

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
Εργαστήριο Μικροβιολογίας

ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΑΣΚΗΣΕΩΝ
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤ' ΕΞΑΜΗΝΟΥ

Σταματίνα Λεβειδιώτου - Στεφάνου
Επίκουρος Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2000



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Εργαστήριο Μικροβιολογίας

ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΑΣΚΗΣΕΩΝ
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤ' ΕΞΑΜΗΝΟΥ

Σταματίνα Λεβειδιώτου - Στεφάνου

Επίκουρος Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2000



Θερμές ευχαριστίες στην κ. ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ ΤΣΑΝΤΑ,
Ε.Δ.Τ.Π. του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας,
πτυχιούχο Τ.Ε.Ι. Θεσσαλονίκης,
Σχολής Διοίκησης και Οικονομίας,
για την πολύτιμη βοήθειά της
στην επεξεργασία του κειμένου του παρόντος βιβλίου.



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΜΥΚΗΤΙΑΣΕΩΝ

1. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

Άμεσο νωπό παρασκεύασμα (με διαύγαση ή όχι).

Το εξεταστέο δείγμα (επίχρισμα, τρίχες, ξέσματα δέρματος και νυχιών) τοποθετείται πάνω σε μία σταγόνα φ.ο. ή ΚΟΗ 10% στην αντικειμενοφόρο πλάκα, σκεπάζεται με καλυπτρίδα και μικροσκοπείται.

2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΥΚΗΤΩΝ

Χρησιμοποιούνται υλικά με όξινο pH (5.5) και αρκετή ποσότητα σακχάρου. Το συνηθέστερο θρεπτικό υλικό είναι το Sabouraud agar με δεξτρόζη.

Επωάζονται αεροβίως, σε θερμοκρασία 20 - 30° C, για πολλές ημέρες (3-7 ημέρες για τα είδη *Candida*, περίπου 20 ημέρες για τα Δερματόφυτα).

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ

α. Μορφολογία των αποικιών

Ελέγχεται το μέγεθος, το χρώμα, η υφή, η ύπαρξη αέριων υφών και διάφοροι άλλοι χαρακτήρες, π.χ. οι αποικίες της *Candida albicans* μοιάζουν με μαργαριτάρια, του *Trichophyton mentagrophytes* με γύψο, του *T. rubrum* έχουν ερυθρά χρωστική, κ.λ.π.

β. Μικροσκοπική εξέταση

ι. Άμεσο νωπό παρασκεύασμα

Κομματάκι της αποικίας εναιωρείται σε σταγόνα φ.ο. πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα, σκεπάζεται με καλυπτρίδα και μικροσκοπείται.

ii. Gram χρώση από την αποικία για τους Βλαστομύκητες.

γ. Βιοχημική ταυτοποίηση (ζύμωση σακχάρων και αυξανόγραμμα).



3. ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Με ELISA, Latex συγκολλητινοαντίδραση.

4. ΟΡΟΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για την αναζήτηση αντισωμάτων, με μικρή όμως ευαισθησία.

5. ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ (PCR)

Για την αναζήτηση του γενώματος του μύκητα.

Εφαρμόζεται για την αναζήτηση του *Cryptococcus neoformans* της *Candida albicans* και της *Pneumocystis carinii* σε κλινικά δείγματα ασθενών (ΕΝΥ, αίμα και εκκρίσεις αναπνευστικού).



ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ - ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ IN VITRO

Οι διάφορες αντιδράσεις αντιγόνου - αντισώματος εφαρμόζονται πρακτικά στις ορολογικές μεθόδους, δηλαδή σε δοκιμασίες in vitro, για διαγνωστικούς σκοπούς, με τη χρησιμοποίηση κατάλληλου αντιγόνου και ορού αίματος του ασθενούς ή ανοσοποιηθέντος ζώου.

Οι ορολογικές δοκιμές χρησιμοποιούνται :

- α) για διαγνωστικούς σκοπούς, δηλ. ανίχνευση αντισώματος με χρήση γνωστού αντιγόνου
- β) για την ανεύρεση του βαθμού ανοσίας ατόμων ή ομάδων ατόμων έναντι ενός λοιμογόνου παράγοντα και
- γ) για την αναζήτηση διαφόρων αγνώστων μικροβιακών αντιγόνων, εφόσον διατίθενται τα αντίστοιχα αντισώματα έναντι αυτού (ορός ανοσοποιηθέντος ζώου).

Η βασική αρχή όλων των ορολογικών δοκιμών είναι η ένωση του αντιγόνου με το αντίσωμα, οι δε βασικές αρχές καθεμιάς ορολογικής μεθόδου είναι να καταστήσει ορατό το αποτέλεσμα αυτής της ένωσης, αυξάνοντας συγχρόνως την ευαισθησία και την ειδικότητα της μεθόδου.

Η τεχνική των διαφόρων ορολογικών δοκιμών εξαρτάται κυρίως από τους δύο πρωταγωνιστές : το αντιγόνο και το αντίσωμα.

Τα αντιγόνα μπορεί να είναι :

α. Αντιγόνα μικροβίων : οι μικροοργανισμοί δρουν σαν αντιγόνα, είτε στο σύνολό τους είτε και τμηματικά, με αντιγονικά στοιχεία που υπάρχουν επί ή εντός των μικροβίων (**σωματικά αντιγόνα**), στις βλεφαρίδες (**βλεφαριδικά αντιγόνα**), στο περίβλημα (**αντιγόνα Κ**). Το σωματικό αντιγόνο των Gram αρνητικών βακτηρίων είναι γνωστό σαν σωματικό «Ο» αντιγόνο, ενώ το βλεφαριδικό σαν «Η».

Αντιγόνα μπορεί να είναι επίσης και οι ουσίες που παράγει και εκκρίνει το μικρόβιο στο περιβάλλον, όπως οι εξωτοξίνες, οι αιμολυσίνες, η ιωδολυσίνη, κ.λ.π.

β. Αντιγόνα ιών : το νουκλεοκαψίδιο ή η πρωτεΐνη του ιού.



- γ. **Αντιγόνα ομάδων αίματος** : ειδικά αντιγόνα στα ερυθρά αιμοσφαίρια και στην επιφάνεια διαφόρων κυττάρων.
- δ. **Αντιγόνα ιστοσυμβατότητας (HLA- σύστημα Human Leucocyte A)**: αντιγονικές ουσίες στα κύτταρα του μοσχεύματος του δότη, καθώς και στα κύτταρα των ιστών του λήπτη.
- ε. **Ετερόφιλα αντιγόνα** : βρίσκονται σε διάφορα ζώα και μικροοργανισμούς άσχετους μεταξύ τους και παρουσιάζουν διασταυρούμενες αντιδράσεις λόγω στενής αντιγονικής σχέσης, π.χ. κοινά αντιγόνα στις Ρικέτσιες και στους Πρωτεΐες, αντιγόνα τύπου Forssmann στα ερυθρά διαφόρων ζώων.

Το αντίσωμα είναι πάντα μια ανοσοσφαιρίνη. Οι IgG, IgM, IgA, IgE και IgD με τα Fab κλάσματα για να ενώνονται με το αντιγόνο (Σχήμα).

Οι σπουδαιότερες αντιδράσεις αντιγόνου (Ag) - αντισώματος (Ab) διακρίνονται :

- A. Σ' αυτές που το βασικό γεγονός, δηλ. η ένωση Ag-Ab έμμεσα μόνον μπορεί να διαπιστωθεί. Έτσι, για να γίνει καταφανής η ένωση αυτή, πραγματοποιείται σήμανση του Ag ή του Ab με διάφορους δείκτες, όπως ραδιοϊσότοπα, φθοριοχρώματα ή ένζυμα.
- B. Σ' αυτές στις οποίες μετράμε τα επακόλουθα της ένωσης Ag-Ab. Τέτοιες είναι οι περισσότερες αντιδράσεις στο κλινικό εργαστήριο, π.χ. Ιζηματοαντίδραση.



A. ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕ ΣΕΣΗΜΑΣΜΕΝΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ Ή ΑΝΤΙΣΩΜΑ

1. Ραδιοανοσοβιολογικές (RIA)
2. Ανοσοφθορισμός (άμεσος και έμμεσος, IF και IIF)
3. Ανοσοενζυμικές (ELISA)

B. 1. Αντιγόνο σε διάλυση - Ιζηματοαντίδραση

- α. Νεφελομετρία
- β. Ακτινωτή ανοσοδιάχυση (Mancini)
- γ. Ανοσοηλεκτροφόρηση (IE)
- δ. Αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση (CIE)

2. Αντιγόνο σε μορφή σωματιδίων

- α. Συγκολλητινο-αντίδραση (agglutination test)
- β. Έμμεση αιμοσυγκόλληση (IHA)
- γ. Συγκόλληση σωματιδίων Latex (LA)
- δ. Αναστολή αιμοσυγκόλλησης (HAI)
- ε. Αντίδραση Coombs

3. Μέθοδοι με συμμετοχή συμπληρώματος

Σύνδεση συμπληρώματος (CF)

4. Μέθοδοι εξουδετέρωσης (N)

- α. Εξουδετέρωση τοξινών
- β. « ιών
- γ. « ενζύμων



A1. ΡΑΔΙΟΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ (RIA)

Είναι πολύ ειδικές και ευαίσθητες. Με αυτές είναι δυνατόν να προσδιορισθούν με μεγάλη ακρίβεια ουσίες που είναι αντιγόνα ή απτίνες και που μπορούν να επισημανθούν με ραδιενεργά ισότοπα.

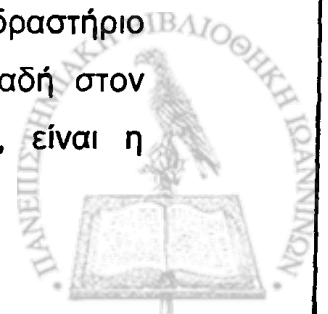
A2. ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ (DF και IDF)

Είναι η εντόπιση αντιγόνου ή αντισώματος με ειδικό αντίσωμα σεσημασμένο με φθοριόχρωμα. Φθοριοχρώματα είναι ουσίες που εκπέμπουν ορατό φως μεγαλύτερου μήκους κύματος, όταν ακτινοβοληθούν με μικρού μήκους κύματος φως, π.χ. αόρατη υπεριώδης ακτινοβολία. Τέτοιες φθορίζουσες χρωστικές είναι η φλουορεσίνη, η ροδαμίνη κ.α.

Η τεχνική με φθορίζον αντίσωμα εφαρμόζεται πρακτικά με δύο μεθόδους : **άμεσο και έμμεσο.**

Στην **άμεσο μέθοδο (DF)**, το σεσημασμένο ειδικό αντίσωμα τοποθετείται πάνω στο παρασκεύασμα που περιέχει το ομόλογο αντιγόνο (φθορίζον σύμπλεγμα). Εφαρμόζεται κυρίως στην αναζήτηση ή ταυτοποίηση των μικροβίων στο κλινικό δείγμα ή στην καλλιέργεια, π.χ. αναζήτηση *Legionella pneumophila* σε κλινικά δείγματα (κυρίως βρογχικές εκκρίσεις), του *C.trachomatis*, του HSV και άλλων.

Στην **έμμεσο μέθοδο (IDF)**, το μη σεσημασμένο αντίσωμα (εξεταστέος ορός) τοποθετείται επί του αντιγόνου του υποστρώματος και η σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος (που δεν είναι φθορίζον σύμπλεγμα) αποδεικνύεται με την προσθήκη σεσημασμένης με φθοριόχρωμα αντισφαιρίνης (δεύτερο αντίσωμα - φθορίζον σύμπλεγμα). Χρησιμοποιείται αντίσωμα ειδικό για το αντιγόνο που επιθυμούμε να αναγνωρίσουμε. Το αντιγόνο που επιθυμούμε να αναγνωρίσουμε συνήθως είναι ξηρό, μονιμοποιημένο σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Η ένωση του αντιγόνου με το ομόλογό του αντίσωμα που βρίσκεται στον εξεταστέο ορό, γίνεται πάνω σε αυτή την πλάκα. Το κύριο αντιδραστήριο που θα μας δείξει αν πράγματι έγινε η σύνδεση αυτή, αν δηλαδή στον εξεταστέο ορό υπάρχουν αντισώματα προς το αντιγόνο αυτό, είναι η



σεσημασμένη αντι-ανθρώπιος γ-σφαιρίνη (αντίσωμα προς την γ-σφαιρίνη του ανθρώπου). Αυτή έχει παρασκευασθεί σε κόνικλο, με την ένεση της ανθρωπίου σφαιρίνης. Το αντίσωμα αυτό θα αναγνωρίσει την γ-σφαιρίνη, δηλ. το μικροβιακό αντίσωμα που θα έχει ενωθεί με το αντιγόνο, αν στον εξεταστέο ορό υπάρχουν αντισώματα προς το αντιγόνο. Αν το παρασκεύασμα εξετασθεί στο ειδικό μικροσκόπιο του ανοσοφθορισμού, τα μικρόβια θα φανούν φωτεινά, λαμπερά, μέσα σε σκοτεινό οπτικό πεδίο.

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο πολυδύναμο του αντιγόνου, που παρά την αρχική του ένωση με το αντίσωμα έχει ακόμη ελεύθερα σημεία συνδέσεως, με τα οποία συνδέεται με το προστιθέμενο φθορίζον αντίσωμα. Το αποτέλεσμα μπορεί να χαρακτηριστεί, αναλόγως της έντασης του φθορισμού, σαν αρνητικό ή θετικό (από 1 έως ++++).

Εφαρμόζεται στην ορολογική διάγνωση της συφιλίδος (FTA και FTA Abs), στην αναζήτηση αντισωμάτων έναντι της *Legionella pneumophila*, της *Borrellia burgdorferi*, των Ρικετσιών, της *Leishmania*, του Εχινοκόκκου, του Τοξοπλάσματος και άλλων μικροοργανισμών.

Το μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού είναι εφοδιασμένο με : μία λυχνία υπεριωδών ακτίνων με συγκεντρωτικό φακό, ειδικό συμπυκνωτή, φωτογραφικό φίλτρο, φακούς αντοφθάλμιους αχρωματικούς και ειδικές αντικειμενοφόρες πλάκες.

A3. ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ Ή ΕΙΑ (Enzyme-immuno-assay) Ή ELISA (Enzyme - Linked - Immuno - Sorbent - Assay)

Είναι η μέθοδος που εφαρμόζεται περισσότερο σε όλες τις φάσεις της εργαστηριακής διάγνωσης των λοιμώξεων. Αναζητούμε είτε το άγνωστο αντιγόνο, είτε το άγνωστο αντίσωμα. Έτσι, χρησιμοποιείται σαν μέσο ταχείας εργαστηριακής διάγνωσης για την αναζήτηση μικροβιακών αντιγόνων στα κλινικά δείγματα όπως στο αίμα, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και σε άλλα υγρά και εκκρίματα των ασθενών. Χρησιμοποιείται ακόμη για την αναζήτηση στον ορό του ασθενούς αντισωμάτων έναντι βακτηρίων, ιών, μυκήτων ή παρασίτων για διαγνωστικούς ή άλλους λόγους.



Αρχή της μεθόδου

Η σήμανση του αντιγόνου ή του αντισώματος γίνεται με ένζυμο και η αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος διαπιστώνεται με ανίχνευση του ενζύμου, αφού προστεθεί το υπόστρωμα του ενζύμου (Σχήμα).

Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι η αλκαλική φωσφατάση και η υπεροξειδάση.

Για την αναζήτηση IgG αντισωμάτων χρησιμοποιείται η **έμμεση ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA)**. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, το αντιγόνο είναι καθηλωμένο στην επιφάνεια ενός στερεού υποδοχέα (φρεάτια μικροπλακών ή σφαιρίδια πολυστερίνης - στερεά φάση). Στο καθηλωμένο αντιγόνο προστίθεται αραιωμένο δείγμα του εξεταζόμενου ορού. Μετά από επώαση και έκπλυση προστίθεται αντιανθρώπιος αντισφαιρινικός ορός ιχνοθετημένος με ένζυμο. Η σύνδεσή του με το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος αποδεικνύεται με την ανάπτυξη χρώματος, όταν προστεθεί το υπόστρωμα του ενζύμου. Τα αποτελέσματα προσδιορίζονται με τη βοήθεια φωτομέτρου. Η ένταση του χρώματος (δραστηριότητα του ενζύμου) είναι ανάλογη του ποσού του αντισώματος που συνδέθηκε. Ως θετικά αξιολογούνται εκείνα τα δείγματα των ορών, των οποίων η τιμή οπτικής πυκνότητας είναι μεγαλύτερη από την τιμή οπτικής πυκνότητας που έχει ορισθεί ως **ουδός**.

Για την αναζήτηση IgM αντισωμάτων χρησιμοποιείται η **διπλή sandwich ή capture ELISA**, η οποία είναι περισσότερο ευαίσθητη και ειδική. Στην επιφάνεια των υποδοχέων είναι καθηλωμένο αντι-ανθρώπειο IgM αντίσωμα (στερεή φάση). Ακολούθως, προστίθεται ο εξεταζόμενος ορός, σεσημασμένο με ένζυμο αντιγόνο ή μη σεσημασμένο αντιγόνο και σεσημασμένο ειδικό αντίσωμα. Ακολούθως, προστίθεται το υπόστρωμα του ενζύμου και αναπτύσσεται χρώμα, το οποίο προσδιορίζεται με τη βοήθεια φωτόμετρου. Ως θετικά αξιολογούνται εκείνα τα δείγματα των ορών, των οποίων η τιμή οπτικής πυκνότητας είναι μεγαλύτερη από την τιμή οπτικής πυκνότητας που έχει ορισθεί ως **ουδός**.



B1. ΙΖΗΜΑΤΙΝΟΑΝΤΙΔΡΑΣΗ

Η ένωση αντιγόνου-αντισώματος παρουσία ηλεκτρολύτου έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό συμπλέγματος υπό μορφή δικτυωτού, το οποίο καθιζάνει μέσα στο διάλυμα.

Η κλασσική ιζηματινοαντίδραση εκτελείται με την τοποθέτηση του ορού που περιέχει το αντίσωμα σε μικρό δοκιμαστικό σωληνάριο, πάνω δε στην επιφάνεια του ορού επιστοιβάζουμε με προσοχή το διάλυμα του αντιγόνου. Στο σημείο επαφής των δύο υγρών παρατηρείται εμφάνιση λευκού δακτυλίου από το σχηματιζόμενο ίζημα (Ring test). Ο σχηματισμός του ιζήματος παρατηρείται όταν το αντιγόνο βρίσκεται σε άριστη αναλογία με το αντίσωμα. Έτσι, στις ιζηματινοαντιδράσεις μπορούμε να διακρίνουμε τη ζώνη περίσσειας του αντισώματος, τη ζώνη ισορροπίας και τη ζώνη περίσσειας του αντιγόνου. Η κλασσική ιζηματινοαντίδραση σε υγρό υλικό έχει σήμερα αντικατασταθεί από την **νεφελομετρία**.

Η ιζηματινοαντίδραση σε άγαρ χρησιμοποιείται ευρέως στα κλινικά εργαστήρια για τη διάγνωση των λοιμώξεων.

Στις ιζηματινοαντιδράσεις αυτές σε γέλη, αντιγόνο και αντίσωμα τοποθετούνται σε άγαρ, το ένα διαχέεται στο άλλο και σχηματίζεται θολερή γραμμή στο σημείο που θα συναντηθούν σε άριστη αναλογία.

Η περισσότερο χρησιμοποιούμενη από αυτές τις μεθόδους είναι η **ακτινωτή ανοσοδιάχυση (Mancini)** για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ανοσοσφαιρινών. Κατά την τεχνική αυτή, ειδικοί αντιοροί έναντι των ανοσοσφαιρινών, ενσωματώνονται σε άγαρ (μέσα σε τρυβλίο Petri), στο οποίο ανοίγονται φρεάτια. Στα φρεάτια τοποθετούνται οι εξεταζόμενοι οροί-αντιγόνα, οι οποίοι διαχέονται στο άγαρ και σχηματίζουν με τον αντιορό δακτύλιο καθιζήσεως, ομόκεντρο προς την οπή, η διάμετρος του οποίου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντιγόνου (Εικόνα).

Ο προσδιορισμός γίνεται συγκρίνοντας τον δακτύλιο με εκείνο τον σχηματιζόμενο από αραιώσεις προτύπου γνωστής περιεκτικότητας ανοσοσφαιρίνης.



2. ΑΝΤΙΓΟΝΟ ΣΕ ΜΟΡΦΗ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

α. ΣΥΓΚΟΛΛΗΤΙΝΟΑΝΤΙΔΡΑΣΗ

Είναι η σύνδεση επιφανειακών αντιγόνων μικροβίων, κυττάρων, ερυθρών κ.λ.π. με αντισώματα.

Είναι μία από τις περισσότερο ευαίσθητες αντιδράσεις για την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων και η αρχαιότερη διαγνωστική ορολογική αντίδραση.

Το αντιγόνο βρίσκεται πάνω στην επιφάνεια στερεών σωματιδίων (κύτταρα μικροβίων, ερυθρά αιμοσφαίρια, σωματίδια Latex). Υπό την επίδραση του αντισώματος επέρχεται συγκόλληση των αντιγόνων αυτών σε ομάδες, η οποία είναι ορατή με γυμνό οφθαλμό ή με το μικροσκόπιο.

Μηχανισμός της αντίδρασης

Καταρχάς γίνεται ένωση των αντισωμάτων που υπάρχουν στον ορό με κάποια από τις ουσίες που υπάρχουν στην επιφάνεια των σωματιδίων. Η φάση αυτή ευνοείται από τη χαμηλή ιοντική ισχύ.

Ακολούθως, σχηματίζονται πλέγματα από αλληλοσυγκολλούμενα σωματίδια και στη συνέχεια κροκίδες. Πολλοί παράγοντες παρεμβαίνουν στο σχηματισμό των πλεγμάτων αυτών, όπως το pH (ευνοϊκό : 6.7 - 7.2), η θερμοκρασία (37° C), η ιοντική ισχύς (τα ρυθμιστικά διαλύματα), οι δυνάμεις Van der Waals.

Η μέθοδος είναι ημιποσοτική και το αποτέλεσμα εκφράζεται σαν τίτλος. Τίτλος του εξεταζόμενου ορού αίματος λαμβάνεται η μεγαλύτερη αραιώση του ορού, η οποία συγκολλά το αντιγόνο.

Η τεχνική της δοκιμής περιλαμβάνει τα εξής :

- i. Παρασκευή του αντιγονικού εναιωρήματος.
- ii. Διαδοχικές αραιώσεις του ορού του ασθενούς σε διάλυμα NaCl 0.85%, π.χ. 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 κ.λ.π.
- iii. Ανάμειξη με ίσους όγκους αντιγονικού εναιωρήματος, επώαση σε 37°C, εξέταση για την εμφάνιση συγκολλήσεως και προσδιορισμός του



τίτλου. Η ένταση των συγκολλήσεων αξιολογείται με σταυρούς, από 4(+) μέχρι 1(+). Επί αρνητικής αντιδράσεως, τα σωματίδια είτε παραμένουν εν αιωρήσει στο διάλυμα του NaCl (όπως τα μικρόβια), είτε καθιζάνουν «δίκην κομβίου» στο κέντρο του πυθμένα (όπως τα ερυθρά αιμοσφαίρια). Η μέθοδος μπορεί να εκτελεσθεί σε δοκιμαστικά σωληνάρια και σε αντικειμενοφόρες πλάκες, με άμεση ανάμειξη αντιγονικού εναιωρήματος και παρατήρηση για ταχεία εμφάνιση συγκόλλησης (Εικόνα).

Πάντοτε χρησιμοποιείται και μάρτυρας θετικός και αρνητικός.

Περίσσεια αντισώματος προκαλεί το φαινόμενο της «προζώνης», δηλαδή απουσία συγκόλλησης στις μικρές αραιώσεις.

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την αναζήτηση αντισωμάτων με γνωστά μικροβιακά αντιγόνα, την ταυτοποίηση μικροβίων, κ.λ.π.

- Οροαντίδραση Widal για τις Σαλμονελλώσεις.
- « Wright για τις Βρουκελλώσεις
- « Weil-Felix για τις Ρικετσιώσεις
- Ορολογική ταυτοποίηση και τυποποίηση των σαλμονελλών, σιγκελλών και άλλων Εντεροβακτηριακών, των μηνιγγιτιδοκόκκων, του αιμόφιλου, κ.α.

β. ΕΜΜΕΣΗ ΑΙΜΟΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗ (ΙΗΑ)

Ερυθρά αιμοσφαίρια, στα οποία έχει προσροφηθεί αντιγόνο, συγκολλώνται από ειδικά προς αυτό αντισώματα.

Συνήθως χρησιμοποιούνται ερυθρά αιμοσφαίρια ανθρώπου ή προβάτου, ομάδας O, στα οποία προσροφώνται πρωτεΐνες, αφού προηγηθεί επεξεργασία με ταννικό οξύ (εξ ου και η ονομασία έμμεσος).

Η έμμεση αιμοσυγκόλληση είναι πολύ ευαίσθητη μέθοδος για την αναζήτηση αντισωμάτων έναντι διαφόρων αντιγόνων, π.χ. έναντι του εχινόκόκκου, της ωχράς σπειροχαΐτης της συφιλίδος.

γ. ΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ LATEX (LA)



Η μέθοδος είναι παραλλαγή της μεθόδου της εμμέσου αιμοσυγκολλησεως, με τη διαφορά ότι το αντιγόνο υπό μορφή διαλύματος είναι προσροφημένο επί αδρανών σωματιδίων (από πολυεστερική ουσία) Latex.

Η συγκόλληση αυτή έχει το προσόν ότι γίνεται ταχύτατα, είναι ορατή με το μάτι και γίνεται πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα.

Εφαρμόζεται για τη διάγνωση πολλών λοιμώξεων και προσφέρεται στο εμπόριο σε διάφορα kits.

Η μέθοδος μπορεί να χρησιμεύσει και για την αναζήτηση αντιγόνου, όταν επί των σωματιδίων Latex έχει προσροφηθεί αντίσωμα.

δ. ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΑΙΜΟΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗΣ (ΗΑΙ)

Με τη μέθοδο αυτή μπορεί να αναζητηθεί αντίσωμα ή αντιγόνο, αναλόγως της προκαλούμενης αναστολής της αιμοσυγκόλλησης.

Η μέθοδος χρησιμεύσει για την αναζήτηση : α) αντισωμάτων. Μερικοί ιοί, π.χ. ο ιός της ερυθράς, έχουν την ιδιότητα να συγκολλούν τα ερυθρά αιμοσφαίρια διαφόρων ζώων. Η παρουσία αντισωμάτων στον ορό του ασθενούς αναστέλλει αυτή τη συγκόλληση. Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε τίτλο. β) αντιγόνου.

ε. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ COOMBS

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα του μορίου του αντισώματος να συμπεριφέρεται σαν αντίσωμα αλλά και σαν αντιγόνο και να ενώνεται με το αντίσωμα (αντισφαιρίνη). Έτσι, ερυθρά αιμοσφαίρια στα οποία προσροφήθηκαν ατελή αντισώματα και μετά πλύθηκαν με διάλυμα NaCl, συγκολλώνται αν έλθουν σε επαφή με αντισφαιρινικό ορό (ο οποίος παρασκευάζεται με την ανοσοποίηση κονίκλων με ενέσεις γ-σφαιρίνης), ορός Coombs.

Διακρίνεται σε άμεσο και έμμεσο.



- i. **άμεσος Coombs** : η ευαισθητοποίηση των ερυθρών γίνεται in vivo (αιμολυτική νόσος του νεογνού, επίκτητη αιμολυτική αναιμία).
- ii. **έμμεσος Coombs** : η ευαισθητοποίηση των ερυθρών γίνεται in vitro (ευαισθητοποίηση εγκύων και ατόμων που έχουν υποστεί μεταγγίσεις).



ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΣΤΗΝ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

Όπως είναι γνωστό, οι τέσσερις (4) αζωτούχες βάσεις (νουκλεοτίδια), αδενίνη (A), θυμίνη (T), κυτοσίνη (C) και γουανίνη (G) εναλλάσσονται στο DNA, κωδικοποιώντας ανά 3 ένα αμινοξύ.

Η αλληλουχία των βάσεων αυτών αποτελεί τον γενετικό κώδικα του κυττάρου. Το RNA φέρει επίσης την γενετική πληροφορία.

Το DNA αποτελείται από 2 δεξιόστροφες πολυνουκλεοτιδικές αλυσούς (έλικες) που περιελίσσονται γύρω από τον ίδιο άξονα ώστε να σχηματίζουν διπλή έλικα.

Από το 1961, αρκετοί ερευνητές έδειξαν ότι οι δύο συμπληρωματικές έλικες DNA μπορεί να αποχωριστούν με θερμότητα, σε αλκαλικό περιβάλλον. Τα νουκλεϊνικά οξέα δημιουργούν διπλές έλικες, που συγκρατούνται με δεσμούς H₂ ανάμεσα σε αντικριστά νουκλεοτίδια. Όταν οι δεσμοί H₂ σπάσουν, με την επίδραση της θερμότητας ή σε αλκαλικό περιβάλλον, οι δύο έλικες αποχωρίζονται και το φαινόμενο αυτό ονομάζεται **αποδιάταξη του DNA (denaturation)**. Δύο μονές αλυσίδες συμπληρωματικές ως προς τις βάσεις, σε κατάλληλες συνθήκες τυλίγονται (υβριδίζονται) και σχηματίζουν δίκλωνο DNA. Έτσι, σε δεύτερο στάδιο, αν προστεθεί ιχνηθέτης (ανιχνευτής - primer), μπορεί να γίνει **ανασύνδεση (annealing)** του ιχνηθέτη, δηλ. να δημιουργηθούν δεσμά H₂ ανάμεσα στον ιχνηθέτη και τις συμπληρωματικές αλληλουχίες που υπάρχουν πιθανόν στον αποδιαταγμένο στόχο. Στο φαινόμενο αυτό στηρίζονται οι διάφορες μοριακές τεχνικές για την ανίχνευση τμημάτων DNA, με τη χρήση κατάλληλων DNA - ανιχνευτών - ιχνηθετών (primers).

Υβριδισμός επομένως είναι το αποτέλεσμα του σχηματισμού μιάς διπλής έλικας DNA, που η μια της αλυσίδα αντιστοιχεί στο μόριο DNA του υπό μελέτη μικροοργανισμού και η άλλη στον ανιχνευτή.

Οι DNA - ιχνηθέτες (probes) αποτελούν μικρά τμήματα DNA που περιέχουν κάποιο γονίδιο ή γονιδιακή περιοχή ή είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια. Η βασική αρχή για την επιλογή του είναι να υβριδοποιείται με το μόριο-στόχο, αλλά όχι με τα άλλα νουκλεϊνικά οξέα-στόχους που πιθανόν να ευρίσκονται στο εξεταστέο δείγμα. Είναι γεγονός ότι κάθε



μικροοργανισμός φέρει τουλάχιστον μια μοναδική αλληλουχία που τον διακρίνει από τους άλλους και κατά συνέπεια χρησιμοποιείται αυτή σαν ιχνηθέτης. Οι ιχνηθέτες αυτοί σημαίνονται με ένα ανιχνεύσιμο μόριο-σηματοδότη (^{32}P , εθίδιο, αλκαλική φωσφατάση, βιοτίνη-horseradish peroxidase, φλουορεσκεΐνη, κ.α.). Μια θετική αντίδραση υβριδοποίησης αναγνωρίζεται εφόσον ανιχνεύεται το «σήμα» της ένωσης με την οποία έχει σημανθεί ο ιχνηθέτης : Η μέτρηση της ραδιενεργούς ακτινοβολίας με αυτοραδιογραφία, η μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας με χημειοφωταύγεια ή με χρωματομετρική μέθοδο σε ένα απλό φωτόμετρο (όπως μια ELISA).

Περιοριστικά ένζυμα ή ενδονουκλεάσες (restriction enzyme)

Τα ένζυμα αυτά τέμνουν το DNA σε μια σταθερή θέση με μια ειδική περιοχή αναγνώρισης, που συνήθως αποτελείται από 4 έως 6 νουκλεοτίδια. Έχουν απομονωθεί από βακτηρίδια στα οποία υπάρχουν για να διασπούν ξένο DNA (π.χ. βακτηριοφάγων). Περισσότερα από 400 έχουν απομονωθεί και χαρακτηρισθεί. Μερικά από τα συνηθέστερα που χρησιμοποιούνται είναι : Eco RI, Hind III, A pa I, Sma I.

Χαρακτηρίζονται σαν το ψαλίδι της Μοριακής Γενετικής.



ΤΥΠΟΙ ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗΣ

A. In situ υβριδισμός («επί τόπου»)

Ο ανιχνευτής αναζητεί το υπό ανίχνευση γενετικό υλικό απευθείας μέσα στα ίδια τα μικροβιακά κύτταρα ή στα κύτταρα του ξενιστή.

Ανιχνευτής χημικός σεσημασμένος με φλουροροσκεΐνη \Rightarrow χρώση στα σημεία υβριδισμού \Rightarrow ανίχνευση με μικροσκόπιο φθορισμού

B. Υβριδισμός σε υγρή φάση

Είναι ο περισσότερο διαδεδομένος τύπος υβριδοποίησης στην Μοριακή Μικροβιολογία και ο πιο γρήγορος. Η ανάγνωση του αποτελέσματος γίνεται με χρωματομετρική μέθοδο σε φωτόμετρο.

Γ. Υβριδισμός σε στερεή φάση

Τεχνικές blotting (ανοσο-αποτυπωματικές)

Southern blotting (για DNA)

Πριν την εφαρμογή του ιχνηθέτη (probe), οι τεχνικές αυτές προϋποθέτουν:

α. Τεμαχισμό του DNA, με ειδικό περιοριστικό ένζυμο, σε κλάσματα.

β. Ανάλυση των κλασμάτων του DNA με ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη και διαχωρισμός τους ανάλογα με το μοριακό τους μέγεθος.

γ. Μεταφορά του DNA σε φύλλα νιτροκυτταρίνης και υβριδισμός με ιχνηθέτες - probes.

Παρόμοια μέθοδος είναι η τεχνική Northern blotting για την ανίχνευση RNA.

Δ. Ριβοτυπία (ribotyping)

Περιλαμβάνει την αποτύπωση θραυσμάτων λύσης γενωμικού DNA, που περιέχουν όλα ή τμήμα των γονιδίων που κωδικοποιούν τα 16S και 23S rRNA. Προσφέρει υψηλή διακριτική ικανότητα στις διάφορες επιδημιολογικές μελέτες βακτηρίων.



ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Οι τεχνικές υβριδοποίησης χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και τυποποίηση πολλών μικροοργανισμών. Το DNA-στόχος όμως, τις περισσότερες φορές βρίσκεται σε πολύ μικρές ποσότητες μέσα στα κλινικά δείγματα. Έτσι, για να επιτύχει η δοκιμασία υβριδοποίησης, πρέπει πρώτα να προηγηθεί καλλιέργεια. Άλλοι μικροοργανισμοί όμως δεν καλλιεργούνται, ενώ άλλοι απαιτούν πολλές ημέρες για να αναπτυχθούν.

Ο πολλαπλασιασμός, εκλεκτικά, του επιθυμητού τμήματος του μορίου του DNA, σε ποσότητες τέτοιες που να επιτρέπουν τη μελέτη του, απλουστεύει και διευκολύνει τις δοκιμασίες υβριδοποίησης. Ο πολλαπλασιασμός αυτός του DNA (των νουκλεϊνικών οξέων) επιτεύχθηκε με την PCR.



ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR, POLYMERASE CHAIN REACTION)

Είναι η συχνότερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος πολλαπλασιασμού νουκλεϊνικών οξέων.

Από το 1989, που η τεχνική αυτή θεωρήθηκε «η σημαντικότερη επιστημονική εξέλιξη της χρονιάς» και μετά από ορισμένες βελτιώσεις, η PCR επέτρεψε την εφαρμογή της τεχνολογίας στην επίλυση διαφόρων διαγνωστικών προβλημάτων και στην Μικροβιολογία.

Χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα.

Βασικές αρχές της PCR

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί επαναλαμβανόμενους κύκλους σύνθεσης DNA με ολιγονουκλεοτίδια, με σκοπό να φτιάξει *in vitro* αντιγραφή αλληλουχιών των επιθυμητών νουκλεϊνικών οξέων-στόχων (target DNA).

Στη στοιχειώδη μορφή της PCR, κάθε κύκλος επιτελείται σε τρία βήματα :

- i. Ένα στάδιο αποδιάταξης (**denaturation**) της διπλής έλικας του DNA σε δύο μονές αλυσίδες, ώστε στη συνέχεια οι διαχωρισμένες αλυσίδες να μπορούν να υποστούν υβριδοποίηση. Αυτό επιτυγχάνεται με την επώαση του DNA σε υψηλή θερμοκρασία ($\cong 95^{\circ}\text{C}$).
- ii. Στάδιο ανασύνδεσης (**annealing**) του ζεύγους των αφετηριών-primers, σε ένα σημείο της κάθε μονής αλυσίδας, στους $20^{\circ} - 50^{\circ}\text{C}$.
- iii. Αντίδραση επέκτασης των primers κατά μήκος της αλυσίδας, με την τοποθέτηση νέων νουκλεοτιδίων, με τη δράση της πολυμεράσης (**extension**), σε $70^{\circ} - 75^{\circ}\text{C}$.



Αυτά τα τρία στάδια επώασης ονομάζονται «θερμικός κύκλος». Ένα τυπικό πρωτόκολλο PCR περιλαμβάνει 20 - 40 θερμικούς κύκλους και ολοκληρώνεται περίπου σε 4 ώρες.

Κάθε φορά που συμπληρώνεται ένας κύκλος, η αλληλουχία-στόχος διπλασιάζεται. Έτσι, η επανάληψη του αποτελέσματος των θερμικών κύκλων είναι μια γεωμετρική συσσώρευση αυτών των αλληλουχιών. Το προϊόν αυτό του πολλαπλασιασμού, είναι το προϊόν της PCR ή **amplicon**.

Το τμήμα DNA-στόχος μεγαθύνεται 2^{30} φορές, που αντιστοιχούν σε αριθμό ανατύπων $\geq 10^6$.

Το **ένζυμο πολυμεράση** είναι μία μορφή θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης, η οποία έχει απομονωθεί από το βακτηρίδιο *Thermus aquaticus* (Taq) των νερών των θερμοπηγών. Έχει την ικανότητα να διατηρεί την ενζυμική δραστηριότητά της και σε υψηλές θερμοκρασίες.

Τα **primers (εκκινητές ή αφετηρίες)** που χρησιμοποιούνται είναι μικρές σειρές 18-30 ολιγονουκλεοτιδίων.

Το **DNA στόχος (target DNA)** είναι δυνατόν να προέρχεται από διάφορα δείγματα. Είτε αυτό είναι καθαρό απομονωμένο, είτε βρίσκεται μέσα σε ιστούς, αίμα, κύτταρα, σπέρμα, ούρα, υγρά παρακεντήσεων, αμνιοκύτταρα, κ.λ.π.

Η τεχνική PCR εφαρμόζεται και σε RNA, αφού πρώτα σχηματισθεί σε αντίδραση το συμπληρωματικό του (complementary DNA - cDNA) με τη δράση του ενζύμου ανάστροφη τρανσκριπτάση και κατόπιν εφαρμοσθεί η PCR.



ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΤΗΣ PCR

- α. Διπλή ή εμφωλεύουσα PCR (nested PCR)
- β. PCR με ανάστροφη τρανσκριπτάση ή με αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse transcriptase PCR, RT-PCR)
- γ. Ασύμμετρη PCR

ΑΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

- α. Αλυσιδωτή αντίδραση της λιγκάσης (Ligase Chain Reaction, LCR)
- β. Συστήματα πολλαπλασιασμού που βασίζονται σε μετεγγραφή (NASBA)

ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΗΣ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ

- α. Ανάλυση PCR - RFLPs
- β. Ριβοτυπία μετά από PCR
- γ. PCR βασιζόμενη σε επαναλαμβανόμενη αλληλουχία (Repetitive Element Sequence - Based PCR, rep-PCR)
- δ. Αποτύπωμα τυχαία πολλαπλασιαζόμενου DNA ή PCR με αυθαίρετους εκκινήτες (Randomly Amplified Polymorphic DNA Fingerprint, RAPD ή Arbitrarily Primed, AP-PCR)

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΕΝΟΣ ΜΟΡΙΟΥ DNA (SEQUENCING)



ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ PCR ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ (ΠΟΙΟΤΙΚΗ και ΠΟΣΟΤΙΚΗ), ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ Ή ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Βακτήρια

Bordetella pertusis

Borrelia burgdorferi

Brucella species

Chlamydia trachomatis

Coagulase-negative Staphylococci

Corynebacterium diphtheriae

E. coli O₁₅₇H₇

Helicobacter pylori

Legionella pneumophila

Leptospira interrogans

Mycobacterium tuberculosis

« *avium complex*

Neisseria gonorrhoeae

Salmonella typhi

Staphylococcus aureus

Streptococcus pneumoniae

« *pyogenes*

Rickettsiae

Treponema pallidum

Yersinia enterocolitica

Μύκητες

Aspergillus species

Candida «

Cryptococcus neoformans

Pneumocystis carinii



Ιοί

Adenovirus

Cytomegalovirus (CMV)

Enteroviruses

Hepatitis C

« E

Herpes simplex virus 2

« « viruses 1 και 2

Human herpes viruses 6 και 7

HIV

Human papillomavirus (HPV)

« parvovirus B₁₉

Measles virus

Respiratory syncytial virus (RSV)

Rubella virus

Varicella-zoster

Παράσιτα

Plasmodium sp.

Toxoplasma gondii

Trypanosoma cruzi



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Αντωνιάδης Α., Αντωνιάδης Γρ., Λεγάκης Ν., Τσελέντης Ι.: Ιατρική Μικροβιολογία, Τόμος Ι.
Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδη, Αθήνα 1998.
2. Αρσένη Α.: Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων, Τόμος 1 και 2, 4^η έκδοση.
Ζήτα Ιατρικές Εκδόσεις, 1994.
3. Koneman E., Allen S., Janda W., Schreckenberger P., Winn W.: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th edition.
Lippincott 1997.
4. Λεγάκης Ν., Τσελένη-Κωτσοβίλη Α.: Μοριακή Κλινική Μικροβιολογία.
Ιατρικές Εκδόσεις Χάρη Ζεβελάκη, 1996.
5. Murray P., Baron E., Pealler M., Tenover F., Tenover F., Tenover F., Tenover F., Yolken R.: Manual of Clinical Microbiology, 6th edition.
ASM Press 1995.
6. Παπαπαναγιώτου Ι.: Ιατρική Μικροβιολογία και Ανοσολογία, Τόμος Α΄ και Β΄.
Παρατηρητής, Θεσσαλονίκη 1994.
7. Παυλάτου Μ.: Ανοσοδιαγνωστική των Λοιμώξεων.
Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα 1990.
8. Χαρβάλου Α.: Διαγνωστική Μοριακή Μικροβιολογία.
Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδη, Αθήνα 1998.





Τυπώθηκε στο Πανεπιστημιακό Τυπογραφείο
με δαπάνη του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ
Τυπογραφείο

Διανέμεται Δωρεάν στους φοιτητές.



