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»
nsiaf@med.uoa.gr

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΙΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΜΑΘΗΜΑΤΟΣ

- *Κατανόηση της Επίδρασης των Ιών στις Ανθρώπινες Κοινωνίες, με έμφαση στις Ασθένειες και στις Επιδημίες/Πανδημίες*

- *Συμβατικές και Νεότερες Διαγνωστικές Μέθοδοι: Ποια είναι τα Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματά τους?*

- *Πως μας βοηθούν οι Μοριακές Μέθοδοι στην Καταπολέμηση των Ιογενών Επιδημιών?*

- *Τι χρειάζεται για τη σωστή εφαρμογή των σύγχρονων διαγνωστικών μεθόδων και γιατί δεν αποτελούν ακόμα πανάκεια?*

- *Ποιο είναι το Μέλλον των Διαγνωστικών Μεθόδων?*

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΙΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ

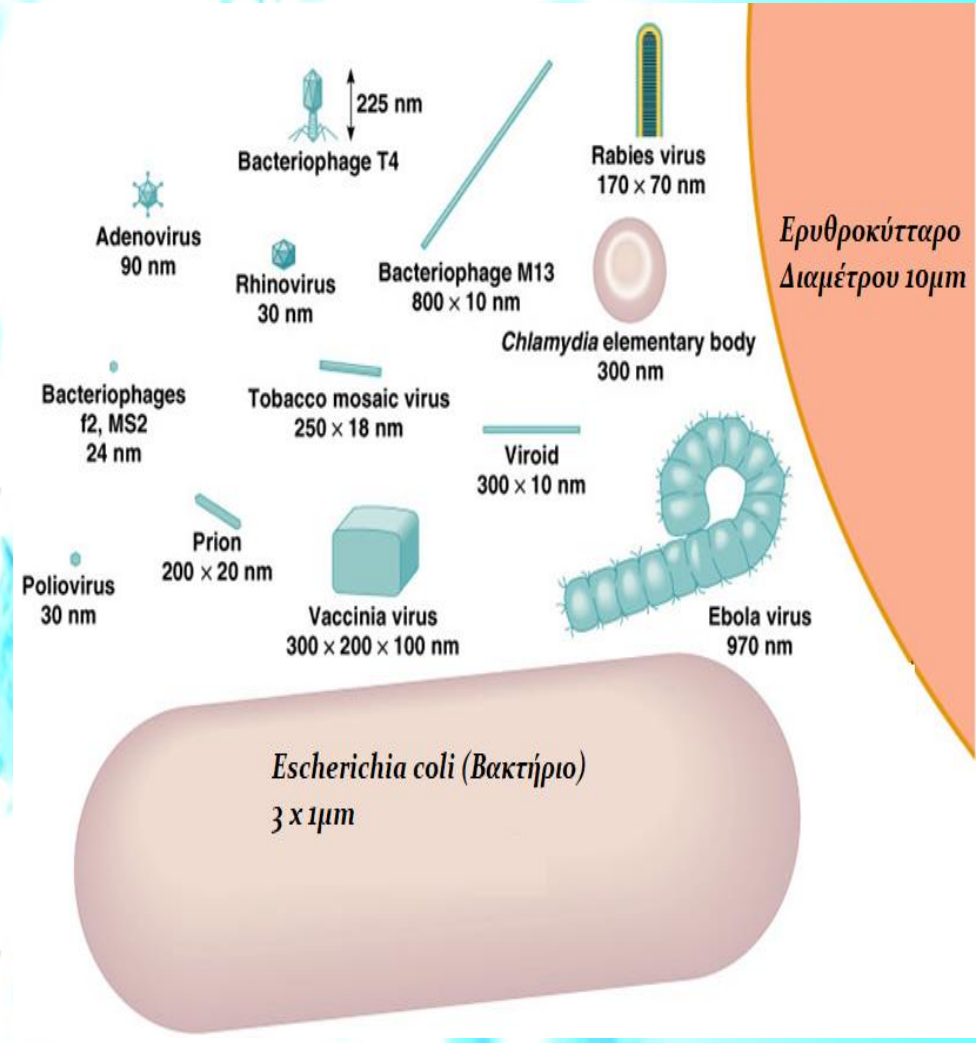
- *Τι είναι οι Ιοί; (Εμφάνιση, Προέλευση, Ανακάλυψη – Ορόσημα στην Ιολογία, στις Ιογενείς Λοιμώξεις και στις Επιδημίες/Πανδημίες από Ιούς)*
- *Πως εξελίχθηκαν και εξελίσσονται οι Ιοί;*
- *Η Επίδραση των Ιών στις Ανθρώπινες Κοινωνίες*
  - *Ιογενείς Ασθένειες, Επιδημίες, Πανδημίες: Ανθρωπογενείς Παράγοντες*
  - *Ιογενείς Ασθένειες, Επιδημίες, Πανδημίες: Ιογενείς Παράγοντες*
  - *Παραδείγματα: Ο Ιός της Γρίππης*
    Εντεροϊός D68: Αναδυόμενο Παθογόνο
- *Εργαστηριακές Μέθοδοι στην Ιολογία: Παρελθόν, Παρόν & Μέλλον*
  - *Απομόνωση Ιών*
  - *Ανίχνευση Ιών: Έμμεση και Άμεση*
  - *Μοριακές Μέθοδοι: Σκοπός*
    - *Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR)*
    - *Πέρα από την PCR: Αλληλούχηση Γενετικού Υλικού (Sequencing)*
    - *Εφαρμογές Μοριακών Μεθόδων στην Ιολογία*
    - *Η Εξέλιξη των Μοριακών Μεθόδων στην Ιολογία*
      - ✓ *Συνδρομική Διάγνωση*
    - *Πέρα από τη Συνδρομική Ανίχνευση:*
      - ✓ *Το Παράδειγμα των Εντεροϊών*
      - ✓ *Αναδυόμενες Ιογενείς Λοιμώξεις του Αναπνευστικού*
    - *Πανδημία COVID-19: Παράδειγμα του πως μας βοηθάει η τρέχουσα γνώση να αντιμετωπίσουμε της επιδημίες/πανδημίες*
    - *Η Μοριακή Μεθοδολογία δεν αποτελεί Πανάκεια*

ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΙΟΙ;

Πολύ Μικρά «Παράσιτα» που Επιβιώνουν Μόνο μέσα σε Κύτταρα

Διαφορές με υπόλοιπους μικροοργανισμούς

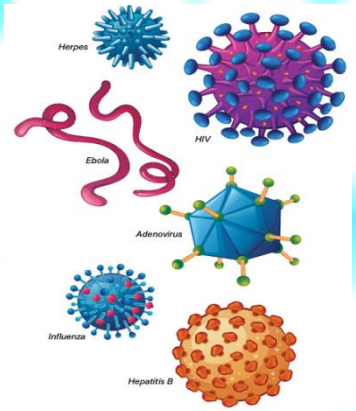
- ***Οι μικρότεροι σε μέγεθος λοιμογόνοι παράγοντες***
- ***Δεν είναι Κύτταρα***
- ***Δεν έχουν δικό τους Μεταβολισμό – Εξαρτώνται πλήρως από τους μεταβολικούς μηχανισμούς του κυττάρου που έχουν προσβάλει***



ΠΟΛΛΑ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΜΕΓΕΘΗ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΑ

ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΙΟΙ;

Τελικά, είναι ζωντανοί οργανισμοί, ή όχι;



Ιδιότητες Ζωντανών Οργανισμών		Ιδιότητες των Ιών
Αναπνέουν		Δεν αναπνέουν
Έχουν Μεταβολισμό		Δεν έχουν μεταβολισμό
Μεγαλώνουν		Δε μεγαλώνουν
Αναπαράγονται	=	**Αναπαράγονται!**
Κληρονομικότητα	=	**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***

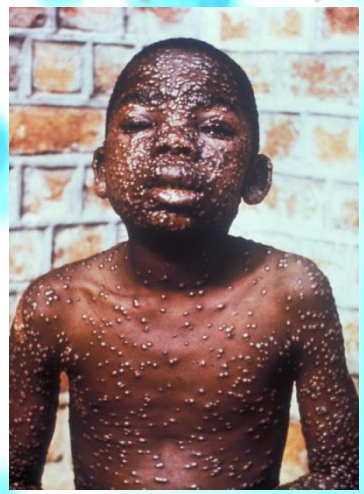
Φυτά

*Ιός της Μωσαϊκής του Καπνού (**TMV**)*

Ζώα

*Ιός Ασθένειας Ποδών και Στόματος (**FMDV**)*

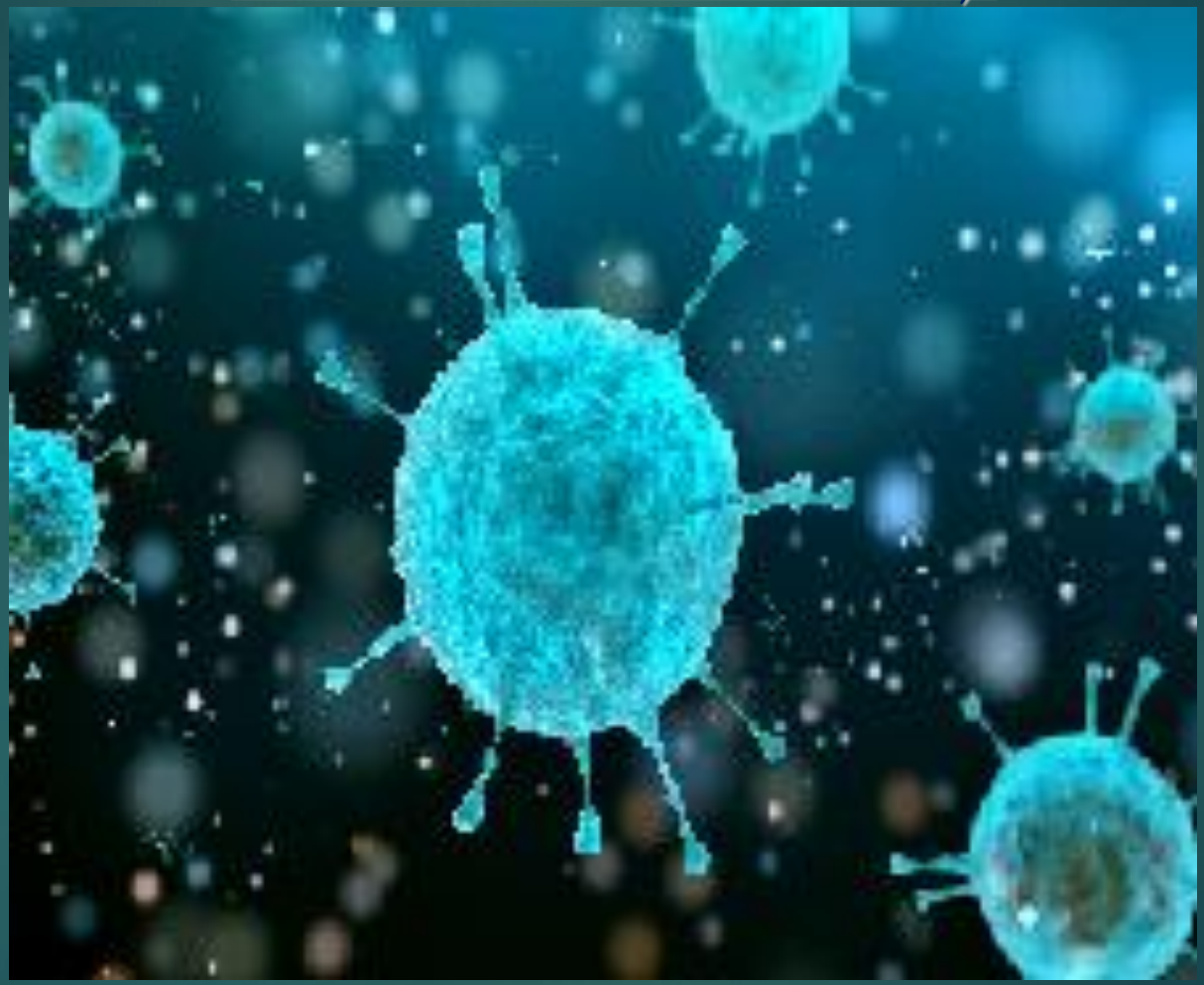
Άνθρωπος



Ιός Ευλογιάς

ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΙΟΙ;

Οι Ζωντανοί Οργανισμοί Επιβιώνουν σε Έναν Ωκεανό από Ιούς!

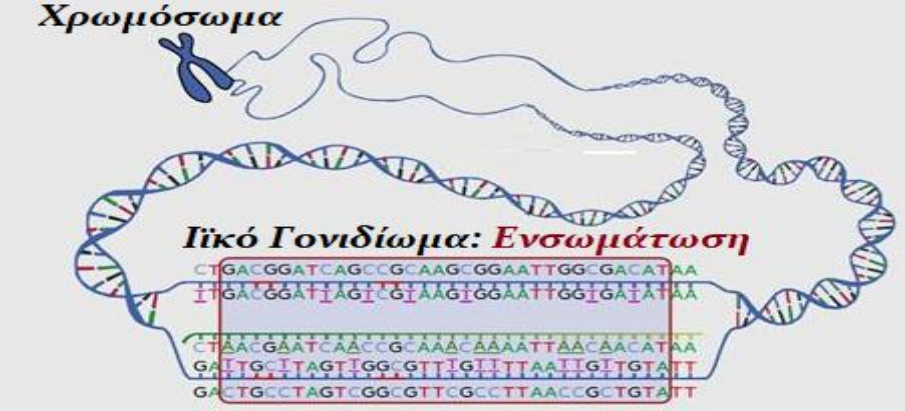


ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΙΟΙ;

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***

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

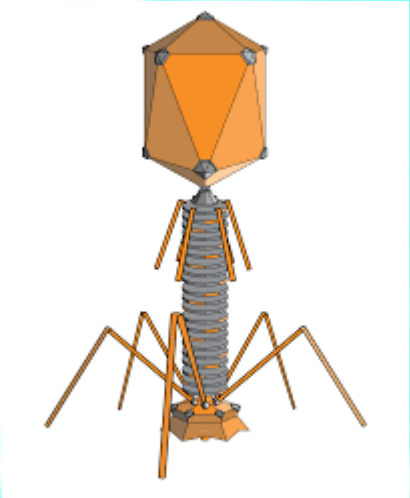
ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΙΟΙ;

Οι Ζωντανοί Οργανισμοί Επιβιώνουν σε Έναν Ωκεανό από Ιούς!

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

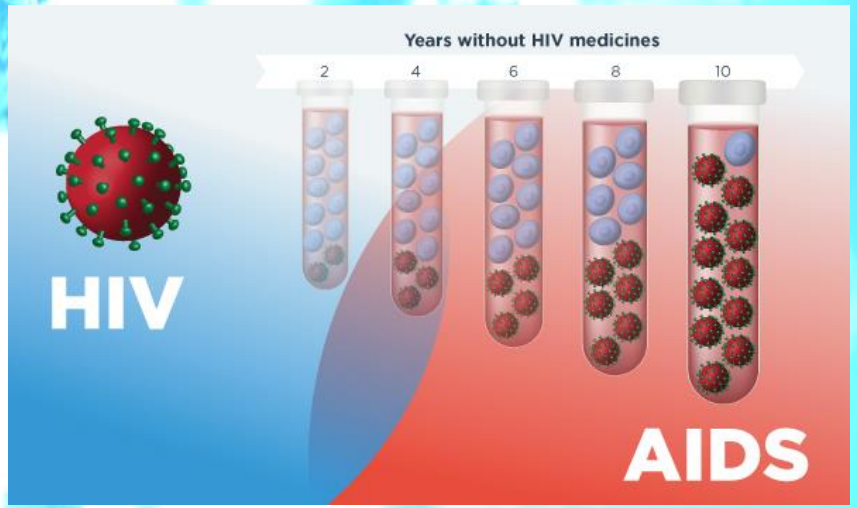
1000x Μεγαλύτερη Βιομάζα από εκείνη των Ελεφάντων

Μήκος όλων των Βακτηριοφάγων: 200 Εκατομμύρια Έτη Φωτός!



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

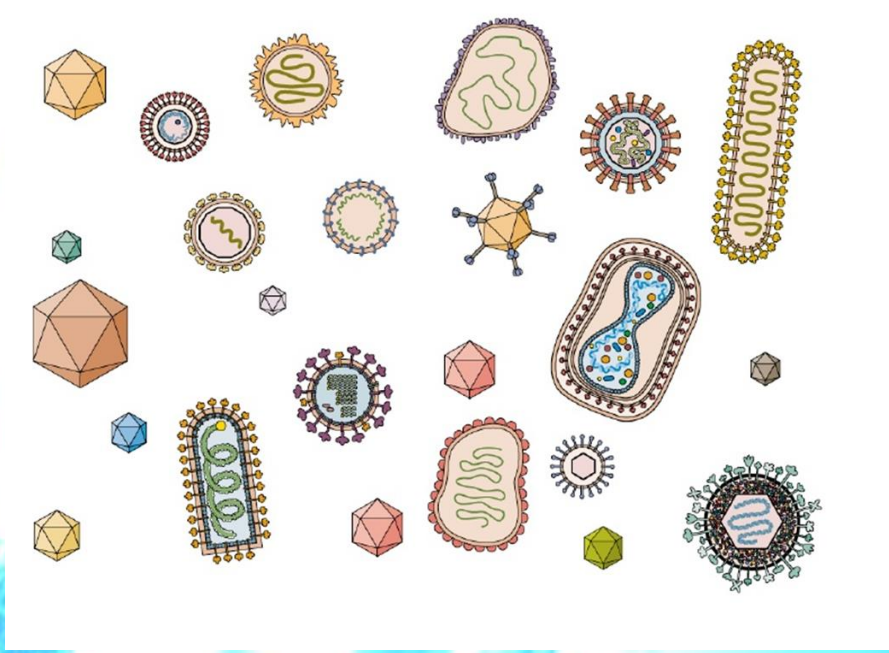
Μεγάλη πιθανότητα για στελέχη ανθεκτικά σε κάθε είδος φαρμάκου που έχουμε σήμερα



ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΙΟΙ;

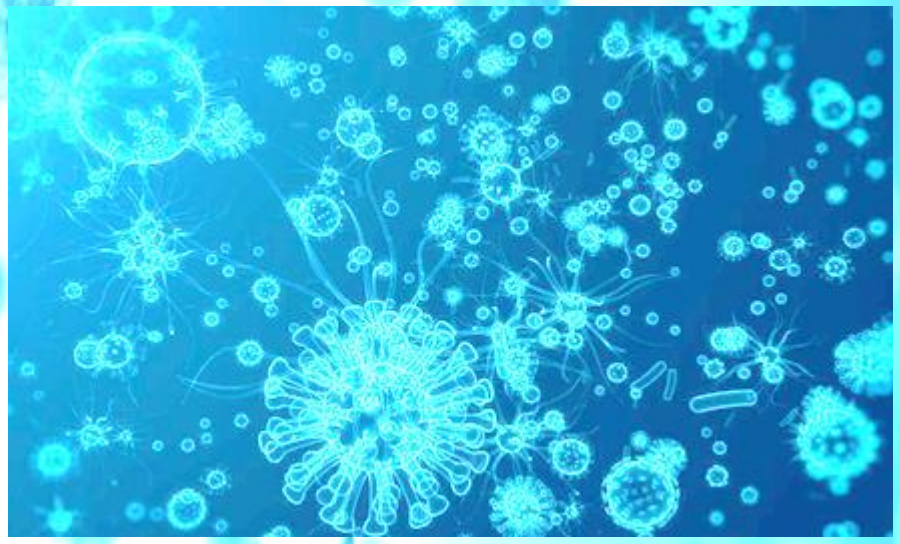
- *40000 Ιοί Βακτηρίων, Φυτών και Ζώων που ταξινομούνται σε 3 Τάξεις, 73 Οικογένειες, 287 Γένη και 1950 Είδη*

  (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).

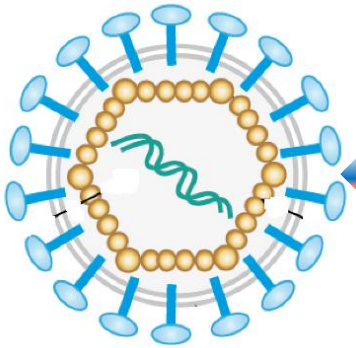


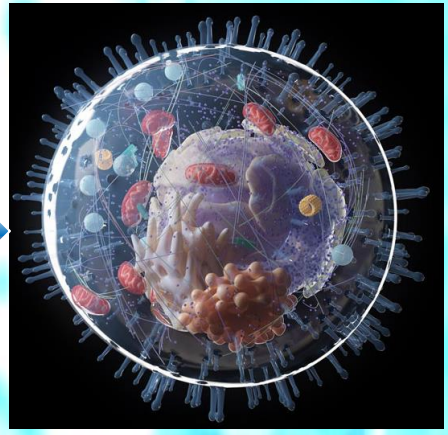
ΠΩΣ ΕΜΦΑΝΙΣΤΗΚΑΝ ΟΙ ΙΟΙ;

ΔΕΝ ΥΠΑΡΧΕΙ ΣΑΦΗΣ ΑΠΑΝΤΗΣΗ

ΠΙΘΑΝΕΣ ΘΕΩΡΙΕΣ:

- *Πρόδρομες Μοριακές Μορφές Κυτταρικών Οργανισμών;*

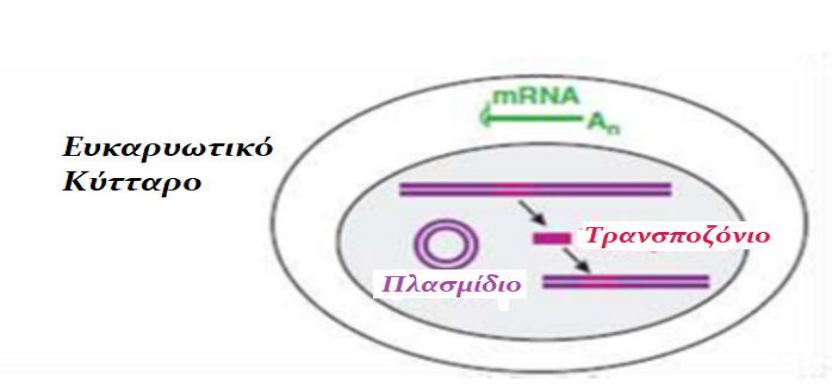




Ιός

Κύτταρο

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

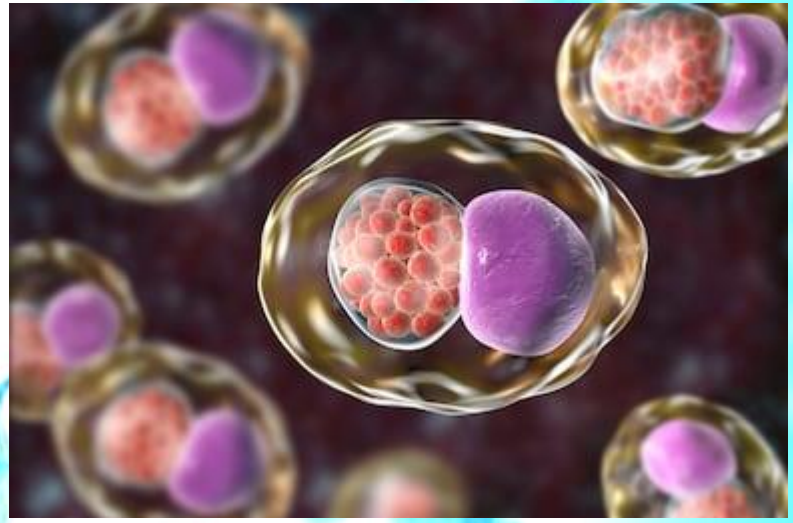


ΠΩΣ ΕΜΦΑΝΙΣΤΗΚΑΝ ΟΙ ΙΟΙ;

ΔΕΝ ΥΠΑΡΧΕΙ ΣΑΦΗΣ ΑΠΑΝΤΗΣΗ

ΠΙΘΑΝΕΣ ΘΕΩΡΙΕΣ:

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



Πολλές βιολογικές διαδικασίες έχουν συμβάλει

Ο Τροπισμός* των Ιών ίσως σχετίζεται με την προέλευσή τους

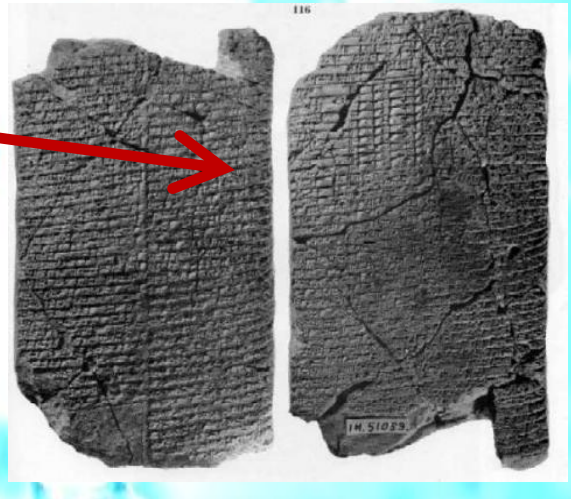
*** «Προτίμηση» (Προσαρμογή) σε συγκεκριμένα κύτταρα, ιστούς, οργανισμούς**

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, 23ος 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 5ου 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 10ος Αιώνας μ.Χ.:*** ***Ρινική εμφύσηση σκόνης από κρούστα εξανθημάτων ευλογιάς (1η 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 1η 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)

Φίλτρο Pasteur Chamberland

Κατακράτηση βακτηρίων λόγω μικροσκοπικής διαμέτρου πόρων πορσελάνης

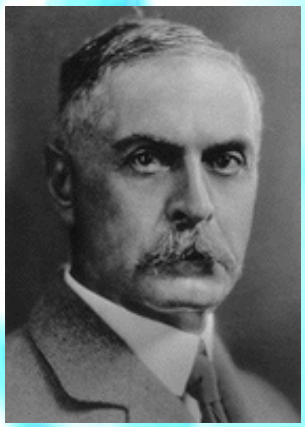
Εκχύλισμα «Άρρωστου» Φυτού

Μετάδοση Ασθένειας

ΠΩΣ ΑΝΑΚΑΛΥΦΘΗΚΑΝ ΟΙ ΙΟΙ

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

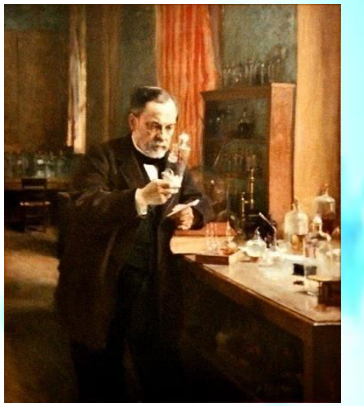
Ανακάλυψη Poliovirus: 1909 (K. Landsteiner & E. Popper) – Μετάδοση σε πειραματόζωα με φιλτραρισμένο εκχύλισμα εγκεφάλου νεκρών



K. Landsteiner

ΑΛΛΑ ΟΡΟΣΗΜΑ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ & ΣΤΙΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

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



Louis Pasteur

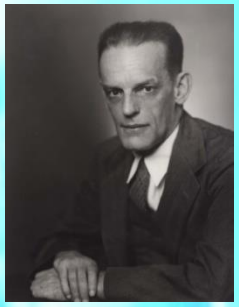
- ***1915-17**: Ανακάλυψη Βακτηριοφάγων*

Twort and D'Herelle

- ***1918**: Πανδημική Ισπανική Γρίππη (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***

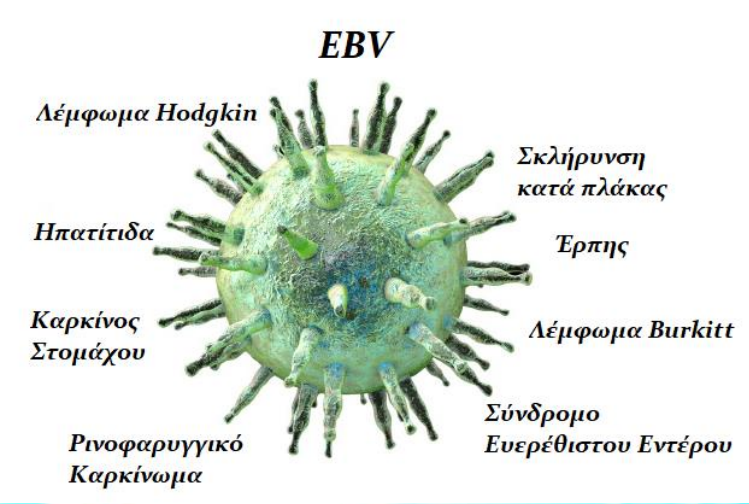
J. Salk

ΑΛΛΑ ΟΡΟΣΗΜΑ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ & ΣΤΙΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

- ***1961**: Εισαγωγή στοματικού εξασθενημένου εμβολίου κατά της πολιομυελίτιδας*

Ο A. Sabin εμβολιάζει παιδί με OPV

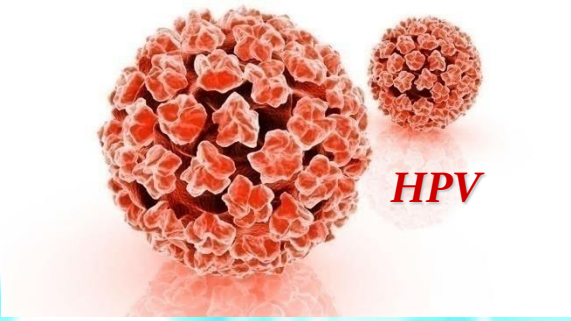
- ***1964**: 1η σύνδεση ενός ιού, του ερπητοϊού Epstein-Barr (EBV) με μορφές καρκίνου στον άνθρωπο*



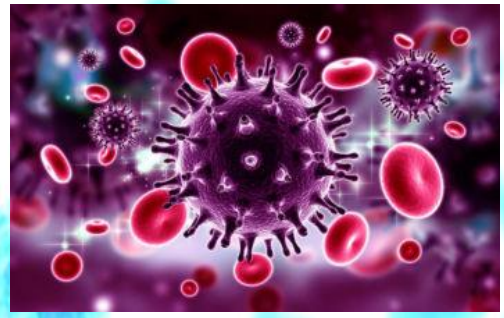
- ***1976**: 1η επίσημη καταγραφή αιμορραγικού πυρετού Ebola*

ΑΛΛΑ ΟΡΟΣΗΜΑ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ & ΣΤΙΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

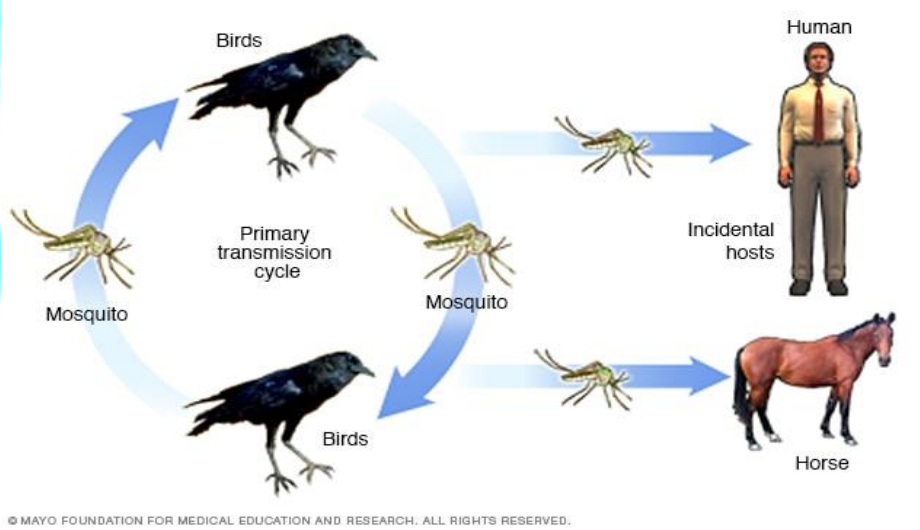
- ***1983**: Σύνδεση στελεχών Ιού Ανθρωπίνων Κονδυλωμάτων (HPV) με καρκίνο τραχήλου μήτρας*



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



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



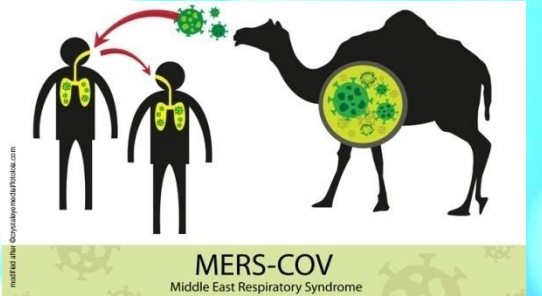
ΑΛΛΑ ΟΡΟΣΗΜΑ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ & ΣΤΙΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

- ***2003**: Σοβαρό Οξύ Αναπνευστικό Σύνδρομο (SARS) από ένα νέο είδος Κοροναϊού*

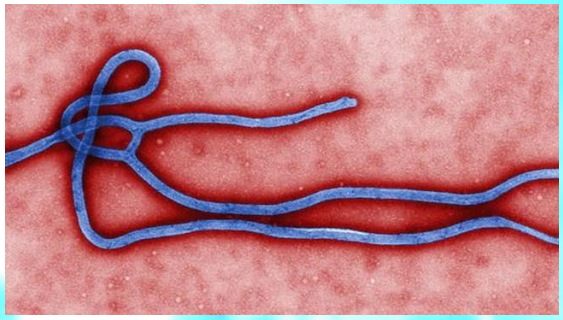
- ***2005-2007**: Σοβαρές επιδημίες από τους ιούς Chikungunya και Δάγγειου Πυρετού*

- ***2009-2010**: Νέα Πανδημία Γρίππης H1N1 των χοίρων*

- ***2012**: Καταγραφή σοβαρού Αναπνευστικού Συνδρόμου Μέσης Ανατολής (MERS), προκαλείται από κοροναϊό, μετάδοση από*



ΑΛΛΑ ΟΡΟΣΗΜΑ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ & ΣΤΙΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

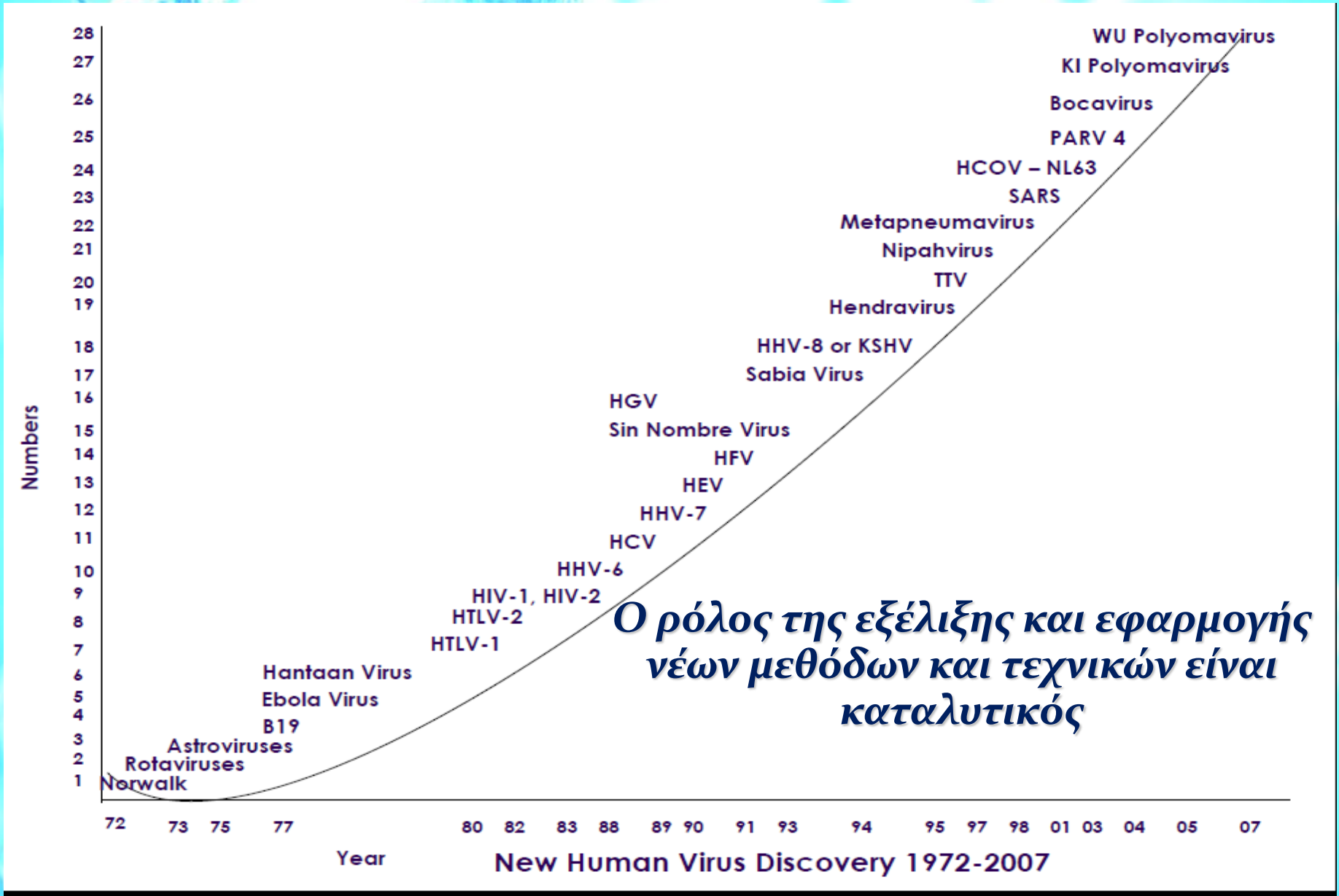


- ***2014**: Στην Αφρική η μεγαλύτερη επιδημία Ebola που έχει καταγραφεί στην ιστορία, με πάνω από 11000 νεκρούς*

- ***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

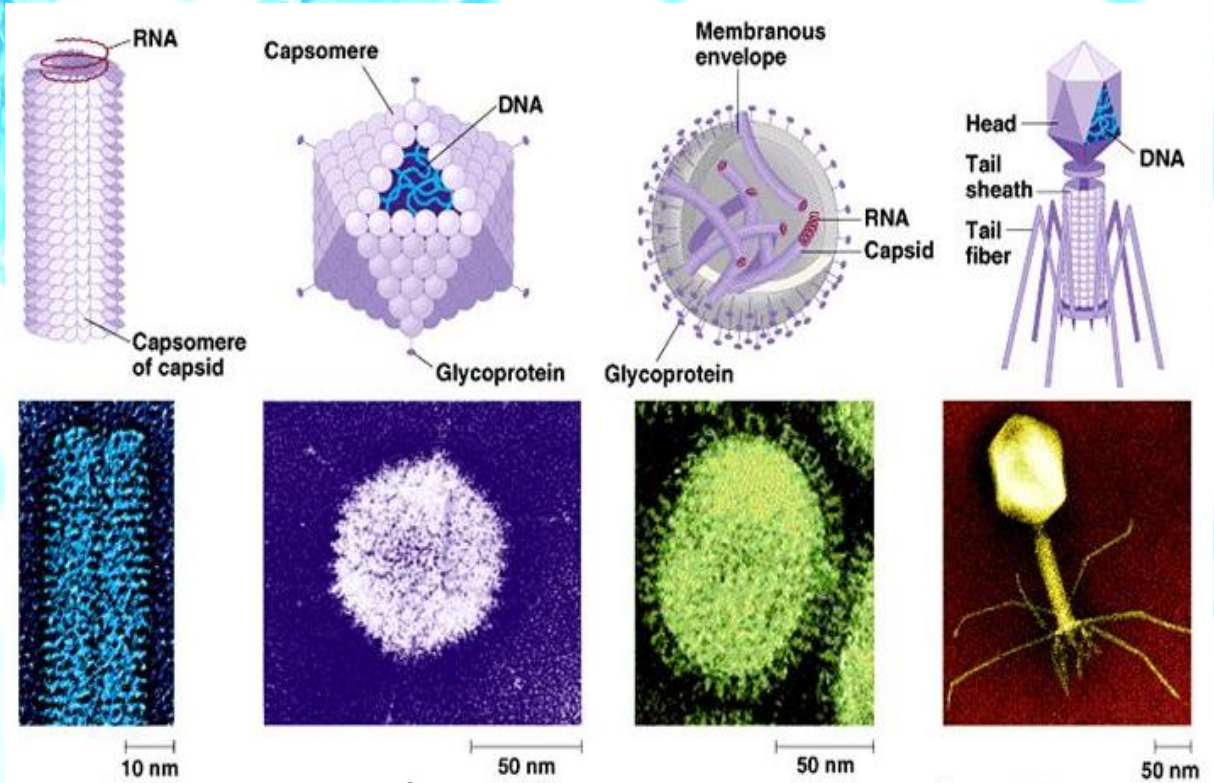


Ο ρόλος της εξέλιξης και εφαρμογής νέων μεθόδων και τεχνικών είναι καταλυτικός

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 Γρίππης*** ***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 <u>Γενετική Ποικιλομορφία</u>***

Μεταλλάξεις

Γενετικοί Ανασυνδυασμοί

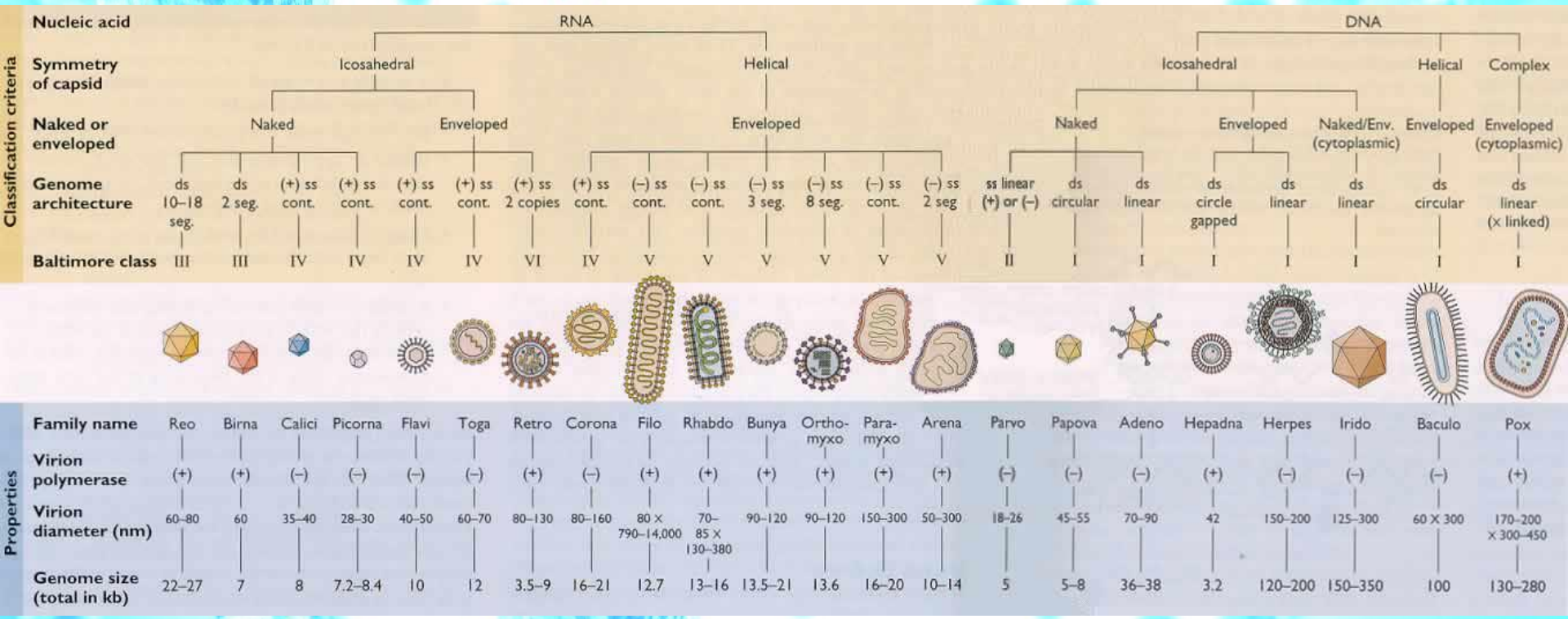
Quasispecies
Ετερόμορφος γενετικά πληθυσμός του ιδίου στελέχους

<u>Οι ιοί είναι Απλές «Δαρβινικού» Τύπου Μηχανές ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΛΥΤΕΡΑ ΠΡΟΣΑΡΜΟΣΜΕΝΟΥ</u>

<u>Η Γενετική Ποικιλομορφία χρειάζεται για να επιλεγεί ο ΚΑΛΥΤΕΡΑ ΠΡΟΣΑΡΜΟΣΜΕΝΟΣ σε μια χρονική στιγμή!</u>

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 ΕΝΑ - το DNA)

ΠΩΣ ΕΞΕΛΙΧΘΗΚΑΝ & ΕΞΕΛΙΣΣΟΝΤΑΙ ΟΙ ΙΟΙ;

ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗ ΠΙΕΣΗ
(π.χ. Ανοσοποιητικό Σύστημα. Αντιιϊκές Ουσίες)

ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ →

← **ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ**

ΦΥΣΙΚΗ ΕΠΙΛΟΓΗ
Επιβίωση του
Καλύτερα
Προσαρμοσμένου

Επικράτηση λίγων στελεχών που ΤΥΧΑΙΝΕΙ να είναι τα καλύτερα προσασμοσμένα 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 έχει 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***

Συμβαίνουν και τα 3!

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΩΝ ΣΤΙΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΚΟΙΝΩΝΙΕΣ

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Ανοσοκαταστολή
(AIDS, Μεταμόσχευση)

Γενετικό Υπόβαθρο που μπορεί να προσδιορίσει ανθεκτικότητα σε συγκεκριμένες ιογενείς λοιμώξεις

Πολλές παράμετροι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο για να καταλήξουμε στην Ασθένεια από Ιό

ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ (Σποραδικές, Επιδημίες)

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ - ΣΗΜΕΙΟ ΕΙΣΟΔΟΥ ΤΟΥ ΙΟΥ

Π.χ. ***HIV***:
Επαφή με Δέρμα → Χ
Είσοδος στο Αίμα → ***Λοίμωξη***

ΛΟΙΜΟΓΟΝΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΙΟΥ

Διαφυγή Ανοσοποιητικού Συστήματος
(Γεν. Ποικιλομορφία)

Τροπισμός
(Είδος Οργάνου που προσβάλλει)

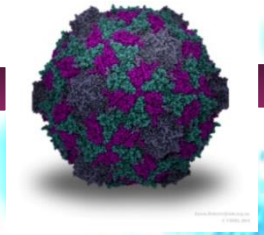
Χαρακτηριστικά Ενδοκυττάριου Κύκλου Ζωής

ΑΝΘΡΩΠΟΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΩΝ ΣΤΙΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΚΟΙΝΩΝΙΕΣ

Γενικοί Τύποι Ιογενών Λοιμώξεων

Ασυμπτωματικές/Υποκλινικές Λοιμώξεις (Πλειοψηφία)



Χρόνιες Λοιμώξεις

Οξείες Λοιμώξεις

Επιμένουσες/Λανθάνουσες Λοιμώξεις

Ερπητικές Λοιμώξεις

Παραδείγματα

HIV (AIDS)

ΚΑΡΚΙΝΟΣ

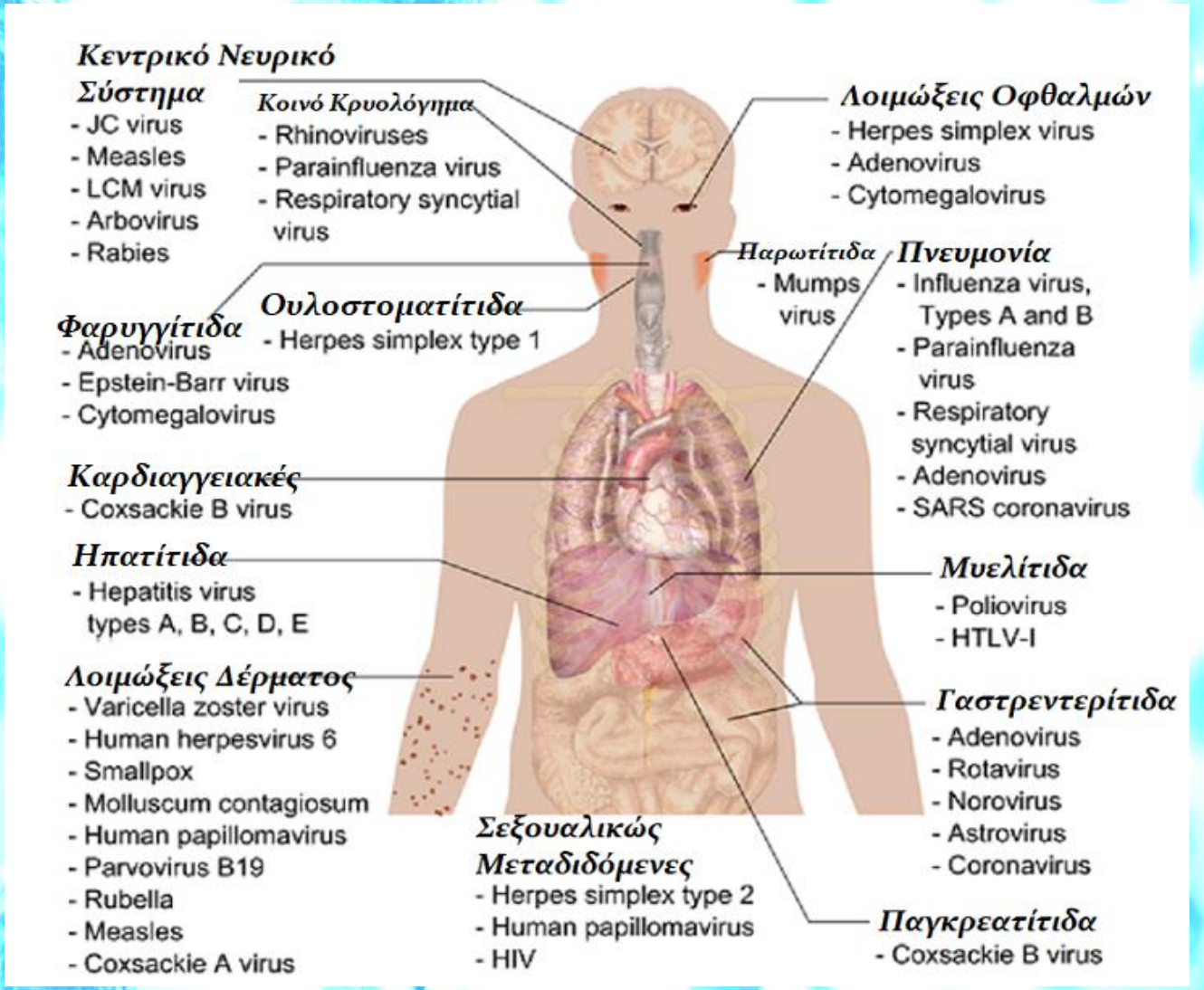
Ηπατίτιδα B, C

HPV

EBV

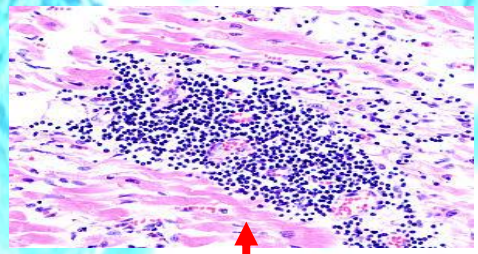
Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΩΝ ΣΤΙΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΚΟΙΝΩΝΙΕΣ

Παραδείγματα Οξείων Ιογενών Λοιμώξεων του Ανθρώπου



Häggström, Mikael (2014). "Medical gallery of Mikael Häggström 2014". *WikiJournal of Medicine* **1** (2). DOI:10.15347/wjm/2014.008

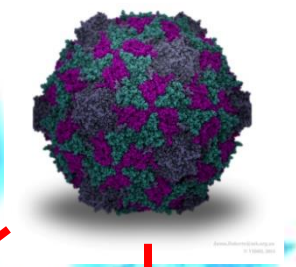
Χρόνια Ιογενής Καρδιομυοπάθεια



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

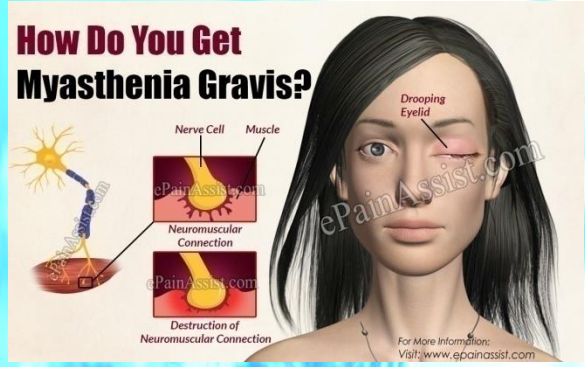
ΧΡΟΝΙΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Σκλήρυνση κατά Πλάκας(MS)

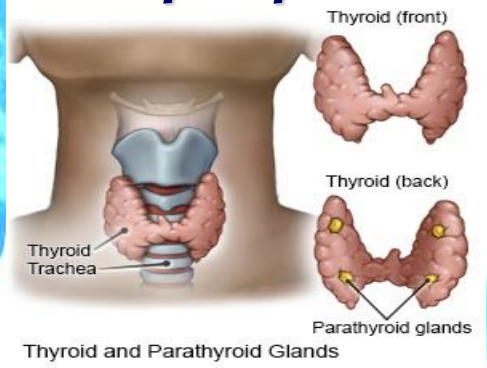


Σύνδρομο Χρονίας Κοπώσεως (CFS)

Myasthenia Gravis



Αυτοάνοση Θυροειδίτιδα



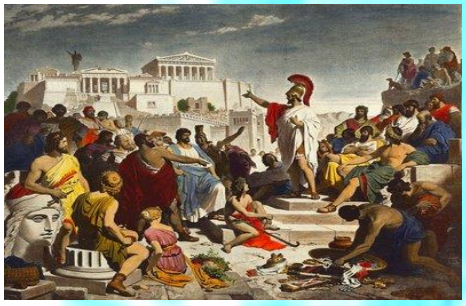
Τύπου 1 Διαβήτης

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 Γρίππης, 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 Γρίππης: 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 ιη Φορά με Νέους Παθογόνους Ιούς

ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ, ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ, ΠΑΝΔΗΜΙΕΣ

ΑΝΘΡΩΠΟΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

- **Ιατρικές/Χειρουργικές Παρεμβάσεις**

Παράδειγμα:

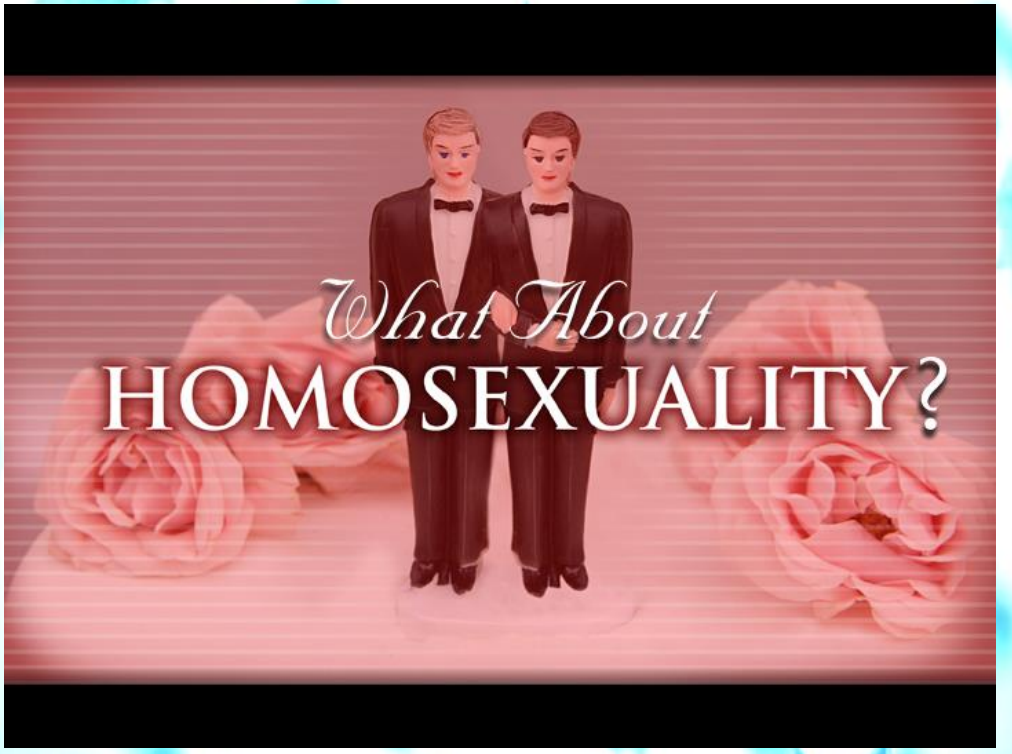
- Μεταμοσχεύσεις Οργάνων
- Ανοσοκατασταλτικά Φάρμακα

Ανάδυση ερπητοϊών όπως ο CMV

ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ, ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ, ΠΑΝΔΗΜΙΕΣ

ΑΝΘΡΩΠΟΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

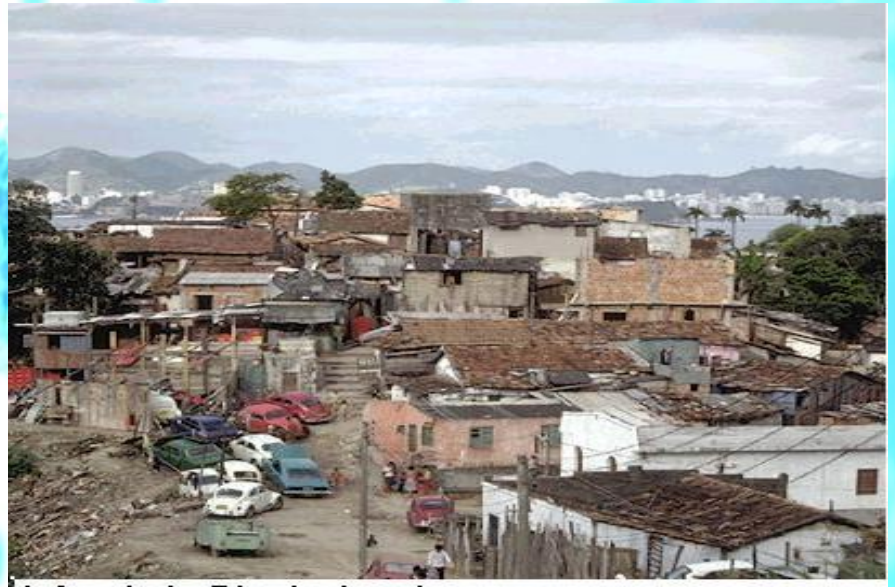
- **Ανθρώπινο Ήθος**
  - *Αλλαγές στη συμπεριφορά του ανθρώπου (σεξουαλική απελευθέρωση, χρήση ενδοφλέβιων ουσιών, κ.ά.) αποτέλεσαν γόνιμο έδαφος για τη μετάδοση και επικράτηση πολλών ιών (π.χ. HIV, HBV, ερπητοϊοί, papilloma, κ.λ.π.)*



ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ, ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ, ΠΑΝΔΗΜΙΕΣ

ΑΝΘΡΩΠΟΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

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



A favela in Rio de Janeiro

Κυρίως για Αερογενώς και Υδατογενώς Μεταδιδομένους 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:

- ***<u>Διάρρηξη των φραγμών ως προς το είδος του ξενιστή ενός ιού</u> (π.χ. HIV: μεταφορά από πρωτεύοντα στον άνθρωπο, influenza: εξάπλωση από πτηνά, ζώα κ.λ.π. στον άνθρωπο και πρόκληση πανδημιών)***

- ***<u>Διαφυγή Αμυντικών Μηχανισμών (π.χ. Ανοσοποιητικό)</u>***

- ***<u>Ανθεκτικότητα σε Αντιιϊκές Ουσίες</u>***

- ***<u>Υψηλό Λοιμογόνο Δυναμικό</u>***

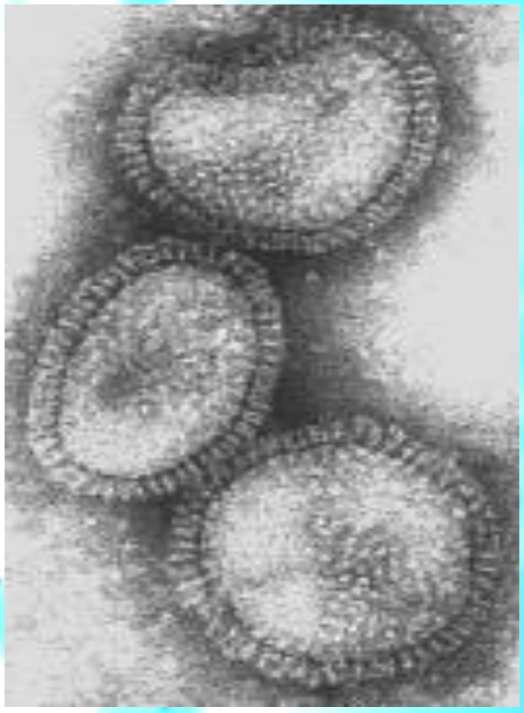
ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ: Ο ΙΟΣ ΤΗΣ ΓΡΙΠΠΗΣ

- Οικογένεια *Orthomyxoviridae*
- Γένη:
  - ✓ *Influenza A* → Άνθρωπος
    → Πτηνά
    → Άλλα Θηλαστικά (π.χ. χοίροι)
  - ✓ *Influenza B* → Άνθρωπος
    → Φώκιες
  - ✓ *Influenza C* → Άνθρωπος
    → Χοίροι
  - ✓ *Influenza D* → Βοοειδή
    → Χοίροι

Πιο Συχνή Επιδημίες Πανδημίες

Λιγότερο Συχνή, Επιδημίες, Όχι Πανδημίες

Σπάνια Τοπικές Επιδημίες



- 400.000 Θάνατοι ρα 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

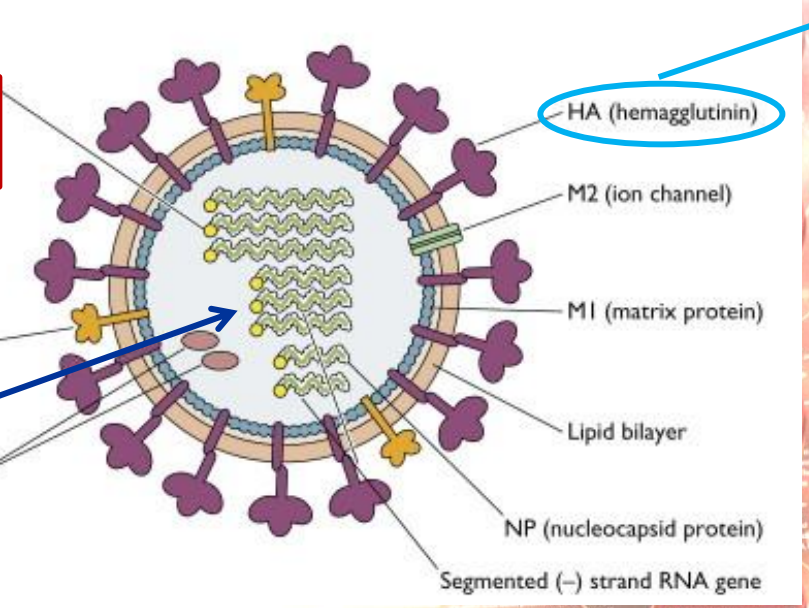
ΙΟΣ ΤΗΣ ΓΡΙΠΠΗΣ: Ο ΜΟΝΙΜΟΣ ΠΡΩΤΑΓΩΝΙΣΤΗΣ

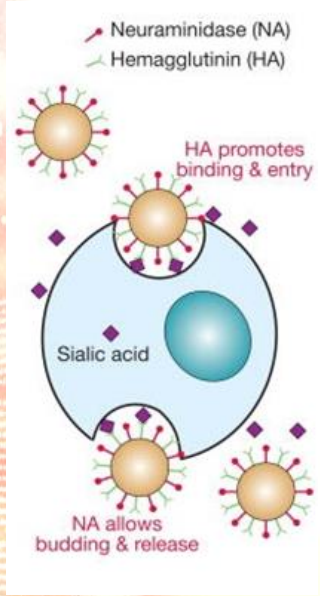
- Ελυτροφόρος, Πλειομορφικός

Προσκόλληση σε Κυτταρικούς Υποδοχείς

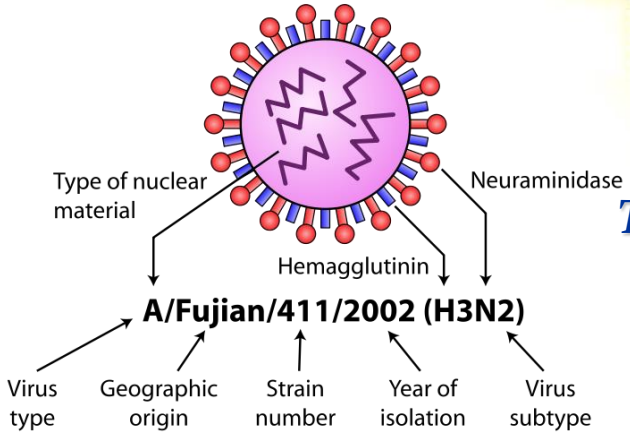
Απελευθέρωση από Επιφάνεια Κυττάρου Ξενιστή

ssRNA (-) πολικότητας (8 segments)





✓ *Influenza A* → 18 Η Υπότυποι (HA), 11 Ν Υπότυποι (NA)

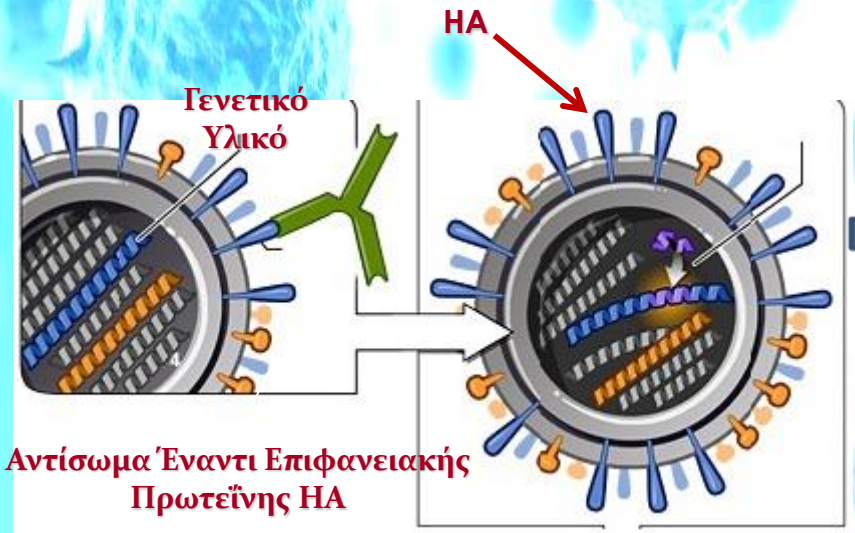


Τρόπος Ονομασίας Στελεχών

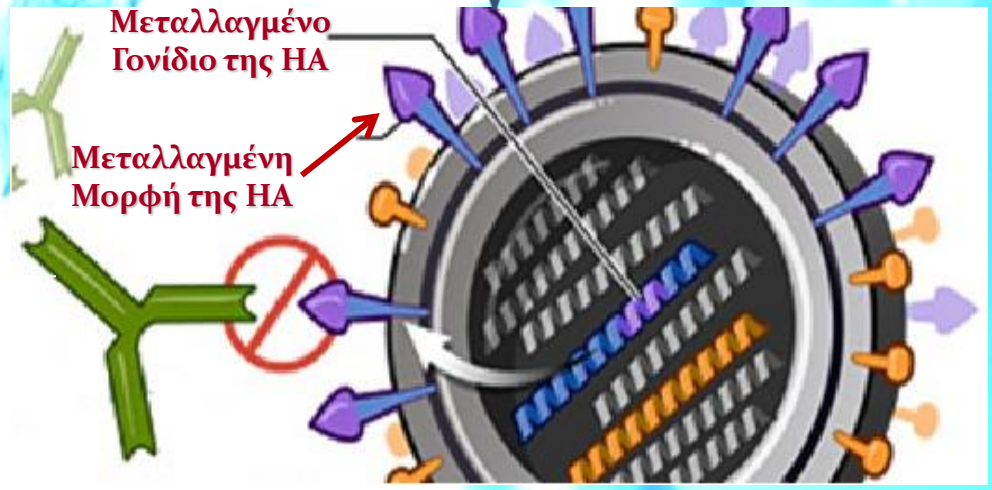
ΙΟΣ ΤΗΣ ΓΡΙΠΠΗΣ: ΤΟ ΑΕΝΑΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ

Γενετική Ποικιλομορφία

- **Influenza A: Αντιγονική Απόκλιση (*Antigenic Drift*)**



Μετάλλαξη
στο Γονίδιο της HA



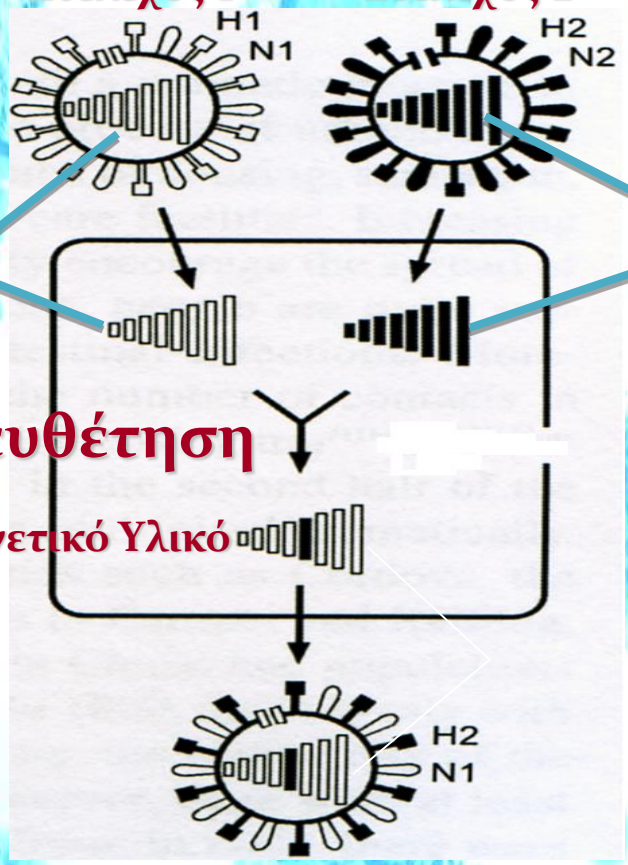
Αντισώματα του Ανθρώπου δεν αναγνωρίζουν πλέον τη Μεταλλαγμένη Μορφή της HA

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*)**



Νέο Στέλεχος με Ανασυνδυασμένο Γενετικό Υλικό και Νέες Αντιγονικές Ιδιότητες

Πανδημία

Διαφορά Από «Drift»

Μεγαλύτερες Γενετικές Διαφορές

↓

Αντιγονικά Ευρύτερες Αλλαγές

↓

Μικρότερες Πιθανότητες Ανοσίας της Κοινότητας

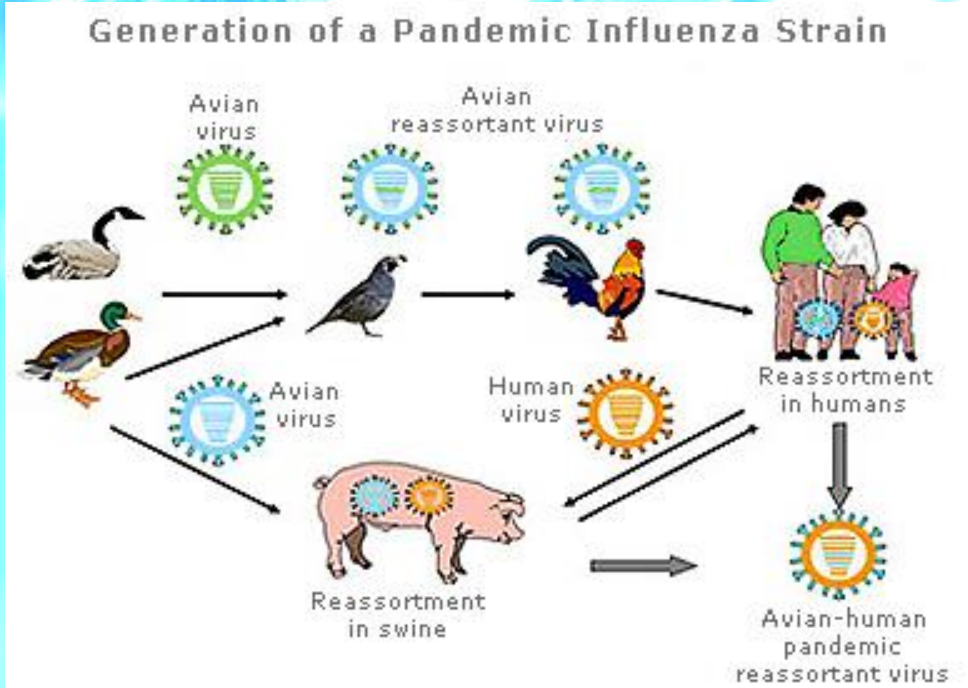
↓

Μεγαλύτερη Απουσία Ανοσίας:
Διάδοση Πανδημική (πέρα από στενότερα γεωγραφικά όρια

ΙΟΣ ΤΗΣ ΓΡΙΠΠΗΣ: ΤΟ ΑΕΝΑΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ

- **Influenza A: Αντιγονική Εκτροπή (*Antigenic Shift*)**

Σημείο Κλειδί: ΑΛΛΑΓΗ ΞΕΝΙΣΤΗ



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	H3N8 ή H2N2
1918 flu pandemic (Spanish flu)	1918–1920	20-100 εκατομμύρια	H1N1
Asian Flu	1957–1958	1-1.5 εκατομμύρια	H2N2
Hong Kong Flu	1968–1969	0.75-1 εκατομύριο	H3N2
Russian flu	1977–1978	Άγνωστο	H1N1
2009 flu pandemic	2009–2010	18,000	H1N1

1918–1920

1957–1958

1968

2009-2010

ΕΝΑ ΑΛΛΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ: ΕΝΤΕΡΟΪΟΣ D68

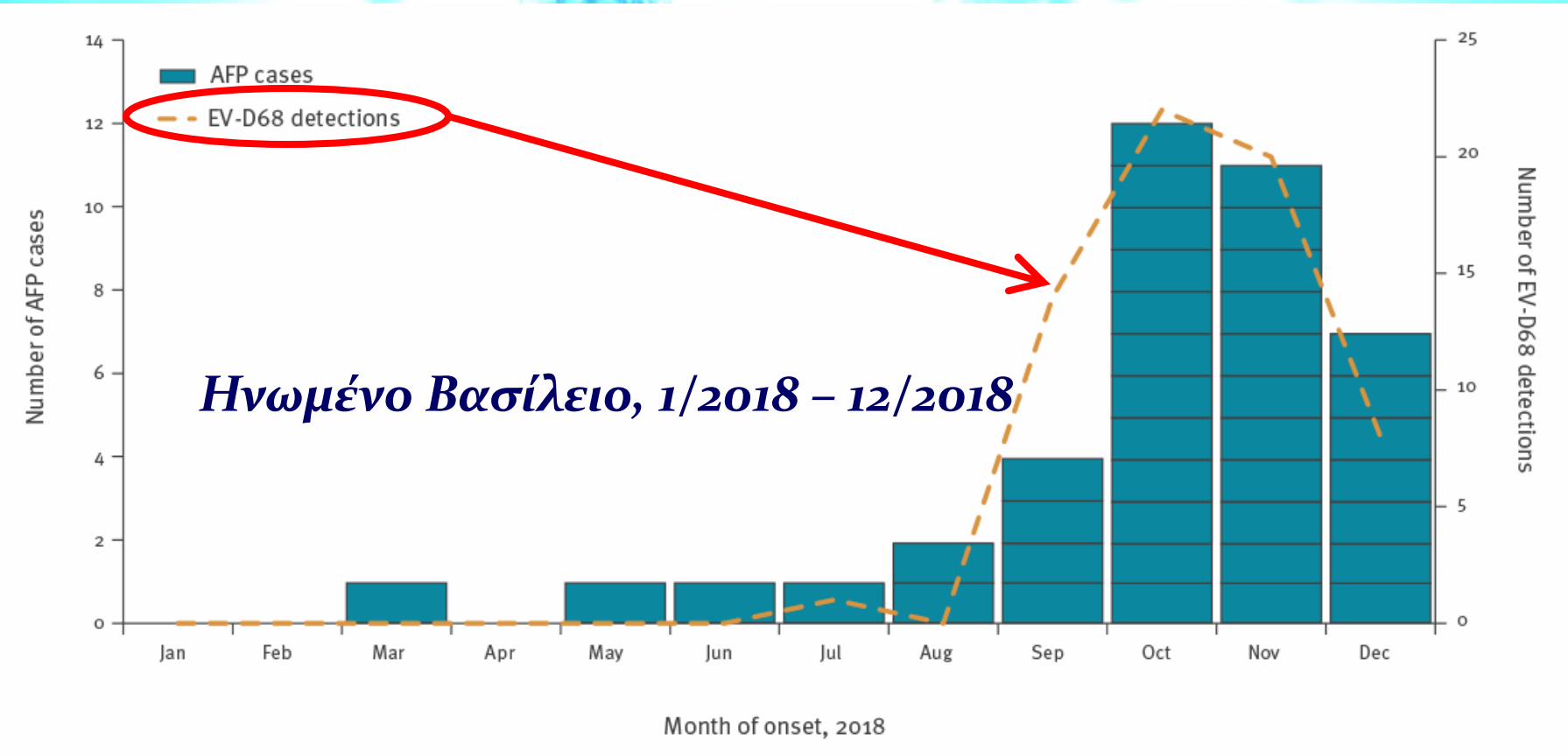
- ***Ανακάλυψη:***
  - 1962 (Καλιφόρνια)
- ***Κλινικές Εκδηλώσεις - Επιδημιολογία:***
  - Έως 2014: Σποραδικά περιστατικά (699)
  - *Αύγουστος 2014*: Αυξημένος Αριθμός Κρουσμάτων EV-D68 με Οξεία Λοίμωξη Κατωτέρου Αναπνευστικού αρχικά στις ΗΠΑ
  - Ομάδες κρουσμάτων Οξείας Χαλαρής Παράλυσης κατά τη διάρκεια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

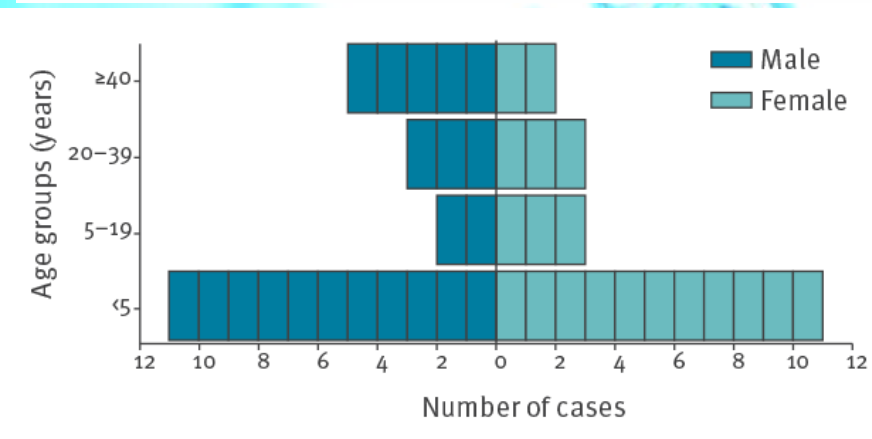
Μεταλλάξεις στην Ιϊκή Πρωτεΐνη που αναγνωρίζεται από το Ανοσοποιητικό → Διαφυγή από Ανοσοποιητικό → ΕΠΙΒΙΩΣΗ & ΕΠΙΚΡΑΤΗΣΗ Νέων Λοιμογόνων Στελεχών, Επιδημία

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

Επηρρεάζουν 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

Αποτελέσματα

- **Διάγνωση**
- **Θεραπεία**
- **Εμβόλια**

Ερμηνεία

- **Έρευνα**
  - Θεραπεία
  - Εμβόλια
  - Παθοφυσιολογία
  - Ανακάλυψη Νέων & Επανεμφανιζομένων Ιών
  - Αιτιολογική Σύνδεση (Αδιάγνωστες Ασθένειες)
- **Επιδημιολογία**
  - Πρόληψη
  - Χαρτογράφηση Λοιμογόνου Δυναμικού
  - Επιτήρηση
  - Νέα Λοιμογόνα Στελέχη <u>Επιδημίες</u>, <u>Πανδημίες</u>

ΑΣΘΕΝΗΣ

ΚΟΙΝΩΝΙΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ

- Βασική Έρευνα Βιολογίας των Ιών
- Εμβόλια
- Αντιιϊκές Ουσίες
- Παλαιότερες Μέθοδοι
- Ακόμα Χρήσιμες
- Όχι για όλους τους Ιούς

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

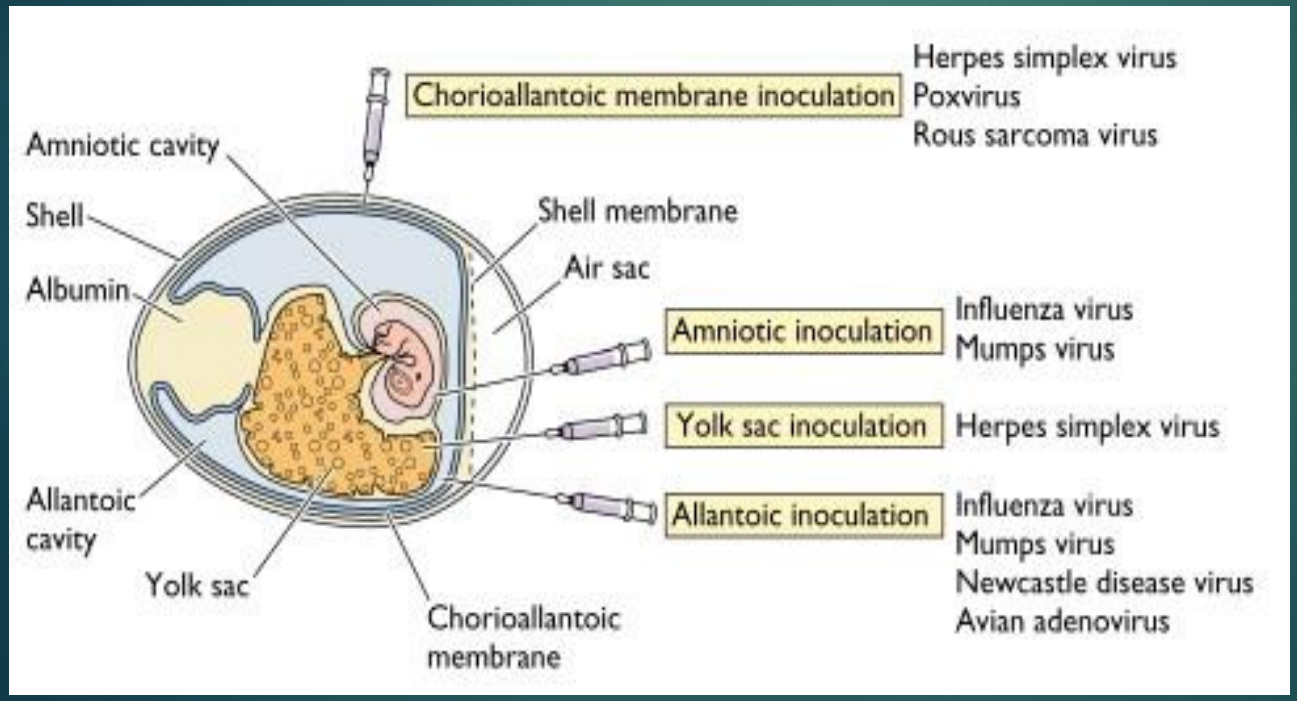
- Διάγνωση
- Ανακάλυψη Νέων Στελεχών ή/και Ιών
- Επιδημιολογία
- Βασική Έρευνα Βιολογίας των Ιών
- Εμβόλια
- Αντιιϊκές Ουσίες
- Ατιολογική Σύνδεση με Αδιάγνωστες/Χρόνιες Ασθένειες

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ

- ***Ενδοκυττάρια Παράσιτα:***
  - Ενοφθαλμισμός Πειραματοζώων.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ

- ***Ενδοκυττάρια Παράσιτα:***
  - Εμβρυοφόρα Αυγά (Ακόμα χρησιμοποιούνται για εμβόλιο κατά γρίππης).



Θάνατος Εμβρύου

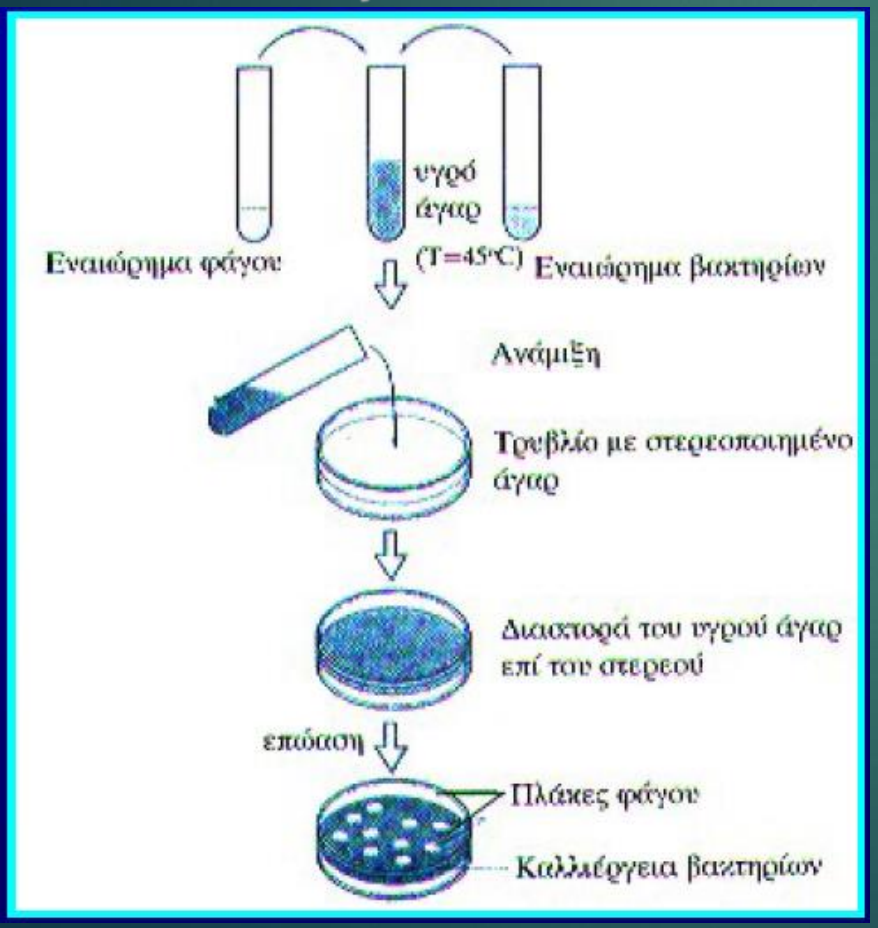
Βλάβες στα Εμβρυϊκά Κύτταρα

Βλάβες στις Μεμβράνες – Περιοχές Ενοφθαλμισμού

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ

- ***Ενδοκυττάρια Παράσιτα:***
  - **Κυτταροκαλλιέργειες:**
    - **Οι βακτηριοφάγοι σχηματίζουν «πλάκες» σε στρώμα βακτηριακών κυττάρων:**



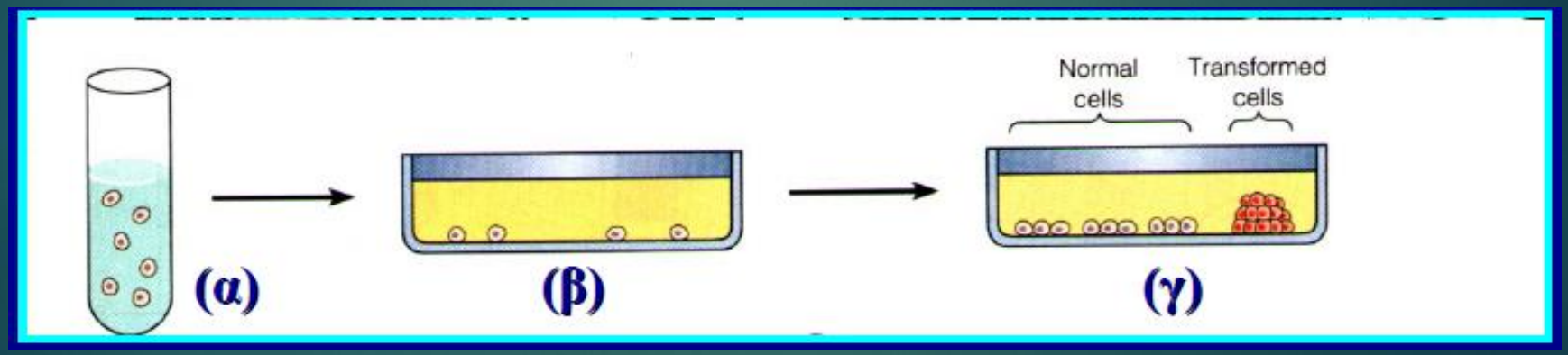
Κάθε Πλάκα → 1 Σωματίδιο Φάγου

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.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ

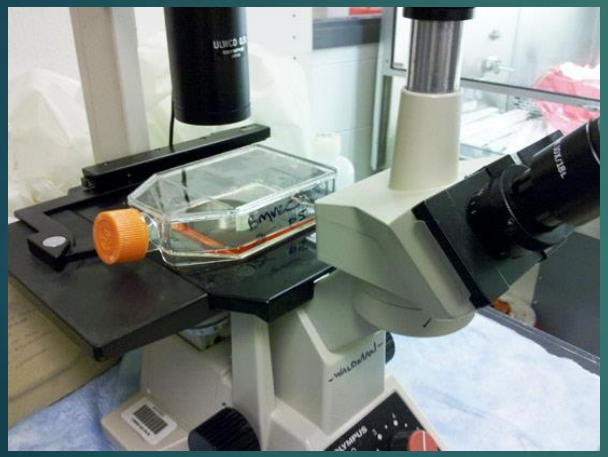
- ***Ενδοκυττάρια Παράσιτα:***
  - **Κυτταροκαλλιέργειες:**
    - α) Παραγωγή εναιωρήματος κυττάρων με συγκεκριμένη συγκέντρωση – Επεξεργασία με ειδικά ένζυμα (π.χ. Τρυψίνη)
    - β) Εμβολιασμός κυττάρων σε στερεό υπόστρωμα
    - γ) Δημιουργία μονοστρωματικής κυτταροκαλλιέργειας.

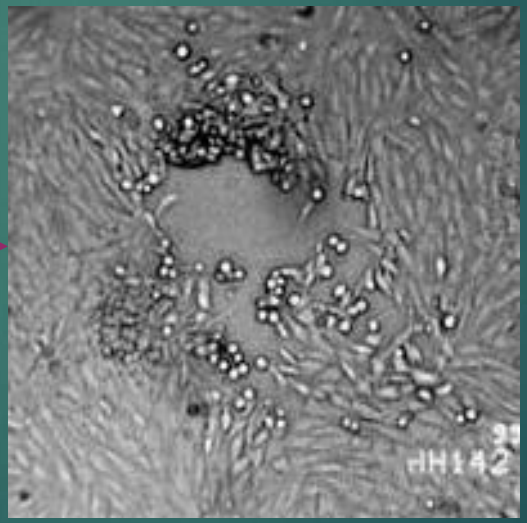


ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ

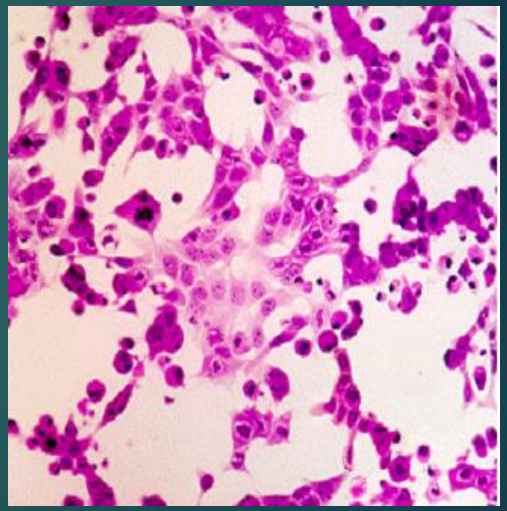
- ***Ενδοκυττάρια Παράσιτα:***
  - **Κυτταροκαλλιέργειες:**

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





Κυτταροπαθογόνος δράση εντεροϊών



Κυτταροπαθογόνος δράση αδενοϊών

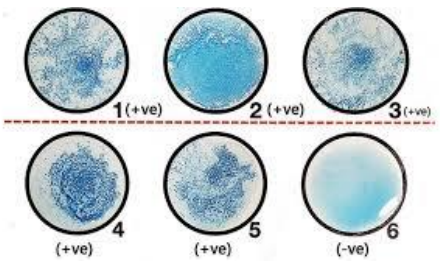
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΕΜΜΕΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

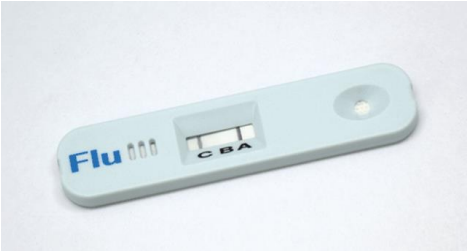
Ορολογικές (IgG-IgM)

ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ!

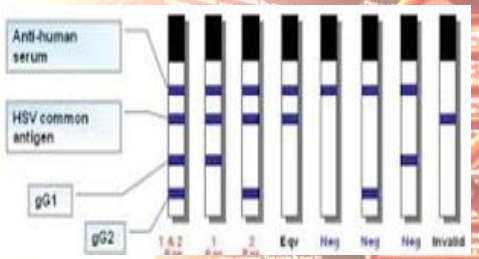
- «Παράθυρο» & επιμονή IgM μετά οξεία φάση
- Μειωμένη Ειδικότητα & Ευαισθησία
- Πολλοί Ορότυποι
- Συνεχώς Νέα Στελέχη, Ορότυποι



Συγκολλητινοαντίδραση



Ανοσοχρωματογραφία



Ανοσοαποτύπωση

Αυτόματη ELISA

Προβληματικές στη Διάγνωση, αλλά

Μερικές Φορές Χρήσιμες

- Ταχείες με Υψηλή Θετική Προγνωστική Αξία (π.χ. Ανοσοχρ. Γρίππη)
- Ταχείες και Αποτελεσματικές ως Μέθοδοι Διαλογής σε λίγες περιπτώσεις (Π.χ. Έλεγχος Ηπατιτίδων – 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?

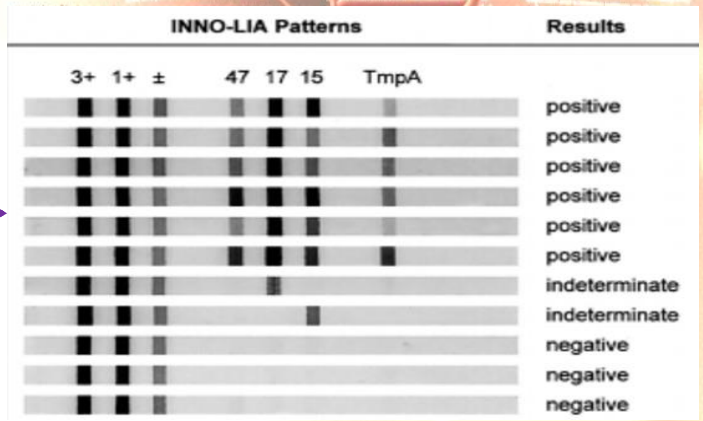
Ορομετατροπή?

Ασθενώς (+) με
Μέθοδο Διαλογής

Επιβεβαίωση με Western Blot

Συχνά Αμφίβολα Αποτελέσματα

Θεραπεία
Παρακολ. Ιϊκού Φορτίου

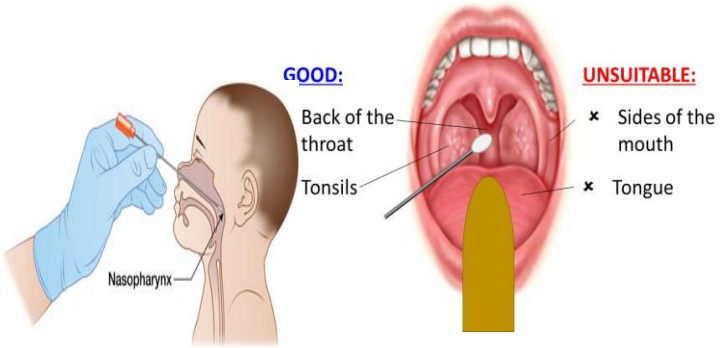


Λύση: Μόνο με Νεότερες Μοριακές Μεθόδους Προσδιορισμού Ιϊκού φορτίου

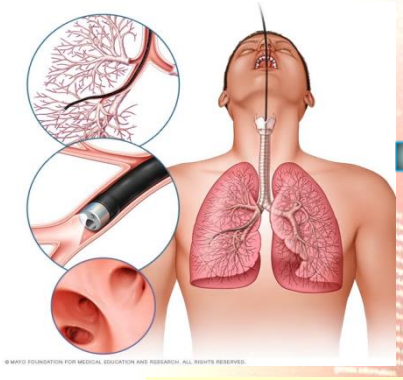
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

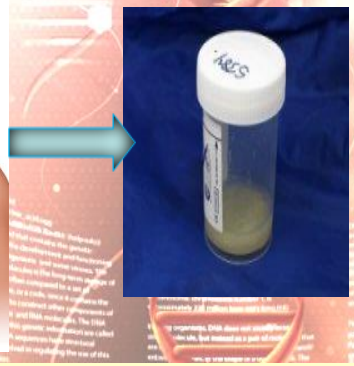
ΑΜΕΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

ΚΛΙΝΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ

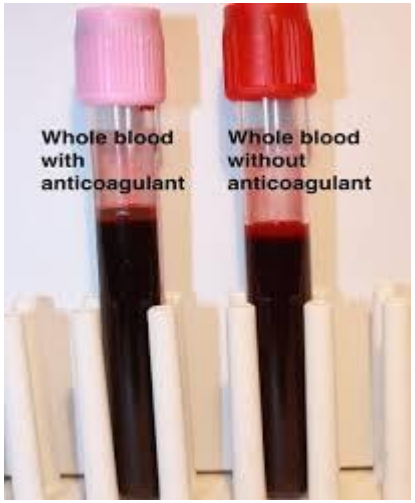


Ρινο-/Φαρυγγικό Επίχρισμα

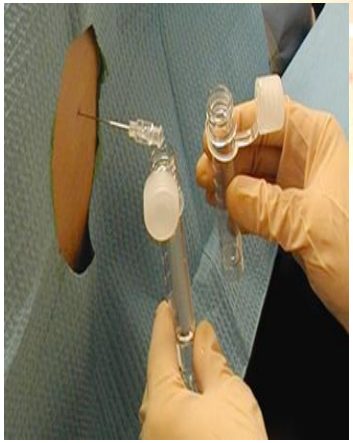




Πτύελα, Βρογχικές Εκκρίσεις, BAL



Αίμα (Ολικό, Πλάσμα, Ορός)



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

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

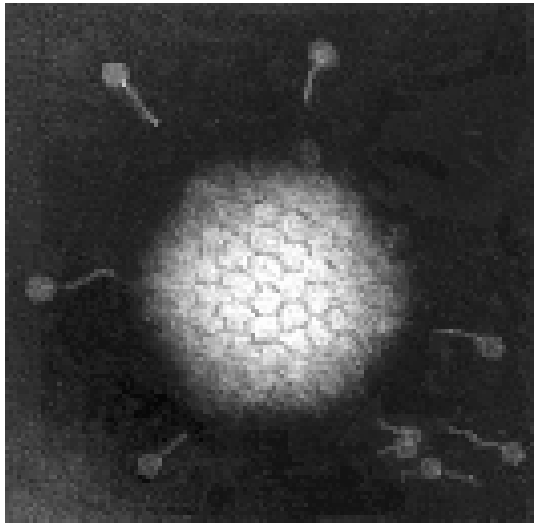
ΑΜΕΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

↓

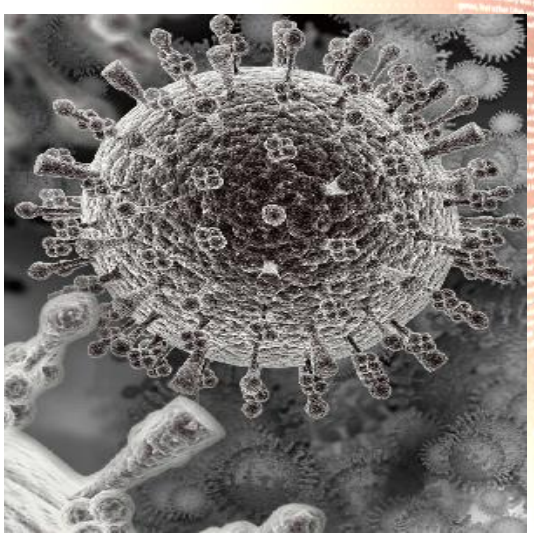
Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο

Μορφολογία Ϊικών Σωματιδίων

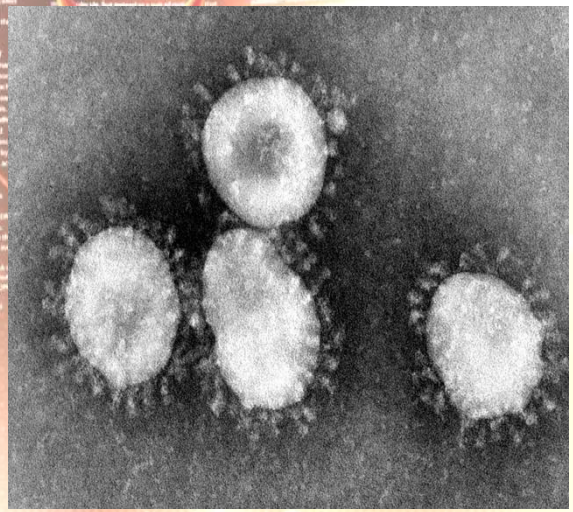
Δύσκολη και Αμφίβολης Ευαισθησίας Τεχνική



Adenovirus



Influenza



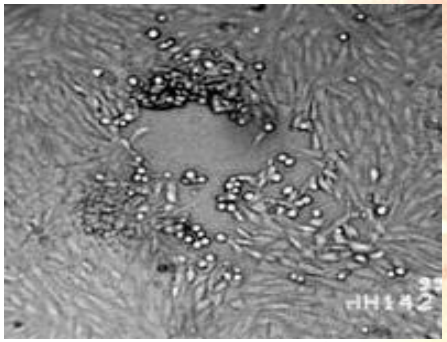
Coronavirus

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

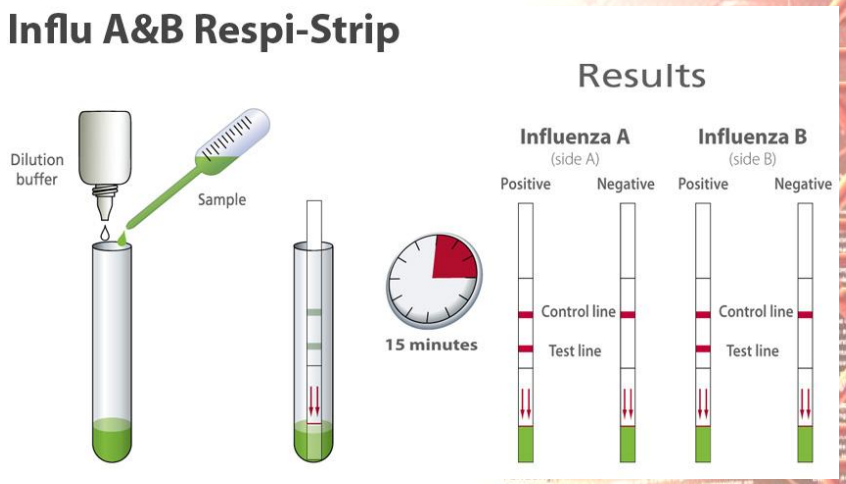
- Πλήρης Μελέτη & Χαρακτηρισμός Ιϊκών Σωματιδίων
- Τεκμηρίωση & Ολοκλήρωση Ανακάλυψης Νέων Στελεχών, Γονοτύπων & Ιών

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΑΜΕΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

↓

Ανοσοχρωματογραφία



- ***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

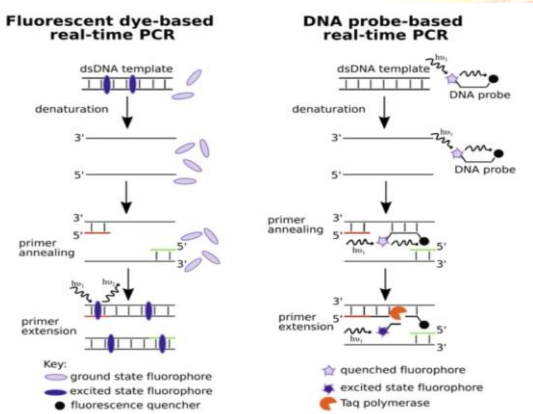
Νεότερες Μέθοδοι στη Διαγνωστική Ιολογία

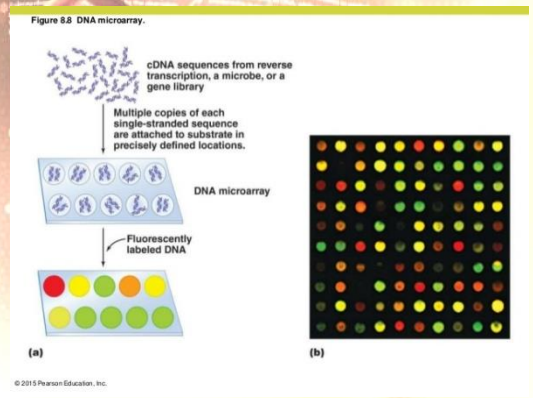
Μοριακές Μέθοδοι

- **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





ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

- ***Μοριακές Μέθοδοι*:**
  - Γενετικός Κώδικας

Καθολικός

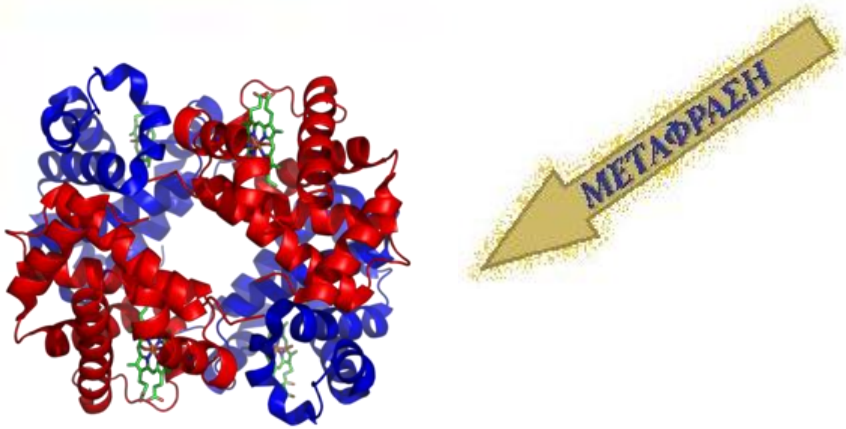
Υποδηλώνει την εξειδικευμένη σχέση Γονοτύπου – Φαινοτύπου

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

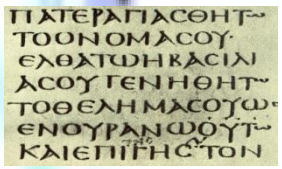
2η Βάση Κωδικονίου

1η Βάση Κωδικονίου / *3η 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

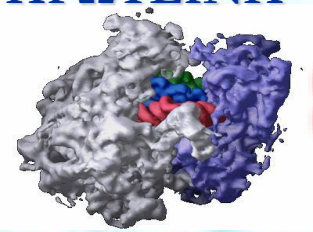
ΑΛΦΑΒΗΤΟ

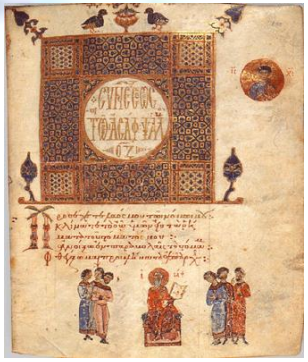
ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΟ



ΠΡΟΤΑΣΗ

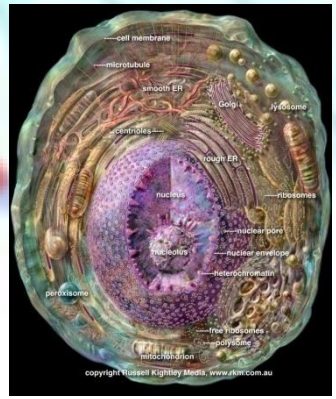
ΠΡΩΤΕΪΝΗ





ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΙΟΣ



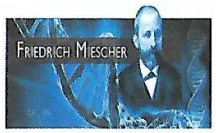
ΒΙΒΛΙΟ

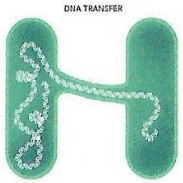
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

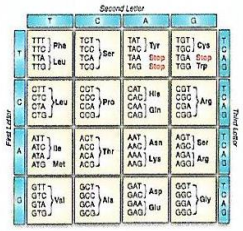
ΣΚΟΠΟΣ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ

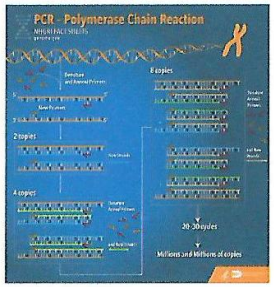
- **Προσπαθούμε να μιμηθούμε "*in vitro*" την αλληλουχία των γεγονότων του κεντρικού δόγματος που οδηγούν από το γενετικό υλικό στη διαφορική έκφραση του φαινοτύπου που αντιστοιχεί στη γονιδιακή του σύσταση για:**
  - **Διάγνωση των Ιογενών Ασθενειών**
  - **Επιδημιολογία των Ιών**
  - **Μελέτη της Βιολογίας 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**
  - **…**

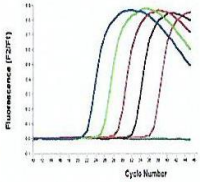
Εξέλιξη Μοριακών Τεχνικών

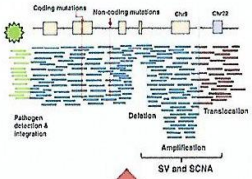












1869
Ανακάλυψη DNA

'30-'40
DNA → Γενετικό Υλικό

1961
Αποσαφήνιση Γενετικού Κώδικα

1983
Εφεύρεση PCR

1993
Real Time PCR

2003
Human Genome Project

2009
NGS – Μελέτες Μεταλλάξεων

1928
Πειράματα Griffith: Μεταφορά Γενετικής Πληροφορίας

1953
Watson & Crick: Ανακάλυψη Δομής DNA

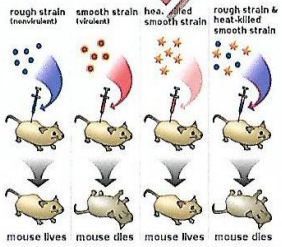
1977
Ανάπτυξη Τεχνολογίας DNA Sequencing

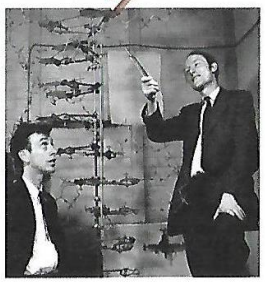
1988
Πολυπλεκτική PCR

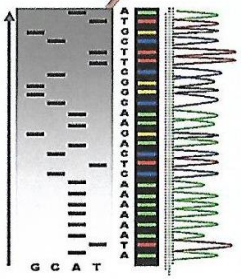
1995
Μικροσυστοιχίες

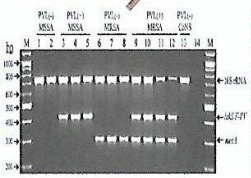
2005
Next Generation Sequencing

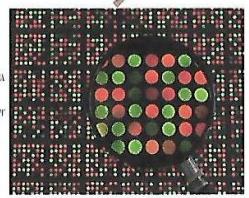
2011
Έγκριση NGS για Κλινική Διάγνωση

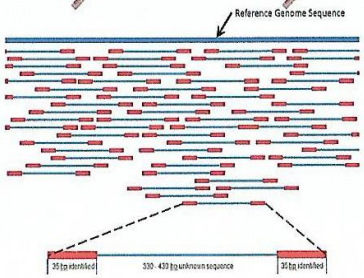












ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

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:

***Διάγνωση**

Επιδημιολογία

Βασική Έρευνα Βιολογίας των Ιών

Ανακάλυψη Νέων Στελεχών ή/και Ιών

Έρευνα για Αντιιϊκές Ουσίες

Εμβόλια

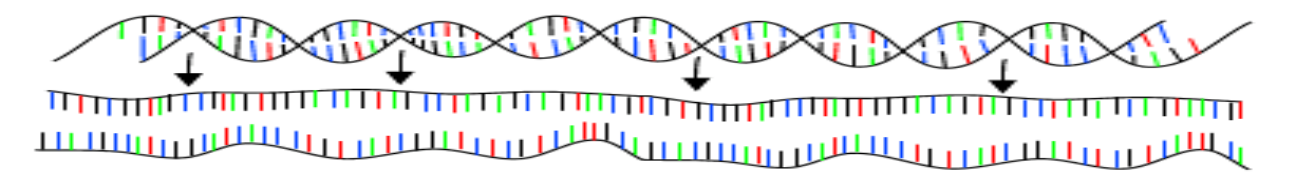
Ατιολογική Σύνδεση με Αδιάγνωστες/Χρόνιες Ασθένειες

Ανίχνευση, Ταυτοποίηση, Αναγνώριση Παθογόνων Στελεχών ή/και Ανθεκτικών σε Αντιιϊκές Ουσίες

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

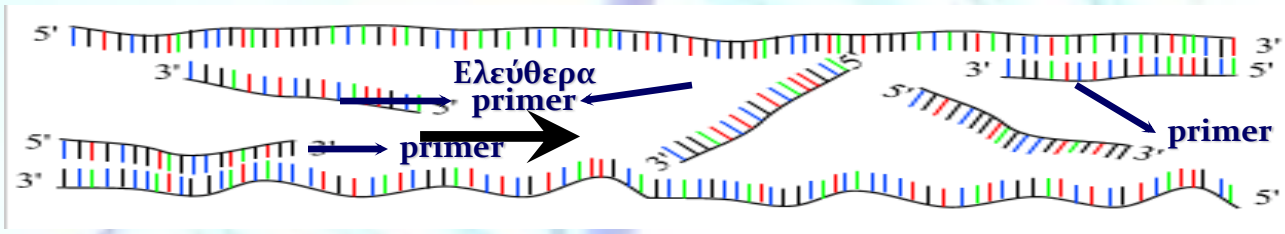
- *Διαφορετικά Στάδια Μεθόδου:*

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



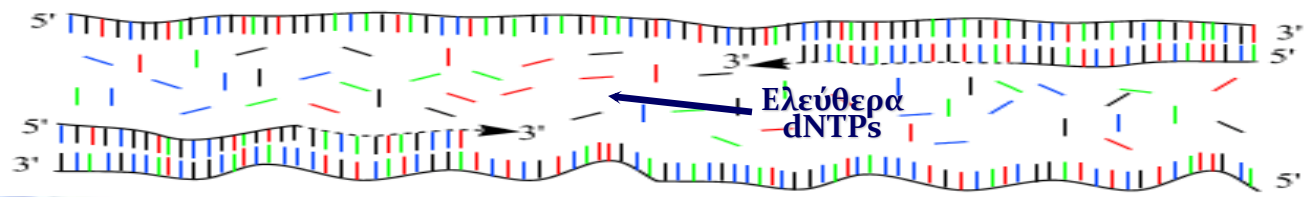
92-95ºC για ~30sec

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



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

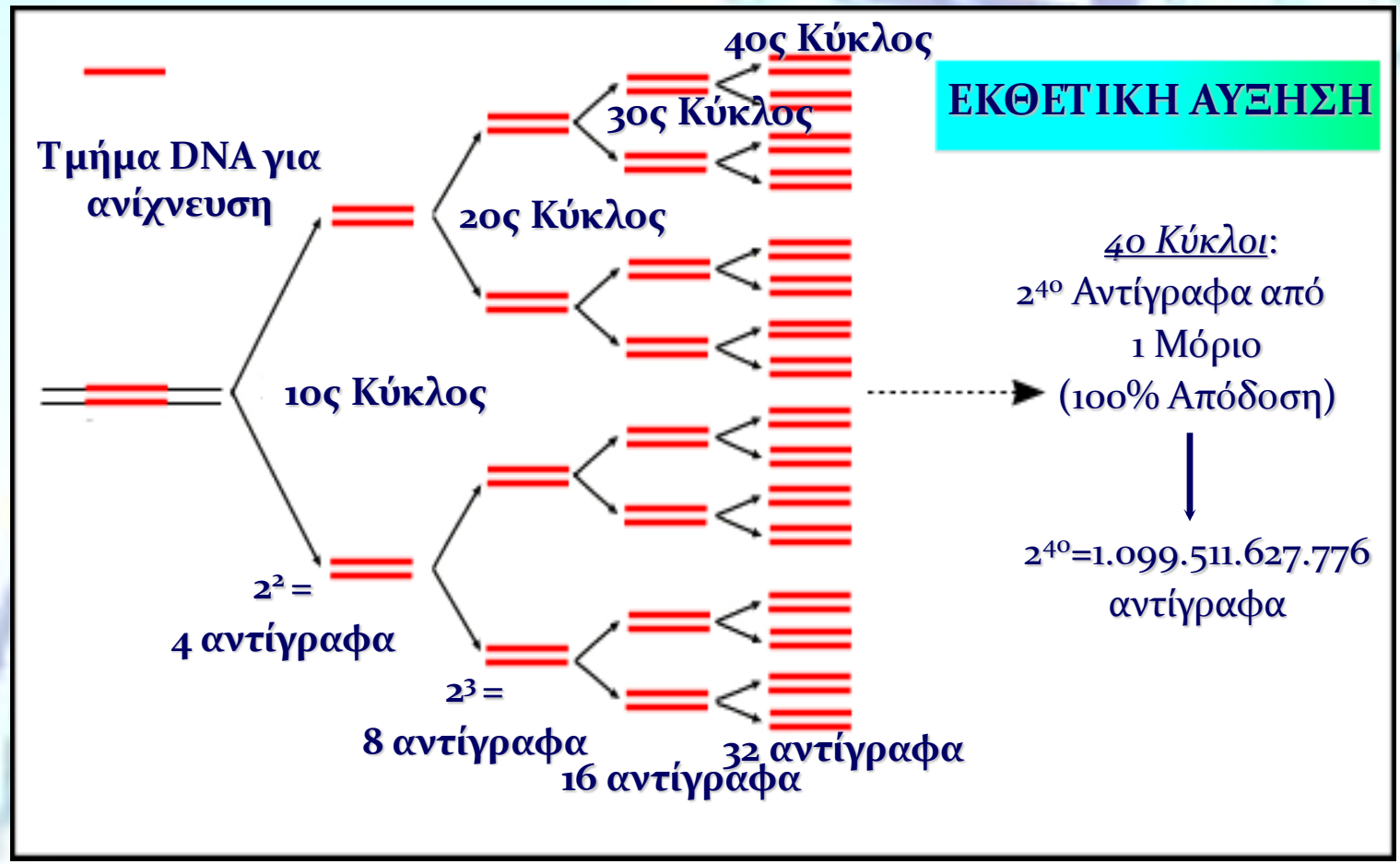
3. Στάδιο Επέκτασης Εκκινητικών Μορίων (Extension): Δημιουργία θυγατρικού κλώνου



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

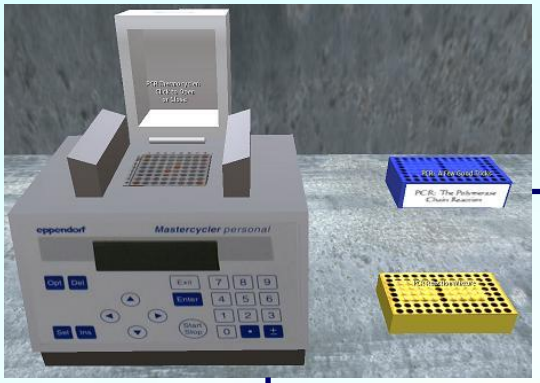
ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

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

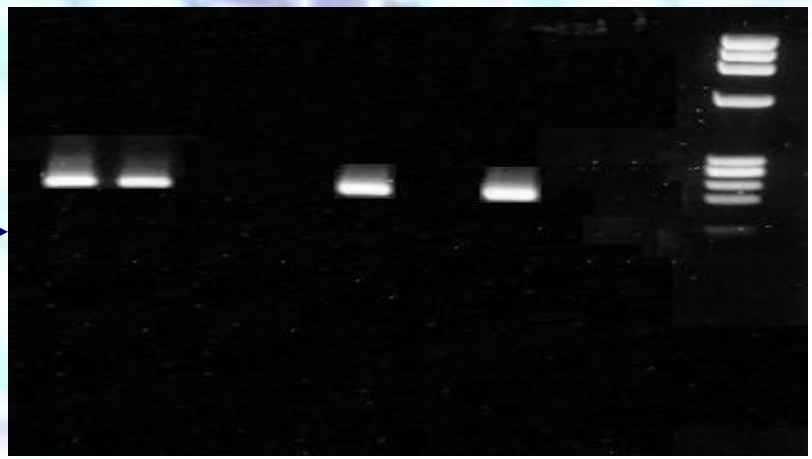


ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

- Ανίχνευση Αποτελεσμάτων (*Συμβατική PCR*):

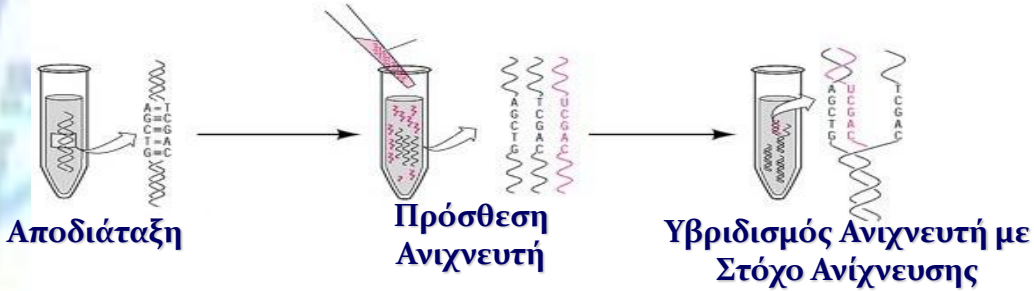


Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης



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

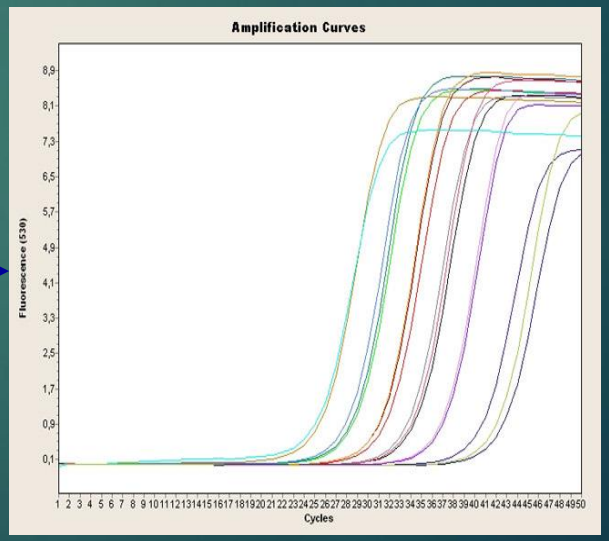
Υβριδισμός



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:

LightCycler



ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

- ***PCR Πραγματικού Χρόνου (Real Time PCR):***
  - *Τέσσερεις Βασικές Τεχνολογίες Ανίχνευσης*:

ΜΗ ΕΙΔΙΚΗ

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

ΕΙΔΙΚΕΣ (ΒΑΣΙΖΟΝΤΑΙ ΣΤΟΝ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟ ΙΧΝΗΘΕΤΩΝ – PROBES)

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

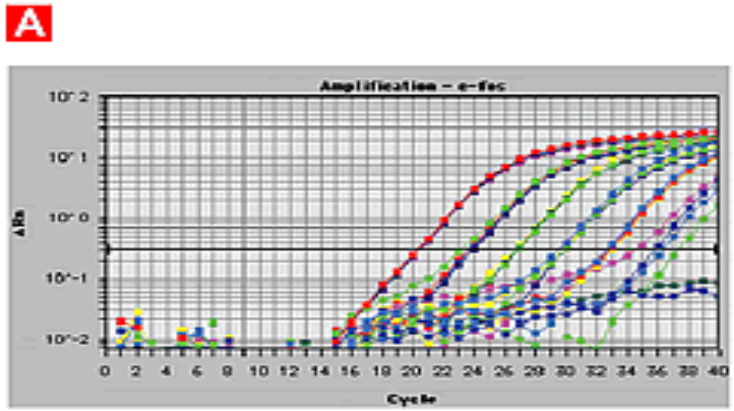
ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

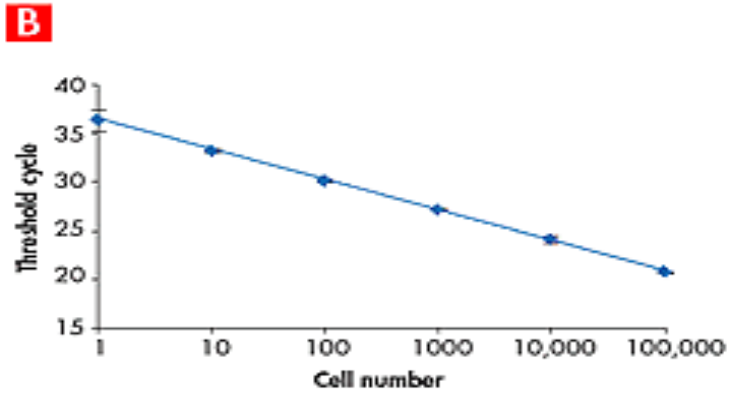
- ***Πλεονεκτήματα Real-Time PCR έναντι Συμβατικής PCR:***
  - Δεν επηρρεάζεται από μη-ειδικά προϊόντα
  - Η παραγωγή των προϊόντων παρακολουθείται συνεχώς σε κάθε κύκλο και όχι μόνο στο τέλος
  - Καμμία επεξεργασία μετά το τέλος της αντίδρασης (↓ χρόνος, ↑ ευκολία, ↓ επιμολύνσεις)
  - Συντομότεροι κύκλοι (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***

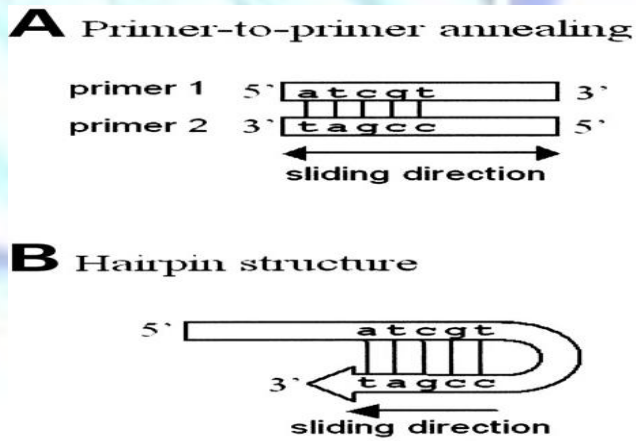
Ανίχνευση Φθορισμού:
Δυνατότητα Αντικειμενικού Προτύπου Ποσοτικοποίησης με Βαθμονομημένο Πρότυπο





ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

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



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

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

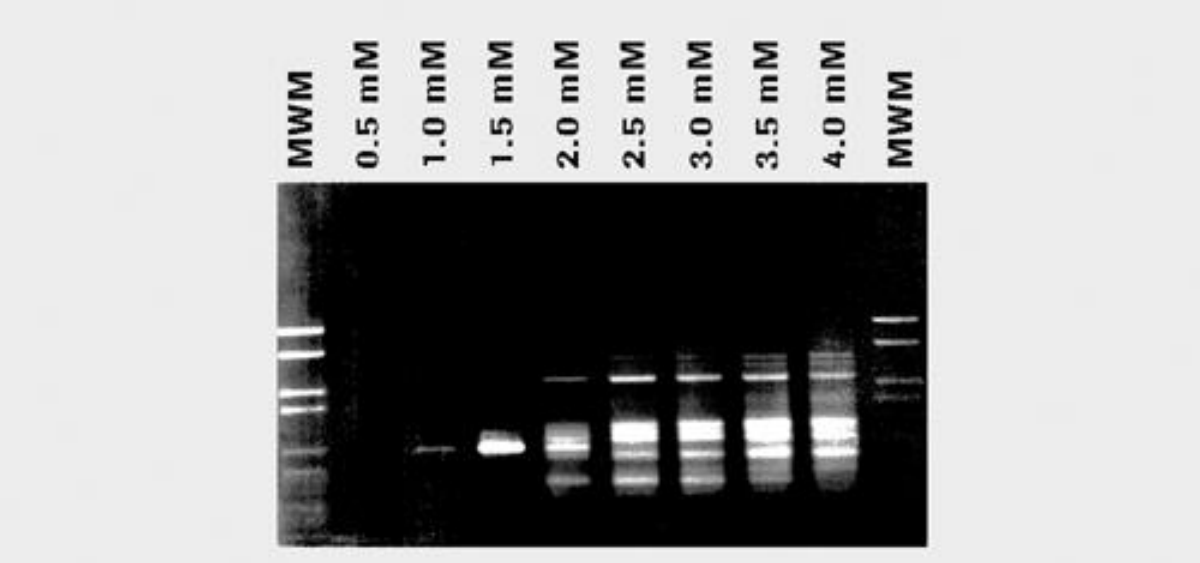
- ***Βελτιστοποίηση Ευαισθησίας/Ειδικότητας:***
  - Συγκέντρωση ιόντων Mg^{2+} (1.5-2.5mM)
  - Αριθμός κύκλων (25-50) (Κλειστό, «πεπερασμένο» σύστημα η κάθε αντίδραση)
  - Συγκέντρωση θερμοάντοχου ενζύμου Taq πολυμεράση (1.5-3u ανά δείγμα)
  - Συγκέντρωση DNA-στόχου
  - Καταπολέμηση Αναστολέων

  } 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

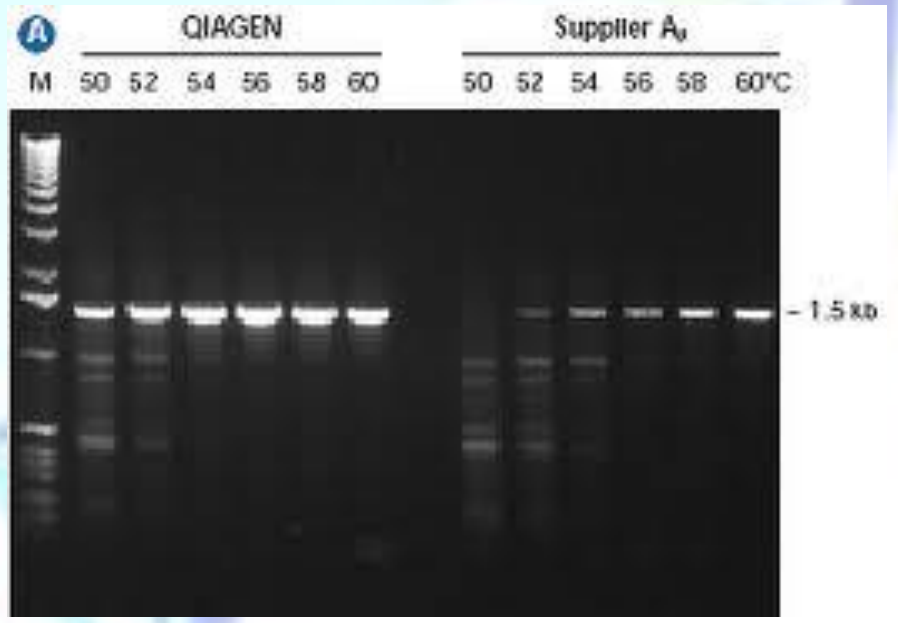
- ***Βελτιστοποίηση Ευαισθησίας/Ειδικότητας:***
  - ***Παράδειγμα:*** Συγκέντρωση ιόντων Mg^{2+} (1.5-2.5mM)



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

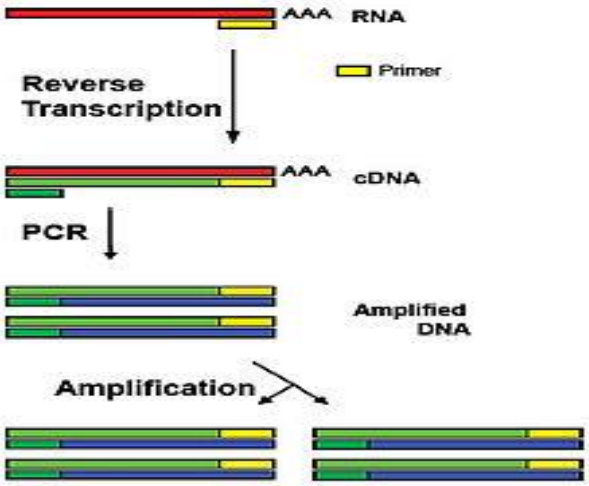
ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

- ***Πλεονεκτήματα*:**
  - **Ταχύτητα**, **Ευαισθησία**, **ειδικότητα**
  - Ανίχνευση μεταλλάξεων που σχετίζονται με ασθένειες
  - Ανίχνευση μικροροογανισμών →Χρόνιες Λοιμώξεις
  - Ανίχνευση μικροβιακού γενετικού υλικού χαμηλού τίτλου → πολύπλοκα κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα (π.χ. μυοκαρδιακός ιστός, δείγματα ιστού μονιμοποιημένα με φορμαλίνη και παραφίνη, Ε.Ν.Υ. 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

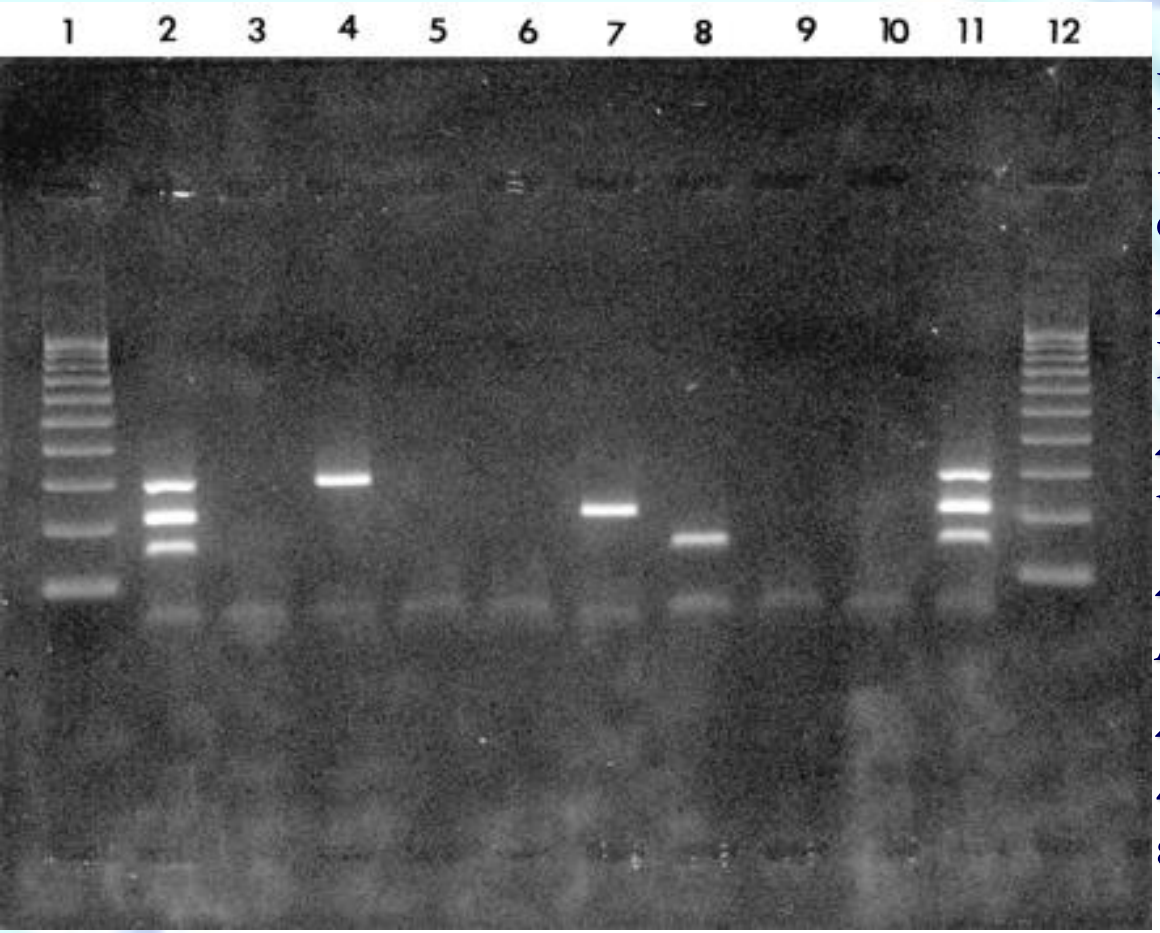
- **Αντίστροφη Μεταγραφή (Reverse Transcription) PCR (RT-PCR):**
  - Ανίχνευση **RNA**- και όχι DNA-στόχου
  - Προηγείται το στάδιο της **Αντίστροφης Μεταγραφής** για μετατροπή του RNA σε DNA (complementary – cDNA) για την επακόλουθη εφαρμογή της PCR
  - Ανίχνευση ιών με γενετικό υλικό RNA (π.χ. picorna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

Αντίστροφη Μεταγραφάση (Reverse Transcriptase): Ένζυμο Κλειδί



ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

- **<u>Πολυπλεκτική (Multiplex) PCR</u>:** 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 ΜΒ.

Στήλες 2 και 11: HSV-1, VZV και EV.

Στήλες 3, 5, 6, 9 και 10: Αρνητικά.

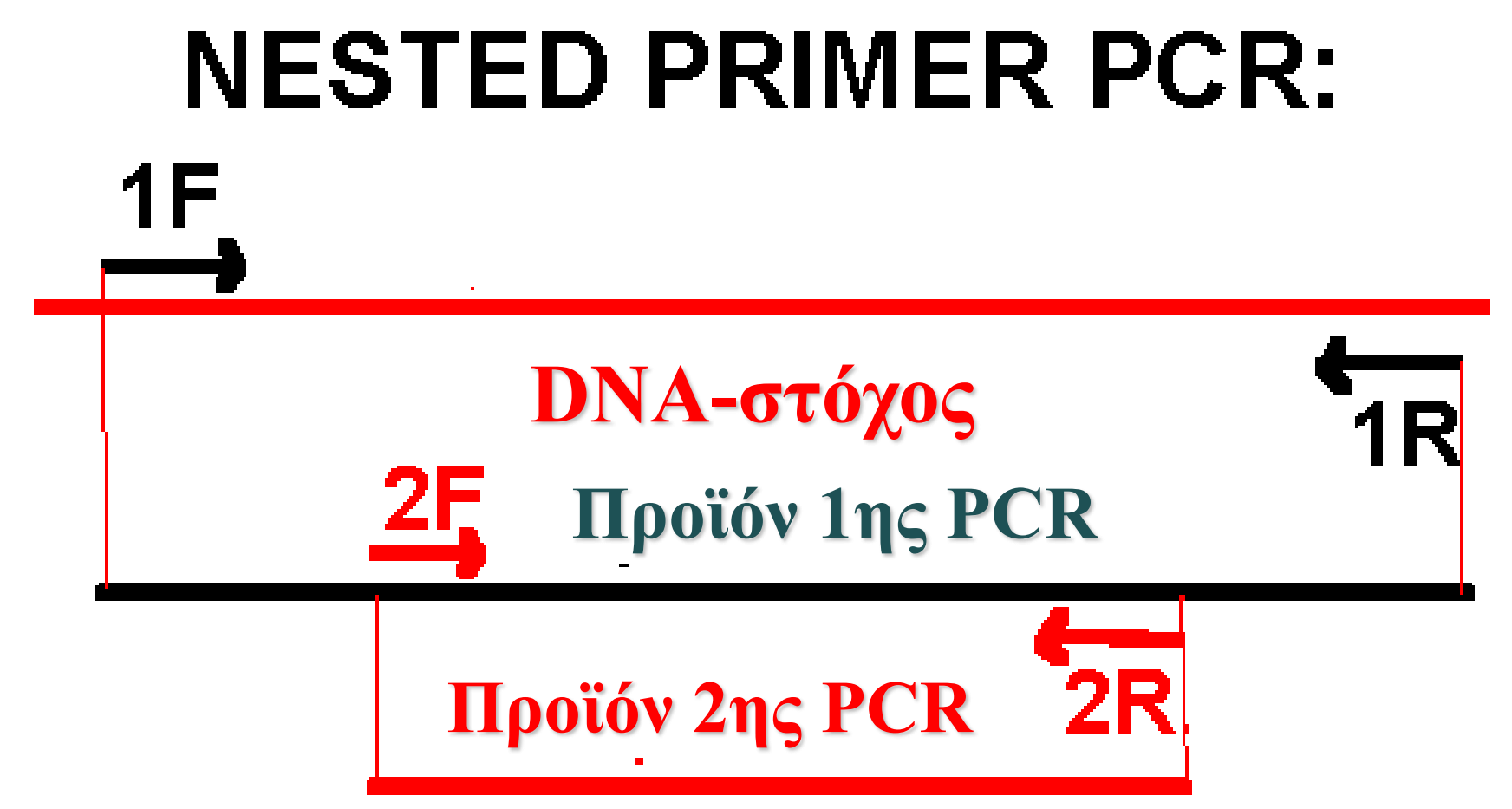
Στήλες 4, 7, 8: HSV-1 (στήλη 4), VZV (στήλη 7), και εντεροϊό (στήλη 8).

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:**

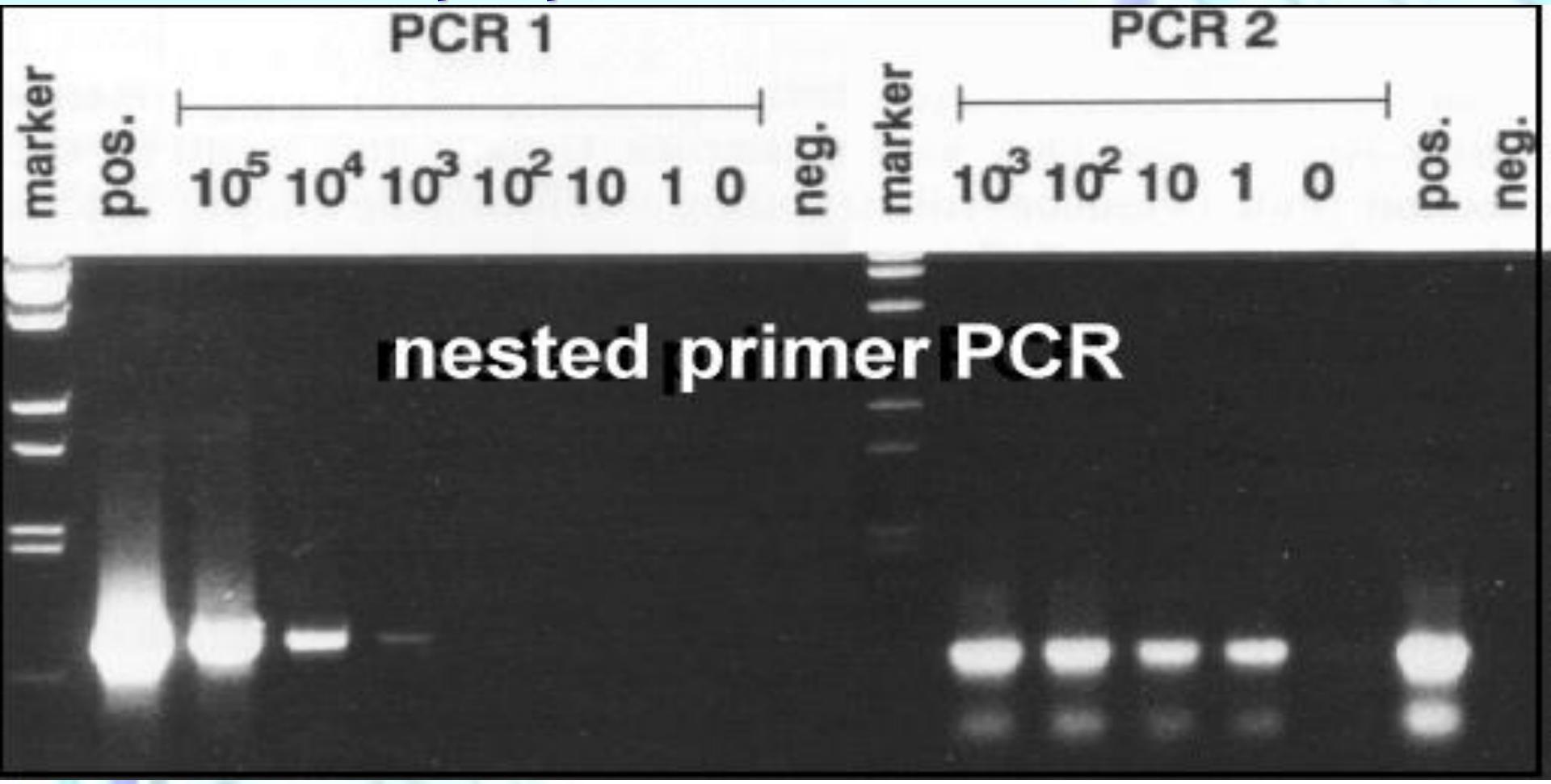


1F και 1R: Ζεύγος Εκκινητικών Μορίων 1ης PCR

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 10^3 μόρια DNA-στόχου, ενώ η δεύτερη PCR ανιχνεύει έως και 1 μόριο DNA.

ΠΕΡΑ ΑΠΌ ΤΗΝ PCR:

ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ (SEQUENCING) ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

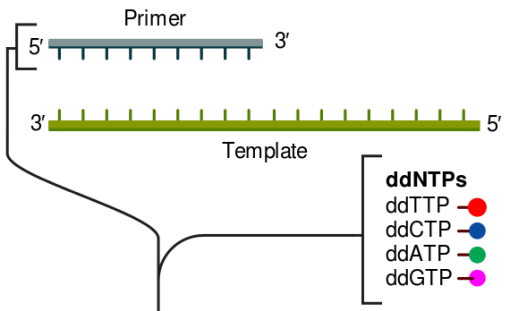
- Υπέρτατος βαθμός ανάλυσης γενετικού υλικού, χαρτογράφησης γονιδίων, ταυτοποίησης – τυποποίησης (Θυμ. ***ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΚΩΔΙΚΑΣ***)

SEQUENCING

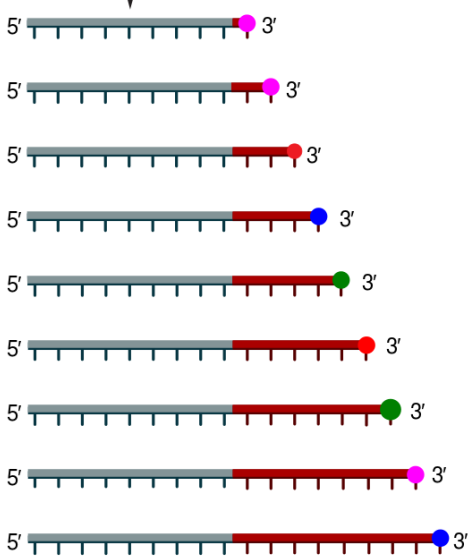
Πρωτότυπη Μέθοδος “Sanger”

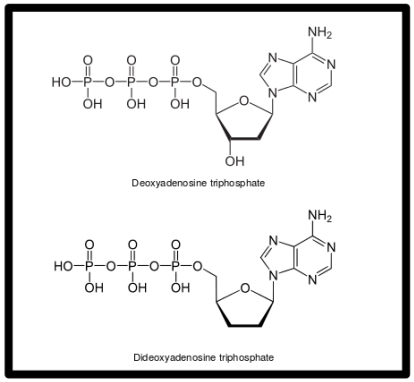
① *Μείγμα Αντίδρασης*

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

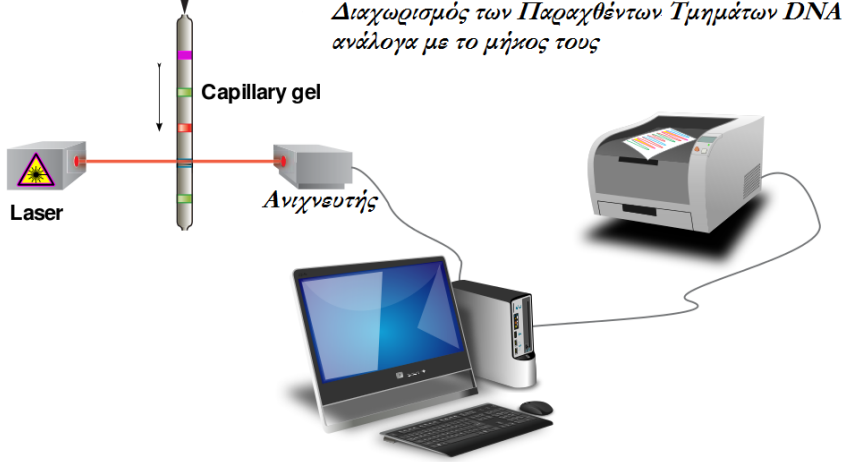


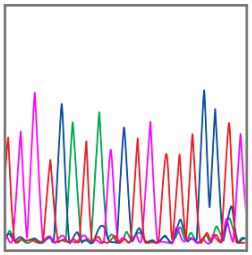
② *Δημιουργία Αντιγράφου και Τερματισμός Επιμήκυνσης Συμπληρωματικού κλώνου*





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



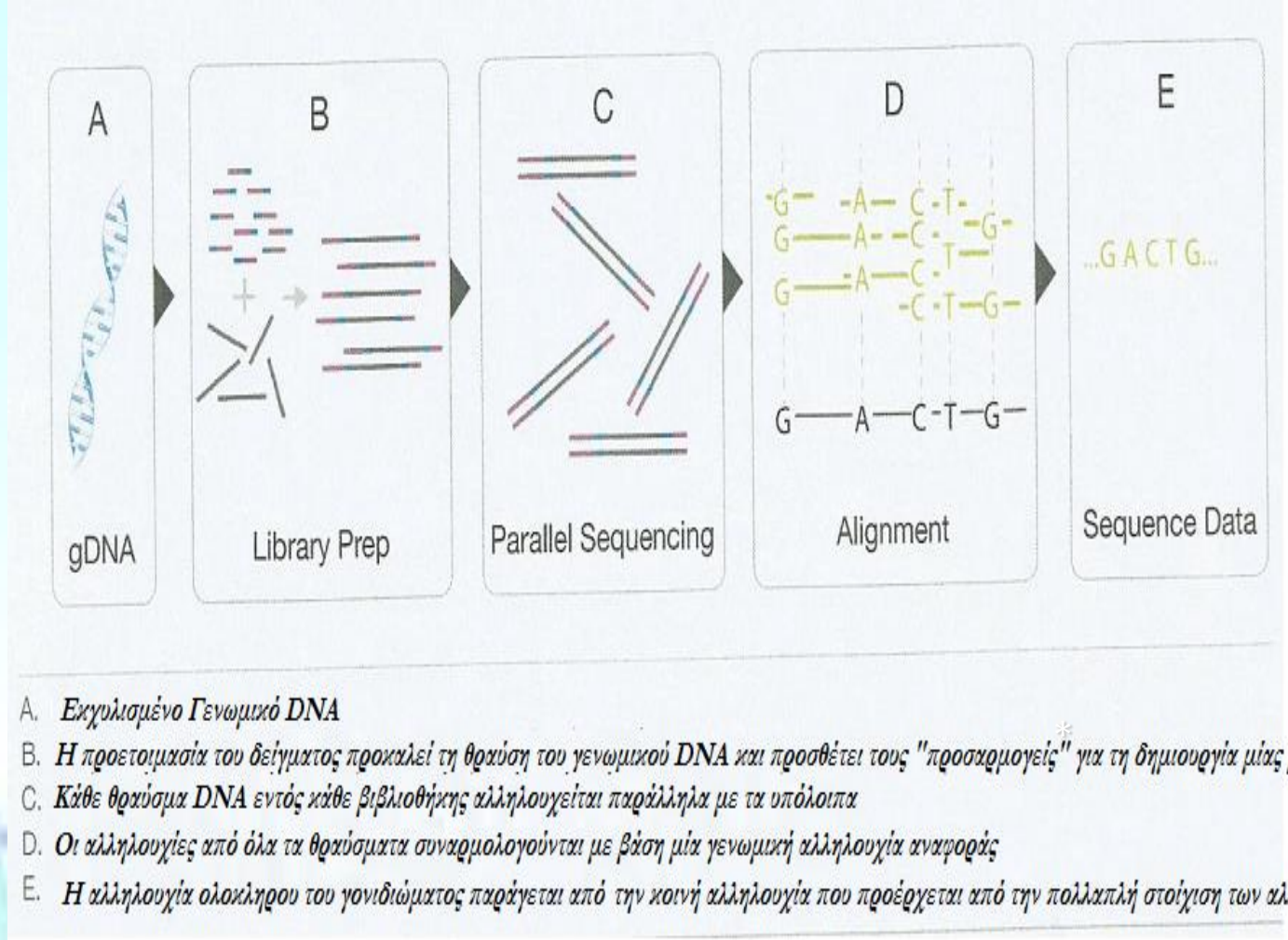


Χρωματόγραμμα

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

SEQUENCING

Πιο Σύγχρονες Μέθοδοι – Next Generation Sequencing



Illumina

A. *Εκχυλισμένο Γενωμικό DNA*

B. *Η προετοιμασία του δείγματος προκαλεί τη θραύση του γενωμικού 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 γενωμική αλληλουχία αναφοράς*

E. *Η αλληλουχία ολοκλήρου 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 γενωμικού 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

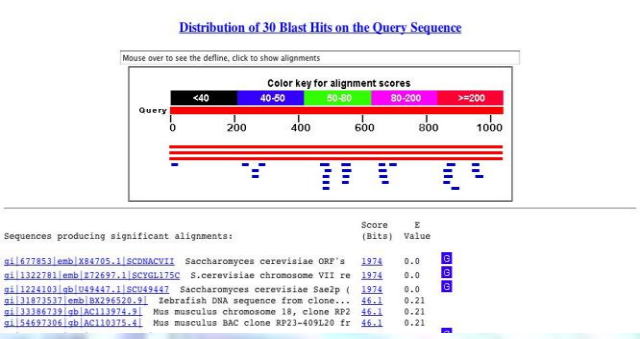
* Can sequence up to 75 strains per run at 30x coverage
**Assumes single 3730xl instrument running 24 hr/day
† Excluding sample prep

SEQUENCING

- Ακολουθεί η περαιτέρω ανάλυση του Γεν. Υλικού με:
  - ***Βιοπληροφορική***

Ταυτοποίηση Ιών

Ταξινόμηση Ιών

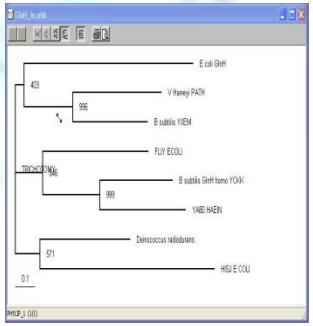


Λογισμικό BLAST

Σύγκριση με Γονιδιακές Αλληλουχίες Κατατεθειμένες σε Αποθήκες Δεδομένων Αναφοράς

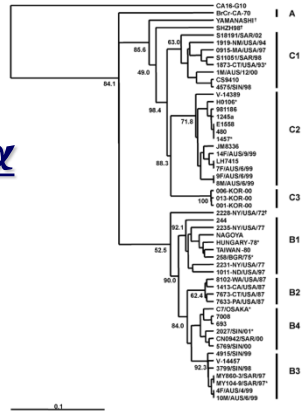
ClustalW

Πολλαπλή στοίχιση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών



TreeView

Κατασκευή Φυλογενετικών Δέντρων



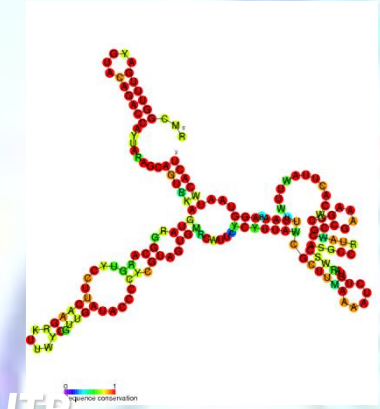
Δενδρόγραμμα

SEQUENCING

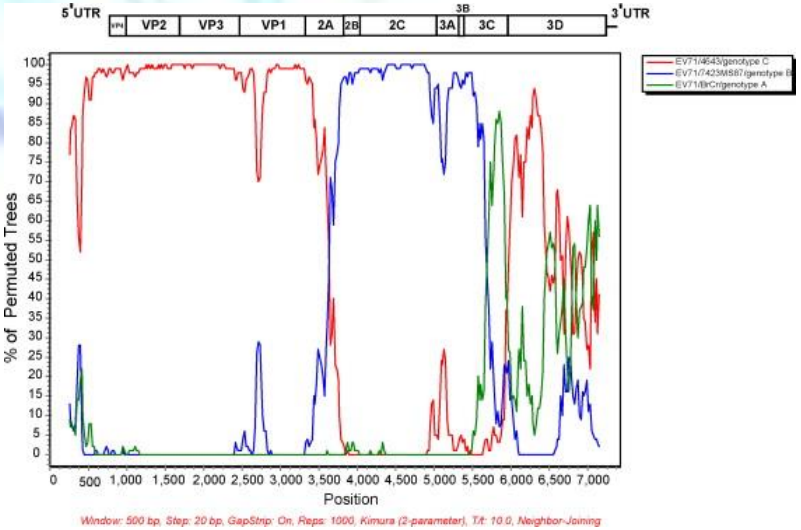
- Ακολουθεί η περαιτέρω ανάλυση του Γεν. Υλικού με:
  - ***Βιοπληροφορική***

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

Δομικές Μελέτες



5'-UTR



Simplot: Γενετικός Ανασυνδυασμός σε Στελέχη Εντεροϊών

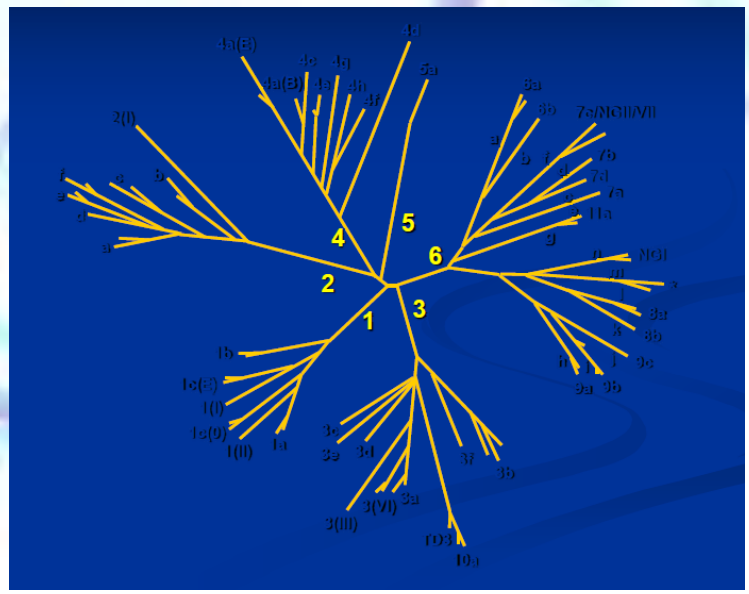
SEQUENCING

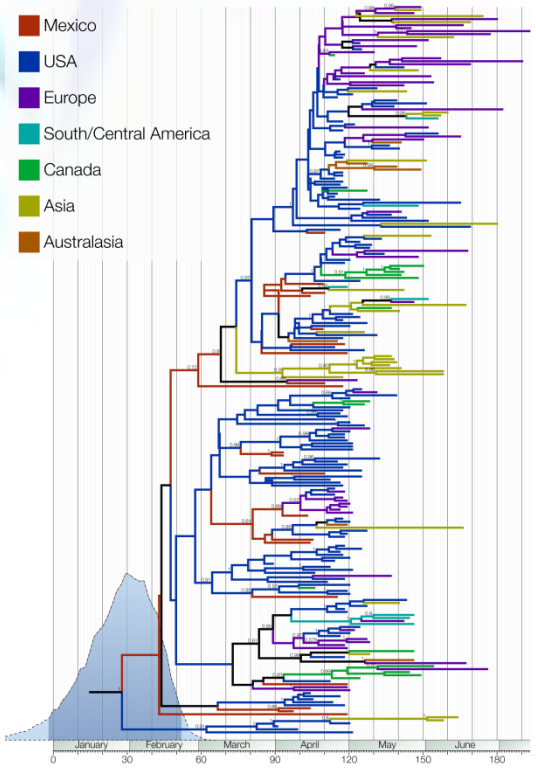
- Ακολουθεί η περαιτέρω ανάλυση του Γεν. Υλικού με:
  - ***Βιοπληροφορική***:

Ανακάλυψη Νέων Ιών

Γονοτυπική Ταυτοποίηση – Θεραπεία

Τυποποίηση – Επιδημιολογία Ιών





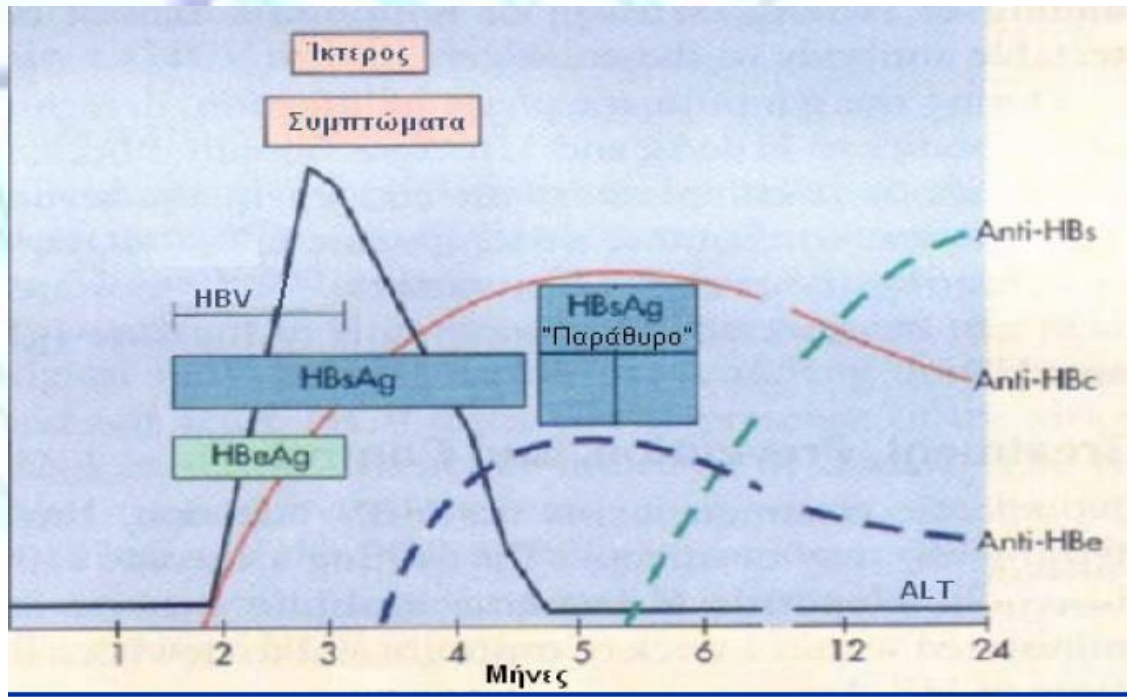
Π.χ. Γονότυποι HCV: Διαφορική Θεραπεία

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ

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

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ

- Ανίχνευση σε Λοιμώξεις Ήπατος
  - **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)
  - **HBV:**



ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ

- Ανίχνευση σε Λοιμώξεις Ήπατος
  - **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
  - **HCV:**
    - ✓ Anti-HCV δεν αρκούν για διάγνωση
    - ✓ Μοριακός Έλεγχος → *Επιβεβαιωτική Μέθοδος*
    - ✓ Έναρξη/Παρακολούθηση Θεραπείας (Ποσοτική Εκτίμηση)
- Ανίχνευση αναπνευστικών ιών:
  - Ταχεία και ειδική μοριακή ανίχνευση με PCR **SARS**, **corona ιών**, **influenza** από κλινικά δείγματα του ανωτέρου και του κατωτέρου αναπνευστικού συστήματος
- Ανίχνευση εντερικών ιών:
  - 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:
  - **Anti-CMV IgG-IgM, CMV Ag pp65:** Μειωμένη ευαισθησία, πρόβλημα με ανοσοκατεσταλμένους (ανίχνευση IgG/IgM) και ουδετεροπενικούς (pp65 Ag, PMN κύρια πηγή).
  - **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:
  - Γονοτυπική ταυτοποίηση HIV για την ανίχνευση ανθεκτικότητας στη θεραπεία
  - Σημαντική η γονοτυπική ταυτοποίηση για τη διαχείριση και θεραπεία χρονίας ιογενούς ηπατίτιδας (HCV, HBV)
  - **Human Papilloma Virus (HPV):** Εμφάνιση των περισσοτέρων 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:

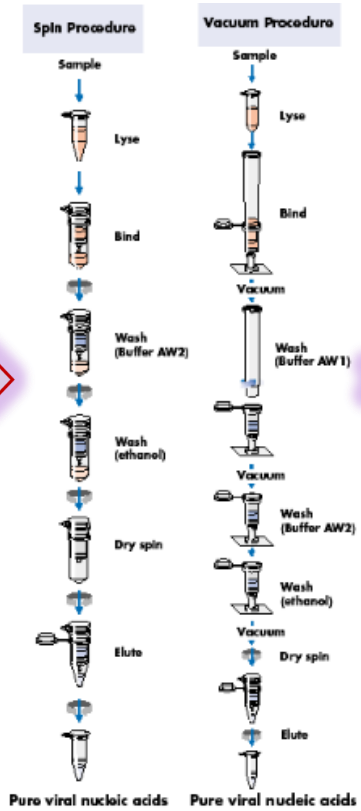
Μοριακές Μέθοδοι

- Εξειδικευμένες Γνώσεις
- Εκπαίδευση
- Χρονοβόρες

Κλινικό Δείγμα

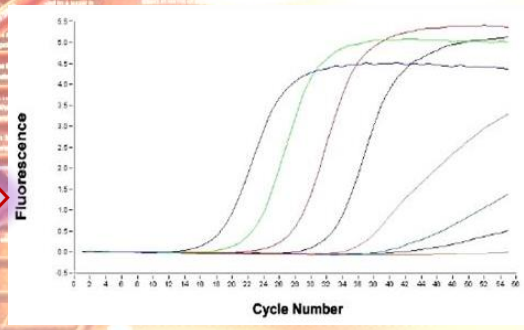
Universal Transport Medium & patented Flocked Swabs

Εκχύλιση Γεν. Υλικού



Εκτέλεση PCR

Αποτελέσματα και Ερμηνεία

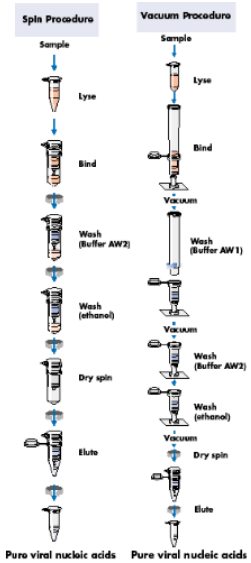


Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

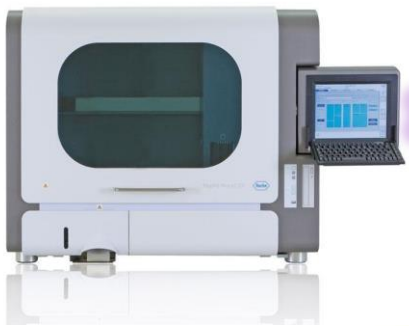
Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

- ***Επόμενο Στάδιο Εξέλιξης:***

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



Χειροκίνητη Εκχύλιση Γεν. Υλικού



Αυτοματοποιημένη Εκχύλιση Γεν. Υλικού

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

Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ: ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Συμπτώματα ↔ Κλιν. Ενδείξεις

ΣΥΝΔΡΟΜΟ

Αιτιολογία | Παθοφυσιολογία | Ανοσολογία | Επιδημιολογία | Επιπλοκές

↓

Εργαστηριακή Διερεύνηση

Είδος Εξέτασης | Είδος Κλινικού Δείγματος | Χρόνος Λήψης & Μεταφορά. Δείγματος

↓

Αποτελέσματα → Ερμηνεία → **Διάγνωση** → **Θεραπεία**

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…)*

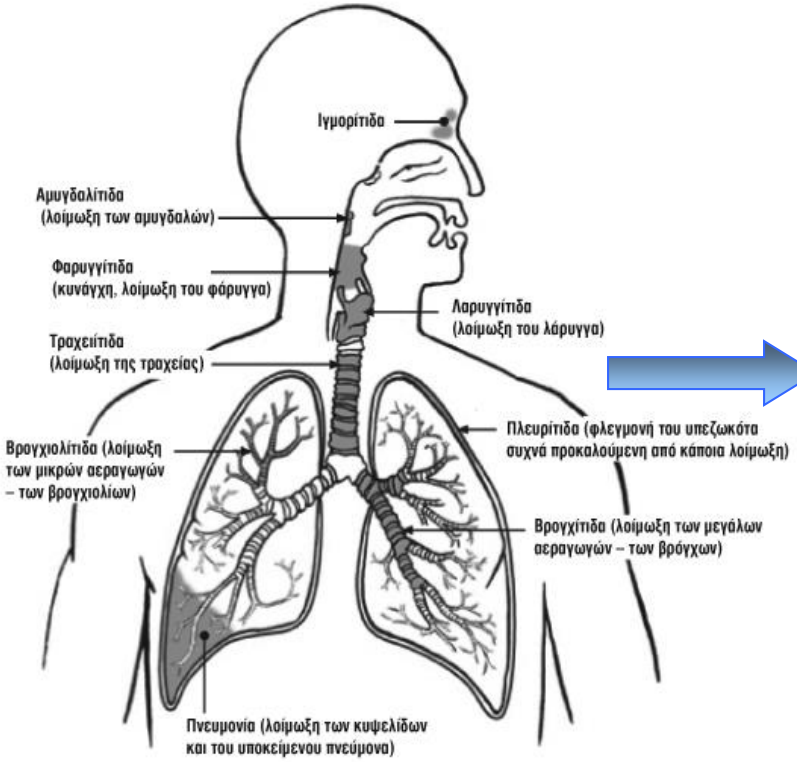
      ↓
    - ***Είδος Εργαστηριακής Εξέτασης;***

      ↓
    - ***Αποτέλεσμα;***

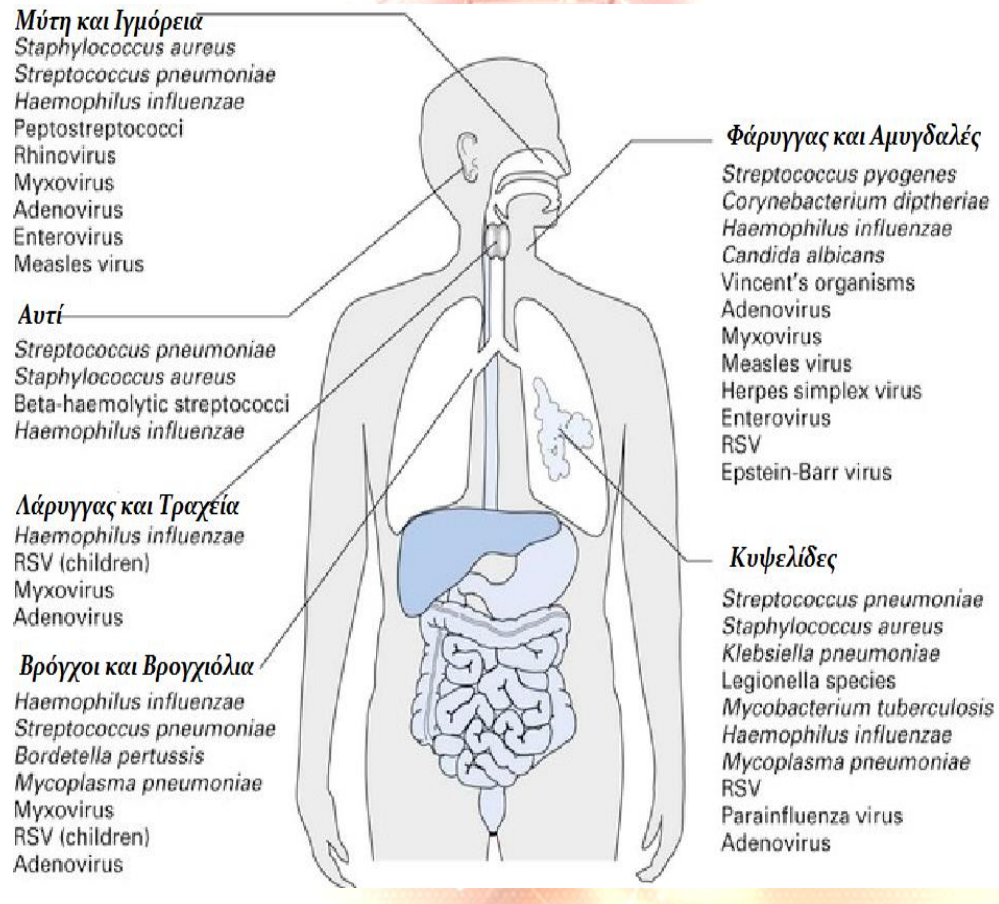
      ↓
    - ***Ερμηνεία Αποτελέσματος → Διάγνωση → Θεραπεία;***

Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ: ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

- ***Λοιμώξεις Αναπνευστικού Συστήματος***



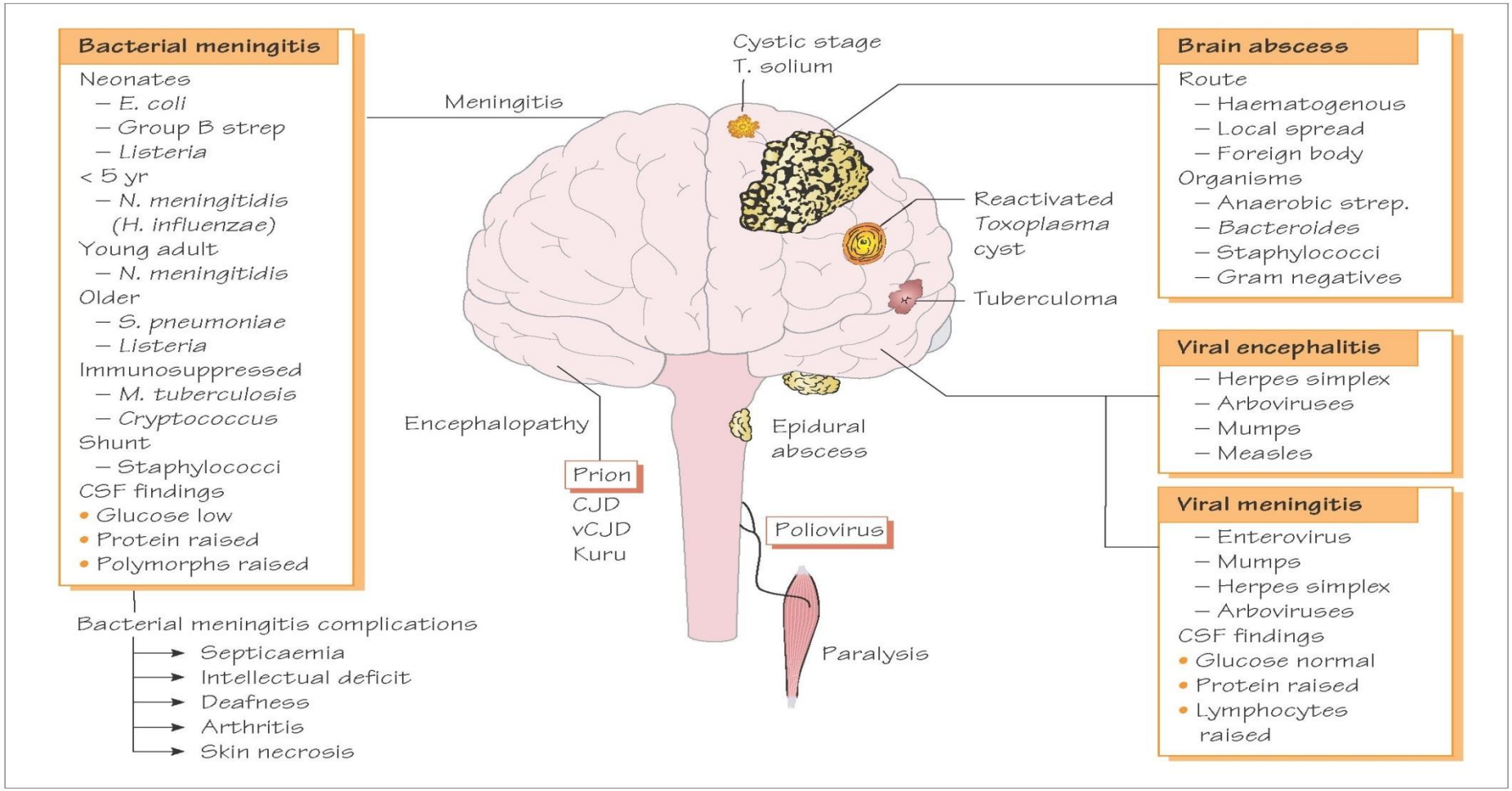
Λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος



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?

Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ: ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

- ***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

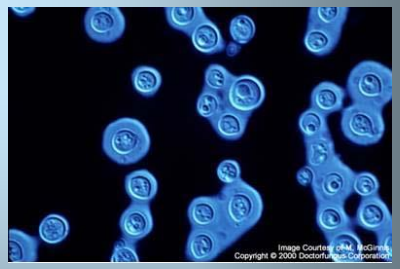
Επιπτώσεις επί τη απουσία Έγκαιρης Διάγνωσης

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 ***Έγκαιρη*** Εργαστηριακή Διάγνωση:

ΕΝΥ: Οσφυονωτιαία Παρακέντηση

Εξέταση ΕΝΥ
- Αριθμός Κυττάρων
- Πρωτεΐνη
- Γλυκόζη

Καλλιέργεια
- Βακτήρια
- Μύκητες
- Μυκοβακτήρια

Χρώση Gram/Ziehl-Neelsen/Indian Ink
- Βακτήρια
- Μύκητες
- Μυκοβακτήρια
- Κρυπτόκοκκος

PCR
- Βακτήρια, Μύκητες
- Ιοί
- Μυκοβακτήρια

Συγκολλητινοαντίδραση Latex
- Βακτήρια
- Μύκητες
- Μυκοβακτήρια

Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ: ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

- ***Λοιμώξεις Κεντρικού Νευρικού Συστήματος***

–Προκλήσεις για τη ***Σωστή*** και ***Έγκαιρη*** Εργαστηριακή Διάγνωση:

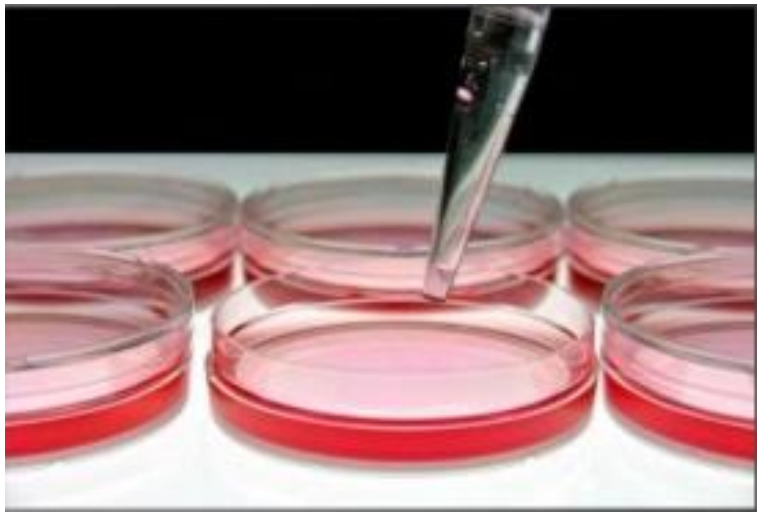
→*Χρονοβόρα και τεχνικώς πολύπλοκη διαδικασία*

→*(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…)*

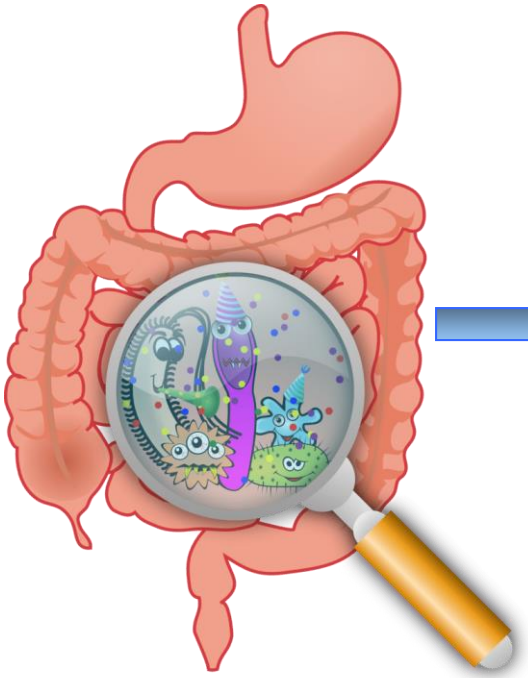
→*Χορήγηση αντιβιοτικών και αντιιϊκών επηρρεάζει αποτέλεσμα*

→*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

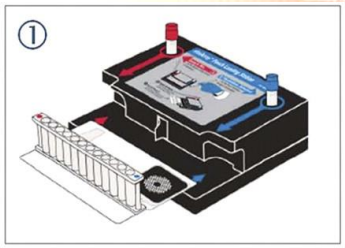
Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ: ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

- ***Το «Στοίχημα» 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.:

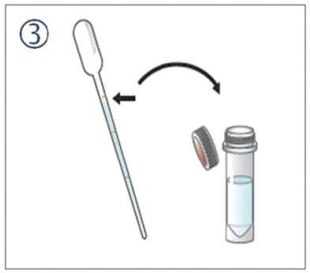
FilmArray

FilmArray RP Pouch

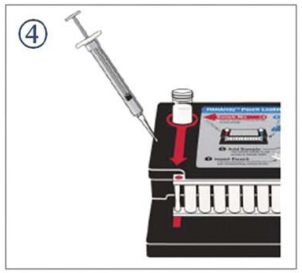


Load Pouch

Inject Hydration Solution



Add Sample to Buffer



Inject Sample

Load Pouch in FilmArray

Χρόνος «hands-on»: 3-5min

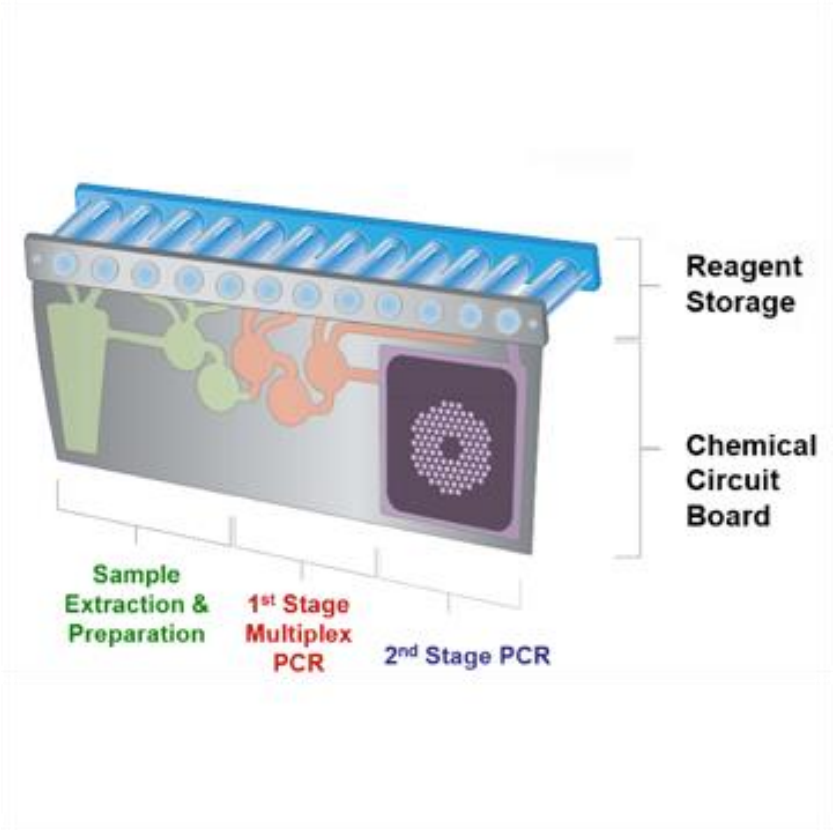
Χρόνος έως τη λήψη αποτελεσμάτων: 1:15'

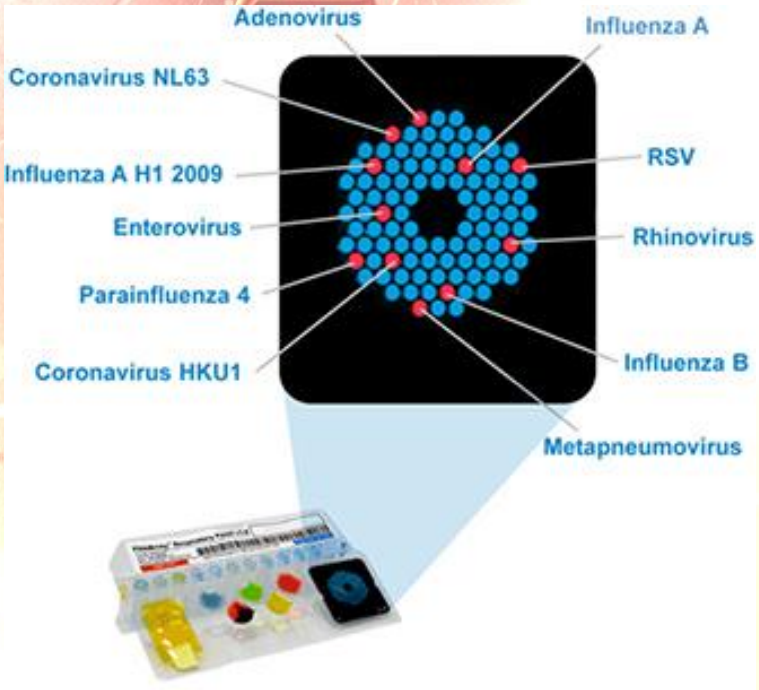
Απλή Διαδικασία: Όχι ειδικές γνώσεις – εργαλεία ακριβείας

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 & Αιμοκαλλιέρνειες

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

Parasites

Cryptosporidium
Cyclospora cayetanensis
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
Entero Virus
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

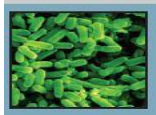
Bordetella pertussis
Chlamydophila pneumoniae
Mycoplasma pneumoniae

The FilmArray BCID Panel

Simultaneous detection of 27 targets:

Gram + Bacteria

- *Staphylococcus*
- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Enterococcus*
- *Listeria monocytogenes*

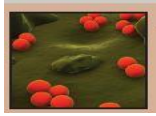


Gram - Bacteria

- *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

- *mecA*
- *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			
Campylobacter species	✓	✓	✓
Salmonella species	✓	✓	✓
Shigella species/enteroinvasive *E. coli*[b]	✓	✓	✓
Vibrio species	✓		✓
Vibrio cholerae		✓	✓
Yersinia enterocolitica	✓		✓
Escherichia coli O157		✓	✓
Enterotoxigenic *E. coli*		✓	✓
Enteropathogenic *E. coli*			✓
Enteroaggregative *E. coli*			✓
Plesiomonas shigelloides			✓
Shiga toxin-producing *E. coli* (stx_1-stx_2)	✓[c]	✓	✓
Clostridium difficile (toxin A/B)		✓	✓
Viruses			
Norovirus GI/GII	✓	✓	✓
Rotavirus A	✓	✓	✓
Astrovirus			✓
Adenovirus 40/41		✓	✓
Sapovirus			✓
Parasites			
Cryptosporidium species		✓	✓
Entamoeba histolytica		✓	✓
Giardia lamblia		✓	✓
Cyclospora cayetanensis			✓
No. of samples (throughput)	1–32 (scalable)	24	1–12 (scalable)
Time to result (h)	<2	~5	~1

[a]EP, enteric pathogens; GPP, gastrointestinal pathogen panel; GIP, gastrointestinal panel
[b]The Verigene EP and Luminex GPP do not specifically target enteroinvasive *E. coli*.
[c]The Verigene EP has separate targets for stx_1 and stx_2.

Ramanan et al (2018), Clin Microbiol. Rev 31(1): e00024-17

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							
Chlamydophila pneumoniae	✓				✓		✓
Mycoplasma pneumoniae	✓				✓		✓
Bordetella pertussis	✓	✓					
Bordetella parapertussis-Bordetella bronchiseptica		✓					
Bordetella holmesii		✓					
Time to result (h)	~1	~2–3	~8	~6	~4	~6	~1.5

[a]The acceptable specimen type for all panels is a nasopharyngeal swab. RVP, respiratory virus panel; RPP, respiratory pathogen panel.

Ramanan et al (2018), Clin Microbiol. Rev 31(1): e00024-17

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 ΕΝΥ τι θα βγάλει? (Συχνό Φαινόμενο: Ζήτηση από κλινικές απ' ευθείας μοριακών μεθόδων πριν τη Γενική ΕΝΥ…)*

Μερικές Φορές Φυσιολογική σε Ιογενείς Λοιμώξεις ΚΝΣ

- *Παιδιατρική Κλινική:* *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 ΕΝΥ:* *Ελαφρώς αυξημένη πρωτεΐνη, 45σκκχ, Πολυμορφοπυρηνικός τύπος (!) (αρχή λοίμωξης…)*

Σταματάει εδώ η Διάγνωση με την Ανίχνευση του Παθογόνου?

ΟΧΙ!!!

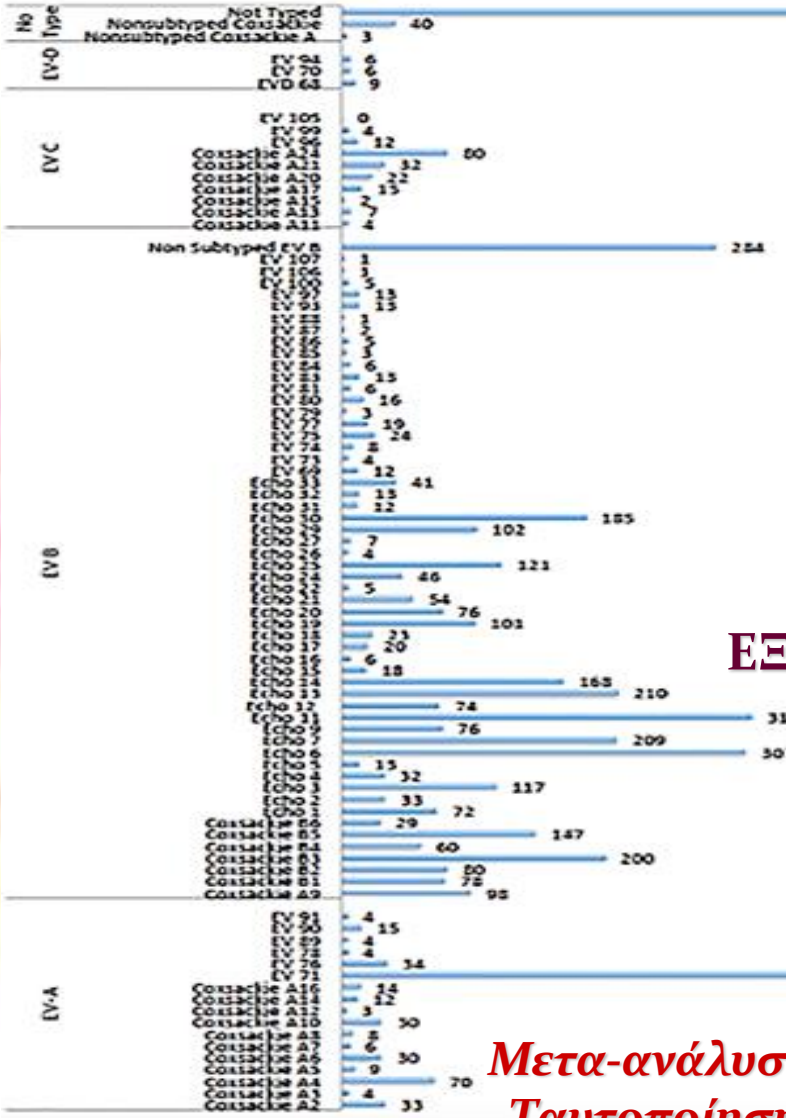
ΑΡΚΕΤΕΣ ΟΙ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ ΟΠΟΥ ΧΡΕΙΑΖΕΤΑΙ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΑΝΑΛΥΣΗ

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 EV



ΜΗ-ΠΟΛΙΟ ΕΝΤΕΡΟΪΟΙ & ΟΞΕΙΑ ΧΑΛΑΡΗ ΠΑΡΑΛΥΣΗ

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

ΕΞΕΛΙΞΗ → ΝΕΑ ΣΤΕΛΕΧΗ EV, ΝΕΕΣ ΛΟΙΜΟΓΟΝΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

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

Journal of Medical Virology, Volume: 90, Issue: 1, Pages: 3-7

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

- *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 EV

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.

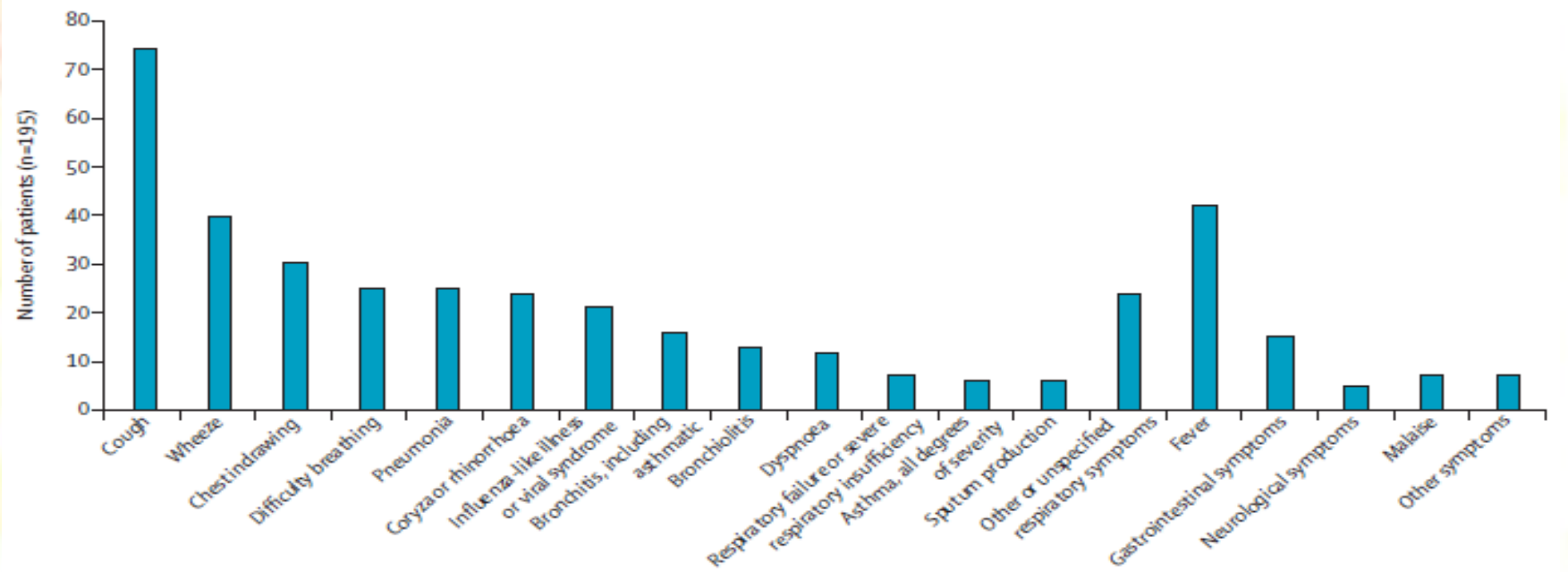
- *Πολιτεία Κολοράντο:*
  - *34 Περιστατικά Νόσου ΚΝΣ, 3 AFM, 3 HFMD*
    - *Όλα EV-A71*

Νέα Λοιμογόνα Στελέχη με Μεταλλάξεις στη VP1

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

EV-D68: ΑΝΑΔΥΣΗ ΕΝΟΣ ΝΕΟΥ ΠΟΛΙΟΪΟΥ

- ***Κλινικές Εκδηλώσεις - Επιδημιολογία:***
  - *Συνολικά*: >2000 Περιστατικά EV-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 EV-D68

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

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

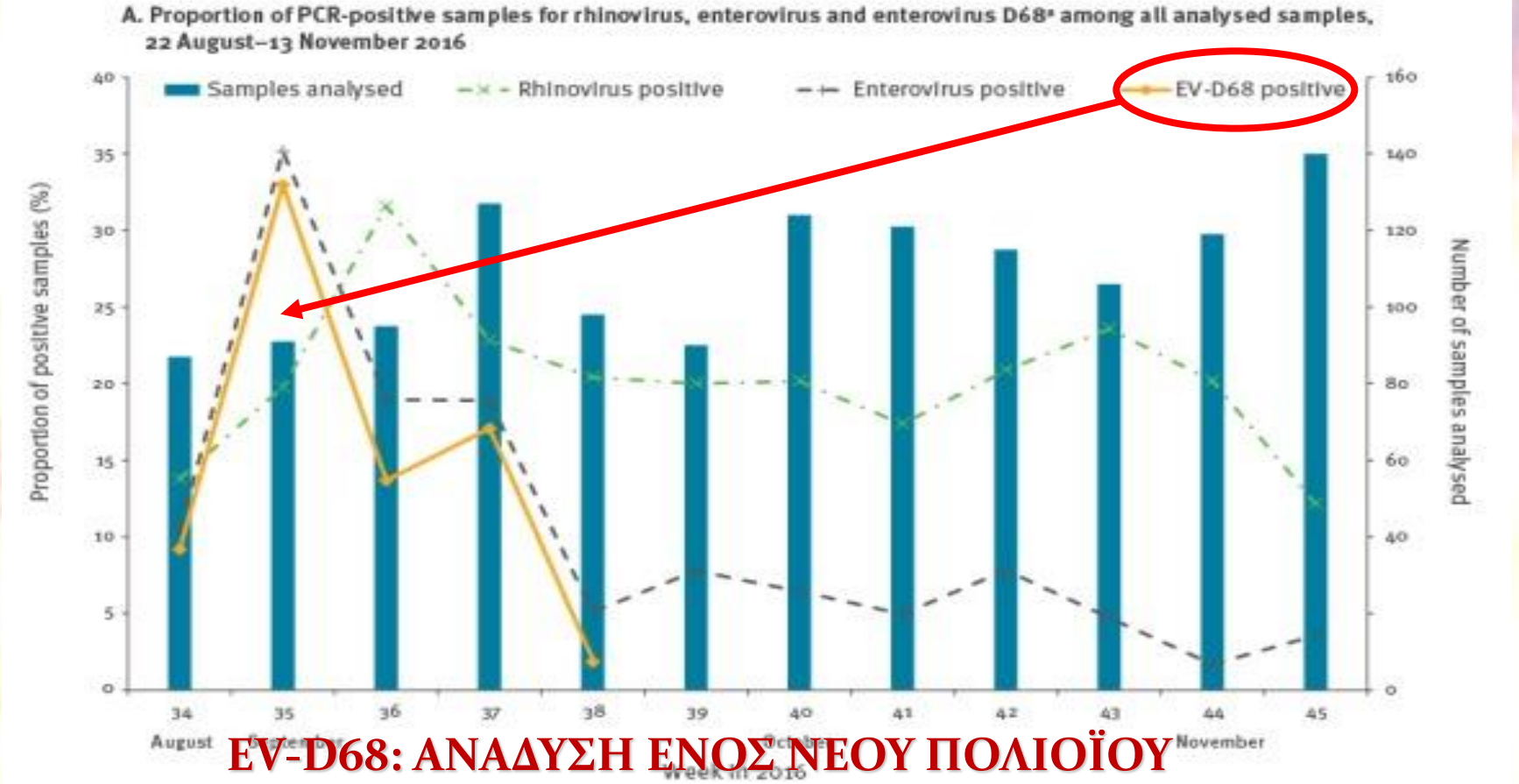
EV-D68: ΑΝΑΔΥΣΗ ΕΝΟΣ ΝΕΟΥ ΠΟΛΙΟΪΟΥ

- ***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 EV-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 ΓΙ Α ΚΑΛΥΤΕΡΗ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΤΟ ΕΝΔΟΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΑ

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



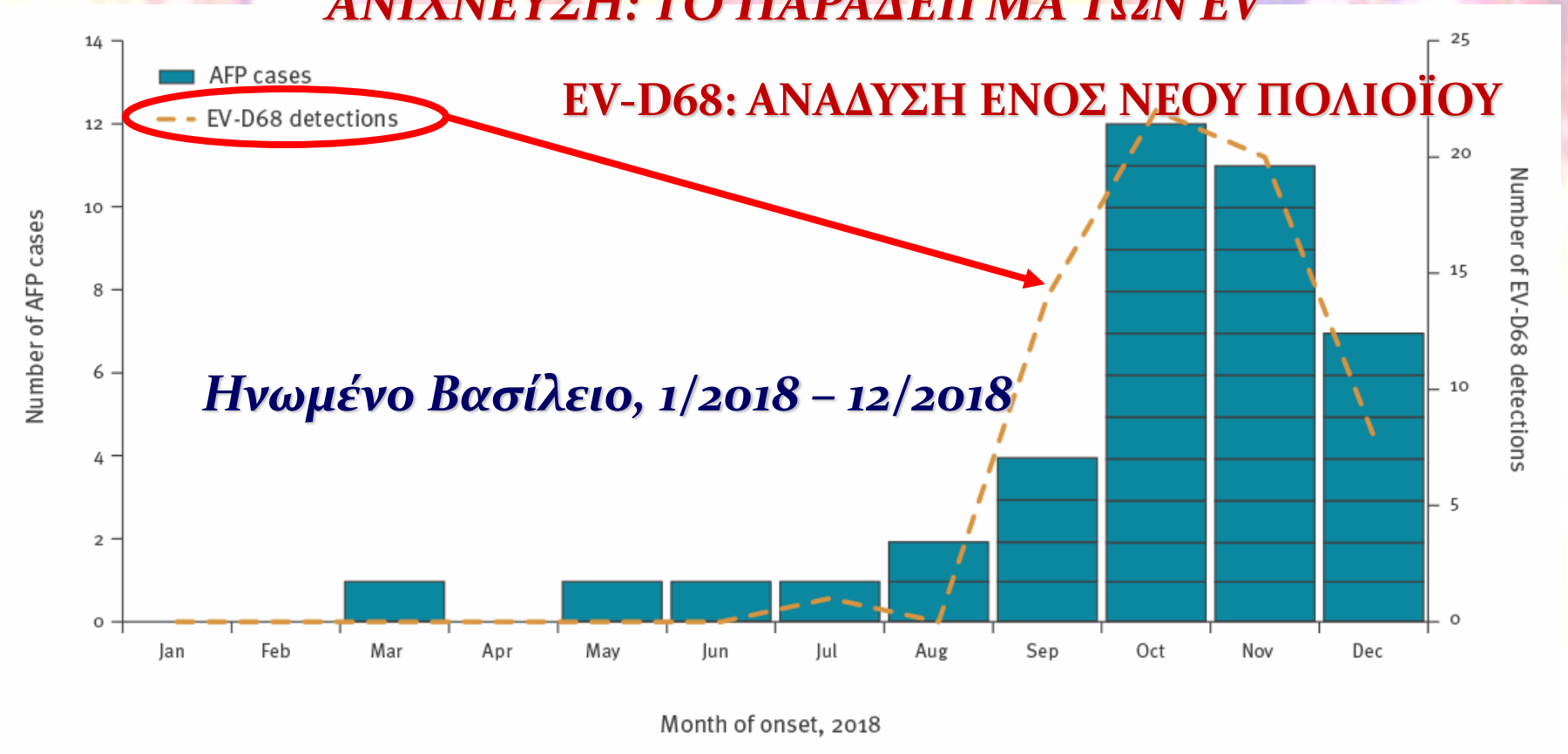
EV-D68: ΑΝΑΔΥΣΗ ΕΝΟΣ ΝΕΟΥ ΠΟΛΙΟΪΟΥ

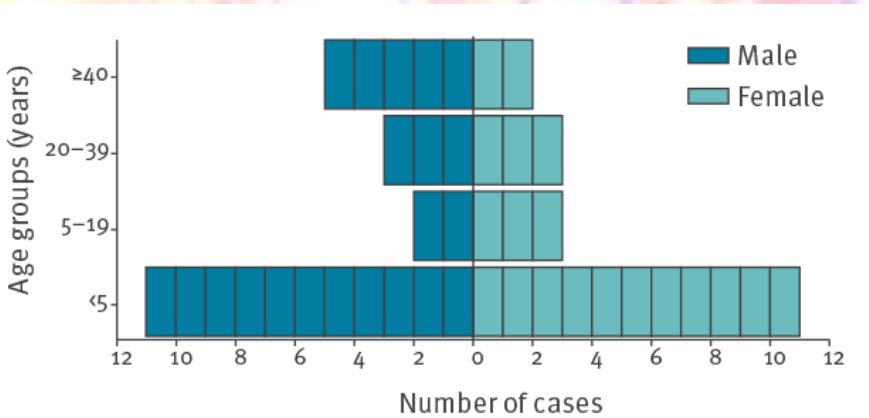
(Euro Surveill. 2016 Nov 17; 21(46): 30403)

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 EV





- *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 ΕΥ

- ***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:*

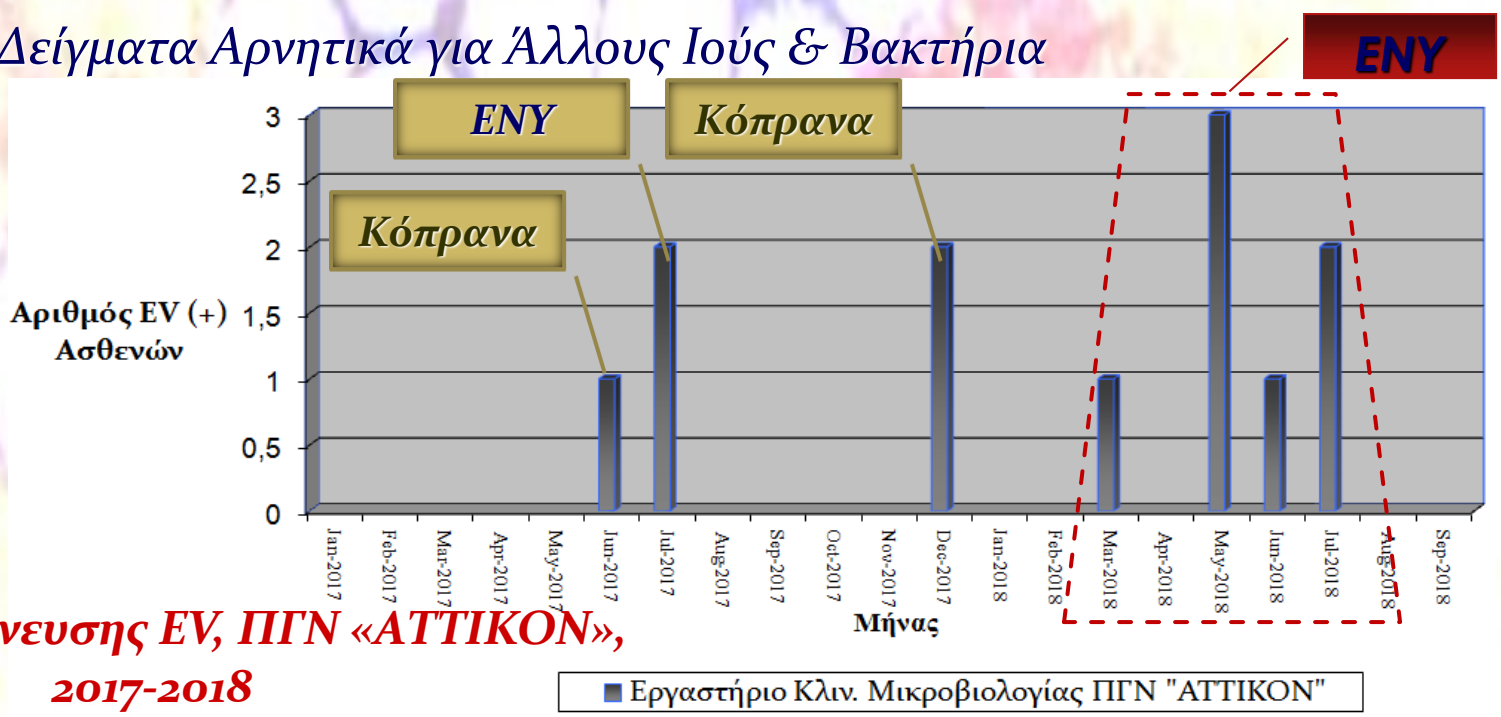
Υπέρτατο Επίπεδο Ανάλυσης

Συμβατική Nested RT-PCR (Γονίδιο 1D) → ***Sequencing*** *(Γεν. Προσδιορισμός Οροτύπου)* → ***Αποτέλεσμα: Όλα Εξο Επιδημία(?)***

Αδυναμία Πολυπλεκτικής Μεθόδου Αναγνώρισης Επιδημίας

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

- ***Ελλάδα, 2018:***
  - *Περίοδος Μελέτης: 6 Μήνες (2/2018 – 7/2018)*
  - *Αριθμός Δειγμάτων ΕΝΥ: 28*
  - *Θετικά για EV: 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*

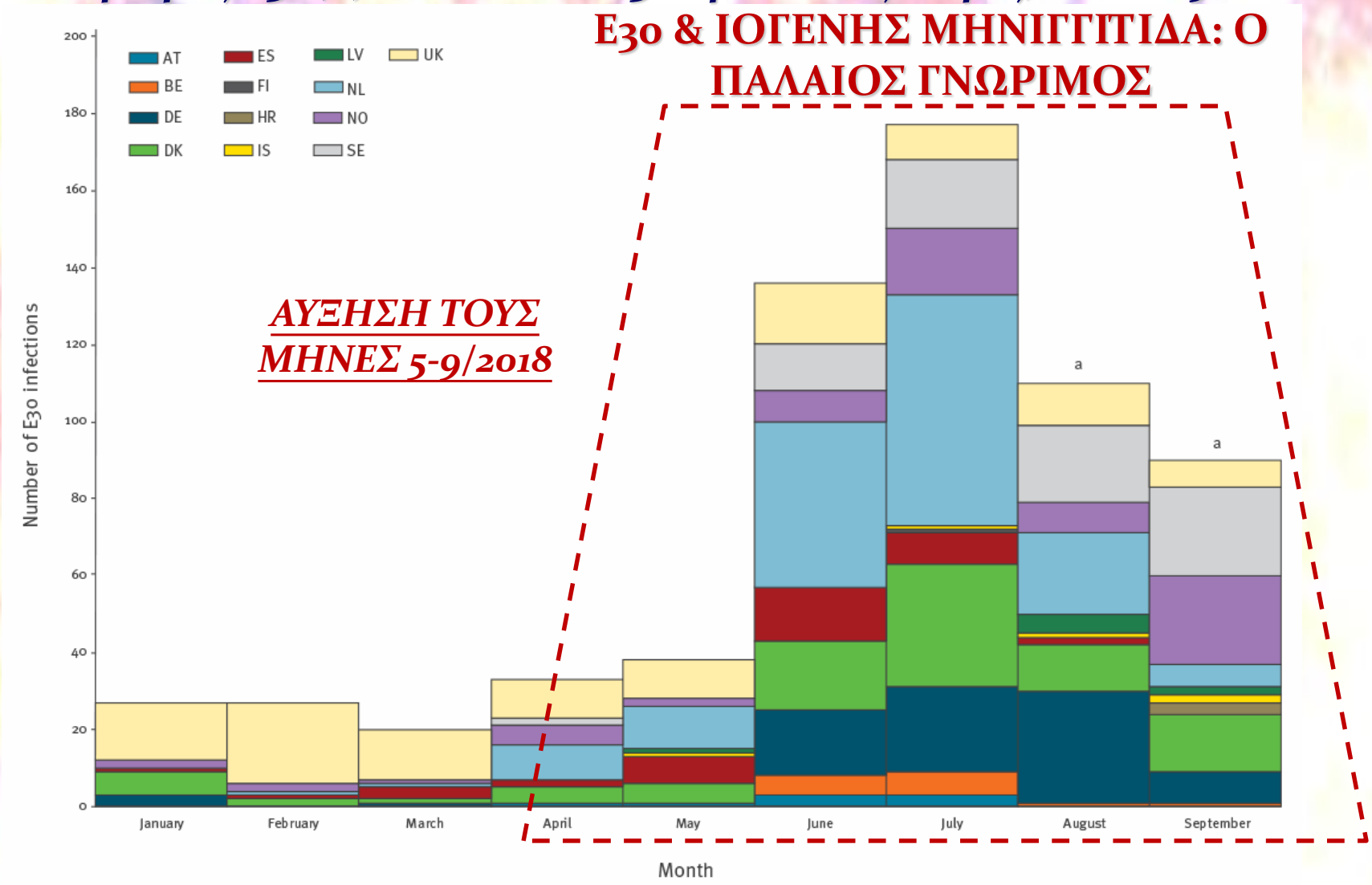


Επίπτωση Ανίχνευσης EV, ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ», 2017-2018

<u>Αυξημένη Επίπτωση 3/2018-7/2018</u>

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

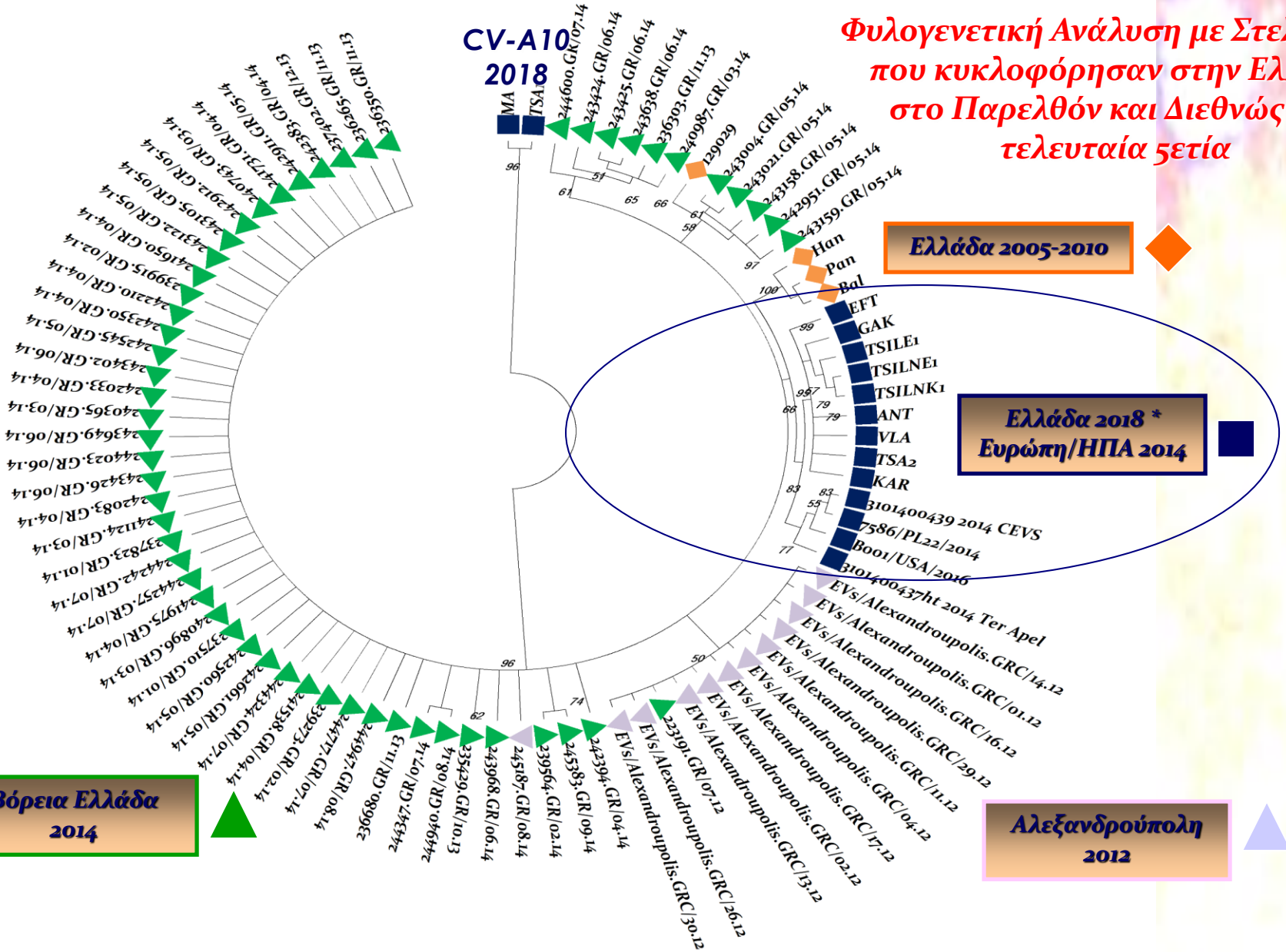
Αριθμός E30(+) Ασθενών σε 13 Ευρωπαϊκές Χώρες, 1/2018=9/2018



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

E30 & ΙΟΓΕΝΗΣ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ

Φυλογενετική Ανάλυση με Στελέχη που κυκλοφόρησαν στην Ελλάδα στο Παρελθόν και Διεθνώς την τελευταία 5ετία



**Αποτελέσματα Ταυτοποίησης – E30 Όλα τα Στελέχη*

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 ΕΝΥ: 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

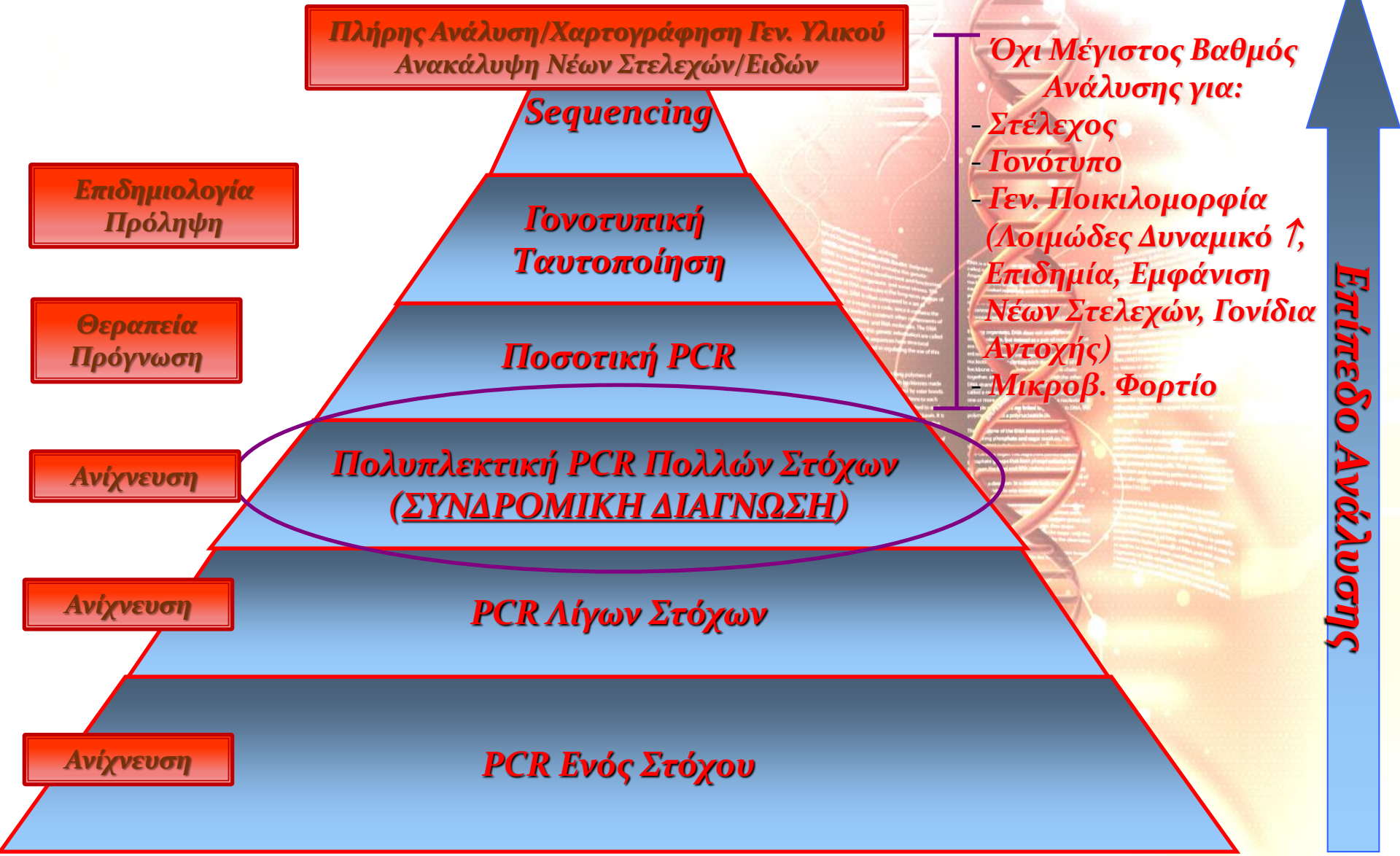
Τεχνικός Περιορισμός στον Αριθμό των Παθογόνων

Μόνο Ανίχνευση Όχι πληροφορίες για γονότυπο/στέλεχος..

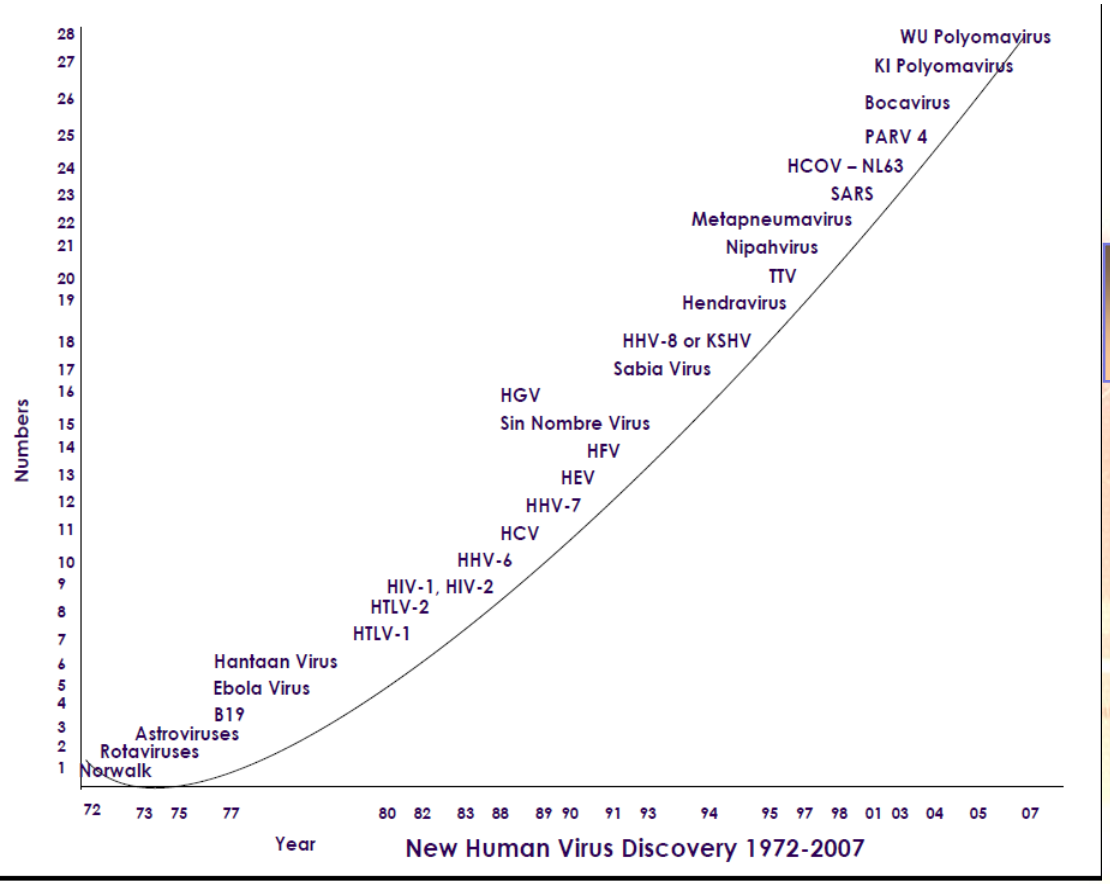
Δεν Μπορούν να Ανιχνευθούν και να Αναγνωριστούν Αναδυόμενα Παθογόνα/Νέα Είδη

ΑΝΑΓΚΗ ΝΑ ΠΡΟΧΩΡΗΣΟΥΜΕ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

Επίπεδα Ανάλυσης των Μοριακών Μεθόδων



ΑΝΑΓΚΗ ΝΑ ΠΡΟΧΩΡΗΣΟΥΜΕ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

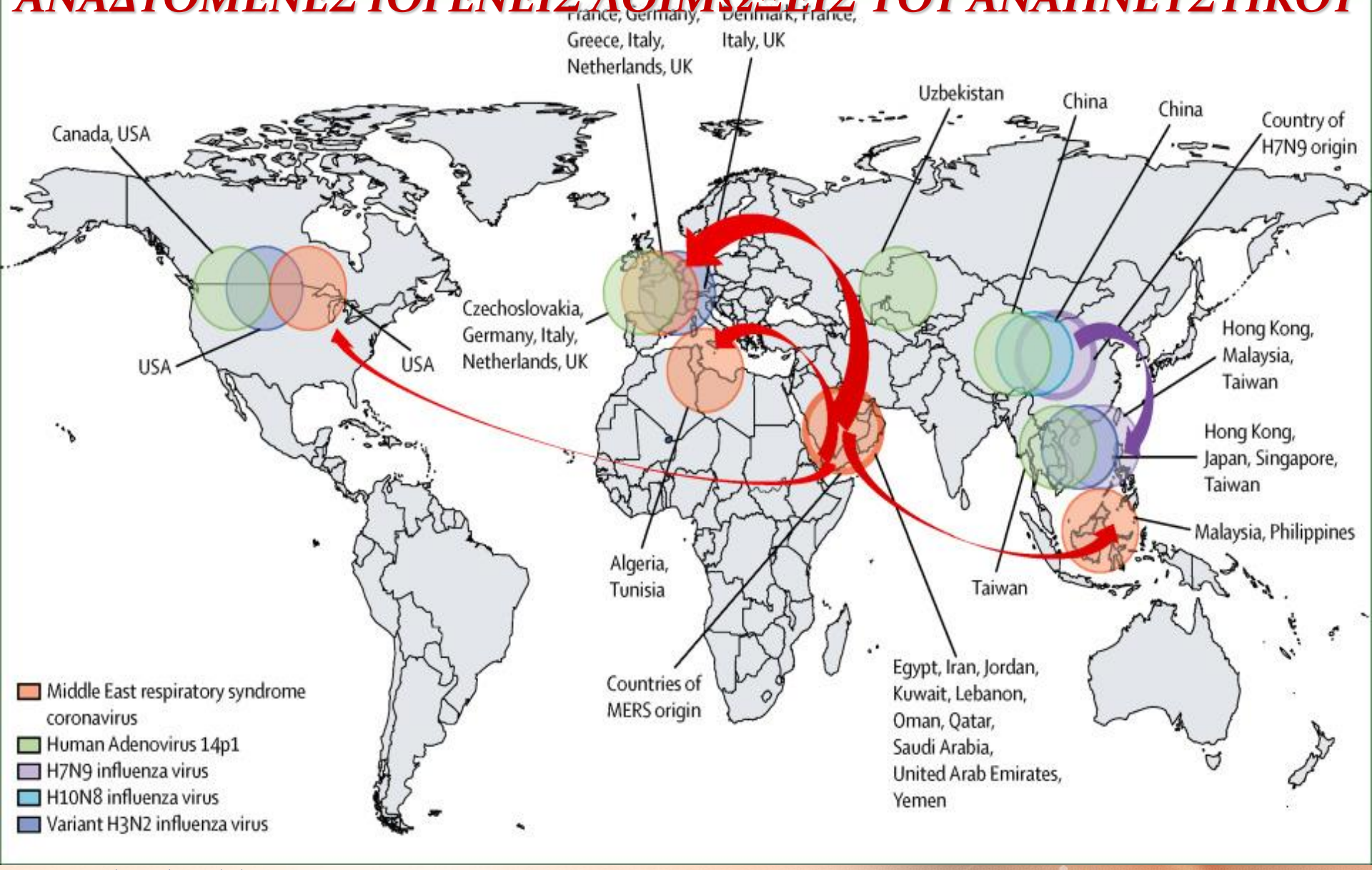


Ανάδυση Νέων Παθογόνων

- **Ανθρωπογενείς Παράγοντες**
  - Ιατρογενείς
  - Καταστροφή Περιβάλλοντος
  - Ανθρώπινη Συμπεριφορά
  - Πόλεμος, Ένδεια, Μετανάστευση
  - Μεταφορές
- **Βιολογία/Εξέλιξη Παθογόνων**

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

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ:
ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΕΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ



Lancet (2014), 14(11):1113-1122

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ:
ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΕΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ
Γρίππη των Πτηνών

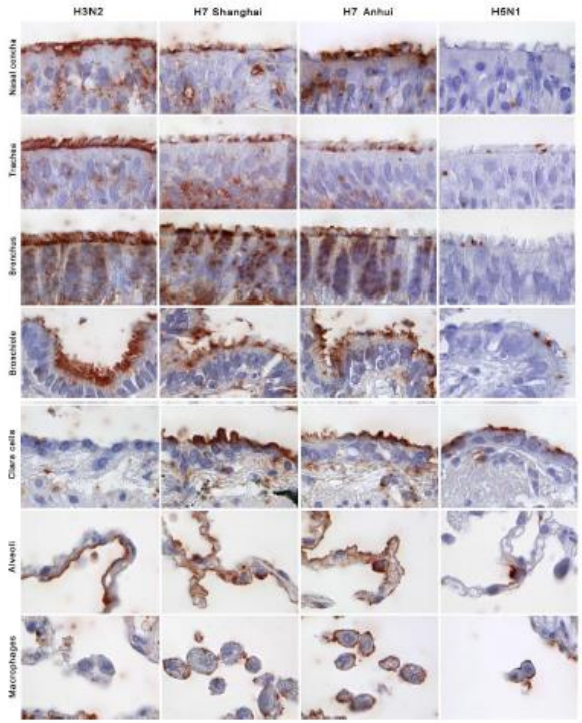
Ανασυνδυασμός Στελεχών από Διαφορετικούς Ξενιστές

ΠΑΝΔΗΜΙΑ

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.

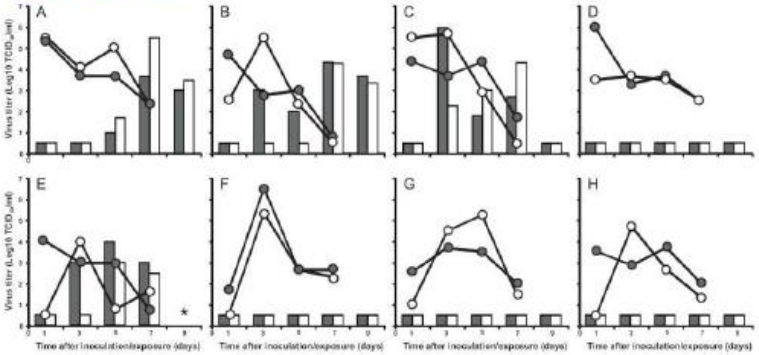


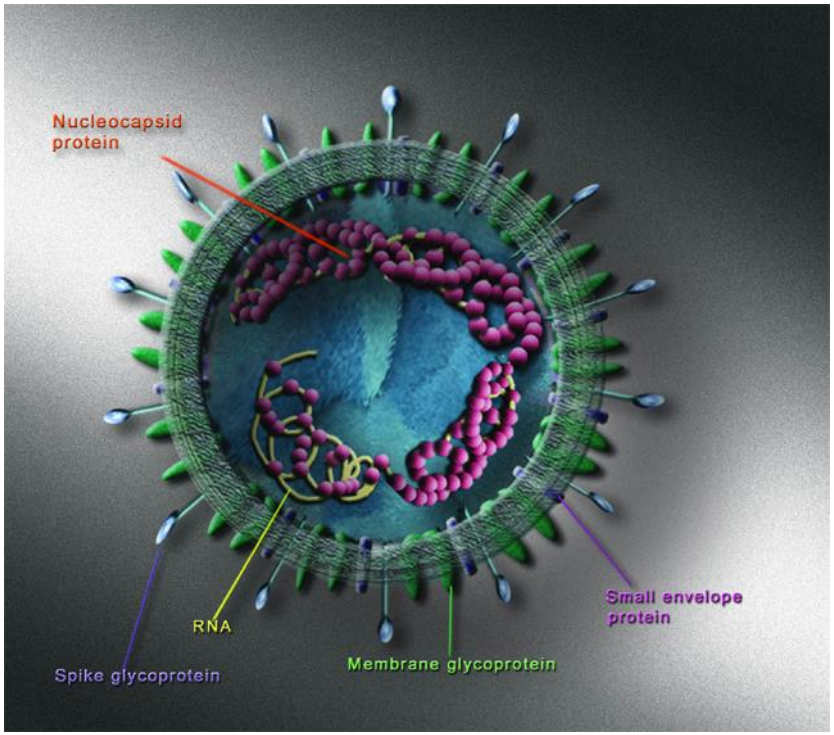
Figure 1 Attachment of two reassortant viruses containing hemagglutinin of either influenza virus A/Shanghai/1/13 (H7 Shanghai) or A/Anhui/1/13 (H7 Anhui) to different parts of the upper and lower human respiratory tract. The attachment of a human seasonal influenza virus (H3N2) and a highly pathogenic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

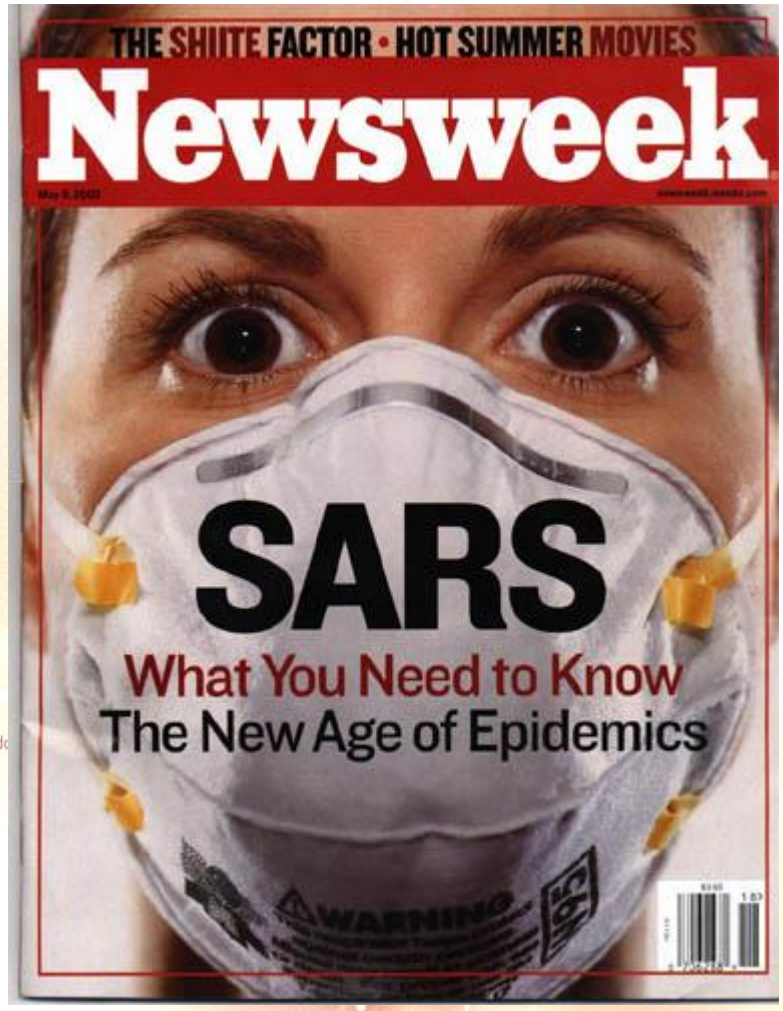
Limited human-to-human transmission: Small clusters!

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

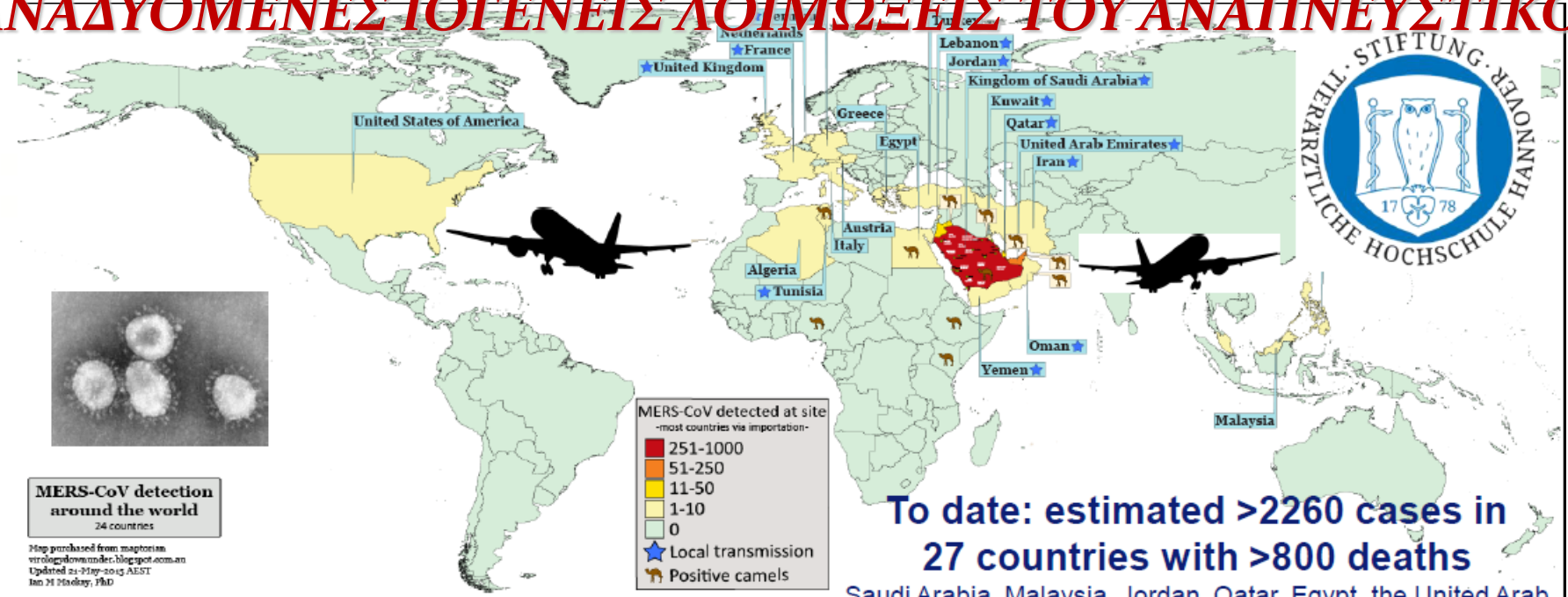
ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ:
ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΕΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ

SARS



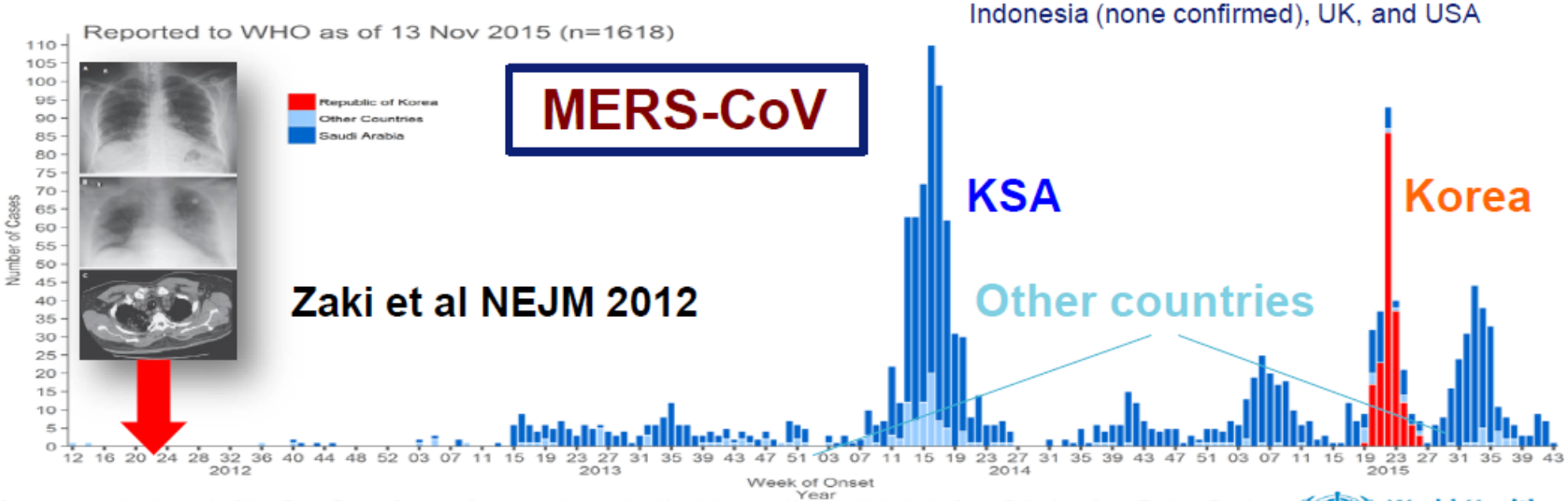


ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ:
ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΕΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ



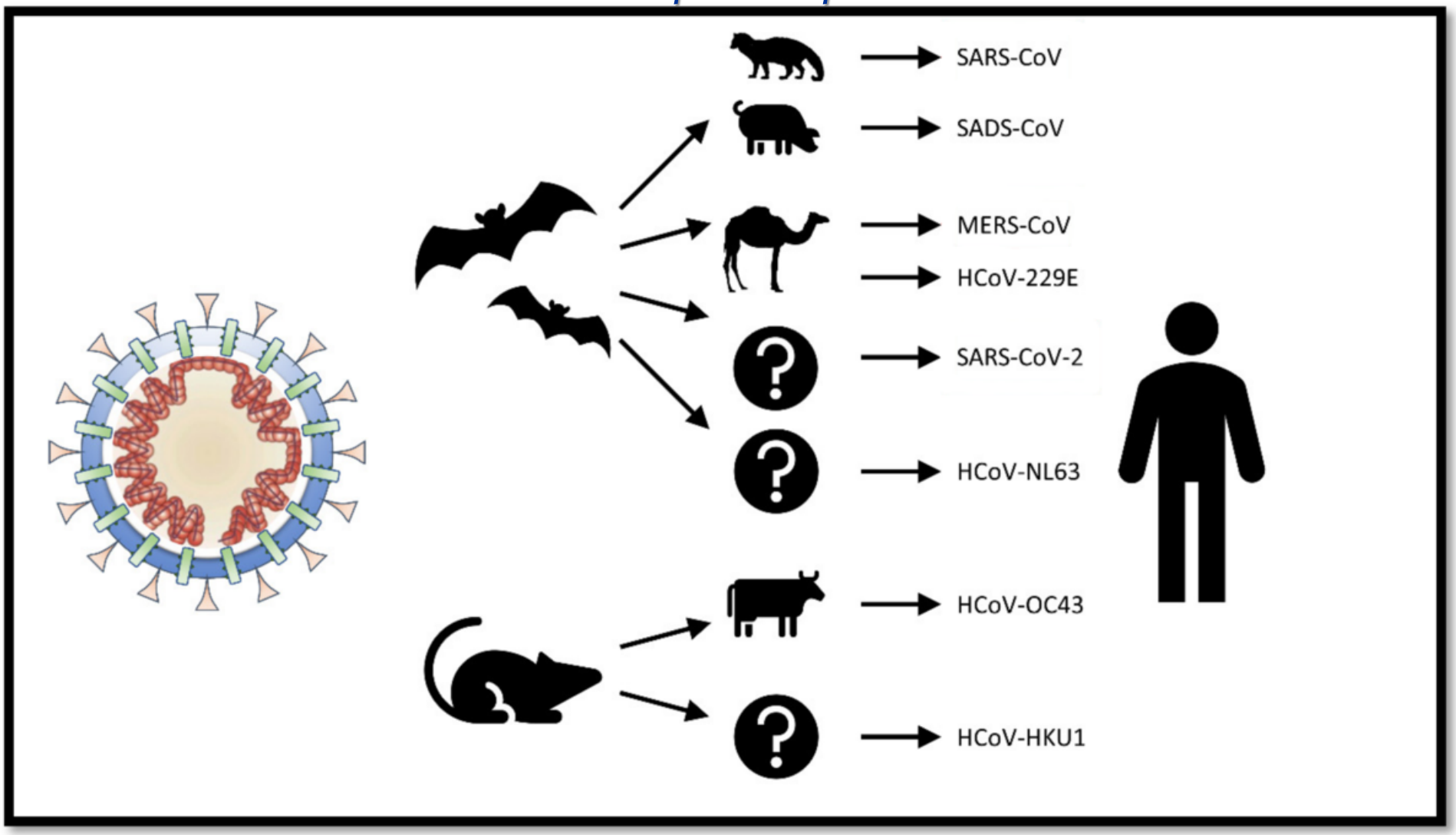
To date: estimated >2260 cases in 27 countries with >800 deaths

Saudi Arabia, Malaysia, Jordan, Qatar, Egypt, the United Arab Emirates, Kuwait, Oman, Algeria, Bangladesh, the Philippines, Indonesia (none confirmed), UK, and USA

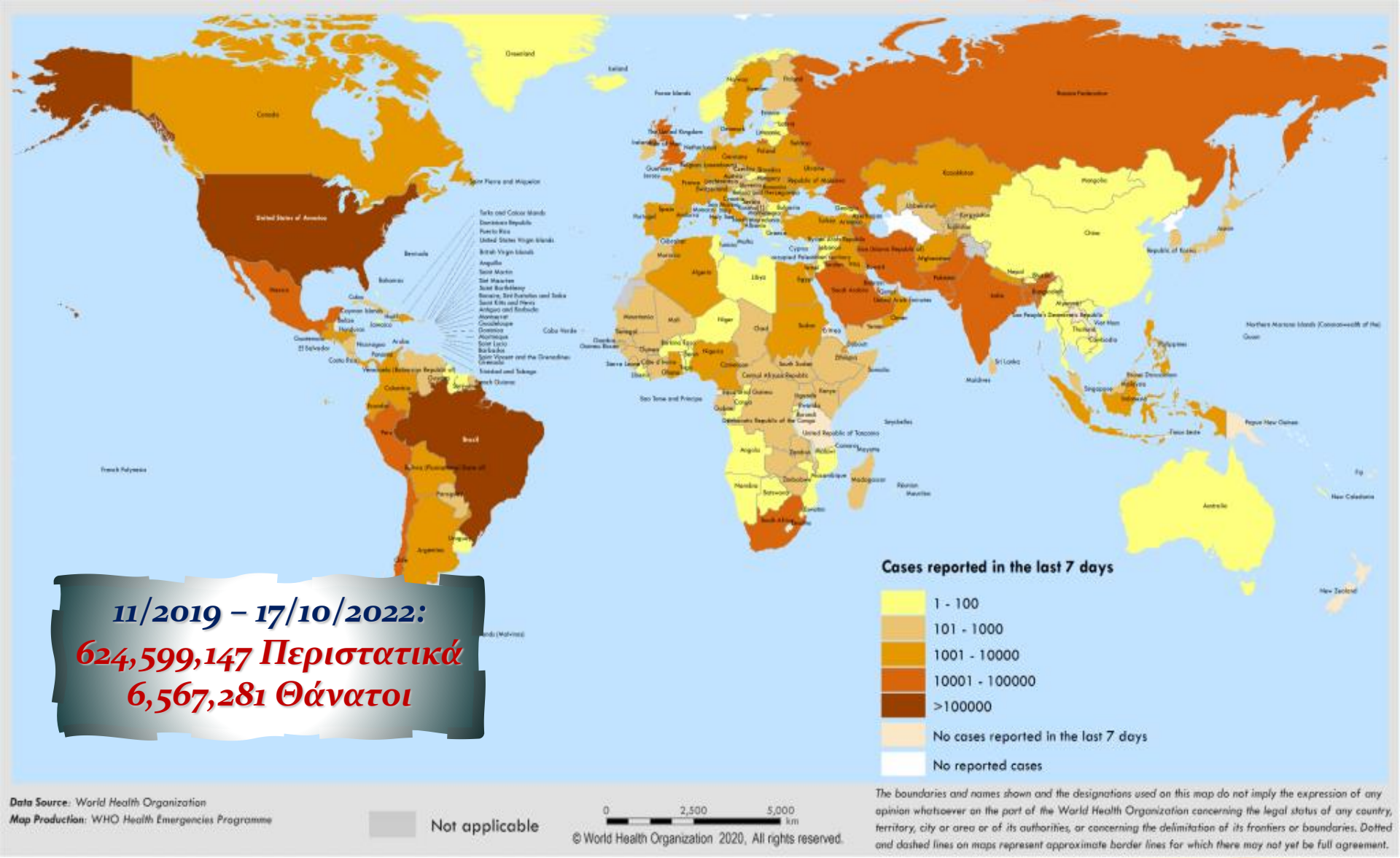


ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ:
ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΕΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ
CORONA ΙΟΙ (HCoV)

Προέλευση

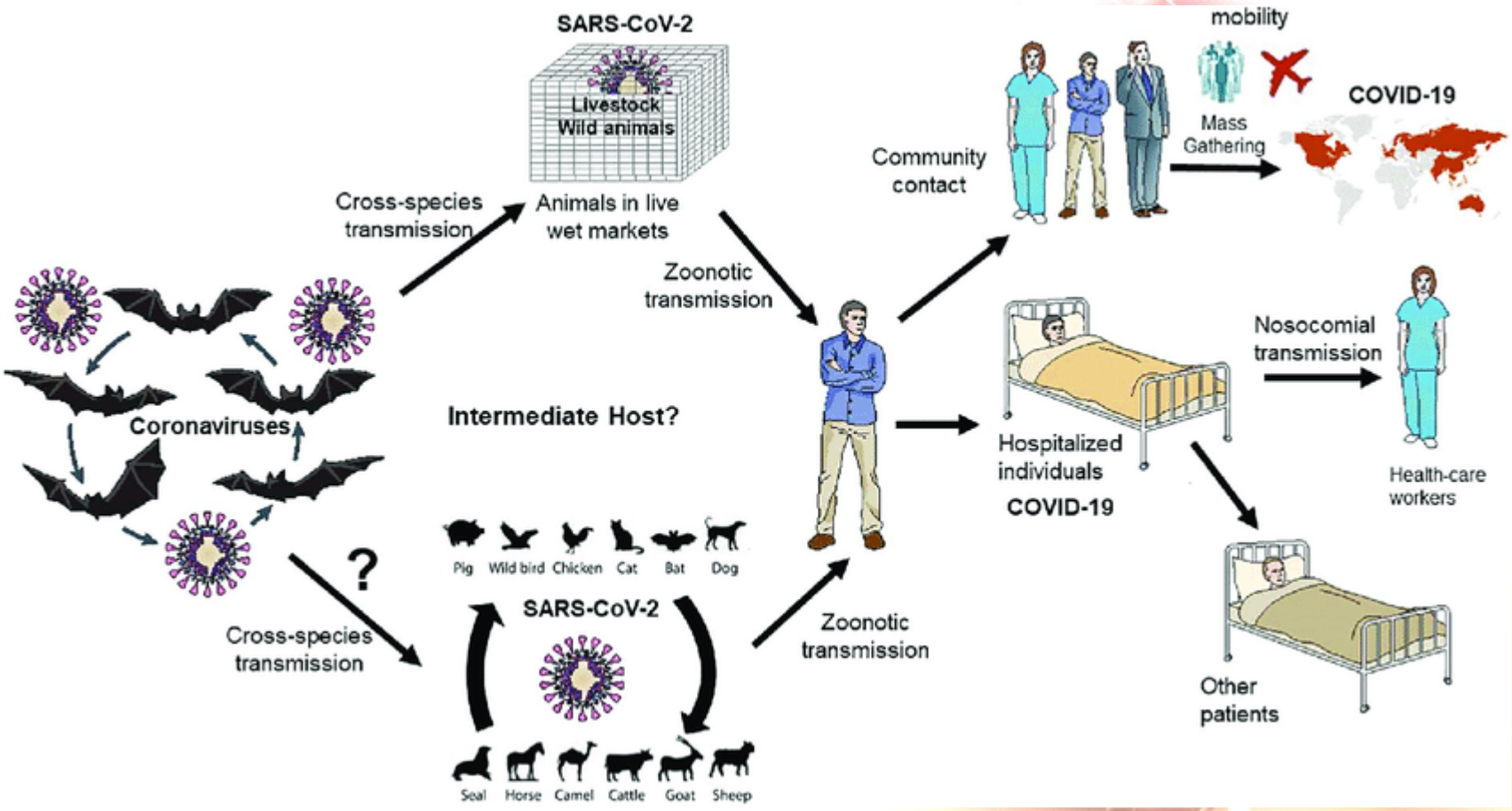


ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ:
ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΕΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ



11/2019 – 17/10/2022:
624,599,147 Περιστατικά
6,567,281 Θάνατοι

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ:
ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΕΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ

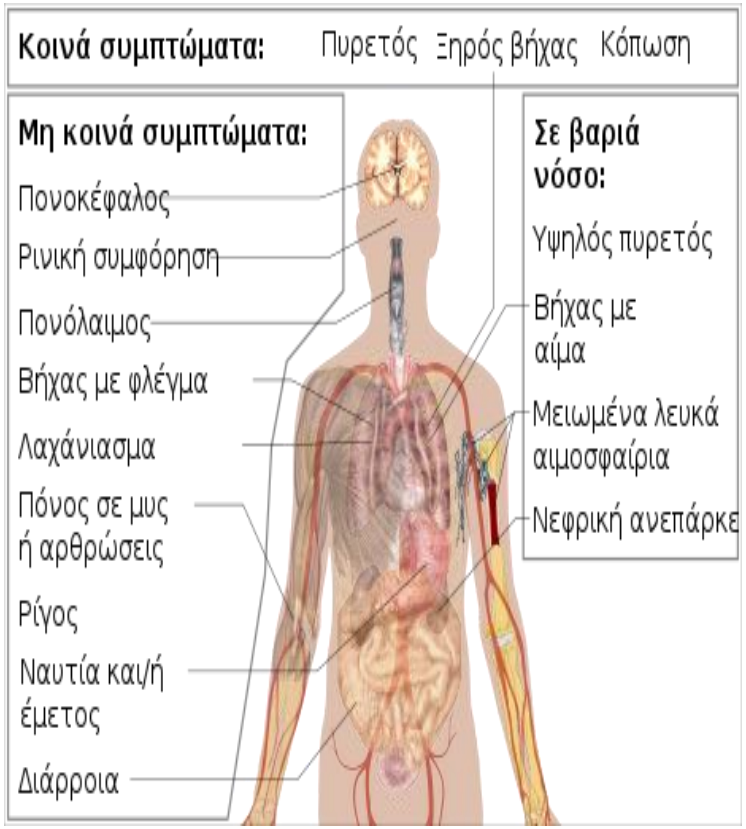


SARS-CoV-2

Πιθανή προέλευση και οδοί μετάδοσης

Χρόνος Επώασης: 2-14 Ημέρες

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ:
ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΕΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ



	MERS-CoV	SARS-CoV	SARS-CoV-2
Ασθένεια	MERS	SARS	COVID-19
Επιδημίες	2012, 2015, 2018	2002–2004	2019–2021 Πανδημία
Επιδημιολογία			
Η/νία 1ου Κρούσματος	Ιούνιος 2012	Νοέμβριος 2002	Δεκέμβριος 2019
Τοποθεσία 1ου 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 ΕΊΝΑΙ ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ (& ΌΧΙ ΑΠΛΩΣ «ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ»)

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

Μία Μέθοδος για Κάθε Διαγνωστικό Ζήτημα

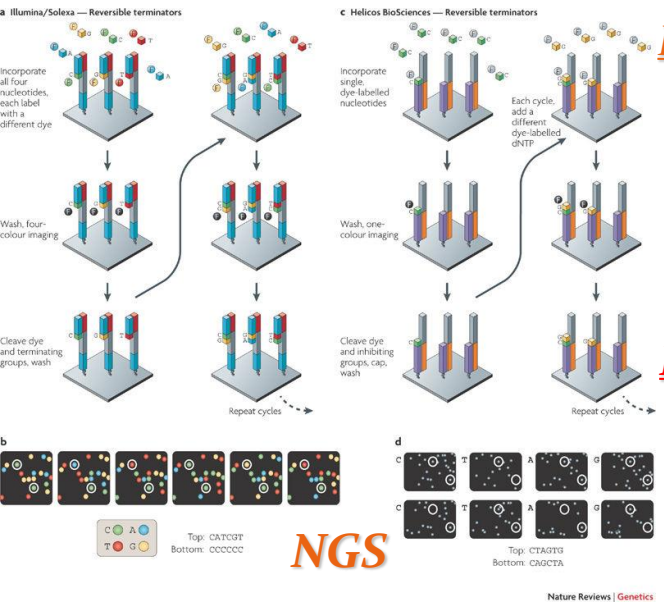
Υψηλή εις Βάθος Ανάλυση (Γονότυπος, Στέλεχος, Ορότυπος, Γενετική Ποικιλομορφία)

Next Generation Sequencing

Ανίχνευση και Αναγνώριση Πάσης Φύσεως Λοιμωδών Παραγόντων

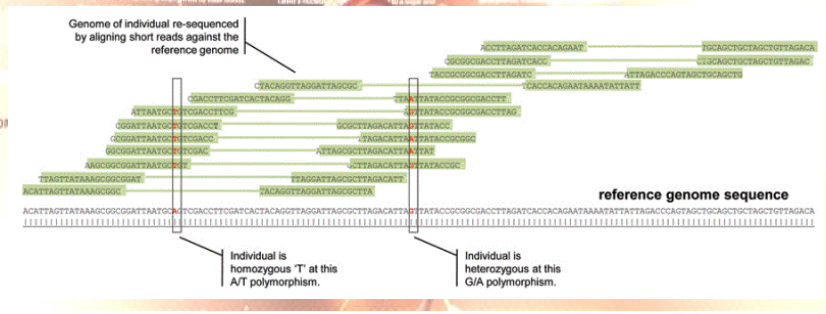
Μειονέκτημα: *Δυσκολία στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων (Τεράστιος Όγκος Πληροφοριών, Βιοπληροφορική)*

Χαρακτηρισμός Νέων, Επανεμφανιζομένων και Αναδυομένων Οροτύπων/Στελεχών Ιών

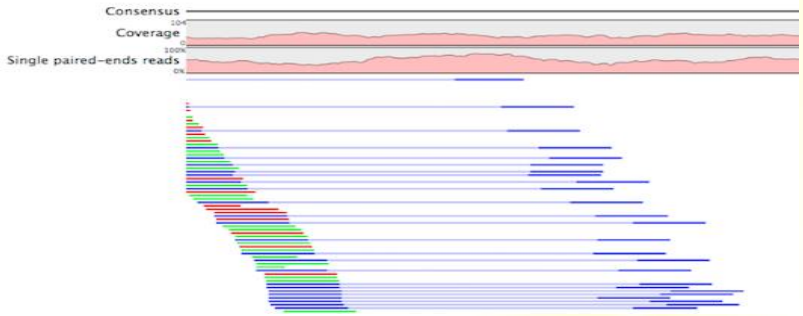


NGS

Reference Genome Sequencing



De Novo Sequencing



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

- ***ΠΑΝΔΗΜΙΑ COVID-19***

ΑΡΧΙΚΑ:

ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ (PCR, NGS)

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΙΤΙΑΣ (ΙΟΙ CORONA)

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ (ΌΧΙ SARS Ή MERS, ΚΑΤΙ ΝΕΟ...)

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ PCR ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

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

- ***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

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

- ***ΠΑΝΔΗΜΙΑ COVID-19***

ΚΑΙ ΜΗΝ ΞΕΧΝΑΜΕ:

ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ (PCR, NGS)

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

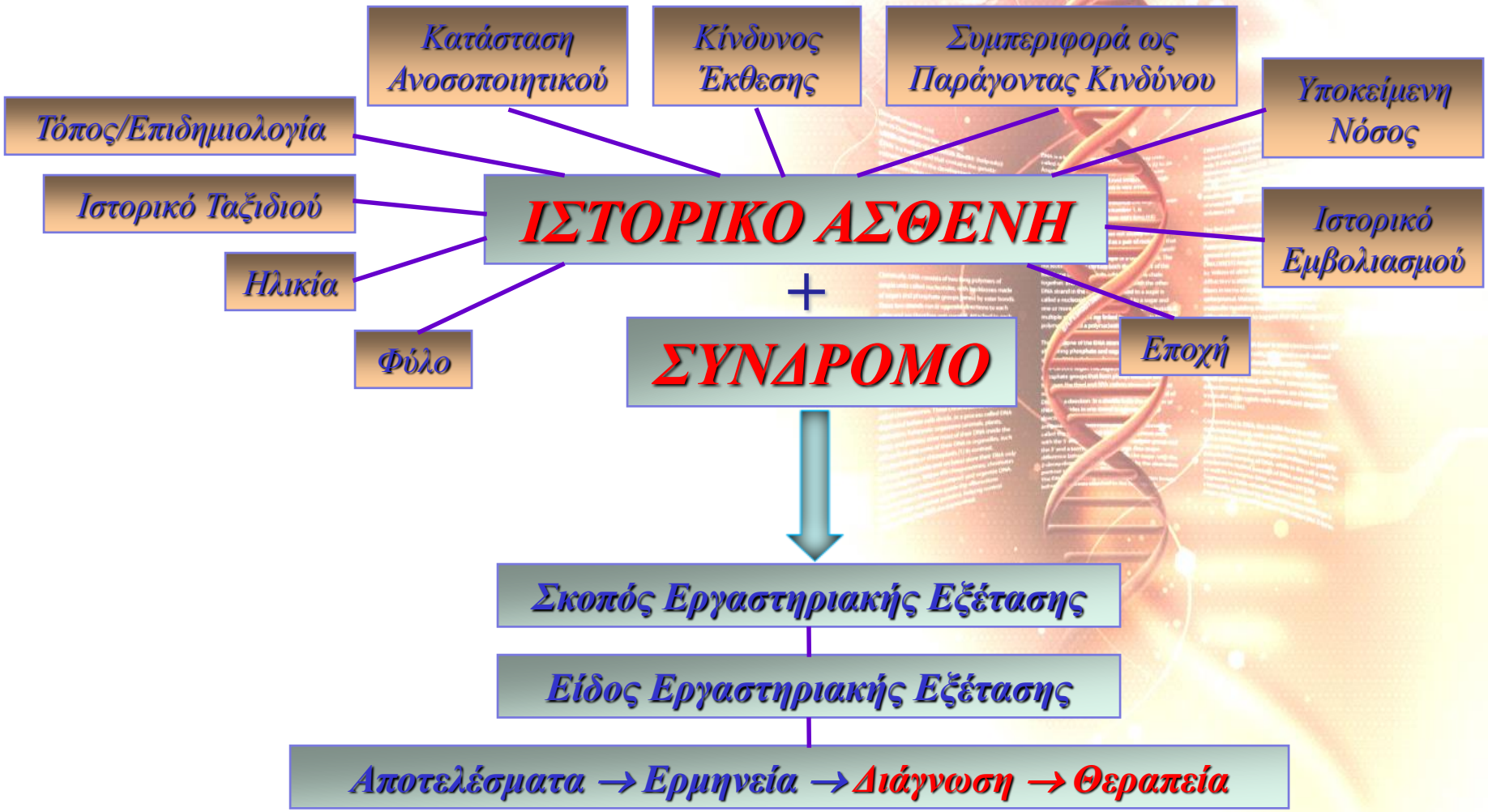
****ΤΟ ΜΕΓΑΛΟ ΣΤΟΙΧΗΜΑ!!!***

(Μεγάλος Αρωγός η Πληροφορική!)

ΑΜΕΣΗ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑ ΜΕΓΑΛΟΥ ΟΓΚΟΥ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟ ΠΑΝΔΗΜΙΑΣ

ΑΡΚΕΙ Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ;

- ***Μην ξεχνάμε:***
  - ***Ιστορικό Ασθενή***



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

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

Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΠΌ ΜΟΝΗ ΤΗΣ ΔΕΝ ΑΠΟΤΕΛΕΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑ

- ***Μην ξεχνάμε:***

  –***Μία νέα σπουδαία επιστήμη, εκ των ων ουκ ανευ για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων που ανοίγει νέους δρόμους στον προσδιορισμό του ρόλου των ιών, παλαιών και νέων, στον άνθρωπο και στην κοινωνία***

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΠΌ 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***

Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΠΌ 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

Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΠΌ ΜΟΝΗ ΤΗΣ ΔΕΝ ΑΠΟΤΕΛΕΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑ

- **<u>Κλινικό Δείγμα</u> – *Είδος Δείγματος, Χρόνος Λήψης, Σημείο Λήψης, Ποσότητα Λήψης, Τρόπος Λήψης και Μεταφοράς στο Εργαστήριο***

  - *Π.χ. Λοίμωξη Κ.Ν.Σ.* → *ΕΝΥ, Αποθήκευση –20ºC ή Άμεση Μεταφορά*

    → *Κόπρανα (Εντεροϊοί), Αποθήκευση +2ºC - + 8ºC 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)*

Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΠΌ 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***

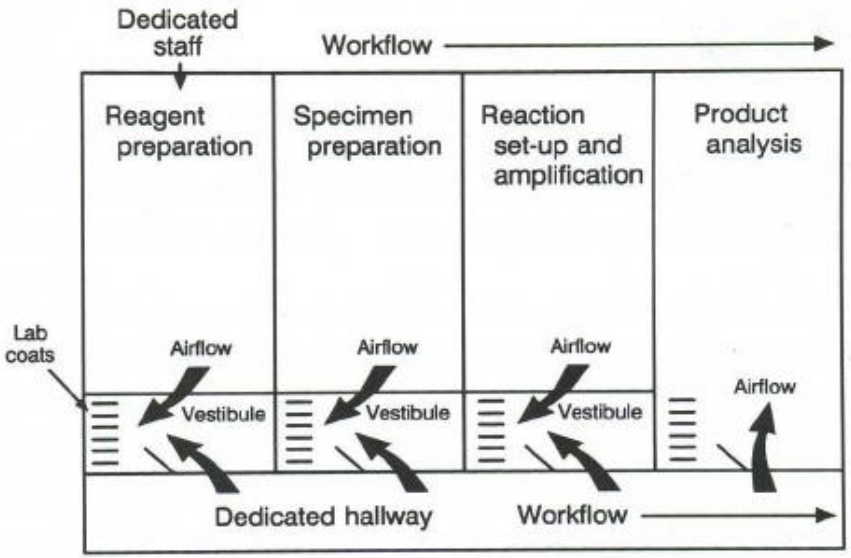
Recommended clinical sample types for EV diagnosis in different clinical presentations.

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.

Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΠΌ ΜΟΝΗ ΤΗΣ ΔΕΝ ΑΠΟΤΕΛΕΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑ

- **Καλή Εργαστηριακή Πρακτική - Χωροταξική Διευθέτηση Εργαστηρίου Μοριακής Διαγνωστικής**



Σαφής Διαχωρισμός Χώρων για αποφυγή Επιμολύνσεων:

- *Προετοιμασία Αντιδραστηρίων*
- *Προετοιμασία Δειγμάτων*
- *Εκχυλιση Γενετικού Υλικού*
- *Προετοιμασία Αντίδρασης*
- *Ανάλυση Προϊόντων*

Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΠΌ 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

Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΠΌ 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

Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΠΌ ΜΟΝΗ ΤΗΣ ΔΕΝ ΑΠΟΤΕΛΕΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑ

ΚΑΙ ΕΝ ΚΑΤΑΚΛΕΙΔΙ:

Έχουμε Πάρα Πολλά να Μάθουμε για Αυτόν τον Ωκεανό από Ιούς και Τους Άπειρους Τρόπους που Αλληλεπιδρούν με τους Ξενιστές τους, Επηρρεάζοντας Θετικά, Αρνητικά, ή Καθόλου τη Φυσιολογία τους

(Κατέκτησαν κάθε Οικοσύστημα και Ξενιστή, Ως Γνήσια Παράγωγα των Μηχανισμών της Ζωής που ως Πέπλο Κάλυψαν κάθε Γωνιά του Πλανήτη)

Μοριακές Τεχνικές Όπως το NGS μας Βοήθησαν να το Καταλάβουμε Αυτό...

ΑΝΤΙ ΕΠΙΛΟΓΟΥ

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


ΣΑΣ ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ