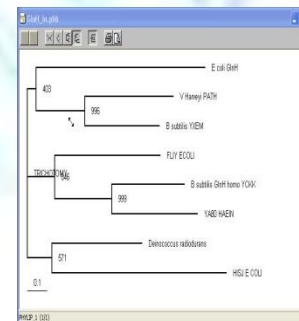
◆ Ακολουθεί η περαιτέρω ανάλυση του Γεν. Υλικού με:

■ Βιοπληροφορική

ClustalW

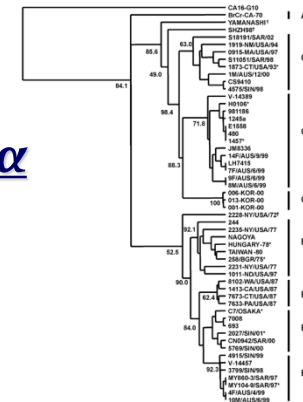
Πολλαπλή στοίχιση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

CLUSTAL W (1.74) multiple sequence alignment

[illegible]

TreeView

Κατασκευή Φυλογενετικών Δέντρων

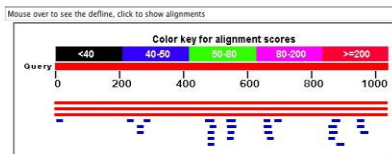


Δενδρόγραμμα

Ταυτοποίηση Ιών

Ταξινομήση Ιών

Distribution of 30 Blast Hits on the Query Sequence



Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E value
gi 677853 emb X84705.1 SCDNACV1	1974	0.0
gi 3227818 emb Z76297.1 SCVLG175C	1974	0.0
gi 2216103 gb U04447.4 U04447.4	1974	0.0
gi 18173517 emb X81025.3 	1974	0.0
gi 33647393 gb AF147428.1	46.1	0.21
gi 346397106 gb AC19476.4	46.1	0.21

Λογισμικό BLAST

Σύγκριση με Γονιδιακές Αλληλουχίες Κατατεθειμένες σε Αποθήκες Δεδομένων Αναφοράς

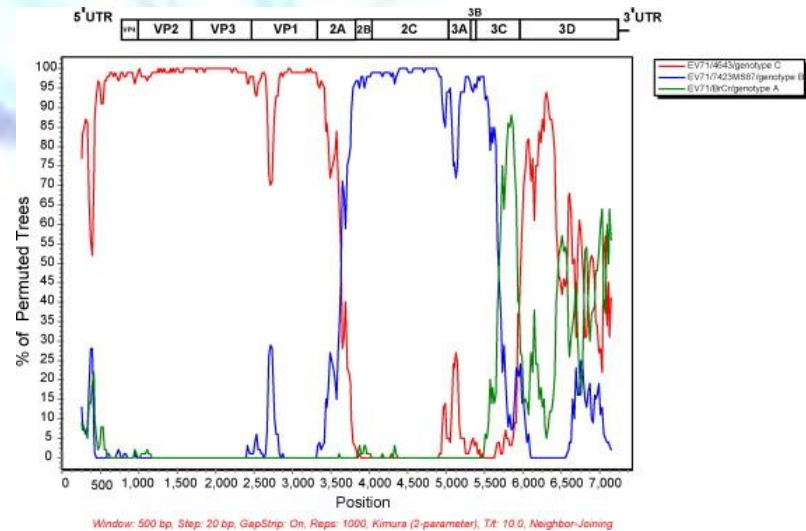
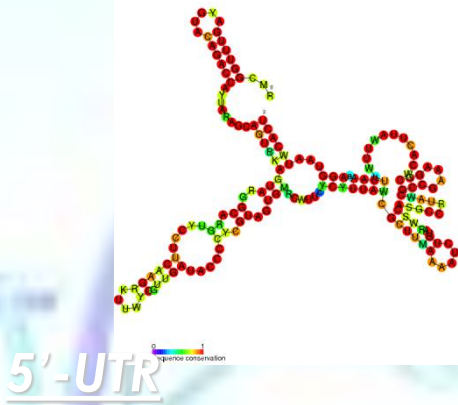
SEQUENCING

◆ Ακολουθεί η περαιτέρω ανάλυση του Γεν. Υλικού με:

- Βιοπληροφορική

Μεταλλάξεις, Γενετικοί Ανασυνδυασμοί (Εξέλιξη, Υψηλό Λοιμογόνο Δυναμικό Μικροοργανισμών, Ανθεκτικότητα σε Αντιμ. Ουσίες)

Δομικές Μελέτες



Simplor: Γενετικός
Ανασυνδυασμός σε Στελέχη
Εντεροϊών

SEQUENCING

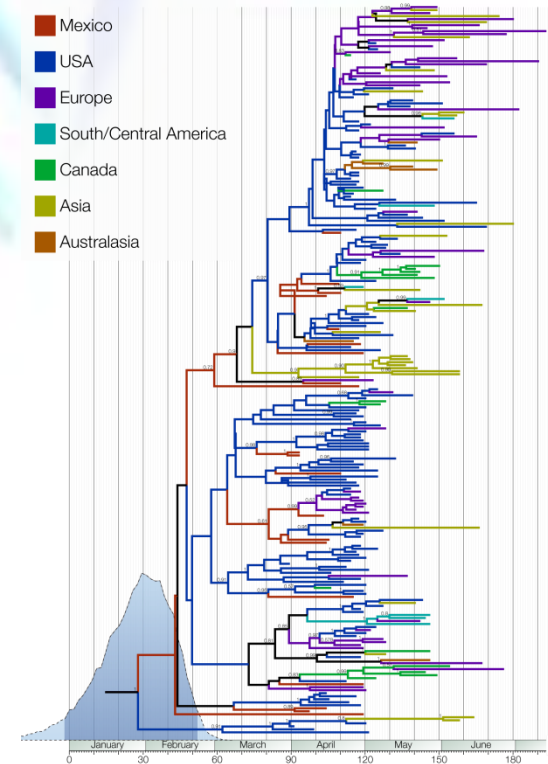
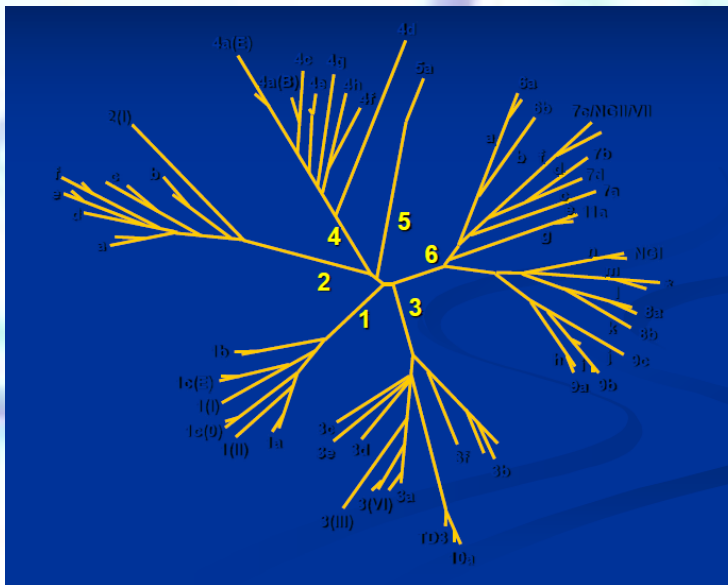
◆ Ακολουθεί η περαιτέρω ανάλυση του Γεν. Υλικού με:

■ **Βιοπληροφορική:**

Ανακάλυψη Νέων
Ιών

Γονοτυπική Ταυτοποίηση – Θεραπεία

Τυποποίηση – Επιδημιολογία
Ιών

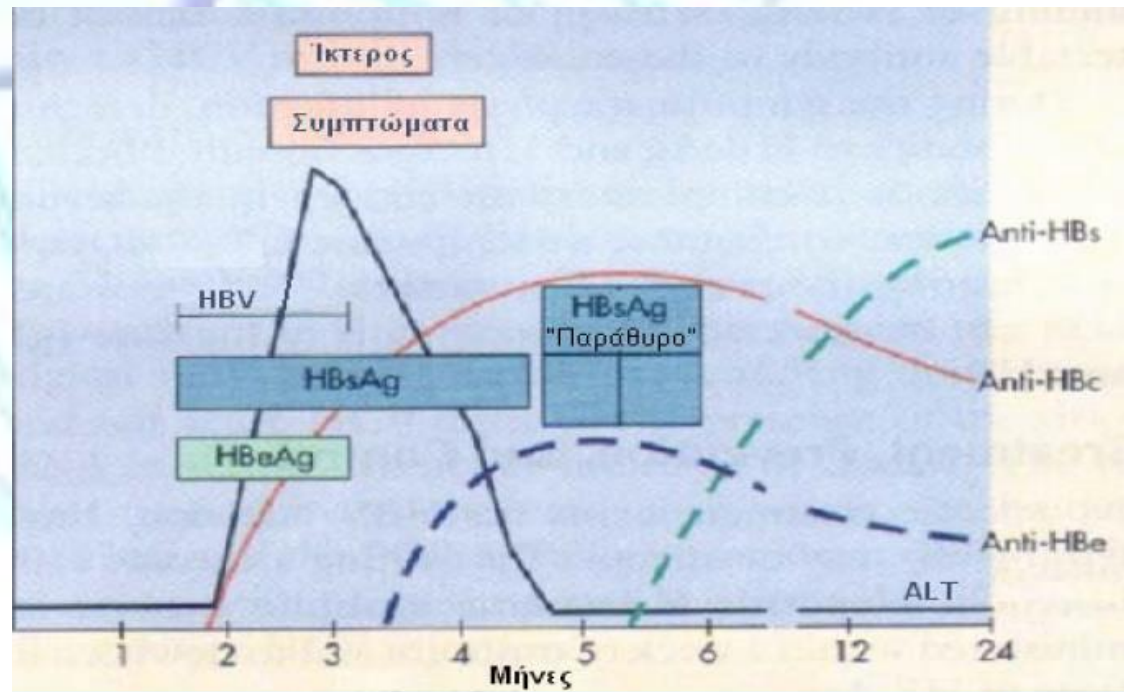


ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ

- Ανίχνευση σε Λοιμώξεις ΚΝΣ (Εγκεφαλίτιδα – Μηνιγγίτιδα)
 - ο PCR → ανίχνευση RNA εντεροϊών (*συχνότερη αιτία ιογενούς μηνιγγίτιδας*) και DNA ερπητοϊών στο ΕΝΥ σε περιστατικά εγκεφαλίτιδας και μηνιγγίτιδας με πολύ μεγάλη ευαισθησία
 - ο **Real – Time PCR**: Δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης και ταυτοποίησης ερπητοϊών (χρήση ιχνηθετών με διαφορετικό φθορισμό)
 - ο **Sequencing**: Ταυτοποίηση εντεροϊών

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ

- Ανίχνευση σε Λοιμώξεις Ήπατος
 - ο **HCV & HBV**: Ανίχνευση γενετικού υλικού του ιού - Σημαντικό όφελος στη διάκριση μεταξύ μολυσματικών και μη μολυσματικών ασθενών σε περιπτώσεις μετάγγισης, μεταμόσχευσης, επαγγελματικών ατυχημάτων, κ.λ.π. (ανίχνευση αντισωμάτων δε διακρίνει παλαιά από νεότερη λοίμωξη)
 - ο **HBV**:



ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ

- Ανίχνευση σε Λοιμώξεις Ήπατος
 - ο **HBV**: Μοριακός έλεγχος σε:
 - ✓ Άτυπα Ορολογικά Προφίλ:
 - HBsAg(+), Anti-HBc(+), Anti-Hbe(+), HBeAg(-) → ενεργός Πολλαπλασιασμός ιού σε περίπτωση Προπυρηνικών Μεταλλαγμένων HBeAg
 - Anti-HBc(+) → ενεργός Πολλαπλασιασμός ιού σε περίπτωση Μετάλλαξης HBsAg
 - ✓ Χρόνια Ηπατίτιδα Β → Αναζωπύρωση
 - ✓ Έναρξη/Παρακολούθηση Θεραπείας (Ποσοτική Εκτίμηση)

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ

- Ανίχνευση σε Λοιμώξεις Ήπατος
 - ο HCV:
 - ✓ Anti-HCV δεν αρκούν για διάγνωση
 - ✓ Μοριακός Έλεγχος → Επιβεβαιωτική Μέθοδος
 - ✓ Έναρξη/Παρακολούθηση Θεραπείας (Ποσοτική Εκτίμηση)
- Ανίχνευση αναπνευστικών ιών:
 - ο Ταχεία και ειδική μοριακή ανίχνευση με PCR **SARS, corona ιών, influenza** από κλινικά δείγματα του ανωτέρου και του κατωτέρου αναπνευστικού συστήματος
- Ανίχνευση εντερικών ιών:
 - ο PCR εφαρμογές συνέβαλε αποφασιστικά στην ακριβή διάγνωση ιογενούς διάρροιας παγκοσμίως (ανίχνευση ροταϊών, αστροϊών, εντεροϊών, εντερικών αδενοϊών)

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ

- Ανίχνευση κυτταρομεγαλοϊού σε περιπτώσεις μεταμοσχεύσεων μυελού των οστών και οργάνων:
 - ο **Anti-CMV IgG-IgM, CMV Ag pp65:** Μειωμένη ευαισθησία, πρόβλημα με ανοσοκατεσταλμένους (ανίχνευση IgG/IgM) και ουδετεροπενικούς (pp65 Ag, PMN κύρια πηγή).
 - ο **Ποσοτική PCR Hybridisation/Real-Time PCR:** μέθοδος αναφοράς για την παρακολούθηση εμφάνισης λοίμωξης από CMV κατά την ανοσοκαταστολή

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ

- Γονοτυπική Ταυτοποίηση Ιών και Έλεγχος Ανθεκτικότητας:
 - ο Γονοτυπική ταυτοποίηση HIV για την ανίχνευση ανθεκτικότητας στη θεραπεία
 - ο Σημαντική η γονοτυπική ταυτοποίηση για τη διαχείριση και θεραπεία χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας (HCV, HBV)
 - ο **Human Papilloma Virus (HPV):** Εμφάνιση των περισσότερων καρκίνων της μήτρας → γονότυποι του ιού που ταξινομούνται ως υψηλού κινδύνου και χαμηλού κινδύνου

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ

◆ Ανακάλυψη Νέων Παθογόνων Μικροοργανισμών:

ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΑΝΑΚΑΛΥΨΗΣ ΝΕΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Εμφάνιση Νέων Στελεχών
Ενίσχυση Επιδημιολογικής
Επιτήρησης

Εμφάνιση Νέων
Μικροοργανισμών
Διερεύνηση Πιθανής Ιογενούς
Αιτιολογίας



Νέες Τεχνολογίες
Μοριακές Μέθοδοι

**Θετικό
Αποτέλεσμα**



Συμβατικές Μέθοδοι Απομόνωσης και Χαρακτηρισμού
(Κυτταροκαλλιέργειες, Μορφολογικές Μελέτες, Πειραματόζωα, κ.λ.π.)

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ

◆ Ανακάλυψη Νέων Παθογόνων Μικροοργανισμών:

- Ανιχνεύονται Άγνωστες Γενετικές Αλληλουχίες
- **Μεταγενωμική:** Διαδικασία Ανάλυσης Γενετικού Υλικού χωρίς να είναι γνωστή η Νουκλεοτιδική Αλληλουχία του
- Εύρεση αιτιολογίας πολλών ασθενειών των οποίων η διάγνωση είναι άγνωστη ή αμφίβολη
- Ένα Διαγνωστικό Μέσο για μία μεγάλη κατηγορία παθογόνων μικροοργανισμών (π.χ. RNA ιούς)
- Δυνατότητα μελέτης αρχειακού υλικού, π.χ. **Ανακάλυψη μεταπνευμονοϊού του ανθρώπου** (ανκάλυψη σε 56 αποθηκευμένα δείγματα ρινικών εκκρίσεων με RT-PCR)
- Πληθώρα Τεχνικών για αυτό το «ταξίδι στο άγνωστο» (*Next Generation Sequencing, Random PCR, SISPA/Sequence-Independent-Single-Primer-Amplification, VIDISCA/Virus-Discovery-cDNA-AFLP, κ.λ.π.*)

Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Αρχικά:

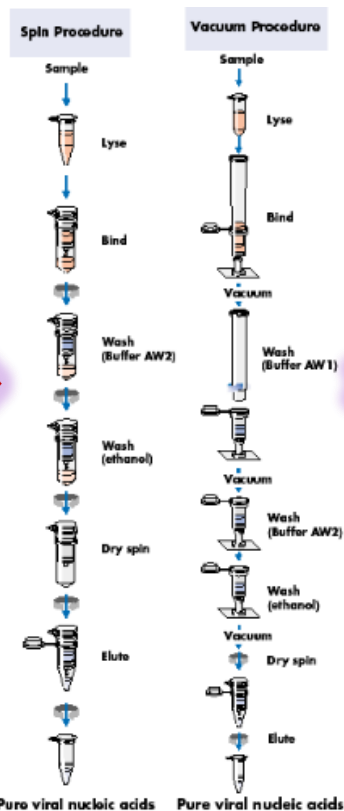
Μοριακές Μέθοδοι

Εξειδικευμένες Γνώσεις
Εκπαίδευση

Χρονοβόρες

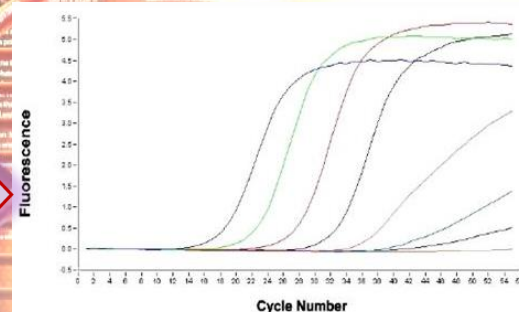
Κλινικό Δείγμα

Εκχύλιση Γεν. Υλικού



Εκτέλεση PCR

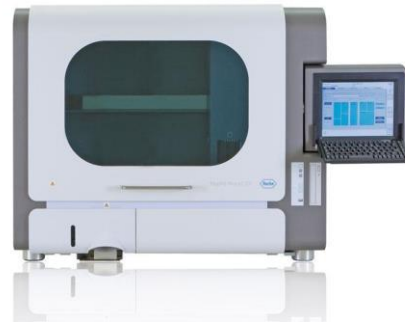
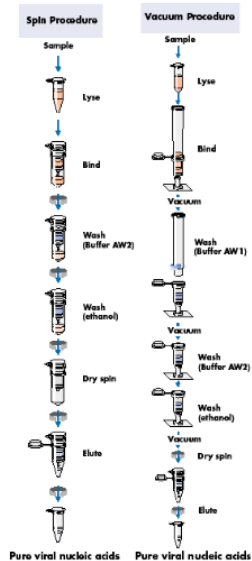
Αποτελέσματα και Ερμηνεία



Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ
ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Επόμενο Στάδιο Εξέλιξης:



Αυτοματοποιημένη
Εκχύλιση Γεν. Υλικού



Χειροκίνητη Εκχύλιση
Γεν. Υλικού

**Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ
ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ**

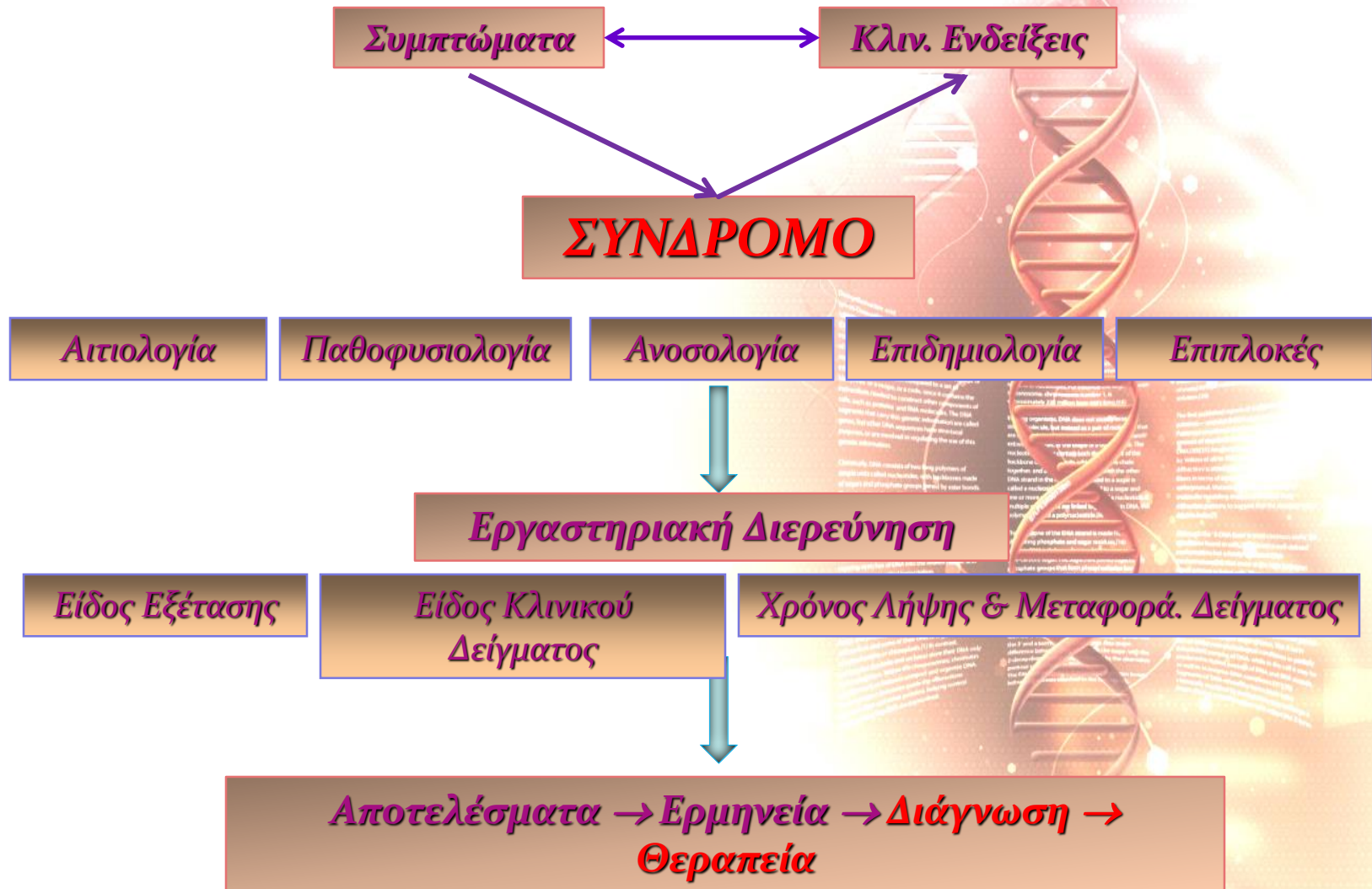
Πλήρης Αυτοματοποίηση:
Εκχύλιση Γεν. Υλικού, Προετοιμασία/Εκτέλεση
PCR & Ερμηνεία Αποτελεσμάτων

random] plasmid

Πλήρης Αυτοματοποίηση & Ταχεία Λήψη
Αποτελεσμάτων
(Π.χ. Ισοθερμικές Μέθοδοι)



Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ: ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

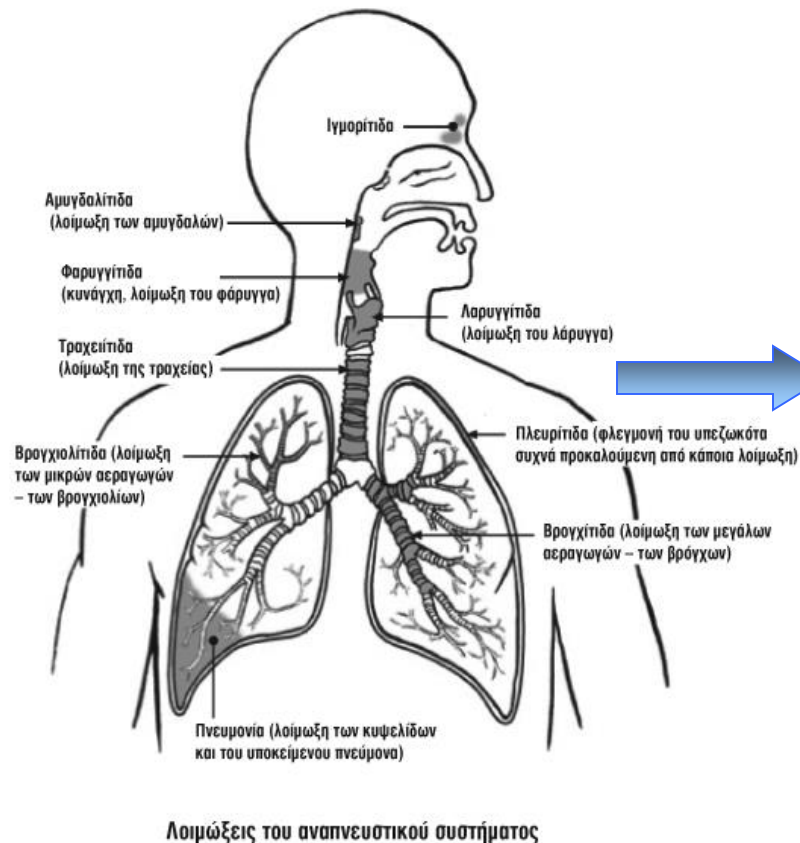


Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ: ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

- Συνδυασμός Συμπτωμάτων & Ενδείξεων → Κατεύθυνση ως προς την Αναγνώριση του Συνδρόμου, Είδος Εξέτασης, Διάγνωση
 - Όμως πολύ συχνά:
 - Συμπτώματα + Ενδείξεις → Μη Ειδικά
 - Αιτιολογία; (Συχνά πολλά διαφορετικά πιθανά παθογόνα...)
- ↓
- Είδος Εργαστηριακής Εξέτασης;
- ↓
- Αποτέλεσμα;
- ↓
- Ερμηνεία Αποτελέσματος → Διάγνωση → Θεραπεία;

Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ: ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

• Λοιμώξεις Αναπνευστικού Συστήματος



Μύτη και Ιγμόρεια

Staphylococcus aureus
Streptococcus pneumoniae
Haemophilus influenzae
Peptostreptococci
Rhinovirus
Myxovirus
Adenovirus
Enterovirus
Measles virus

Αυτί

Streptococcus pneumoniae
Staphylococcus aureus
Beta-haemolytic streptococci
Haemophilus influenzae

Λάρυγγας και Τραχεία

Haemophilus influenzae
RSV (children)
Myxovirus
Adenovirus

Βρόγχοι και Βρογχόλια

Haemophilus influenzae
Streptococcus pneumoniae
Bordetella pertussis
Mycoplasma pneumoniae
Myxovirus
RSV (children)
Adenovirus

Φάρυγγας και Αμυγδαλές

Streptococcus pyogenes
Corynebacterium diphtheriae
Haemophilus influenzae
Candida albicans
Vincent's organisms
Adenovirus
Myxovirus
Measles virus
Herpes simplex virus
Enterovirus
RSV
Epstein-Barr virus

Κυψελίδες

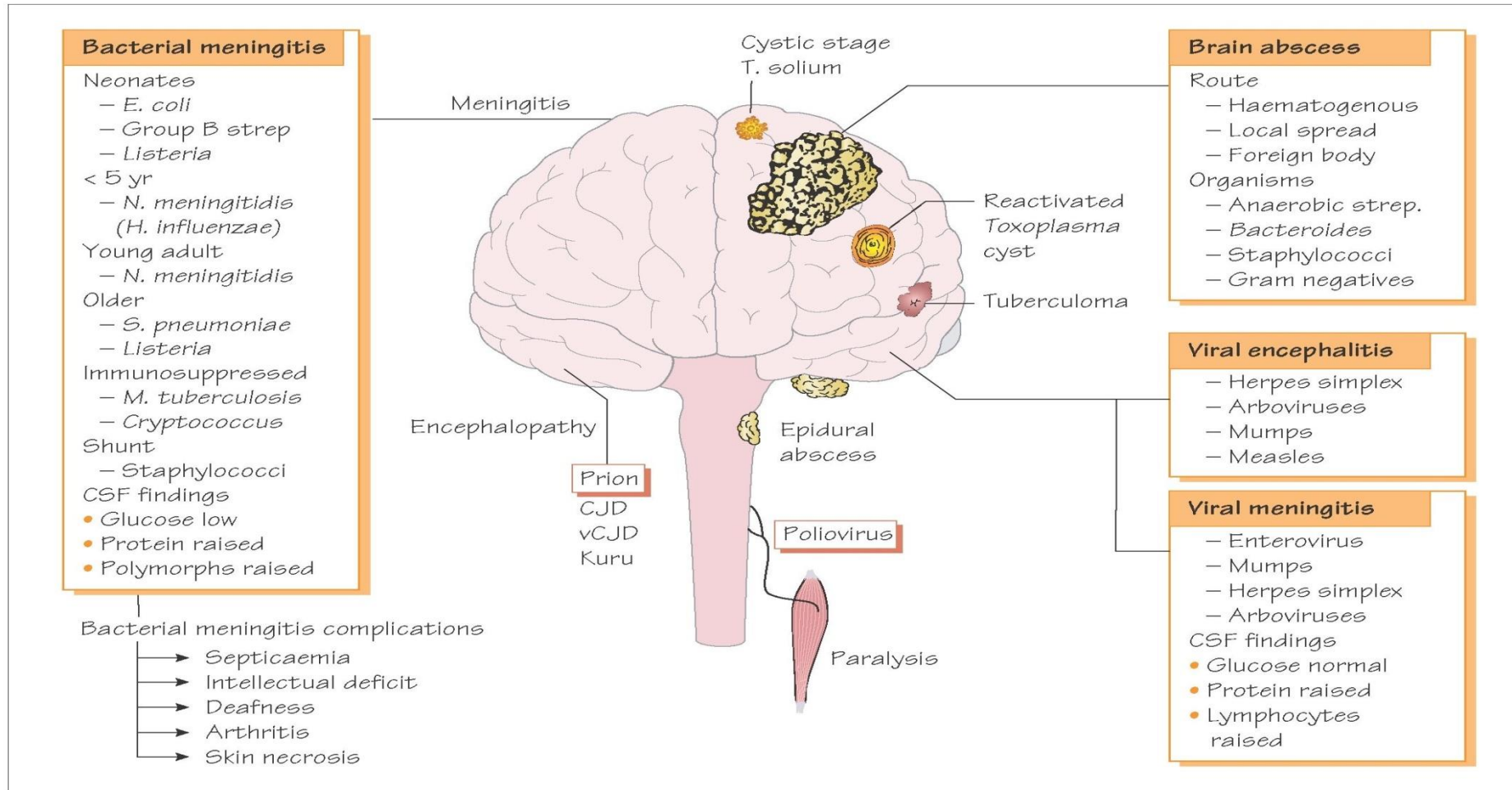
Streptococcus pneumoniae
Staphylococcus aureus
Klebsiella pneumoniae
Legionella species
Mycobacterium tuberculosis
Haemophilus influenzae
Mycoplasma pneumoniae
RSV
Parainfluenza virus
Adenovirus

Ποιο Παθογόνο θα Αναζητήσουμε?

Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ: ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Λοιμώξεις Κεντρικού Νευρικού Συστήματος

- Μηνιγγίτιδα, Εγκεφαλίτιδα, Μηνιγγοεγκεφαλίτιδα (Βακτήρια, Ιοί, Μύκητες, Παράσιτα)



Ποιο Παθογόνο θα Αναζητήσουμε?

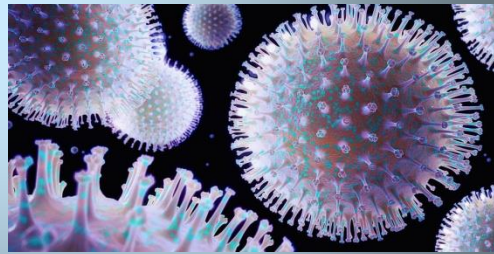
- **Λοιμώξεις Κεντρικού Νευρικού Συστήματος**
 - Κριτικής σημασίας η έγκαιρη διαφορική διάγνωση
 - Σωστή Διαχείριση Ασθενούς - Δύσκολη με Κλινικά Κριτήρια (Μη-Ειδικά Συμπτώματα/Ενδείξεις)
 - Καθυστέρηση Θεραπείας → Πιθανή άσχημη πρόγνωση

Επιπτώσεις επί τη απουσία Έγκαιρης Διάγνωσης



Βακτηριογενής Λοίμωξη

- Νευρικές και Εγκεφαλικές Βλάβες
- Αλλαγές Συμπεριφοράς
- Γνωστικές Δυσλειτουργίες
- Απώλεια Μυϊκού ελέγχου
- Κώφωση, Σπασμοί



Ιογενής Λοίμωξη

- Εγκεφαλικές Βλάβες
- Αλλαγές Συμπεριφοράς
- Αλλαγές Προσωπικότητας
- Επιπτώσεις σε Μνήμη - Ομιλία
- Σπασμοί



Μυκητιακή Λοίμωξη

- Αυξημένη Ενδοκράνια Πίεση
- Υδροκέφαλος
- IRIS (Ανοσοκαταστολή)
- Ατροφία Οπτικών Νεύρων, Τύφλωση

Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ: ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

- **Λοιμώξεις Κεντρικού Νευρικού Συστήματος**
 - Προκλήσεις για τη Σωστή και Εγκαιρη Εργαστηριακή Διάγνωση:

ENY: Οσφυονωτιαία Παρακέντηση

Εξέταση ENY

- Αριθμός Κυττάρων
- Πρωτεΐνη
- Γλυκόζη



PCR

- Βακτήρια, Μύκητες
- Ιοί
- Μυκοβακτήρια

Καλλιέργεια

- Βακτήρια
- Μύκητες
- Μυκοβακτήρια

Χρώση Gram/Ziehl-Neelsen/Indian Ink

- Βακτήρια
- Μύκητες
- Μυκοβακτήρια
- Κρυπτόκοκκος

Συγκολλητινοαντίδραση Latex

- Βακτήρια
- Μύκητες
- Μυκοβακτήρια

Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ: ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

- **Λοιμώξεις Κεντρικού Νευρικού Συστήματος**

– Προκλήσεις για τη Σωστή και Εγκαιρη Εργαστηριακή Διάγνωση:

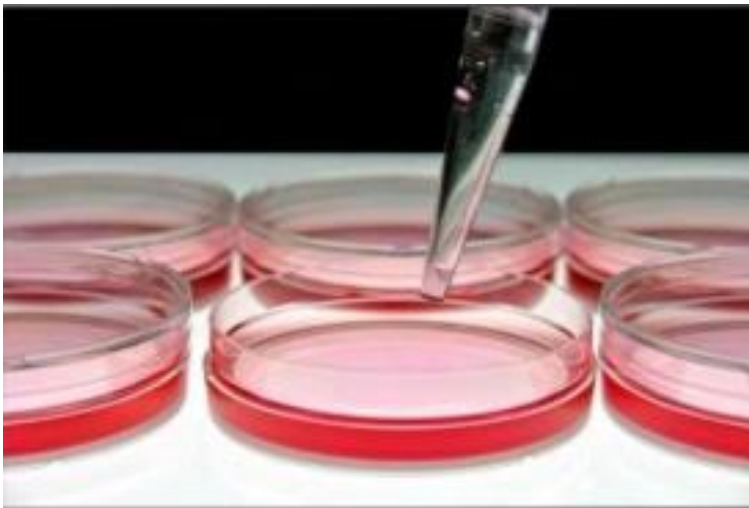
→ Χρονοβόρα και τεχνικώς πολύπλοκη διαδικασία

→ (Εξαιρώντας Μοριακές Μεθόδους) Μειωμένη Ευαισθησία και Ειδικότητα

→ Μικρή ποσότητα ΕΝΥ διαθέσιμη: ο Ιατρός πρέπει να επιλέξει ποια τεστ θα γίνουν με βάση τη μικρή ποσότητα ΕΝΥ και τα κλινικά συμπτώματα (Δύσκολο...)

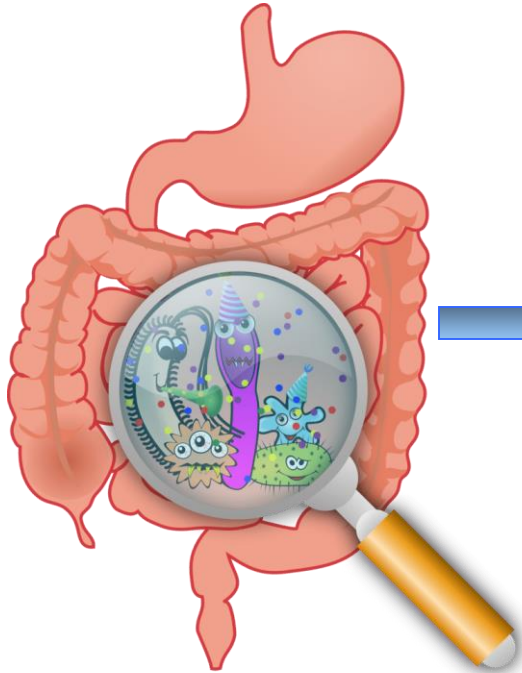
→ Χορήγηση αντιβιοτικών και αντιιικών επηρεάζει αποτέλεσμα

→ Πολλαπλά Μοριακά Τεστ για Διαφορετικούς Υποπτευόμενους Μικροοργανισμούς



Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ: ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

• Λοιμώξεις Γαστρεντερικού Συστήματος



■ Ιοί (70%)

- Rotaviruses
- Noroviruses
- Enteric adenoviruses
- Caliciviruses
- Astroviruses
- Enteroviruses

■ Πρωτόζωα (<10%)

- Cryptosporidium
- *Giardia lamblia*
- *Entamoeba histolytica*

■ Βακτήρια (10-20%)

- *Campylobacter jejuni*
- Non-typhoid *Salmonella* spp
- Enteropathogenic *Escherichia coli*
- *Shigella* spp
- *Yersinia enterocolitica*
- Shiga toxin producing *E coli*
- *Salmonella typhi* and *S paratyphi*
- *Vibrio cholerae*

■ Έλμινθες

- *Strongyloides stercoralis*

Ποιο Παθογόνο θα Αναζητήσουμε?

Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ: ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

- Συμπερασματικά:

Ποιο Παθογόνο να αναζητήσουμε;

Ανάγκη για Γρήγορο Αποτέλεσμα

Κλινική Διάγνωση → Ασθενής

*Αναγνώριση Επιδημιών
(Προστασία Κοινότητας,
Πρόληψη, Εμβόλια)*

*Ειδικές Κατηγορίες (π.χ. Καρκίνος,
HIV, Μεταμοσχεύσεις)*

Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ: ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

- **Συνεπώς, το στοίχημα στις Σύγχρονες Μεθόδους:**

- Να ανιχνεύουν ταυτόχρονα όσο το δυνατόν περισσότερα παθογόνα
- Γρήγορες και Απλές, χωρίς να μειώνονται τα πλεονεκτήματά τους
- Να μπορούν να εκτελεστούν από τον καθένα
- Χρόνος Λήψης Αποτελέσματος ↓↓↓

Έγκαιρη και Σωστή Κλινική
Απόφαση/Διαχείριση Ασθενή

Αναγνώριση Επιδημιών
(Προστασία Κοινότητας,
Πρόληψη, Εμβόλια)

Πρόληψη
Ενδονοσοκομειακών
Λοιμώξεων

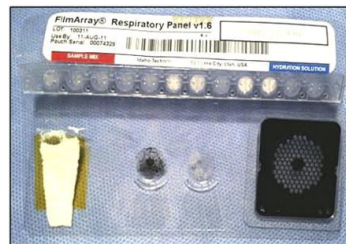
Δυνατότητα Συνδρομικής
Διάγνωσης
Ο Ασθενής στο Επίκεντρο

Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ: ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

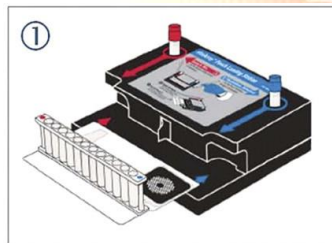
- Το «Στοιχείο» στην εξέλιξη των Μοριακών Τεχνικών Εργαστηριακής Διάγνωσης:

–Η τεχνολογία εξελίσσεται, το «κυνήγι» για ακόμα μεγαλύτερη απλοποίηση και αποτελεσματικότητα με χαρακτηριστικά “Point-of-Care” Πολυπλεκτική Συνδρομική Διάγνωση συνεχίζεται, π.χ.:

FilmArray



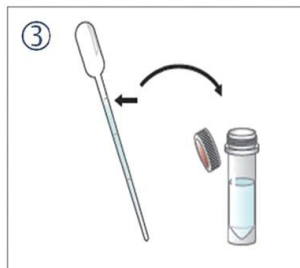
FilmArray RP Pouch



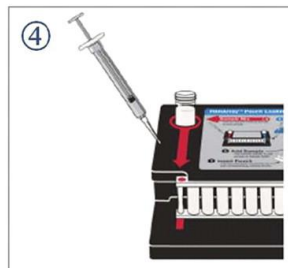
Load Pouch



Inject Hydration Solution



Add Sample to Buffer



Inject Sample



Load Pouch in FilmArray

Χρόνος «hands-on»:
3-5min

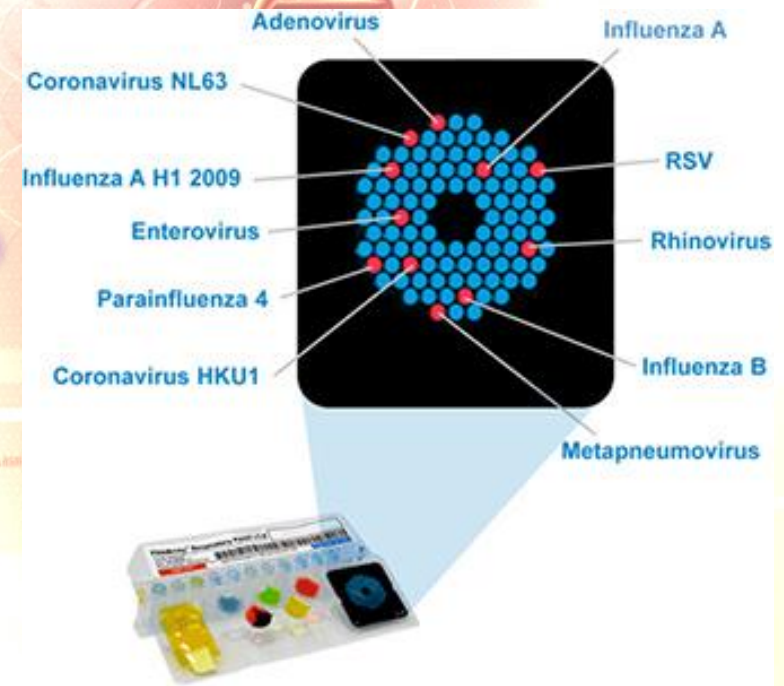
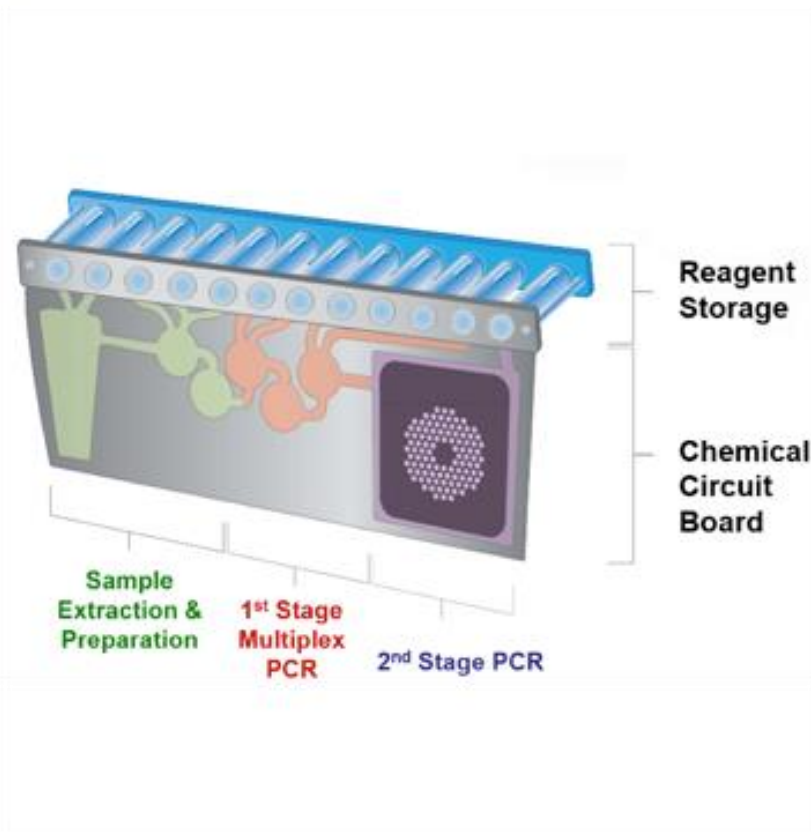
Χρόνος έως τη λήψη
αποτελεσμάτων: 1:15'

Απλή Διαδικασία:
Όχι ειδικές γνώσεις –
εργαλεία ακριβείας

Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ: ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

FilmArray

Συνδυασμός Πολυπλεκτικής Real Time PCR & Μικροσυστοιχιών



Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ: ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

FilmArray

4 Κατηγορίες Εξετάσεων:

Λοιμώξεις Αναπνευστικού, Λοιμώξεις ΚΝΣ, Λοιμώξεις Γαστρεντερικού & Αιμοκαλλιέργειες

FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel

1 Test. 14 Targets. All in about an hour.



Bacteria

Escherichia coli K1
Haemophilus influenzae
Listeria monocytogenes
Neisseria meningitidis
Streptococcus agalactiae
Streptococcus pneumoniae



Viruses

Cytomegalovirus (CMV)
Enterovirus
Herpes simplex virus 1 (HSV-1)
Herpes simplex virus 2 (HSV-2)
Human herpesvirus 6 (HHV-6)
Human parechovirus
Varicella zoster virus (VZV)



Fungi

Cryptococcus neoformans/gattii

FilmArray® Gastrointestinal Panel

1 Test. 22 Targets. All in about an hour.



Bacteria

Campylobacter (jejuni, coli and upsaliensis)
Clostridium difficile (Toxin A/B)
Plesiomonas shigelloides
Salmonella
Yersinia enterocolitica
Vibrio (parahaemolyticus, vulnificus and cholerae)
Vibrio cholerae

Diarrheagenic *E. coli*/Shigella

Enteraggregative *E. coli* (EAEC)
Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)
Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) *lt/stx*
Shiga-like toxin-producing *E. coli* (STEC) *stx1/stx2*
E. coli O157
Shigella/Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)



Parasites

Cryptosporidium
Cyclospora cayatanensis
Entamoeba histolytica
Giardia lamblia



Viruses

Adenovirus F 40/41
Astrovirus
Norovirus GI/GII
Rotavirus A
Sapovirus (I, II, IV and V)

The FilmArray Respiratory Panel

Viral

Adenovirus
Bocavirus
Coronavirus 229E
Coronavirus HKU1
Coronavirus OC43
Coronavirus NL63
Enterovirus
Influenza A
Influenza A H1
Influenza A H1 2009
Influenza A H3

Influenza B
Metapneumovirus
Parainfluenza 1
Parainfluenza 2
Parainfluenza 3
Parainfluenza 4
Respiratory Syncytial Virus
Rhinovirus

Bacterial

Bordetella pertussis
Chlamydia pneumoniae
Mycoplasma pneumoniae

The FilmArray BCID Panel

Simultaneous detection of 27 targets:



Gram + Bacteria

- Staphylococcus*
- Staphylococcus aureus*
- Streptococcus*
- Streptococcus agalactiae*

- Streptococcus pyogenes*
- Streptococcus pneumoniae*
- Enterococcus*
- Listeria monocytogenes*



Gram - Bacteria

- Klebsiella oxytoca*
- Klebsiella pneumoniae*
- Serratia*
- Proteus*
- Acinetobacter baumannii*
- Haemophilus influenzae*

- Neisseria meningitidis*
- Pseudomonas aeruginosa*
- Enterobacteriaceae*
- Escherichia coli*
- Enterobacter cloacae* complex



Fungi

- Candida albicans*
- Candida glabrata*

- Candida krusei*
- Candida parapsilosis*
- Candida tropicalis*



Antibiotic Resistance

- meaA*
- vanA / vanB*

- KPC

Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ: ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Παραδείγματα Άλλων Συστημάτων Μοριακής Πολυπλεκτικής Ανίχνευσης: Λοιμώξεις Γαστρεντερικού

TABLE 4 FDA-approved/cleared multiplex gastrointestinal panels^a

Parameter	Verigene EP	Luminex GPP	BioFire GIP
Analysis platform	Verigene system	Magpix or Luminex 100/200 system	FilmArray system or FilmArray Torch
Acceptable specimen type	Stool in Cary-Blair medium	Fresh stool or stool in Cary-Blair medium	Stool in Cary-Blair medium
No. of targets	9	14	22
Ability to detect pathogen			
Bacteria			
<i>Campylobacter</i> species	✓	✓	✓
<i>Salmonella</i> species	✓	✓	✓
<i>Shigella</i> species/enteroinvasive <i>E. coli</i> ^b	✓	✓	✓
<i>Vibrio</i> species	✓		✓
<i>Vibrio cholerae</i>		✓	✓
<i>Yersinia enterocolitica</i>	✓		✓
<i>Escherichia coli</i> O157		✓	✓
Enterotoxigenic <i>E. coli</i>		✓	✓
Enteropathogenic <i>E. coli</i>			✓
Enteraggregative <i>E. coli</i>			✓
<i>Plesiomonas shigelloides</i>			✓
Shiga toxin-producing <i>E. coli</i> (stx ₁ -stx ₂)	✓ ^c	✓	✓
<i>Clostridium difficile</i> (toxin A/B)		✓	✓
Viruses			
Norovirus GI/GII	✓	✓	✓
Rotavirus A	✓	✓	✓
Astrovirus			✓
Adenovirus 40/41		✓	✓
Sapovirus			✓
Parasites			
<i>Cryptosporidium</i> species		✓	✓
<i>Entamoeba histolytica</i>		✓	✓
<i>Giardia lamblia</i>		✓	✓
<i>Cyclospora cayentanensis</i>			✓
No. of samples (throughput)	1–32 (scalable)	24	1–12 (scalable)
Time to result (h)	<2	~5	~1

^aEP, enteric pathogens; GPP, gastrointestinal pathogen panel; GIP, gastrointestinal panel.

^bThe Verigene EP and Luminex GPP do not specifically target enteroinvasive *E. coli*.

^cThe Verigene EP has separate targets for stx₁ and stx₂.

Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ: ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Παραδείγματα Άλλων Συστημάτων Μοριακής Πολυπλεκτικής Ανίχνευσης: Λοιμώξεις Αναπνευστικού

TABLE 3 FDA-approved/cleared multiplex respiratory panels^a

Parameter	FilmArray	Verigene	x-TAG RVP	x-TAG RVP Fast	NxTAG-RPP	eSensor RVP	ePlex
Analysis platform	FilmArray system or FilmArray Torch	Verigene system	Luminex 100/200	Luminex 100/200	Luminex Magpix	eSensor	ePlex system
No. of targets	20	16	12	8	20	14	17
Ability to detect pathogen							
Viruses							
Adenovirus	✓	✓	✓	✓	✓	✓ (differentiates subgroup B/E from C)	✓
Coronavirus							✓
Coronavirus HKU1	✓				✓		
Coronavirus NL63	✓				✓		
Coronavirus 229E	✓				✓		
Coronavirus OC43	✓				✓		
Human bocavirus					✓		
Human metapneumovirus	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Influenza A virus	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Subtype H1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Subtype H3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Subtype 2009 H1N1	✓					✓	✓
Influenza B virus	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Parainfluenza virus 1	✓	✓	✓		✓	✓	✓
Parainfluenza virus 2	✓	✓	✓		✓	✓	✓
Parainfluenza virus 3	✓	✓	✓		✓	✓	✓
Parainfluenza virus 4	✓	✓			✓		✓
Respiratory syncytial virus	✓			✓			
Respiratory syncytial virus A		✓	✓		✓	✓	✓
Respiratory syncytial virus B		✓	✓		✓	✓	✓
Rhinovirus/enterovirus	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Bacteria							
Chlamydomphila pneumoniae	✓				✓		✓
Mycoplasma pneumoniae	✓				✓		✓
Bordetella pertussis	✓	✓					
Bordetella parapertussis-Bordetella bronchiseptica		✓					
Bordetella holmesii		✓					
Time to result (h)	~1	~2-3	~8	~6	~4	~6	~1.5

^aThe acceptable specimen type for all panels is a nasopharyngeal swab. RVP, respiratory virus panel; RPP, respiratory pathogen panel.

Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ: ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

- **Παραδείγματα Συνδρομικής Διάγνωσης (Αληθινά Περιστατικά!):**

Πέμπτη 5 Σεπτεμβρίου 2019, ώρα 14:00

- Παιδιατρική Κλινική: Έχουμε παιδί 3 ετών με πυρετό & αυχενική δυσκαμψία & θέλουμε PCR για εντεροϊούς
- Μικρ. Εργαστήριο: Γιατί ψάχνετε μόνο εντεροϊούς? Να δούμε και τη γενική ENY τι θα βγάλει? (Συχνό Φαινόμενο: Ζήτηση από κλινικές απ' ευθείας μοριακών μεθόδων πριν τη Γενική ENY...)
- Παιδιατρική Κλινική: Μερικές Φορές Φυσιολογική σε Ιογενείς Λοιμώξεις ΚΝΣ  Μπορούμε να δούμε και ερπητοϊούς?
- Μικρ. Εργαστήριο: Υπάρχει η δυνατότητα πολυπλεκτικής PCR για τα κυριότερα παθογόνα ΚΝΣ! Μας επιτρέπει να κάνουμε εργαστηριακή διάγνωση με γνώμονα ΤΟ ΠΑΙΔΙ, γρήγορα & αξιόπιστα και όχι με βάση το κάθε πιθανό παθογόνο (δεν ξέρουμε ποιο είναι...) (Ενημέρωση Κλινικής για Δυνατότητα Συνδρομικής Διάγνωσης με Ταχεία Πολυπλεκτική PCR)

Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ: ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

- Παραδείγματα Συνδρομικής Διάγνωσης (Αληθινά Περιστατικά!):

Πέμπτη 5 Σεπτεμβρίου 2019

Αποτέλεσμα

- *FilmArray ME Panel:* Θετικό για Εντεροϊούς (Σύμπτωση!)
- Γενική ENY: Ελαφρώς αυξημένη πρωτεΐνη, 450κκx, Πολυμορφοποιητικός τύπος (!) (αρχή λοίμωξης...)

Σταματάει εδώ η Διάγνωση με την Ανίχνευση του Παθογόνου?

ΟΧΙ!!!

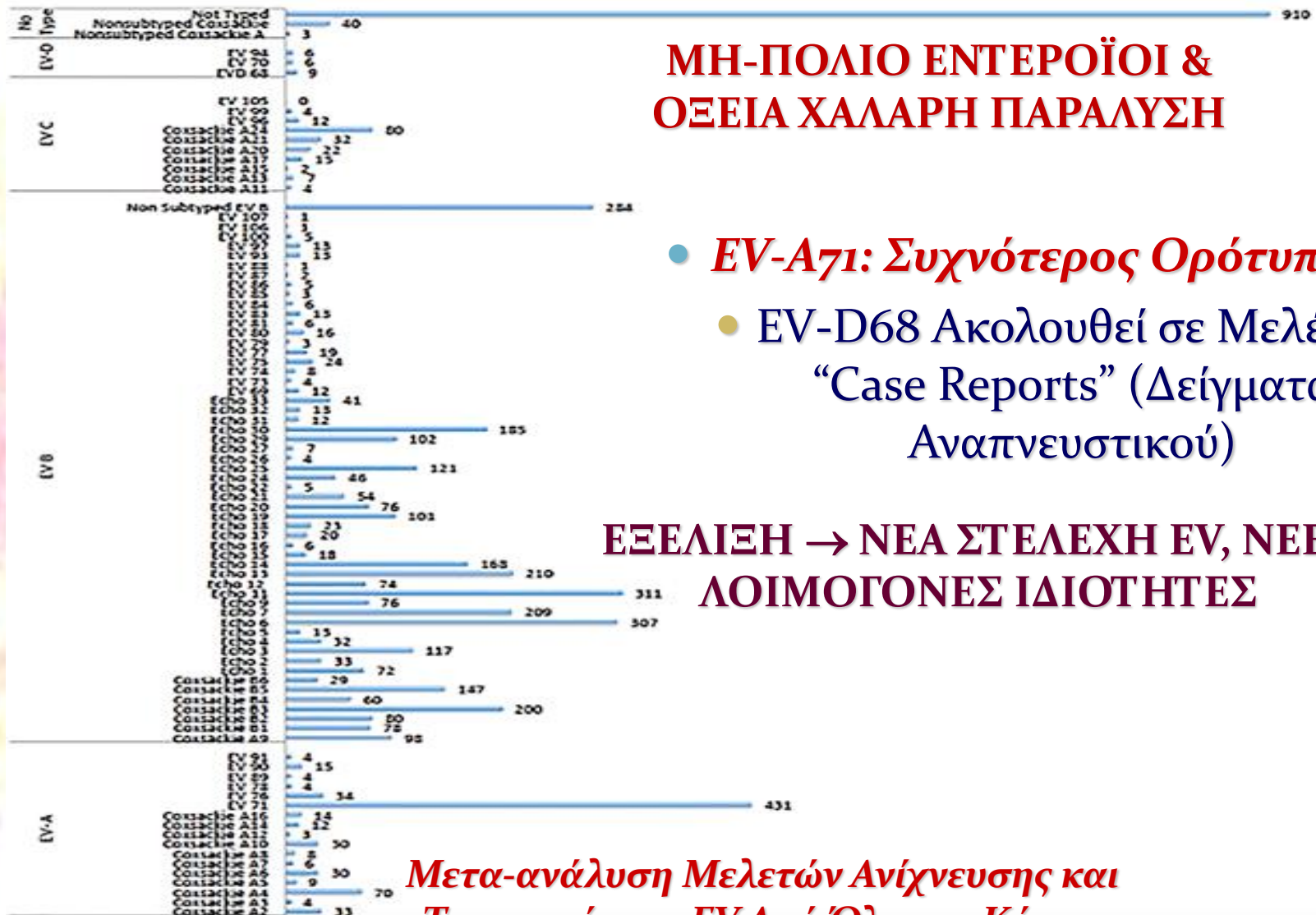
ΑΡΚΕΤΕΣ ΟΙ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ ΟΠΟΥ
ΧΡΕΙΑΖΕΤΑΙ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΑΝΑΛΥΣΗ

Ταυτοποίηση
(Αναγνώριση Πιθανού Επικίνδυνου
Στελέχους, π.χ. EV-D68, EV-A71)

Αναγνώριση Επιδημιών/Πανδημιών
(Προστασία Κοινότητας, Πρόληψη,
Εμβόλια)

Αιτιολογική Σύνδεση με Σύνδρομα των οποίων η
Ιογενής Βάση είναι έως σήμερα άγνωστη, ή ασαφής

ΑΝΑΓΚΗ ΝΑ ΠΡΟΧΩΡΗΣΟΥΜΕ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ: ΤΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΤΩΝ ΕΥ



ΜΗ-ΠΟΛΙΟ ΕΝΤΕΡΟΪΟΙ & ΟΞΕΙΑ ΧΑΛΑΡΗ ΠΑΡΑΛΥΣΗ

- **EV-A71: Συχνότερος Ορότυπος**
- EV-D68 Ακολουθεί σε Μελέτες “Case Reports” (Δείγματα Αναπνευστικού)

ΕΞΕΛΙΞΗ → ΝΕΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΕΥ, ΝΕΕΣ ΛΟΙΜΟΓΟΝΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Μετα-ανάλυση Μελετών Ανίχνευσης και Ταυτοποίησης ΕΝ Από Όλο τον Κόσμο

ΑΝΑΓΚΗ ΝΑ ΠΡΟΧΩΡΗΣΟΥΜΕ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ: ΤΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΤΩΝ ΕV



- **53.000 Περιστατικά HFMD, 1/2018-11/2018**
 - **6 Θάνατοι**
 - **Μελέτη 86 Περιστατικών HFMD:**
 - **80% EV-A71, 20% Άλλοι EV**

ΑΝΑΓΚΗ ΝΑ ΠΡΟΧΩΡΗΣΟΥΜΕ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ: ΤΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΤΩΝ ΕV

Figure: Number of Confirmed US AFM Cases Reported to CDC by Month of Onset, August 2014-October 2018 [^]*†

ΕV-A71: ΠΑΛΑΙΟΣ ΙΟΣ, ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΟ ΠΑΘΟΓΟΝΟ

ΧΑΛΑΡΗ ΠΑΡΑΛΥΣΗ ΣΤΗΝ ΑΜΕΡΙΚΗ, 2018



AFM indicates acute flaccid myelitis; CDC, US Centers for Disease Control and Prevention; MRI, magnetic resonance imaging.

[^] Confirmed AFM cases CDC has been made aware of as of November 30, 2018, with onset of the condition through October 31, 2018.

* Data shown from August 2014 to July 2015 are based on the AFM investigation case definition: onset of acute limb weakness on or after August 1, 2014, and an MRI showing a spinal cord lesion largely restricted to gray matter in a patient ≤21 years.

† Data shown from August 2015 to present are based on the AFM case definition adopted by the Council of State and Territorial Epidemiologists: acute onset of focal limb weakness and an MRI showing spinal cord lesion largely restricted to gray matter and spanning one or more spinal segments, regardless of age.

● Πολιτεία Κολοράντο:

- 34 Περιστατικά Νόσου ΚΝΣ, 3 AFM, 3 HFMD

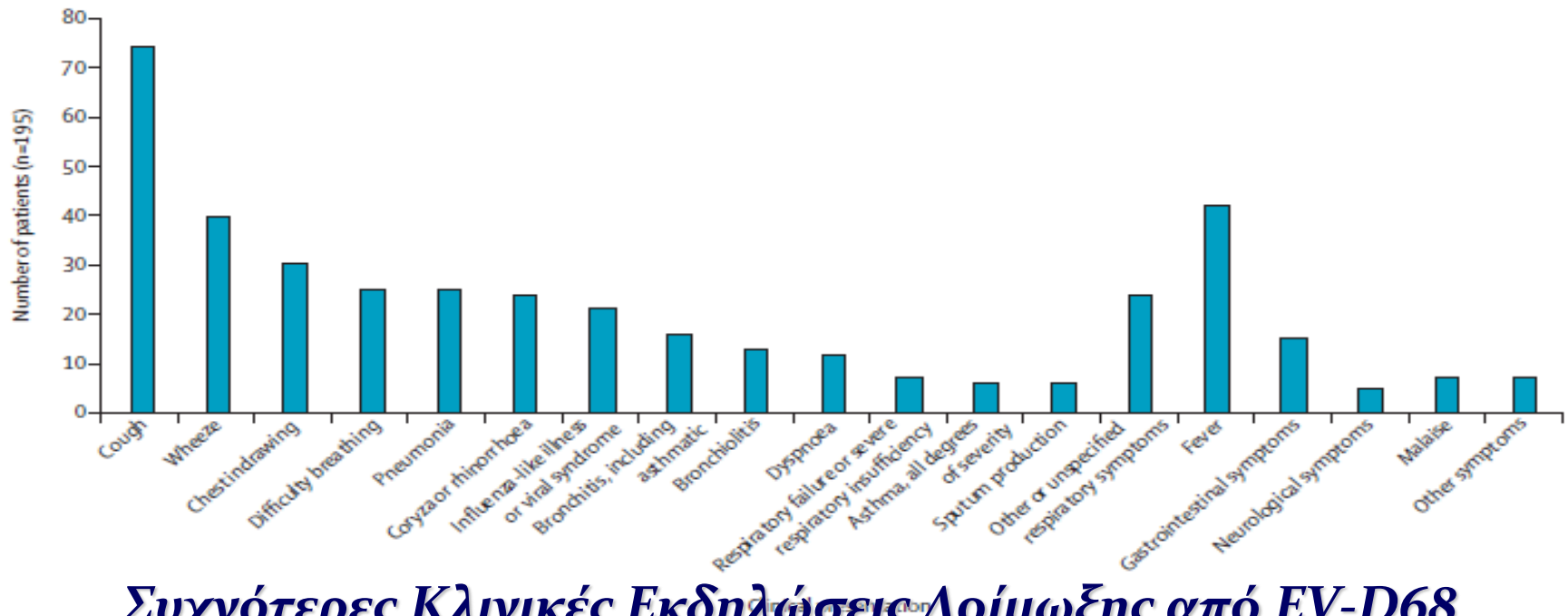
○ Όλα ΕV-A71

Νέα Λοιμογόνα Στελέχη με Μεταλλάξεις στη VP1

ΑΝΑΓΚΗ ΝΑ ΠΡΟΧΩΡΗΣΟΥΜΕ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ: ΤΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΤΩΝ ΕV ΕV-D68: ΑΝΑΔΥΣΗ ΕΝΟΣ ΝΕΟΥ ΠΟΛΙΟΪΟΥ

● Κλινικές Εκδηλώσεις - Επιδημιολογία:

- Συνολικά: >2000 Περιστατικά ΕV-D68 σε 20 χώρες σε ολόκληρο τον κόσμο το 2014, 14 θάνατοι στις ΗΠΑ
- Παράγοντες Κινδύνου: Υποκείμενη Νόσος Αναπνευστικού, Καρδιοπάθειες, Κακοήθεια, Ανοσοκαταστολή



Συχνότερες Κλινικές Εκδηλώσεις Λοίμωξης από ΕV-D68

(Lancet Infect Dis (2016), 16:e64-e75)

ΑΝΑΓΚΗ ΝΑ ΠΡΟΧΩΡΗΣΟΥΜΕ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ: ΤΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΤΩΝ ΕΥ

ΕΥ-D68: ΑΝΑΔΥΣΗ ΕΝΟΣ ΝΕΟΥ ΠΟΛΙΟΪΟΥ

Κλινικές Εκδηλώσεις - Επιδημιολογία:

ΟΜΩΣ:

Ομάδες κρουσμάτων Οξείας Χαλαρής Παράλυσης κατά τη διάρκεια της επιδημίας: 2 στη Νορβηγία, 1 στη Γαλλία, 25 στις ΗΠΑ (Κολοράντο, Καλιφόρνια)

12 Θετικά για ΕΥ-D68

Σημεία Προσοχής:

Διαφέρει από άλλους Εντεροϊούς (Ομοιότητες με Ρινοϊούς – «Πρώην» HRV 87!):

Φυσικές/Χημικές Ιδιότητες (π.χ. ευαισθησία σε όξινο περιβάλλον, χαμηλότερη θερμοκρασία ανάπτυξης)

Τρόπος Μετάδοσης (Αναπνευστική Οδός – «ευκολότερος» τρόπος?)

Επιδημιολογία – Νευρολογικές Επιπλοκές

**ΙΟΣ ΠΟΥ ΣΥΝΔΥΑΖΕΙ ΤΗΝ ΕΥΚΟΛΙΑ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΤΩΝ ΡΙΝΟΪΩΝ ΚΑΙ ΤΗΝ
ΠΑΘΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑ «ΝΕΥΡΟΤΡΟΠΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ»**

**ΑΝΑΓΚΗ ΓΙΑ ΚΑΛΥΤΕΡΗ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
ΣΤΟ ΕΝΔΟΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΑ**

ΑΝΑΓΚΗ ΝΑ ΠΡΟΧΩΡΗΣΟΥΜΕ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ: ΤΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΤΩΝ ΕV

A. Proportion of PCR-positive samples for rhinovirus, enterovirus and enterovirus D68* among all analysed samples, 22 August–13 November 2016



EV-D68: ΑΝΑΔΥΣΗ ΕΝΟΣ ΝΕΟΥ ΠΟΛΙΟΪΟΥ

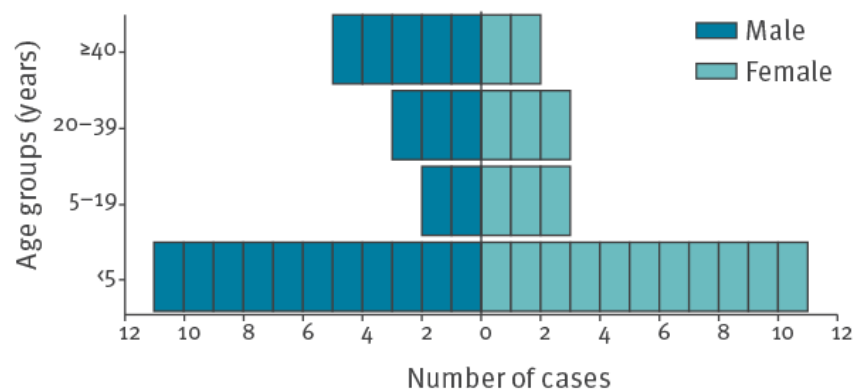
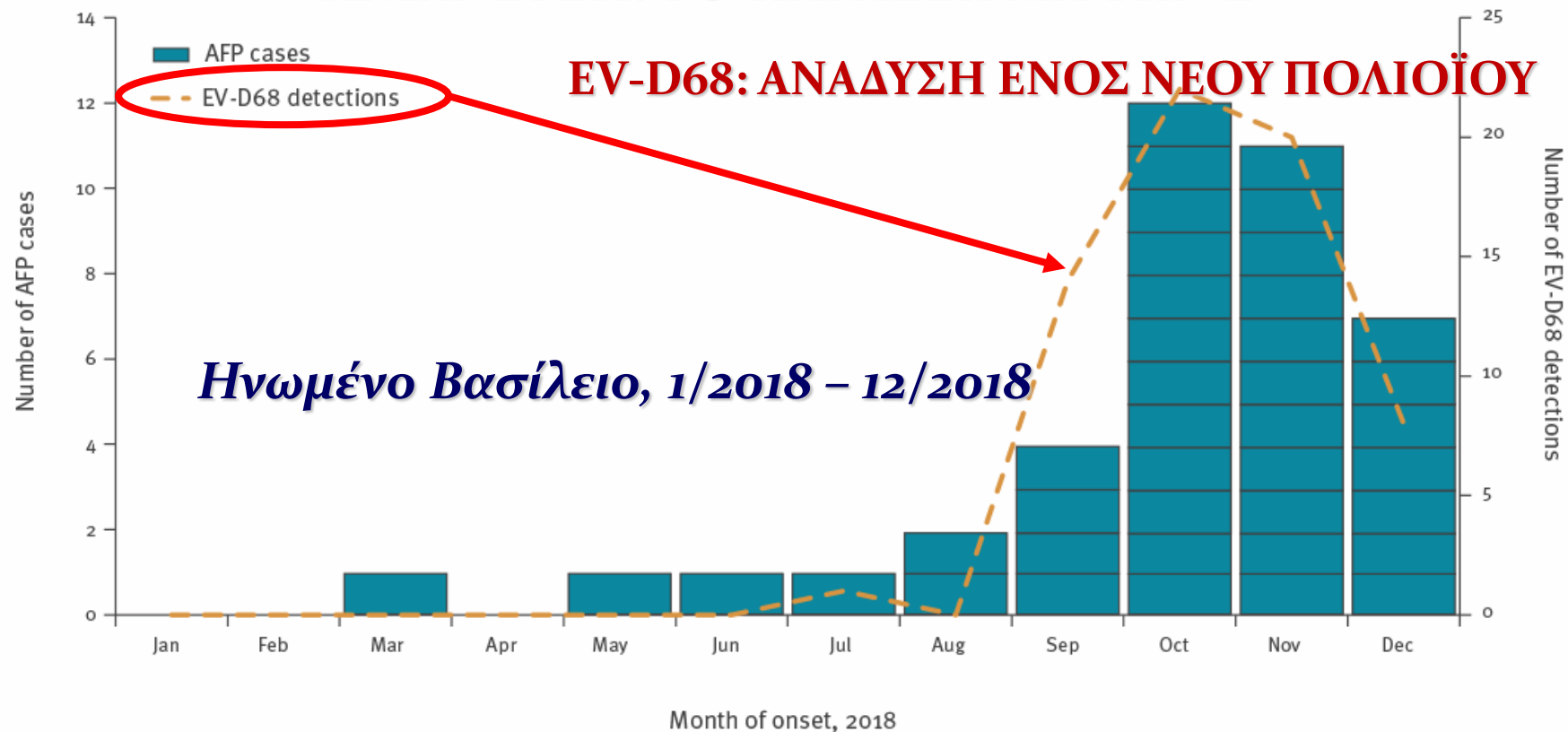
(Euro Surveill. 2016 Nov 17; 21(46): 30403)

Στοκχόλμη, 8/2016 – 9/2016

• **74/495 Δείγματα Αναπνευστικού ? EV-D68 (+)**

- **44 παιδιά <5 ετών**
- **10 Ασθενείς ? Υποκείμενη Νόσος, Σοβαρές Αναπνευστικές/Νευρολογικές Επιπλοκές (1 Θάνατος)**

ΑΝΑΓΚΗ ΝΑ ΠΡΟΧΩΡΗΣΟΥΜΕ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ: ΤΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΤΩΝ ΕV



- **40 Περιστατικά AFP**
- **15 EV(+)**
- **9 EV-D68(+)**
- **HRV, CV-B1, EV-C104**

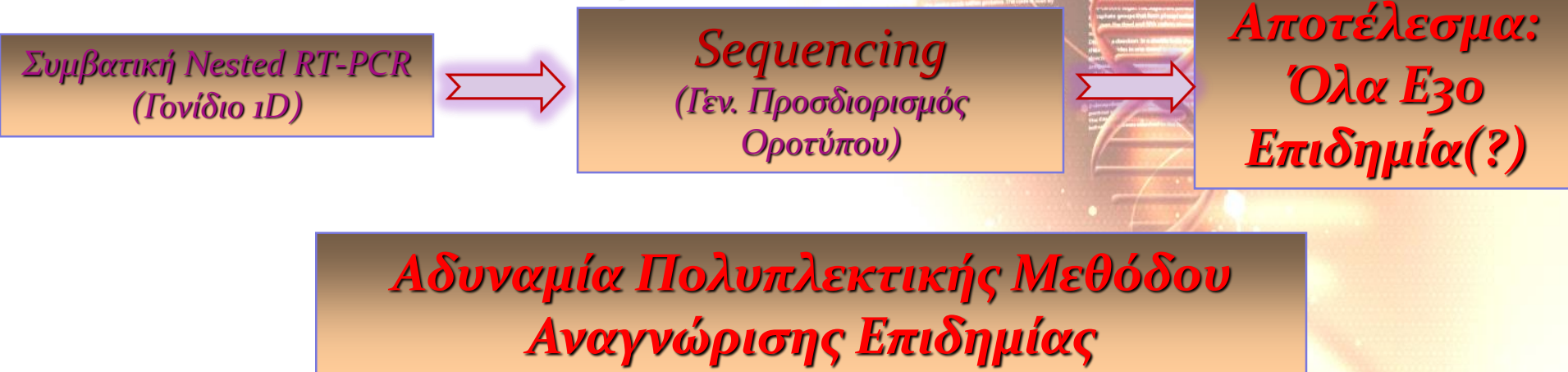
(Euro Surveill. 2019;24(6)pii=1900093)

ΑΝΑΓΚΗ ΝΑ ΠΡΟΧΩΡΗΣΟΥΜΕ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ: ΤΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΤΩΝ ΕΝ

- **Ένα άλλο παράδειγμα:**

- Απρίλιος – Σεπτέμβριος 2018 (ΠΓΝ ΑΤΤΙΚΟΝ) → 28 Δείγματα Ύποπτα για Λοίμωξη ΚΝΣ
- Εφαρμογή FilmArray ME Panel: 9 Δείγματα ΕΝΥ Θετικά για Εντεροϊούς
- Γονοτυπική Ταυτοποίηση:

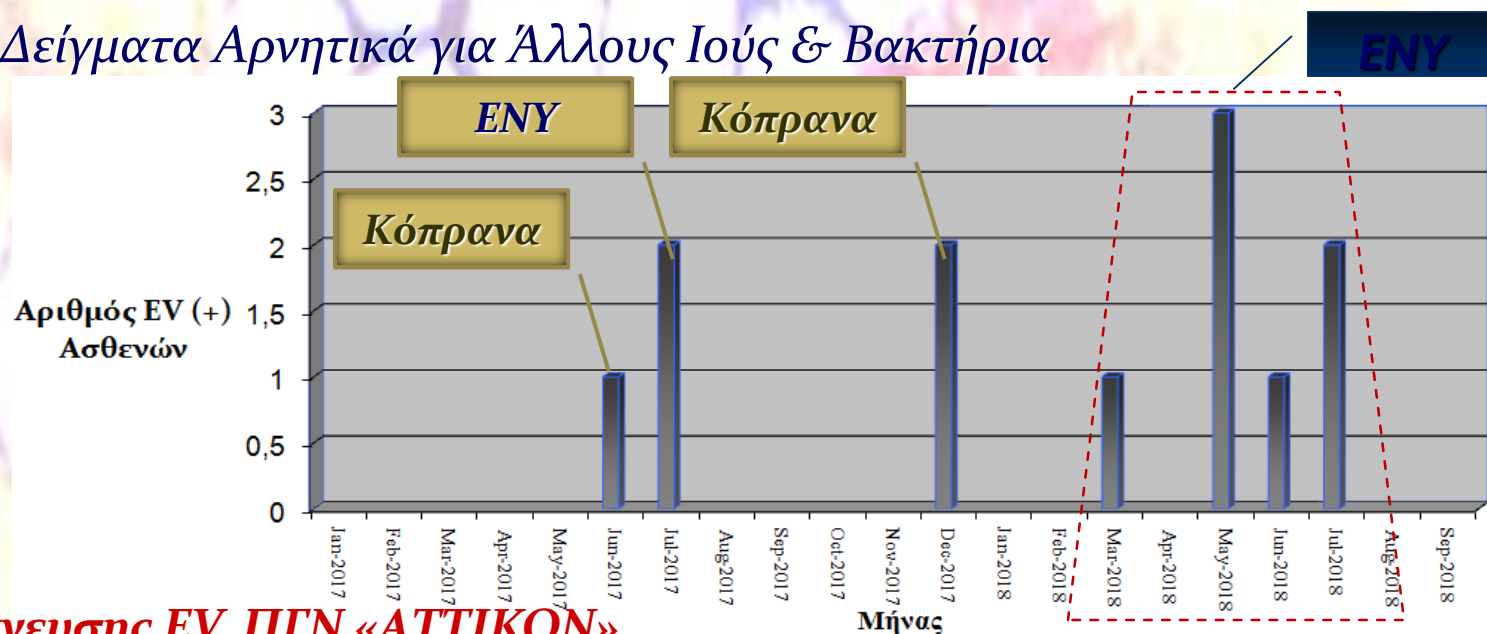
Υπέρτατο Επίπεδο Ανάλυσης



ΑΝΑΓΚΗ ΝΑ ΠΡΟΧΩΡΗΣΟΥΜΕ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ: ΤΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΤΩΝ ΕΝ

Ελλάδα, 2018:

- Περίοδος Μελέτης: 6 Μήνες (2/2018 – 7/2018)
- Αριθμός Δειγμάτων ΕΝΥ: 28
- Θετικά για ΕΝ: 7 (25%), 3-7/2018
 - Φύλο Ασθενών: 7Α
 - Ηλικία: 3 Ενήλικες 32-36y, 4 Παιδιά 4m-17y
 - ΕΝΥ: 20-580 κυτ/mm³, Λεμφ., Πρωτ. Φυσ.-↑
 - Δείγματα Αρνητικά για Άλλους Ιούς & Βακτήρια



Επίπτωση Ανίχνευσης ΕΝ, ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»,

2017-2018

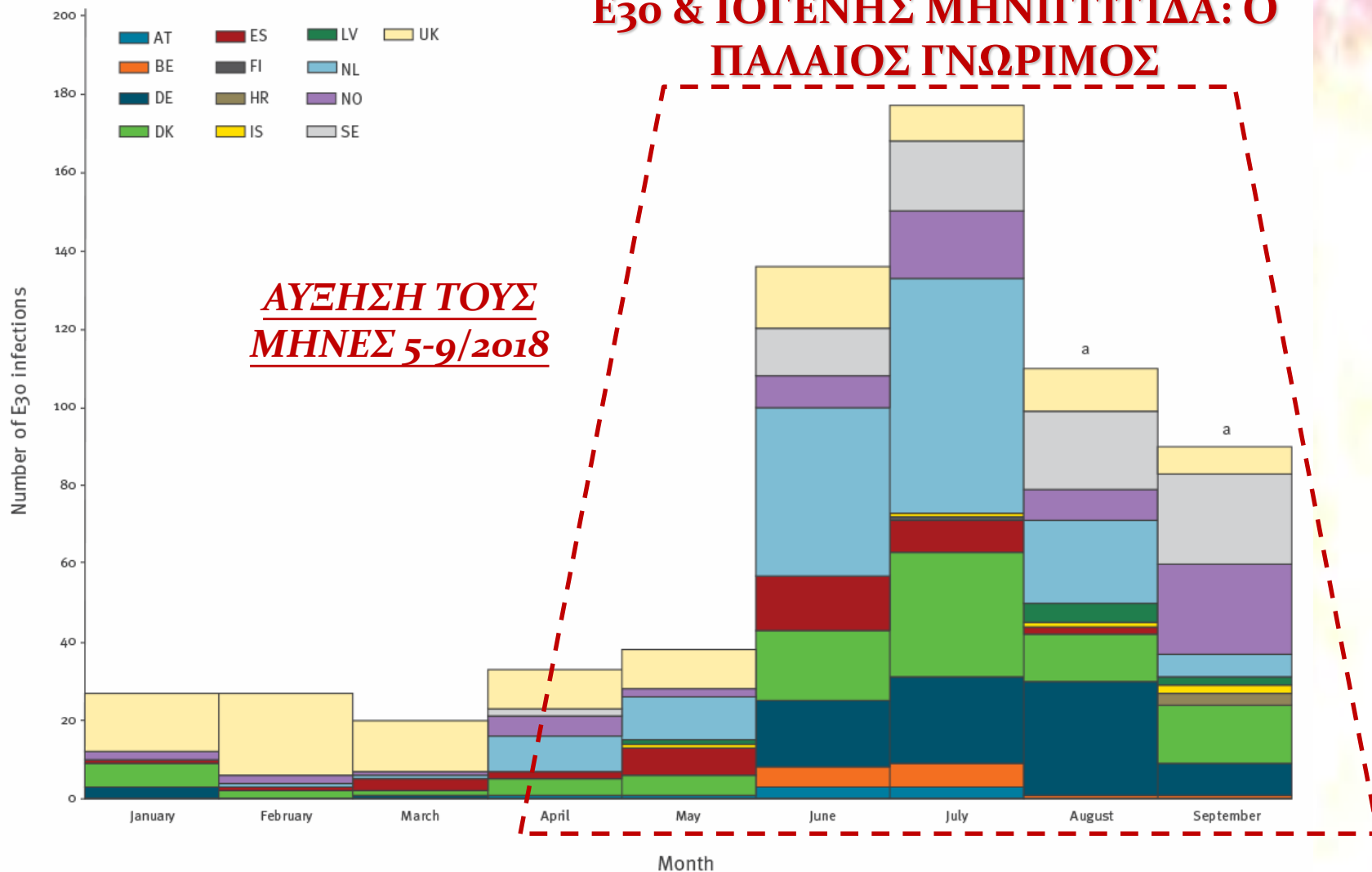
Αυξημένη Επίπτωση 3/2018-7/2018

■ Εργαστήριο Κλιν. Μικροβιολογίας ΠΓΝ "ΑΤΤΙΚΟΝ"

ΑΝΑΓΚΗ ΝΑ ΠΡΟΧΩΡΗΣΟΥΜΕ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ: ΤΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΤΩΝ ΕΥ

Αριθμός Ε30(+) Ασθενών σε 13 Ευρωπαϊκές Χώρες, 1/2018=9/2018

Ε30 & ΙΟΓΕΝΗΣ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ: Ο
ΠΑΛΑΙΟΣ ΓΝΩΡΙΜΟΣ



Broberg Eeva K, Simone Benedetto, Jansa Josep, the EU/EEA Member State contributors. Upsurge in echovirus 30 detections in five EU/EEA countries, April to September, 2018. Euro Surveill. 2018;23(44):pii=1800537

ση με Στελέχη
στην Ελλάδα
και Διεθνώς την
αξία



ΑΝΑΓΚΗ ΝΑ ΠΡΟΧΩΡΗΣΟΥΜΕ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

ΕΠΙΣΗΣ, ΠΡΟΣΟΧΗ!

- **Δυνατότητες Μεθόδου Πεπερασμένες, δεν μπορούν να ανιχνευθούν όλα τα πιθανά παθογόνα**

Παράδειγμα

- Άνδρας 43 ετών, Πυρετός και Κώμα εντός 4 ημερών μετά από αναφορά τσιμπημάτων από κουνούπια – Απεικονιστική Διάγνωση Μηνιγγοεγκεφαλίτιδας
- Γενική Εξέταση ENY: 1528 κύτταρα, 428 ερυθρά κκχ Χρώση Gram Αρνητική, (90%λεμφοκυτταρικός τύπος)
- Εφαρμογή FilmArray ME Panel: **Αρνητικό**
- Επιβεβαίωση αποτελέσματος & περαιτέρω διερεύνηση:
 1. Ανίχνευση με Εξειδικευμένη One Step Real Time RT-PCR για εντεροϊούς και Real Time RT-PCR για HSV-1/-2 & VZV - **Αποτέλεσμα: Αρνητικό**
 2. Αντισώματα έναντι ιού Δυτικού Νείλου: **Αρνητικό**

ΑΝΑΓΚΗ ΝΑ ΠΡΟΧΩΡΗΣΟΥΜΕ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

ΠΡΟΣΟΧΗ!

Μειονέκτημα Πολυπλεκτικών Τεχνικών

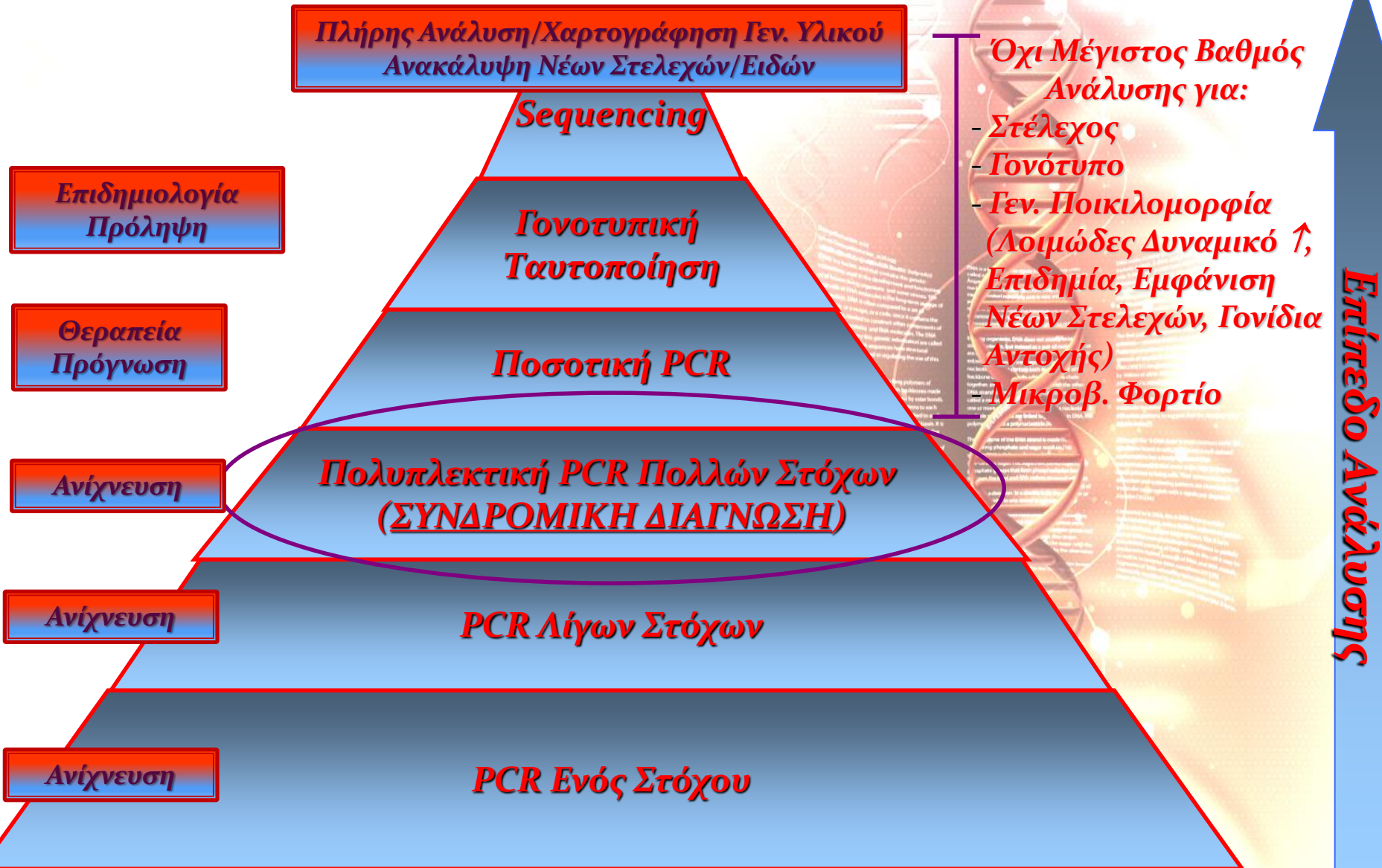
**Τεχνικός Περιορισμός
στον Αριθμό των
Παθογόνων**

**Μόνο Ανίχνευση
Όχι πληροφορίες για
γονότυπο/στέλεχος..**

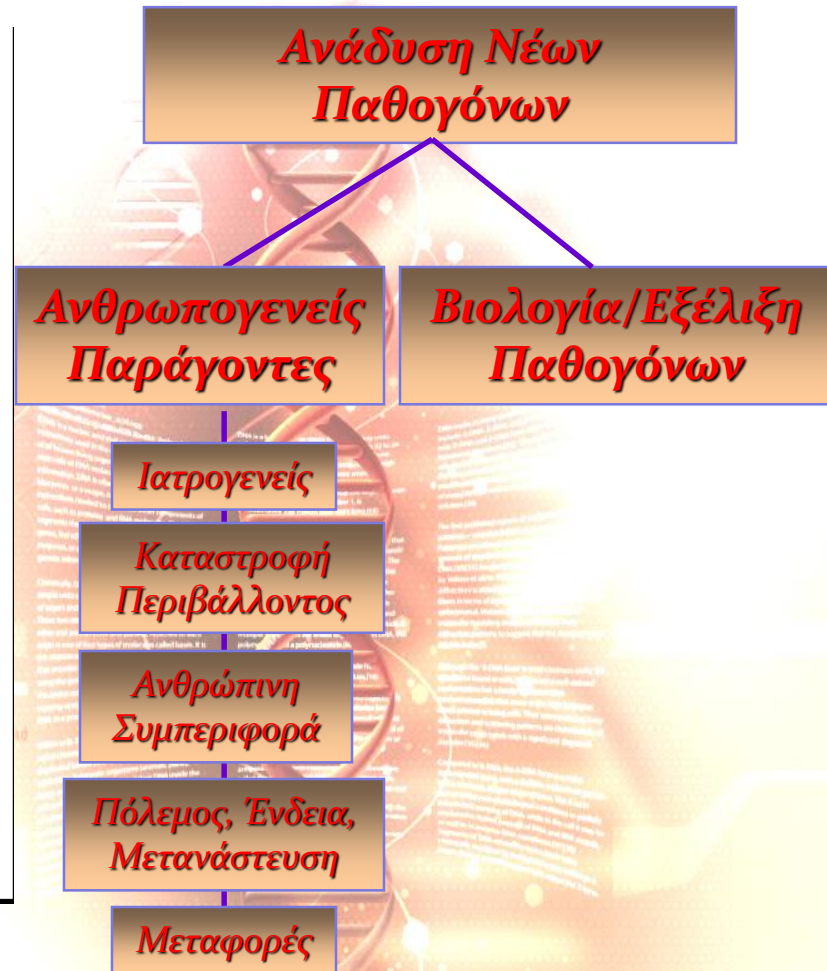
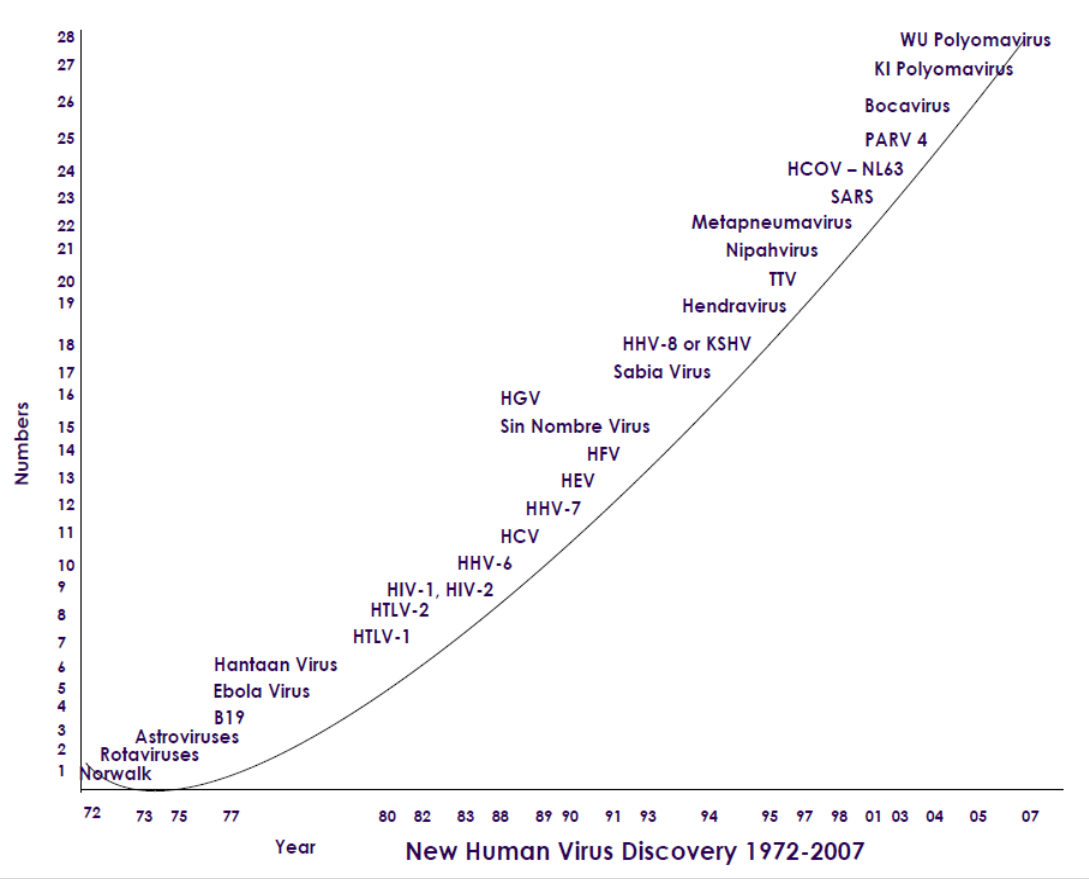
**Δεν Μπορούν να
Ανιχνευθούν και να
Αναγνωριστούν Αναδυόμενα
Παθογόνα/Νέα Είδη**

ΑΝΑΓΚΗ ΝΑ ΠΡΟΧΩΡΗΣΟΥΜΕ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

Επίπεδα Ανάλυσης των Μοριακών Μεθόδων



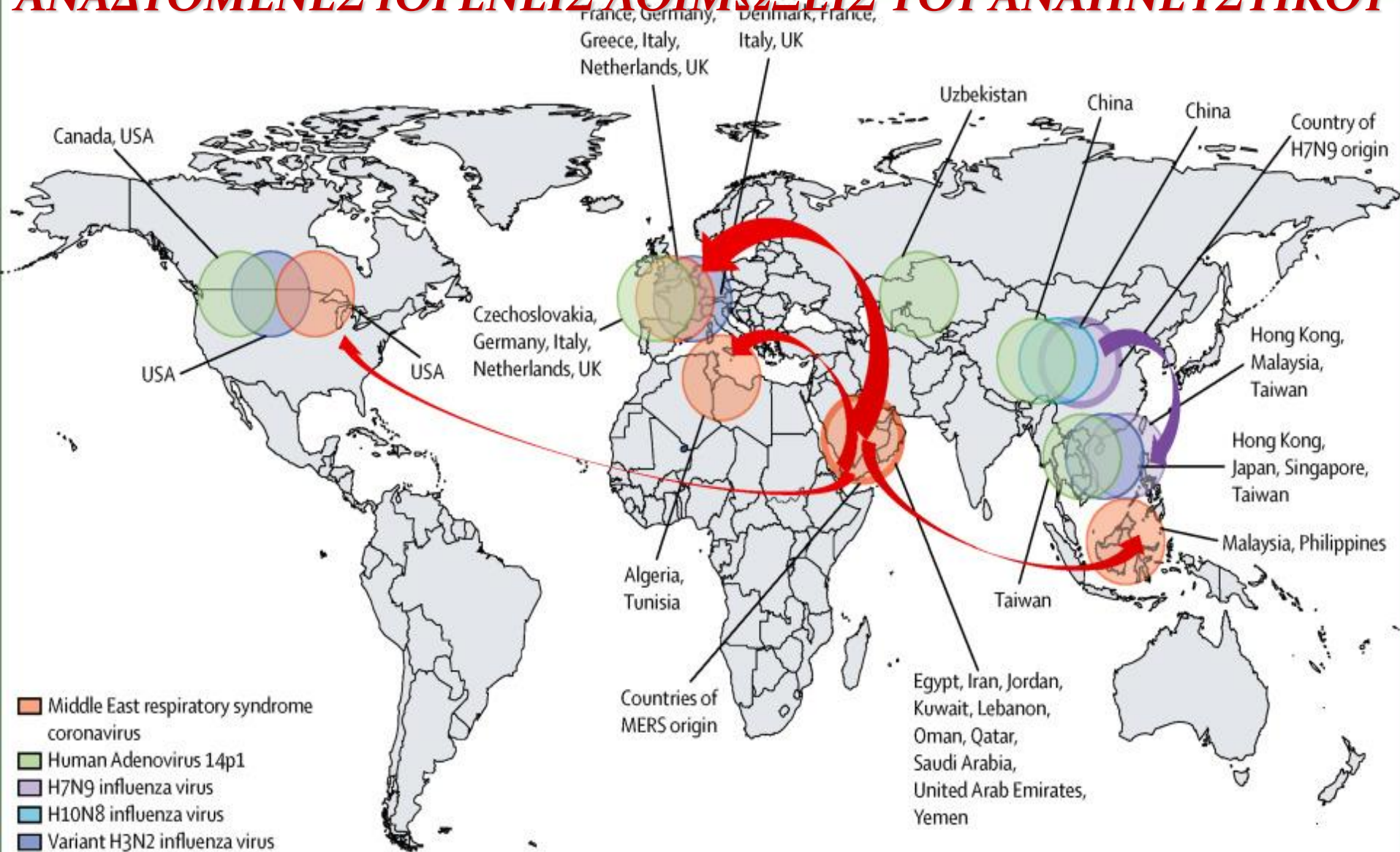
ΑΝΑΓΚΗ ΝΑ ΠΡΟΧΩΡΗΣΟΥΜΕ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ



Ποια η Ζητούμενη Εξέλιξη στη Συνδρομική Διάγνωση για Αναδυόμενα/Επανεμφανιζόμενα Παθογόνα;

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ:

ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΕΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ



ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ:
ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΕΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ
Γρίπη των Πτηνών

Ανασυνδυασμός Στελεχών από
Διαφορετικούς Ξενιστές

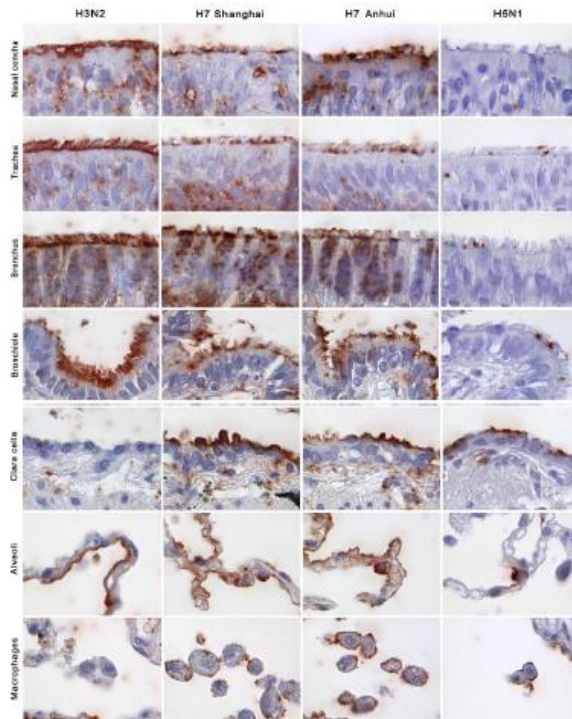


ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ:

ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΕΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ

Novel avian-origin influenza A (H7N9) virus attaches to epithelium in both upper and lower respiratory tract of humans.

D van Riel et al. Am J Pathol. 2013



Richard M. et al., Nature. 2013.

Limited airborne transmission of H7N9 influenza A virus between ferrets.

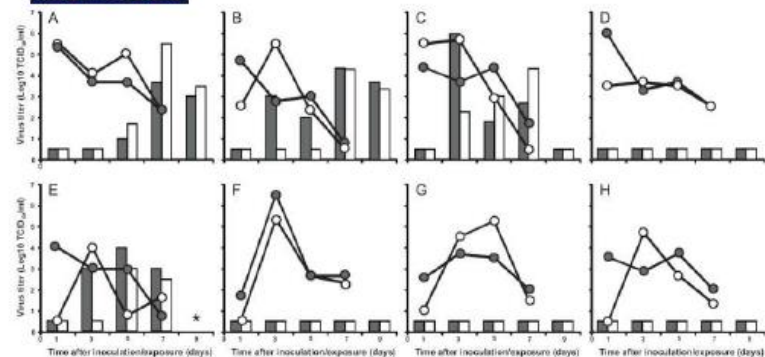


Figure 1 Attachment of two reassortant viruses containing hemagglutinin of either influenza virus A/Shanghai/1/13 (H7 Shanghai) or A/Anhui/1/13 (H7 Anhui) to different parts of the upper and lower human respiratory tract. The attachment of a human seasonal influenza virus (H3N2) and a highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) is shown for comparison.

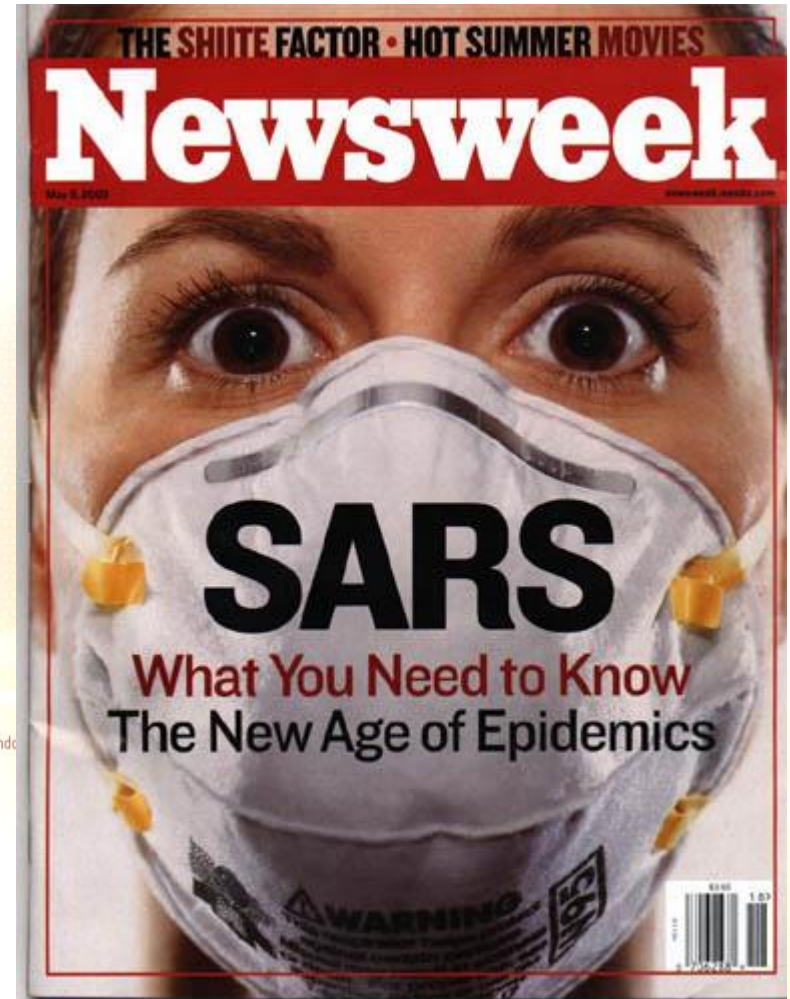
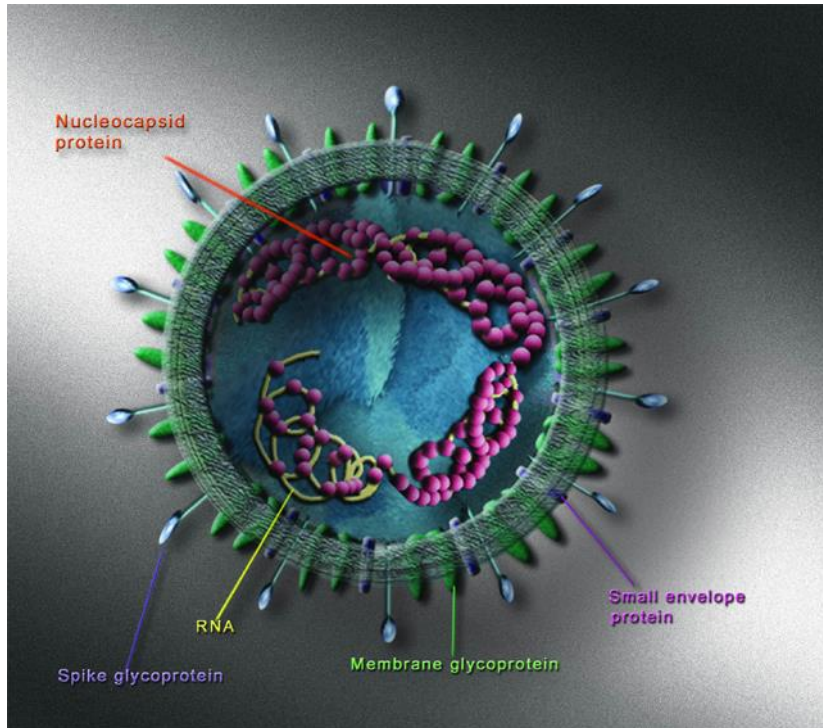
Limited human-to-human transmission: Small clusters!

Chen Z, et al., Emerg Infect Dis. 2014

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ:

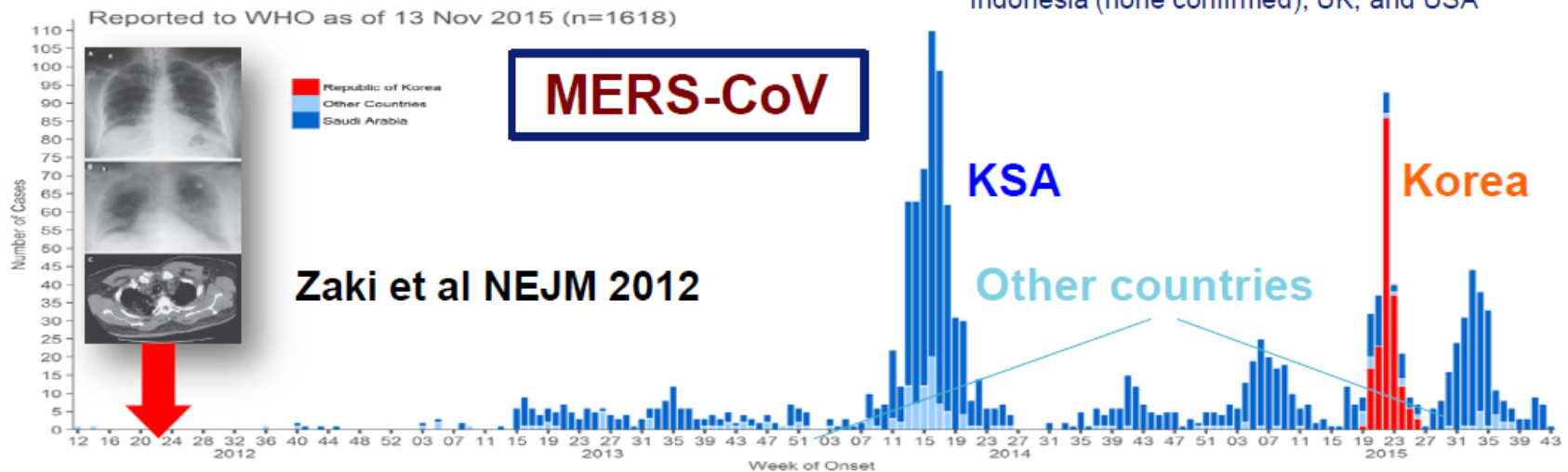
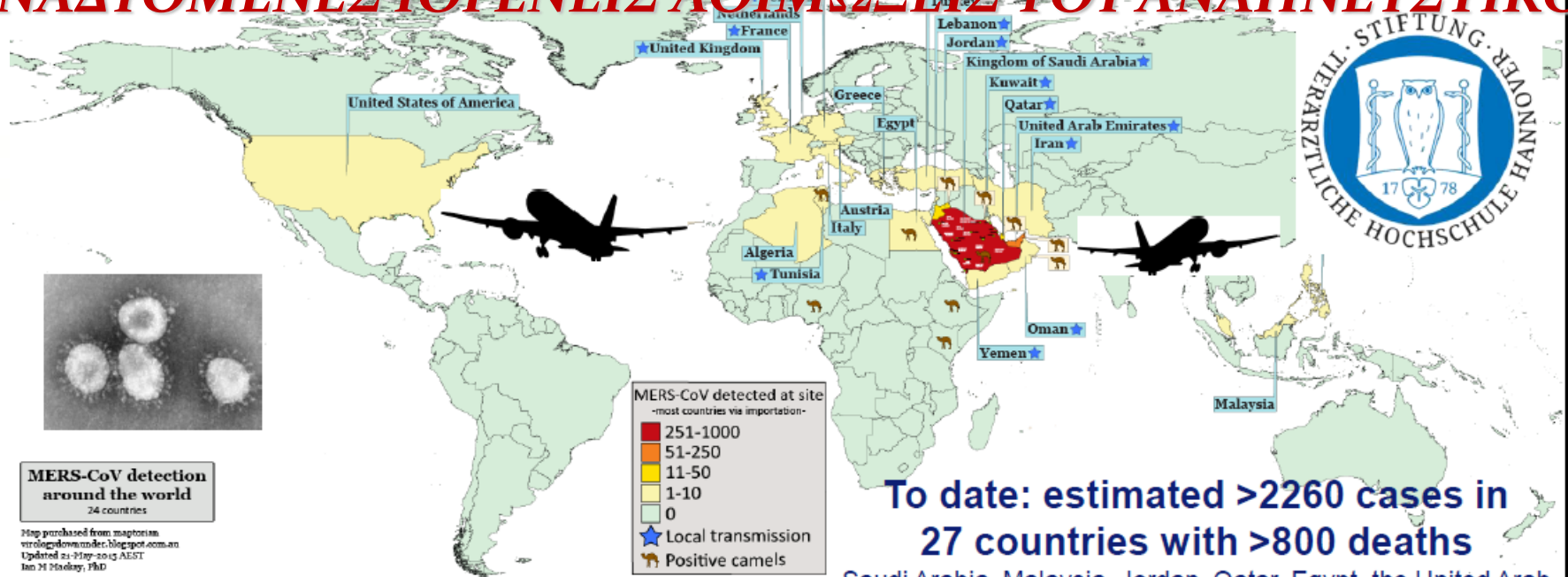
ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΕΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ

SARS



ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ:

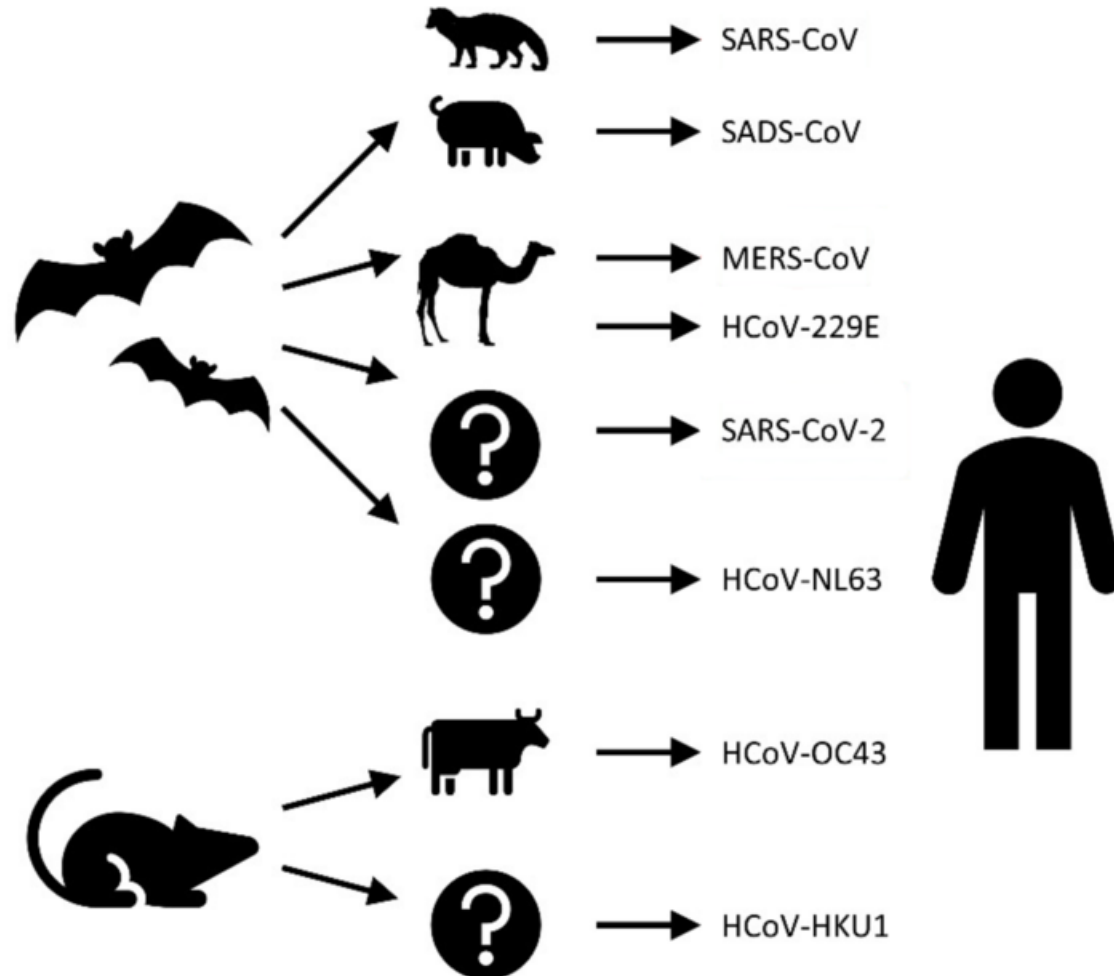
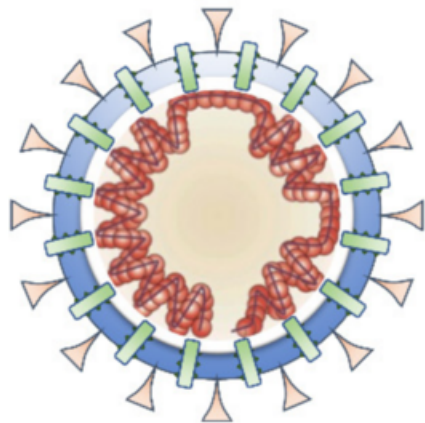
ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΕΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ



Other countries: Algeria, Austria, China, Egypt, France, Germany, Greece, Iran, Italy, Jordan, Kuwait, Lebanon, Malaysia, Netherlands, Oman, Philippines, Qatar, Thailand, Tunisia, Turkey, United Arab Emirates, United Kingdom, United States of America, Yemen
Please note that the underlying data is subject to change as the investigations around cases are ongoing. Onset date estimated if not available.

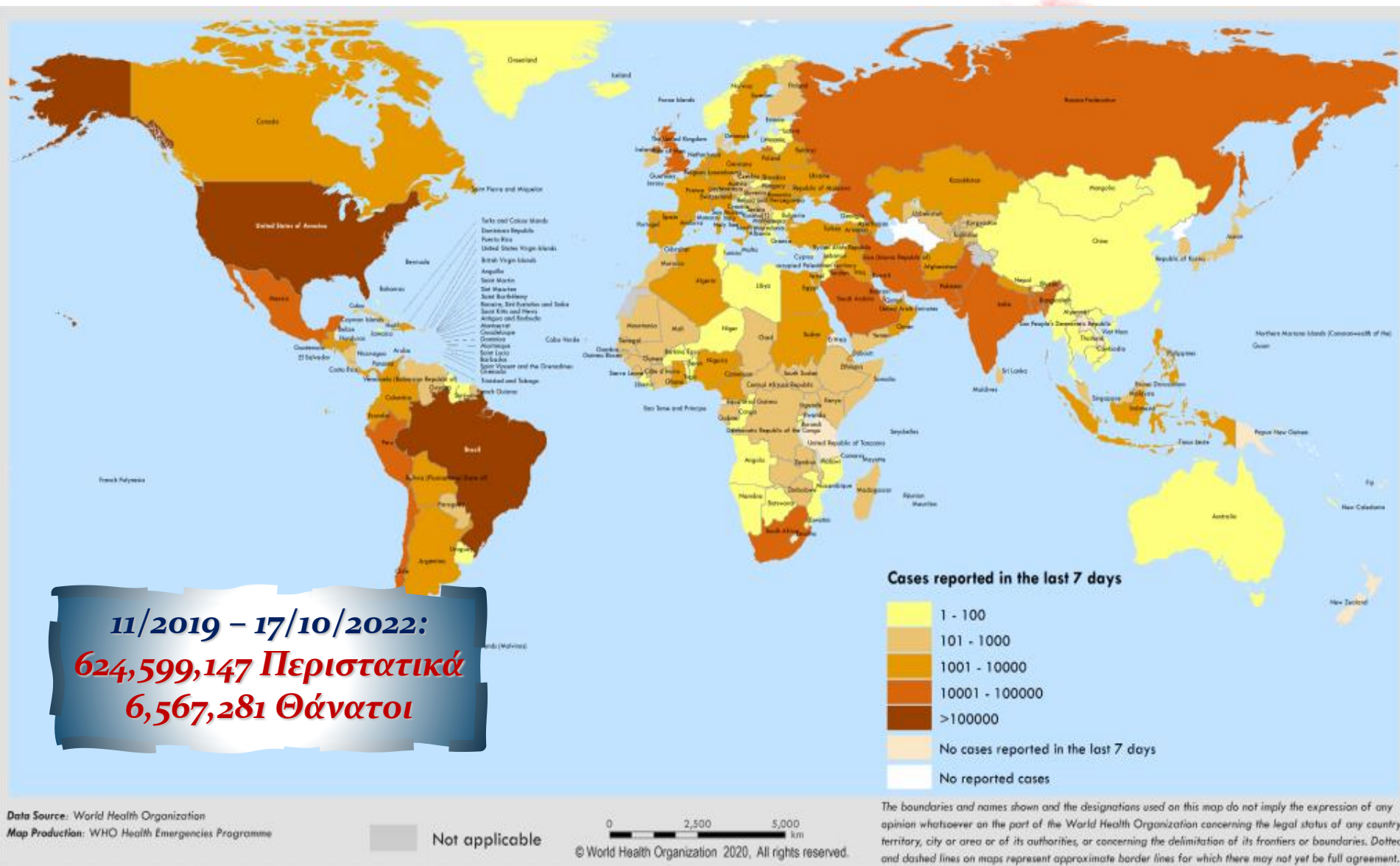
ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ: ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΕΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ CORONA ΙΟΙ (HCoV)

Προέλευση



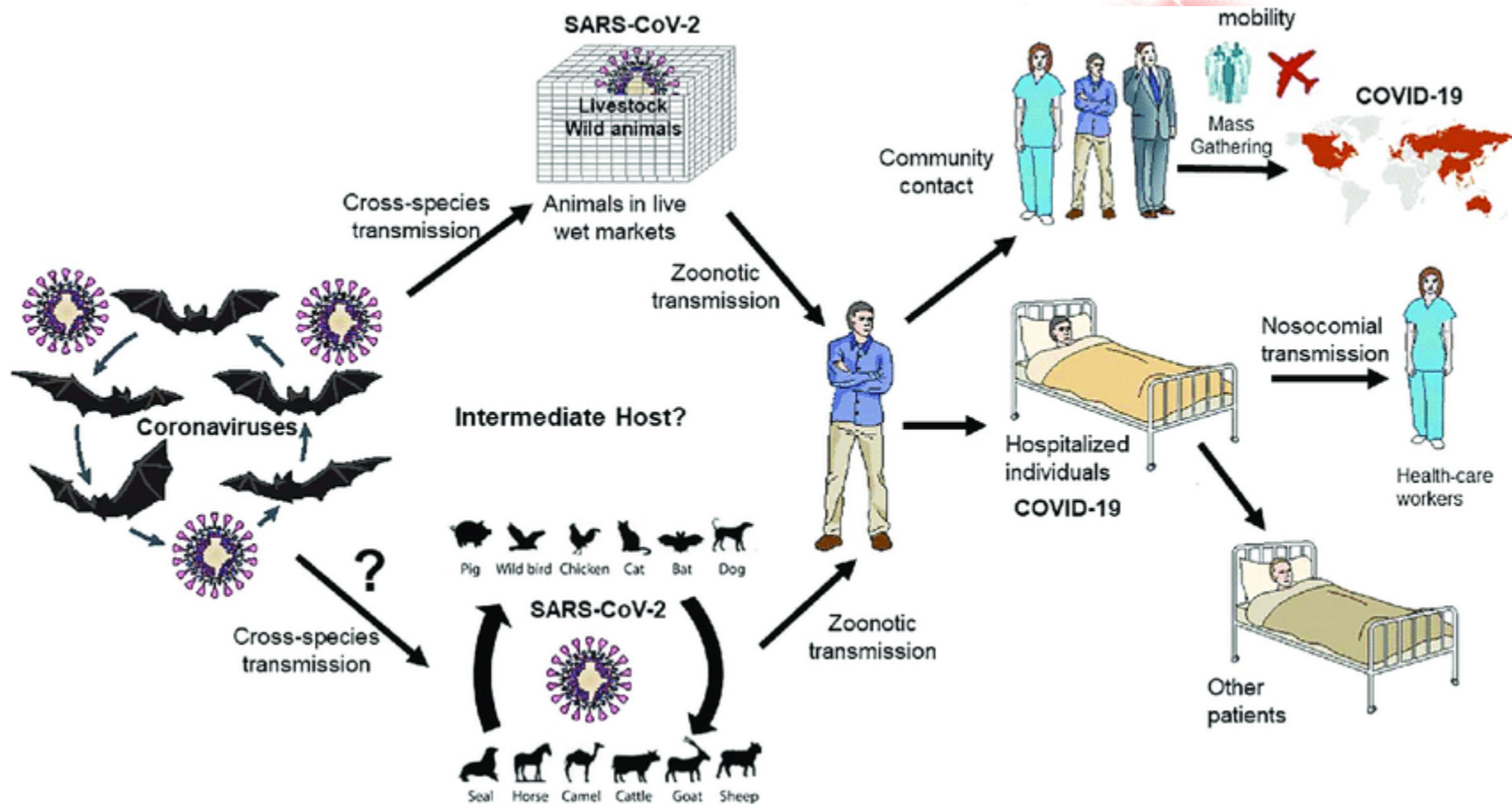
ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ:

ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΕΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ



ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ:

ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΕΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ



SARS-CoV-2

Πιθανή προέλευση και οδοί μετάδοσης

Χρόνος Επώασης: 2-14 Ημέρες

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ:

ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΕΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ

Κοινά συμπτώματα: Πυρετός Ξηρός βήχας Κόπωση

Μη κοινά συμπτώματα:

Πονοκέφαλος

Ρινική συμφόρηση

Πονόλαιμος

Βήχας με φλέγμα

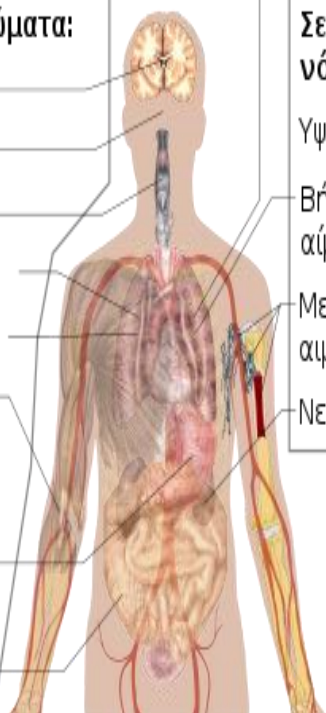
Λαχάνιασμα

Πόνος σε μυς
ή αρθρώσεις

Ρίγος

Ναυτία και/ή
έμετος

Διάρροια



Σε βαριά νόσο:

Υψηλός πυρετός

Βήχας με
αίμα

Μειωμένα λευκά
αιμοσφαίρια

Νεφρική ανεπάρκεια

	MERS-CoV	SARS-CoV	SARS-CoV-2
Ασθένεια	MERS	SARS	COVID-19
Επιδημίες	2012, 2015, 2018	2002–2004	2019–2021 Πανδημία
Επιδημιολογία			
Η/νία 1^{ου} Κρούσματος	Ιούνιος 2012	Νοέμβριος 2002	Δεκέμβριος 2019
Τοποθεσία 1^{ου} Κρούσματος	Jeddah, Σαουδική Αραβία	Shunde, Κίνα	Wuhan, Κίνα
Μ.Ο. Ηλικίας	56	44	56
Αναλογία Φύλων (M:F)	3.3:1	0.8:1	1.6:1
Επιβεβαιωμένα Κρούσματα	2494	8096	624,599,147
Θάνατοι	858	774	6,567,281
Θνητότητα	37%	9.2%	1,05%* (4,4% Πριν το Εμβόλιο)

ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΕΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ

«ΠΑΛΑΙΟΙ» ΙΟΙ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ

Influenza A, D, C, D

Αναπνευστικός Συγκυτιακός Ιός A & B
(Respiratory Syncytial Virus – RSV)

Ιοί Παραγρίππης 1, 2, 3, 4
(Human Parainfluenza

Κοροναϊοί (Human Coronavirus –
HCoV, αρχικά 229E & OC43)

Ρινοϊοί (Human Rhinovirus – HRV,
>160 Ορότυποι συνολικά)

Εντεροϊοί (Human Enterovirus –
(Coxsackie A/CA-, Coxsackie B/CB-,
Enterovirus/EV-, >10 Ορότυποι)

Αδενοϊοί (Human Adenovirus – HAdV,
57 Ορότυποι)

«ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΟΙ» ΙΟΙ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ

2001 Μεταπνευμονοϊός (hMPV)

2003 SARS HCoV

2004 HCoV - NL63 & HKU1

2005 Human Bocavirus (HBoV)

2005 Influenza A H5N1

2007 Polyoma ιοί (HPoV) WU/KI

2009 Influenza A H1N1pdm2009

2011 Influenza A H3N2v

2012 MERS HCoV

2013 Influenza A H7N9

2014 EV-D68 & -C105

2019 SARS CoV-2

ΠΟΙΟ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΕΙΝΑΙ ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ (& ΟΧΙ ΑΠΛΩΣ «ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ»)

- Next Generation Sequencing:** Ο υπέρτατος βαθμός ανάλυσης παθογόνων (και όχι μόνο!) → υπόσχεση για το μέλλον:

Μία Μέθοδος για Κάθε Διαγνωστικό Ζήτημα

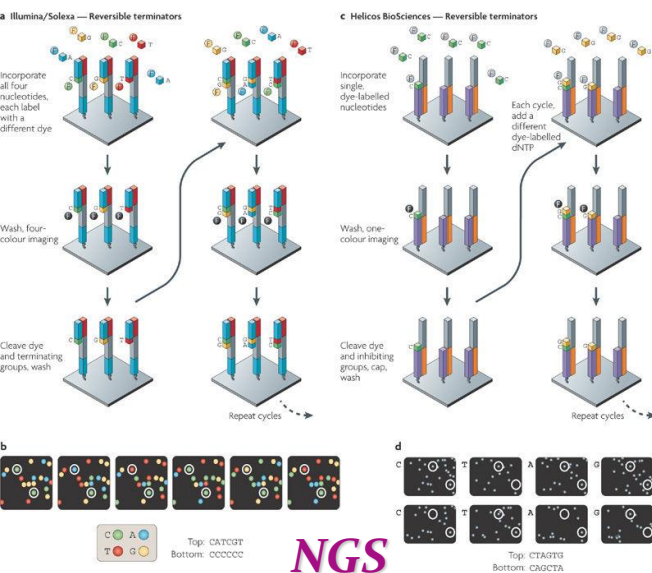
Next Generation Sequencing

Μειονέκτημα: Δυσκολία στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων (Τεράστιος Όγκος Πληροφοριών, Βιοπληροφορική)

Υψηλή εις Βάθος Ανάλυση
(Γονότυπος, Στέλεχος, Ορότυπος,
Γενετική Ποικιλομορφία)

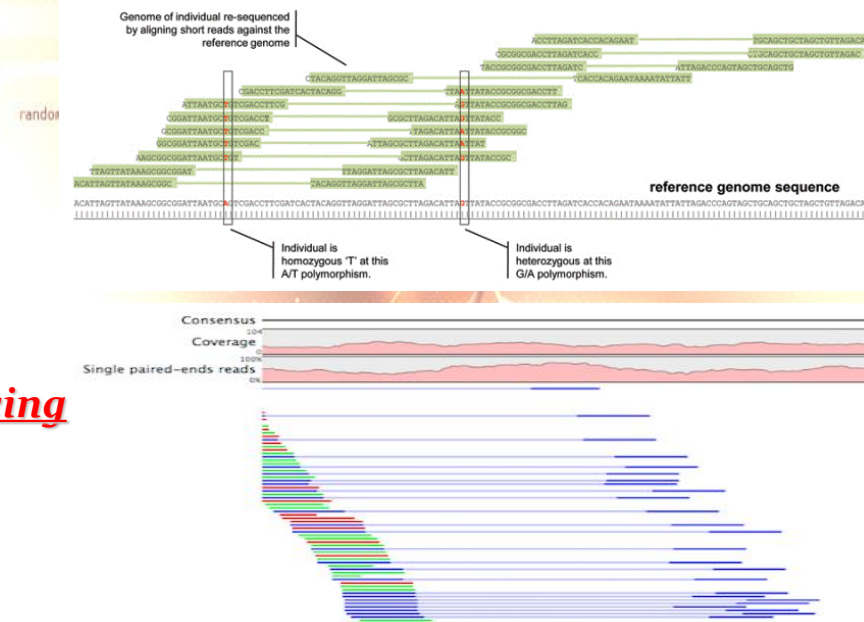
Ανίχνευση και Αναγνώριση
Πάσης Φύσεως Λοιμωδών
Παραγόντων

Χαρακτηρισμός Νέων, Επανεμφανιζομένων και
Αναδυομένων Οροτύπων/Στελεχών Ιών



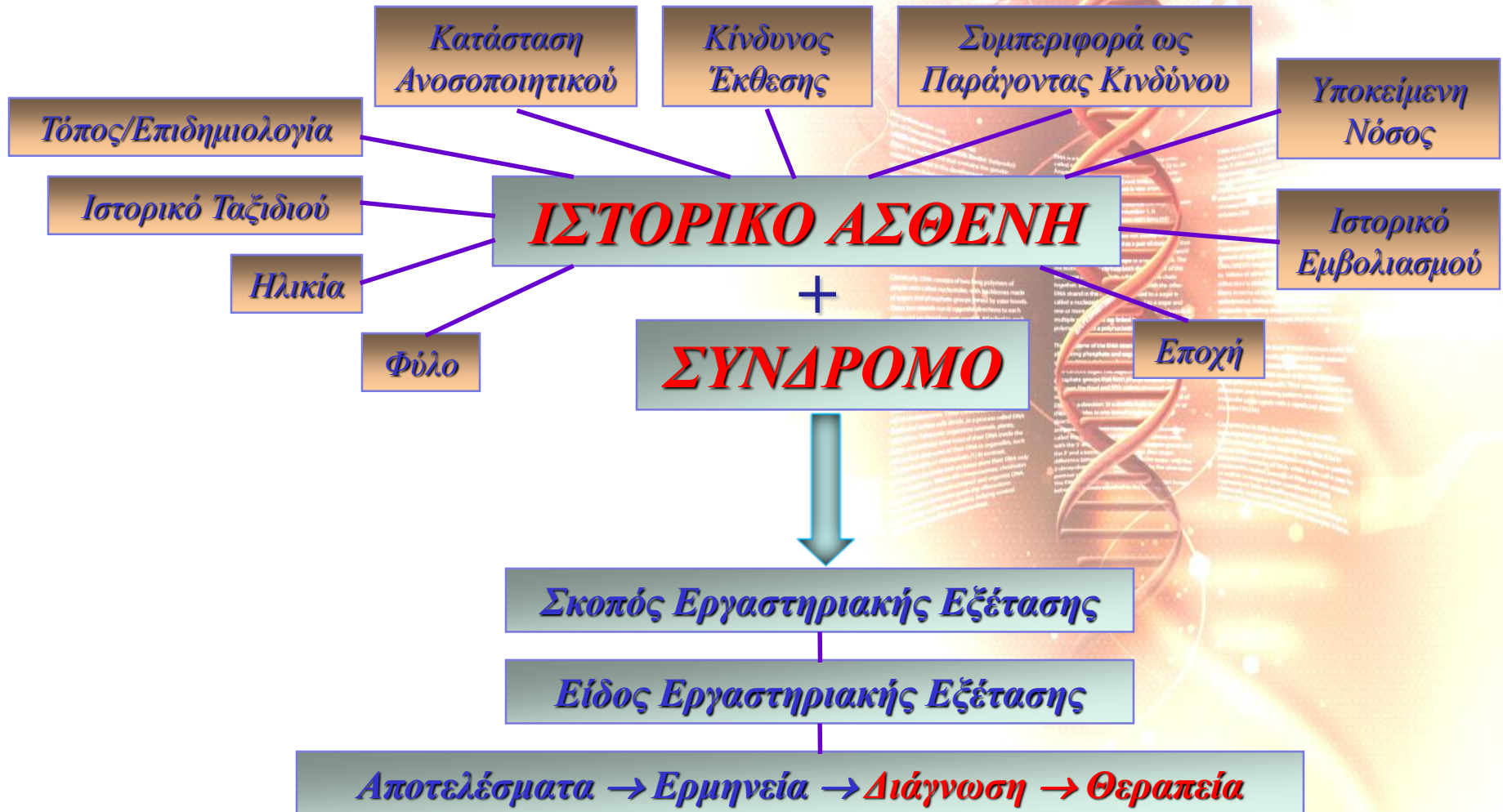
Reference Genome Sequencing

De Novo Sequencing



ΑΡΚΕΙ Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ;

- *Μην ξεχνάμε:*
 - *Ιστορικό Ασθενή*



ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΓΝΩΡΙΖΟΥΜΕ ΌΤΙ Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΠΌ ΜΟΝΗ ΤΗΣ ΔΕΝ ΑΠΟΤΕΛΕΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑ

Ασθενής*

- Ιστορικό
- Υποκείμενο Νόσημα
- Ανοσοεπάρκεια



Είδος/Ιδιότητες Λοιμώδη Παράγοντα*



Κλινικό Δείγμα*

- Είδος
- Χρόνος Λήψης
- Τρόπος Λήψης
- Σημείο Λήψης

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Εξίσωση με πάρα πολλές ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ,
από τον ασθενή έως το τελικό αποτέλεσμα και
την ΕΡΜΗΝΕΙΑ του*

Μεταφορά Κλινικού Δείγματος*



Εργαστηριακές Εξετάσεις*

- Προσωπικό
- Πιστοποίηση
- Εκπαίδευση
- Χώροι
- Εξοπλισμός

ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΓΝΩΡΙΖΟΥΜΕ ΌΤΙ Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΠΌ ΜΟΝΗ ΤΗΣ ΔΕΝ ΑΠΟΤΕΛΕΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑ

ΠΑΝΤΑ ΠΡΟΣΟΧΗ ΣΤΗΝ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

ΓΝΩΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ
ΛΟΙΜΩΔΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ

ΣΥΝΔΕΣΗ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΕΣ
ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ/ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟ
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

ΣΥΝΑΞΙΟΛΟΓΕΙΤΑΙ ΜΕ ΑΛΛΑ
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

ΠΩΣ ΜΑΣ ΒΟΗΘΑΕΙ ΟΛΗ ΑΥΤΗ Η ΤΡΕΧΟΥΣΑ ΓΝΩΣΗ ΝΑ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΟΥΜΕ ΤΙΣ ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ/ΠΑΝΔΗΜΙΕΣ?

♦ Παράδειγμα: **ΠΑΝΔΗΜΙΑ COVID-19**

ΑΡΧΙΚΑ:

**ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ
(PCR, NGS)**

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ
ΑΙΤΙΑΣ
(IOI CORONA)**

**ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ
ΣΤΕΛΕΧΩΝ
(ΟΧΙ SARS Ή MERS, ΚΑΤΙ
ΝΕΟ...)**

**ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ
PCR
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ**

ΠΩΣ ΜΑΣ ΒΟΗΘΑΕΙ ΟΛΗ ΑΥΤΗ Η ΤΡΕΧΟΥΣΑ ΓΝΩΣΗ ΝΑ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΟΥΜΕ ΤΙΣ ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ/ΠΑΝΔΗΜΙΕΣ?

♦ Παράδειγμα: **ΠΑΝΔΗΜΙΑ COVID-19**

**ΣΤΗ
ΣΥΝΕΧΕΙΑ:**

**ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ
(PCR, NGS)**

**ΤΑΧΕΙΑ
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ
SARS-CoV-2**

**ΑΜΕΣΗ ΛΗΨΗ
ΜΕΤΡΩΝ
ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ**

**ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ
ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΩΝ
ΓΕΝ. ΠΑΡΑΛΛΑΓΩΝ**

**ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ,
ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ**

**ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ
ΕΜΒΟΛΙΩΝ -
ΑΝΤΙ-ΙΙΚΩΝ**

**ΠΡΟΛΗΨΗ,
ΘΕΡΑΠΕΙΑ**

ΠΩΣ ΜΑΣ ΒΟΗΘΑΕΙ ΟΛΗ ΑΥΤΗ Η ΤΡΕΧΟΥΣΑ ΓΝΩΣΗ ΝΑ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΟΥΜΕ ΤΙΣ ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ/ΠΑΝΔΗΜΙΕΣ?

♦ Παράδειγμα: **ΠΑΝΔΗΜΙΑ COVID-19**

ΚΑΙ ΜΗΝ
ΞΕΧΝΑΜΕ:

ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ
(PCR, NGS)

ΤΑΧΕΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ
SARS-CoV-2 ΜΑΣ ΔΙΝΕΙ
ΤΗ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΓΙΑ

***ΤΟ ΜΕΓΑΛΟ ΣΤΟΙΧΗΜΑ!!!**
(Μεγάλος Αρωγός η Πληροφορική!)

ΑΜΕΣΗ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑ ΜΕΓΑΛΟΥ
ΟΓΚΟΥ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΓΙΑ
ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟ ΠΑΝΔΗΜΙΑΣ

ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΓΝΩΡΙΖΟΥΜΕ ΌΤΙ Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΠΟ ΜΟΝΗ ΤΗΣ ΔΕΝ ΑΠΟΤΕΛΕΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑ

❖ Ρόλος ιδιαίτερων βιολογικών χαρακτηριστικών ενός παθογόνου μικροοργανισμού στο διαγνωστικό αποτέλεσμα

- ❑ Κύκλος Ζωής – Είδος Γενετικού Υλικού & Στάδιο Προϊού για Ιούς
- ❑ Διάρκεια Ιαιμίας
- ❑ Διάρκεια φορτίου στο συγκεκριμένο κλινικό δείγμα (ΕΝΥ, κόπρανα)
 - ✓ Παράδειγμα: Τα κόπρανα ΕΙΝΑΙ ΚΑΛΥΤΕΡΟ δείγμα από το ΕΝΥ για ανίχνευση εντεροϊών σε περιστατικά ιογενούς μηνιγγίτιδας – ΓΙΑΤΙ;

Μεγαλύτερος Χρόνος Απέκκρισης στα Κόπρανα

- ❑ Γενετική Ποικιλομορφία (Μεταλλάξεις, Γενετικοί Ανασυνδυασμοί)
- ❑ Ελυτροφόροι Ιοί και RNA Ιοί → Λιγότερο ανθεκτικοί σε μακροχρόνια αποθήκευση

ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΓΝΩΡΙΖΟΥΜΕ ΌΤΙ Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΠΟ ΜΟΝΗ ΤΗΣ ΔΕΝ ΑΠΟΤΕΛΕΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑ

- ❖ **Ρόλος ιδιαίτερων βιολογικών χαρακτηριστικών ενός παθογόνου μικροοργανισμού στο διαγνωστικό αποτέλεσμα**
 - ▣ Παθοφυσιολογία σε συγκεκριμένους πληθυσμούς ατόμων που εξετάζονται, π.χ. CMV → ανοσοκατεσταλμένοι, HIV(+), αιματολογικοί/μεταμοσχευμένοι (GVHD/Graft-Versus-Host-Disease), κ.λ.π.
 - ▣ **ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ (Νόμος Bayes): Ευαισθησία Διαγνωστικού Τεστ ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ ΚΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΣΕ ΕΠΙΔΗΜΙΚΕΣ Η΄ ΜΗ-ΕΠΙΔΗΜΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΔΟΥΣ-ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ**

Κίνδυνος για ΘΕΤΙΚΑ Η΄ ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΧΩΡΙΣ ΚΛΙΝΙΚΟ ΑΝΤΙΚΡΥΣΜΑ, Η΄ ΜΕ ΔΥΣΑΡΕΣΤΕΣ ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΑΣΘΕΝΗ

ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΓΝΩΡΙΖΟΥΜΕ ΌΤΙ Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΠΟ ΜΟΝΗ ΤΗΣ ΔΕΝ ΑΠΟΤΕΛΕΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑ

◆ Κλινικό Δείγμα – *Είδος Δείγματος, Χρόνος Λήψης, Σημείο Λήψης, Ποσότητα Λήψης, Τρόπος Λήψης και Μεταφοράς στο Εργαστήριο*

- Π.χ. Λοίμωξη Κ.Ν.Σ.



→ ΕΝΥ, Αποθήκευση -20°C ή Άμεση Μεταφορά

→ Κόπρανα (Εντεροϊοί), Αποθήκευση $+2^{\circ}\text{C} - +8^{\circ}\text{C}$ έως 1 εβδομάδα ή Άμεση Μεταφορά

- Π.χ. Λοίμωξη Κατωτέρου Αναπνευστικού



→ Σωστό Δείγμα (BAL) και Σωστός Τρόπος Λήψης

→ ΌΧΙ Δείγμα Επιμολυσμένο από Ανώτερο Αναπνευστικό (Φυσ. Χλωρίδα)

ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΓΝΩΡΙΖΟΥΜΕ ΌΤΙ Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΠΟ ΜΟΝΗ ΤΗΣ ΔΕΝ ΑΠΟΤΕΛΕΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑ

◆ Κλινικό Δείγμα – Είδος Δείγματος, Χρόνος Λήψης, Σημείο Λήψης, Ποσότητα Λήψης, Τρόπος Λήψης και Μεταφοράς στο Εργαστήριο

- **Παράδειγμα EV-D68** → **Νέα Δεδομένα! Προσθήκη Δείγματος Αναπνευστικού στη Διάγνωση Λοίμωξης ΚΝΣ**

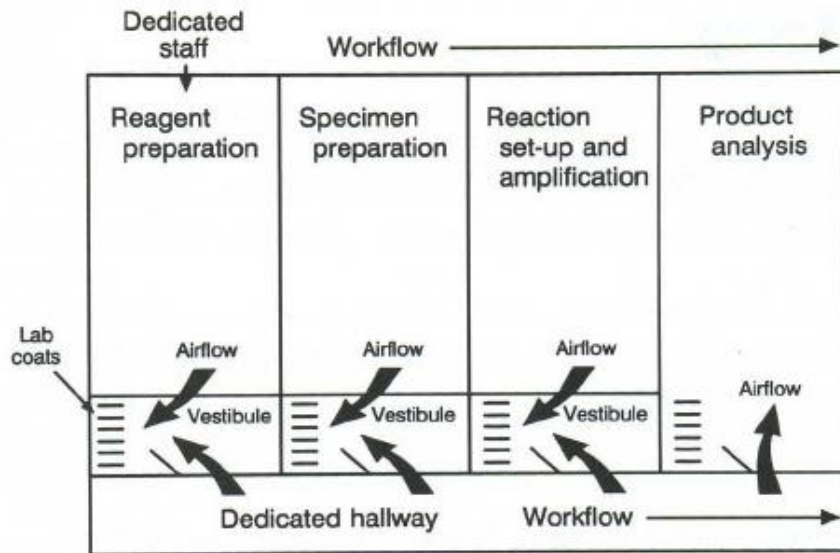
Recommended clinical sample types for EV diagnosis in different clinical presentations.

Presentation	Sample types*	Comments
Meningitis/meningoencephalitis	CSF, stool AND respiratory sample, possible blood	EV RNA detectable in CSF in the majority of meningitis cases by PCR but inconsistently in encephalitis cases; EV excretion in throat and stool samples is prolonged but detection does not automatically demonstrate aetiological link.
Neonatal sepsis	CSF, stool, blood AND respiratory sample	Often difficult to distinguish from meningitis. Viral load can be higher in blood than in CSF, but requires further studies. Human parechovirus testing should also be performed, either as a first line investigation or if EV testing is not diagnostic.
Acute flaccid paralysis/myelitis	Respiratory, CSF, stool AND blood sample*	CSF sample should be tested for enteroviruses, but in many cases of EV-D68 and EV-A71 virus has been only detectable in respiratory tract specimen and/or stool specimen. Therefore testing of respiratory specimen are necessary for any clinical case with CNS/paralysis/myelitis involvement. In cases of classical AFP (without myelitis), consider also possibility of polio and obtain stool sample for the virus detection.
HFMD/other rash	Vesicle fluid , respiratory sample and/or stool	Usually high viral loads in vesicle fluid. CV-A6 has been associated with onychomadesis (nail shedding) and virus has also been recovered from finger nail in HFMD cases.
Respiratory disease	Respiratory sample , possibly stool	Usually nasopharyngeal aspirates or swabs recommended. Consider testing for both HRV and EV, and consider also cross-reactivity of PCR used.
Myocarditis	Stool and respiratory sample, blood and/or heart biopsy	Typing might be helpful as CV-Bs are typically associated with myocarditis. Tissue biopsy can be used to confirm diagnosis.
Conjunctivitis	Eye swab	Viral haemorrhagic conjunctivitis caused by enteroviruses is highly infectious.

CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; CV, coxsackie virus; EV, enteroviruses, HFMD, hand, foot and mouth disease; PCR, polymerase chain reaction. * Primary sample type has been marked as bold. ** Base line blood sample should to be collected before any blood products (i.e. intravenous immunoglobulin) are administered.

ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΓΝΩΡΙΖΟΥΜΕ ΌΤΙ Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΠΟ ΜΟΝΗ ΤΗΣ ΔΕΝ ΑΠΟΤΕΛΕΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑ

Καλή Εργαστηριακή Πρακτική - Χωροταξική Διευθέτηση Εργαστηρίου Μοριακής Διαγνωστικής



Σαφής Διαχωρισμός Χώρων για αποφυγή Επιμολύνσεων:

- Προετοιμασία Αντιδραστηρίων
- Προετοιμασία Δειγμάτων
- Εκχύλιση Γενετικού Υλικού
- Προετοιμασία Αντίδρασης
- Ανάλυση Προϊόντων



ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΓΝΩΡΙΖΟΥΜΕ ΌΤΙ Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΠΟ ΜΟΝΗ ΤΗΣ ΔΕΝ ΑΠΟΤΕΛΕΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑ

❖ Καλή Εργαστηριακή Πρακτική - Ποιοτικός Έλεγχος

┐ *Εσωτερικός:*

- ✓ Εσωτερικοί Μάρτυρες για έλεγχο εκχύλισης γενετικού υλικού/αναστολής αντίδρασης
- ✓ Θετικός και Αρνητικός Μάρτυρας
- ✓ **Ποσοτική PCR:** Θετικά Πρότυπα Βαθμονόμησης

- ### ┐ *Εξωτερικός:*
- Συστηματική διανομή κλινικών δειγμάτων από πιστοποιημένους οργανισμούς (π.χ. QCMD, NEQAS) και έλεγχος απόδοσης εργαστηρίου στη διερεύνηση των δειγμάτων

ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΓΝΩΡΙΖΟΥΜΕ ΌΤΙ Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΠΟ ΜΟΝΗ ΤΗΣ ΔΕΝ ΑΠΟΤΕΛΕΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑ

❖ Καλή Εργαστηριακή Πρακτική - Ψευδώς Θετικά/Ψευδώς Αρνητικά αποτελέσματα

- ❑ **Ψευδώς Θετικά:** Επιμόλυνση από
 - ✓ Κακή εργαστηριακή πρακτική
 - ✓ Έλλειψη καθαρισμού/αποστείρωσης χώρου (π.χ. UV) από προηγούμενες εφαρμογές
- ❑ **Ψευδώς Αρνητικά:**
 - ✓ Ύπαρξη αναστολέων στο κλινικό δείγμα
 - ✓ Κακή λήψη-μεταφορά-αποθήκευση κλινικού δείγματος
 - ✓ Ακατάλληλα αντιδραστήρια
 - ✓ Μεταλλάξεις – Γενετικοί Ανασυνδυασμοί → **Γενετική Ποικιλομορφία**, Νέα Στελέχη Μικροοργανισμών

ΑΝΤΙ ΕΠΙΛΟΓΟΥ

**ΟΙ ΝΕΟΤΕΡΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΕΊΝΑΙ ΕΝΑ
ΠΑΝΙΣΧΥΡΟ ΟΠΛΟ ΠΟΥ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΞΕΡΟΥΜΕ ΠΩΣ ΝΑ ΤΟ
ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΟΥΜΕ**



ΣΑΣ ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ