



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



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

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

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

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

ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

**Δημήτρης Μόσιαλος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας
Μικροβίων , Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.**

Αλληλεπιδράσεις ξενιστή-παθογόνων

Το ανθρώπινο σώμα είναι συνεχώς εκτεθειμένο σε μικροοργανισμούς. Κάθε φορά που αναπνέουμε ή μιλάμε ερχόμαστε σε επαφή με πολλούς μικροοργανισμούς. Κάθε φορά που αγγίζουμε ένα αντικείμενο μικροοργανισμοί βρίσκονται στο δέρμα μας. Εκατοντάδες διαφορετικά είδη μικροοργανισμών, αναπτύσσονται πάνω και μέσα στο σώμα μας και αποτελούν την φυσιολογική χλωρίδα. Οι περισσότεροι από αυτούς δεν είναι βλαβεροί. Οι οργανισμοί που ζουν πάνω και μέσα σε ένα ξενιστή και είναι βλαβεροί ονομάζονται **παράσιτα**. Τα μικροβιακά παράσιτα ονομάζονται **παθογόνοι μικροοργανισμοί**. Το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης ξενιστή-παρασίτου εξαρτάται από την παθογονικότητα του παρασίτου (την ικανότητα να προκαλεί ασθένεια) αλλά και την ανθεκτικότητα του ξενιστή (πολλοί παράγοντες την επηρεάζουν).

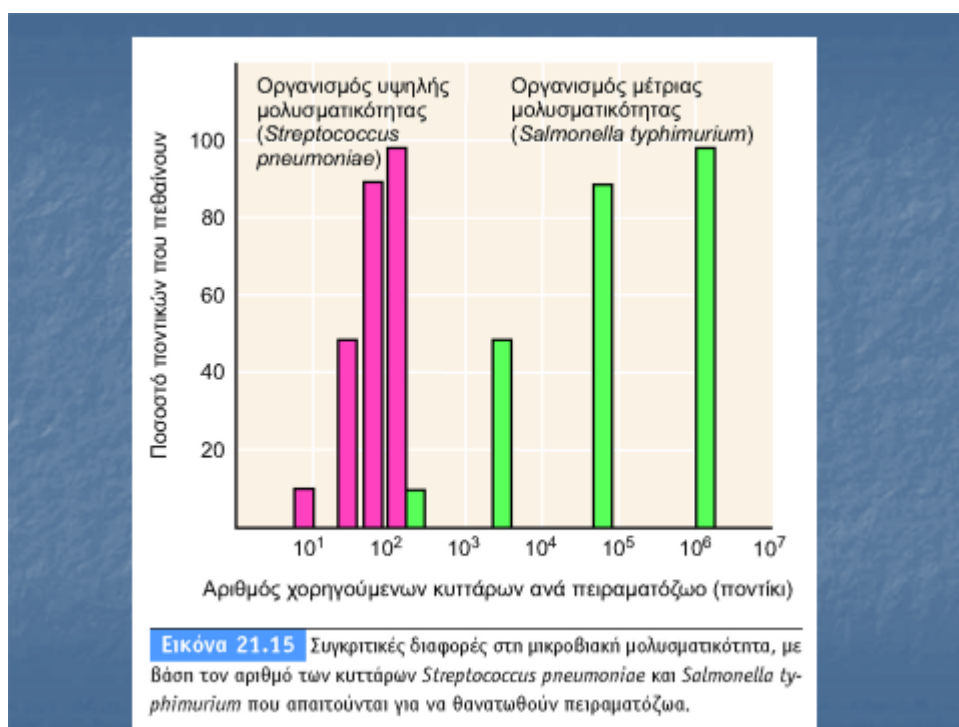
Οι όροι μόλυνση και ασθένεια δεν είναι ταυτόσημοι. **Μόλυνση** είναι η ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού στον ξενιστή ανεξάρτητα από το εάν προκαλεί βλάβη στο ξενιστή ή όχι. Στην περίπτωση που προκαλεί βλάβη τότε ονομάζεται **μικροβιακή ασθένεια**

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

Βλαβερές αλληλεπιδράσεις ανθρώπου-παθογόνων

Πολλοί μικροοργανισμοί όχι απλώς μολύνουν αλλά βλάπτουν τον ξενιστή τους χρησιμοποιώντας διαφορετικές στρατηγικές για να αυξήσουν την μολυσματικότητα τους (virulence). Η μολυσματικότητα μπορεί να εκτιμηθεί πειραματικά από μελέτες του LD₅₀ (lethal dose₅₀) δηλαδή του αριθμού των βακτηριακών κυττάρων που

απαιτούνται προκειμένου να πεθάνει το 50% των πειραματόζωων που μολύνονται πειραματικά. . Με βάση την τιμή του LD₅₀ καθορίζεται η επικινδυνότητα ενός παθογόνου.



Οι περισσότεροι παθογόνοι μικροοργανισμοί όταν διατηρούνται για μεγάλο διάστημα σε εργαστηριακές καλλιέργειες γίνονται λιγότερο μολυσματικοί εξαιτίας της επικράτησης μη-μολυσματικών μεταλλαγμάτων στον μικροβιακό πληθυσμό. Η συσσώρευση τυχαίων μεταλλάξεων στο γονιδίωμα ενός παθογόνου το καθιστά όταν αναπτύσσεται σε εργαστηριακές συνθήκες λιγότερο παθογόνου καθώς πολλοί (π.χ παραγωγή τοξινών) μολυσματικοί παράγοντες δεν του προσδίδουν κάποιο προσαρμοστικό όφελος. Η μολυσματικότητα οφείλεται στην ικανότητα των παθογόνων να προκαλούν ασθένειες μέσω της τοξικότητάς τους (*Clostridium tetani*) και της ικανότητάς τους να εισβάλλουν στον ξενιστή και να αντιμετωπίζουν την ανοσολογική του απόκριση πολλές φορές με καταστροφικές εκτεταμένες φλεγμονές για τον ξενιστή (*Streptococcus pneumoniae*).

Παράγοντες μολυσματικότητας και τοξίνες

Πολλοί μολυσματικοί παράγοντες είναι ένζυμα (πχ πρωτεάσες, λιπάσες, υαλουρονιδάση) που επιτρέπουν στο παθογόνο να αποικίσει τον ξενιστή και να

αναπτυχθεί μέσα σε αυτόν. Οι διάφορες τοξίνες είναι επίσης μολυσματικοί παράγοντες που ενισχύουν την τοξικότητα του παθογόνου και προκαλούν **άμεση βλάβη** στον ξενιστή. Οι τοξίνες διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες τις εξωτοξίνες, και τις ενδοτοξίνες.

Οι εξωτοξίνες είναι πρωτεΐνες που απελευθερώνονται εξωκυτταρικά κατά την διάρκεια ανάπτυξης του παθογόνου. Δεν παραμένουν μόνο στο σημείο μόλυνσης του παθογόνου αλλά μπορούν να μεταφερθούν σε άλλα όργανα και ιστούς του ξενιστή.

Οι περισσότερες εξωτοξίνες ανήκουν σε μία από τις 3 κατηγορίες: **κυτταρολυτικές, τοξίνες τις A-B τοξίνες και τις υπεραντιγονικές τοξίνες**. Οι κυτταρολυτικές δρουν ενζυμικά και προκαλούν λύση του κυττάρου, οι τοξίνες A-B αποτελούνται από δύο υπομονάδες. Η υπομονάδα B συνήθως δεσμεύεται σε συγκεκριμένο κυτταρικό υποδοχέα και μεταφέρει την υπομονάδα A μέσα στο κύτταρο-στόχο. Οι υπεραντιγονικές τοξίνες υπερδιεγείρουν την ανοσοαπόκριση του ξενιστή με αποτέλεσμα εκτεταμένες φλεγμονώδεις αποκρίσεις.

Κυτταρολυτικές τοξίνες



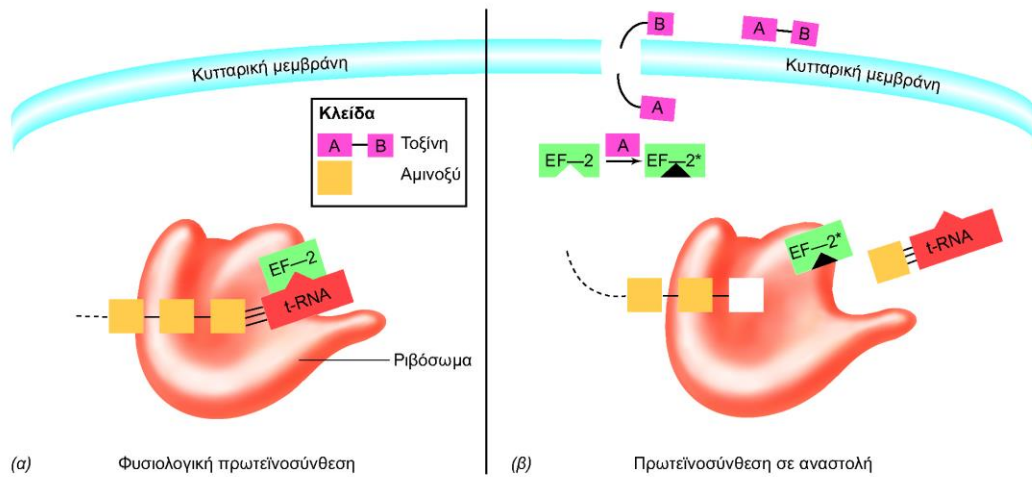
Οι κυτταρολυτικές τοξίνες δρουν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων προκαλούν την λύση τους και κατά συνέπεια κυτταρικό θάνατο. Η δράση τους μπορεί να ανιχνευθεί με ερυθροκύτταρα για αυτό συχνά ονομάζονται αιμολυσίνες. Ένα

παθογόνο που παράγει αιμολυσίνες εάν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο που περιέχει αίμα θα δώσει αποικίες που περιβάλλονται από ζώνη αιμόλυσης (καταστροφή των ερυθροκυττάρων που περιέχονται στο θρεπτικό μέσο). Οι κυτταρολυτικές τοξίνες επιδρούν στα φωσφολιπίδια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του ξενιστή. Επειδή το φωσφολιπίδιο λεκιθίνη αποτελεί συχνά υπόστρωμα τους ονομάζονται και λεκιθινάσες ή φωσφολιπάσες. Αυτό δεν σημαίνει ότι όλες οι αιμολυσίνες είναι φωσφολιπάσες καθώς μπορεί να δρουν σε άλλα συστατικά της μεμβράνης (πχ στερόλες).

A-B τοξίνες (τοξίνη διφθερίτιδας, τετάνου, αλλαντιάσης, εντεροτοξίνες).

Η τοξίνη αυτή παράγεται από το βακτήριο *Corynebacterium diphtheriae* και ανήκει στις A-B τοξίνες. Η τοξίνη αυτή εκκρίνεται από το βακτήριο ως ένα πολυπεπτιδίο 62 kDa. Το τμήμα του πολυπεπτιδίου που αντιστοιχεί στην υπομονάδα B δεσμεύεται σε έναν υποδοχέα του ξενιστή. Μετά την δέσμευση, πρωτεόλυση του πολυπεπτιδίου επιτρέπει την είσοδο της υπομονάδας A μέσα στο κύτταρο. Η υπομονάδα A αδρανοποιεί τον παράγοντα επιμήκυνσης-2 (πρωτεΐνη που μεταφέρει ενεργοποιημένα αμινοξέα κατά μήκος της πεπτιδικής αλυσίδας στα ριβοσώματα) με αποτέλεσμα την καταστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Η παραγωγή της τοξίνης γίνεται μόνο από στελέχη τα οποία έχουν υποστεί τροποποίηση φάγου (δηλ. έχουν υποστεί λυσιγονία, με ενσωμάτωση γονιδιώματος φάγου) και μόνο σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου. Η εξωτοξίνη A που παράγεται από την *Pseudomonas aeruginosa* (ευκαιριακό παθογόνο που προκαλεί ενδονοσοκομιακές λοιμώξεις και σε ασθενείς που πάσχουν από κυστική ίνωση) έχει παρόμοιο τρόπο δράσης



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

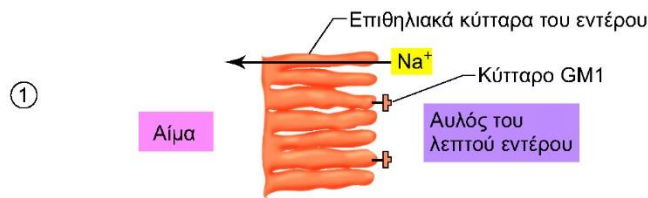
Τοξίνες του τέτανου και αλλαντίασης

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

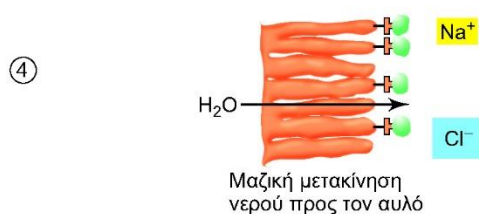
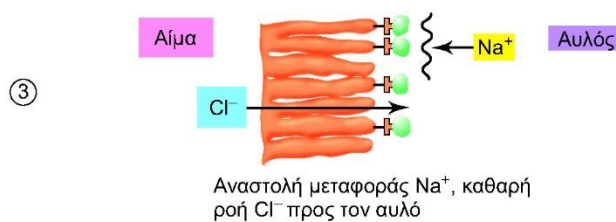
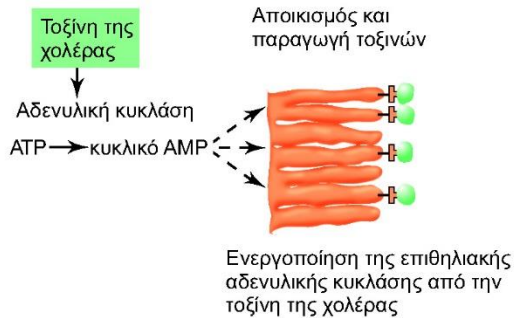
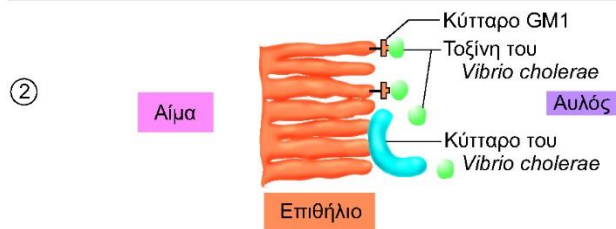
Εντεροτοξίνες

Οι εντεροτοξίνες επιδρούν στο λεπτό έντερο προκαλώντας μαζική έκκριση νερού που οδηγεί σε διάρροια. Παράγονται από διάφορα βακτήρια όπως αυτά που προκαλούν τροφικές δηλητηριάσεις (*Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*) και άλλα εντεροπαθογόνα (*Salmonella enteritidis*, *Vibrio cholera*). Η τοξίνη της χολέρας που παράγεται από το *Vibrio cholera* είναι η καλύτερα μελετημένη εντεροτοξίνη. Ανήκει στις A-B τοξίνες και ενεργοποιεί το ένζυμο αδενυλική κυκλάση με αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή cAMP. Στα θηλαστικά το μόριο αυτό εμπλέκεται στην δράση

ορμονών, σε ανοσοαποκρίσεις (αλλεργικές αντιδράσεις) και φλεγμονές. Στην περίπτωση της χολέρας αυξημένα επίπεδα cAMP οδηγούν σε μεγάλη έκκριση ιόντων χλωρίου και διττανθρακικών από τα κύτταρα του λεπτού εντέρου. Η αλλαγή της συγκέντρωσης των ιόντων οδηγεί σε ακατάσχετη διάρροια και σε κάποιες περιπτώσεις στο θάνατο λόγω αφυδάτωσης



Φυσιολογική κίνηση ιόντων: Na⁺ κινείται από τον αυλό προς το αίμα· δεν υπάρχει καθαρή ροή Cl⁻



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

Ενδοτοξίνες

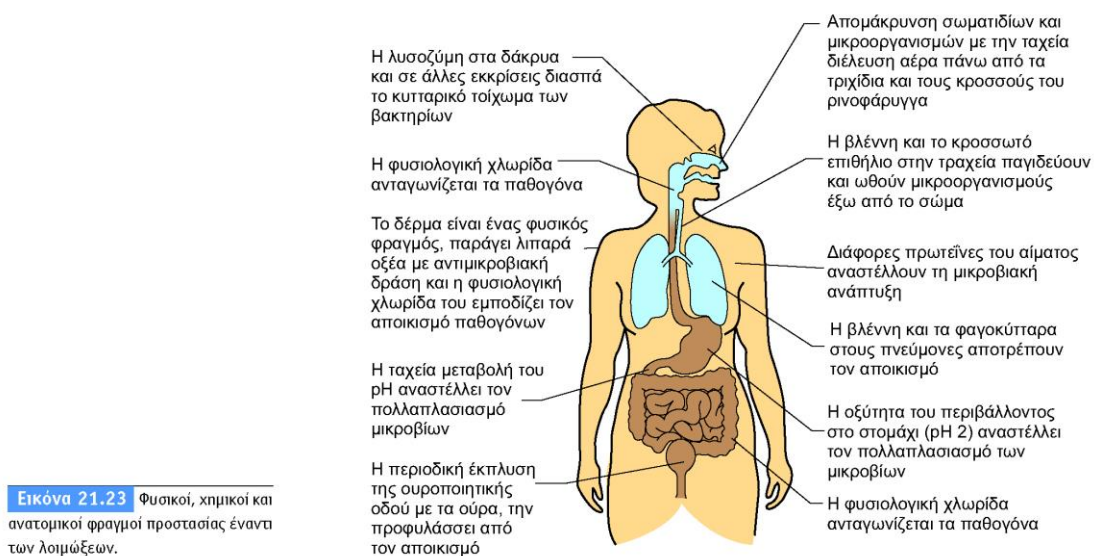
Τα Gram-αρνητικά βακτήρια παράγουν λιποπολυσακχαρίτες ως μέρος της εξωτερικής επιφάνειας του κυτταρικού τους τοιχώματος που σε κάποιες περιπτώσεις δρουν ως τοξίνες και λέγονται ενδοτοξίνες. Οι ενδοτοξίνες είναι πυρετογόνες γιατί διεγείρουν την απελευθέρωση από τα κύτταρα του ξενιστή κάποιων πρωτεϊνών (ενδογενή πυρετογόνα) που επηρεάζουν το θερμορυθμιστικό κέντρο του εγκεφάλου προκαλώντας πυρετό. Σε κάποιες περιπτώσεις προκαλούν διάρροια, πτώση του αριθμού των αιμοπεταλίων, των λεμφοκυττάρων και των λευκοκυττάρων καθώς και γενική φλεγμονή. Σε μεγάλες δόσεις μπορεί να προκαλέσουν θάνατο λόγω νέκρωσης ιστών και αιμορραγικού σοκ. Σε κάθε περίπτωση είναι λιγότερο τοξικές από τις εξωτοξίνες. Επειδή οι ενδοτοξίνες είναι πυρετογόνα, φαρμακευτικές ουσίες όπως αντιβιοτικά και ενδοφλέβια διαλύματα πρέπει να μην τις περιέχουν. Για αυτό το λόγο αναπτύχθηκε μια εργαστηριακή δοκιμή ανίχνευσης ενδοτοξινών που χρησιμοποιεί αμοιβαδοκύτταρα του θαλάσσιου αρθρόποδου *Limulus polyphemus*. Οι ενδοτοξίνες προκαλούν λύση των κυττάρων αυτών σε απειροελάχιστες ποσότητες οπότε η δοκιμή αυτή χαρακτηρίζεται από εξαιρετική ευαισθησία. Η λύση των κυττάρων μπορεί να μετρηθεί ποσοτικά με την χρήση ενός φασματοφωτομέτρου (με την βοήθεια μιας πρότυπης καμπύλης) . Προσοχή πρέπει να δοθεί ώστε να μην υπάρξει μόλυνση των διαλυμάτων και των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται από Gram-αρνητικά βακτήρια αφού ακόμα και 10 pg/ml ενδοτοξίνης μπορούν να ανιχνευθούν με την μέθοδο αυτή

Παράγοντες που επηρεάζουν την ανθεκτικότητα ενός ξενιστή

Η ικανότητα ενός παθογόνου να προκαλεί ασθένεια ποικίλει ανάλογα με το ζωικό είδος που μολύνει και τον τρόπο επιμόλυνσης (πχ ο άνθρακας σκοτώνει αγελάδες, πρόβατα αλλά όχι τα πτηνά. Είναι θανατηφόρο παθογόνο στον άνθρωπο μόνο όταν μολύνει το αναπνευστικό του σύστημα μέσω αναπνοής)

Άλλοι παράγοντες που καθορίζουν την ανθεκτικότητα σε ένα παθογόνο είναι: η ηλικία (υπερευαισθησία των ηλικιωμένων σε λοιμώξεις του αναπνευστικού), το στρες (η έκκριση κορτιζόνης μειώνει την αντίσταση σε λοιμώξεις) και η διαίτα (πχ φτωχή σε πρωτεΐνες διατροφή προκαλεί ευκαιριακές λοιμώξεις και μειωμένη ανθεκτικότητα στο *Vibrio cholera*).

Γενετικές διαφορές από άτομο σε άτομο καθορίζουν την πιθανή ανθεκτικότητα του σε λοιμώξεις. Για παράδειγμα άτομα που έχουν ένα έλλειμα 32 βάσεων και στα δυο αλληλόμορφα στο γονίδιο του συνυποδοχέα CCR5 που είναι απαραίτητος για την είσοδο του HIV στα CD4 B-λεμφοκύτταρα, παρουσιάζουν μεγάλη ανθεκτικότητα στην μόλυνση τους με τον HIV. Ανάλογα άτομα που είναι ετερόζυγοι φορείς για το γονίδιο της δρεπανοκυτταρικής ή της μεσογειακής αναιμίας είναι πιο ανθεκτικά στην προσβολή τους από ελονοσία που προκαλείται από το *Plasmodium*. Η πρώτη γραμμή άμυνας (**έμφυτη ανοσία**) έναντι στις λοιμώξεις είναι επίσης πολύ σημαντική στην ανθεκτικότητα έναντι λοιμώξεων και εξαιρετικά συντηρημένη (εξελικτικά στους διάφορους ζωικούς οργανισμούς σε αντίθεση με την **προσαρμοστική ανοσία** που παρατηρείται μόνο στα σπονδυλωτά.



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

«Κλασσική» διαγνωστική βακτηριολογία

Η κλινική πρακτική απαιτεί την έγκαιρη ταυτοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών ώστε να δοθεί η κατάλληλη θεραπεία (π.χ αντιβιοτικά). Διαχρονικά αυτό γίνονταν και γίνεται ακόμα σε ένα βαθμό με την απομόνωση του παθογόνου αιτιολογικού παράγοντα από δείγμα του ασθενούς

Η σωστή δειγματοληψία (κάτω από ασηπτικές συνθήκες) και ο χειρισμός του δείγματος (κόπρανα, αίμα, ούρα, πτύελα κτλ) εξακολουθεί να είναι το πρώτο σημαντικό βήμα

Τα υπόλοιπα 5 βασικά βήματα της κλασσικής προσέγγισης είναι τα εξής:
ενοφθαλισμός, επώαση, διαχωρισμός, επιθεώρηση και ταυτοποίηση

- Ενοφθαλισμός σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα (γενικά, επιλεκτικά, διαφοροδιαγνωστικά). Τα γενικά επιτρέπουν την ανάπτυξη ενός μεγάλου φάσματος μικροοργανισμών π.χ θρεπτικός ζωμός. Τα επιλεκτικά την ανάπτυξη συγκεκριμένων ομάδων π.χ εντεροβακτήρια και τα διαφοροδιαγνωστικά επιτρέπουν την ταυτοποίηση συγκεκριμένων μικροοργανισμών λόγω των μεταβολικών τους ιδιοτήτων . Κλασσικό επιλεκτικό και διαφοροδιαγνωστικό θρεπτικό υπόστρωμα για εντεροβακτήρια είναι το McConkey
- Επώαση στις σωστές συνθήκες (π.χ θερμοκρασία, αναερόβιες συνθήκες)
- Διαχωρισμός αποικιών με ξεχωριστά μορφολογικά χαρακτηριστικά (σχήμα, υφή, παρουσία χρωστικών)
- Επιθεώρηση από εξειδικευμένο προσωπικό
- Ταυτοποίηση (τουλάχιστον σε επίπεδο είδους αν όχι στελέχους)

Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά στην διάγνωση

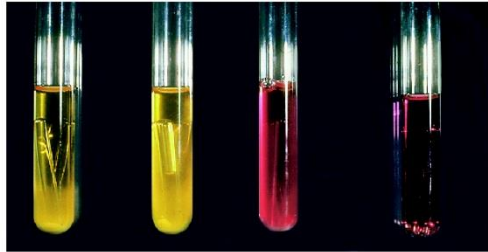
- Μορφολογία αποικιών (σχήμα, υφή, χαρακτηριστικές χρωστικές)
- Μικροσκοπική παρατήρηση μετά από χρώση (χρώση κατά Gram, οξεοάντοχη χρώση για Mycobacterium tuberculosis, χρώση ενδοσπορίων)
- Πολλές φορές στην κλασσική διαγνωστική επιβεβαίωση απαιτείται και με **βιοχημικές μεθόδους**

Βιοχημικές μέθοδοι ταυτοποίησης παθογόνων

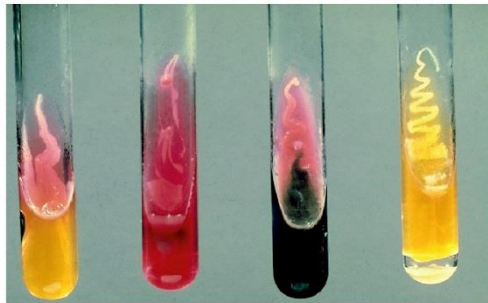
Τα βακτήρια που απομονώνονται από ένα κλινικό δείγμα πρέπει να ταυτοποιηθούν και από τις βιοχημικές τους ιδιότητες που τα διαχωρίζουν από τα υπόλοιπα βακτηριακά είδη ή γένη. Η δημιουργία ενός «βιοχημικού-μεταβολικού προφίλ» είναι μια επίπονη, χρονοβόρα διαδικασία που απαιτεί μια σειρά ενζυμικών μετρήσεων και χρήσης πολλών διαφορετικών θρεπτικών υποστρωμάτων. Η σμίκρυνση των δοκιμών αυτών οδήγησε σε σημαντική μείωση του χρόνου ταυτοποίησης και εξοικονόμησης αντιδραστηρίων. Υπάρχουν στο εμπόριο διαφορετικά «κιτ» τα οποία χρησιμοποιούνται κατά κόρον για την βιοχημική ταυτοποίηση βακτηρίων. Τα περισσότερα από αυτά περιέχουν τουλάχιστον 20-30 διαφορετικά θρεπτικά μέσα και ενζυμικά υποστρώματα επιλεγμένα έτσι ώστε να ταυτοποιούν συγκεκριμένες ομάδες βακτηρίων ή βακτηριακά είδη. Ο ενοφθαλισμός ενός δείγματος του παθογόνου γίνεται στα κυτία που περιέχουν τα διάφορα ενζυμικά και θρεπτικά υποστρώματα. Τα περισσότερα από αυτά τα «κιτ» δίνουν αποτελέσματα μετά από 18-24 ώρες επώασης. Το βιοχημικό προφίλ δημιουργείται με βάση τις θετικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται παρουσία του παθογόνου προς ταυτοποίηση (εύκολα αντιληπτές χρωματικές αλλαγές). Οι θετικές αυτές αντιδράσεις ομαδοποιούνται και οδηγούν σε ένα είδος βιοχημικής ταυτότητας που οδηγεί μέσω μιας κλείδας προσδιορισμού στην ταυτοποίηση του παθογόνου. Η ακρίβεια ταυτοποίησης των «κιτ» είναι της τάξεως του 90-99%. Τα περισσότερα από αυτά είναι σχεδιασμένα για την ταυτοποίηση εντεροβακτηρίων αλλά υπάρχουν διαθέσιμα και άλλα που ταυτοποιούν *Campylobacter*, *Listeria*, αναερόβια βακτήρια, Gram-θετικά βακτήρια κτλ.

Υπάρχουν κάποια αυτοματοποιημένα συστήματα (πχ το Vitek από την εταιρεία bioMérieux) τα οποία τα οποία ελέγχουν συνεχώς τις αλλαγές των βιοχημικών αντιδράσεων, δημιουργούν αυτόματα το βιοχημικό προφίλ και το συγκρίνουν με την βάση δεδομένων που υπάρχει ενσωματωμένη στο σύστημα και βγάζουν το αποτέλεσμα της ταυτοποίησης. Ένα άλλο αυτοματοποιημένο σύστημα (το MIS από την εταιρεία Microbial-ID) χρησιμοποιεί αέρια χρωματογραφία (FAME ανάλυση) για να δημιουργήσει το προφίλ των λιπαρών οξέων των βακτηρίων και το συγκρίνει με την βάση δεδομένων

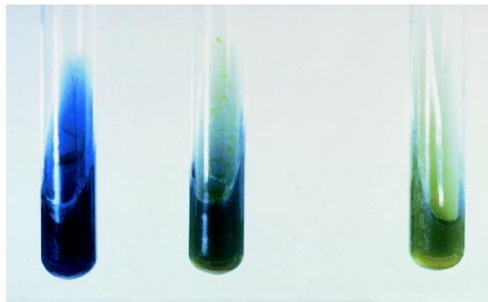
προκειμένου να γίνει ταυτοποίηση. Τα λιπαρά οξέα των βακτηρίων χρησιμοποιούνται πολύ συχνά ως ταξινομικό κριτήριο και άρα για την ταυτοποίηση βακτηρίων καθώς τόσο τα είδη των λιπαρών οξέων όσο και η αναλογία τους είναι μοναδικά για κάθε βακτήριο (μοριακή ταυτότητα).



(α)



(β)



(γ)



(δ)



(ε)

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

Μειονεκτήματα κλασσικής διαγνωστικής βακτηριολογίας

Χρονοβόρα διαδικασία (τουλάχιστον 24-48 ώρες, σε κάποιες περιπτώσεις και εβδομάδα π.χ Mycobacterium tuberculosis). Σε πολλές περιπτώσεις είναι ζήτημα ζωής η θανάτου η διάγνωση να γίνει όσο το δυνατόν γρηγορότερα.

Αρκετά μεγάλη πιθανότητα λάθους ειδικά αν στηρίζεται μόνο σε μορφολογικά χαρακτηριστικά και όχι ΚΑΙ βιοχημικά.

Απαιτείται η ανάπτυξη του παθογόνου κάτι που δεν είναι πάντα εφικτό καθώς πρέπει να χρησιμοποιηθούν εξαρχής τα κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα. Σε πολλές περιπτώσεις οι παθογόνοι μικροοργανισμοί έχουν ιδιαίτερες απαιτήσεις καλλιέργειας και μέσα από την κλινική εικόνα του ασθενούς πρέπει ο θεράπων ιατρός να «μαντέψει» τους πιθανούς αιτιολογικούς παράγοντες ώστε να γίνει σωστή επιλογή των συνθηκών καλλιέργειας

Υπάρχει η πιθανότητα ακόμα και να αναπτύσσεται φυσιολογικά το παθογόνο στα θρεπτικά υποστρώματα να μην συμβεί διότι είναι μεν βιώσιμο αλλά μη καλλιεργήσιμο. Αρκετά βακτηριακά είδη υπάρχουν σε μια κατάσταση όπου ενώ είναι ζωντανά δεν μπορούν να καλλιεργηθούν με τις κλασσικές μικροβιολογικές μεθόδους (VNC) . Η είσοδος σε αυτή την κατάσταση είναι μια στρατηγική επιβίωσης που ακολουθείται από βακτήρια που δεν σποριώνονται. Τα βακτήρια σε αυτή την κατάσταση έχουν διαφορετική μορφολογία από την κανονική.

Η ύπαρξη των βακτηρίων αυτών και η διαφοροποίηση τους από νεκρά βακτήρια μπορεί να δειχτεί με την βοήθεια κυτταρολογικών μεθόδων πχ χρήση χρωστικών που φθορίζουν. Άλλος τρόπος διάκρισης είναι η χρήση του ιώδους του ιοδονιτροτετραζολίου το οποίο ανάγεται από τα VNC βακτήρια και σχηματίζει αδιάλυτα συσσωματώματα που διακρίνονται στο μικροσκόπιο.

Τα VNC βακτήρια επανέρχονται στην κατάσταση όπου μπορούν να καλλιεργηθούν μετά από αλλαγές της θερμοκρασίας ή διαθεσιμότητα θρεπτικών στο περιβάλλον.

Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών

Μέθοδοι ανίχνευσης παθογόνων βασισμένες στα νουκλεϊκά οξέα

Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν να ανιχνευτούν και με μεθόδους βασισμένες στα νουκλεϊκά οξέα και πιο συγκεκριμένα του DNA. Η ανίχνευση γονιδίων των παθογόνων γίνεται με τον υβριδισμό DNA-DNA (Southern blotting). Επισημασμένα ολιγονουκλεοτίδια (ιχνηθέτες) υβριδίζονται με το DNA του παθογόνου και ο

υβριδισμός ανιχνεύεται με αυτοραδιογραφία ή χρωματομετρικά. Πολύ συχνά για την ταυτοποίηση ενός παθογόνου χρησιμοποιείται το γονίδιο του 16S rRNA. Το 16S rRNA είναι δομικό συστατικό της μικρής υπομονάδας των προκαρυωτικών μικροοργανισμών και κωδικοποιείται από ένα γονίδιο μεγέθους περίπου 1500 ζευγών βάσεων το οποίο είναι εξαιρετικά συντηρημένο και η αλληλουχία του οποίου είναι μοναδική για κάθε είδος (άρα είναι ένα είδος μοριακής ταυτότητας). Το γεγονός ότι τα βακτηριακά γονίδια που κωδικοποιούν 16S rRNA βρίσκονται σε πολλά αντίτυπα και είναι χαρακτηριστικά του κάθε είδους επιτρέπει την μεγαλύτερη ευαισθησία και εξειδίκευση της μεθόδου.

Στόπωμα κατά Southern (Southern blotting).

Αναπτύχθηκε από τον E.M. Southern το 1975 και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση συγκεκριμένων τμημάτων DNA σε ένα δείγμα (π.χ του γονιδίου 16S rRNA ή γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά). Το DNA προς ανίχνευση μπορεί να είναι ένα ή και περισσότερα γονίδια ή ακόμα και ολόκληρο γονιδιώμα (π.χ ιού). Όπως αναφέρθηκε η μέθοδος στηρίζεται στον υβριδισμό DNA-DNA. Τα κυριότερα βήματα της μεθόδου είναι τα παρακάτω

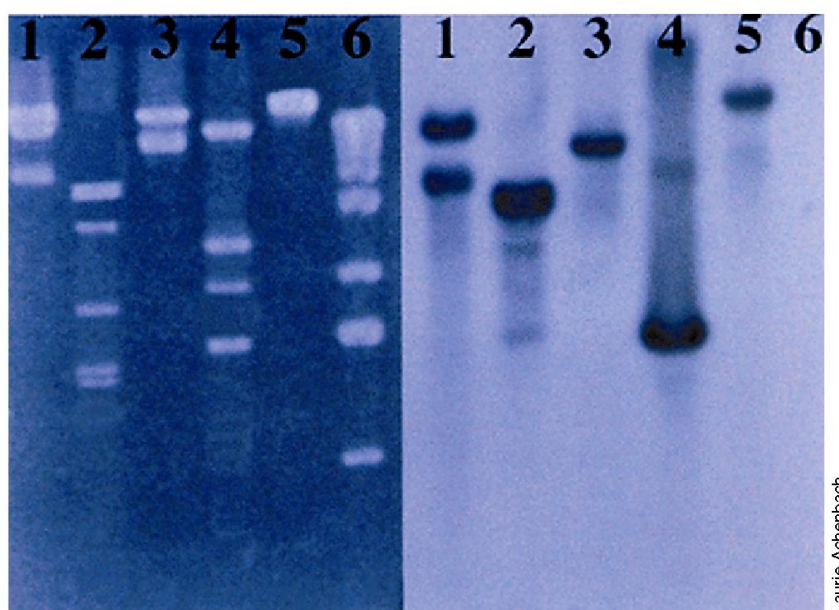
1. Απομόνωση, θρυμματισμός και διαχωρισμός μείγματος μορίων DNA
2. Τα μόρια ακινητοποιούνται σε μια μεμβράνη
3. Προστίθεται ο ιχνηθέτης
4. Απομακρύνεται η περίσσια του ιχνηθέτη
5. Ανίχνευση της θέσης υβριδισμού του ιχνηθέτη

Απομόνωση, θρυμματισμός και διαχωρισμός του DNA

Απομόνωση του DNA με χημική λύση των βακτηριακών κυττάρων (σε αλκαλικό pH). Οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με χημική μετουσίωση και φυγοκέντρηση. Το DNA καθαρίζεται περαιτέρω με ειδικές ρητίνες και καθίζηση αιθανόλης. Το DNA θρυμματίζεται με την χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών σε διαφορετικά μεγέθη (τυχαία διαδικασία)

Ο διαχωρισμός των τμημάτων του DNA επιτυγχάνεται σε πήκτωμα (συνήθως αγαρόζης) με ηλεκτροφόρηση. Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το μέγεθος των τμημάτων του DNA, την συγκέντρωση της αγαρόζης, την τάση του ηλεκτρικού πεδίου. Ακολουθεί η μεταφορά του DNA από το πήκτωμα σε στερεό υπόβαθρο.

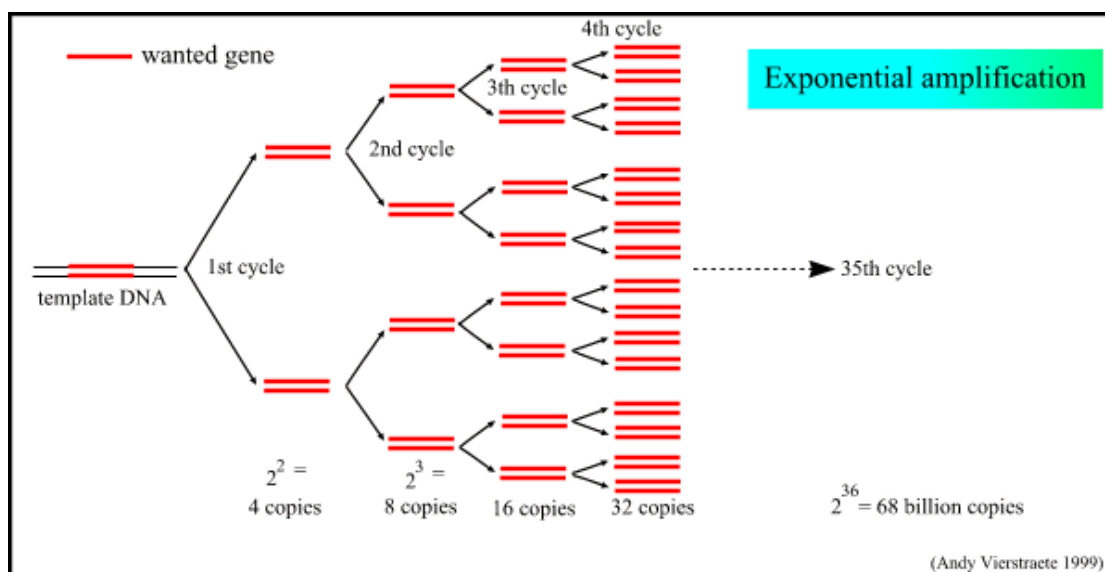
Το υπόβαθρο είναι μεμβάνη νιτροκυτταρίνης ή θετικά φορτισμένη Nylon μεμβράνη. Κατά την διάρκεια της μεταφοράς το DNA αποδιατάσσεται και παραμένει σε αυτή την κατάσταση. Στην συνέχεια προετοιμάζεται ο ιχνηθέτης δηλ. σημαίνεται ένα ή περισσότερα ολιγονουκλεοτίδια είτε με την χρήση ραδιοϊσοτόπων (φώσφορος -32 πολύ συχνά) είτε με μη ραδιενεργές ουσίες (π.χ διγοξυγενίνη, δευτερογενής μεταβολίτης φυτικής προέλευσης). Προστίθεται ο ιχνηθέτης και πραγματοποιείται ο υβριδισμός, απομακρύνεται η περίσσεια του και πραγματοποιείται η ανίχνευση του (αυτοραδιογραφία ή ανίχνευση μέσω ενζυμικής αντίδρασης π.χ αλκαλική φωσφατάση)



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

PCR - Polymerase Chain Reaction

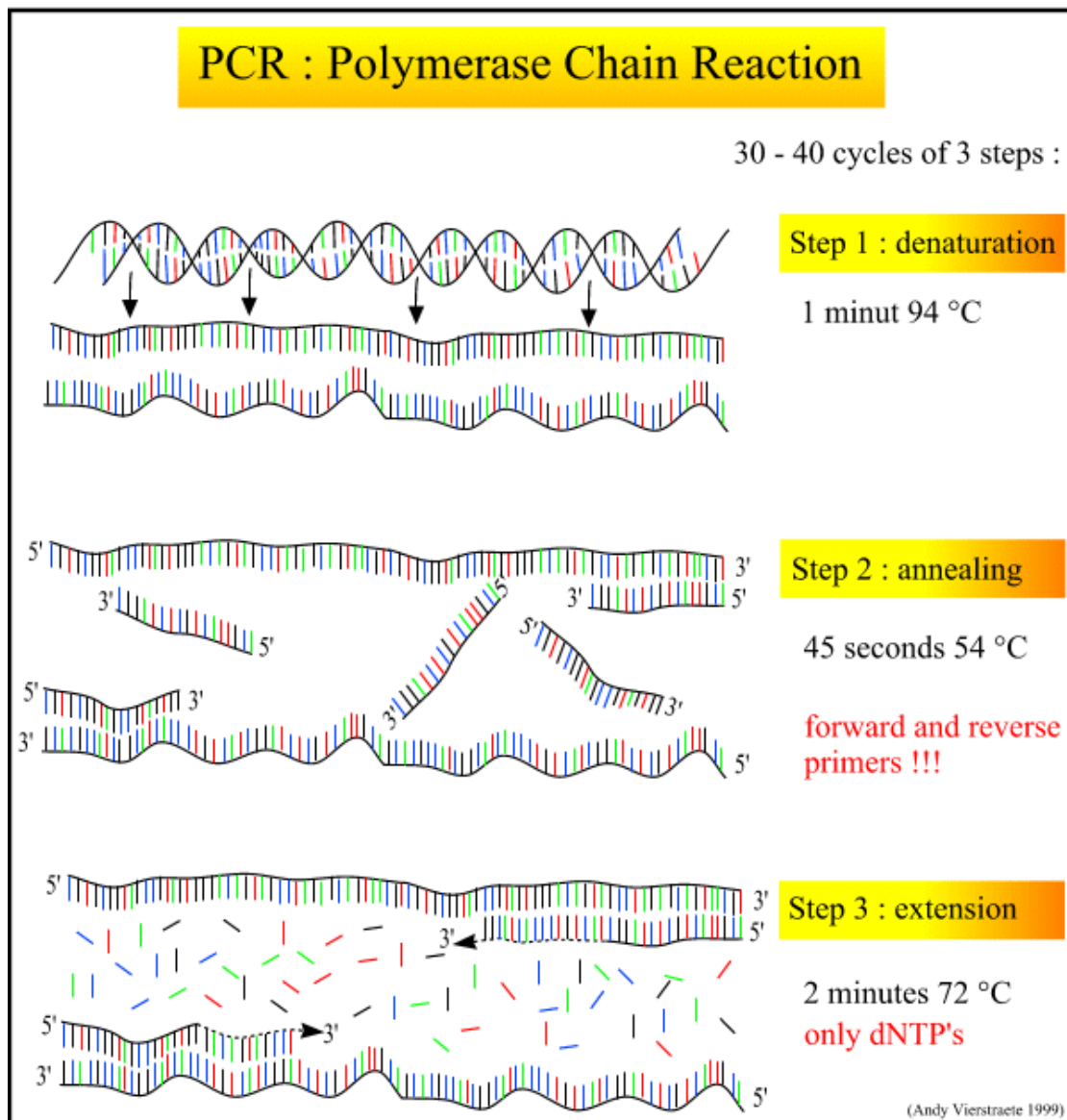
Η PCR είναι μία *in vitro* τεχνική για την ενίσχυση μιας περιοχής του DNA μεταξύ δύο περιοχών γνωστής αλληλουχίας με την χρήση ολιγονουκλεοτιδικών **εκκινητών**. Οι εκκινητές υβριδίζονται σε συμπληρωματικές περιοχές των αποδιαταγμένων κλώνων του DNA στόχου. Αυτό έχει αποτέλεσμα την σύνθεση πολλαπλών αντιγράφων του DNA μέσα από μια διαδικασία πολλών κύκλων επιμήκυνσης .



Τα βήματα ενός κύκλου της PCR

1. Μετουσίωση (αποδιάταξη) του DNA στόχου σε υψηλή θερμοκρασία
2. Υβριδισμός των εκκινητών σε συμπληρωματικές περιοχές DNA στόχου

3. . Επιμήκυνση των συμπληρωματικών αλυσίδων του δίκλωνου DNA στόχου

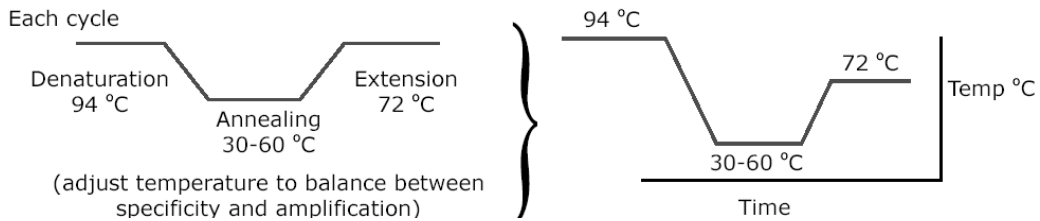


Τι περιέχει κάθε αντίδραση PCR

PCR reaction contains

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

Mix is subjected to temperature cycling



Τι λαμβάνεται υπόψη για την επιλογή κατάλληλων εκκινητών

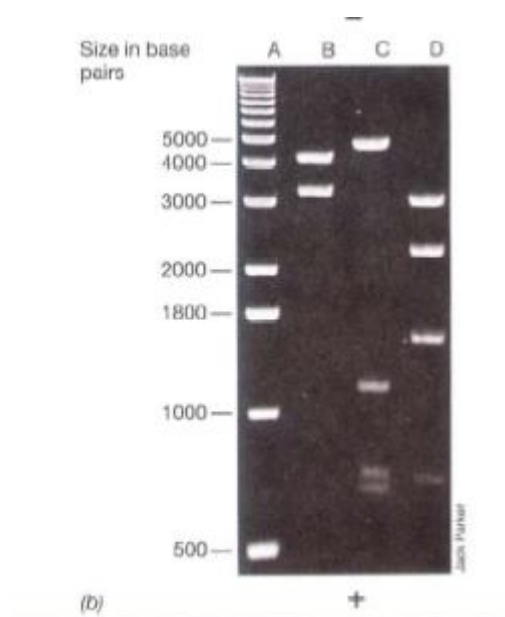
Η σωστή επιλογή καθορίζει την επιτυχία ή όχι της ενίσχυσης. Συμπληρωματικότητα με τον DNA στόχο (μεγάλη εξειδίκευση ενίσχυσης)

- Για τον σχεδιασμό λαμβάνονται υπόψη και οι δύο κλώνοι του DNA στόχου (forward, reverse primers)
 - Το ποσοστό G-C βάσεων στον εκκινητή μήκους 20-30 βάσεων, πρέπει να είναι περίπου 50%, Η θερμοκρασία αποδιάταξης του εκκινητή καθορίζει την θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών (αρκετούς βαθμούς χαμηλότερη, συνήθως 55-60 βαθμούς κελσίου)
 - Μη συμπληρωματικότητα μεταξύ των εκκινητών (αποφυγή primer dimers). Ο σχηματισμός διμερών των εκκινητών μειώνει την απόδοση της αντίδρασης καθώς δεν είναι διαθέσιμη μεγάλη συγκέντρωση των εκκινητών για την πραγματοποίηση της.

DNA Πολυμεράση το βασικό ένζυμο της αντίδρασης

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

Οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων μέσω ηλεκτροφόρησης των προϊόντων σε πήκτωμα αгарόζης.

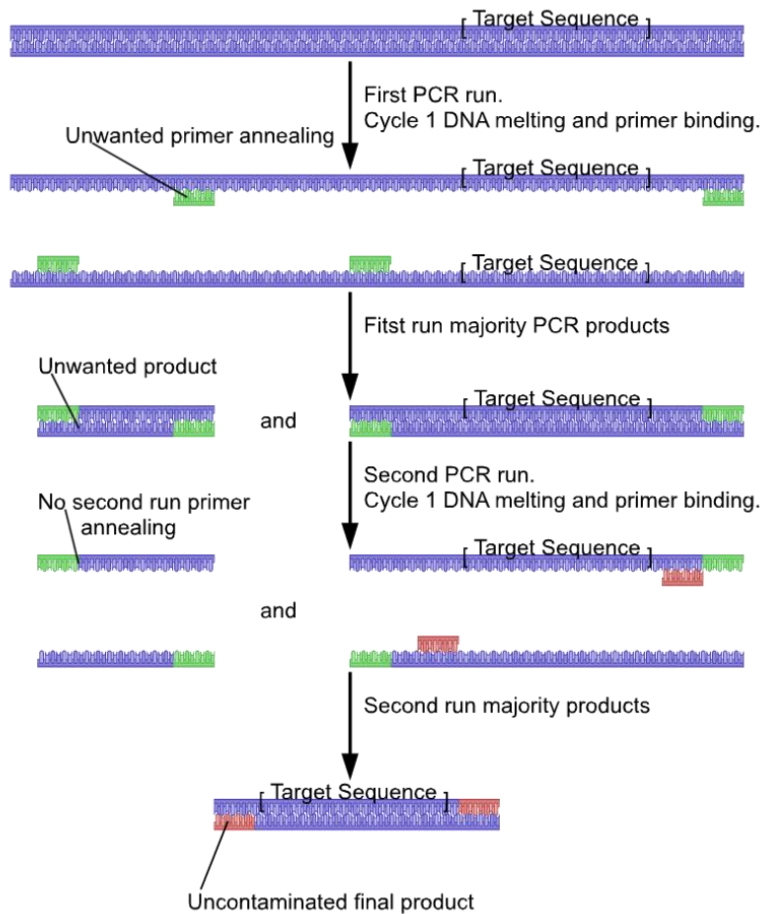


Τροποποιήσεις (παραλλαγές) της PCR

Nested PCR

Μεγαλύτερη εξειδίκευση (αποφυγή παραπροϊόντων). Σε πολλές περιπτώσεις μπορεί ένας εκκινήτης να υβριδιστεί σε λάθος σημείο όπου να ενισχύσει λανθασμένα μια μεγαλύτερη ή μικρότερη περιοχή με αποτέλεσμα την παραγωγή παραπροϊόντων. Η συγκεκριμένη μέθοδος βοηθάει στην μείωση ή και στην εξάλειψη τους.

Βασίζεται στην χρήση δευτέρου εσωτερικού ζεύγους εκκινήτων για την πραγματοποίηση δεύτερης αντίδρασης PCR, χρησιμοποιώντας τα προϊόντα της πρώτης ως DNA-στόχο. Η μέθοδος αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την ανίχνευση παθογόνων σε πολύ μικρούς αριθμούς (π.χ ανίχνευση ιών).



Multiplex PCR

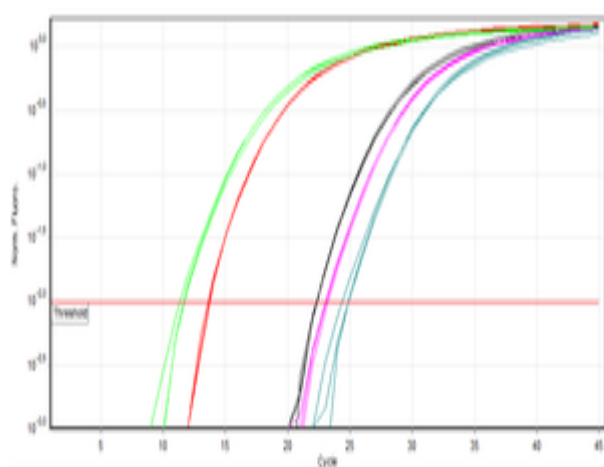
- Ταυτόχρονη χρήση πολλαπλών ζευγών εκκινητών σε μια αντίδραση PCR.
- Ενίσχυση πολλαπλών στόχων (είτε γονίδια του ίδιου βακτηρίου, άρα πιο ακριβής ανίχνευση, είτε γονίδια διαφορετικών βακτηρίων άρα ταυτόχρονη διάγνωση περισσότερών του ενός παθογόνων)
- Σημαντικό είναι οι εκκινητές να σχεδιαστούν με τέτοιο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

Real-Time PCR (qRT-PCR). PCR πραγματικού χρόνου ή ποσοτική PCR.

Χρήση εκκινητών προσδεδεμένων με φθορίζουσες χρωστικές (συνήθως SYBR Green).

Ανίχνευση προϊόντων σε πραγματικό χρόνο (δεν χρειάζεται ηλεκτροφόρηση). Η ανίχνευση γίνεται με ειδικό λογισμικό που συνοδεύει την συσκευή της qRT-PCR.

Μέσου του ίδιου λογισμικού γίνεται ποσοτικοποίηση των προϊόντων (αριθμός αντιγράφων DNA στόχου) και ταυτόχρονη ανίχνευση διαφορετικών προϊόντων

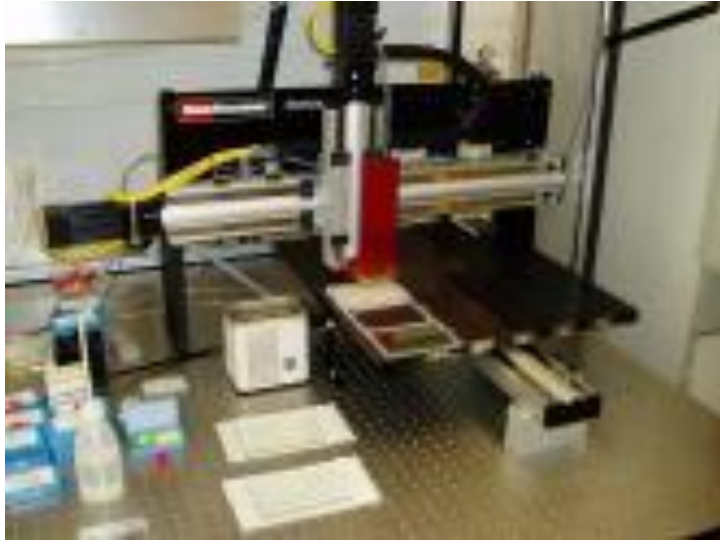


Στο γράφημα φαίνεται η ταυτόχρονη ανίχνευση προϊόντων διαφορετικών στελεχών παθογόνων μικροοργανισμών. Τα προϊόντα θεωρούνται θετικά όταν η συγκέντρωσή τους ξεπεράσει ένα κατώφλι (οριζόντια γραμμή). Χρονικά όσο πιο γρήγορα συμβεί αυτό σχετίζεται με υψηλότερο αριθμό κυττάρων του παθογόνου στο δείγμα του ασθενούς.

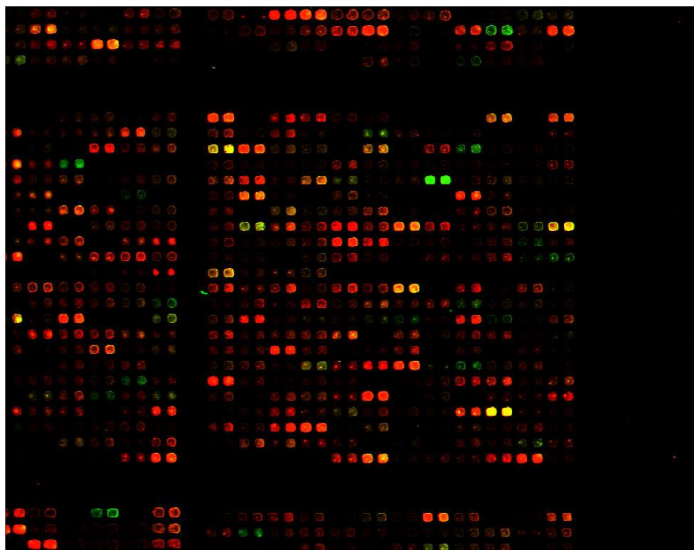
Μικροσυστοιχίες DNA (DNA microarrays)

Η βασική αρχή πάνω στην οποία στηρίζονται οι μικροσυστοιχίες DNA είναι ο υβριδισμός DNA- DNA. Η τεχνολογία αυτή δανείστηκε την φωτολιθογραφία από την κατασκευή μικροεπεξεργαστών ηλεκτρονικών υπολογιστών για την «εκτύπωση» DNA ολιγονουκλεοτιδίων σε γυαλί ή πλαστική μεμβράνη. Με αυτό τον τρόπο ολιγονουκλεοτίδια τα οποία αντιπροσωπεύουν ολόκληρο το γονιδίωμα (όλα τα γονίδια) ενός μικροοργανισμού μπορούν να τοποθετηθούν σε συστοιχίες πάνω σε ένα DNA chip. Η τεχνολογία αυτή χρησιμοποιείται τις περισσότερες φορές για μελέτες γονιδιακής έκφρασης (transcriptomics) σε επίπεδο ολόκληρου γονιδιώματος αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την ταυτόχρονη μοριακή διάγνωση πολλών παθογόνων μικροοργανισμών με ιδιαίτερα παθογόνα χαρακτηριστικά (π.χ παραγωγή ή όχι τοξινών, ανθεκτικότητα σε διάφορα αντιβιοτικά) προσφέροντας έτσι πολύτιμες πληροφορίες τόσο για το είδος του παθογόνου αλλά και για την θεραπευτική αντιμετώπιση του. Τα ολιγονουκλεοτίδια που αποτελούν την μικροσυστοιχία

συνθέτονται είτε *in situ*, είτε με PCR και στην συνέχεια τοποθετούνται πάνω στο DNA chip. Επισημασμένο DNA του δείγματος που εξετάζεται υβριδίζεται με τα ολιγονουκλεοτίδια της μικροσυστοιχίας.



Συσκευή κατασκευής μικροσυστοιχίων

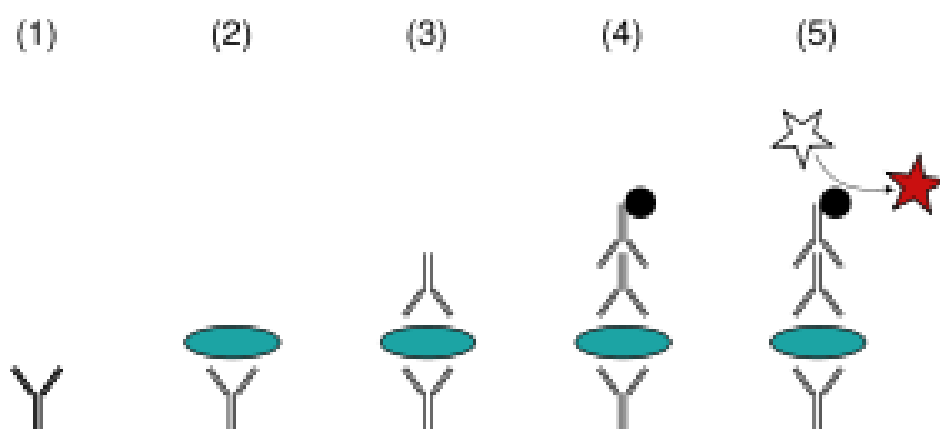


Οπτικοποίηση αποτελεσμάτων πειράματος με την χρήση μικροσυστοιχίων

Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης παθογόνων που βασίζονται στα αντισώματα

ELISA

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



Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου sandwich ELISA

Ανοσοκαθίζηση (Immunoprecipitation)

Η μέθοδος αυτή άρχισε να χρησιμοποιείται πρόσφατα για την ανίχνευση παθογόνων και κερδίζει συνεχώς έδαφος.

Η αρχή της μεθόδου είναι παρόμοια με αυτή της sandwich ELISA με την διαφορά ότι το αντίσωμα που αντιδρά με το αντιγόνο αντί να σχηματίζει σύμπλοκο με κάποιο ένζυμο, σχηματίζει σύμπλοκο με σωματίδια χρωματιστού latex.

Το δείγμα τοποθετείται σε ένα πλαστικό stick μιας χρήσης και εάν περιέχει το αντιγόνο αντιδρά με το αντίσωμα με το latex με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ιζήματος το οποίο λόγω των χρωματιστών σωματιδίων φαίνεται με το μάτι. Σε ένα δεύτερο θάλαμο του stick υπάρχει αντίσωμα που αναγνωρίζει το αντίσωμα με τα σωματίδια latex και σχηματίζει και αυτό ίζημα. Η μέθοδος είναι εξαιρετικά γρήγορη (10-15 λεπτά) αλλά απαιτεί εμπλουτισμό του δείγματος.

Ιστοσελίδα που περιγράφει εμπορικό κιτ της μεθόδου (<http://neogen.com>)

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ (BROCK).

PRINCIPLES OF GENE MANIPULATION (OLD R.W AND S.B. PRIMROSE)

ΙΣΤΟΤΟΠΟΙ

Μικροσυστοιχίες (Flash Animation)

<http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/chip/chip.html>

Εικονικό εργαστήριο ταυτοποίησης παθογόνων μικροοργανισμών

<http://dept.kent.edu/biosim/>