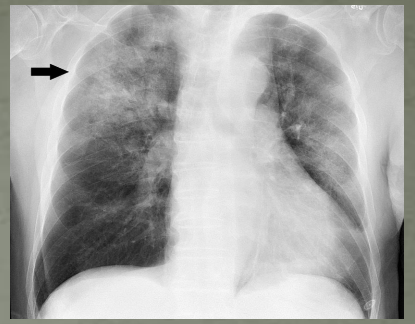
Επιδημικές Εξάρσεις από Ιογενή Αίτια:

Εργαστηριακές Διαγνωστικές Μέθοδοι στην Ιολογία

Νικόλαος Σιαφάκας
Αναπληρωτής Καθηγητής Διαγνωστικής Ιολογίας
Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ
Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας
ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
nsiaf@med.uoa.gr

Περιεχόμενα

- *Εισαγωγή – Σκοπός του μαθήματος*
- *Τι είναι οι ιοί και πώς εξελίσσονται*
- *Ιστορικά ορόσημα στην Ιολογία*
- *Η επίδραση των ιών στις ανθρώπινες κοινωνίες*
- *Αιτίες επιδημιών και πανδημιών*
- *Παράδειγμα: Ο ιός της γρίππης*
- *Παράδειγμα: Εντεροϊός D68*
- *Ο ρόλος του εργαστηρίου μικροβιολογίας*
- *Εργαστηριακές μέθοδοι στην Ιολογία*
- *Απομόνωση και ανίχνευση ιών*
- *Μοριακές μέθοδοι και PCR*
- *Συμπεράσματα*



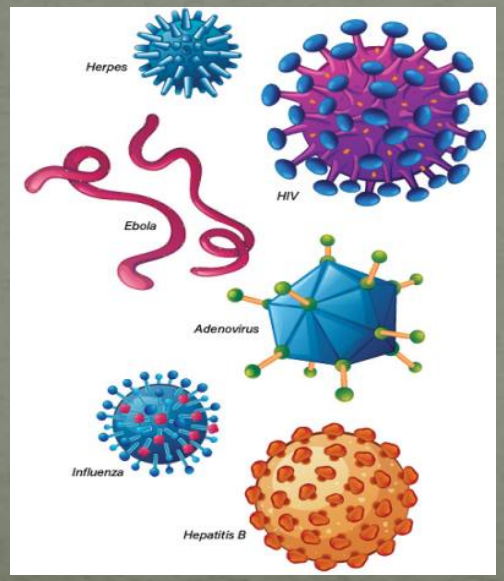
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΙΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΜΑΘΗΜΑΤΟΣ

- Επίδραση των Ιών στις Ανθρώπινες Κοινωνίες Ασθένειες, Επιδημίες/Πανδημίες
- Ποιο είναι το Μέλλον των Διαγνωστικών Μεθόδων?
- Συμβατικές και Νεότερες Διαγνωστικές Μέθοδοι: Πλεονεκτήματα/Μειονεκτήματα
- Οι Μοριακές Μέθοδοι στην Καταπολέμηση των Ιογενών Επιδημιών
- Η Σημασία της Ορθής Εφαρμογής και Ερμηνείας

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!

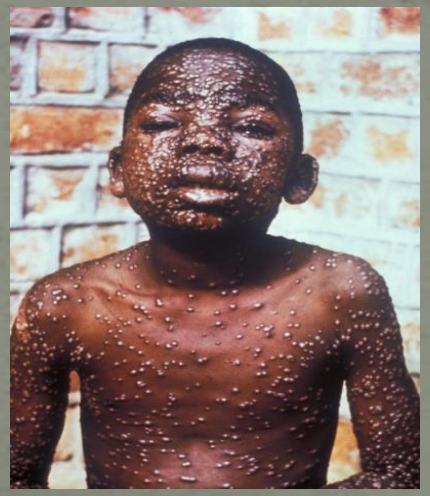
Ζώα

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

Βακτήρια

Ιός Βακτηρίων – **Βακτηριοφάγος**

Άνθρωπος



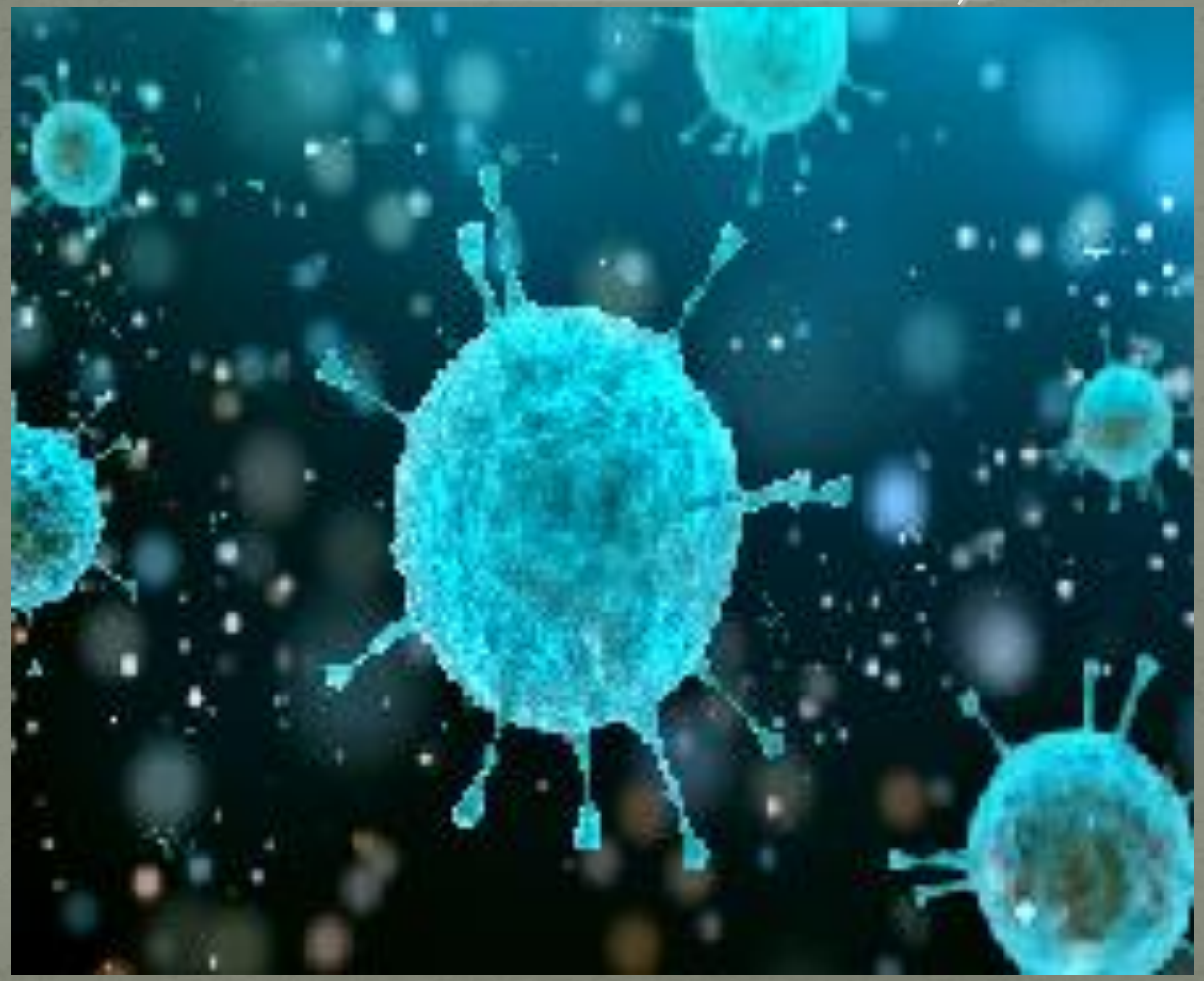
Ιός Ευλογιάς

Φυτά

Ιός της Μωσαϊκής του Καπνού (**TMV**)

ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΙΟΙ;

Οι Ζωντανοί Οργανισμοί Επιβιώνουν σε Έναν Ωκεανό από Ιούς!

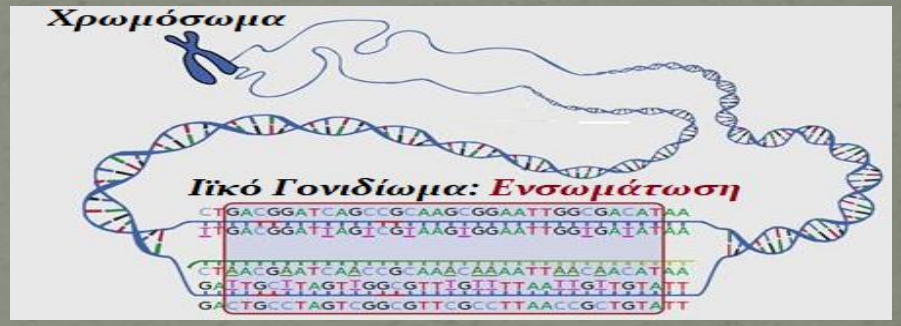


ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΙΟΙ;

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*

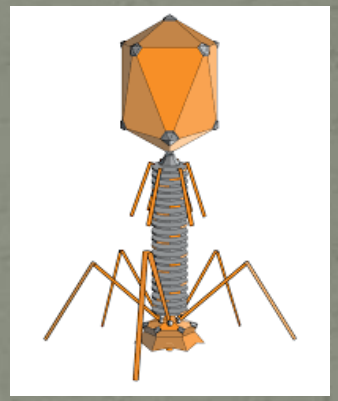
ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΙΟΙ;

Οι Ζωντανοί Οργανισμοί Επιβιώνουν σε Έναν Ωκεανό από Ιούς!

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

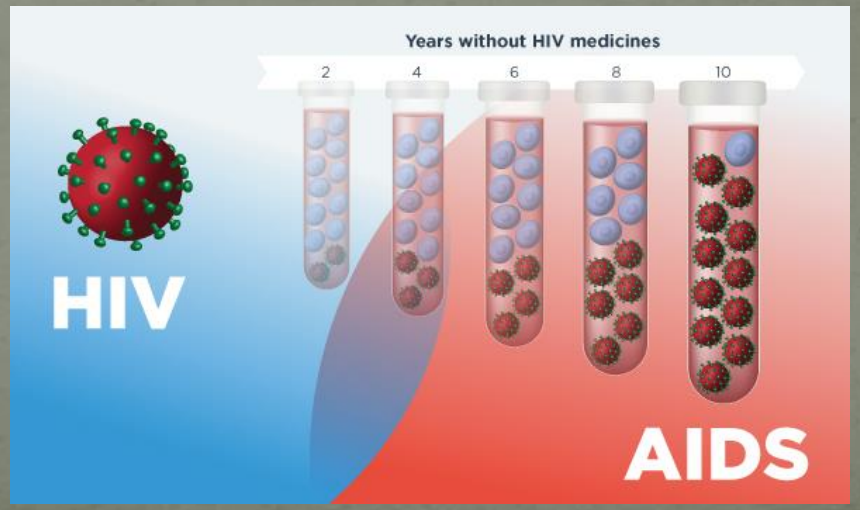
1000x Μεγαλύτερη Βιομάζα από εκείνη των Ελεφάντων

Μήκος όλων των Βακτηριοφάγων: 200 Εκατομμύρια Έτη Φωτός!



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

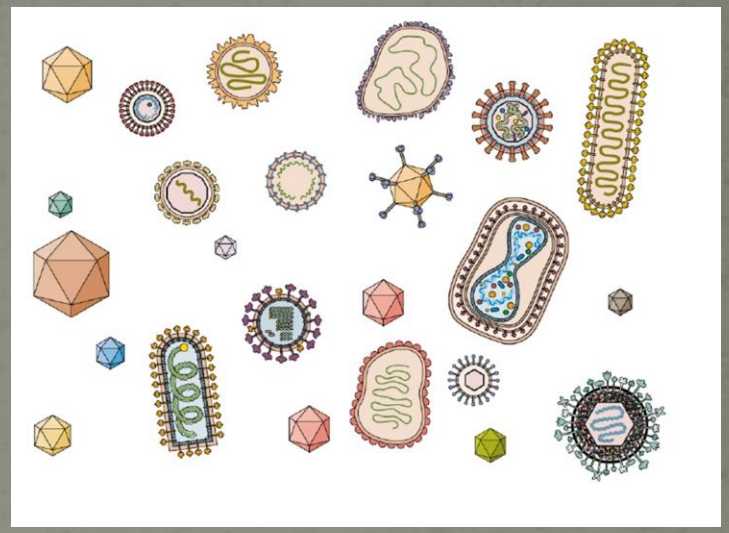
Μεγάλη πιθανότητα για στελέχη ανθεκτικά σε κάθε είδος φαρμάκου που έχουμε σήμερα



ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΙΟΙ;

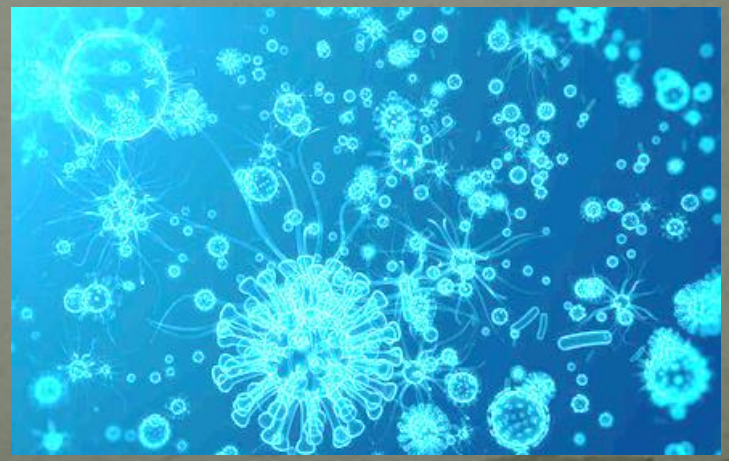
- 40000 Ιοί Βακτηρίων, Φυτών και Ζώων που ταξινομούνται σε 3 Τάξεις, 73 Οικογένειες, 287 Γένη και 1950 Είδη

  (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).

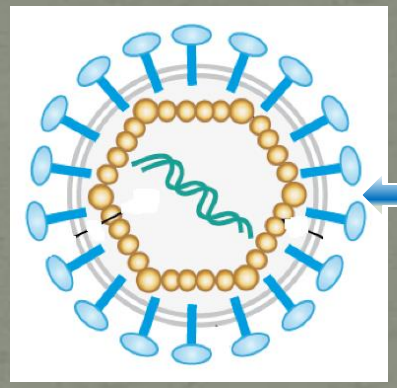


ΠΩΣ ΕΜΦΑΝΙΣΤΗΚΑΝ ΟΙ ΙΟΙ;

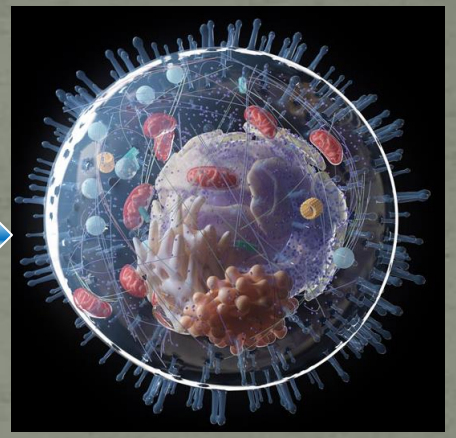
ΔΕΝ ΥΠΑΡΧΕΙ ΣΑΦΗΣ ΑΠΑΝΤΗΣΗ

ΠΙΘΑΝΕΣ ΘΕΩΡΙΕΣ:

- Πρόδρομες Μοριακές Μορφές Κυτταρικών Οργανισμών;

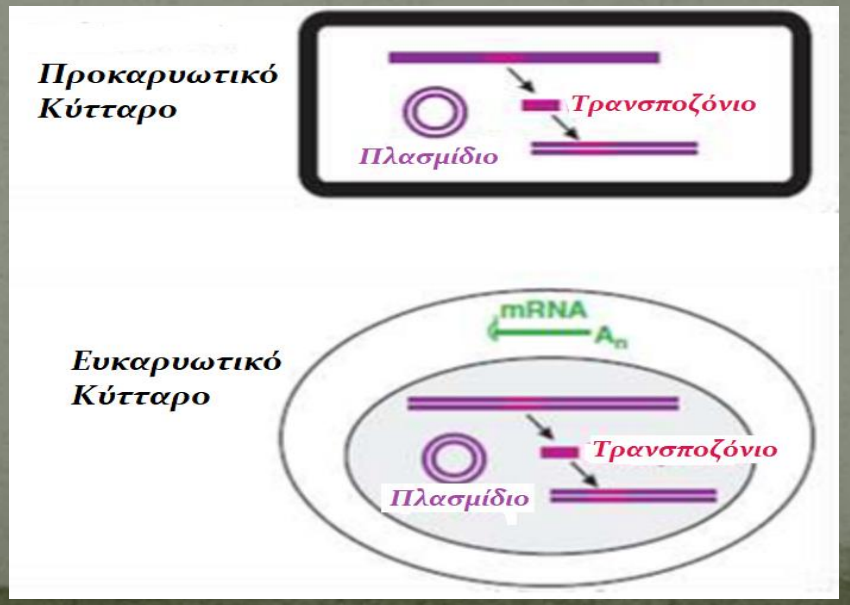


Ιός



Κύτταρο

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

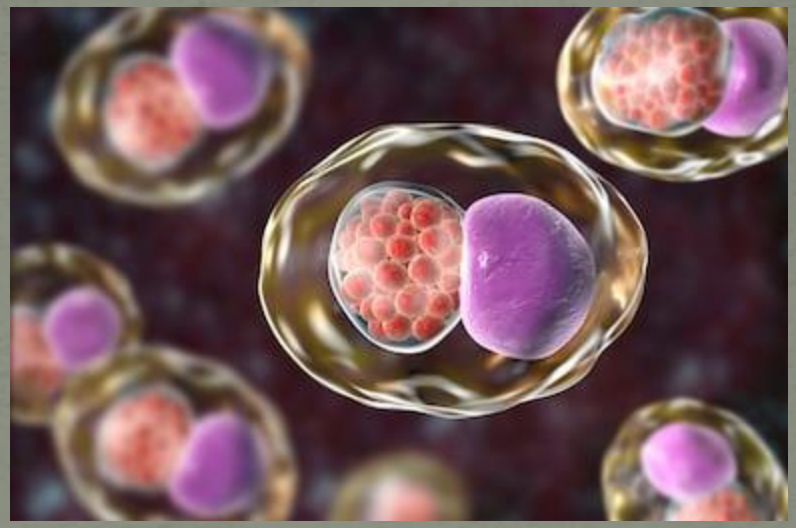


ΠΩΣ ΕΜΦΑΝΙΣΤΗΚΑΝ ΟΙ ΙΟΙ;

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

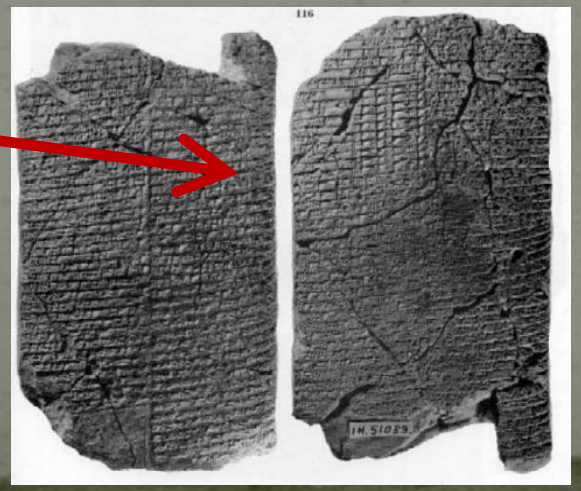
*** «Προτίμηση» (Προσαρμογή) σε συγκεκριμένα κύτταρα, ιστούς, οργανισμούς**

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

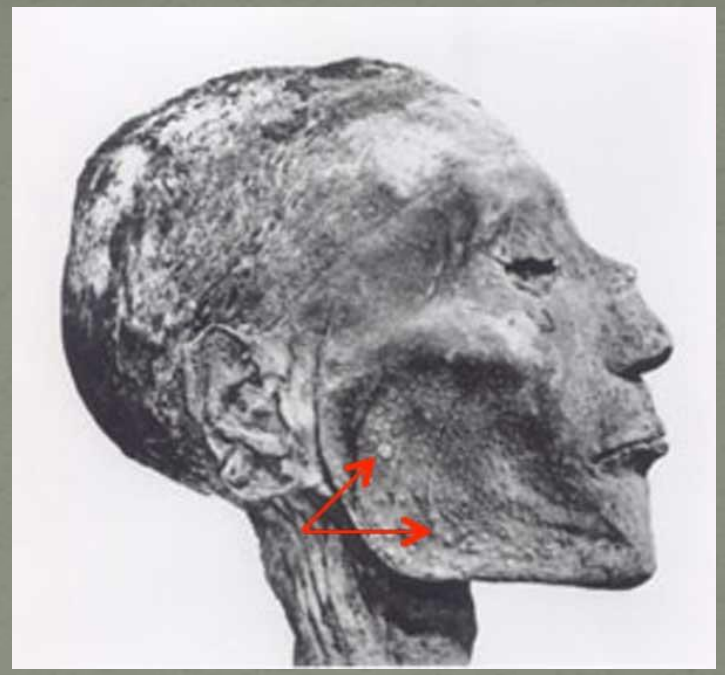
- Κωδικός Εσνούννα, Αρχαία Μεσοποταμία, 23ος αιώνας π.Χ.: Καταγραφή μετάδοσης Λύσσας από σκύλο σε άνθρωπο



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

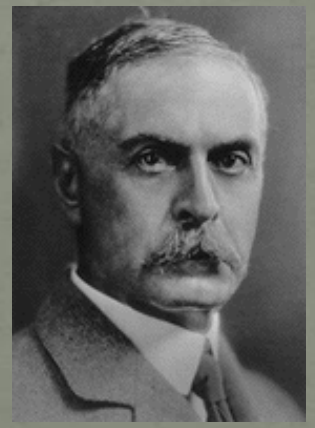
Εκχύλισμα «Άρρωστου» Φυτού

Μετάδοση Ασθένειας

ΠΩΣ ΑΝΑΚΑΛΥΦΘΗΚΑΝ ΟΙ ΙΟΙ

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

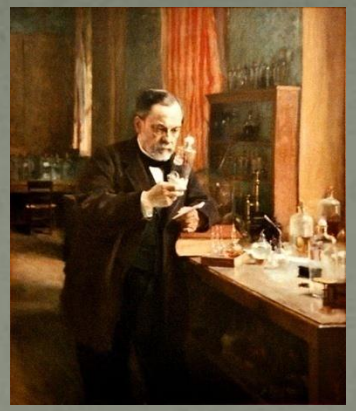
- ***Ανακάλυψη Poliovirus:*** 1909 (K. Landsteiner & E. Popper) – Μετάδοση σε πειραματόζωα με φιλτραρισμένο εκχύλισμα εγκεφάλου νεκρών



K. Landsteiner

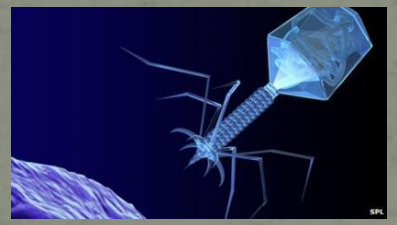
ΑΛΛΑ ΟΡΟΣΗΜΑ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ & ΣΤΙΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

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



Louis Pasteur

- *1915-17: Ανακάλυψη Βακτηριοφάγων*



Twort and D'Herelle

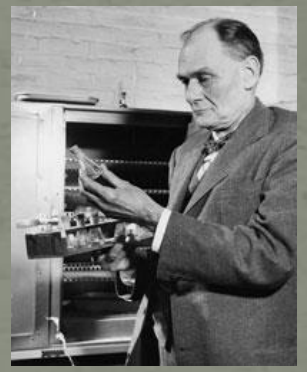
- *1918: Πανδημική Ισπανική Γρίππη (H1N1) – 40 εκατομμύρια νεκροί*

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*

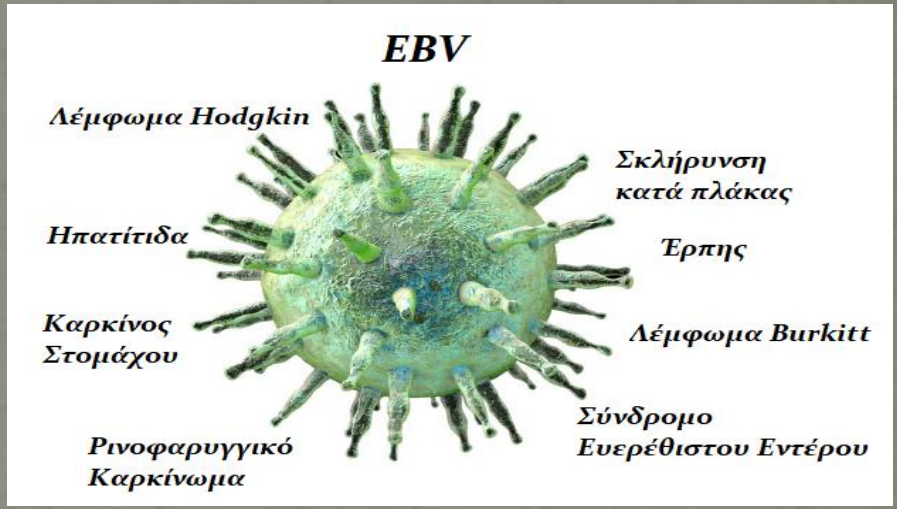
J. Salk

ΑΛΛΑ ΟΡΟΣΗΜΑ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ & ΣΤΙΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

- 1961: Εισαγωγή στοματικού εξασθενημένου εμβολίου κατά της πολιομυελίτιδας

Ο A. Sabin εμβολιάζει παιδί με OPV

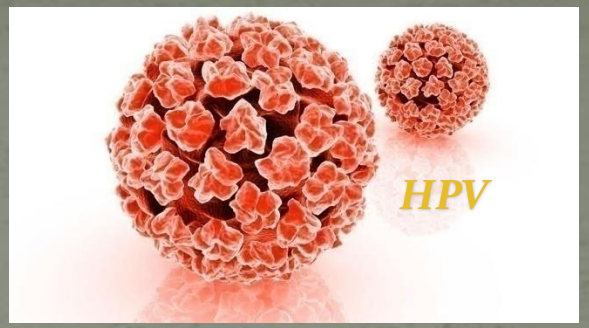
- 1964: 1η σύνδεση ενός ιού, του ερπητοϊού Epstein-Barr (EBV) με μορφές καρκίνου στον άνθρωπο



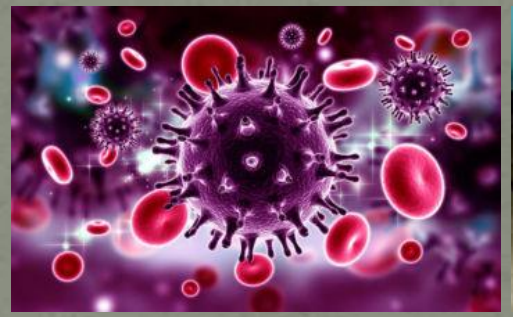
- 1976: 1η επίσημη καταγραφή αιμορραγικού πυρετού Ebola

ΑΛΛΑ ΟΡΟΣΗΜΑ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ & ΣΤΙΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

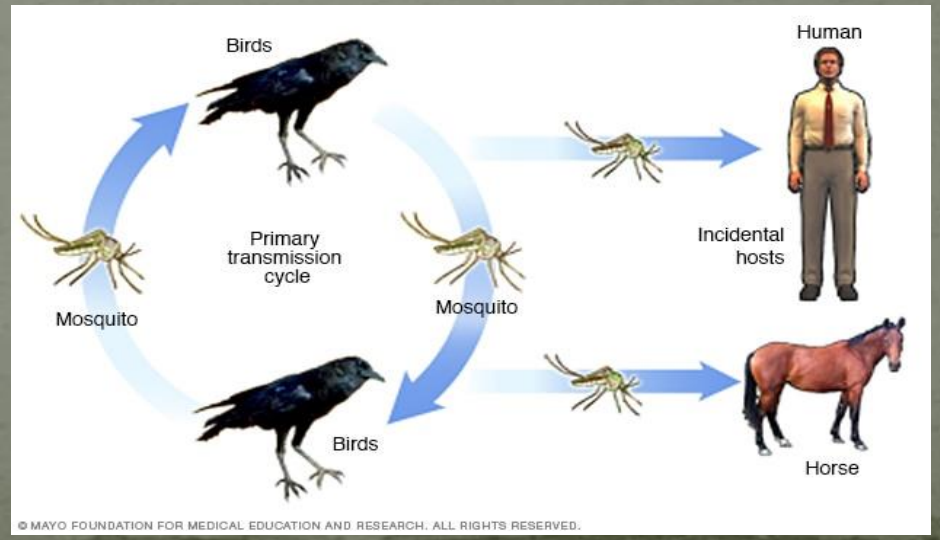
- *1983: Σύνδεση στελεχών Ιού Ανθρωπίνων Κονδυλωμάτων (HPV) με καρκίνο τραχήλου μήτρας*



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



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



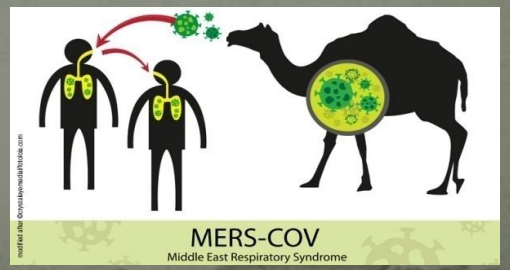
ΑΛΛΑ ΟΡΟΣΗΜΑ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ & ΣΤΙΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

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

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

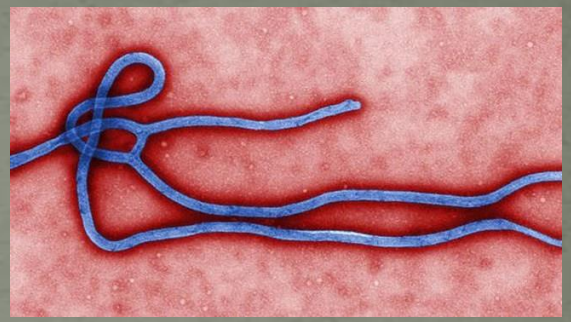
- 2009-2010: Νέα Πανδημία Γρίππης H1N1 των χοίρων

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



ΑΛΛΑ ΟΡΟΣΗΜΑ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ & ΣΤΙΣ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

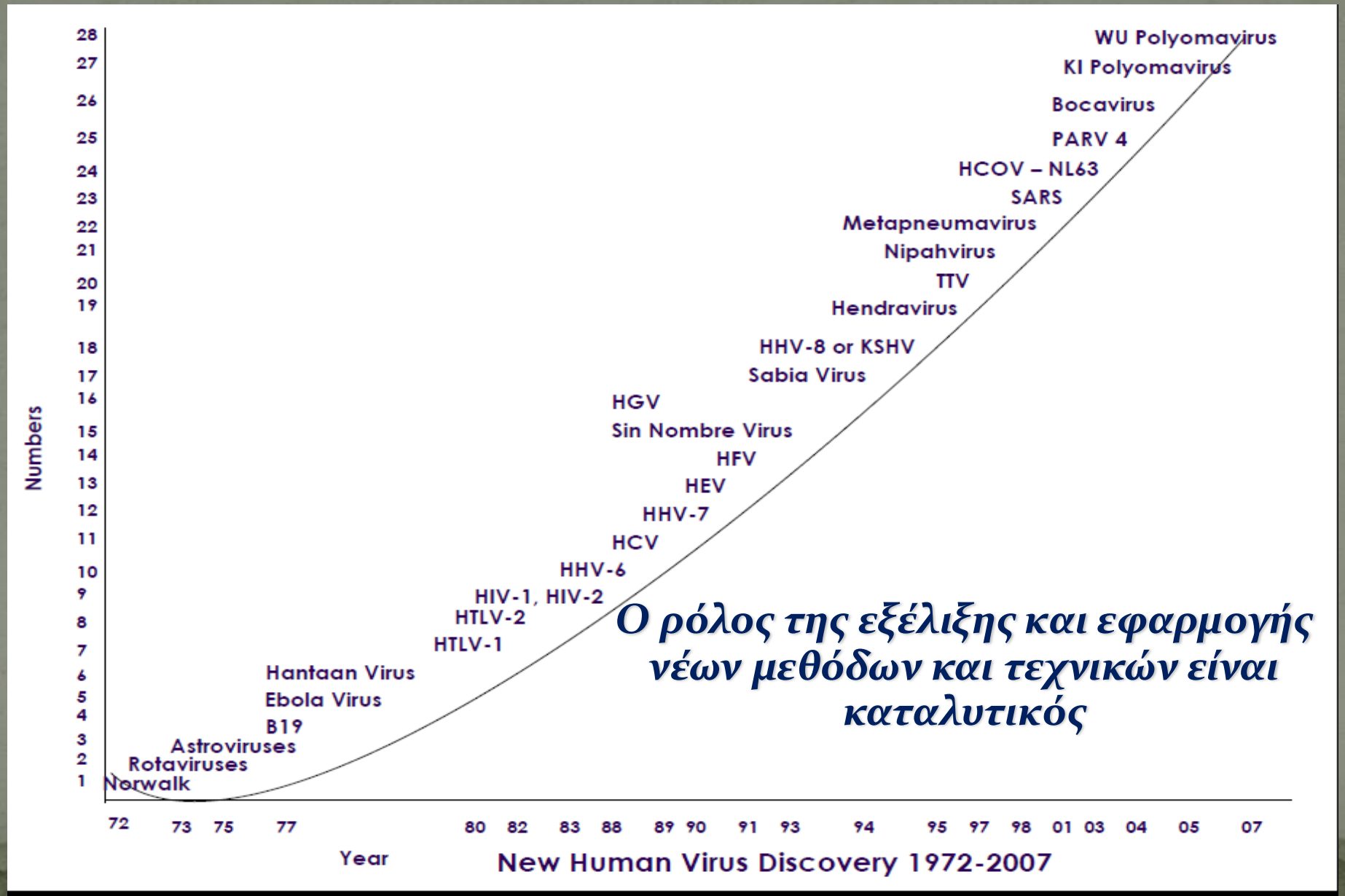
- 2014: Στην Αφρική η μεγαλύτερη επιδημία Ebola που έχει καταγραφεί στην ιστορία, με πάνω από 11000 νεκρούς



- 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

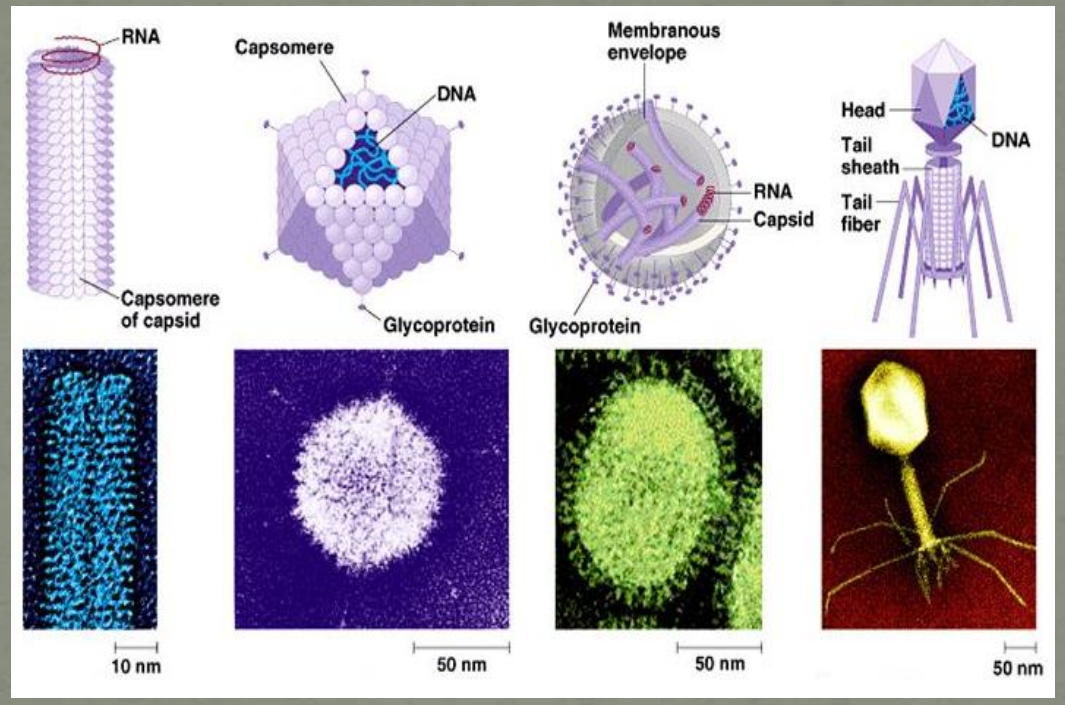


Ο ρόλος της εξέλιξης και εφαρμογής νέων μεθόδων και τεχνικών είναι καταλυτικός

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 Γενετική Ποικιλομορφία

Μεταλλάξεις

Γενετικοί Ανασυνδυασμοί

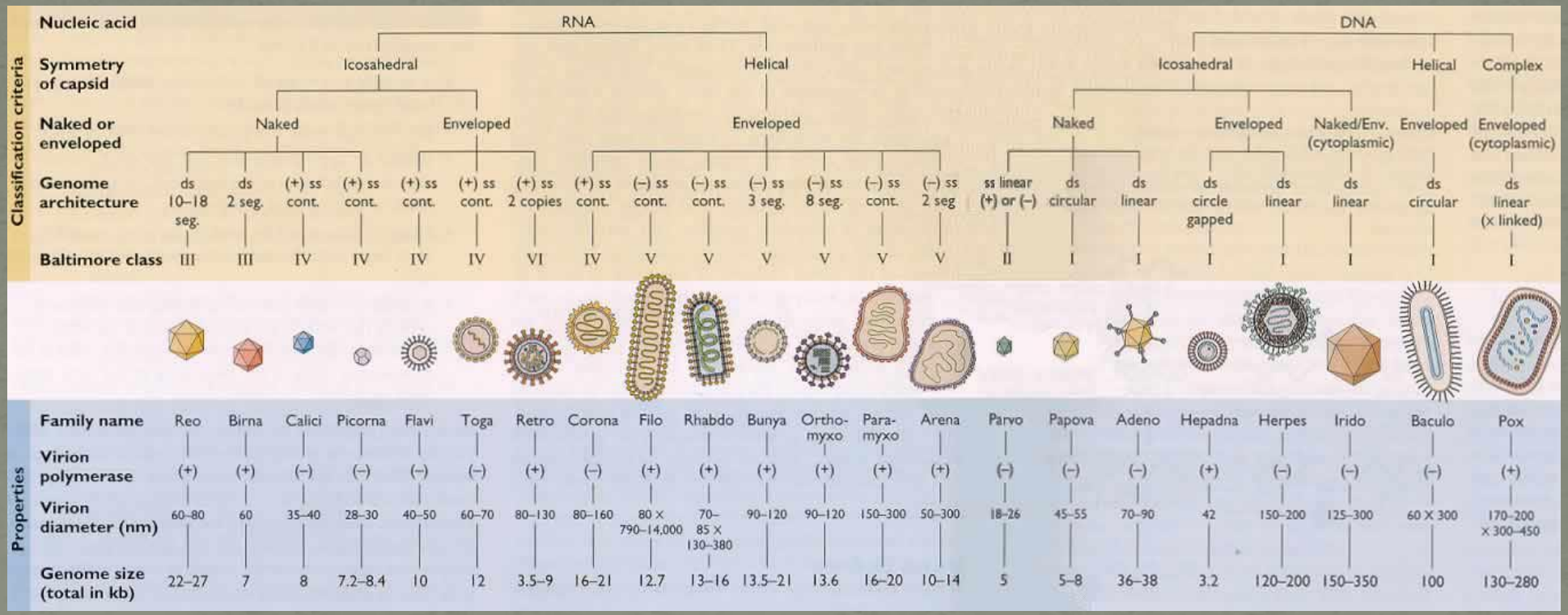
Quasispecies
Ετερόμορφος γενετικά πληθυσμός του ιδίου στελέχους

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

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

ΠΩΣ ΕΞΕΛΙΧΘΗΚΑΝ & ΕΞΕΛΙΣΣΟΝΤΑΙ ΟΙ ΙΟΙ;

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



Γενική Ταξινόμηση Μερικών Σημαντικών Κατηγοριών Ιών των Ζώων

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

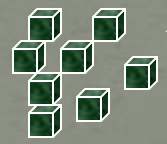
ΠΩΣ ΕΞΕΛΙΧΘΗΚΑΝ & ΕΞΕΛΙΣΣΟΝΤΑΙ ΟΙ ΙΟΙ;

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

ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ

ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ

ΦΥΣΙΚΗ ΕΠΙΛΟΓΗ
Επιβίωση του
Καλύτερα
Προσαρμοσμένου



Επιβίωση 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**

Συχνότερο

Ασθένεια!

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

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ - ΣΗΜΕΙΟ ΕΙΣΟΔΟΥ ΤΟΥ ΙΟΥ

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

ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ (Σποραδικές, Επιδημίες)

ΛΟΙΜΟΓΟΝΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΙΟΥ

Διαφυγή Ανοσοποιητικού Συστήματος
(Γεν. Ποικιλομορφία)

Τροπισμός
(Είδος Οργάνου που προσβάλλει)

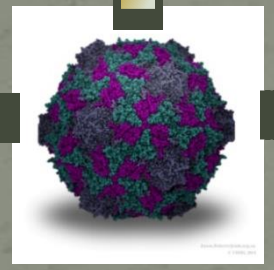
Χαρακτηριστικά Ενδοκυττάριου Κύκλου Ζωής

ΑΝΘΡΩΠΟΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΩΝ ΣΤΙΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΚΟΙΝΩΝΙΕΣ

Γενικοί Τύποι Ιογενών Λοιμώξεων

Ασυμπτωματικές/Υποκλινικές Λοιμώξεις (Πλειοψηφία)



Χρόνιες Λοιμώξεις

Οξείες Λοιμώξεις

Επιμένουσες/Λανθάνουσες Λοιμώξεις

Παραδείγματα

Ερπητικές Λοιμώξεις

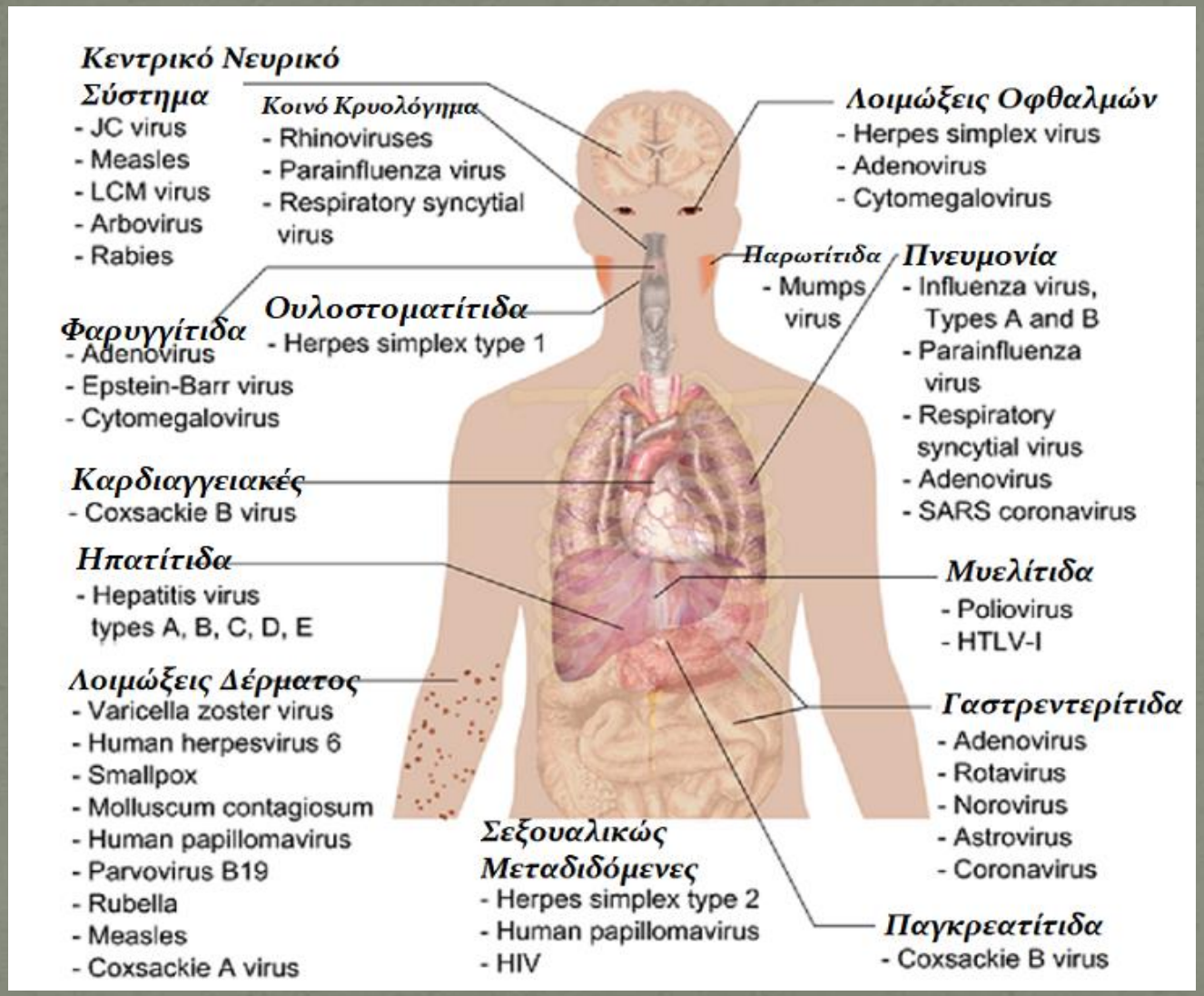
HIV (AIDS)

ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Ηπατίτιδα B, C HPV EBV

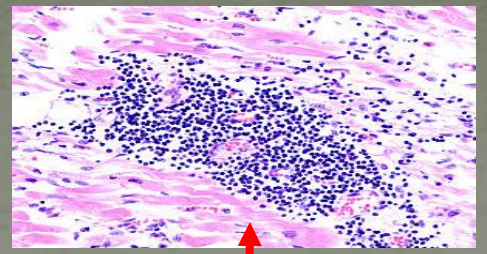
Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΩΝ ΣΤΙΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΚΟΙΝΩΝΙΕΣ

Παραδείγματα Οξείων Ιογενών Λοιμώξεων του Ανθρώπου



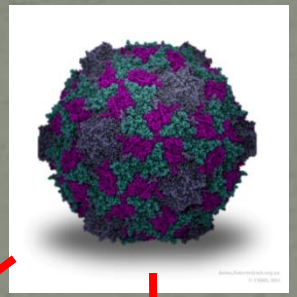
Häggström, Mikael (2014). "Medical gallery of Mikael Häggström 2014". *WikiJournal of Medicine* **1** (2). DOI:10.15347/wjm/2014.008

Χρόνια Ιογενής Καρδιομυοπάθεια

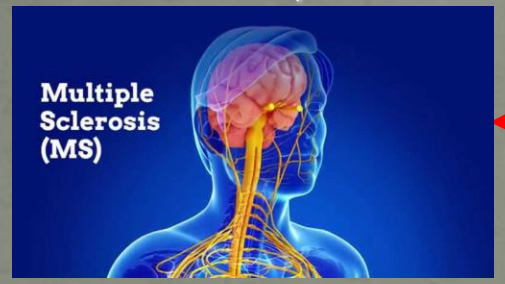


Πολλές ακόμα σοβαρές ασθένειες με πιθανή ιογενή αιτιολογία που αναμένεται να διερευνηθούν

ΧΡΟΝΙΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

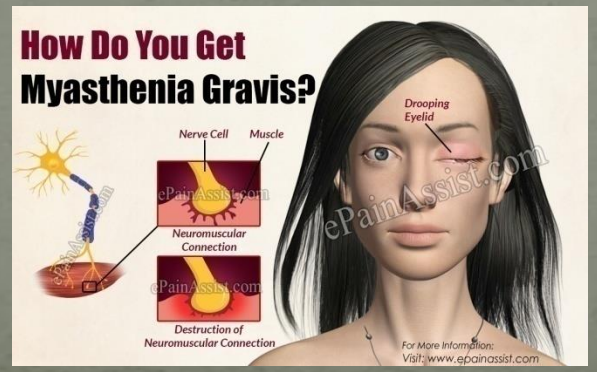


Σκλήρυνση κατά Πλάκας(MS)

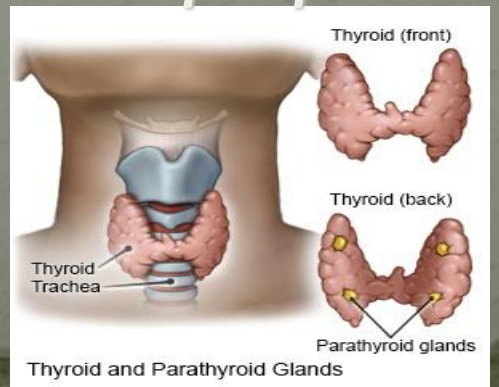


Σύνδρομο Χρονίας Κοπώσεως (CFS)

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 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 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

ΙΟΓΕΝΗΣ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

ΑΝΘΡΩΠΟΓΕΝΗΣ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ, ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ, ΠΑΝΔΗΜΙΕΣ

ΑΝΘΡΩΠΟΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

- **Οικολογία και Σύγχρονες Μέθοδοι Γεωργίας**
  - *Μόλυνση Περιβάλλοντος, Κλιματικές Αλλαγές (?), Αποψίλωση Δασών, Τεχνητή Ύδρευση, Αναδασώσεις, Θεομηνίες*

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

Επαφή για 1η Φορά με Νέους Παθογόνους Ιούς

ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ, ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ, ΠΑΝΔΗΜΙΕΣ

ΑΝΘΡΩΠΟΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

- **Ιατρικές/Χειρουργικές Παρεμβάσεις**

Παράδειγμα:

- Μεταμοσχεύσεις Οργάνων
- Ανοσοκατασταλτικά Φάρμακα

Ανάδυση ερπητοϊών όπως ο CMV

ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ, ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ, ΠΑΝΔΗΜΙΕΣ

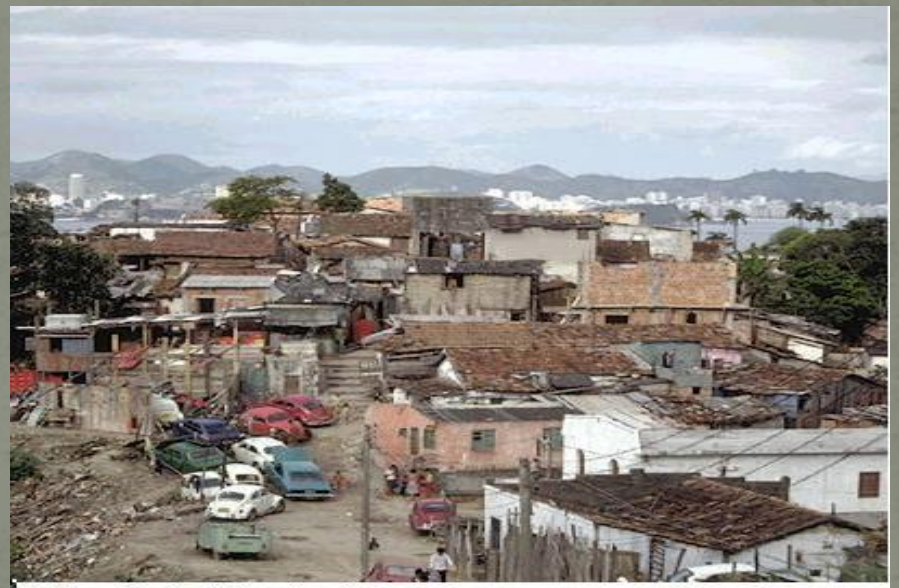
ΑΝΘΡΩΠΟΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

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

ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ, ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ, ΠΑΝΔΗΜΙΕΣ

ΑΝΘΡΩΠΟΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

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



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:

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

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ: Ο ΙΟΣ ΤΗΣ ΓΡΙΠΠΗΣ

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

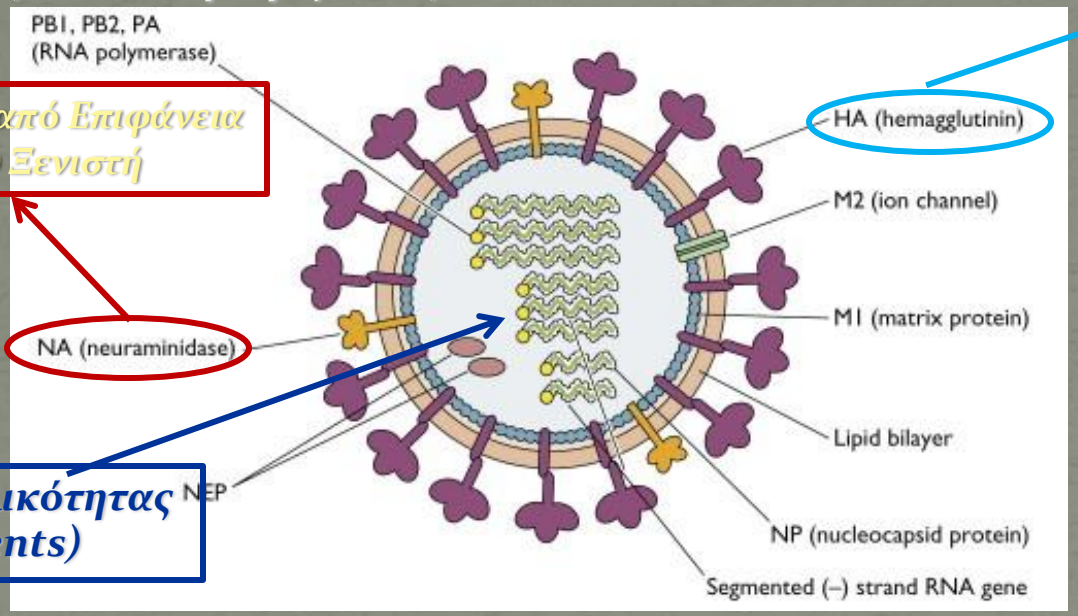
ΙΟΣ ΤΗΣ ΓΡΙΠΠΗΣ: Ο ΜΟΝΙΜΟΣ ΠΡΩΤΑΓΩΝΙΣΤΗΣ

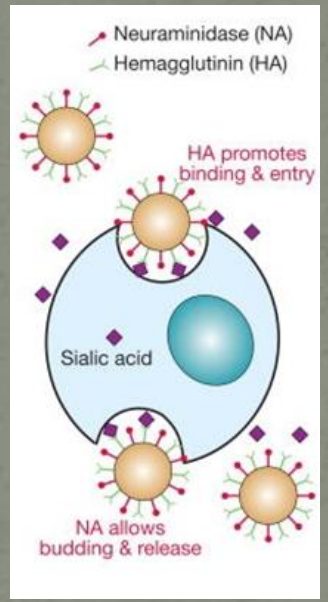
- Ελυτροφόρος, Πλειομορφικός

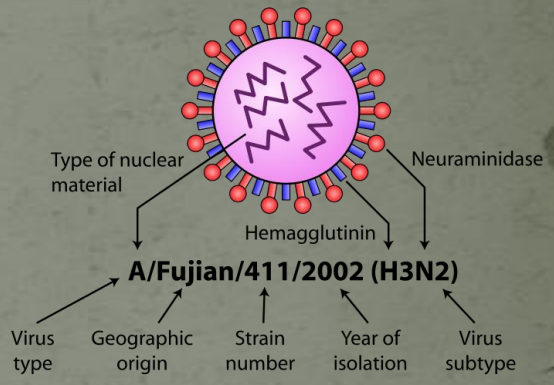
Προσκόλληση σε Κυτταρικούς Υποδοχείς

Απελευθέρωση από Επιφάνεια Κυττάρου Ξενιστή

ssRNA (-) πολικότητας (8 segments)







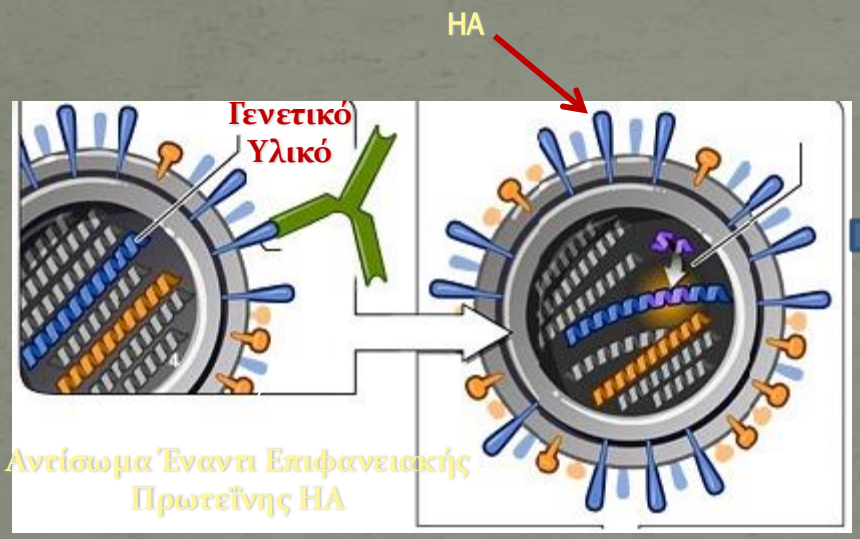
Τρόπος Ονομασίας Στελεχών

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

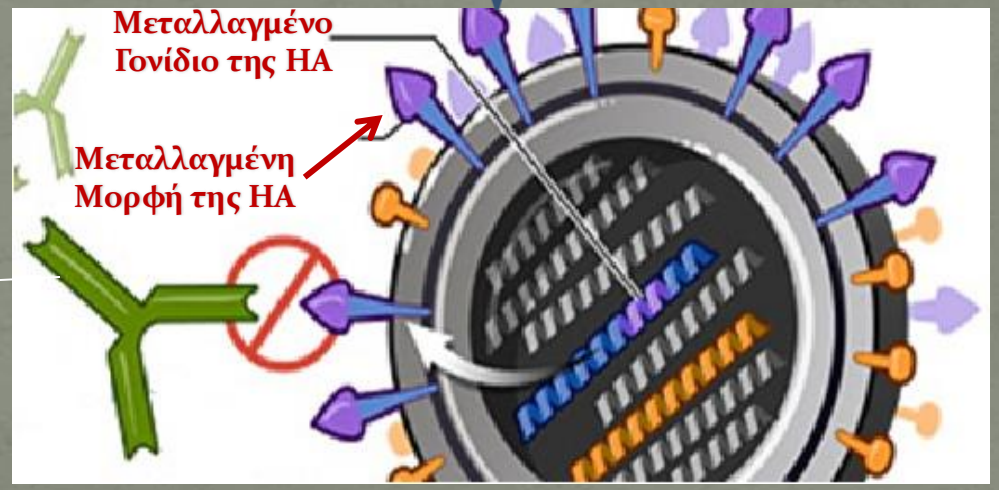
ΙΟΣ ΤΗΣ ΓΡΙΠΠΗΣ: ΤΟ ΑΕΝΑΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ

Γενετική Ποικιλομορφία

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



Μετάλλαξη
στο Γονίδιο της HA



Αντισώματα του Ανθρώπου δεν αναγνωρίζουν πλέον τη Μεταλλαγμένη Μορφή της HA

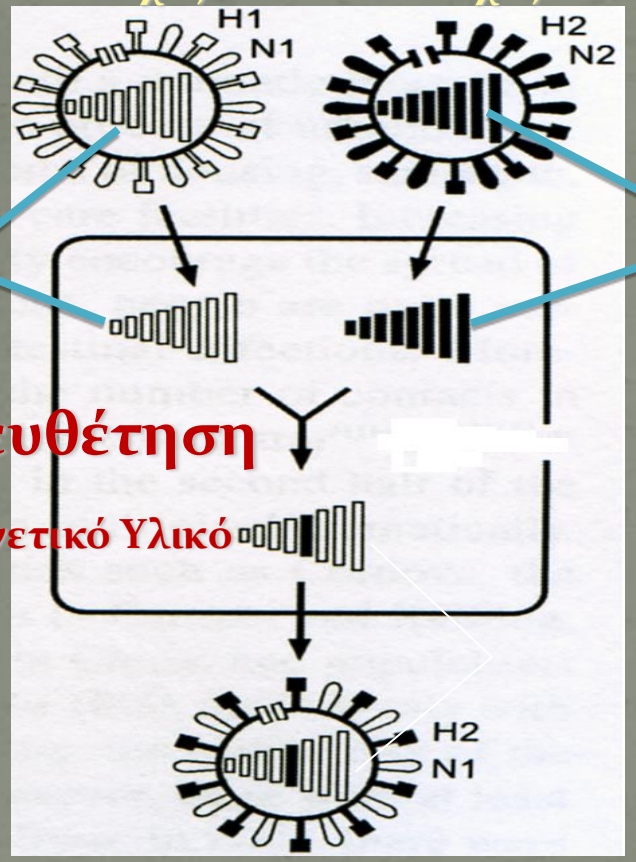
Νέο Στέλεχος με Μεταλλαγμένο Γενετικό Υλικό και Νέες Αντιγονικές Ιδιότητες

ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ

ΙΟΣ ΤΗΣ ΓΡΙΠΠΗΣ: ΤΟ ΑΕΝΑΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ
Γενετική Ποικιλομορφία

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

Στέλεχος 1 Στέλεχος 2



Γενετικό Υλικό Στελέχους 1

Γενετικό Υλικό Στελέχους 2

Αναδιευθέτηση

Νέο Γενετικό Υλικό

Νέο Στέλεχος με Ανασυνδυασμένο Γενετικό Υλικό και Νέες Αντιγονικές Ιδιότητες

Πανδημία

Διαφορά Από «Drift»

Μεγαλύτερες Γενετικές Διαφορές

Αντιγονικά Ευρύτερες Αλλαγές

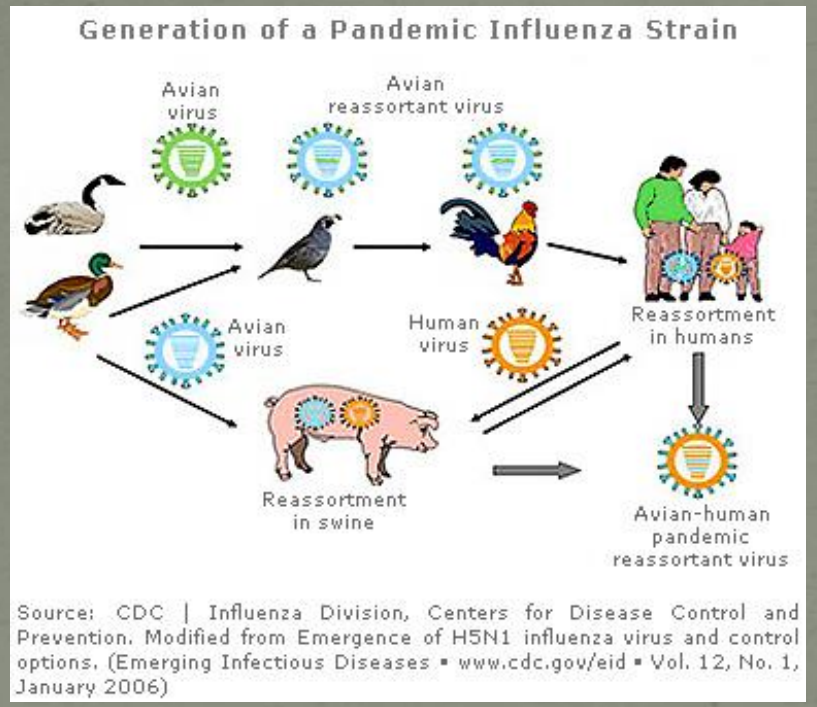
Μικρότερες Πιθανότητες Ανοσίας της Κοινότητας

Μεγαλύτερη Απουσία Ανοσίας:
Διάδοση Πανδημική (πέρα από στενότερα γεωγραφικά όρια επιδημίας που προκαλεί το «drift»)

ΙΟΣ ΤΗΣ ΓΡΙΠΠΗΣ: ΤΟ ΑΕΝΑΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ

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

Σημείο Κλειδί: ΑΛΛΑΓΗ ΞΕΝΙΣΤΗ



ΠΑΝΔΗΜΙΑ

Ανασυνδυασμός Γεν. Υλικού «Ανθρώπινου» Στελέχους με Γεν. Υλικό Στέλεχους από Χοίρο ή Πτηνό για Δημιουργία ΠΑΝΔΗΜΙΚΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ

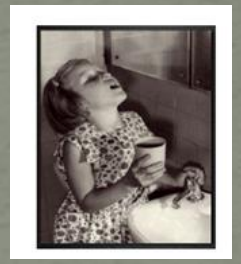
(Ο ανασυνδυασμός γίνεται ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ)

ΙΟΣ ΤΗΣ ΓΡΙΠΠΗΣ: ΤΟ ΑΕΝΑΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ

Γνωστές Πανδημίες

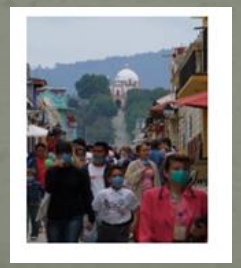
Πανδημία	Η/νία	Θάνατοι	Υπεύθυνος Υπότυπος
1889 flu pandemic (Asiatic/Russian Flu)	1889–1890	1 εκατομμύριο	H3N8 ή H2N2
1918 flu pandemic (Spanish flu)	1918–1920	20-100 εκατομμύρια	H1N1
Asian Flu	1957–1958	1-1.5 εκατομμύρια	H2N2
Hong Kong Flu	1968–1969	0.75-1 εκατομύριο	H3N2
Russian flu	1977–1978	Άγνωστο	H1N1
2009 flu pandemic	2009–2010	18,000	H1N1

1918–1920



1957–1958

1968



2009-2010

ΕΝΑ ΑΛΛΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ: ΕΝΤΕΡΟΪΟΣ D68

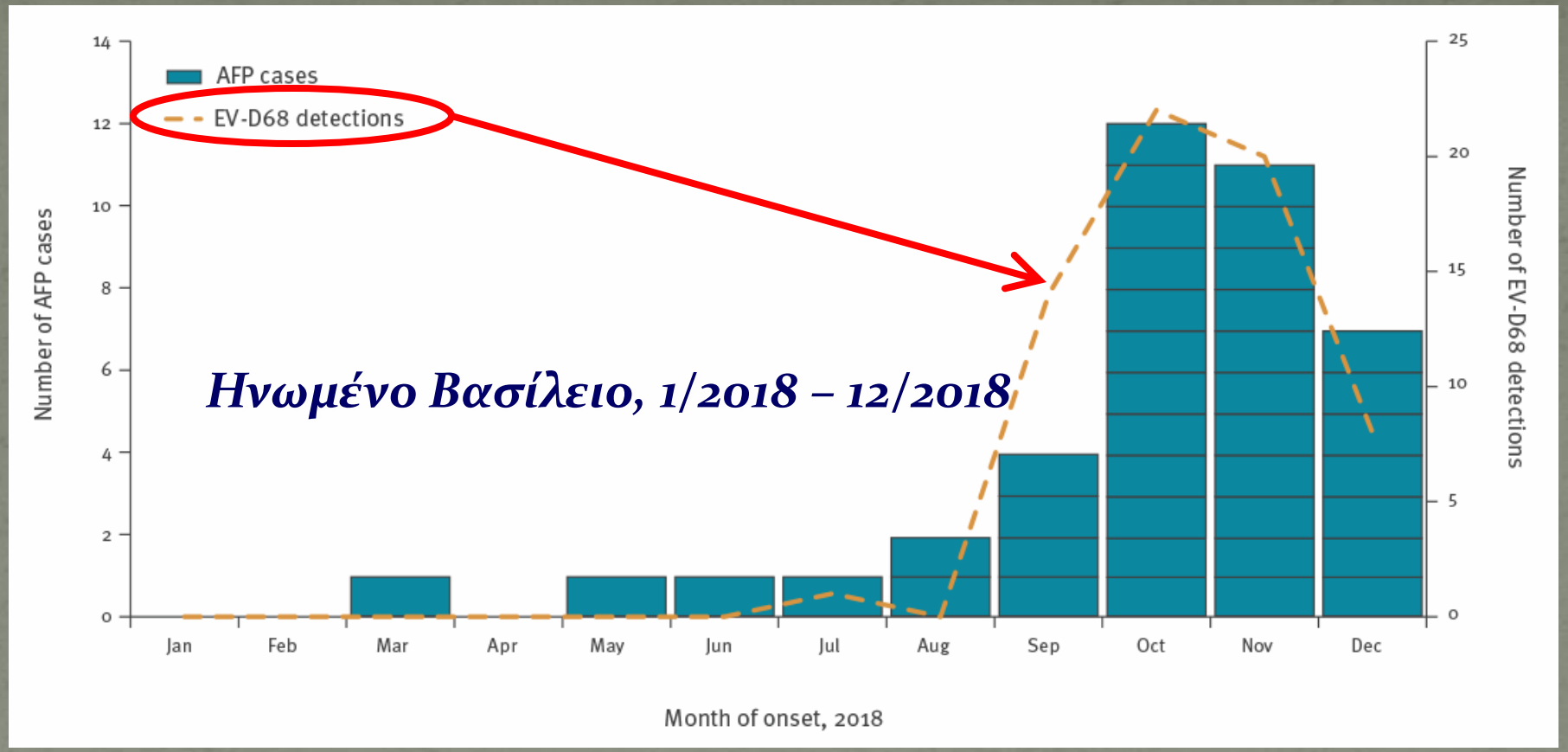
- ***Ανακάλυψη:***
  - 1962 (Καλιφόρνια)
- ***Κλινικές Εκδηλώσεις - Επιδημιολογία:***
  - Έως 2014: Σποραδικά περιστατικά (699)
  - *Αύγουστος 2014*: Αυξημένος Αριθμός Κρουσμάτων EV-D68 με Οξεία Λοίμωξη Κατωτέρου Αναπνευστικού αρχικά στις ΗΠΑ
  - Ομάδες κρουσμάτων Οξείας Χαλαρής Παράλυσης κατά τη διάρκεια 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

Ερμηνεία

Διάγνωση

Θεραπεία

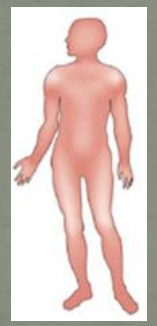
Εμβόλια

Έρευνα

- Θεραπεία
- Εμβόλια
- Παθοφυσιολογία
- Ανακάλυψη Νέων & Επανεμφανιζομένων Ιών
- Αιτιολογική Σύνδεση (Αδιάγνωστες Ασθένειες)

Επιδημιολογία

- Πρόληψη
- Χαρτογράφηση Λοιμογόνου Δυναμικού
- Επιτήρηση
- Νέα Λοιμογόνα Στελέχη Επιδημίες, Πανδημίες



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

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

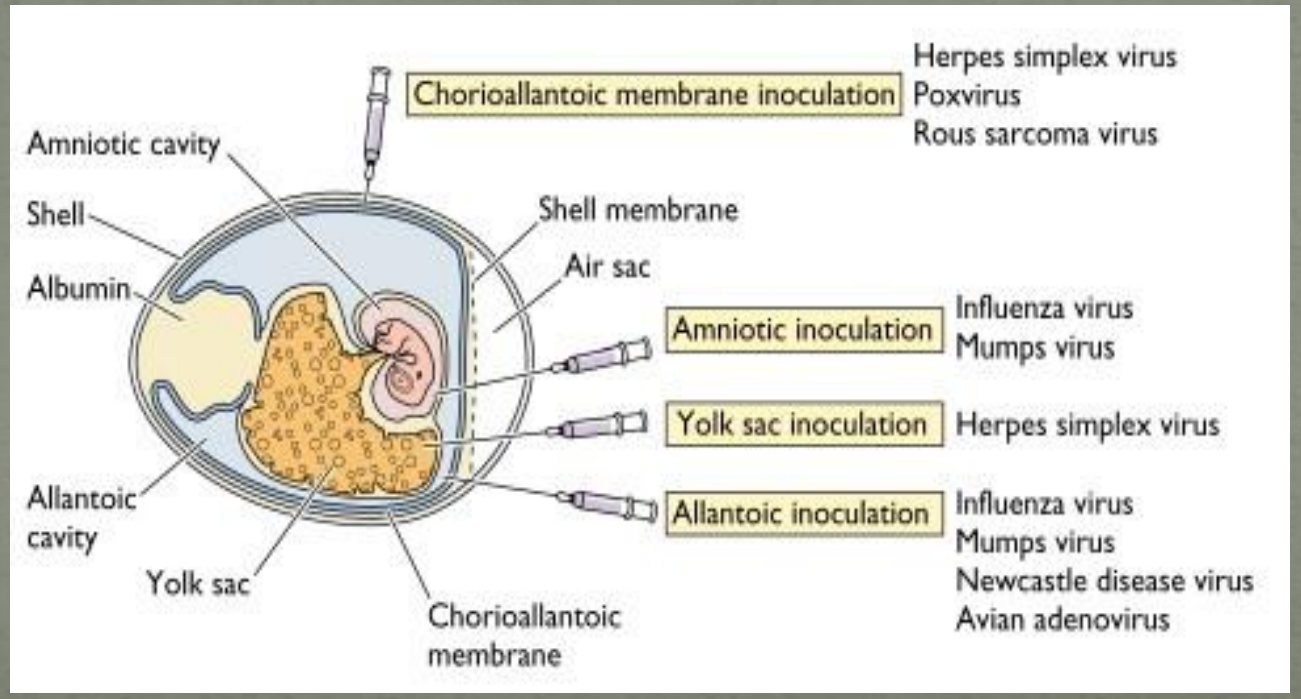
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ

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

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ

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



Θάνατος Εμβρύου

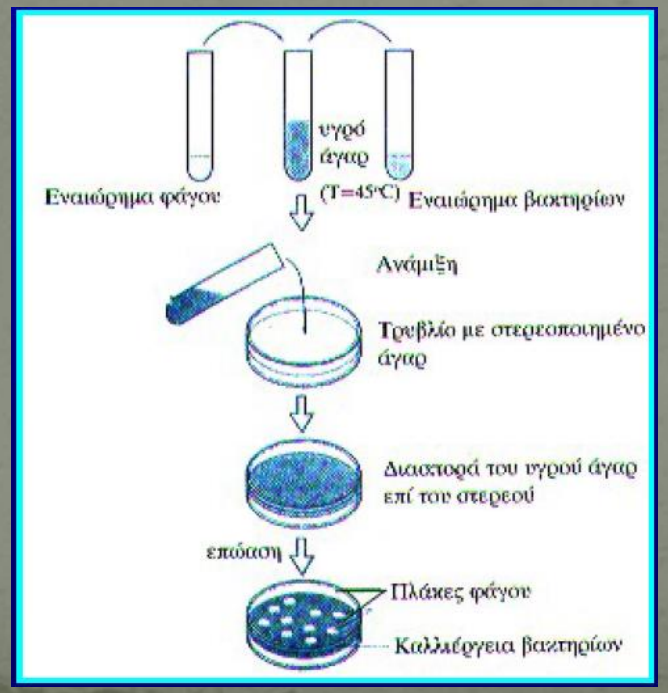
Βλάβες στα Εμβρυϊκά Κύτταρα

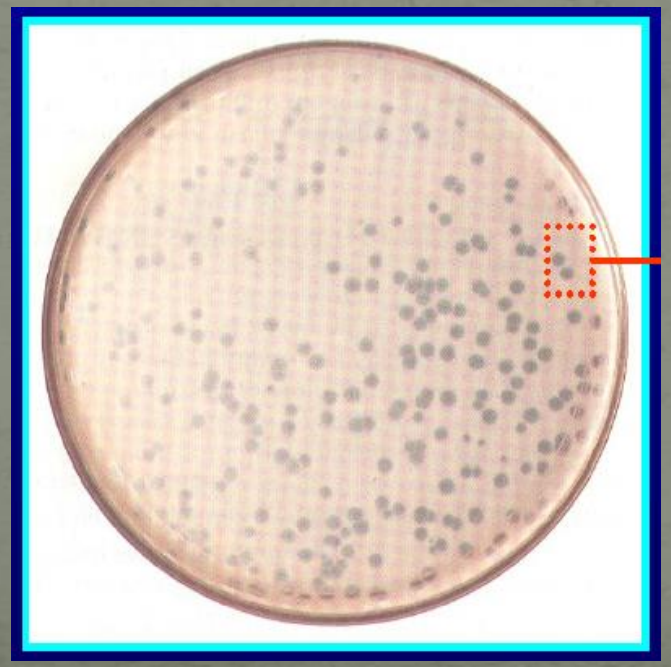
Βλάβες στις Μεμβράνες – Περιοχές Ενοφθαλμισμού

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

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

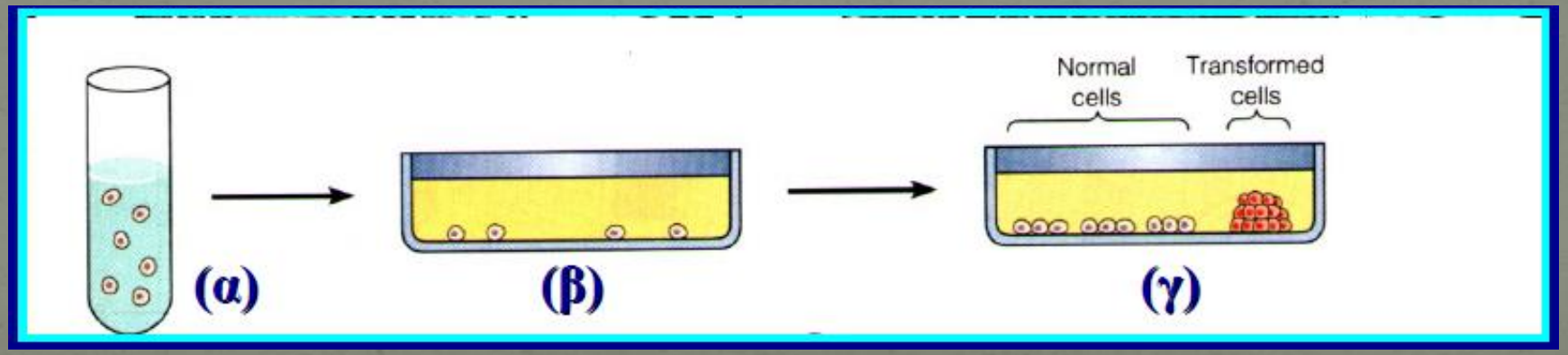
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ

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

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ

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

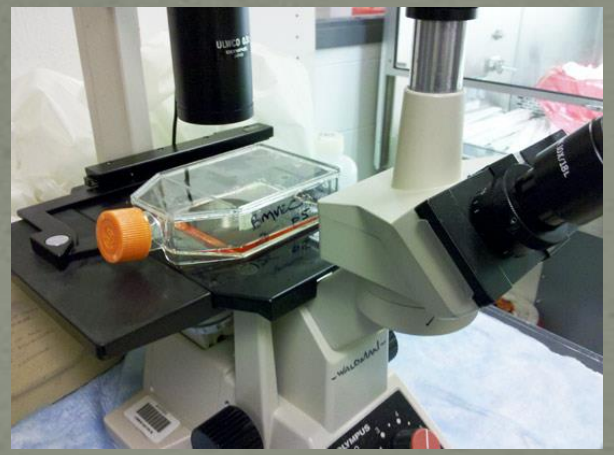


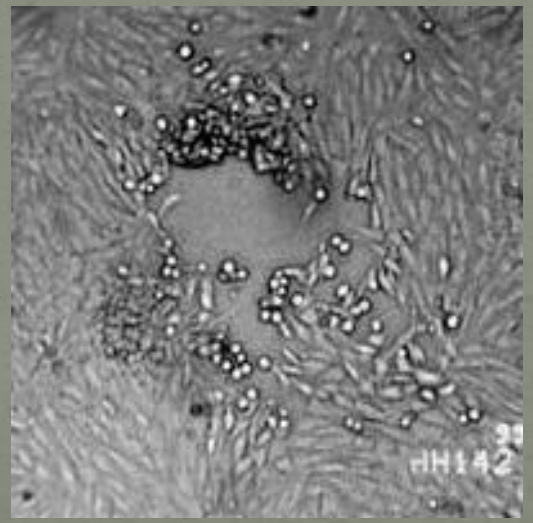
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ

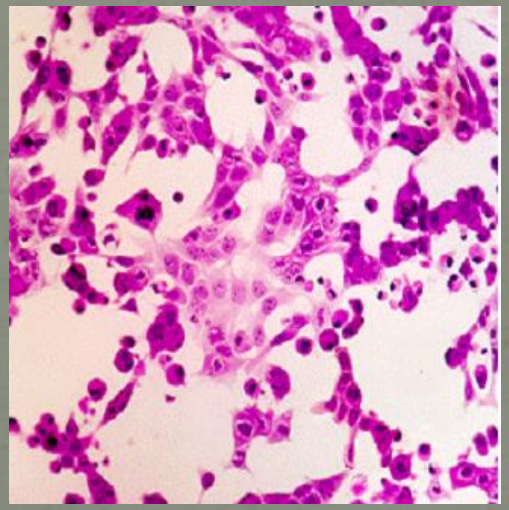
- ***Ενδοκυττάρια Παράσιτα:***
  - **Κυτταροκαλλιέργειες:**

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



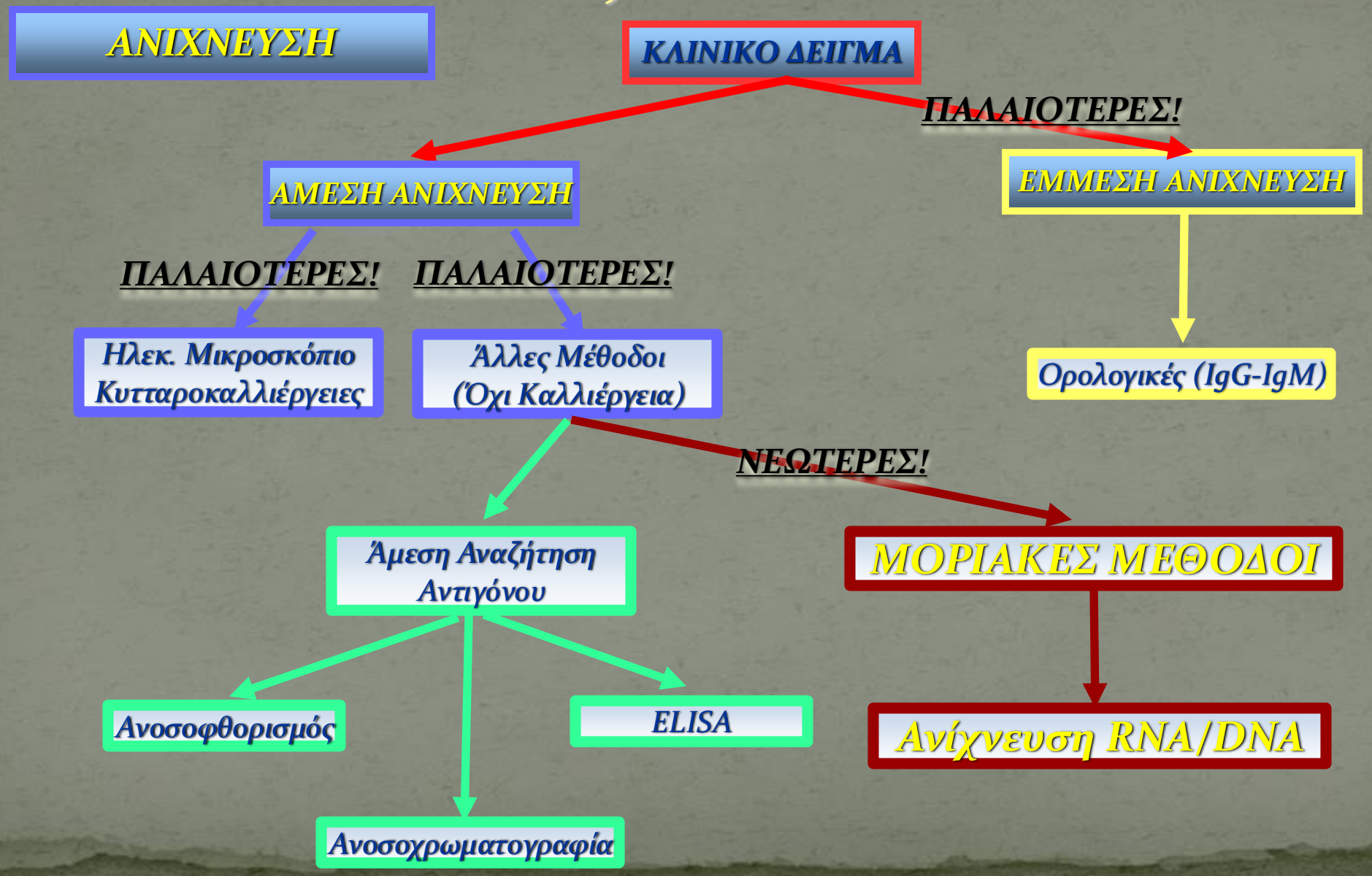


Κυτταροπαθογόνος δράση εντεροϊών



Κυτταροπαθογόνος δράση αδενοϊών

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ



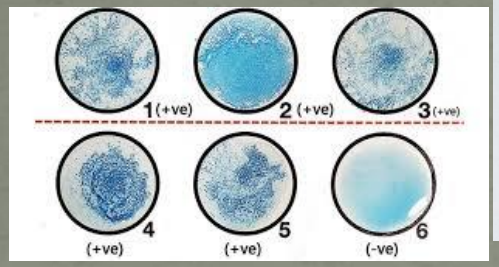
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΕΜΜΕΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ!

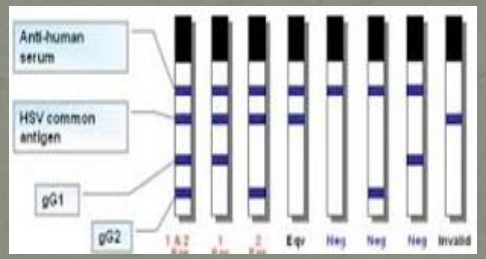
Ορολογικές (IgG-IgM)

- «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
- Αναδυόμενοι Ορότυποι & Στελέχη
- «Παράθυρο» & επιμονή IgM μετά οξεία φάση

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

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΕΜΜΕΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

Ορολογική/Ανοσολογική Διάγνωση

Παραδείγματα Προβλημάτων

Ορολογικό Προφίλ HBV

↓

Παρακολούθηση Χρόνιων Φορέων

→ Θεραπεία Παρακολ. Ιϊκού Φορτίου

→ Αναζωπύρωση HBe "Pre-Core" Mutants"

→ Κρυφή ("Occult") HBV Λοίμωξη

Λύση: Μόνο με Νεότερες Μοριακές Μεθόδους Προσδιορισμού Ιϊκού φορτίου

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΕΜΜΕΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

Ορολογική/Ανοσολογική Διάγνωση

Παραδείγματα Προβλημάτων

Ορολογικό Προφίλ
HCV, HIV

Ψευδώς Θετικά?

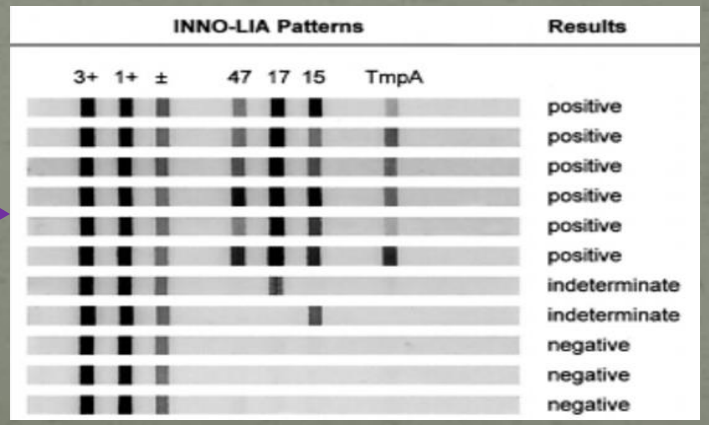
Ορομετατροπή?

Ασθενώς (+) με Μέθοδο Διαλογής

Θεραπεία Παρακολ. Ιϊκού Φορτίου

Επιβεβαίωση με Western Blot

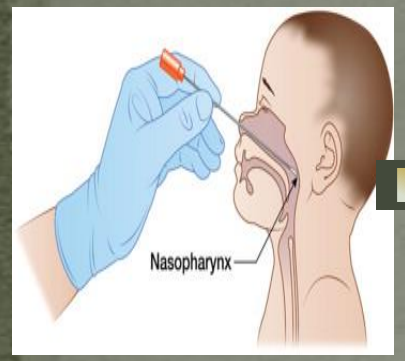
Συχνά Αμφίβολα Αποτελέσματα

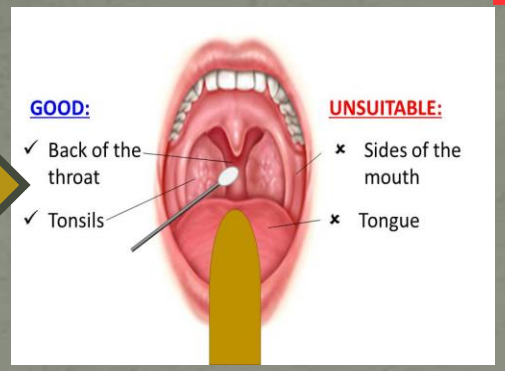


Λύση: Μόνο με Νεότερες Μοριακές Μεθόδους Προσδιορισμού Ιϊκού φορτίου

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΑΜΕΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ



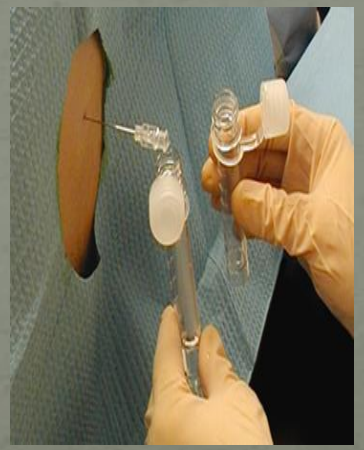


Ρινο-/Φαρυγγικό Επίχρισμα

ΚΛΙΝΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ

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

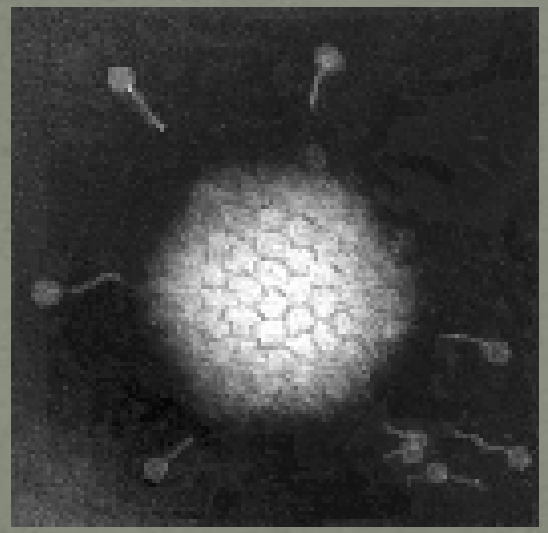
ΑΜΕΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

↓

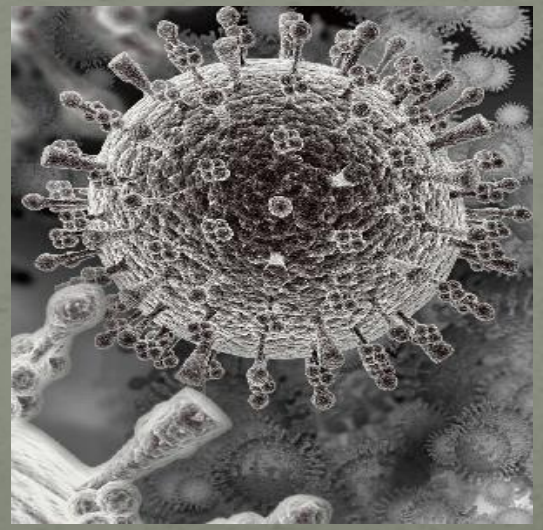
Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο

Μορφολογία Ιϊκών Σωματιδίων

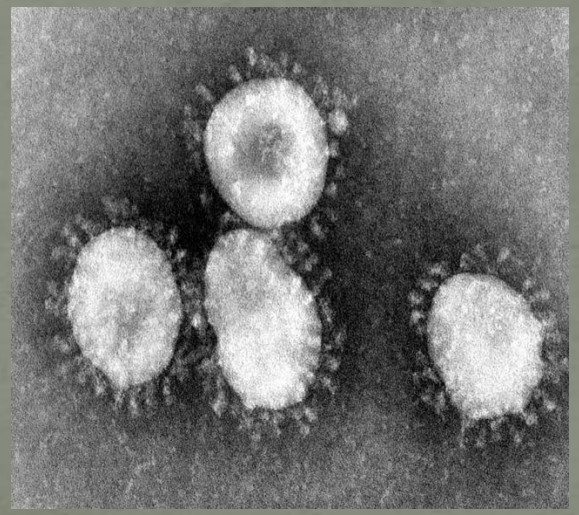
Δύσκολη και Αμφίβολης Ευαισθησίας Τεχνική



Adenovirus



Influenza



Coronavirus

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΑΜΕΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

Κυτταροκαλλιέργειες

- Μειωμένη Ευαισθησία
- Μειωμένη Ειδικότητα
- Δυσκολία
- Χρονοβόρες (4-14 Ημέρες)

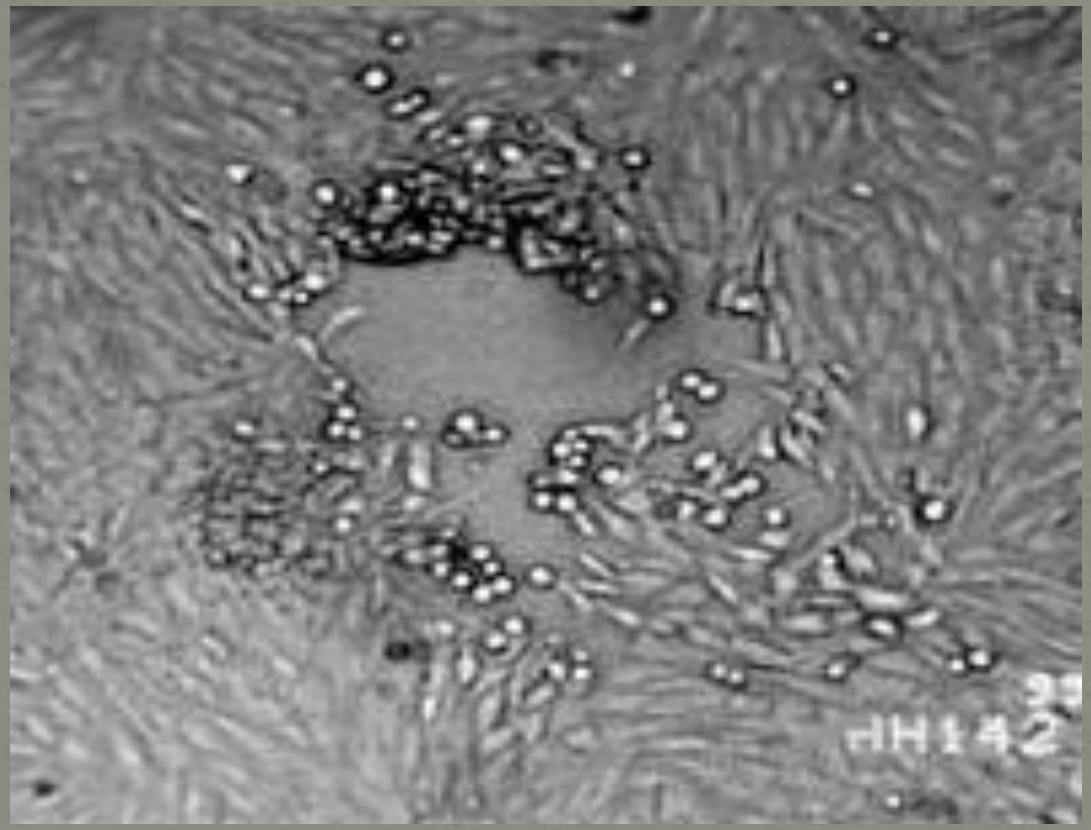
Προβληματικές στη Διάγνωση, αλλά

Ακόμα Χρήσιμες/Απαραίτητες

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ

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

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ



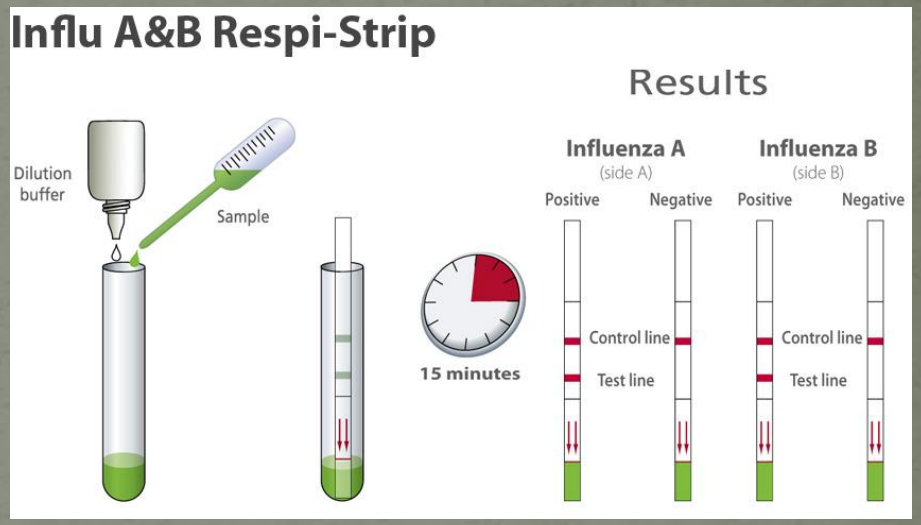
Κυτταροπαθογόνος Δράση Ιών

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΑΜΕΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

↓

Ανοσοχρωματογραφία



- *Πλεονεκτήματα:*
  - → *«Point-of-Care» Εξέταση*
  - → *Ταχεία Μέθοδος (~15min)*
  - → *Ειδικότητα, Θετική Προγνωστική Αξία ↑↑*

- *Μειονεκτήματα:*
  - → *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

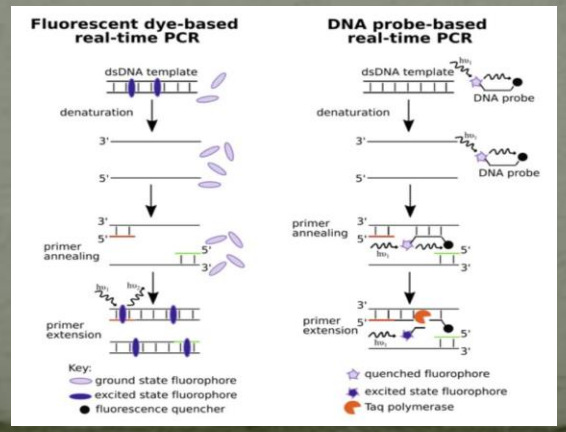
Νεότερες Μέθοδοι στη Διαγνωστική Ιολογία

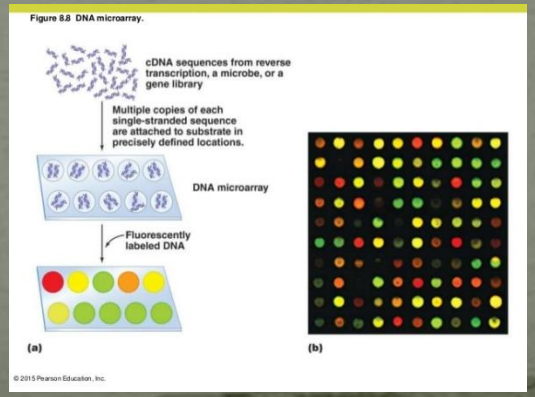
Μοριακές Μέθοδοι

- 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**

↓

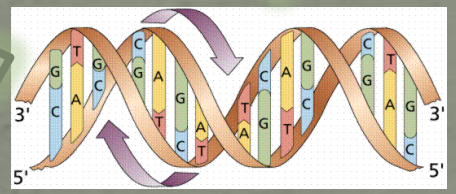
Υποδηλώνει την εξειδικευμένη σχέση Γονοτύπου – Φαινοτύπου → ***ΒΑΣΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ***

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΚΩΔΙΚΑΣ: ΘΕΜΕΛΙΟΣ ΛΙΘΟΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

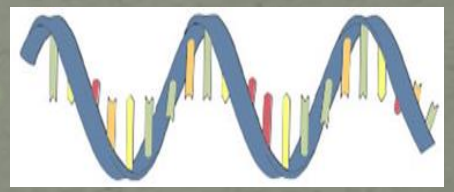
ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ

ΡΟΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ



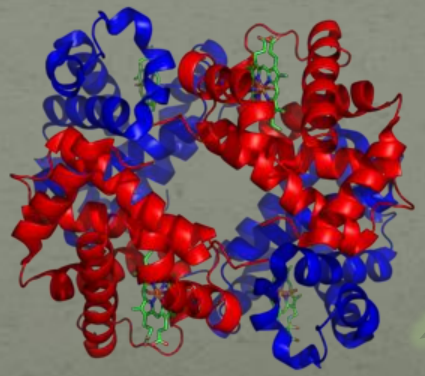
DNA

ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ



mRNA

ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ



ΠΡΩΤΕΪΝΗ

ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΔΟΓΜΑ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗΝ ΙΟΛΟΓΙΑ: ΠΑΡΕΛΘΟΝ, ΠΑΡΟΝ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝ

ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΚΩΔΙΚΑΣ: ΘΕΜΕΛΙΟΣ ΛΙΘΟΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

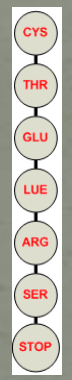
2η Βάση Κωδικονίου

1η Βάση Κωδικονίου

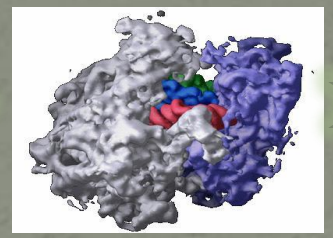
	U	C	A	G	
U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr STOP STOP	Cys Cys STOP Trp	U C A G
C	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G
A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G
G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U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

3η Βάση Κωδικονίου

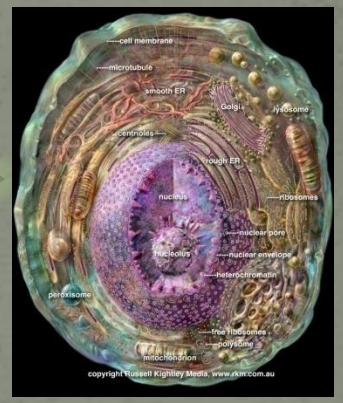
ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΟ



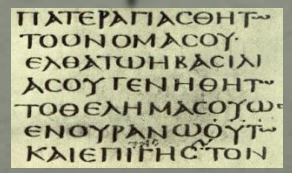
ΠΡΩΤΕΪΝΗ



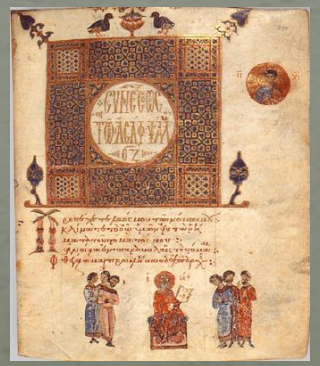
ΙΟΣ



ΑΛΦΑΒΗΤΟ



ΠΡΟΤΑΣΗ



ΚΕΦΑΛΑΙΟ

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:**

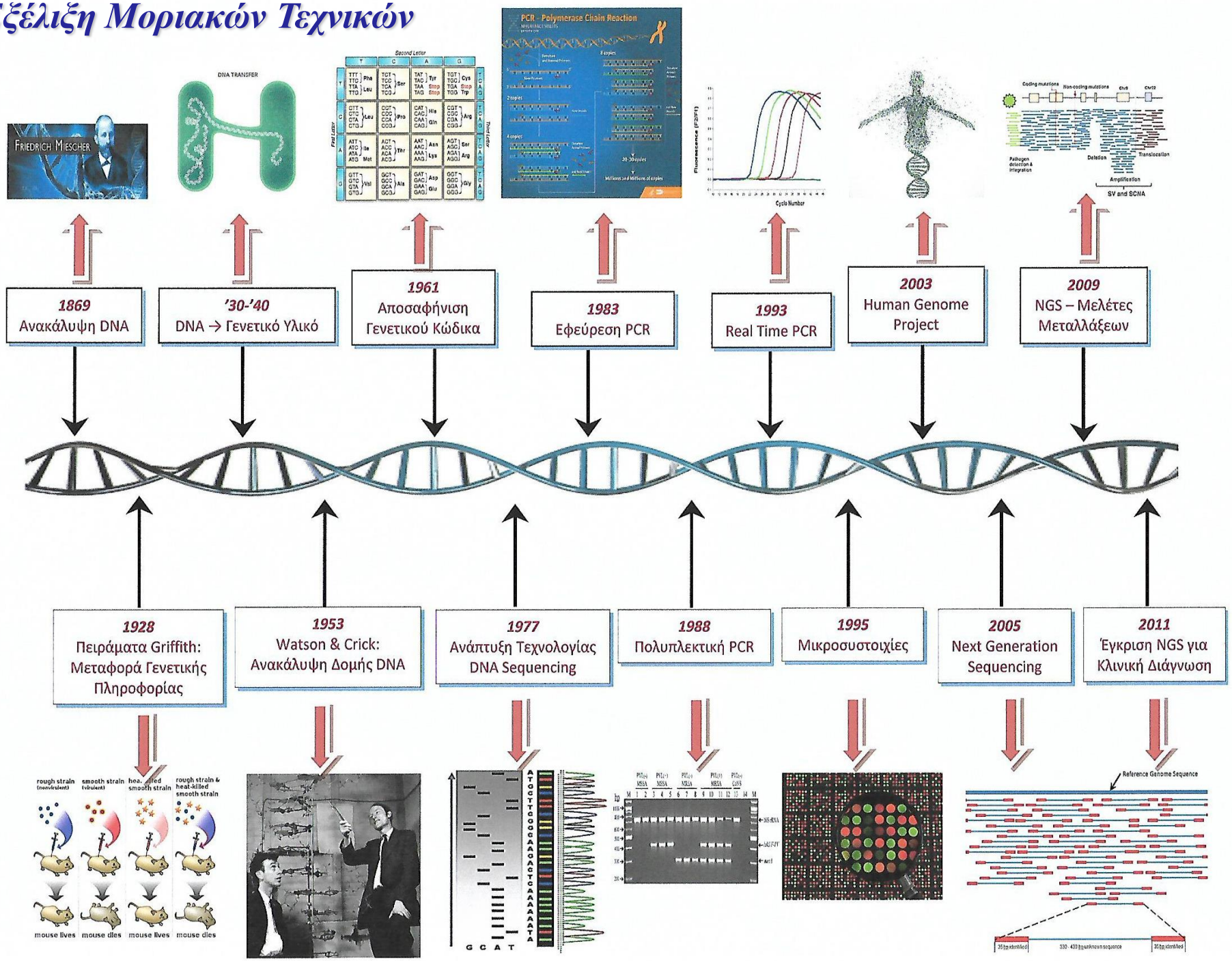
- **Διάγνωση των Ιογενών Ασθενειών**
- **Επιδημιολογία των Ιών**
- **Μελέτη της Βιολογίας των Ιών**
- **Χαρτογράφηση των Φαινομένων Γενετικής Ποικιλομορφίας των Ιών**
  - ✓ *Ένδειξη πιθανών Επιδημικών/Πανδημικών φαινομένων*
  - ✓ *Νέο Λοιμογόνο Δυναμικό*
  - ✓ *Μελέτη Εξέλιξης των Ιών*

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:
  - 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



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

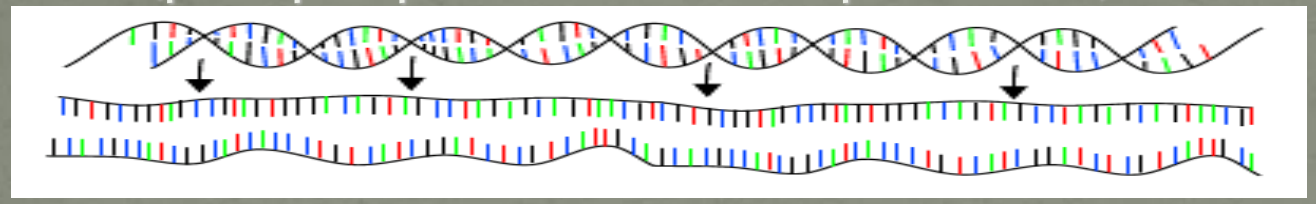
Ατιολογική Σύνδεση με Αδιάγνωστες/Χρόνιες Ασθένειες

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

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

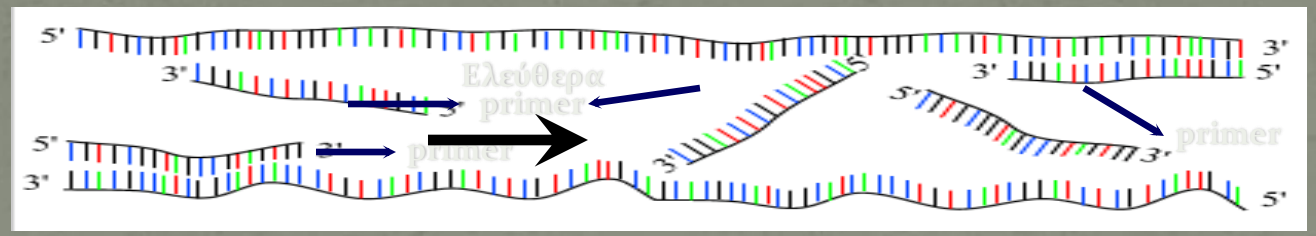
- *Διαφορετικά Στάδια Μεθόδου:*

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



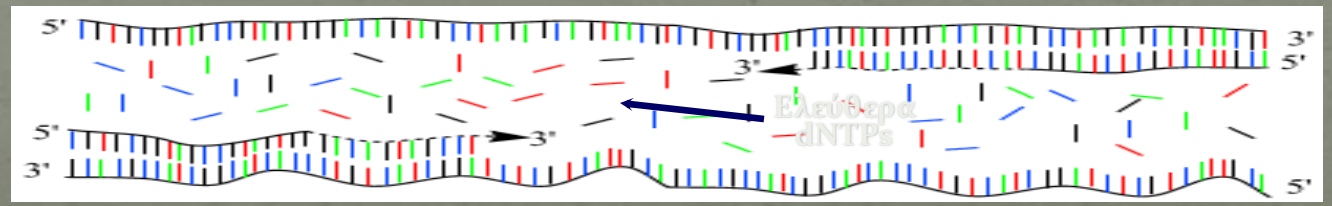
92-95°C για ~30sec

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



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

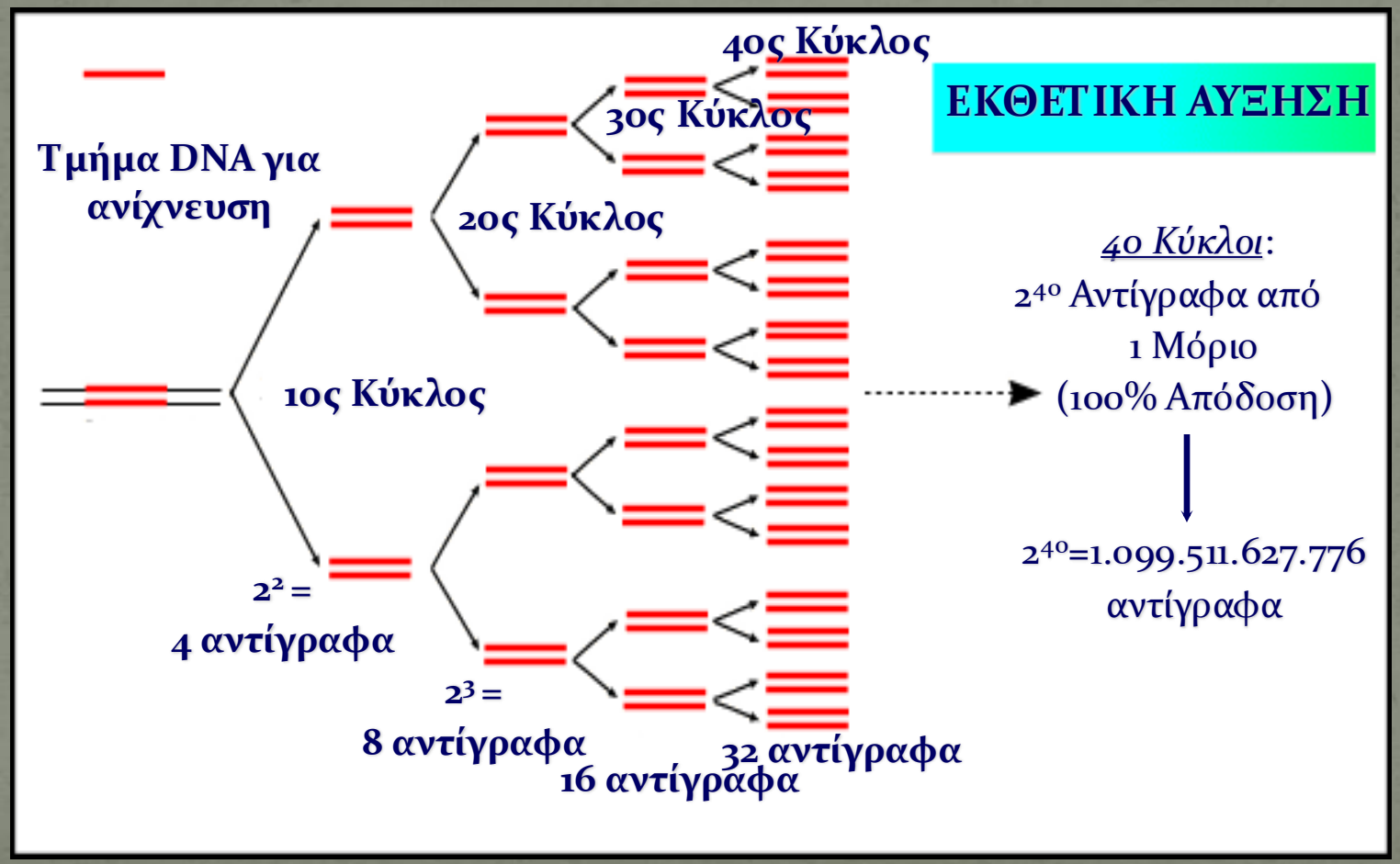
3. Στάδιο Επέκτασης Εκκινητικών Μορίων (Extension): Δημιουργία θυγατρικού κλώνου



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

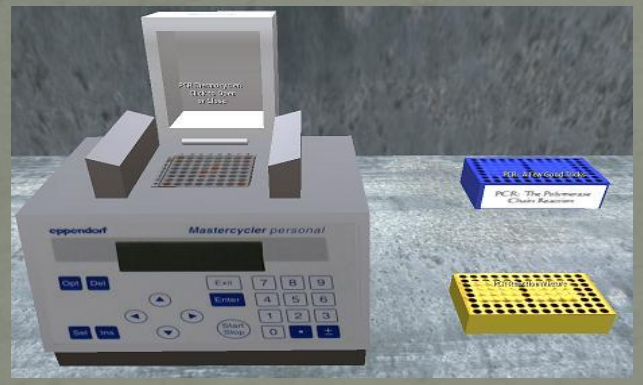
ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

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

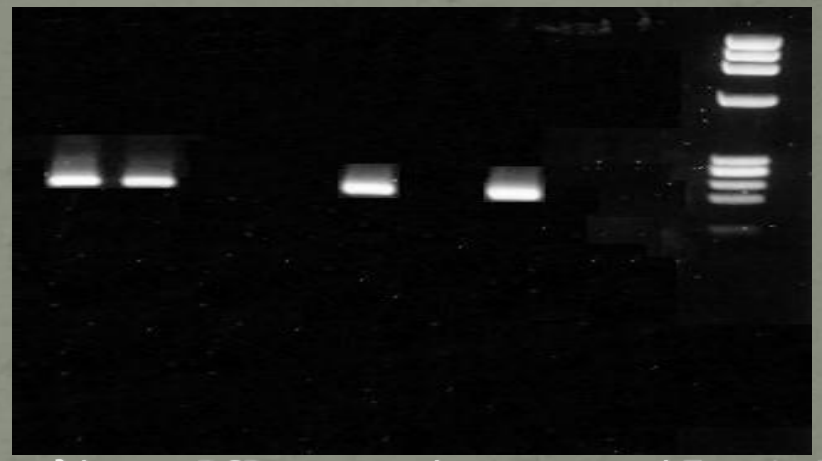


ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

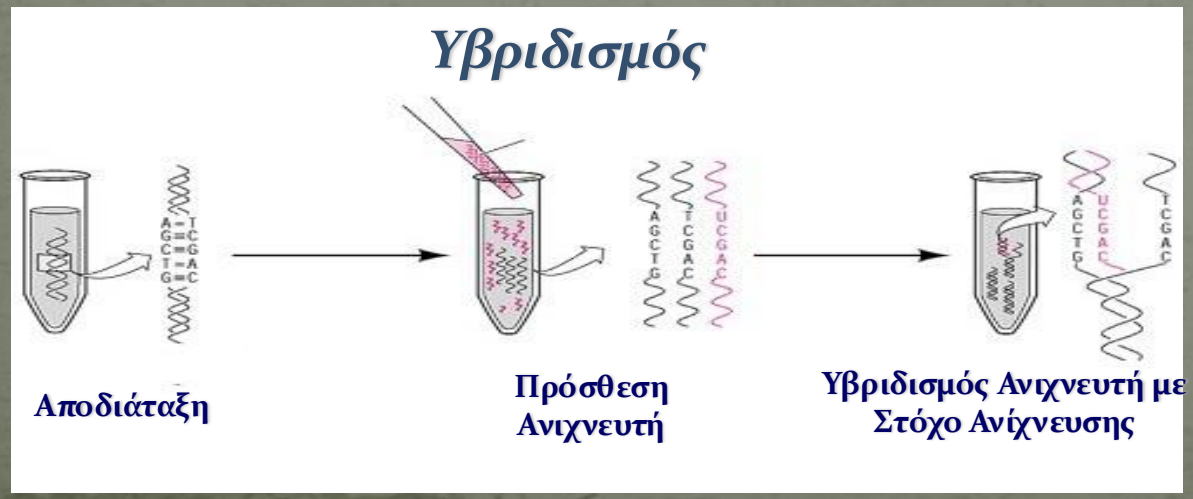
- Ανίχνευση Αποτελεσμάτων (*Συμβατική PCR*):



Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης



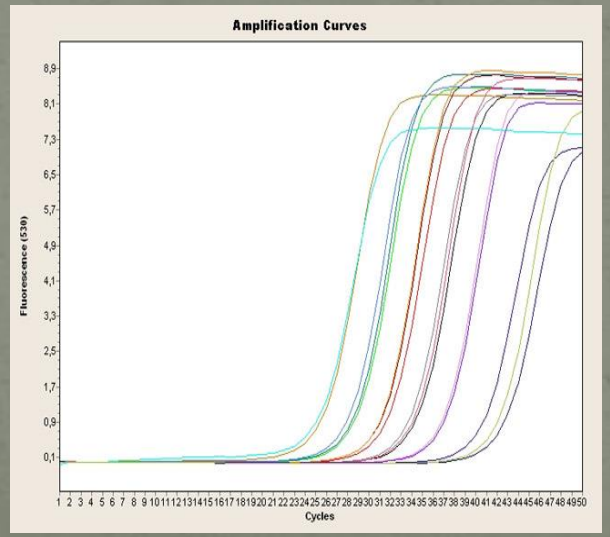
Αποτελέσματα PCR για την ανίχνευση του ιού Epstein-Barr (EBV) σε δείγματα ΕΝΥ ασθενών με AIDS. **M**: Μάρτυρας Μοριακού Βάρους. **Στήλες 1-9**: Δείγματα Ασθενών



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 ή Φθορίζουσες Ουσίες*** → Ειδικός Υβριδισμός ή Μη Ειδική Σύνδεση με παραγόμενο προϊόν → Παραγόμενος φθορισμός ανάλογος πληθυσμού παραγομένων αλληλουχιών:

LightCycler



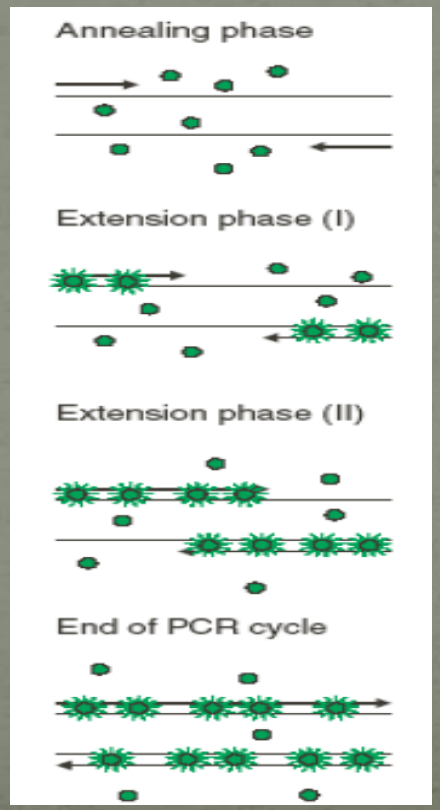
ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

- ***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

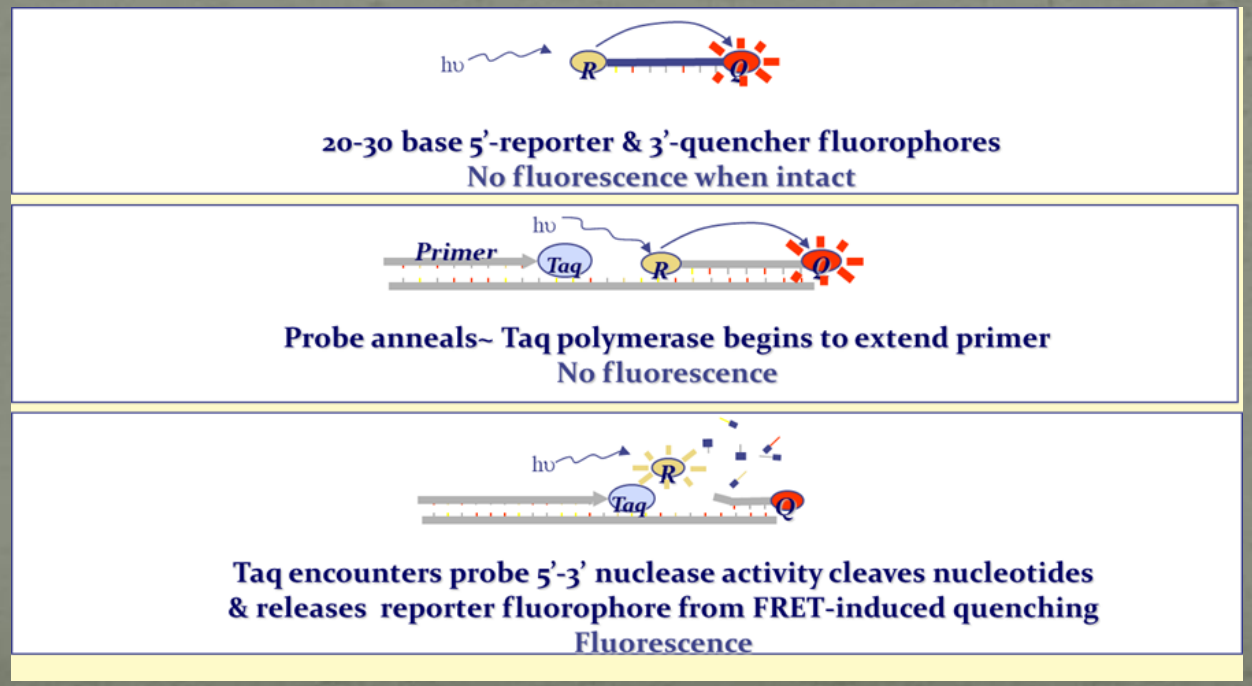


ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

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

ΕΙΔΙΚΕΣ (βασιζονται στον Υβριδισμό Ιχνηθετων – Probes)

- ✓ *Ιχνηθέτες TaqMan*
  - Εύκολοι στο σχεδιασμό

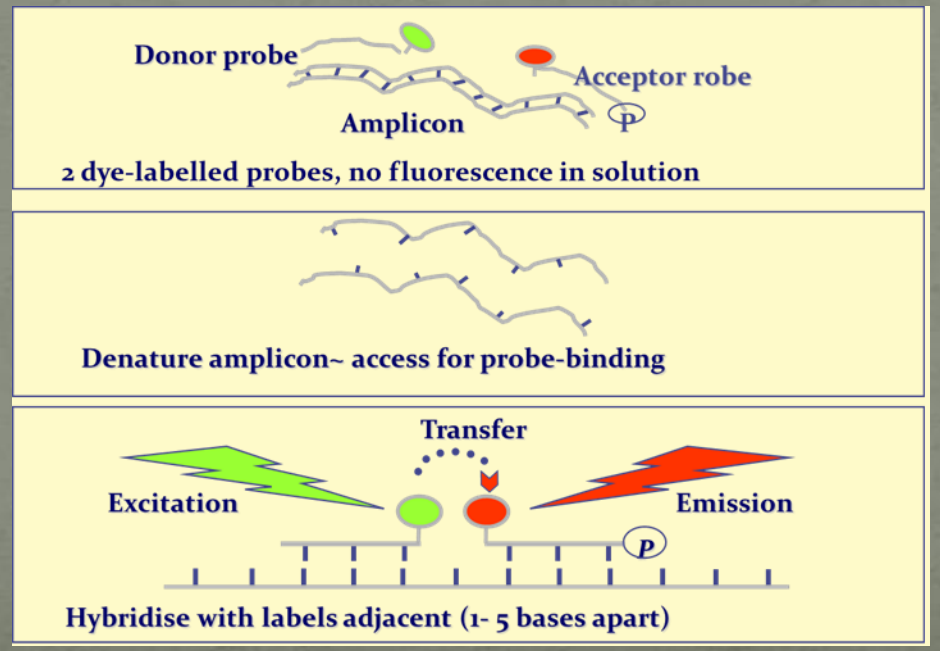


ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

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

ΕΙΔΙΚΕΣ (βασιζονται στον Υβριδισμό Ιχνηθετων – Probes)

- ✓ *Γειτνιάζοντες Ιχνηθέτες*
  - **Καμπύλες Τήξης (Melting Curves)** (↑ Δυνατότητα Γονοτ. Ταυτοποίησης)

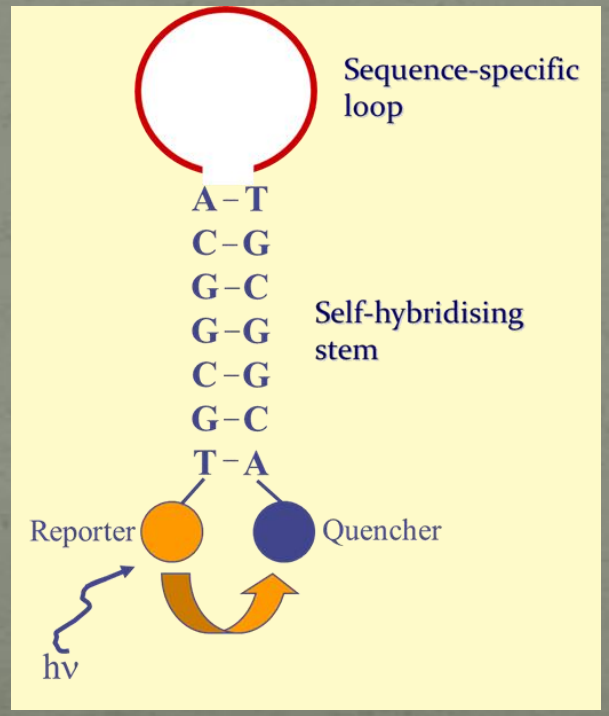


ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

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

ΕΙΔΙΚΕΣ (βασιζονται στον Υβριδισμό Ιχνηθετων – Probes)

✓ *Molecular Beacons*
- Πλεονεκτήματα Ιχνηθετών
- Πολύπλοκος σχεδιασμός



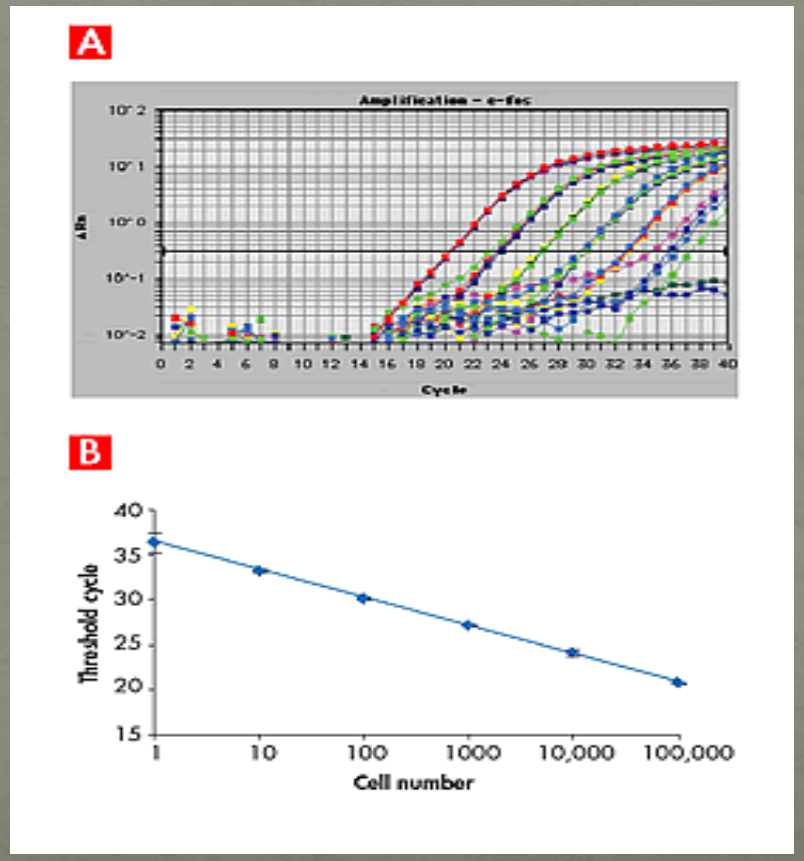
ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

- ***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

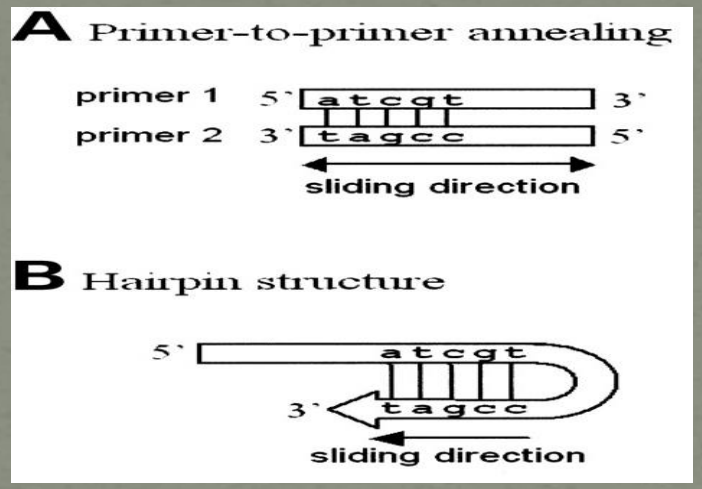
- **Ποσοτική PCR:**
  - ***Συμβατική PCR***: Μόνο ανίχνευση με υβριδισμό
  - ***Real - Time PCR***

} ***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

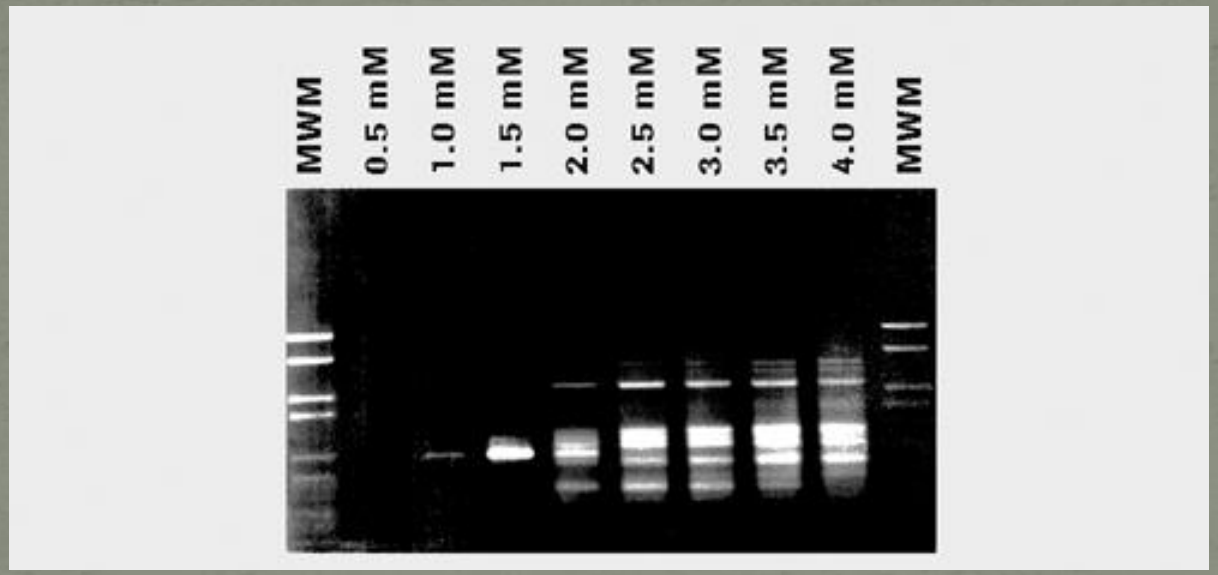
- ***Βελτιστοποίηση Ευαισθησίας/Ειδικότητας:***
  - Συγκέντρωση ιόντων Mg^{2+} (1.5-2.5mM)
  - Αριθμός κύκλων (25-50) (Κλειστό, «πεπερασμένο» σύστημα η κάθε αντίδραση)
  - Συγκέντρωση θερμοάντοχου ενζύμου Taq πολυμεράση (1.5-3u ανά δείγμα)
  - Συγκέντρωση DNA-στόχου
  - Καταπολέμηση Αναστολέων

  } *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

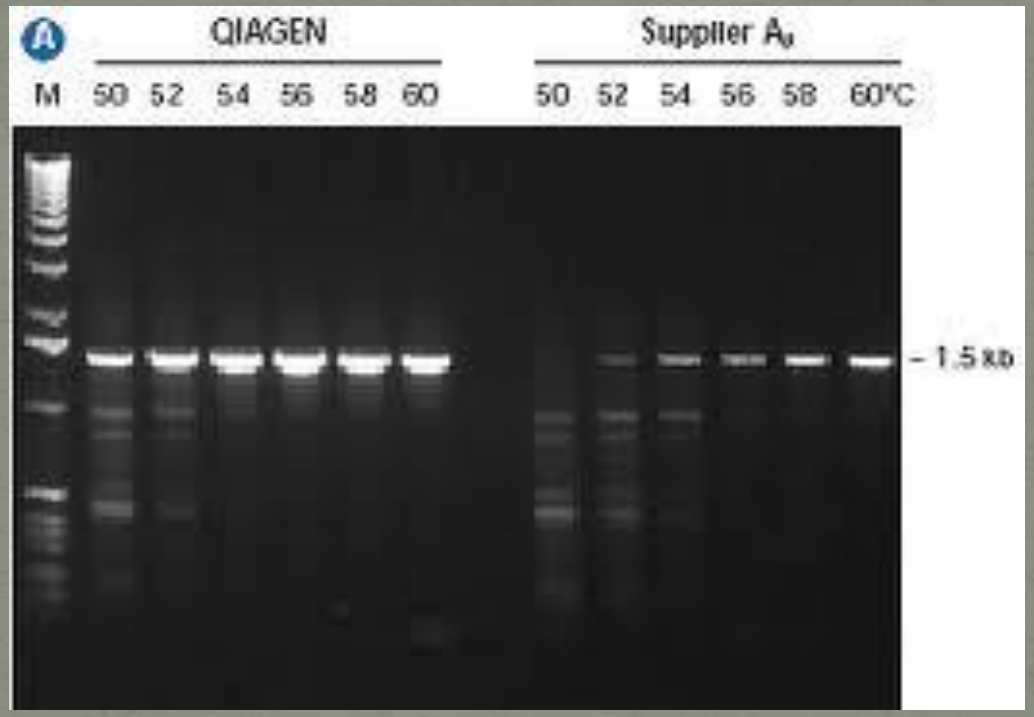
- ***Βελτιστοποίηση Ευαισθησίας/Ειδικότητας:***
  - ***Παράδειγμα:*** Συγκέντρωση ιόντων Mg^{2+} (1.5-2.5mM)



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

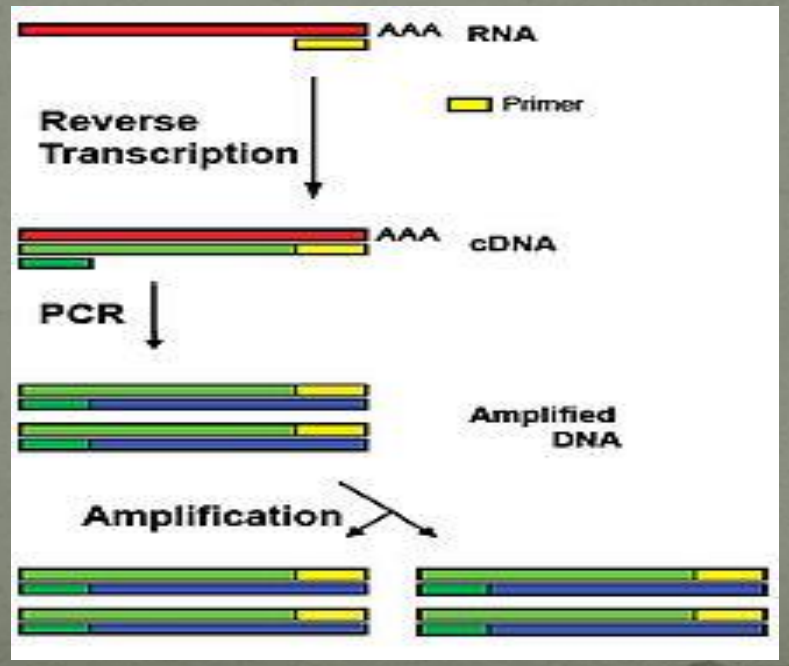
ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

- ***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

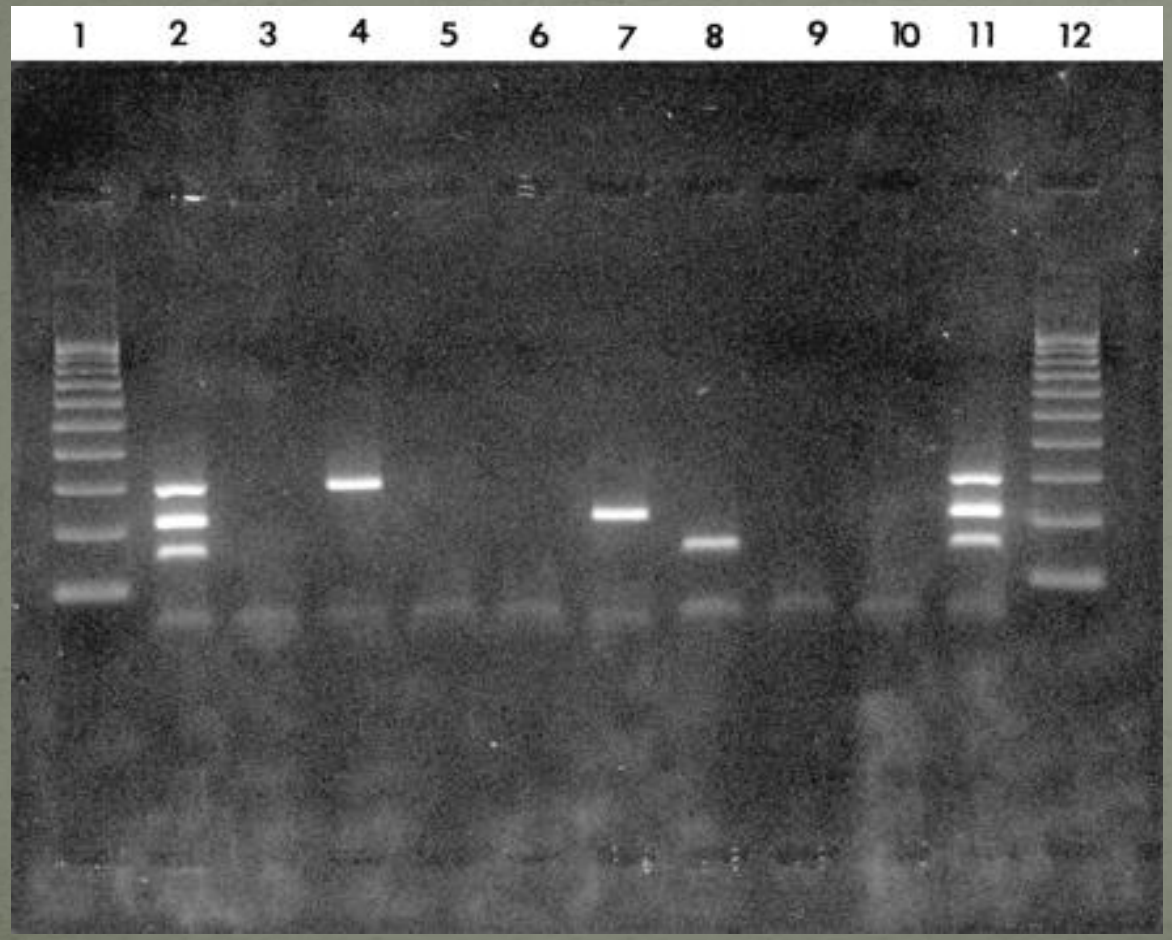
- **Αντίστροφη Μεταγραφή (Reverse Transcription) PCR (RT-PCR):**
  - Ανίχνευση **RNA**- και όχι DNA-στόχου
  - Προηγείται το στάδιο της **Αντίστροφης Μεταγραφής** για μετατροπή του RNA σε DNA (complementary – cDNA) για την επακόλουθη εφαρμογή της PCR
  - Ανίχνευση ιών με γενετικό υλικό RNA (π.χ. picorna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

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



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

Στήλες 1 και 12: Μάρτυρας ΜΒ.

Στήλες 2 και 11: HSV-1, VZV και EV.

Στήλες 3, 5, 6, 9 και 10: Αρνητικά.

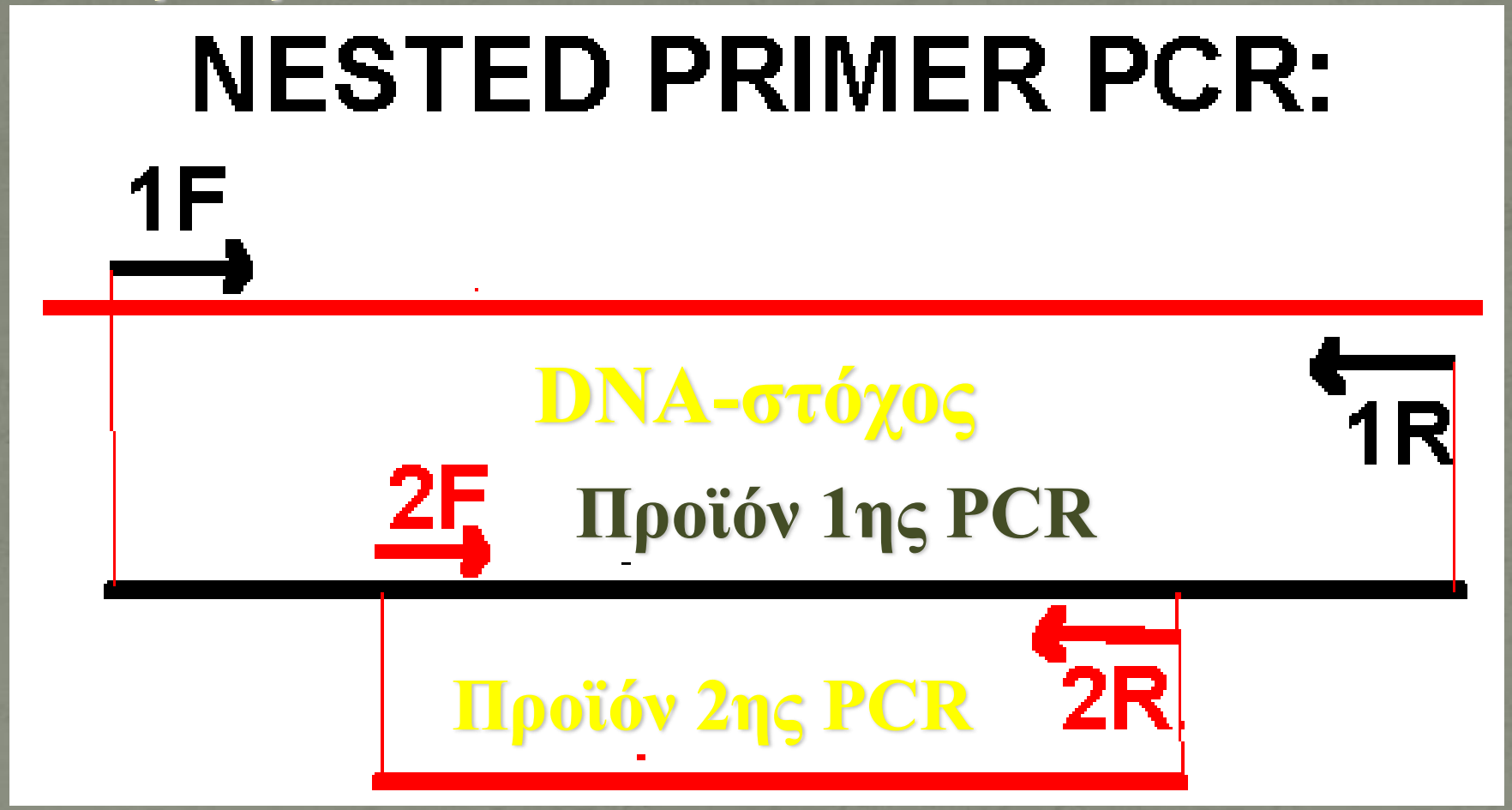
Στήλες 4, 7, 8: HSV-1 (στήλη 4), VZV (στήλη 7), και εντεροϊό (στήλη 8).

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:

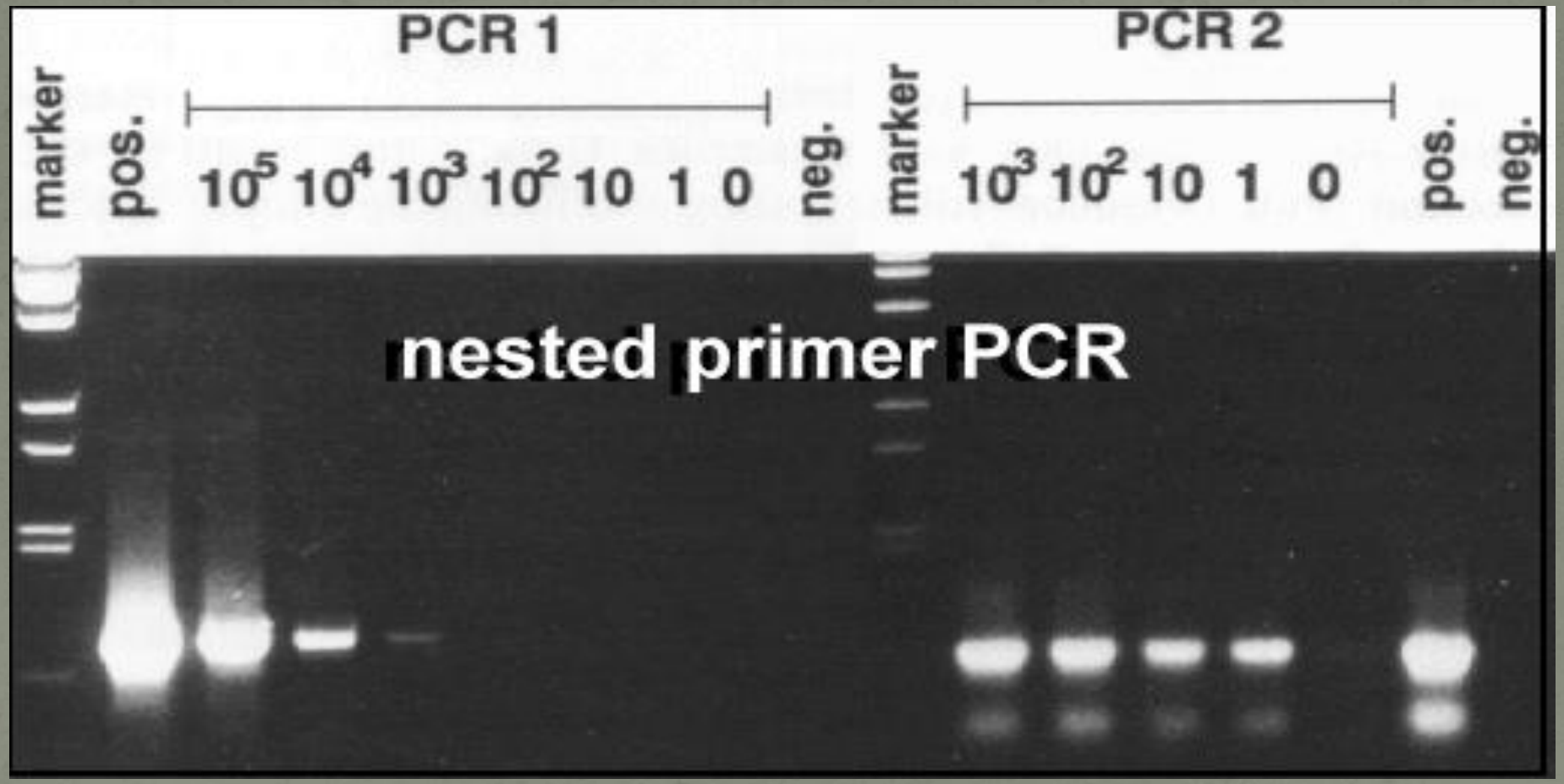


1F και 1R: Ζεύγος Εκκινητικών Μορίων 1ης PCR

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.

Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

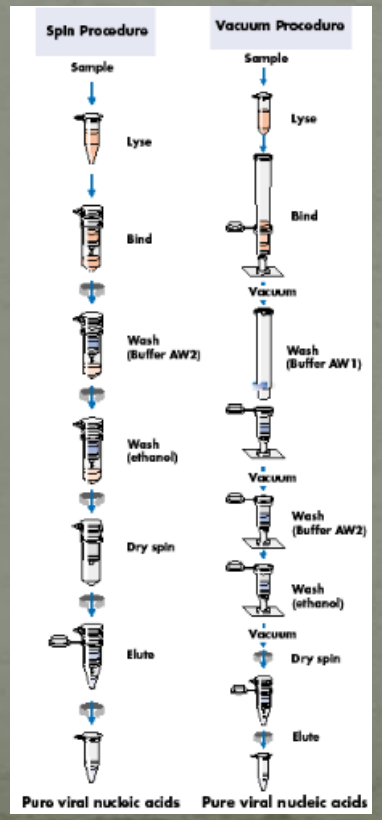
Αρχικά:

Μοριακές Μέθοδοι

- Εξειδικευμένες Γνώσεις
- Εκπαίδευση
- Χρονοβόρες

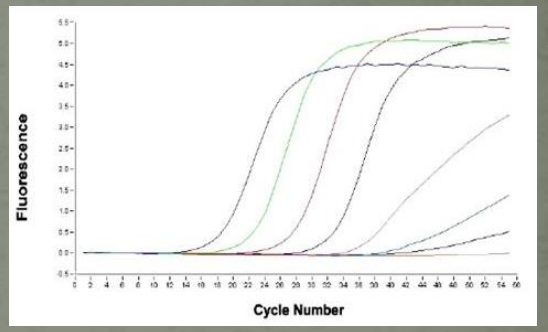
Κλινικό Δείγμα

Εκχύλιση Γεν. Υλικού



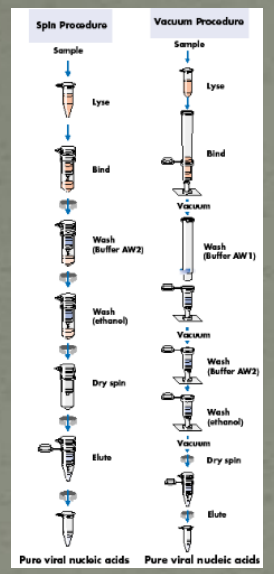
Εκτέλεση PCR

Αποτελέσματα και Ερμηνεία

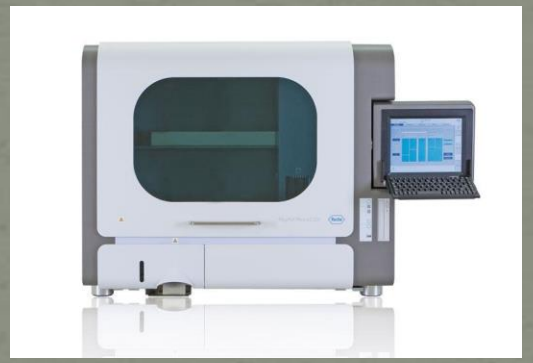


Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

- **Επόμενο Στάδιο Εξέλιξης:**



Χειροκίνητη Εκχύλιση Γεν. Υλικού



Αυτοματοποιημένη Εκχύλιση Γεν. Υλικού

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

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

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;***

↓

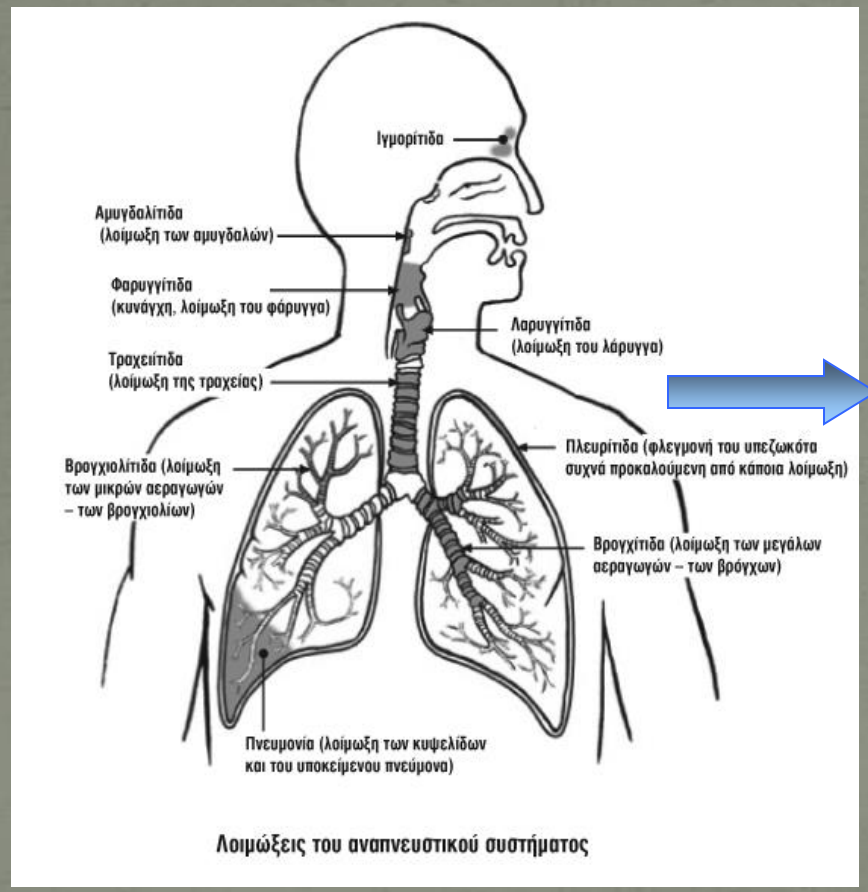
    - ***Αποτέλεσμα;***

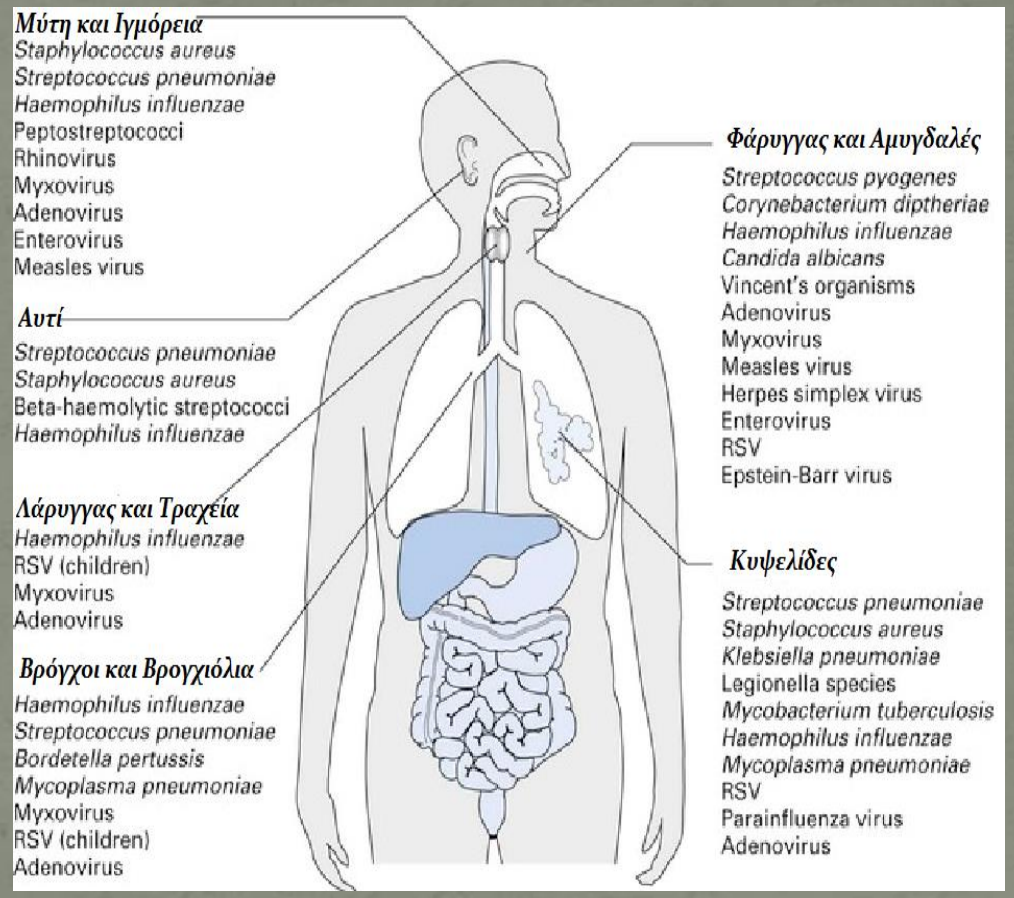
↓

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

Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ: ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

- *Λοιμώξεις Αναπνευστικού Συστήματος*

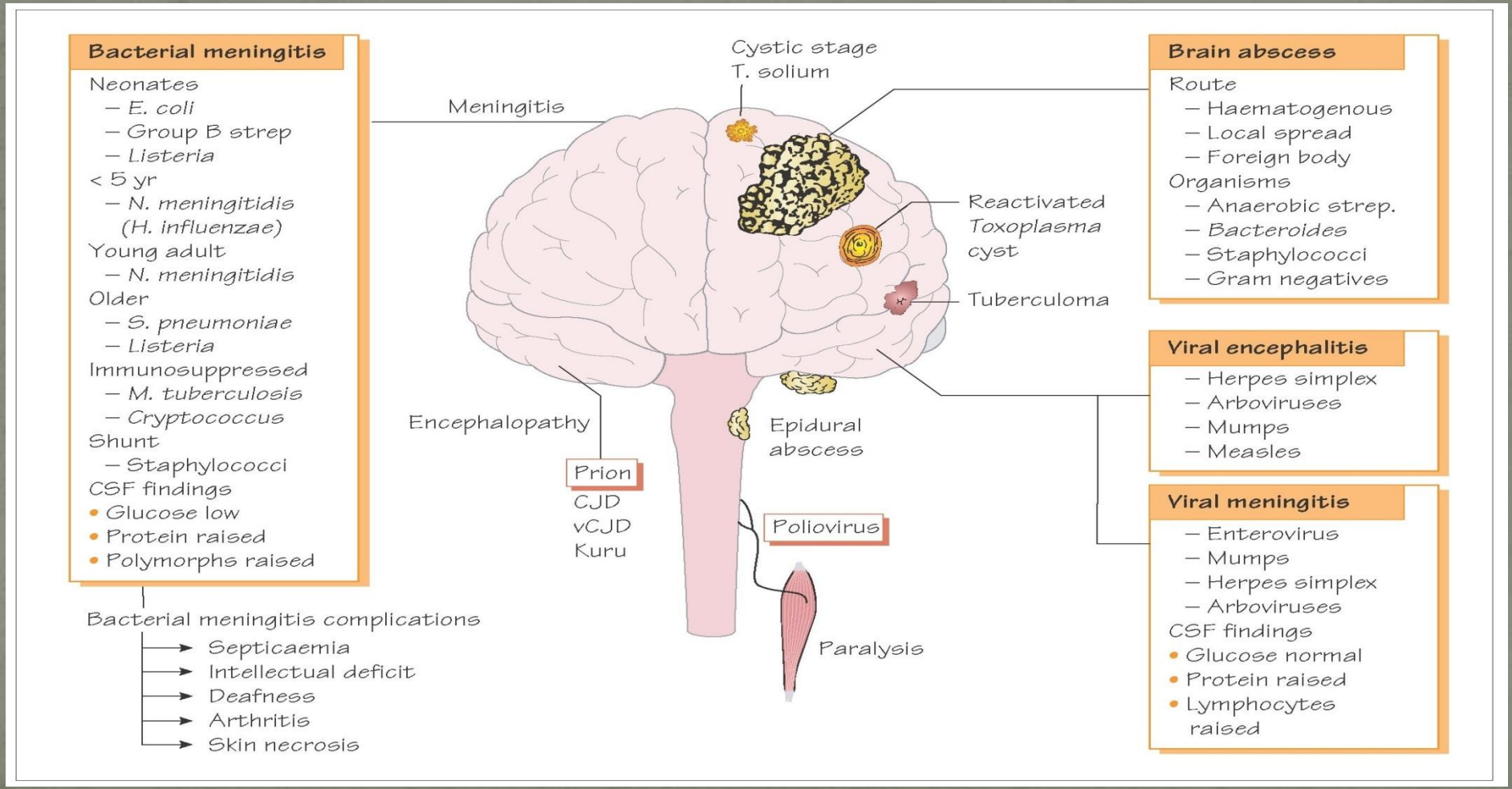




Ποιο Παθογόνο θα Αναζητήσουμε?

Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ: ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

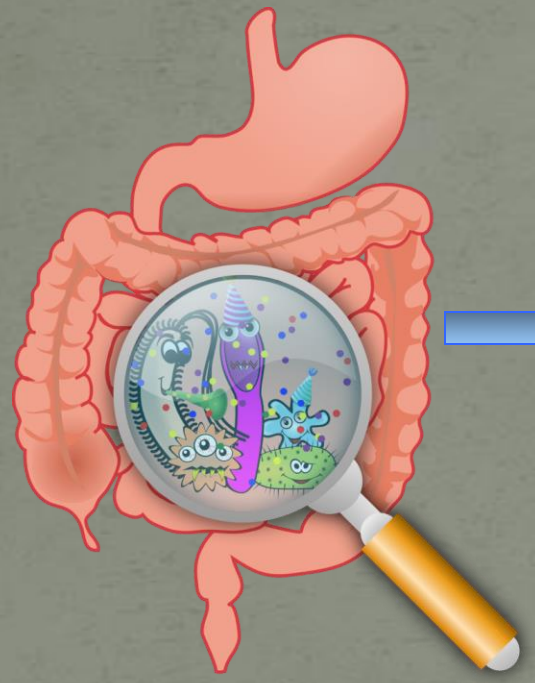
- ***Λοιμώξεις Κεντρικού Νευρικού Συστήματος***
  - Μηνιγγίτιδα, Εγκεφαλίτιδα, Μηνιγγοεγκεφαλίτιδα (Βακτήρια, Ιοί, Μύκητες, Παράσιτα)



Ποιο Παθογόνο θα Αναζητήσουμε?

Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ: ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

- *Λοιμώξεις Γαστρεντερικού Συστήματος*



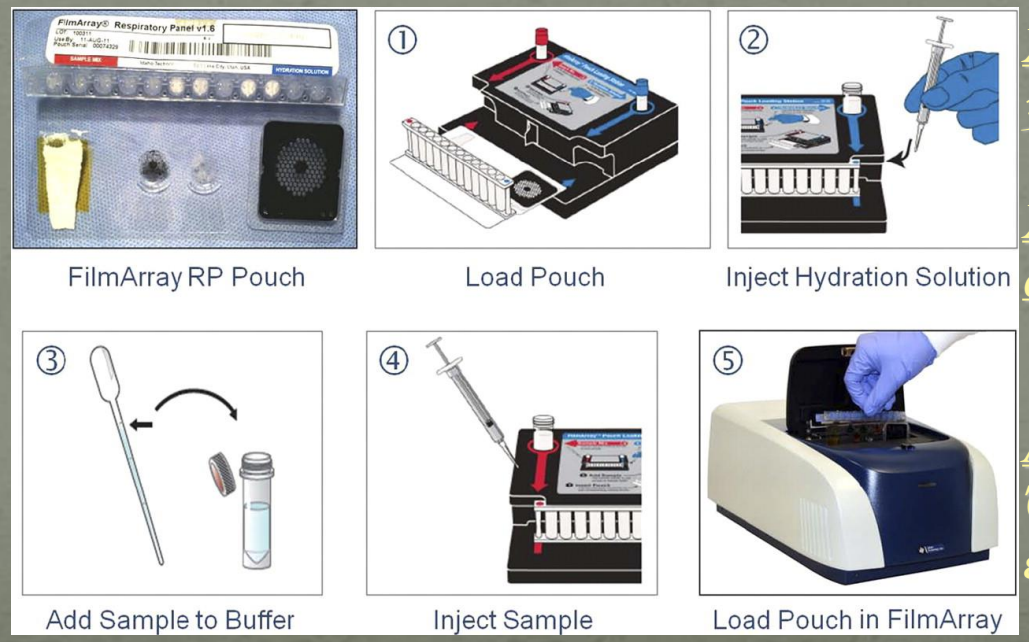
- Ιοί (70%)
  - Rotaviruses
  - Noroviruses
  - Enteric adenoviruses
  - Caliciviruses
  - Astroviruses
  - Enteroviruses
- Πρωτόζωα (<10%)
  - Cryptosporidium
  - *Giardia lamblia*
  - *Entamoeba histolytica*
- Βακτήρια (10-20%)
  - *Campylobacter jejuni*
  - Non-typhoid *Salmonella* spp
  - Enteropathogenic *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

- ***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



Χρόνος «hands-on»: 3-5min

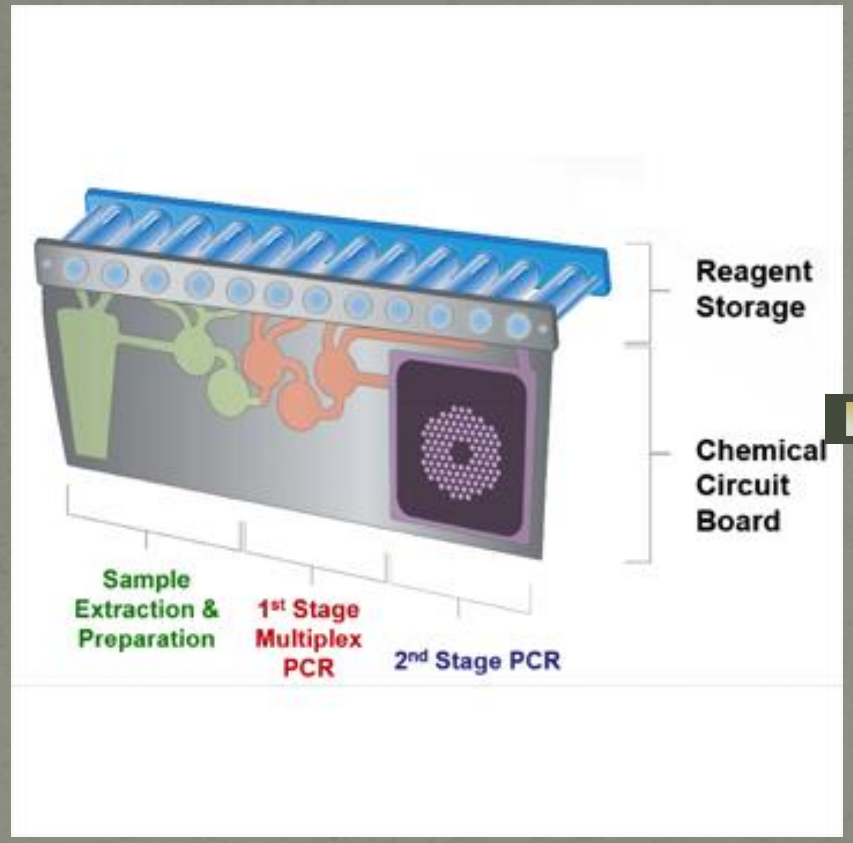
Χρόνος έως τη λήψη αποτελεσμάτων: 1:15'

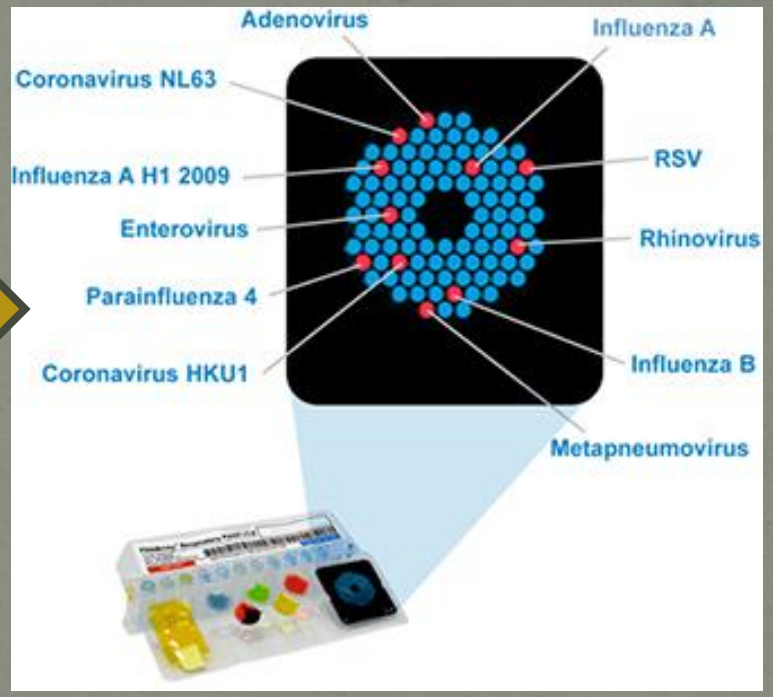
Απλή Διαδικασία: Όχι ειδικές γνώσεις – εργαλεία ακριβείας

Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ: ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

FilmArray

Συνδυασμός Πολυπλεκτικής Real Time PCR & Μικροσυστοιχιών





Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ: ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

FilmArray

4 Κατηγορίες Εξετάσεων:

Λοιμώξεις Αναπνευστικού, Λοιμώξεις ΚΝΣ, Λοιμώξεις Γαστρεντερικού & Αιμοκαλλιέργειες

FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel

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

Bacteria

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

Viruses

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

Fungi

Cryptococcus neoformans/gattii

FilmArray® Gastrointestinal Panel

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

Bacteria

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

Συνδρομική Διάγνωση: Η συνεισφορά της

Συνδρομική Διάγνωση

Ο Ασθενής στο Επίκεντρο

Ανίχνευση Πολλών Διαφορετικών Παθογόνων

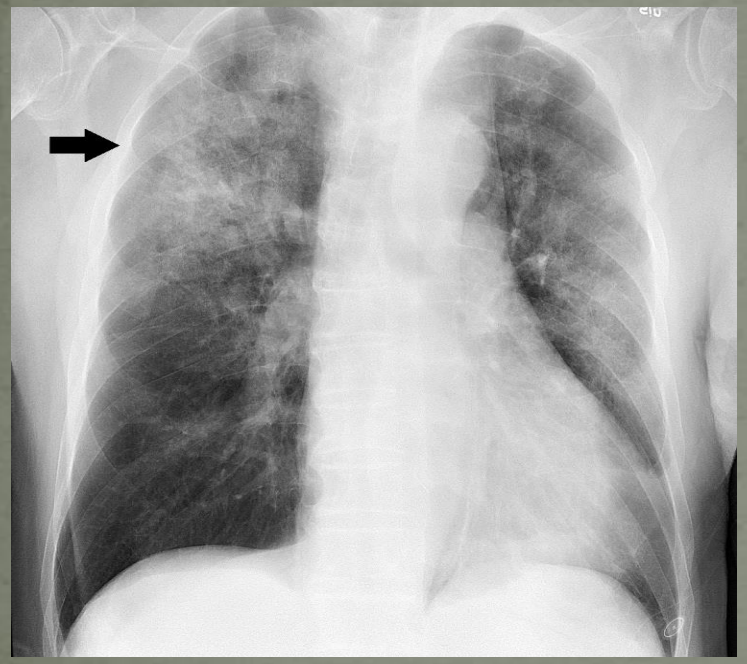
Ευχρηστία

Ταχύτητα Λήψης Αποτελεσμάτων

Βελτιωμένη Διαγνωστική Ακρίβεια

Ανίχνευση Συλλοιμώξεων του Αναπνευστικού

Κλινικό Περιστατικό 1



Η/νία:

- 18/3/2020, 19:50μμ

Τόπος:

- Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών, ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»

Δημογραφικά Στοιχεία Ασθενή:

- Άρρεν, 52 ετών, κάτοικος Γέρακα, Αθήνα

Ιστορικό, Κλινικά Συμπτώματα & Ενδείξεις:

- Πυρετός 39,5°C, βήχας, κόπωση, δύσπνοια, μυαλγίες
- Χωρίς ιστορικό καπνίσματος και χρόνιων παθήσεων

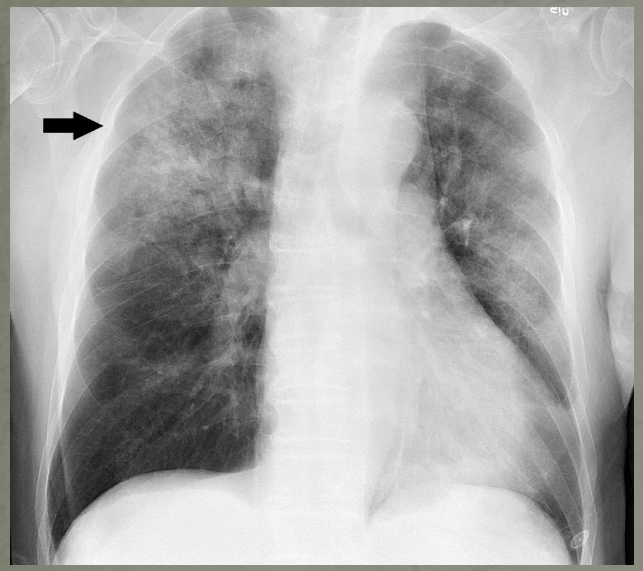
Έκβαση:

- Ίαση μετά από νοσηλεία 11 ημερών στο νοσοκομείο

Διαγνωστικές Εξετάσεις:

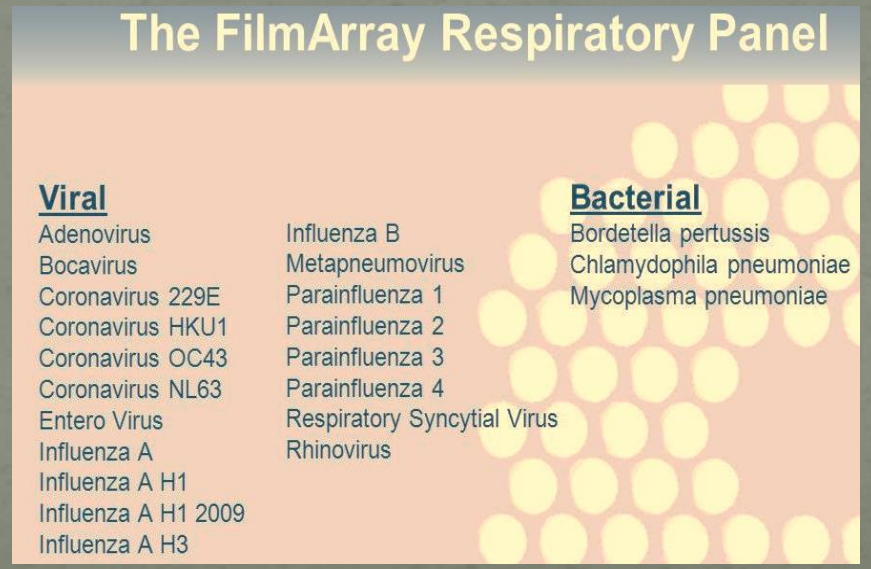
- <u>Ακτινολογικές Εξετάσεις:</u>
  - ✓ Διήθηση στους κάτω λοβούς των πνευμόνων με χαρακτηριστική εικόνα ιογενούς πνευμονίας
- <u>Αιματολογικές Εξετάσεις:</u>
  - ✓ Ελαφρά αύξηση των λευκών αιμοσφαιρίων και ουδετερόφιλων.
- <u>Βιοχημικές Εξετάσεις:</u>
  - ✓ Υψηλή CRP (C-reactive protein)
  - ✓ Αυξημένα επίπεδα D-dimers

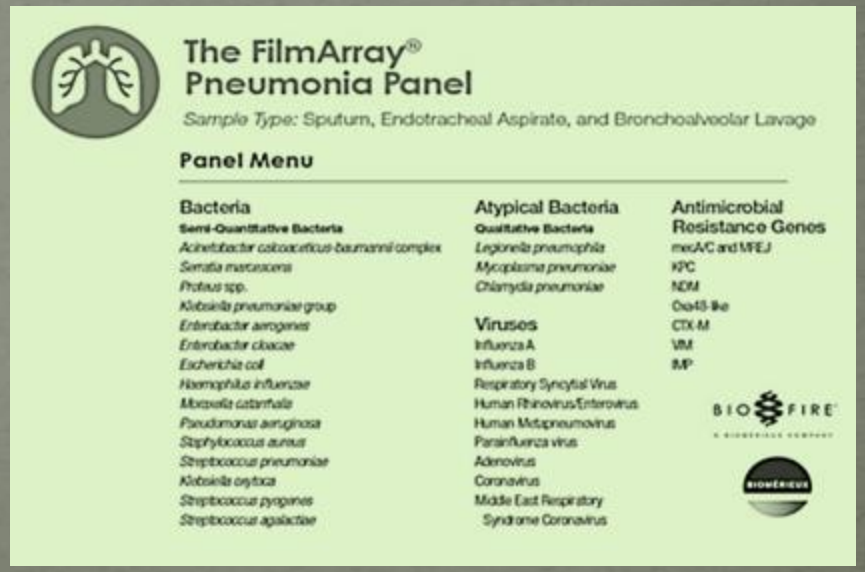
Κλινικό Περιστατικό 1



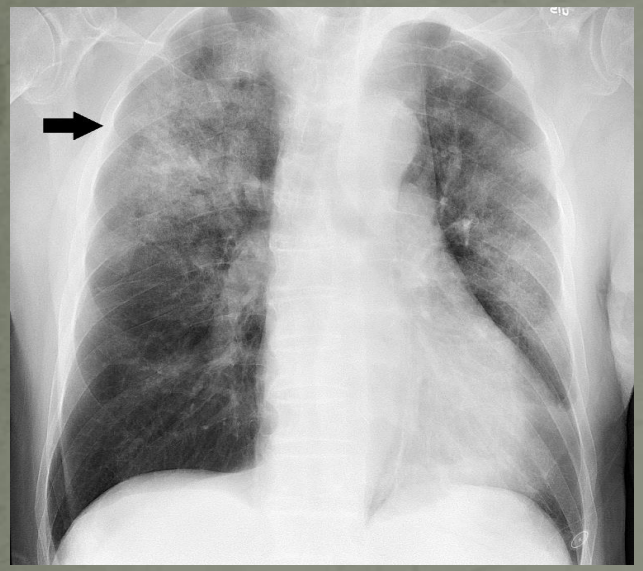
Μικροβιολογικές Εξετάσεις:

- <u>Δοκιμασίες Ανοσοχρωματογραφίας:</u>
  - ✓ Γρίππη Α + Β ⇨ Αρνητικό
- <u>Μοριακές Εξετάσεις:</u>
  - ✓ ***Ρινοφαρυγγικό Επίχρισμα***, BioFire Filmarray Ανωτέρου Αναπνευστικού: ⇨ ***<u>Αρνητικό</u>***
  - ✓ ***Βρογχοκυψελιδικό Έκπλυμα***, BioFire Filmarray Κατωτέρου Αναπνευστικού: ⇨ ***<u>Αρνητικό</u>***





Κλινικό Περιστατικό 1



ΤΙ ΣΥΜΒΑΙΝΕΙ?

Μήπως κάτι ή κάποια από τα παρακάτω:

1. Δεν υπάρχει ***Λοιμώδης Παράγοντας***
2. ***Ψευδώς Αρνητικά Αποτελέσματα***: Να επαναληφθεί η Μοριακή Συνδρομική Μέθοδος
3. Το ***Λοιμώδες Αίτιο*** δεν υπάρχει στη λίστα των παθογόνων που ανιχνεύει η Συνδρομική Μέθοδος
4. Λοίμωξη με διαλείπον ιικό φορτίο που δεν είναι πάντα ανιχνεύσιμο, να σταλεί 2ο δείγμα

Σωστή Απάντηση: **3**

Κλινικό Περιστατικό 1

Έχουμε Ανίχνευση Ιού?

ΝΑΙ!

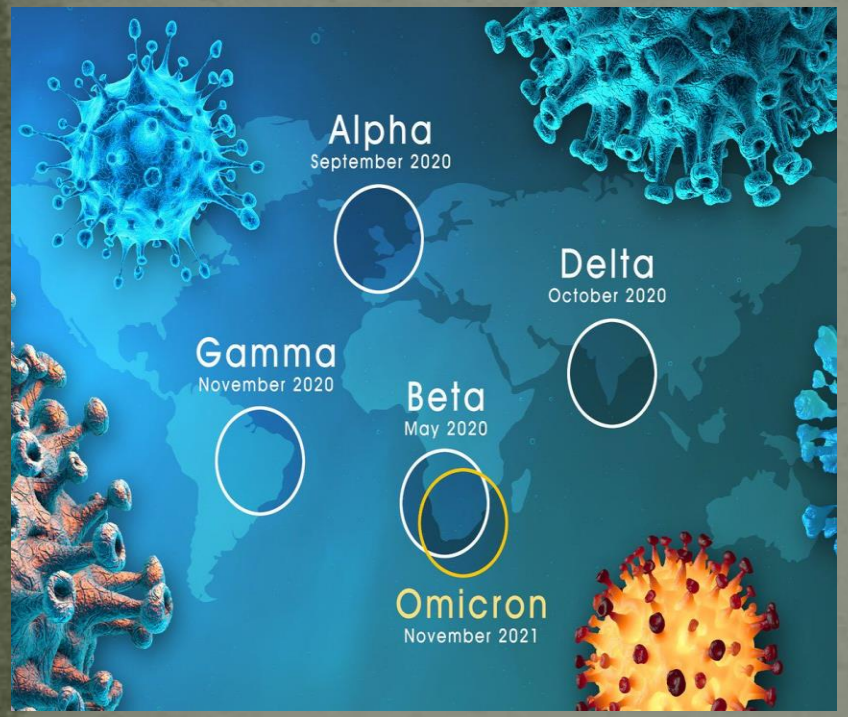
Μικροβιολογικές Εξετάσεις:

- Μοριακές Εξετάσεις:
  - ✓ ***Ρινοφαρυγγικό Επίχρισμα***, PCR ειδική για SARS-CoV-2: ⇨ ***Θετικό****

	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	777,518,838
Θάνατοι	858	774	7,090,763
Θνητότητα	37%	9.2%	1-2%

*Θα μπορούσε να είναι και άλλος ιός εκτός του ρεπερτορίου του Αναπνευστικού Filmarray (Πολλοί Εντεροϊοί, Hantavirus, ερπητοϊοί, Ιλαρά, Παρωτίτιδα, κ.λ.π.)

Κλινικό Περιστατικό 1



Δύο Κύρια Διδάγματα

Υπάρχουσα Συνδρομική Διάγνωση

ΠΕΠΕΡΑΣΜΕΝΕΣ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΕΣ (Μικρός Αριθμός Παθογόνων)

ΑΔΥΝΑΜΙΑ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΤΗΝ *ΑΝΑΔΥΣΗ* ΝΕΩΝ ΕΠΙΔΗΜΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ*

**Απαιτεί χρόνο η ενσωμάτωση της σχετικής εξέτασης στη Συνδρομική Διάγνωση*

Κλινικό Περιστατικό 2

Η/νία:

- 22/5/2022,9:20πμ

Τόπος:

- Εργαζόμενος, ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»

Δημογραφικά Στοιχεία Ασθενή:

- Θήλυ, 52 ετών, κάτοικος Περιστερίου, Αθήνα

Ιστορικό, Κλινικά Συμπτώματα & Ενδείξεις:

- Κοινό κρυολόγημα ο ίδιος και η 4χρονη κόρη της με πυρετό έως 39°C, καταρροή, κόπωση, **'Εντονος Πονοκέφαλος**.
- Σποραδικό κάπνισμα, χωρίς χρόνιες παθήσεις

Έκβαση:

- Επιμονή συμπτωμάτων για πάνω από μία εβδομάδα, πλήρης ίαση

Διαγνωστικές Εξετάσεις:

- Μοριακές Εξετάσεις:
  - ✓ ***Ρινοφαρυγγικό Επίχρισμα***, BioFire Filmarray Ανωτέρου Αναπνευστικού: ⇨ ***Θετικό, Rhinovirus-Enterovirus***

Κλινικό Περιστατικό 2

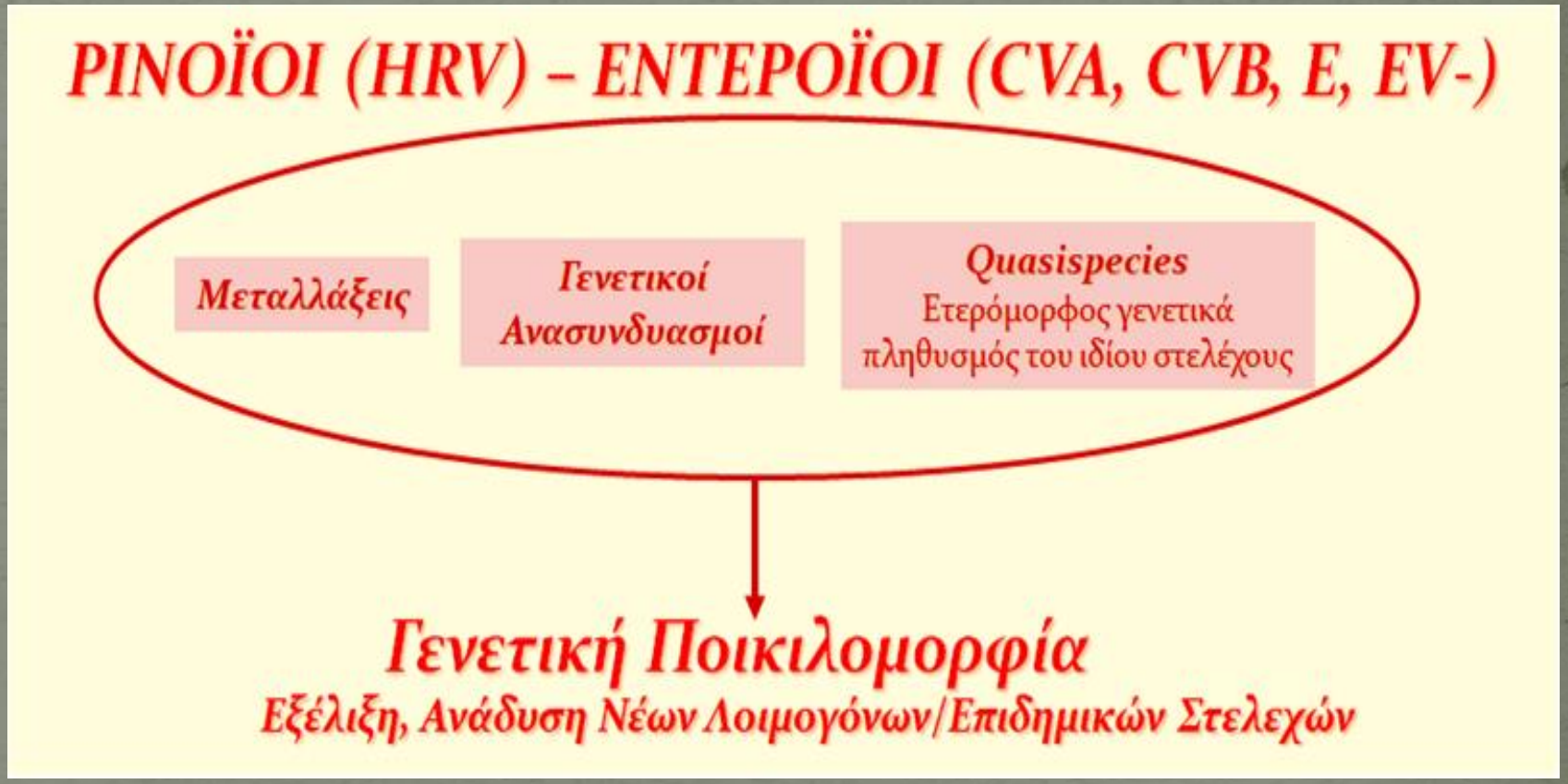
ΤΕΛΕΙΩΣΕ Η ΕΞΕΤΑΣΗ?

1. Θέλει περαιτέρω διερεύνηση
2. Πολύ απλό περιστατικό, ήπια συμπτώματα και άριστη έκβαση για τους ασθενείς, δε θέλει καμία άλλη ενασχόληση
3. Μήπως υπάρχει συλλοίμωξη με ιό που δεν υπάρχει στο πάνελ της εξέτασης?
4. Οι ρινοϊοί προκαλούν ενίοτε και αυτοί λοίμωξη του κατωτέρου αναπνευστικού και έχουν συνδεθεί με το ***Άσθμα***

Σωστή Απάντηση: ***1, Γιατί???***

Κλινικό Περιστατικό 2

Οι υπάρχουσες πλατφόρμες Συνδρομικής Διάγνωσης δεν ξεχωρίζουν RV από EV



Κλινικό Περιστατικό 2

Περαιτέρω Διαγνωστικές Εξετάσεις:

- Μοριακές Εξετάσεις:

1. Εξειδικευμένη ανίχνευση εντεροϊών με in-House, One-Step Real Time RT-PCR με Στόχο → 5΄-UTR: ⇨ **Θετικό**

Άρα το στέλεχος είναι Εντεροϊός και όχι Ρινοϊός!
Ποιος Εντεροϊός?

2. Μοριακός Προσδιορισμός Οροτύπου Θετικού Δείγματος με:
   a) Nested RT-PCR με Γονίδιο-Στόχο 1D → VP1 Καψιδική Πρωτεΐνη
   b) Αλληλούχηση του Γονιδίου για τη VP1
   c) Βιοπληροφορική

Αποτέλεσμα: **EV-D68**

1η Καταγραφή στην Ελλάδα

Κλινικό Περιστατικό 2

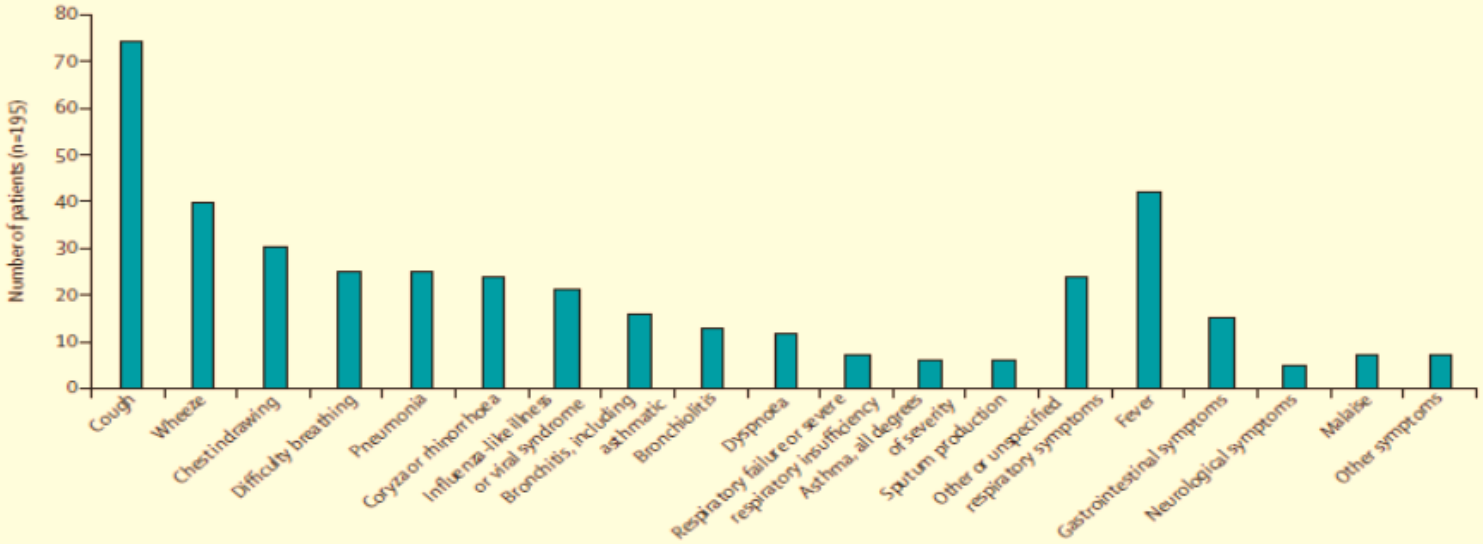
EV-D68: Ο «ΠΟΛΙΟΪΟΣ» ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ

- ***Ανακάλυψη:***
  - ✓ 1962 (Καλιφόρνια)
- ***Κλινικές Εκδηλώσεις - Επιδημιολογία:***
  - ✓ Έως 2014: Σποραδικά περιστατικά (699)
  - ✓ <u>Αύγουστος 2014</u>: Αυξημένος Αριθμός Κρουσμάτων με Οξεία Λοίμωξη Κατωτέρου Αναπνευστικού αρχικά στις ΗΠΑ

Κλινικό Περιστατικό 2

EV-D68: Ο «ΠΟΛΙΟΪΟΣ» ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ

- ***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)

Κλινικό Περιστατικό 2

- ***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»

Κλινικό Περιστατικό 2

EV-D68: Ο «ΠΟΛΙΟΪΟΣ» ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ

Αύξηση Επιπολασμού → *Κίνδυνος για Σοβαρή Αναπνευστική Νόσο και Νευρολογικές Επιπλοκές*

Αναδυόμενο Παθογόνο, ή Περιστασιακή Επιδημία → ***ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΟ ΠΑΘΟΓΟΝΟ***

ΑΝΑΓΚΗ ΓΙ Α ΚΑΛΥΤΕΡΗ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΤΟ ΕΝΔΟΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΑ

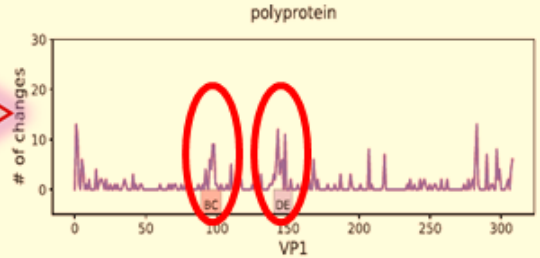
Κλινικό Περιστατικό 2

EV-D68: Ο «ΠΟΛΙΟΪΟΣ» ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ

Φυσική Επιλογή - Διαφυγή από Ανοσοποιητικό

Μεταλλάξεις στη VP1 - Νέα Λοιμογόνα Στελέχη, Επιδημία

Γενετική Ποικιλομορφία στις Νουκλεοτιδικές Αλληλουχίες Στελεχών EV-D68 στον ίδιο Ασθενή ***(Quasispecies)***



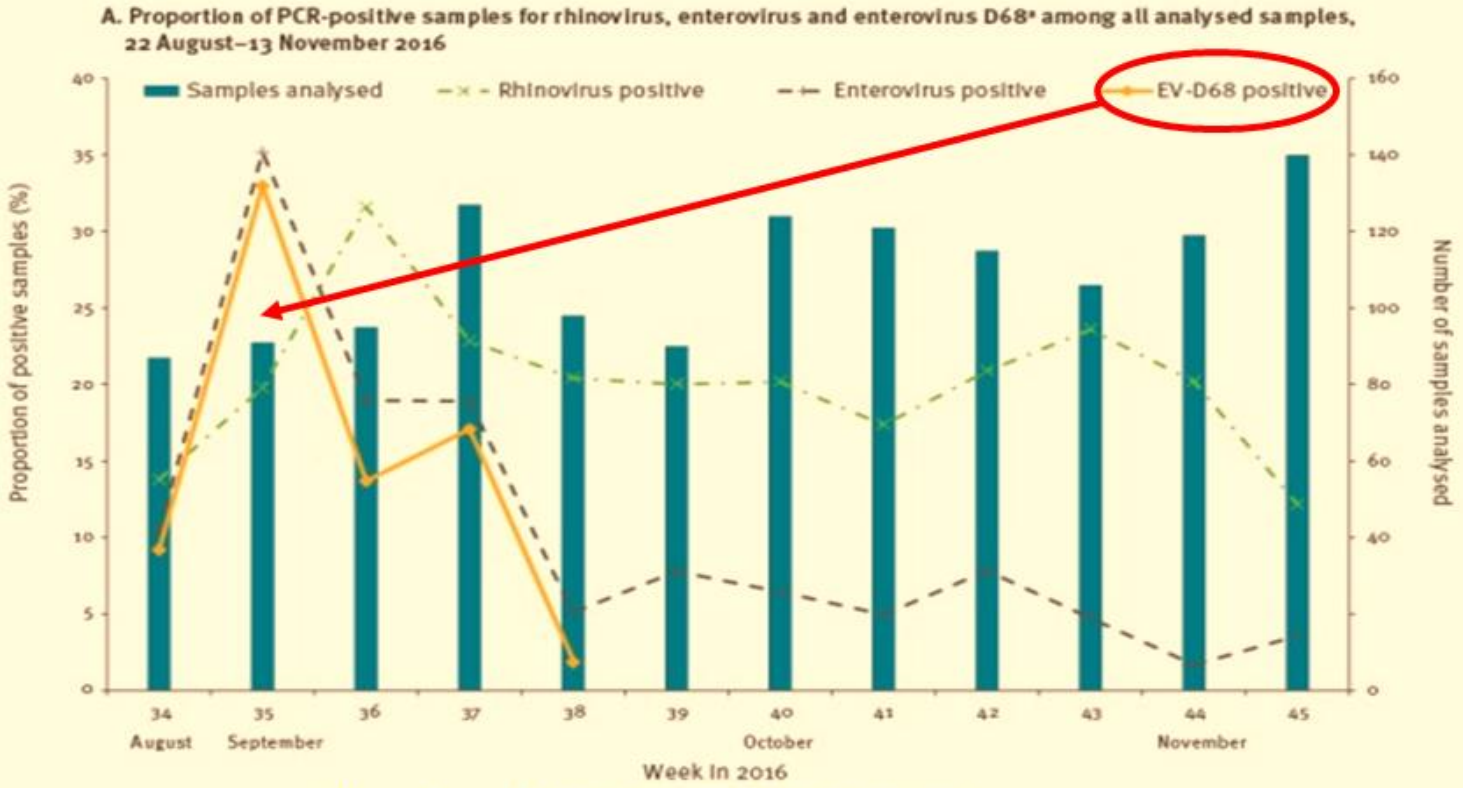
Ποικιλομορφία στην Αλληλουχία Αμινοξέων στη VP1 στελεχών EV-D68 σε διαφορετικούς ασθενείς

(Κυρίως ***BC-DE θηλιές, Αντιγονικά Σημεία****)*

(Virus Evolution, 2019, 5(1): vez007)

Κλινικό Περιστατικό 2

EV-D68: Ο «ΠΟΛΙΟΪΟΣ» ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ



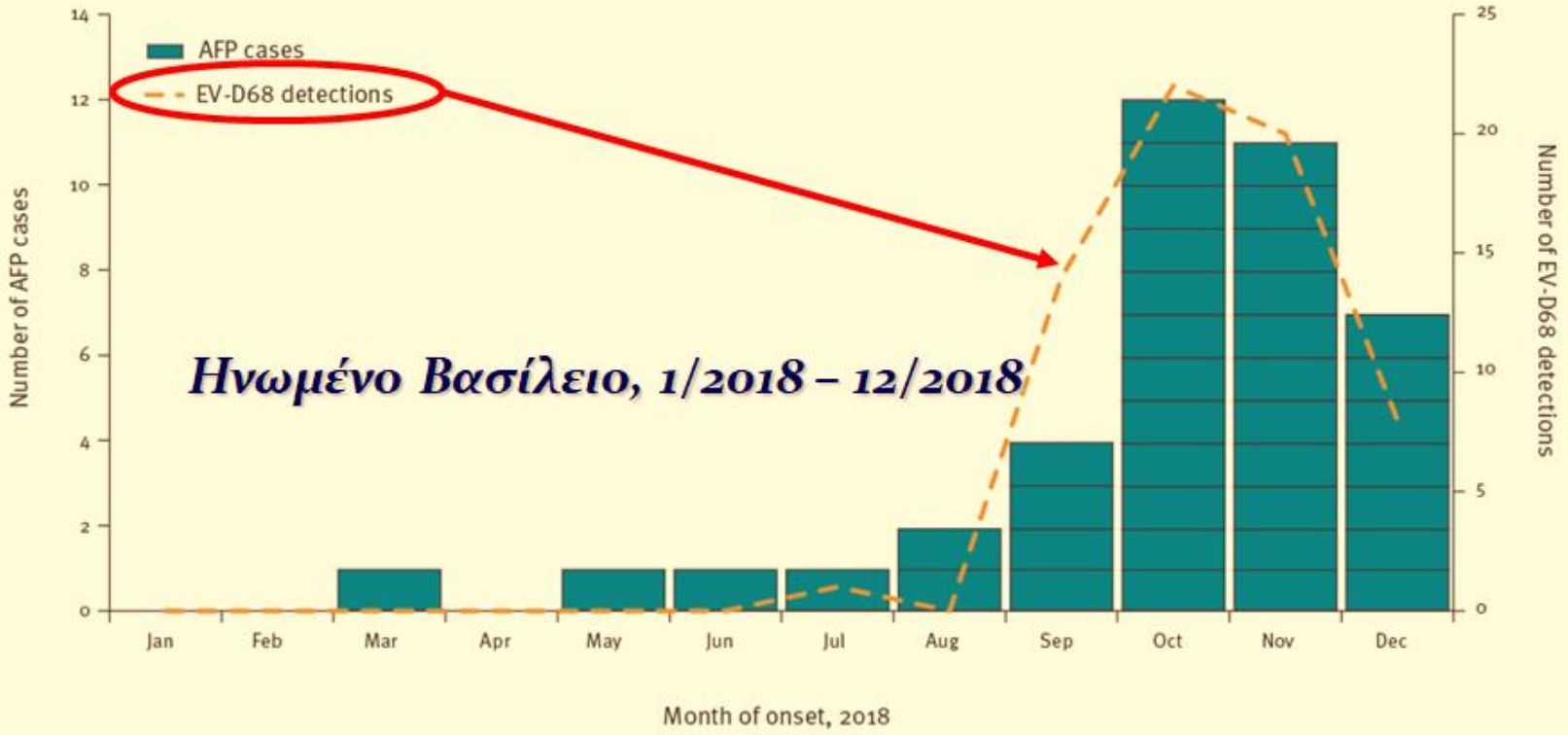
(Euro Surveill. 2016 Nov 17; 21(46): 30403)

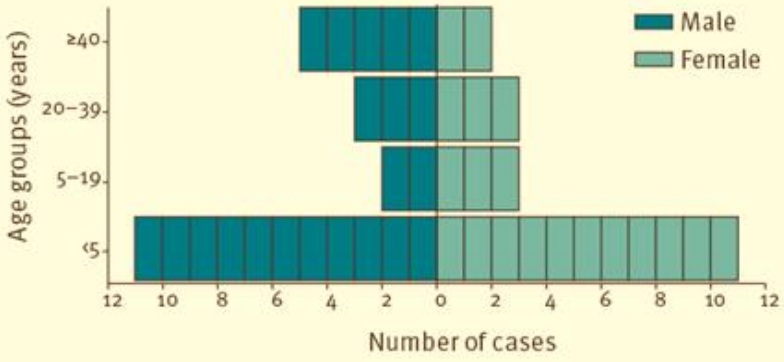
Στοκχόλμη, 8/2016 – 9/2016

- **74/495 Δείγματα Αναπνευστικού → EV-D68 (+)**
  - **44 παιδιά <5 ετών**
  - **10 Ασθενείς → Υποκείμενη Νόσος, Σοβαρές Αναπνευστικές/Νευρολογικές Επιπλοκές (1 Θάνατος)**

Κλινικό Περιστατικό 2

EV-D68: Ο «ΠΟΛΙΟΪΟΣ» ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ





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

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

Τελικά μία Λοίμωξη που δεν αφορά ΜΟΝΟ ένα Σύστημα!!!

Κλινικό Περιστατικό 2*

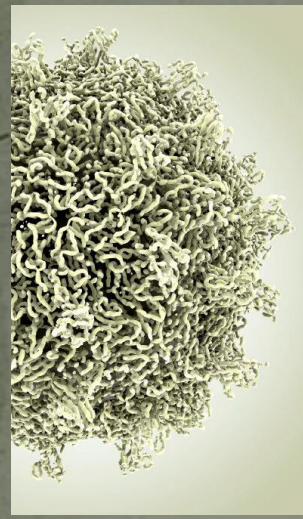
- **Παράδειγμα EV-D68 → Νέα Δεδομένα! Προσθήκη Δείγματος Αναπνευστικού στη Διάγνωση Λοίμωξης ΚΝΣ**

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.

Κλινικό Περιστατικό 2



Enterovirus D68

Δύο Κύρια Διδάγματα

Υπάρχουσα Συνδρομική Διάγνωση

ΑΔΥΝΑΜΙΑ ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΗΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΠΛΗΡΗ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΒΛΕΠΟΥΜΕ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΕΝΑ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΜΟΝΟ (π.χ. Νευρολογικές Επιπλοκές Αναπνευστικού EV-D68)

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

Ανακαλύπτουμε συνέχεια νέους ιούς με αντίστοιχο λοιμογόνο δυναμικό με τον EV-D68:

ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΟΣ ΙΟΣ(?) EV-C105

- ***Ανακάλυψη:***
  - 2010 (Περού, Δημοκρατία Κονγκό)
- ***Κλινικές Εκδηλώσεις - Επιδημιολογία:***
  - *Φάσμα Κλινικών Εκδηλώσεων*: Άγνωστο
  - *Οξεία Χαλαρή Παράλυση:* 2 Περιστατικά (2010 Κονγκό – 2014 ΗΠΑ, κατά τη διάρκεια της επιδημίας EV-D68)
  - *Περισσότερα περιστατικά:* Λοιμώξεις Αναπνευστικού
  - *Περιστατικό ΗΠΑ 2014*: → ***Κορίτσι 6 ετών με AFP*** → ***Ανίχνευση σε Ρινοφαρυγγικό Επίχρισμα*** → ***Κόπρανα – ΕΝΥ: Αρνητικά***
- ***Σημεία Προσοχής:***
  - *Ίδιο Σενάριο με EV-D68?*
    - Λοιμώξεις Αναπνευστικού → ***Ευκολία Μετάδοσης?***
  - *Σημαντικές Διαφορές στη «Σταθερή» 5΄-UTR από άλλους εντεροϊούς*
    - ***Λοιμογόνο Δυναμικό – Δυσκολία Ανίχνευσης?***

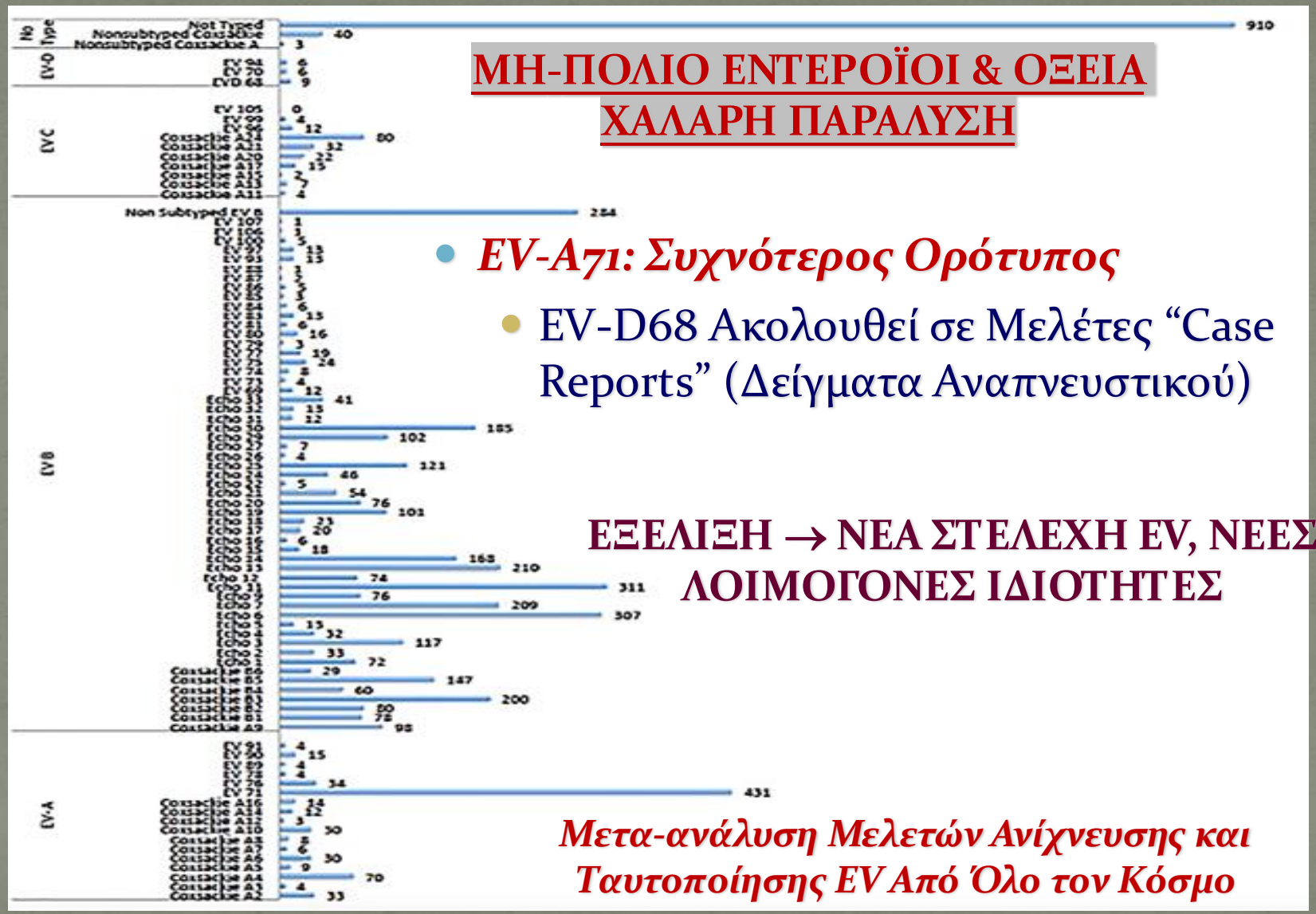
Π.χ., το θέμα των EV

ΚΑΙ ΔΕΝ ΜΠΟΡΟΥΜΕ ΝΑ ΓΝΩΡΙΖΟΥΜΕ ΤΙ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΑΝΑΔΥΘΕΙ ΣΤΟ ΜΕΛΛΟΝ….

(Στοχαστική Διαδικασία Φυσικής Επιλογής & Ανάδυσης ενός Επιδημικού, Λοιμογόνου Στελέχους)

ΔΕΝ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΜΑΣ ΒΟΗΘΗΣΕΙ Η ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΣΕ ΑΥΤΟ

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

A BRIEF HISTORY OF RESPIRATORY EVs

2024-2025:
Ongoing circulation of EV-D68 (clades A2, B3). Reports of CV-A16/CV-A24 in respiratory/extrapulmonary infections

2022-2023:
Post-COVID resurgence: EV-D68, EV-A71, CV-A24 detected in multiple continents

2015-2018:
Epidemic recurrence of multiple EVs (New EV-D68 outbreaks in Europe & US with AFM cases, **CV-A24** AHC with respiratory spread)

2014:
Major Outbreak in N. America/Europe EV-D68 recognized as a **serious respiratory + neurologic pathogen**

2010-2013:
EV-D68: An emerging pathogen

2010-2012:
Discovery of **EV-C104, EV-C105, EV-C109** in respiratory samples from Peru, Congo, USA, Europe. Later EV-C117, EV-C118 also identified.

Molecular Methods:
Indispensable Contribution to Resp. EV Diagnosis & Epidemiology

Syndromic Testing

RT-PCR in Diagnostics

NGS

1960s:
CV-A21 Discovery

1962:
HRV-87 Discovery

1970s-1980s:
Enteroviruses increasingly noted in respiratory infections but often misclassified as rhinoviruses.

1990s:
Reliable detection of respiratory EVs in clinical samples.

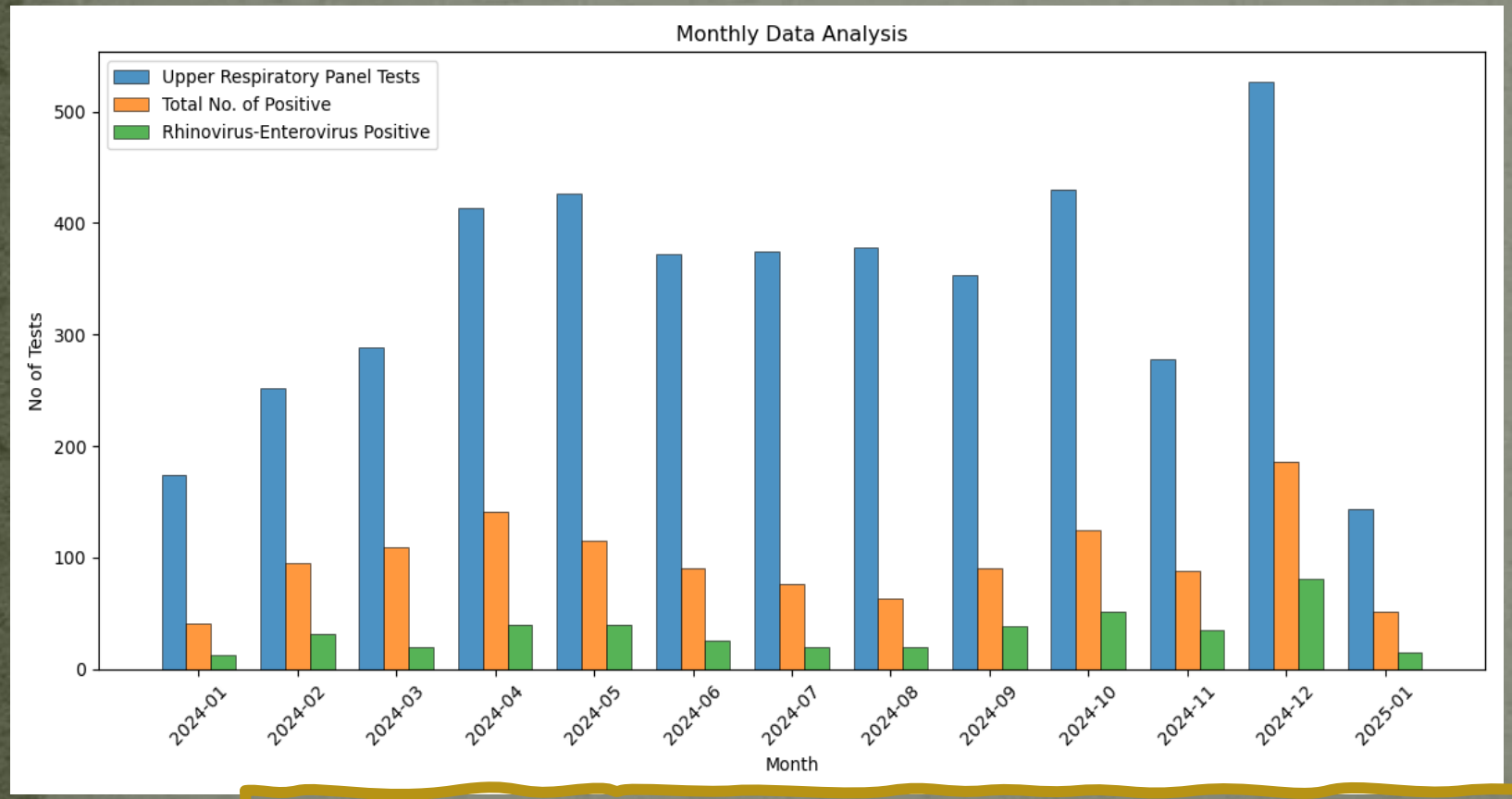
2002:
Classification of HRV-87 & EV-D68 as Unique Serotype with EV & RV features

2000-2005:
Expansion of respiratory EV spectrum (e.g. EV-A71, CV-A6, CV-A10)

2006-2009:
Sporadic Detection of EV-D68 in LRTI

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

- *Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας, ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ»:*

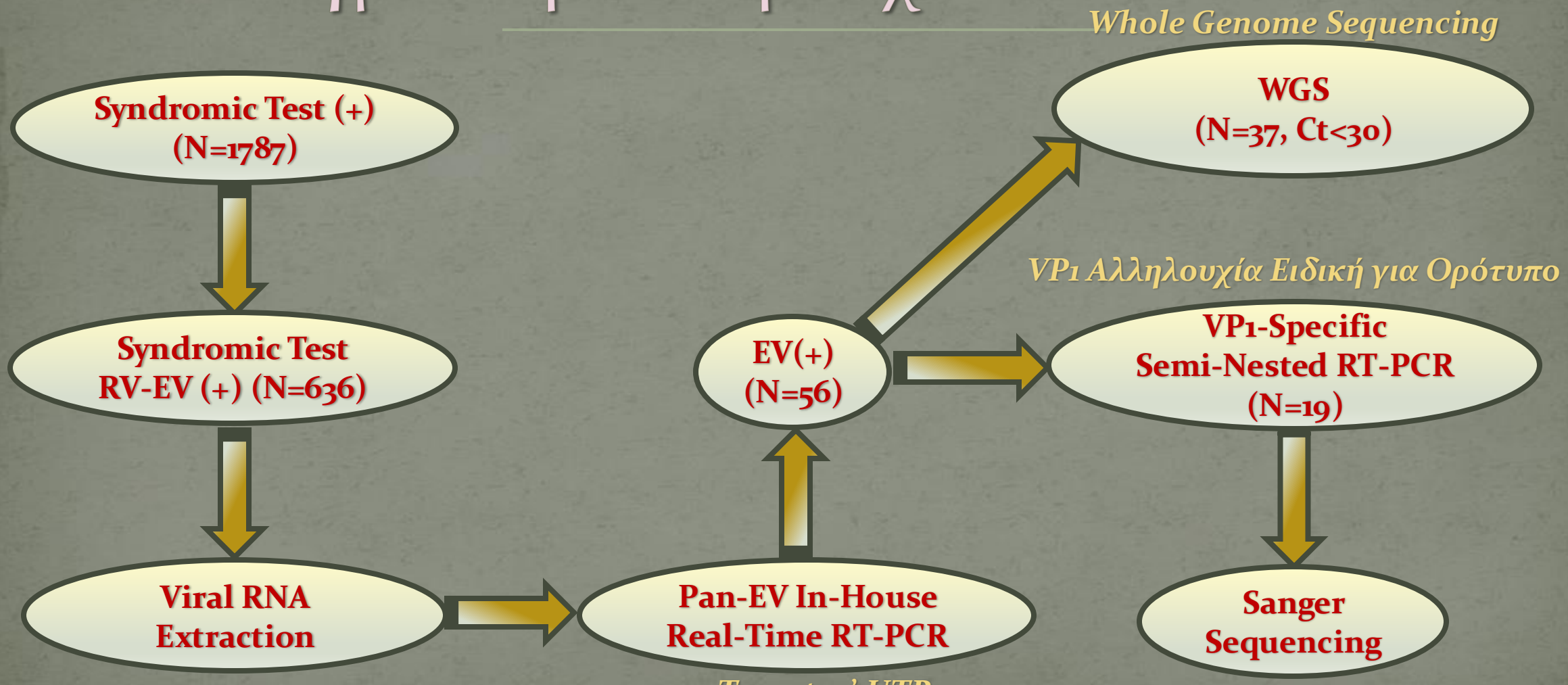


- *1/2024-1/2025:*
  - 3975 Εξετάσεις Συνδρομικής Διάγνωσης Ανωτέρου Αναπνευστικού
- *Συνολικός αριθμός Θετικών:*
  - 1787 (44,95%)
- *Αριθμός Θετικών για Ρινοϊό - Εντεροϊό:*
  - 636 (35,6% Θετικών)

Πόσα από αυτά είναι Αναδυόμενα Στελέχη Υψηλού Λοιμογόνου & Επιδημικού Δυναμικού?

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

Από το Δείγμα στην Αλληλουχία



Target: 5'-UTR

Γενικός Στόχος για Ανίχνευση Όλων των EV

Βιοπληροφορική Ανάλυση

NGS Assembly & Initial Identification: Illumina DRAGEN v4.4

→

Serotype Verification: BLASTn

→

Genotypic Characterisation: Enterovirus Genotyping Tool v0.1 Genome Detective Virus Tool v2.94

↓

Genetic Recombination Analysis: SimPlot++

←

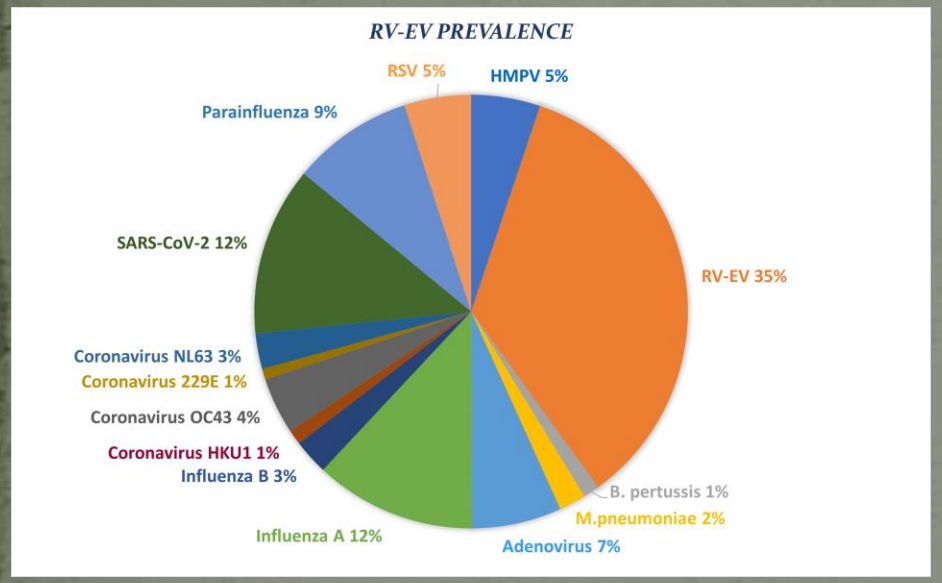
Phylogenetic Analysis

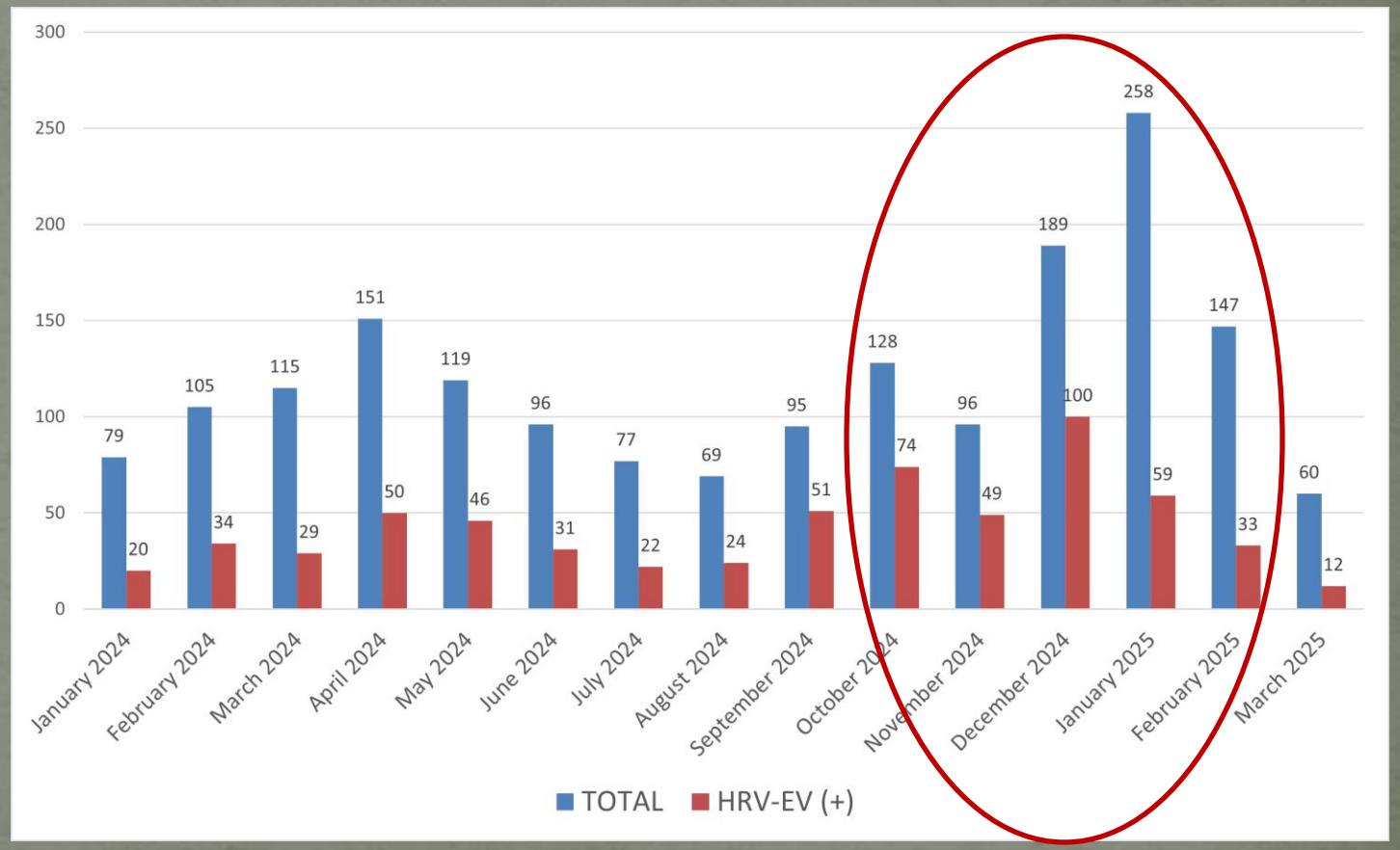
ML Trees: MEGAXI, IQ-TREE2 (Model Finder: TIM+R2), Visualization by iTOL v7,

Bayesian Time-Scaled Trees: BEAUTi/BEAST v10.5.0

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

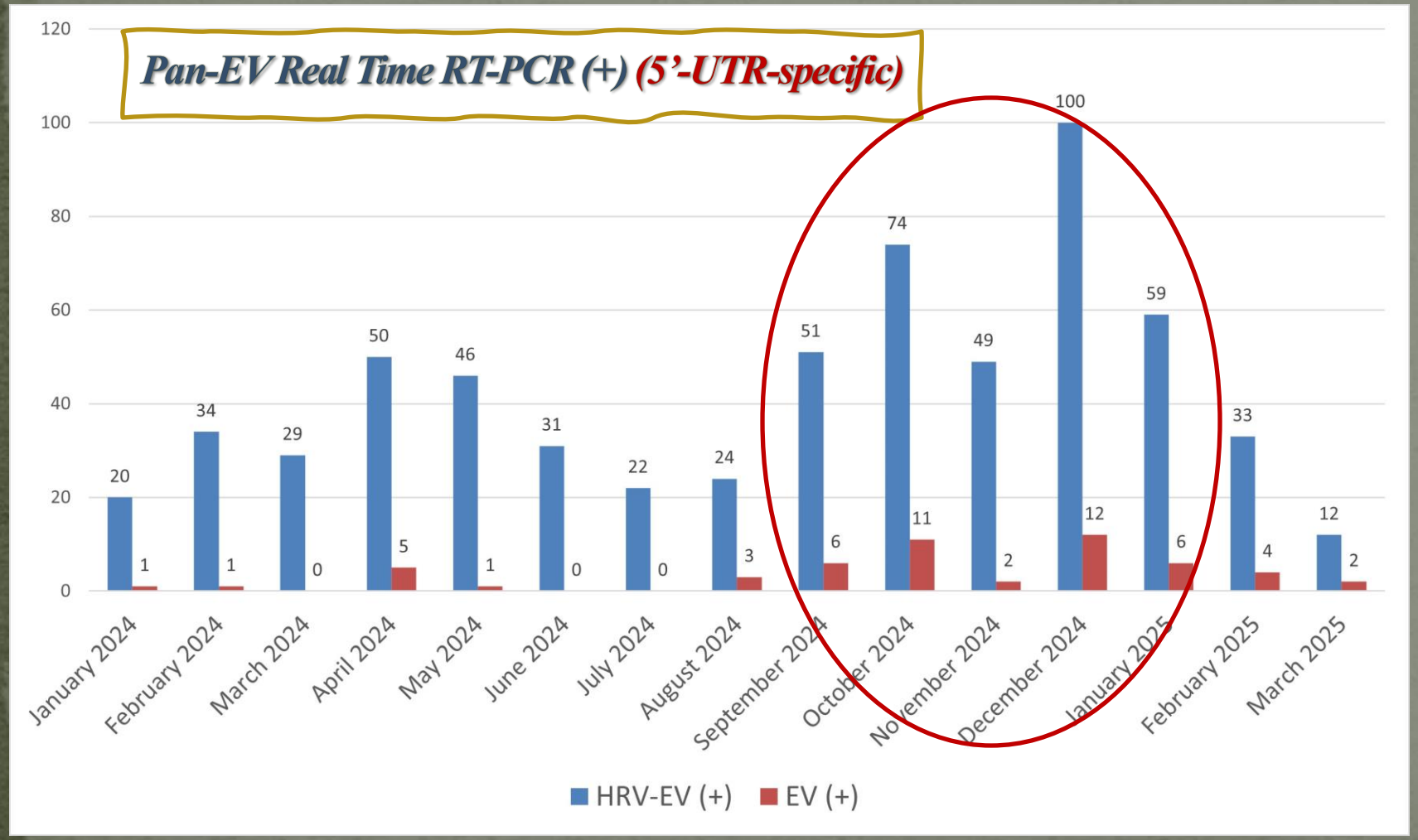
Επιπολασμός RV-EV στις Λοιμώξεις Αναπνευστικού

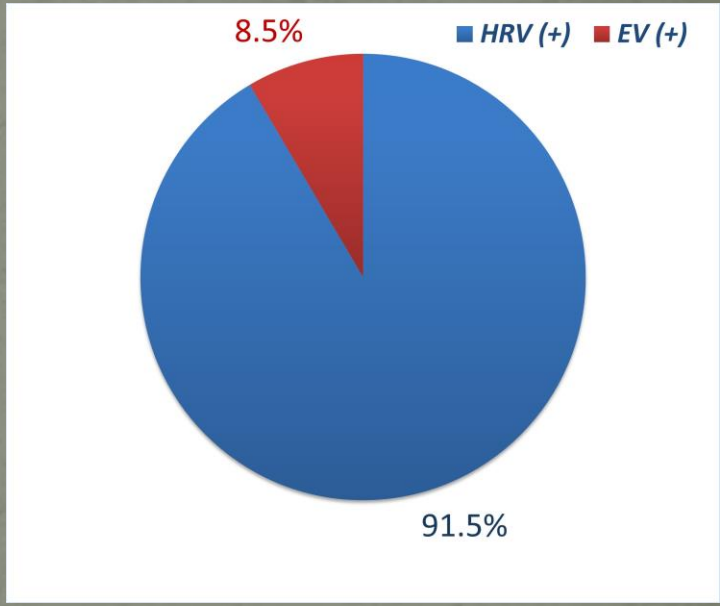




ΑΝΑΓΚΗ ΝΑ ΠΡΟΧΩΡΗΣΟΥΜΕ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ: ΤΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΤΩΝ EV

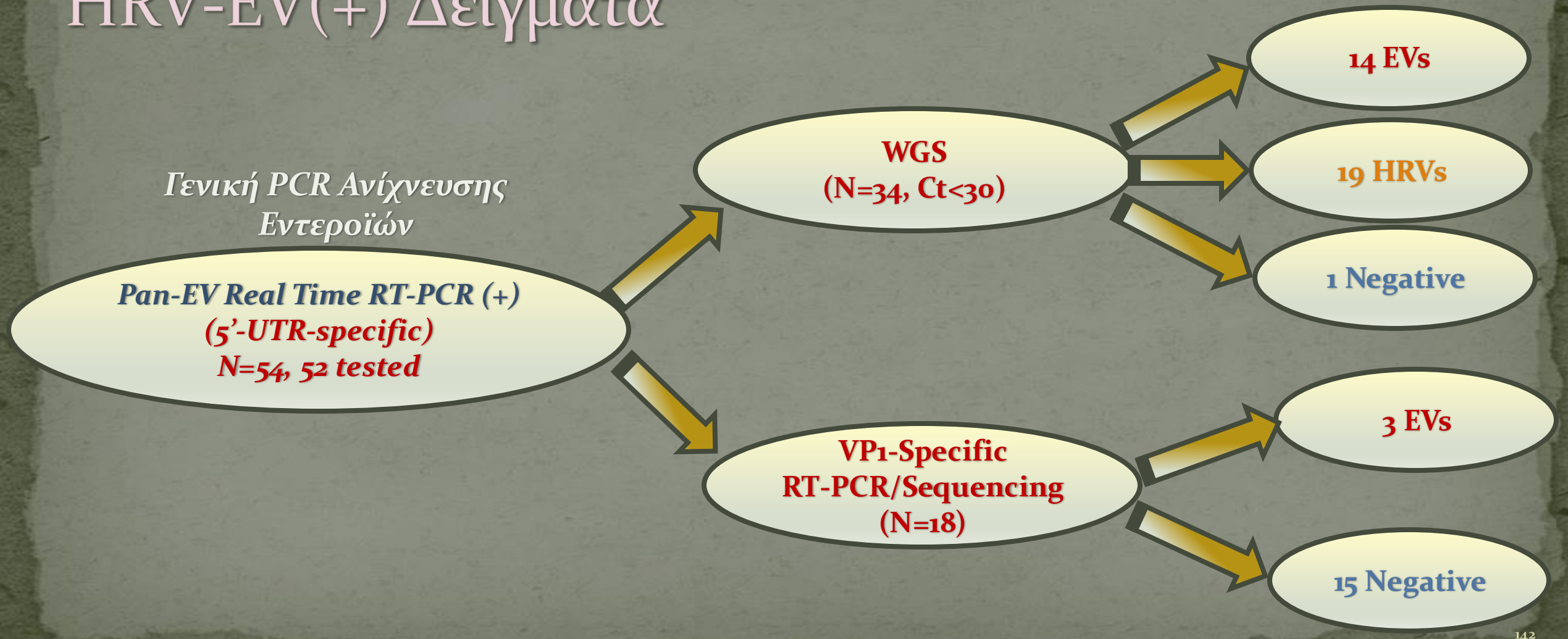
Επιπολασμός EV(+) μεταξύ HRV-EV(+)





Η αναζήτηση Επιδημικών, Λοιμογόνων Εντεροϊών στα HRV-EV(+) Δείγματα

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



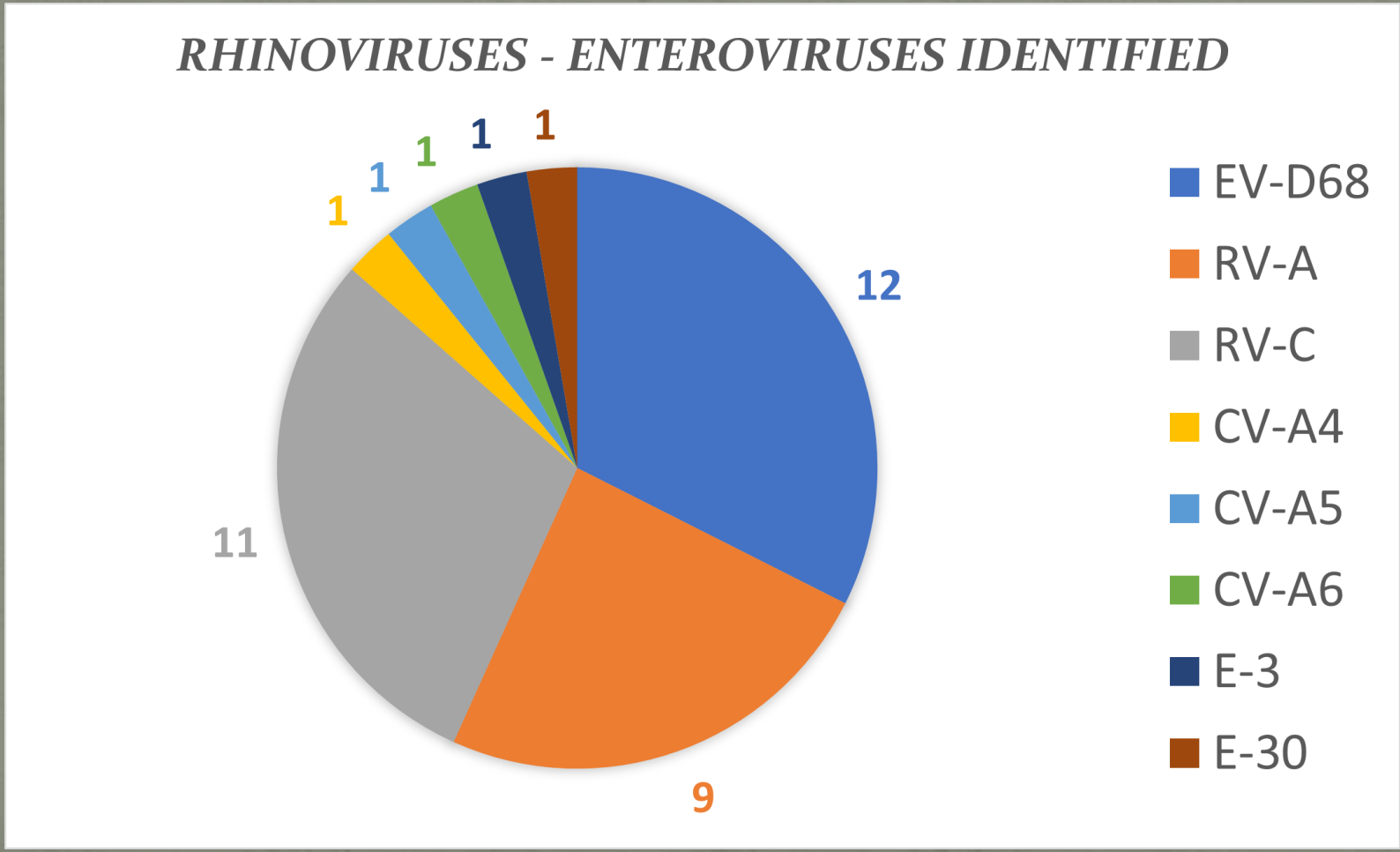
ΑΝΑΓΚΗ ΝΑ ΠΡΟΧΩΡΗΣΟΥΜΕ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ: ΤΟ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΤΩΝ EV

Η αναζήτηση Επιδημικών, Λοιμογόνων Εντεροϊών στα HRV-EV(+) Δείγματα

Code	Date	Age (Years)	Sex	Sample Type	SYNDROMIC TESTING Result	Serotype	Method	GENOME COVERAGE
470510	15/12/2024	52	F	NP	RV-EV	EV-D68	WGS	CG
12212701	30/01/2024	8	F	NP	RV-EV	E-3	WGS	CG
12277470	27/2/2024	2	F	NP	RV-EV	HRV-A18	WGS	CG
12396752	18/4/2024	10	F	NP	RV-EV	CV-A4	WGS	VP4-3B
12895367	8/12/2024	65	M	NP	RV-EV	HRV-A51	WGS	CG
12901666	10/12/2024	22	M	NP	RV-EV	HRV-C42	WGS	CG
12983878	20/1/2025	8	F	NP	RV-EV	HRV-C25	WGS	CG
12985448	21/1/2025	32	F	NP	RV-EV	EV-D68	WGS	CG
13132657	26/3/2025	57	F	NP	RV-EV	HRV-A51	WGS	CG
13028552	08/02/2025	7	M	NP	RV-EV	HRV-C25	WGS	VP4, VP2, VP3, 2A, 2B, 3C
12884938	03/12/2024	2	F	NP	RV-EV	CV-A5	WGS	5'-UTR, VP1, VP4, 2C, 3D
12901674	10/12/2024	58d	M	NP	RV-EV	EV-D68	WGS	CG
12957075	09/01/2025	22	M	NP	RV-EV	HRV-C42	WGS	CG
13093992	09/03/2025	35	M	BAL	RV-EV	EV-D68	WGS	CG
12909316	13/12/2024	81	M	NP	RV-EV	HRV-C15	WGS	CG
12916256	17/12/2024	27	F	NP	RV-EV	HRV-C11	WGS	CG
12931000	23/12/2024	52	M	NP	RV-EV	HRV-C23	WGS	CG
12940096	30/12/2024	13	F	NP	RV-EV	HRV-C1	WGS	CG
12928453	22/12/2024	4,3m	M	NP	RV-EV	EV-D68	VP1	VP1
12897212	09/12/2024	77	M	NP	RV-EV	HRV-C42	WGS	CG
12695014	11/09/2024	85	M	NP	RV-EV	EV-D68	WGS	CG
12745762	03/10/2024	34	M	NP	RV-EV	EV-D68	WGS	CG
12690037	10/09/2024	85	M	NP	RV-EV	EV-D68	WGS	CG
12804581	29/10/2024	90	F	NP	RV-EV	HRV-C43	WGS	CG
12363297	04/04/2024	51	M	NP	hMPV/RV-EV	HRV-A51	WGS	CG
12801549	27/10/2024	12,4m	F	NP	SARS-CoV-2/RV-EV	HRV-A9	WGS	CG
12785864	21/10/2024	76	M	NP	RV-EV	HRV-A51	WGS	CG
12742535	02/10/2024	44	M	BAL	RV-EV	EV-D68	WGS	CG
13113586	17/03/2025	10,7m	F	NP	hMPV/RV-EV	HRV-A12	WGS	CG
13146854	01/04/2025	8	M	NP	ADV/hMPV/RV-EV	EV-D68	WGS	VP1-3D
13194340	24/04/2025	2	M	NP	hMPV/RV-EV	HRV-A89	WGS	CG
13371984	14/07/2025	13,7m	M	NP	PIV3/RV-RV	HRV-C24	WGS	VP4, VP2, VP3, VP1, 2A
13340748	29/06/2025	15	M	NP	ADV/RV-EV	HRV-A53	WGS	CG
13113030	17/03/2025	57	F	BAL	hMPV ?	EV-D68	WGS	3D
13054911	19/02/2025	32	M	NP	hMPV	EV-D68	WGS	2B-3C
13230594	11/05/2025	8.1m	F	NP	ADV/RV-EV	E-30	VP1	VP1
13269042	28/05/2025	18m	M	NP	RV-EV	CV-A6	VP1	VP1

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

Αναγνώριση Οροτύπου



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

EV-D68 στην Ελλάδα

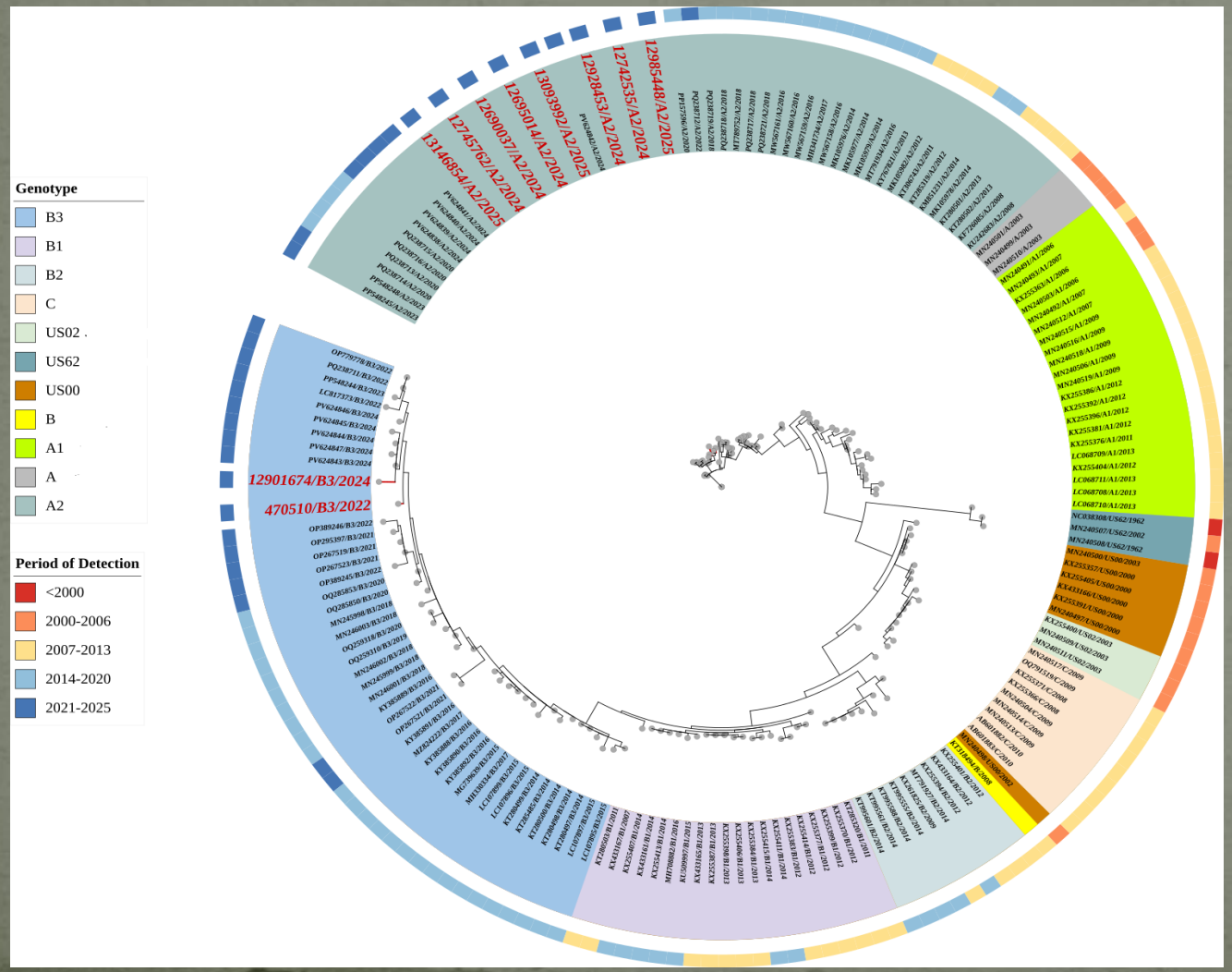
Code	Date	Age (Years)	Sex	Sample Type	Genotype	Clinical Features	Co-morbidities	Method	Genome Coverage
470510	15/12/2022	52	F	NP	B3	URTI	-	WGS	CG
12985448	21/1/2025	32	F	NP	A2	URTI	-	WGS	CG
12901674	10/12/2024	58d	M	NP	B3	URTI	-	WGS	CG
13093992	09/03/2025	35	M	BAL	A2	LRTI	-	WGS	CG
12928453	22/12/2024	4,3m	M	NP	A2	URTI	-	VP1	VP1
12695014	11/09/2024	85	M	NP	A2	LRTI	-	WGS	CG
12745762	03/10/2024	34	M	NP	A2	URTI	-	WGS	CG
12690037	10/09/2024	85	M	NP	A2	LRTI	-	WGS	CG
12742535	02/10/2024	44	M	BAL	A2	LRTI	Haenatological Malignancy	WGS	CG
13146854	01/04/2025	8	M	NP	A2	Respiratory Distress	-	WGS	VP1-3D
13113030	17/03/2025	57	F	BAL	A2	URTI	Haenatological Malignancy	WGS	3D
13054911	19/02/2025	32	M	NP	A2	URTI	-	WGS	2B-3C

AND:

Code	Date	Age (Years)	Sex	Sample Type	Genotype	Clinical Features	Co-morbidities	Method	Genome Coverage
13114033	17/03/2025	41d	F	STOOL	B3	FEBRILE ILLNESS	-	WGS	CG
6545977	22/05/2015	21	F	CSF	B3	CNS INFECTION	-	WGS	5'-UTR, Partial VP1, 3C-3D

Identified 10 years later…

EV-D68 στην Ελλάδα



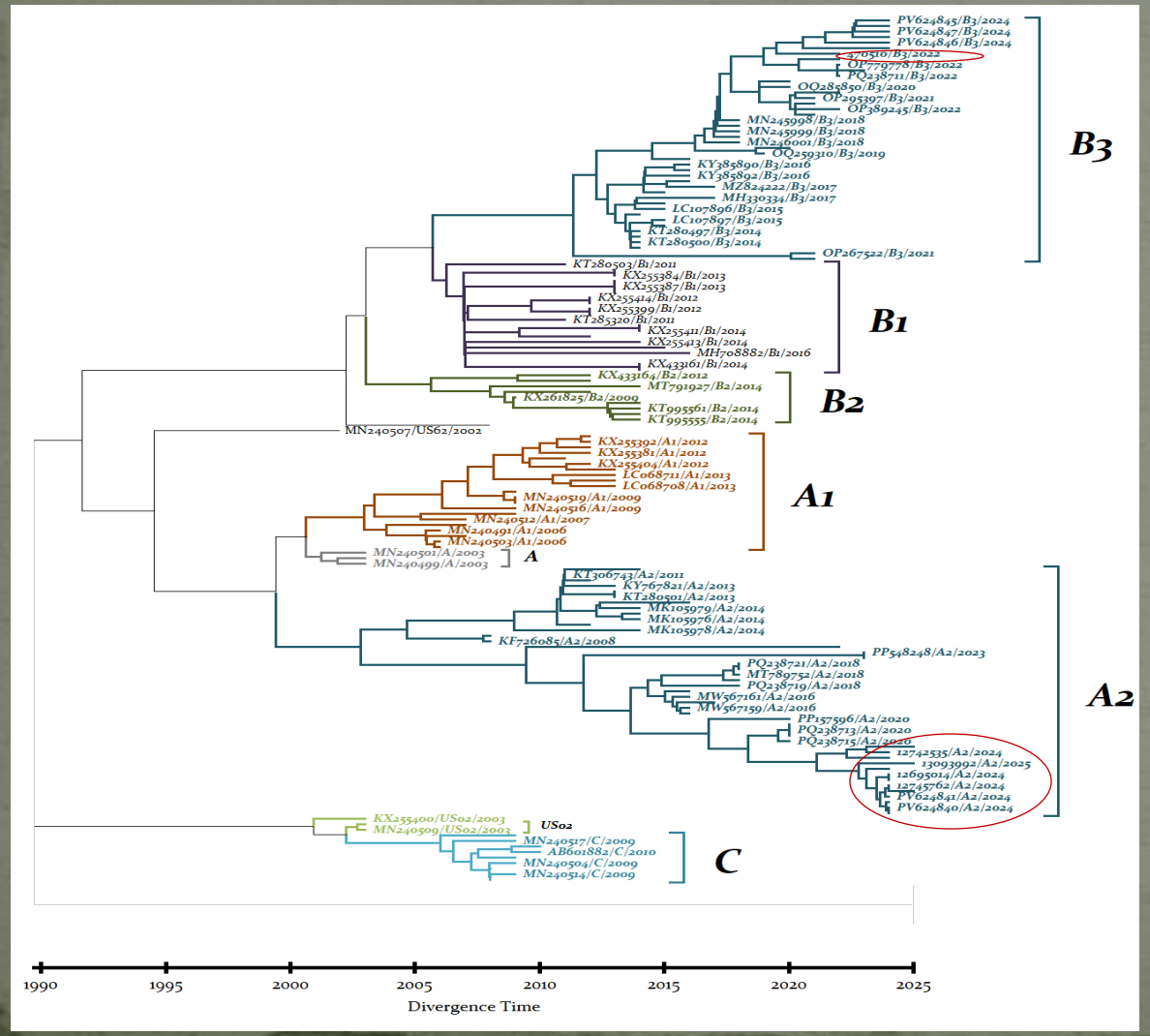
Genotype-specific clusters of EV-D68 strains & Period of Detection

- Prevalence of A2 & B3 Genotypes post-2020

(Strains of the present study are highlighted in red)

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

EV-D68 στην Ελλάδα: Συμπεράσματα



Ανίχνευση για 1η Φορά του Αναδυομένου EV-D68

Ανίχνευση του Δυνητικά Νευροτρόπου Γονοτύπου B3 (Σύνδεση με Χαλαρή Παράλυση

Σημαντική απόδειξη της ανάγκης για Συνεχόμενη Επιτήρηση, ακόμα και εκτός Επιδημικών Περιόδων

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

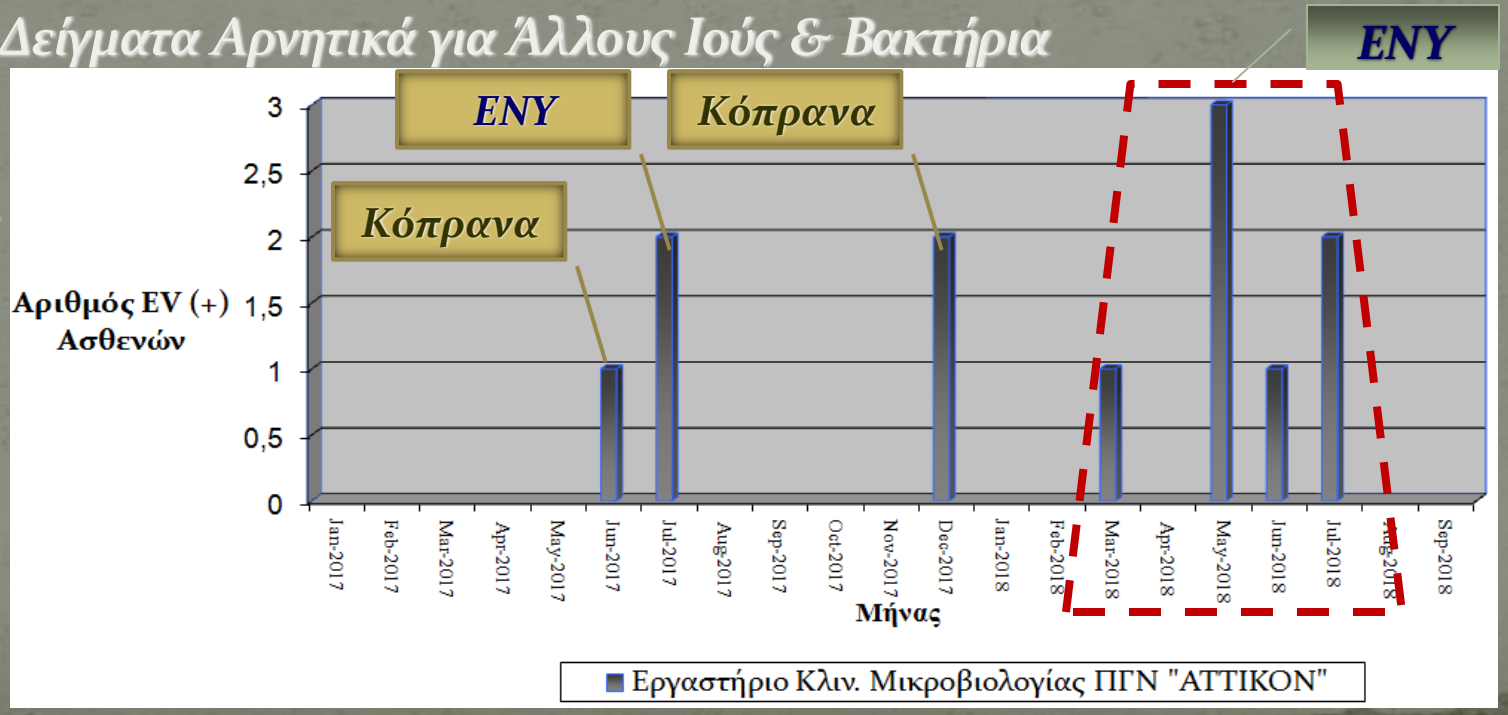
Συμβατική Nested RT-PCR (Γονίδιο 1D) → Sequencing (Γεν. Προσδιορισμός Οροτύπου) → **Αποτέλεσμα: Όλα Ε30 Επιδημία(?)**

Αδυναμία Πολυπλεκτικής Μεθόδου Αναγνώρισης Επιδημίας

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

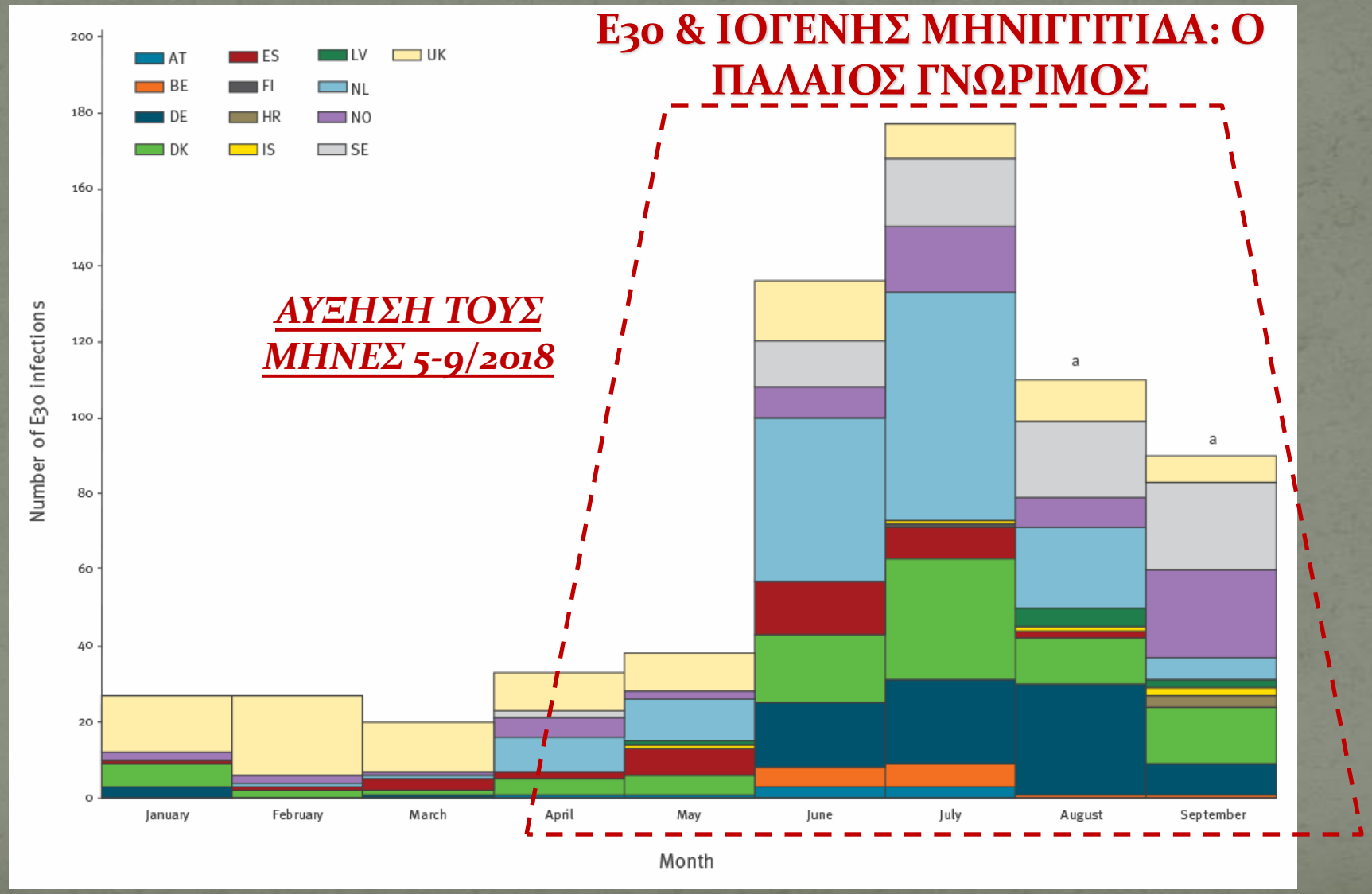
- **Ελλάδα, 2018:**
  - Περίοδος Μελέτης: 6 Μήνες (2/2018 – 7/2018)
  - Αριθμός Δειγμάτων ΕΝΥ: 28
  - Θετικά για EV: 7 (25%), 3-7/2018
    - Φύλο Ασθενών: 7Α
    - Ηλικία: 3 Ενήλικες 32-36y, 4 Παιδιά 4m-17y
    - ΕΝΥ: 20-580 κυτ/mm³, Λεμφ., Πρωτ. Φυσ.- ↑
    - Δείγματα Αρνητικά για Άλλους Ιούς & Βακτήρια

Επίπτωση Ανίχνευσης EV, ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ», 2017-2018
Αυξημένη Επίπτωση 3/2018-7/2018



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

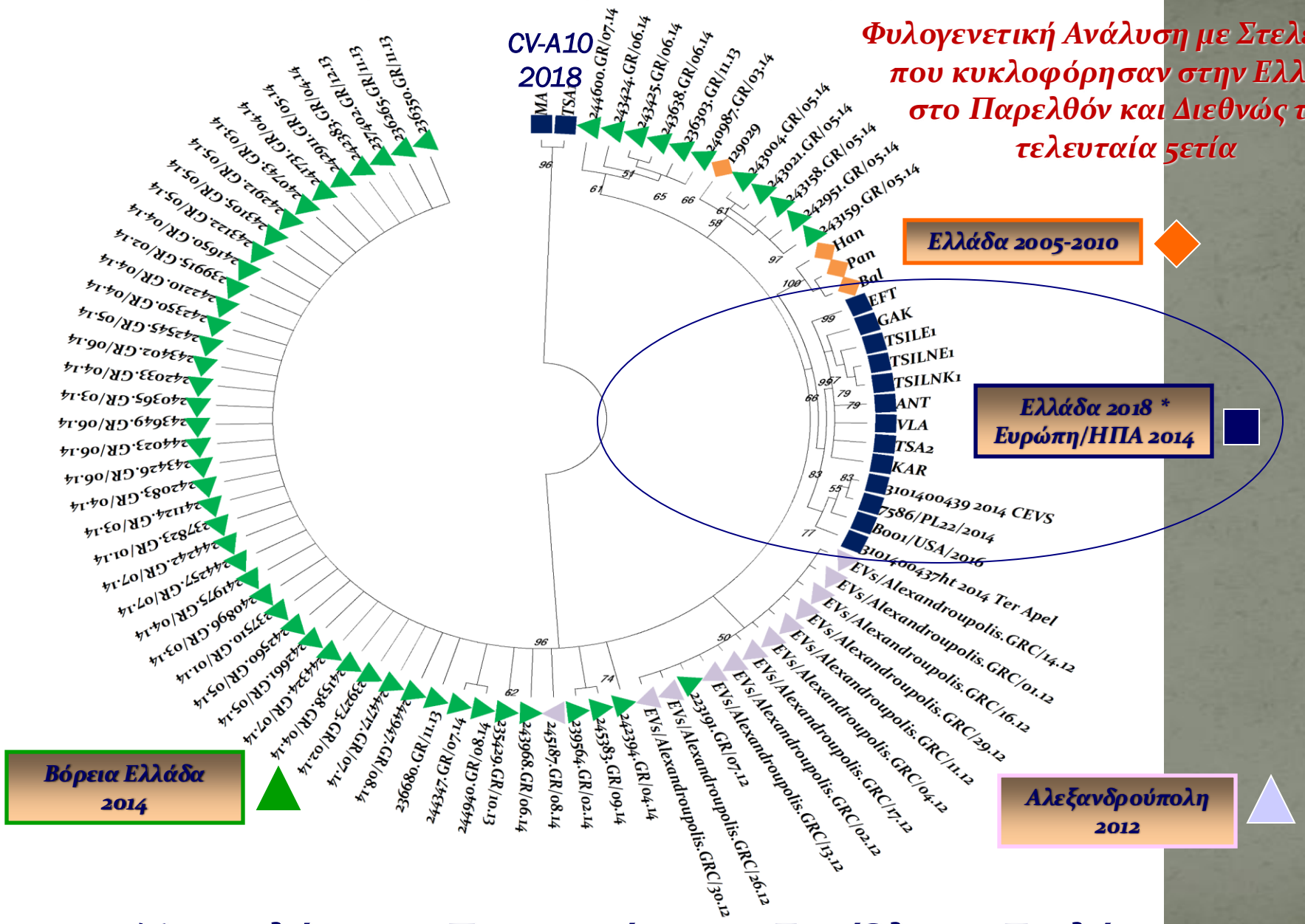
Αριθμός E30(+) Ασθενών σε 13 Ευρωπαϊκές Χώρες, 1/2018=9/2018



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

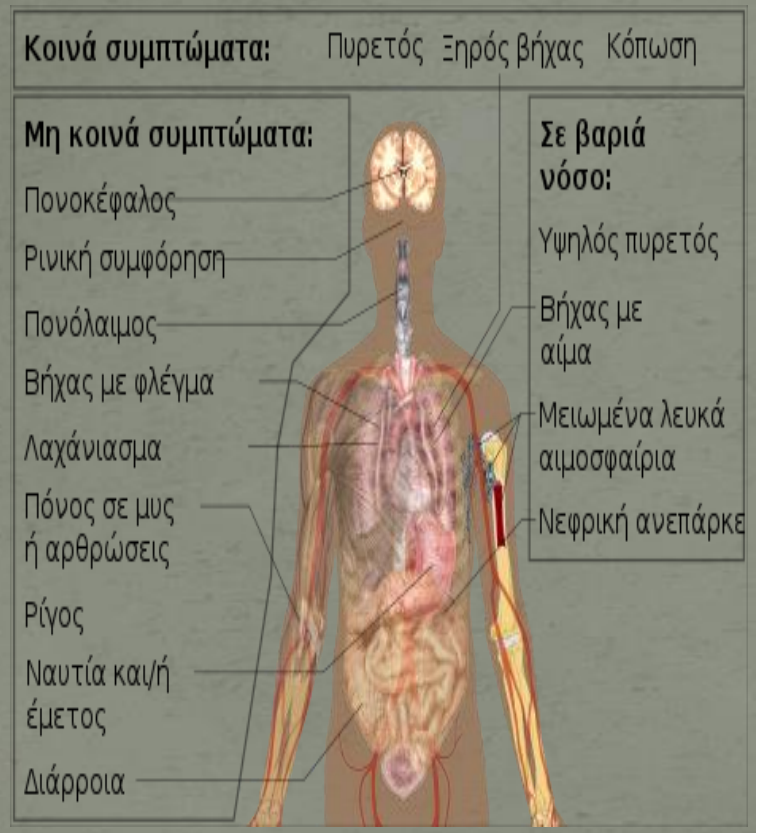
E30 & ΙΟΓΕΝΗΣ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ

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



*Αποτελέσματα Ταυτοποίησης – Ε30 Όλα τα Στελέχη

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

ΑΝΑΓΚΗ ΝΑ ΠΡΟΧΩΡΗΣΟΥΜΕ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΝΔΡΟΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

Υπάρχουσες Μέθοδοι

Τεχνικός Περιορισμός στον Αριθμό των Παθογόνων

Πρακτικό Θέμα! "Μόνο-τεστ", Ακατάλληλο για Επιδημίες

Μόνο Ανίχνευση, όχι πληροφορίες για Ορότυπο/Γονότυπο /Στέλεχος

Λοιμώξεις που επηρρεάζουν περισσότερα από ένα Συστήματα

Δεν μπορούν να ανιχνευθούν και να αναγνωριστούν Αναδυόμενα Παθογόνα/Νέα Είδη

ΑΝΑΓΚΗ ΝΑ ΠΡΟΧΩΡΗΣΟΥΜΕ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ (SEQUENCING) ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

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

ΠΕΡΑ ΑΠΌ ΤΗΝ PCR:

ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ (SEQUENCING) ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

ΑΝΑΓΚΗ ΝΑ ΠΡΟΧΩΡΗΣΟΥΜΕ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

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

Μία Μέθοδος για Κάθε Διαγνωστικό Ζήτημα

Ανίχνευση και Αναγνώριση Πάσης Φύσεως Λοιμωδών Παραγόντων

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

Χαρακτηρισμός Νέων, Επανεμφανιζομένων και Αναδυομένων Οροτύπων/Στελεχών Ιών

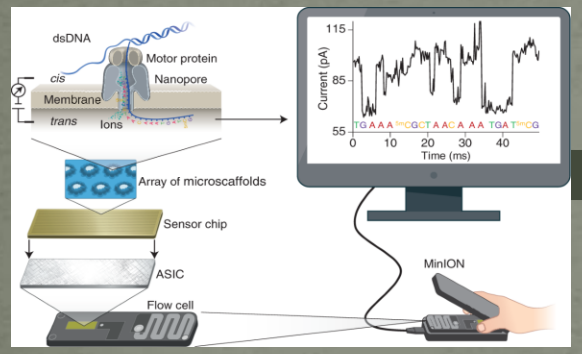
***Μειονέκτημα**: Δυσκολία στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων (Τεράστιος Όγκος Πληροφοριών, Βιοπληροφορική)*

ΑΝΑΓΚΗ ΝΑ ΠΡΟΧΩΡΗΣΟΥΜΕ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

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

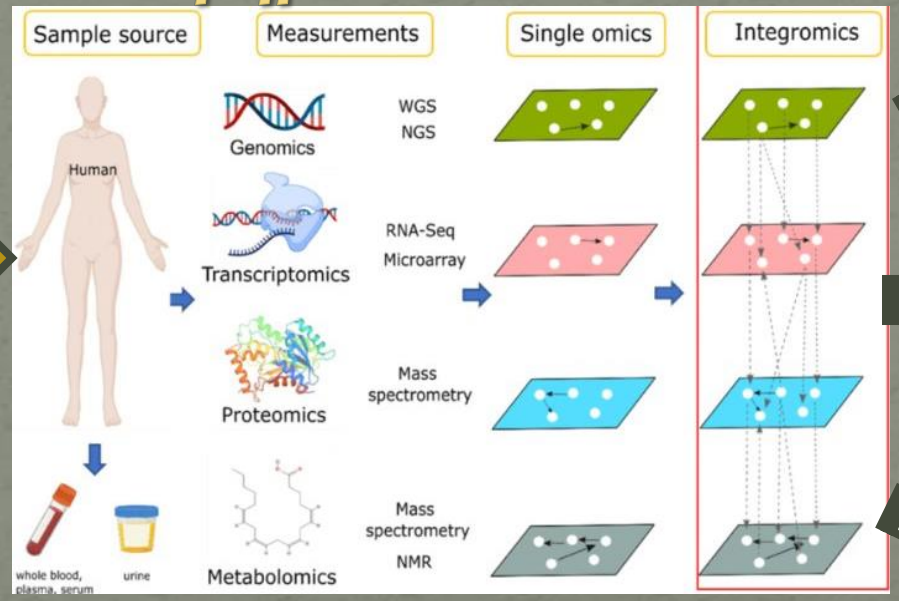
NGS

Reference Genome Sequencing



De Novo Sequencing

Τμήμα των OMICS



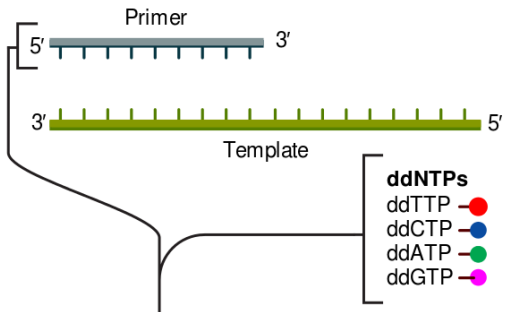
- Κατανόηση Παθογένειας Ασθενειών
- Ανάπτυξη Εμβολίων
- Ανάπτυξη Θεραπειών

ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ

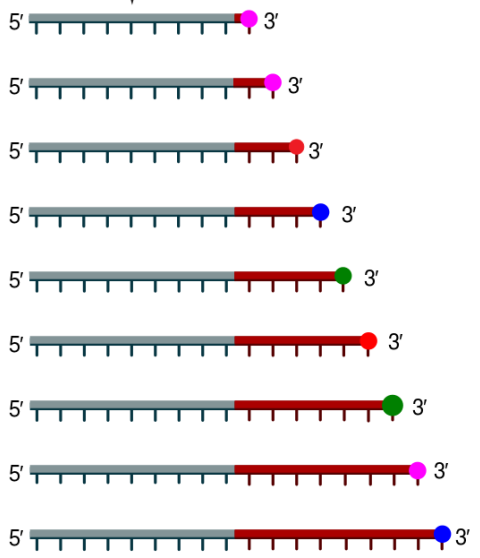
Πρωτότυπη Μέθοδος “Sanger”

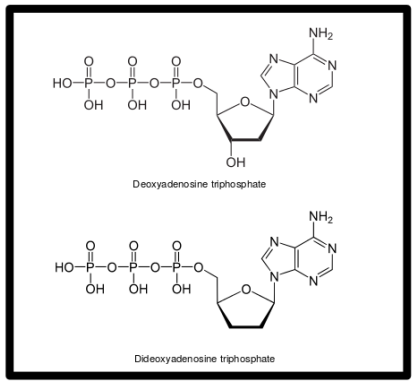
① *Μείγμα Αντίδρασης*

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

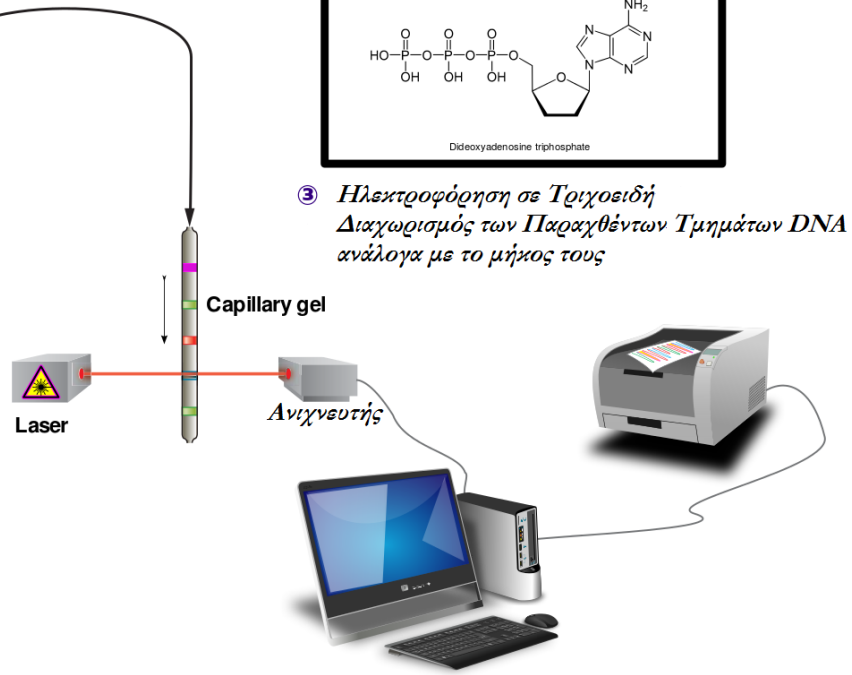


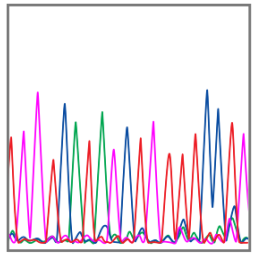
② *Δημιουργία Αντιγράφου και Τερματισμός Επιμήκυνσης Συμπληρωματικού κλώνου*





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



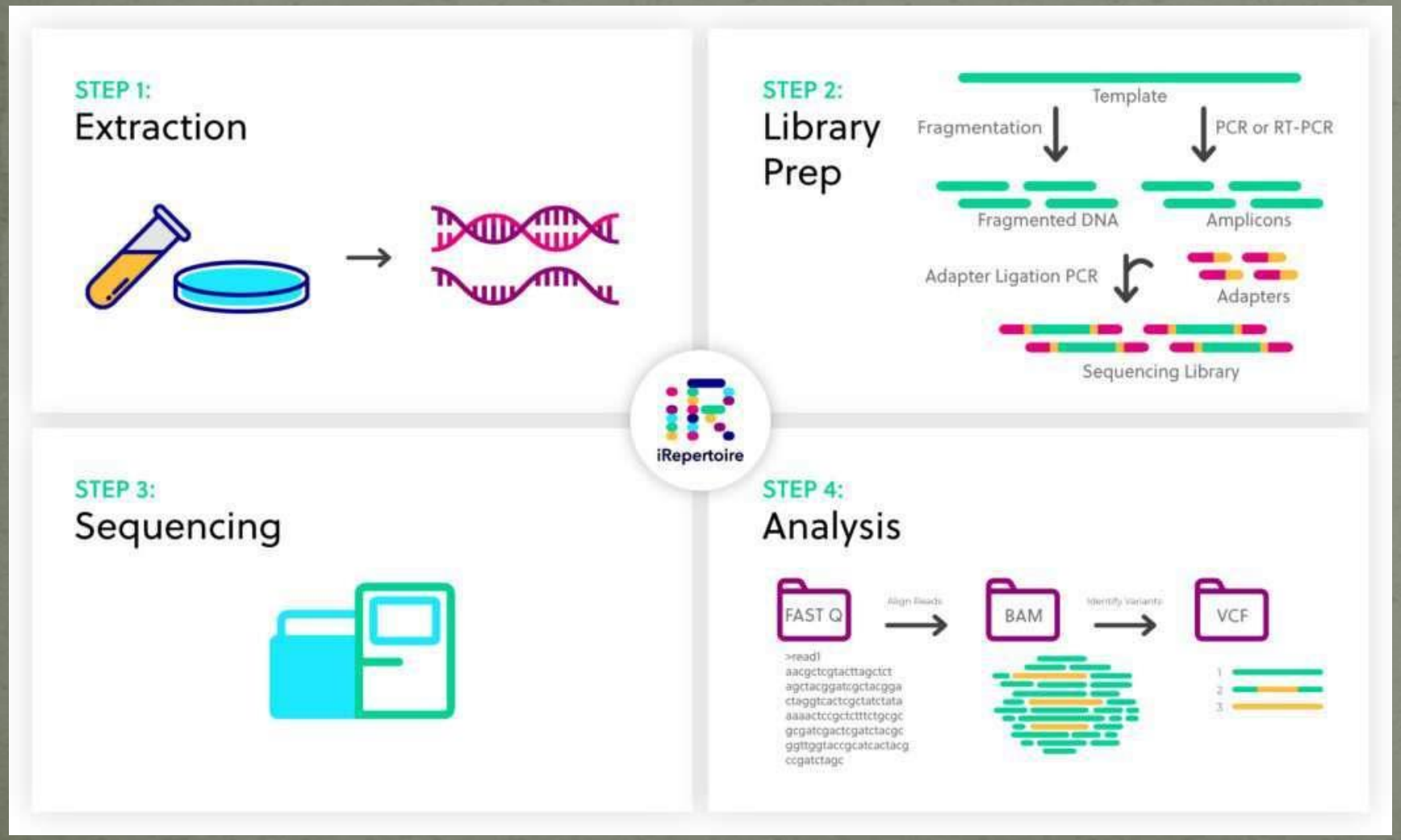


Χρωματόγραμμα

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

ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ

Πιο Σύγχρονες Μέθοδοι – Next Generation Sequencing



***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

ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ

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

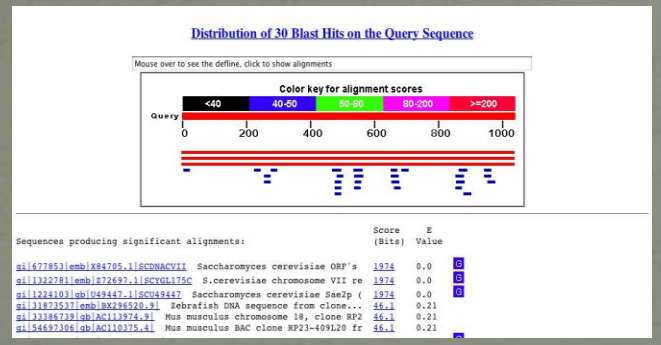
* Can sequence up to 75 strains per run at 30x coverage
**Assumes single 3730xl instrument running 24 hr/day
† Excluding sample prep

ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ

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

Ταυτοποίηση Ιών

Ταξινόμηση Ιών

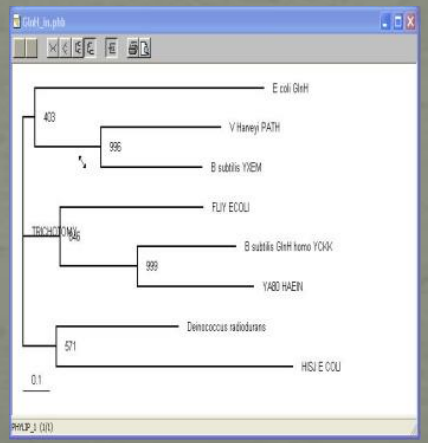


Λογισμικό BLAST

Σύγκριση με Γονιδιακές Αλληλουχίες Κατατεθειμένες σε Αποθήκες Δεδομένων Αναφοράς

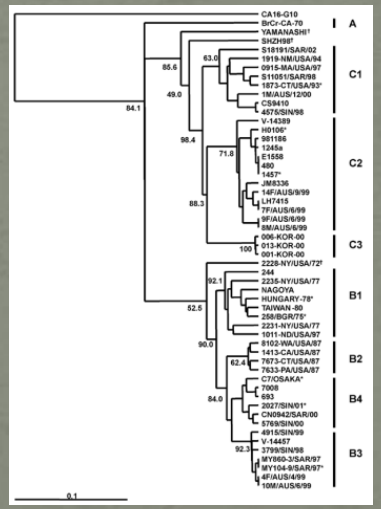
ClustalW

Πολλαπλή στοίχιση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών



TreeView

Κατασκευή Φυλογενετικών Δέντρων



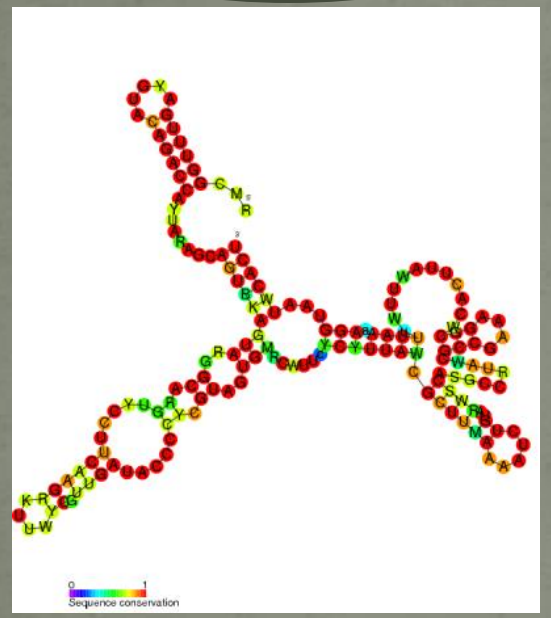
Δενδρόγραμμα

ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ

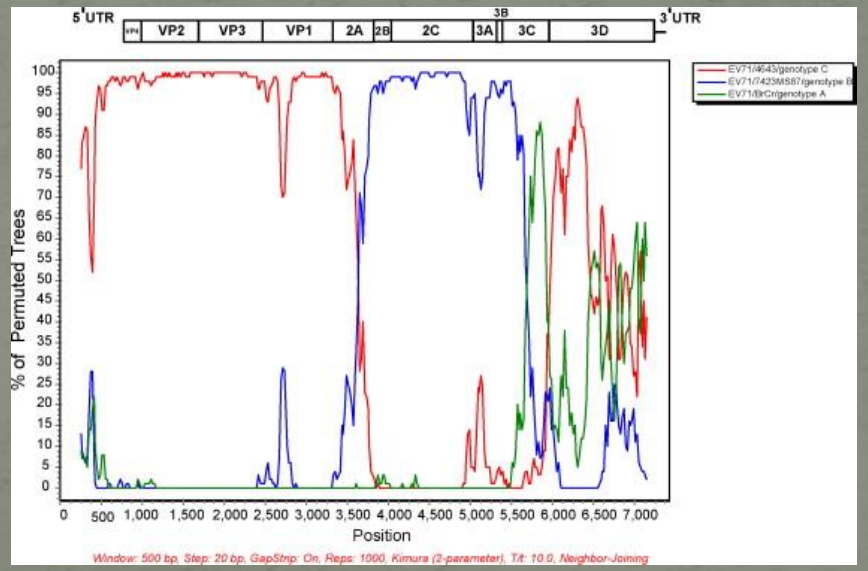
- Ακολουθεί η περαιτέρω ανάλυση του Γεν. Υλικού με:
  - ***Βιοπληροφορική***

Δομικές Μελέτες

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



2γής Δομή 5'-UTR

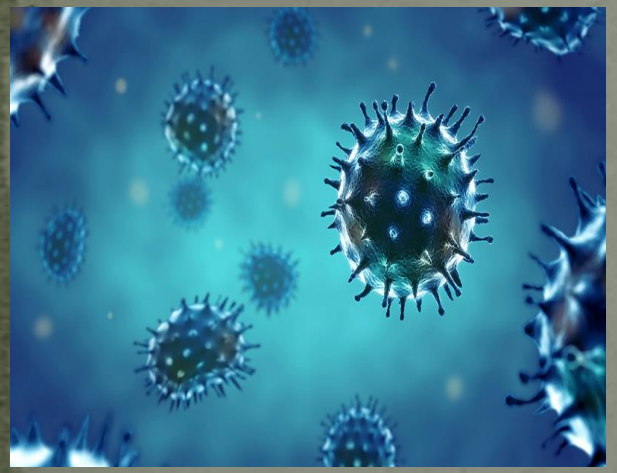


Simplot: Γενετικός Ανασυνδυασμός σε Στελέχη Εντεροϊών

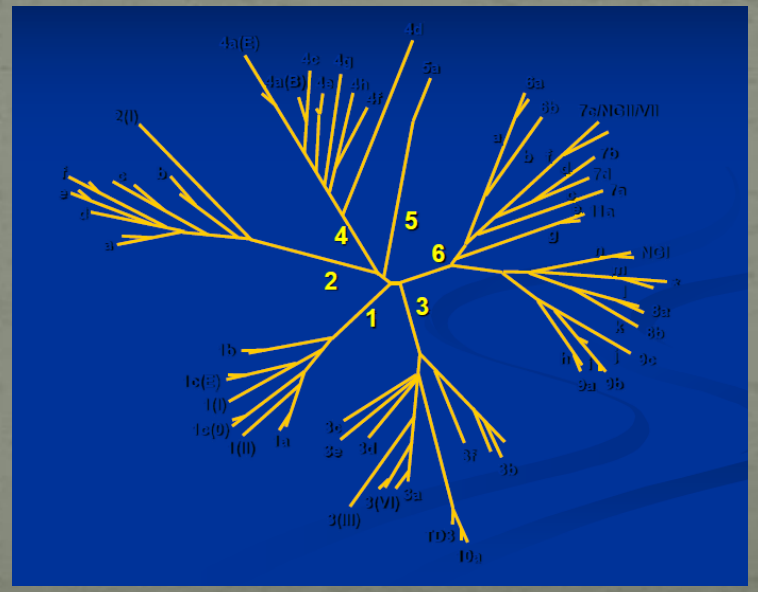
ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ

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

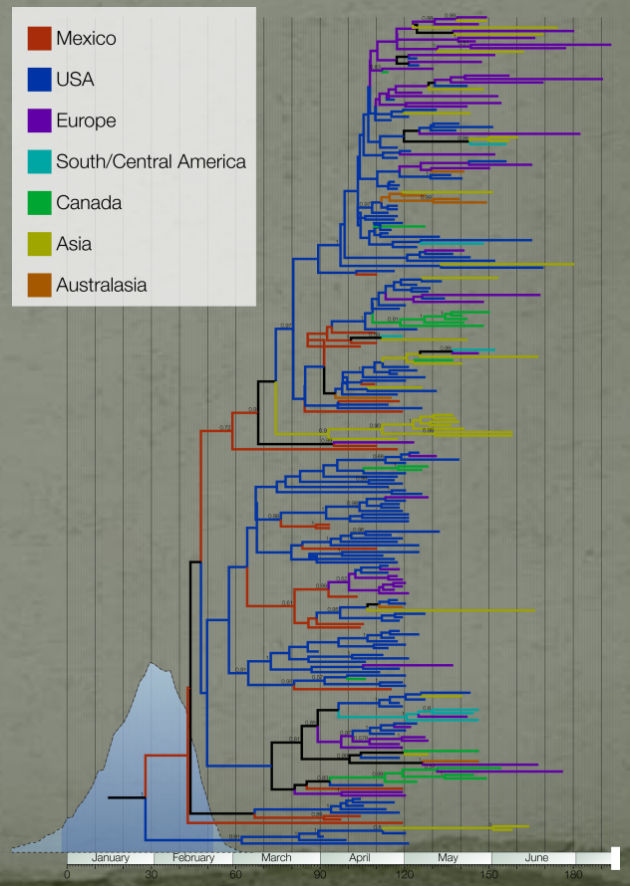
Ανακάλυψη Νέων Στελεχών - Ιών



Γονοτυπική Ταυτοποίηση – Θεραπεία



Τυποποίηση – Επιδημιολογία Ιών



Π.χ. Γονότυποι HCV: Διαφορική Θεραπεία

ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ

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

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 ΝΈΟ...)
- 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

Τι άλλο πρέπει να λάβουμε υπ 'όψιν?

ΠΩΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕ ΤΗΝ ΕΞΕΤΑΣΗ?

ΠΩΣ ΕΡΜΗΝΕΥΟΥΜΕ ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ?

ΙΩΜΑ: ΡΟΛΟΣ ΣΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ & ΑΣΘΕΝΕΙΑ

ΧΡΟΝΙΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ:
ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΥΝΔΕΣΗ ΜΕ ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ (?)

Τι άλλο πρέπει να λάβουμε υπ 'όψιν?

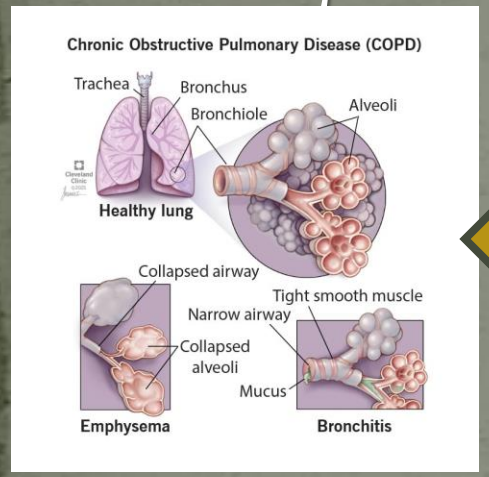
Η Ασθένεια που προκύπτει από μία Λοίμωξη, Οξεία ή Όψιμη, είναι μία δύσκολη, Πολυπαραμετρική Εξίσωση που αναζητά επίλυση

Προσοχή στο ***Αποτέλεσμα της Ανίχνευσης***!

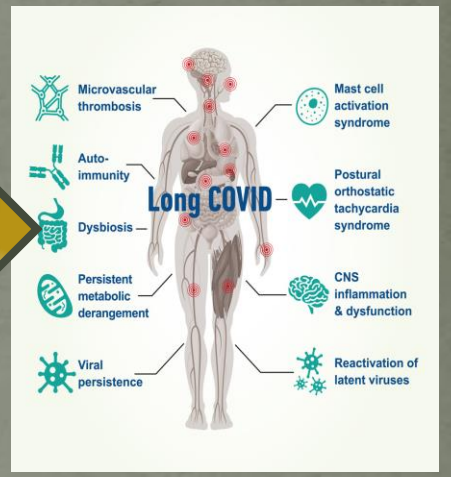
Η είσοδος στον οργανισμό και άρα ***Η ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ***, δε σημαίνει πάντα ***ΑΣΘΕΝΕΙΑ***!

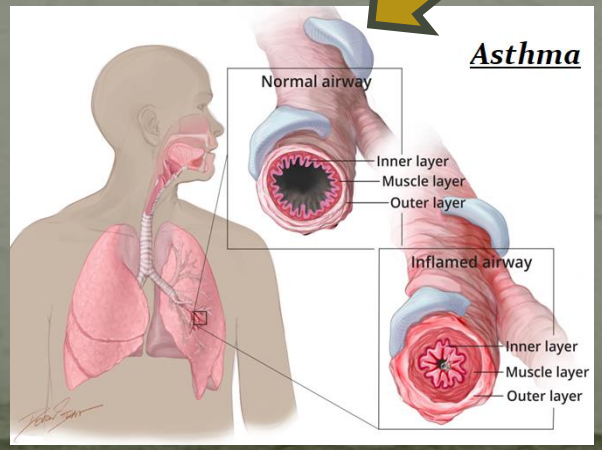
Τι άλλο πρέπει να λάβουμε υπ 'όψιν?

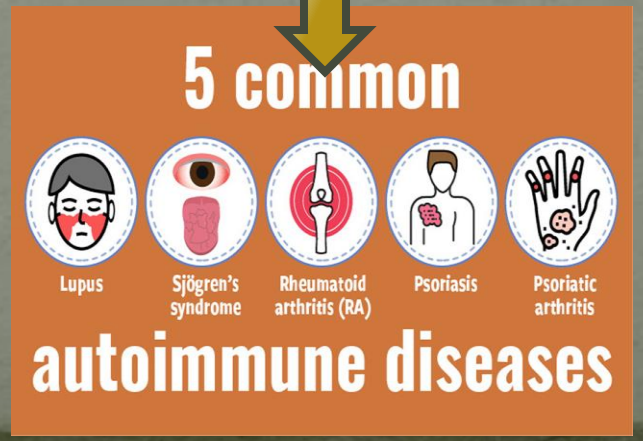
Χρόνιες Ασθένειες: Ο ρόλος των Μοριακών Μεθόδων για τη Διάγνωση Χρονίων Ασθενειών μετά την Οξεία Φάση Αναπνευστικής Λοίμωξης, ποιος θα πρέπει να είναι?

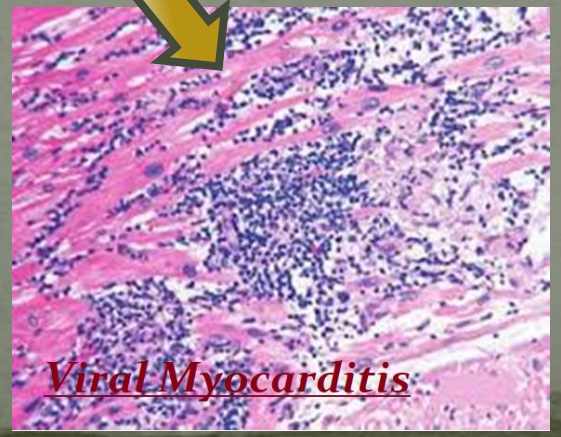


Σημαντικές Δυσκολίες στην Ανίχνευση και Αιτιολογική Σύνδεση με Επιμένουσες, Λανθάνουσες και Αυτοάνοσες Καταστάσεις



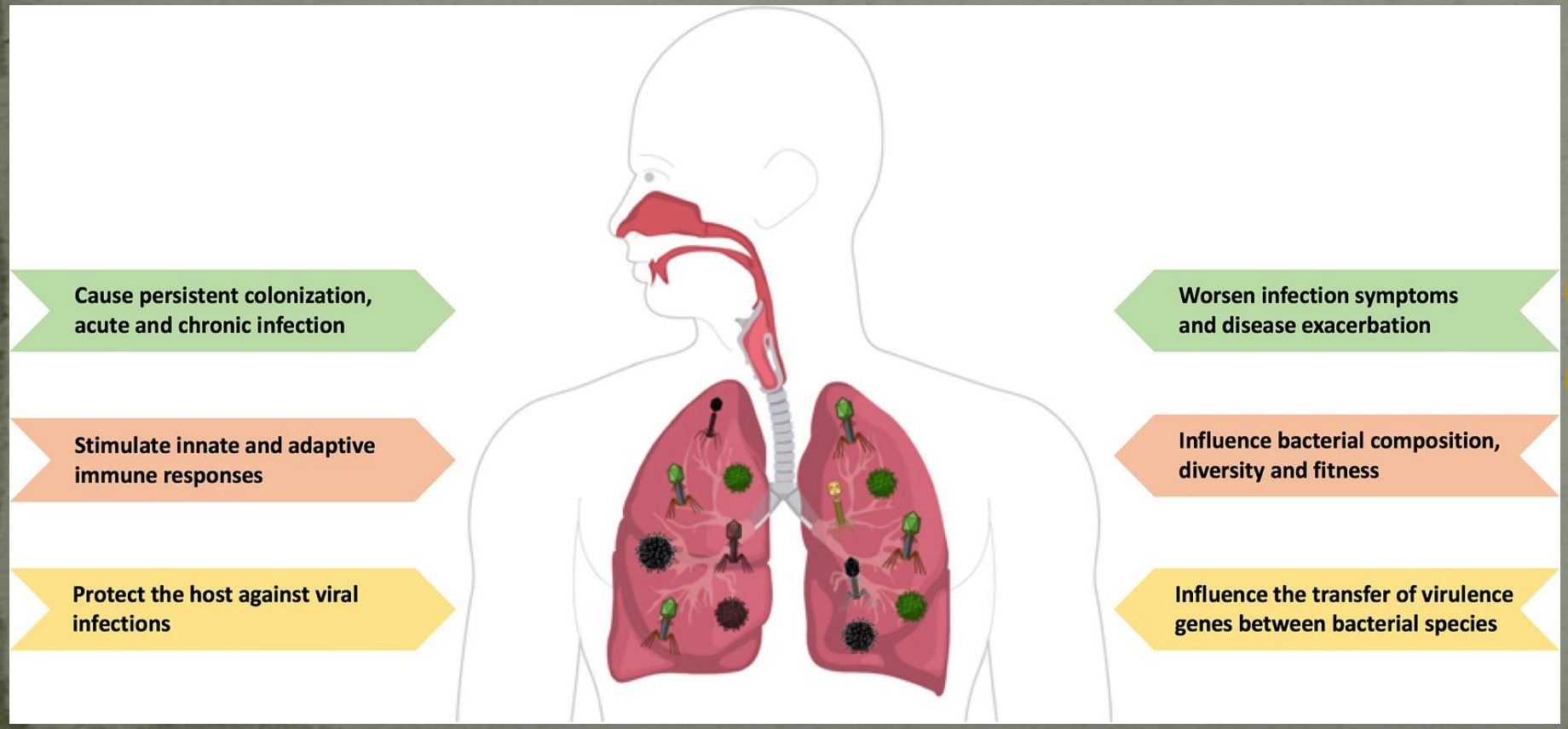






Τι άλλο πρέπει να λάβουμε υπ 'όψιν?

Ίωμα Αναπνευστικού: Ο αμφίπλευρος ρόλος του στις Λοιμώξεις του ***Αναπνευστικού Συστήματος***

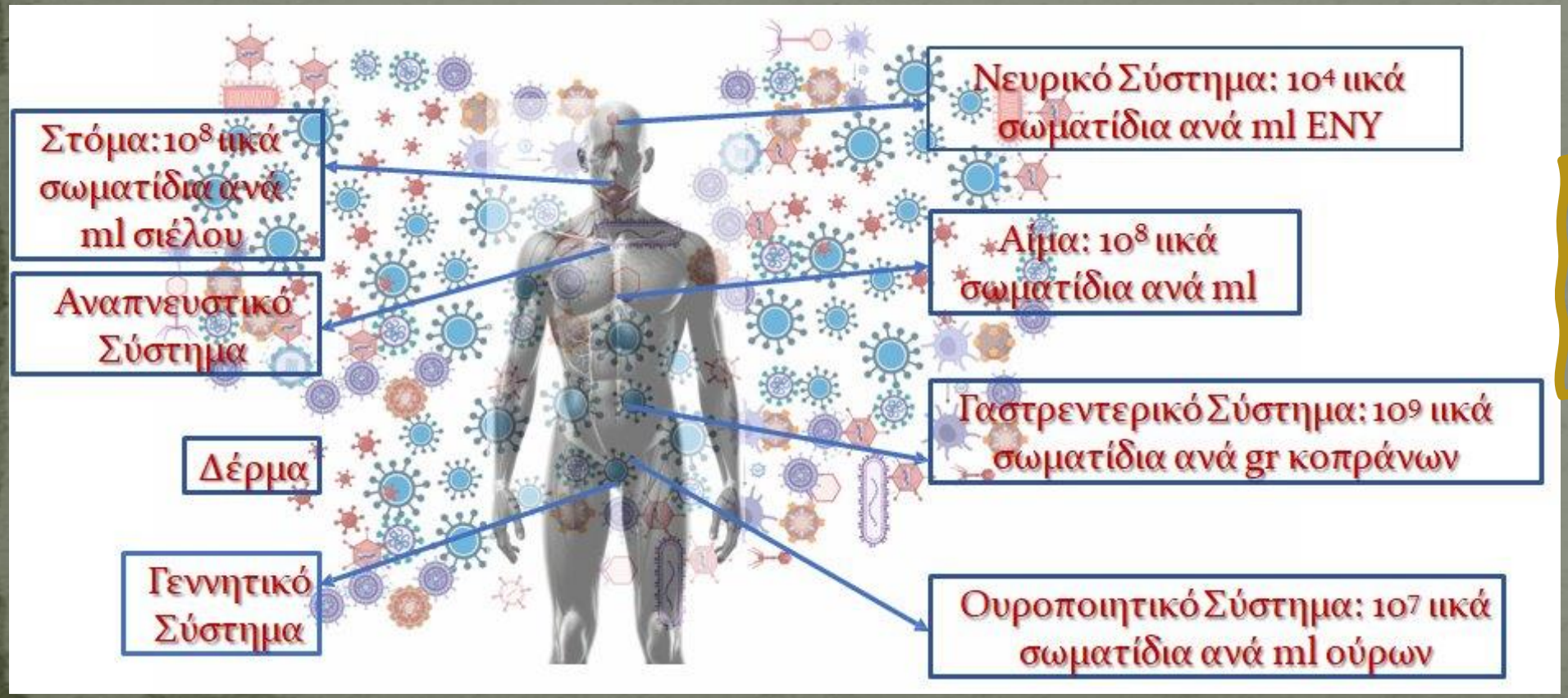


Ποιος ο ρόλος της Μοριακής Διάγνωσης εδώ?

Porto BN. Front Immunol. 2022 Apr 27;13:885341.

Τι άλλο πρέπει να λάβουμε υπ 'όψιν?

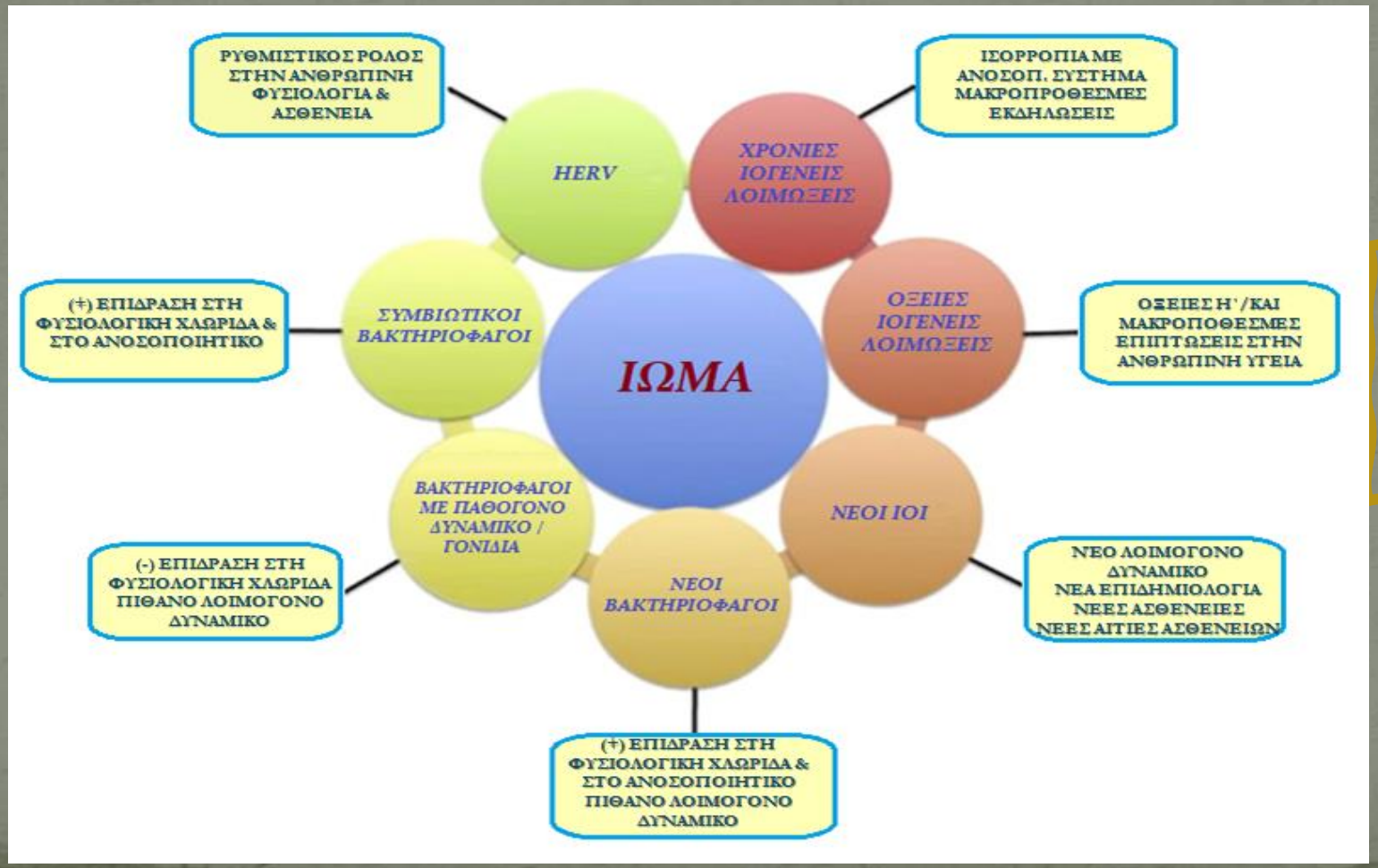
Ίωμα: Πολύπλευρη η αλληλεπίδρασή του με τον Ξενιστή και ο ρόλος του στη Φυσιολογία και στην Ασθένεια



Ποιος ο ρόλος της Μοριακής Διάγνωσης εδώ?

Τι άλλο πρέπει να λάβουμε υπ'όψιν?

Ίωμα: Ρυθμιστικός Παράγοντας Φυσιολογίας & Ασθενειών



Ποια η θέση της Μοριακής Διάγνωσης εδώ?

ΑΝΤΙ ΕΠΙΛΟΓΟΥ

Ξαφνική επιδημία!

- **Τόπος:** Νότια Ευρώπη — αρχική συρροή σε παιδιατρική κλινική.
  - **Ασθενείς:** 35 παιδιά ηλικίας 3–10 ετών με **οξεία αναπνευστική λοίμωξη**.
  - **Κλινικά χαρακτηριστικά:**
    - Πυρετός, βήχας, δύσπνοια, συριγμός
    - 30% παρουσίασε **οξεία χαλαρή παράλυση (AFP)**
    - 10% εμφάνισε **εγκεφαλίτιδα/σπασμούς**
    - 15% παρουσίασε **μυοκαρδίτιδα και ηπατική δυσλειτουργία**

ΑΝΤΙ ΕΠΙΛΟΓΟΥ

Ξαφνική επιδημία!

- Κλινικά Δείγματα:
  - Ανώτερο και Κατώτερο Αναπνευστικό, ΕΝΥ, Αίμα
- Διαγνωστική εικόνα (αρχικά)
  - Multiplex PCR panels (αναπνευστικού): ΑΡΝΗΤΙΚΑ
  - RT-PCR για συνήθη EV/RV/Flu/RSV/SARS-CoV-2: ΑΡΝΗΤΙΚΑ
  - Καλλιέργειες/αντιγονικά tests: Μη διαγνωστικά
  - Δείκτες φλεγμονής αυξημένοι, ακτινολογικά διάχυτες βλάβες

Τι θα κάνουμε στο Εργαστήριο στη Συνέχεια???

ΑΝΤΙ ΕΠΙΛΟΓΟΥ

Ξαφνική επιδημία!

Τι θα κάνουμε στο Εργαστήριο στη Συνέχεια???

ΚΛΙΝΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ

Ανώτερο/Κατώτερο
Αναπνευστικό
ΕΝΥ
ΑΙΜΑ
ΚΟΠΡΑΝΑ

→ **DE NOVO NGS (SHOTGUN WGS)**

→ **ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ & ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΑΙΤΙΑΣ**

→ **ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΥ/ΕΠΙΔΗΜΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ**

→ **ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ PCR ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ**

Ο ΔΡΟΜΟΣ ΕΊΝΑΙ ΑΚΟΜΑ ΠΟΛΥ ΜΑΚΡΥΣ ΚΑΙ ΔΥΣΚΟΛΟΣ…

Παύλος (Α' Θεσσαλονικεῖς 5:19–22):

Τὸ Πνεῦμα μὴ σβέννυτε.

Προφητείας μὴ ἐξουθενεῖτε.

Πάντα δοκιμάζετε, τὸ καλὸν κατέχετε.

Ἀπὸ παντὸς εἴδους πονηροῦ ἀπέχεσθε.

ΣΑΣ ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ