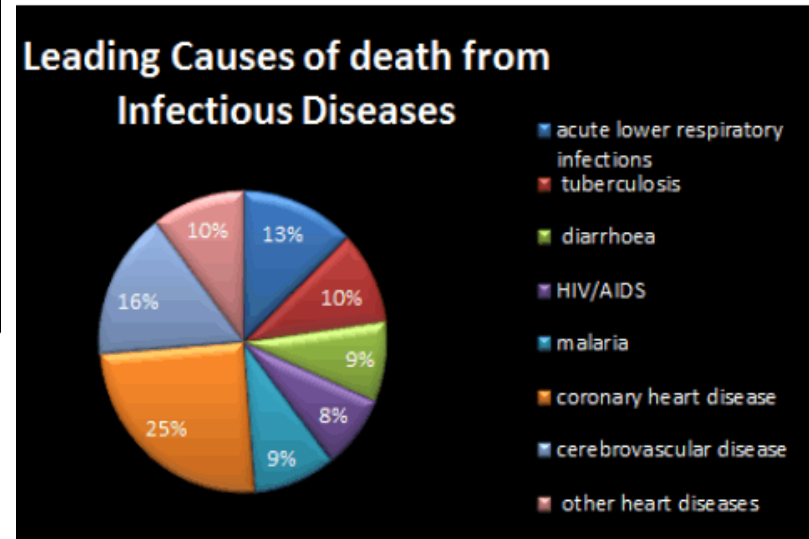


# ΛΟΙΜΩΔΗ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

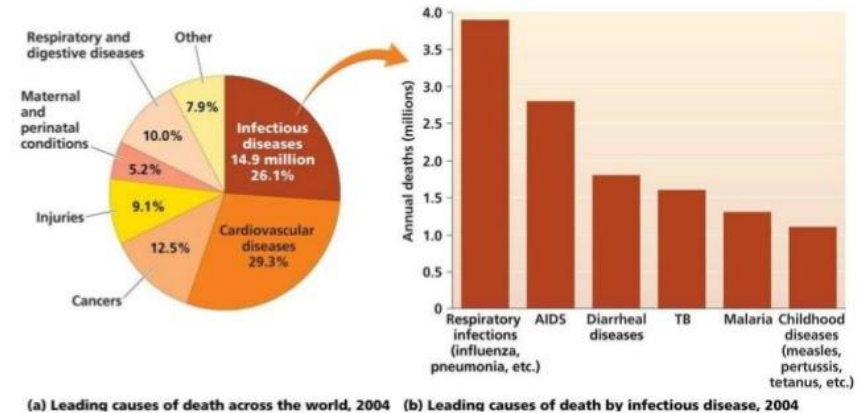


Conference Report - Microbiology:  
Current Research (2019) Volume 3, Issue 4  
2nd Global Congress on Bacteriology and  
Infectious Diseases

# ΛΟΙΜΩΔΗ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

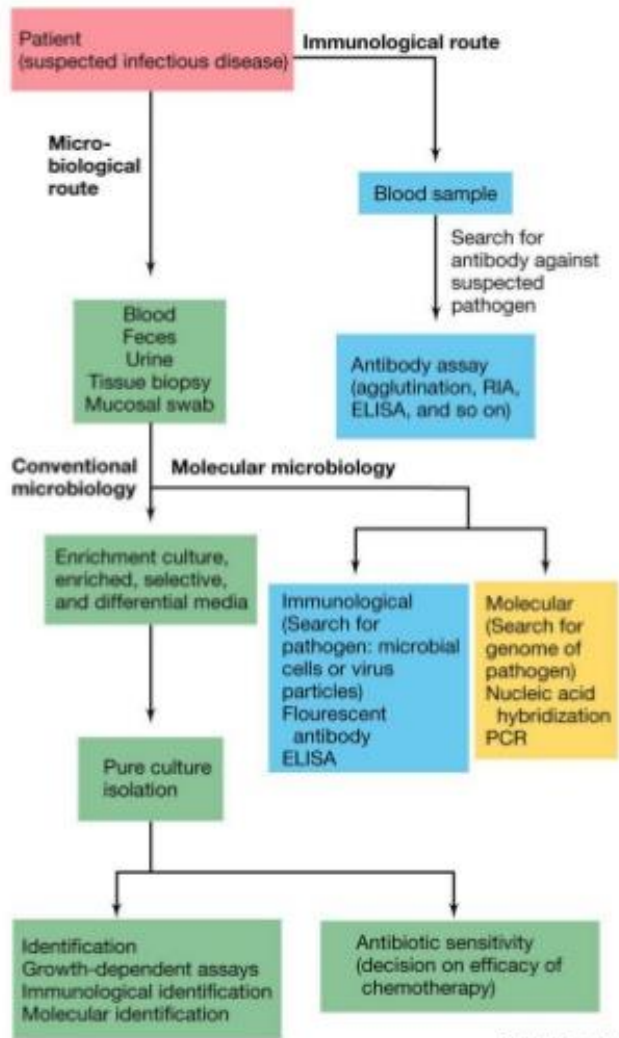
- Τα λοιμώδη νοσήματα σκοτώνουν εκατομμύρια ανθρώπους κάθε χρόνο
  - 15 εκατομμύρια /έτος
  - Οι αναπτυγμένες χώρες έχουν καλύτερη υγιεινή, καλύτερη ιατρική φροντίδα

## Infectious disease



*2nd-leading cause of death worldwide*

*6 diseases account for 80% of infectious disease deaths*



## TYPING METHODS

Phenotypic

- Rely on expression of phenotypic characteristics (genetically coded)
- Antibiotic resistance, antigens etc

Phage typing

Genotypic

- Analysis of the genetic material
- DNA, RNA

Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE)

# ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ

**Εξέταση κλινικών δειγμάτων για την ανίχνευση,  
απομόνωση και τυποποίηση των παθογόνων:**

1- Μικροσκόπηση

2- Καλλιέργεια

3- Ταυτοποίηση

4- Ορολογική διάγνωση

5- Μοριακή διάγνωση

# ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΣΗ

- Χρησιμοποιείται στη μικροβιολογία για δύο **βασικούς σκοπούς**
  - Τον **αρχικό εντοπισμό μικροβίων** σε κλινικά δείγματα
  - Την **προκαταρκτική ή οριστική ταυτοποίηση των βακτηρίων**
    - Η μικροσκοπική εξέταση των κλινικών δειγμάτων χρησιμοποιείται για την ανεύρεση
      - **Βακτηρίων**
      - **Μυκήτων**
      - **Παρασίτων**

# ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΣΗ

- **Μικροσκόπηση σε φωτεινό πεδίο**

- Τρεις αντικειμενικοί φακοί

- **Μικρής μεγέθυνσης- X10**

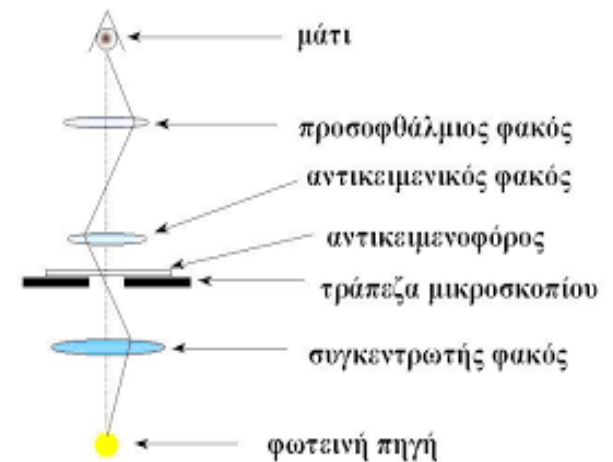
- Γενική επισκόπηση του δείγματος

- **Μεσαίας μεγέθυνσης- X40**

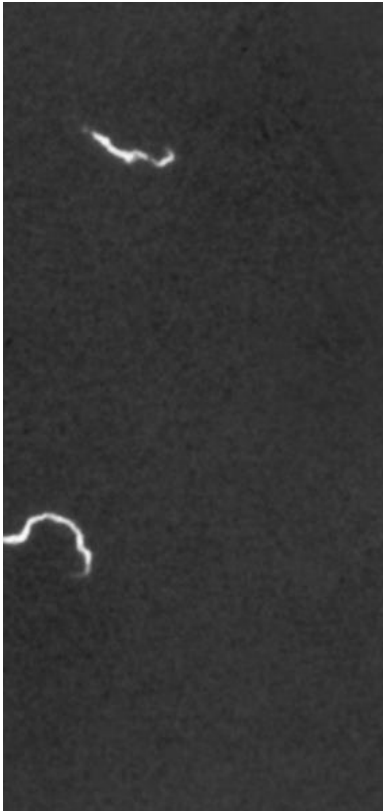
- Παρατήρηση μεγάλων μικροβίων – παρασίτων και νηματοειδών μυκήτων

- **Ελαιοκαταδυτικός φακός- X100**

- Παρατήρηση βακτηρίων και βλαστομυκήτων



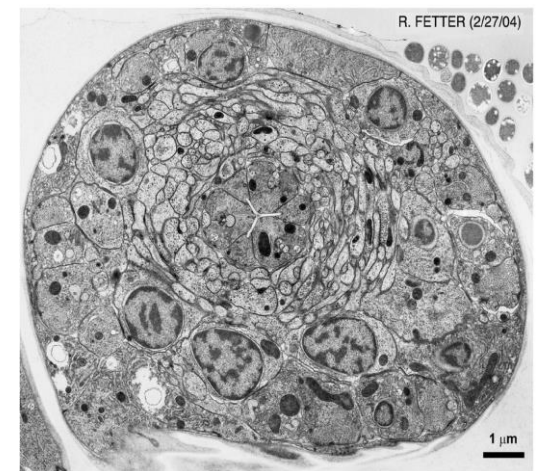
# ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΣΗ



- **Μικροσκόπηση σε σκοτεινό πεδίο**
  - Χρησιμοποιείται ένας ειδικός πυκνωτής που εμποδίζει τις φωτεινές ακτίνες να διέλθουν από το δείγμα
  - Το δείγμα είναι καλά φωτισμένο πάνω σε σκοτεινό πεδίο
  - Πλεονέκτημα
    - Σημαντική βελτίωση της διακριτικής ικανότητας- **0.02** αντί **0.2μm**
    - Παρατήρηση λεπτότατων βακτηρίων, όπως το *Treponema pallidum* *Leptospira spp*

# ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΣΗ

- Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο
  - Πολύ καλύτερη διακριτική ικανότητα και μεγέθυνση





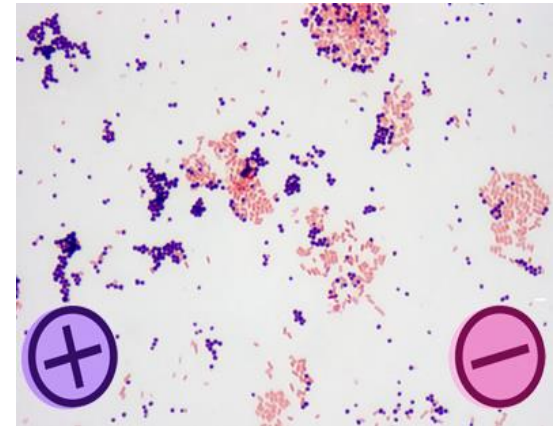
# 1. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΣΗ

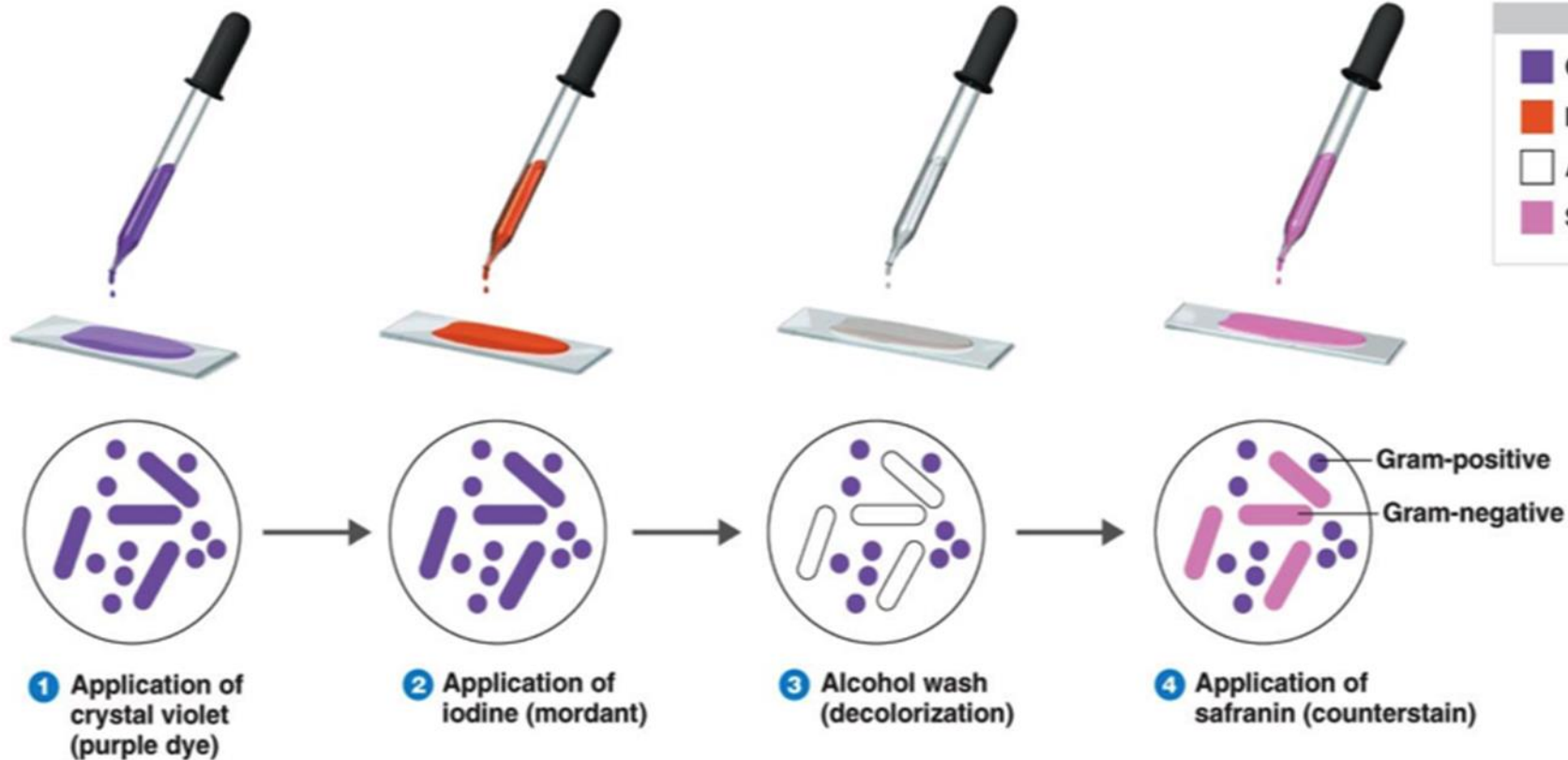
- Η **μικροσκόπηση** γίνεται **γρήγορα**, αλλά η αξιολόγηση εξαρτάται από τον παρατηρητή
- Η **μικροσκοπική εξέταση ιστών** απαιτεί την διάκριση της **διεισδυτικής νόσου** από τον **αποικισμό** – μία διάκριση που είναι δύσκολο να γίνει
- Τα περισσότερα δείγματα χρωματίζονται με **ειδικές χρώσεις** αλλά και νωπά παρασκευάσματα - wet mounts - χρησιμοποιούνται στη διάγνωση μυκήτων και κάποιων άλλων παθογόνων
- Καμία χρώση **δεν είναι 100% ειδική**
- Ορισμένα παθογόνα **δεν είναι ορατά** με τις συνήθεις χρώσεις

# ΧΡΩΣΗ ΚΑΤΑ GRAM

## GRAM STAIN

- Ταξινομεί τα βακτήρια σε **δύο ομάδες**
  - **gram-positive—blue** ή **gram-negative—red**
- Καθορίζει τη **μορφολογία** (βακτηρίδια, κόκκοι) και τη **διάταξη** των κυττάρων
  - σε σωρούς, σε αλυσίδες, σε ζεύγη
- Ανιχνεύει την παρουσία **ουδετεροφίλων**
  - **Βακτηριακή λοίμωξη και όχι αποικισμός**
    - Αυτά τα χαρακτηριστικά κατευθύνουν την **έναρξη της αντιβιοτικής αγωγής**
    - Ανεύρεση μιας **ποικιλομορφίας μικροοργανισμών** σημαίνει ένα επιμολυσμένο δείγμα ή μια πολυμικροβιακή λοίμωξη
  - Ανεύρεση **πολλών επιθηλιακών κυττάρων** στα πτύελα σημαίνει **επιμόλυνση με σάλιο** και επομένως μικρή διαγνωστική αξία του δείγματος





# Gram stain

1. Ανεύρεση **οξεάντοχων** μικροοργανισμών  
*Mycobacterium* species

2. **Ήπια οξεάντοχων** μικροοργανισμών

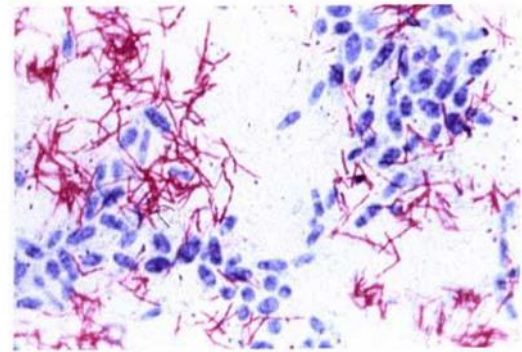
- *Nocardia* species

- *Rhodococcus*

- Ωοκύστες κάποιων παρασίτων

*Cryptosporidium*, *microsporidia*, *Cystoisospora* [*Isospora*]  
*belli*, *Cyclospora*, *Balantidium coli*)

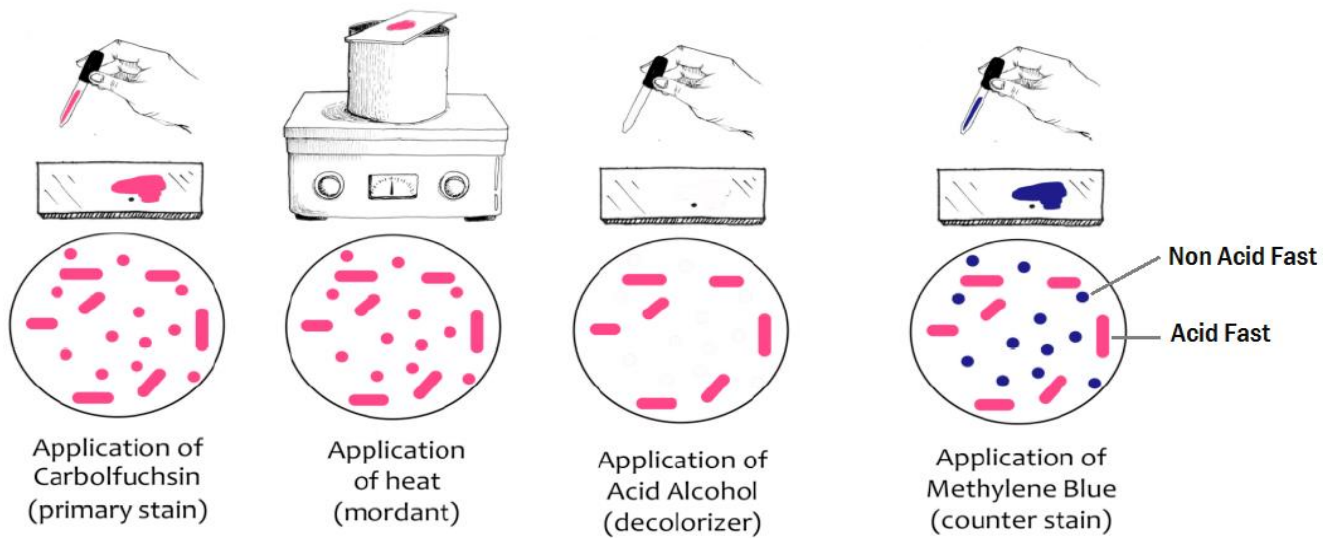
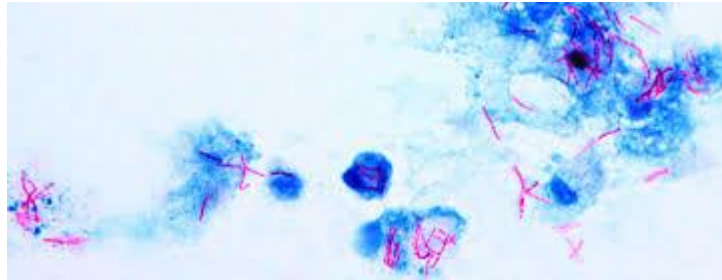
Acid Fast Staining



Η ανίχνευση των μυκοβακτηριδίων στα πτύελα απαιτεί την παρουσία τουλάχιστον **10,000 βακτηρίων /mL**

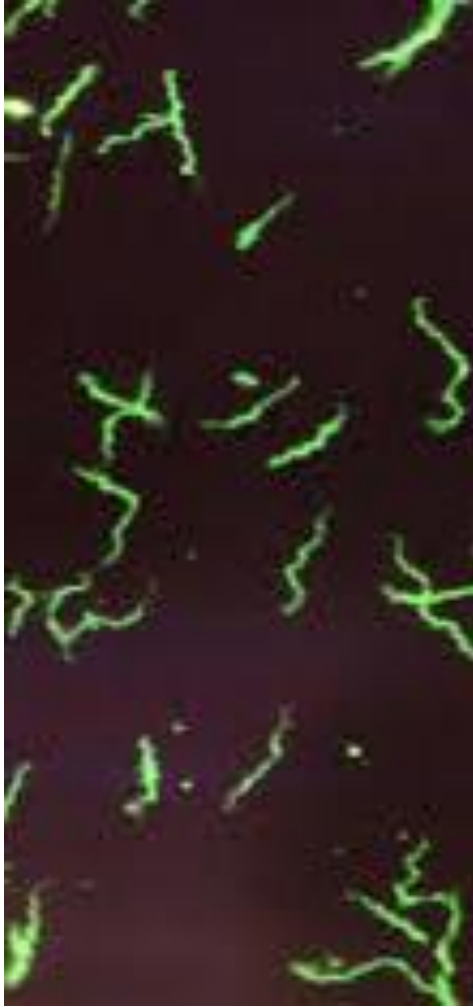
Τα μυκοβακτηρίδια μπορεί να βρίσκονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις οπότε περιορίζεται η ευαισθησία

**Acid-fast and modified acid-fast stains**



## Acid-fast and modified acid-fast stains

# FLUORESCENT STAINS



- Ανιχνεύει μικροοργανισμούς σε **μικρότερες συγκεντρώσεις** ( $< 1 \times 10^4$  cells/mL).
  - **Acridine orange** ( βακτήρια και μύκητες )
  - **Auramine-rhodamine και auramine O** (mycobacteria)
  - **Calcofluor white** (μύκητες, κυρίως δερματόφυτα )
- Σύνδεση του φλουοροχρώματος με αντίσωμα έναντι του συγκεκριμένου μικροοργανισμού (direct or indirect immunofluorescence) αυξάνει θεωρητικά την ευαισθησία
  - Λίγα είναι εμπορικά διαθέσιμα
    - *Pneumocystis*
    - *Legionella*
    - *Μυκοβακτηρίδια*
    - *Treponema*

# ΝΩΠΟ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑ

- Ανιχνεύει :

- Μύκητες -Fungi

- Η ευαισθησία αυξάνει αν προσθέσουμε 10% potassium hydroxide (KOH) το οποίο διαλύει τους ιστούς και τους μη μυκητιασικούς μικροοργανισμούς

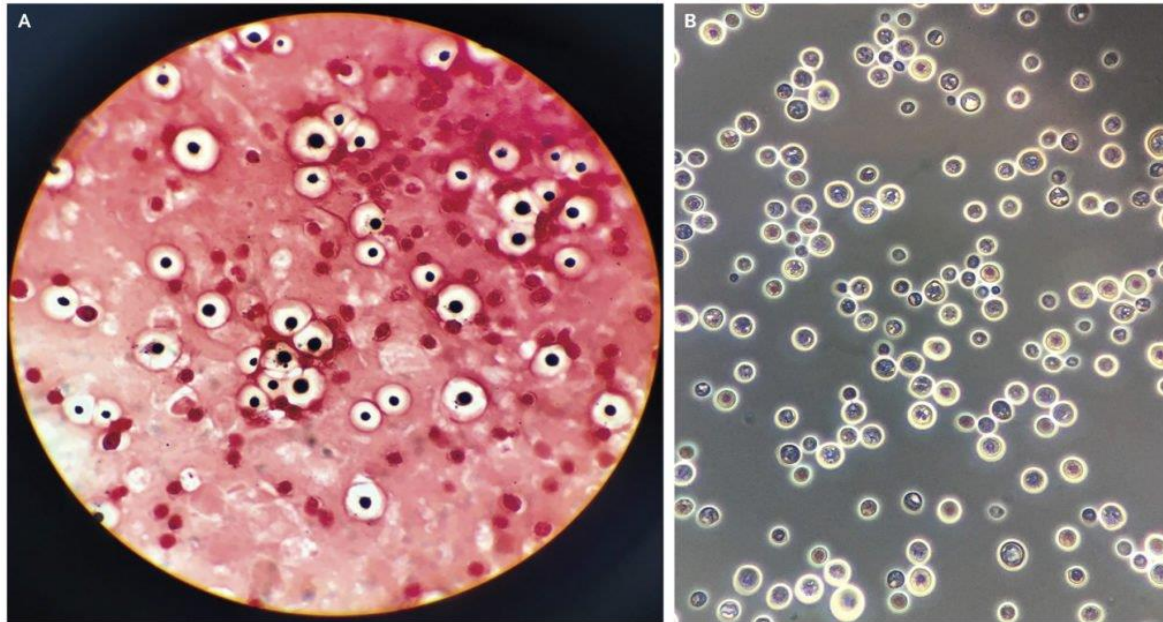
- Παράσιτα (ωάρια και κύστεις )

- **Κολπικά clue cells** (bacterial vaginosis)

- **Κινητούς μικροοργανισμούς** (Trichomonas)

# ΧΡΩΣΗ ΣΙΝΙΚΗΣ ΜΕΛΑΝΗΣ

- Ανίχνευση κυρίως του *Cryptococcus neoformans* και άλλων ελυτροφόρων μυκήτων (δείγματα ENY ).



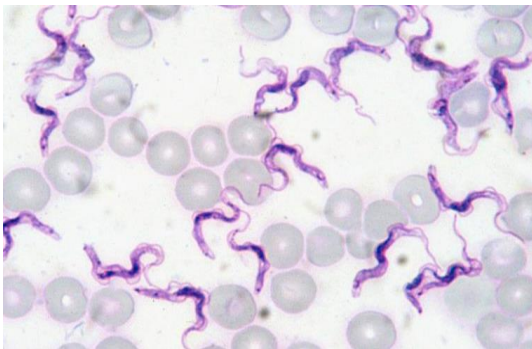
Gram's stain (Panel A) and India ink stain (Panel B) revealed abundant encapsulated, round yeasts, with some budding forms.



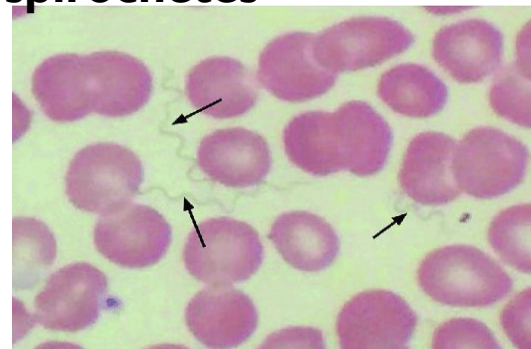
# ΧΡΩΣΗ WRIGHT ΚΑΙ GIEMSA

- **Ανιχνεύουν :**
  - Παράσιτα στο αίμα και διάφορα κύτταρα
    - *Histoplasma capsulatum* στα φαγοκύτταρα και ιστούς
    - Τροφοζώιτες της *Pneumocystis jirovecii*
  - Ορισμένα **ενδοκυττάρια βακτήρια**

**Giemsa Stain** of peripheral blood demonstrating *Trypanosoma gambiense*



Wright stain of peripheral blood demonstrating extracellular **spirochetes**



# ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

- **Καλλιέργεια** : είναι η μικροβιακή ανάπτυξη σε **θρεπτικά υλικά** –στερεά ή υγρά
- Με την καλλιέργεια **αυξάνει** πολύ ο αριθμός των μικροοργανισμών
- Η καλλιέργεια επί πλέον διευκολύνει τον έλεγχο της **ευαισθησίας στα αντιβιοτικά**
- **Επικοινωνία με το εργαστήριο !!!**
  - Αν και οι περισσότεροι μικροοργανισμοί καλλιεργούνται σε **standard καλλιεργητικά υλικά** (blood or chocolate agar), ορισμένα παθογόνα απαιτούν **ειδικά θρεπτικά συστατικά και αναστολείς** (εκλεκτικά υλικά ) ή άλλες **ειδικές συνθήκες επώασης** ( θερμοκρασία, οξυγόνο, διοξείδιο του άνθρακα ή διάρκεια επώασης).
  - Η **πηγή του δείγματος** θα πρέπει **πάντοτε να αναφέρεται** στο εργαστήριο για να διαφοροποιηθεί το παθογόνο από τη χλωρίδα

Στο εργαστήριο τα βακτήρια αναπτύσσονται σε καλλιεργητικά υλικά τα οποία περιέχουν όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά



*S. pneumoniae* σε αιματούχο  
άγαρ



*M. kansasii* σε Lowenstein-  
Jensen

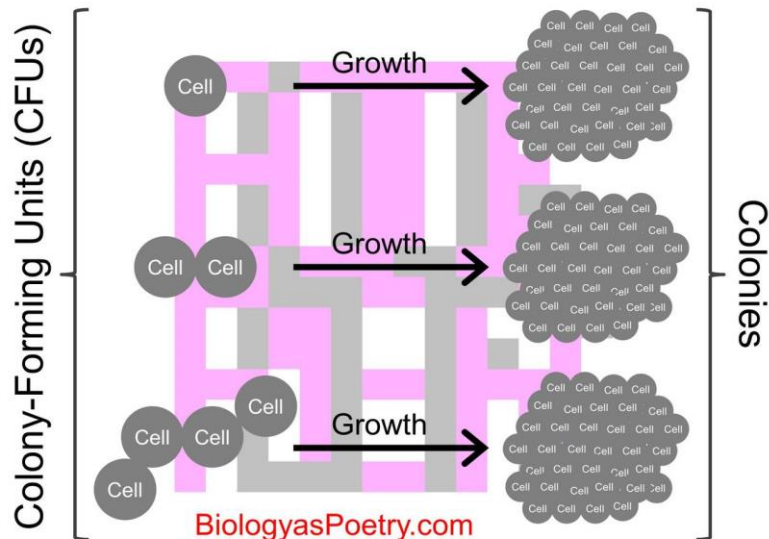


*E. coli* σε MacConkey  
agar

# ΠΩΣ ΣΧΗΜΑΤΙΖΟΝΤΑΙ ΟΙ ΑΠΟΙΚΙΕΣ

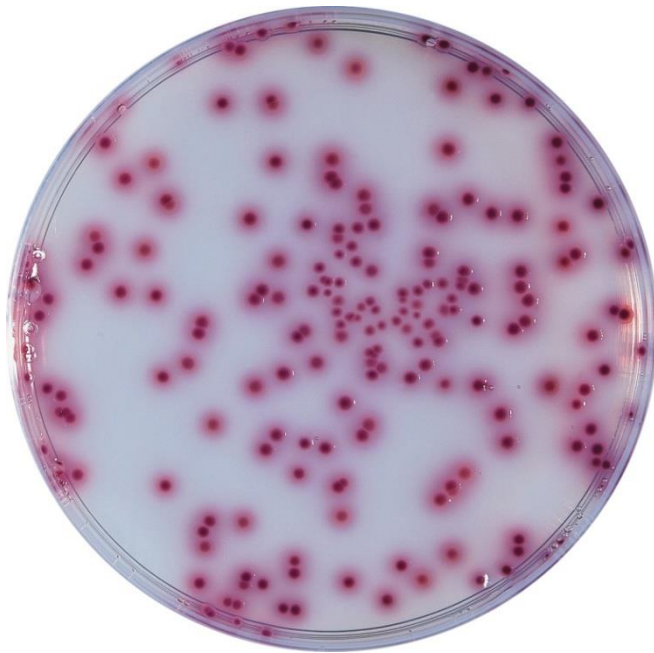
- Colony-Forming Unit-cfu/ml

- Ένα κύτταρο το οποίο σε στερεά θρεπτικά υλικά πολλαπλασιάζεται και σχηματίζει ορατή ανάπτυξη



**Pure culture** : καλλιέργειες που προέρχονται από ένα αρχικό βακτηριακό κύτταρο

**Colony forming unit-CFU**



**ΑΠΟΙΚΙΑ**



**Αποικία**- Ο βακτηριακός πληθυσμός ο οποίος προέρχεται από ένα βακτηριακό κύτταρο.

Τα βακτήρια της αποικίας έχουν τα ίδια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά

# Βακτήρια τα οποία δεν καλλιεργούνται σε τεχνητά θρεπτικά υλικά

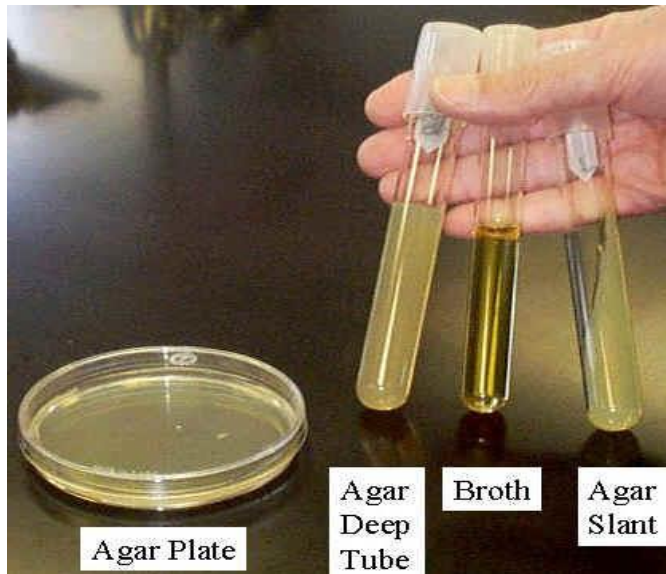
- *Mycobacterium leprae* (leprosy): Αναπτύσσεται στον αρμαδίλλο
- *Treponema pallidum* (syphilis): Αναπτύσσεται στους όρχεις κονίκλου
- Υποχρεωτικά ενδοκυττάρια βακτήρια
  - rickettsia
  - chlamydia



# ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

- Στερεά θρεπτικά υλικά
  - Άγαρ + θρεπτικά υλικά
    - Χρησιμοποιήθηκε από τον Robert Koch.
  - **Ιδιότητες του άγαρ**
    - Λιώνει στους **95°C** και στερεοποιείται **<40°C**
    - **Δεν** αποσυντίθεται από **τα βακτήρια**
    - Πολυσακχαρίτες που παραλαμβάνονται από τα **φύκη (red algae)**
- Υγρά θρεπτικά υλικά

# ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ





# ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

- Απλά υλικά - simple media
  - Θρεπτικό άγαρ- Nutrient agar
- Εμπλουτιστικά υλικά - Enriched media
  - Blood agar
  - Chocolate agar
  - Loffler's serum



# ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

## Εκλεκτικά υλικά:

**Saboraud's Dextrose Agar:** Αναστέλλει την ανάπτυξη των βακτηρίων και επιτρέπει την ανάπτυξη των μυκήτων

### ■ **Brilliant Green Agar:**

- Αναστέλλει την ανάπτυξη των gram-positive και επιτρέπει την ανάπτυξη της *Salmonella*.



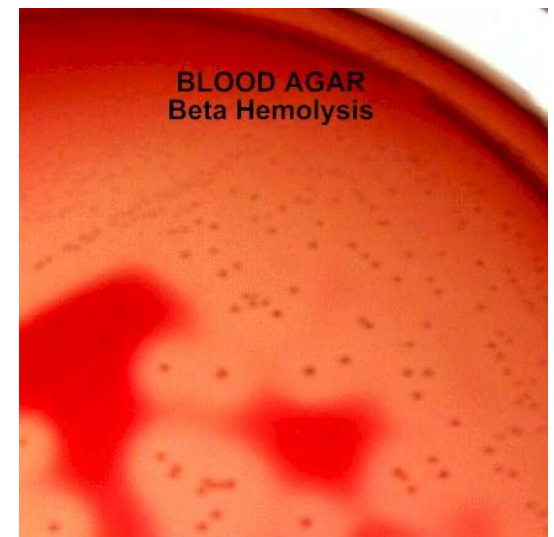
# ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

Διαχωριστικά υλικά: Χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό κάποιων βακτηρίων

- **Αιματούχο άγαρ (Blood Agar):**
  - Διαχωρίζει βακτήρια τα οποία λύουν ερυθρά
    - Αιμόλυση (hemolysis).

Π.χ: *Streptococcus pyogenes*.

# ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

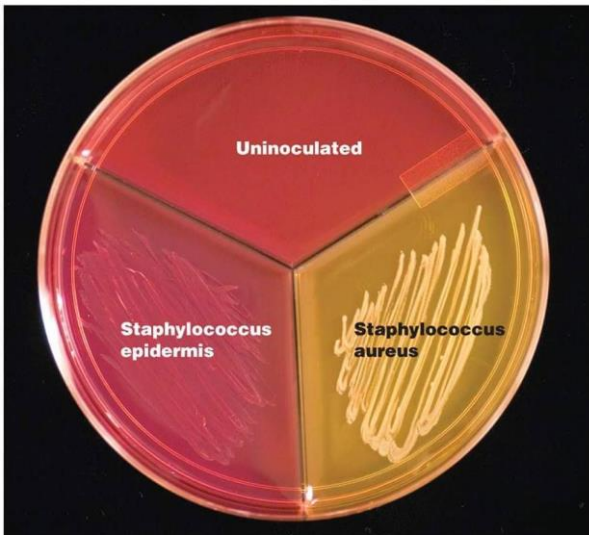


# ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ



shutterstock.com · 1574826160

- Εκλεκτικά και διαχωριστικά υλικά: Διαχωρίζουν κάποια βακτήρια και επιπλέον αναστέλλουν κάποια άλλα
- **Mannitol Salt Agar: Διάκριση του *S. aureus*.**
  - Υψηλή συγκέντρωση αλάτων(7.5% NaCl)
  - Μαννιτόλη την οποία διασπά ο *S. aureus*

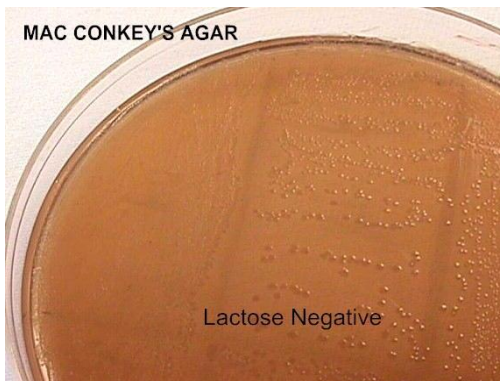
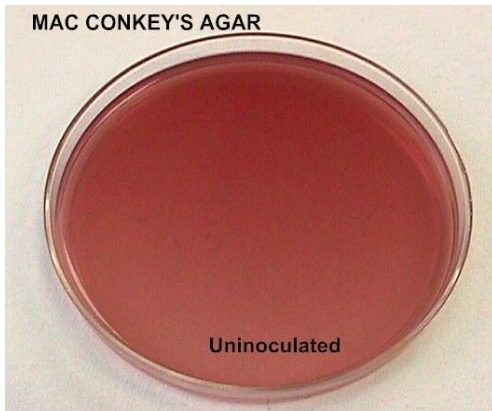


© 2013 Pearson Education, Inc.

# ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ



MAC CONKEY'S AGAR



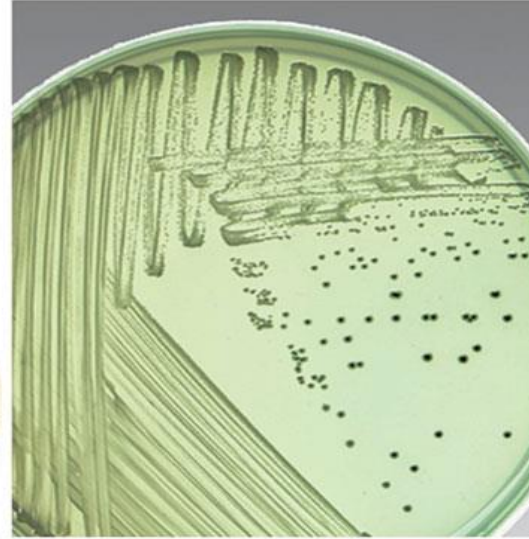
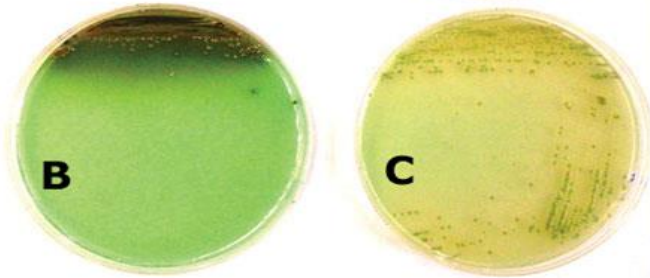
- Εκλεκτικά και διαχωριστικά υλικά:
- **MacConkey Agar:** Χρησιμοποιείται για την διάκριση Gram- αρνητικών βακτηρίων
  - **Χολικά άλατα και crystal violet**
    - αναστέλλουν τα gram-positive βακτήρια
  - **Lactose**
    - Τα βακτήρια που τη ζυμώνουν παράγουν ρόζ αποικίες
    - Τα βακτήρια που δεν τη ζυμώνουν παράγουν άχρωμες αποικίες

## Bismuth Sulphite Agar (BSA)

A: *Salmonella* sp.

B: *Klebsiella pneumoniae*

C: *Pseudomonas aeruginosa*



## *Candida albicans* on Sabouraud Dextrose Agar



## Harlequin Salmonella ABC Medium



# ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

BIOMÉRIEUX

- Mineral oil (125ml)
- Ampules of API AUX Medium (5ml)
- Ampule protector
- Additional Reagents
- Incubation boxes
- Pipettes or PSipettes
- API 20 NE strips

BIOMÉRIEUX

- Separation of a single colony
- Bacterial suspension
- Ampules of API AUX Medium (5ml)

BIOMÉRIEUX

- Fill the tubes and cupules of tests GLU to PAC with the suspension.
- Place the strip in the incubation box.
- Distribute 5 ml of distilled water into the bottom of the incubation box.
- Add mineral oil to the cupules of the underlined tests  
**ADH ODC H2S URE**
- Close the incubation box

BIOMÉRIEUX

判定表

反応/酵素	成績	
	陽性	陰性
ガラクトシダーゼ	黄色(1)	無色
アミノヒドロラーゼ	赤色/オレンジ色	黄色
リカルボキシラーゼ	オレンジ色	黄色
アンプノキサミナーゼ	赤色/オレンジ色	黄色
糖の利用性	赤色/白色	深緑色/黄色
硫化	黒色の沈澱	無沈澱/白沈澱

- After the incubation period, read the strip by referring to the Reading Table.
- Identification is obtained by referring to the Analytical Profile Index or using the identification software.

BIOMÉRIEUX

- Close the incubation box and incubate at 29° C ± 2° C for 24 hours (± 2 hours).
- 18-24 hours
- According to the instructions, to add additional reagent to the corresponding holes
- api reagent

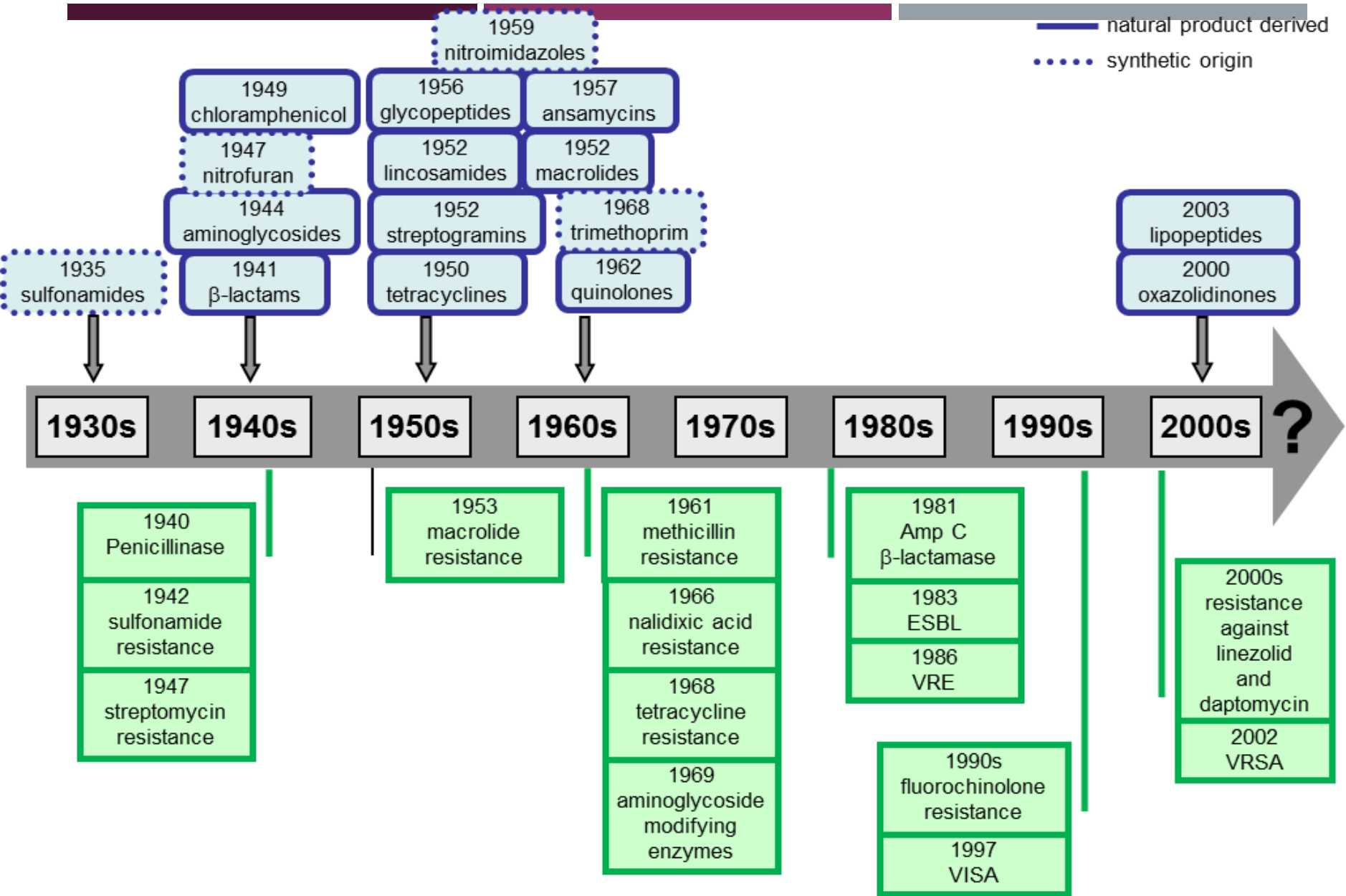




# ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ



# Introduction of new antibiotic classes



## Development of bacterial resistance

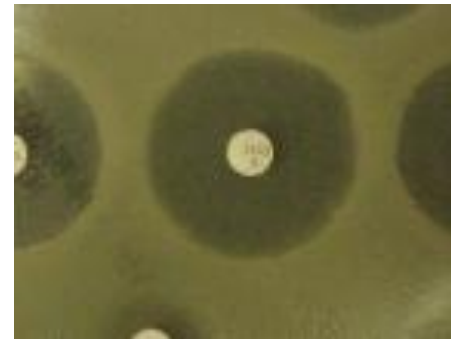
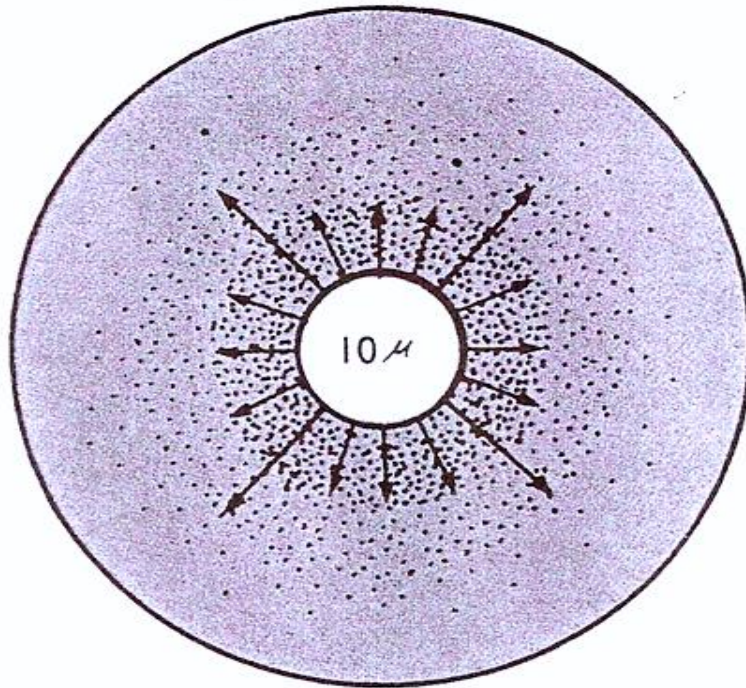
# ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

- Μέθοδος διάχυσης σε άγαρ ή Kirby-Bauer
- Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (**Minimum Inhibitory Concentration -MIC**)
- Προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοκτόνου πυκνότητας (Minimal Bactericidal Concentration - MBC)
- EUCAST (Clinical and Laboratory Standards Institute)
  - Προτυποποίηση των μεθόδων

# ΕΠΙΛΟΓΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

- Προτεινόμενα από την επιτροπή EUCAST (Clinical and Laboratory Standards Institute)
- Ανάλογα με το είδος του μικροβίου
- Ανάλογα με τη θέση της λοίμωξης

- Μέθοδος διάχυσης σε άγαρ ή
- Kirby-Bauer

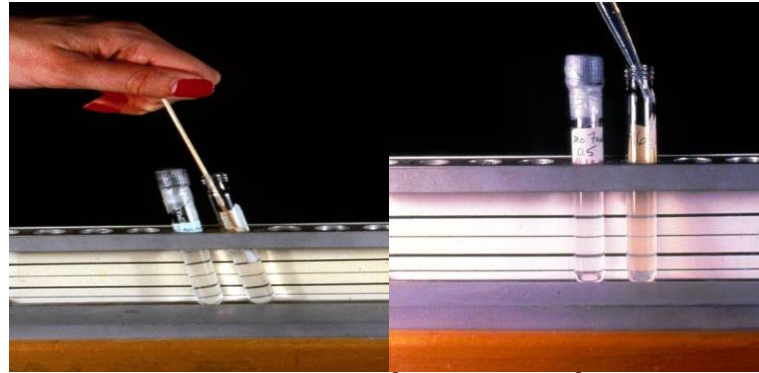


**Αρχή μεθόδου διάχυσης αντιβιοτικού στο άγαρ**

Η συγκέντρωση του αντιβιοτικού μειώνεται όσο η απόσταση από το δισκίο



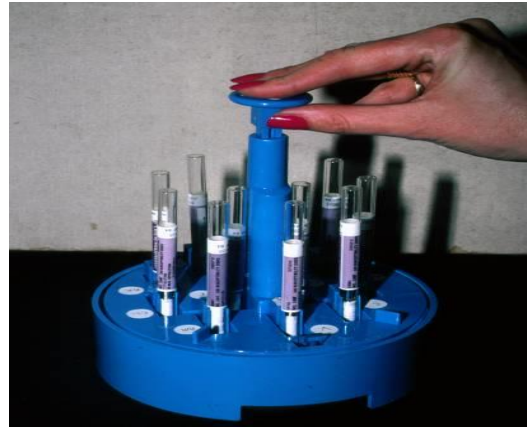
**1.Επιλογή αποικιών**



**2.Παρασκευή εναιωρήματος**  
**Θολερότητα : 0.5 κλίμακας McFarland**  
**(  $1-2 \times 10^8$  CFU/ml**



**3. Επίστρωση**

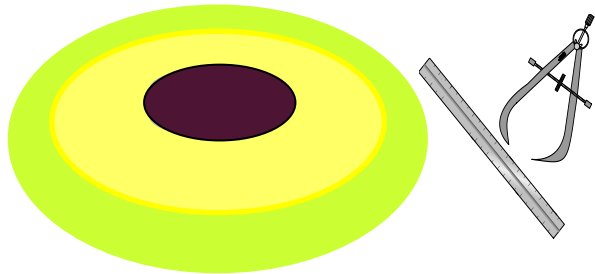


**Προσθήκη των δίσκων**

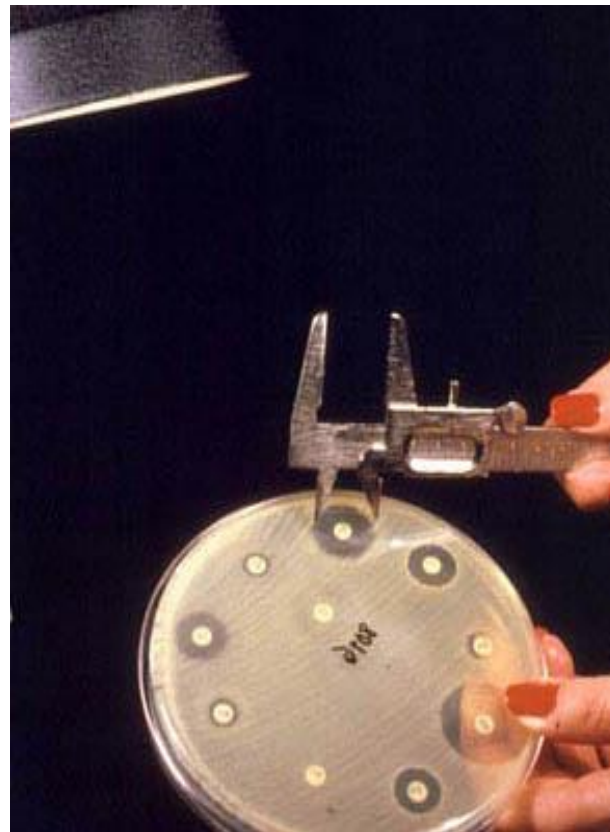
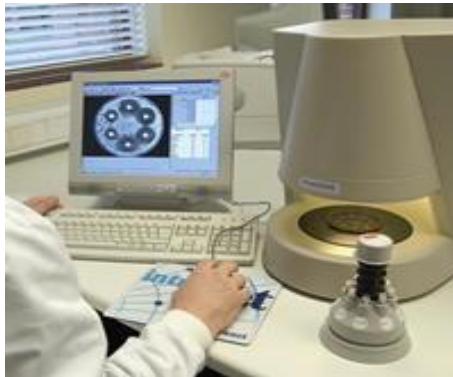


**Επώαση overnight**

# Ανάγνωση αποτελεσμάτων



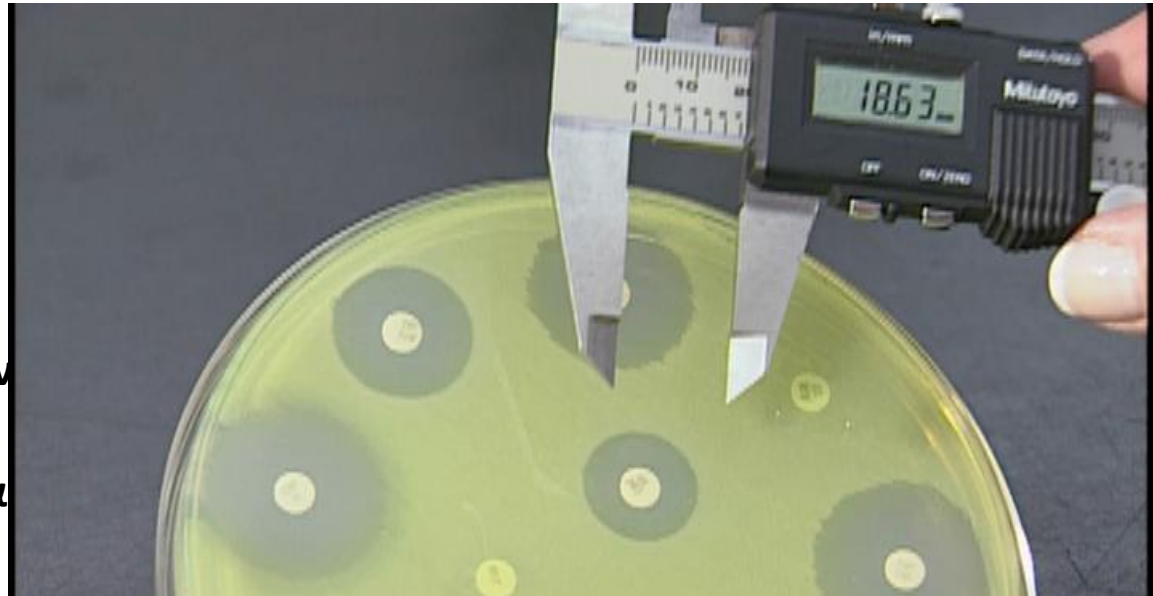
Μέτρηση διαμέτρων  
Χάρακας ή παχύμετρο ή κάμερα



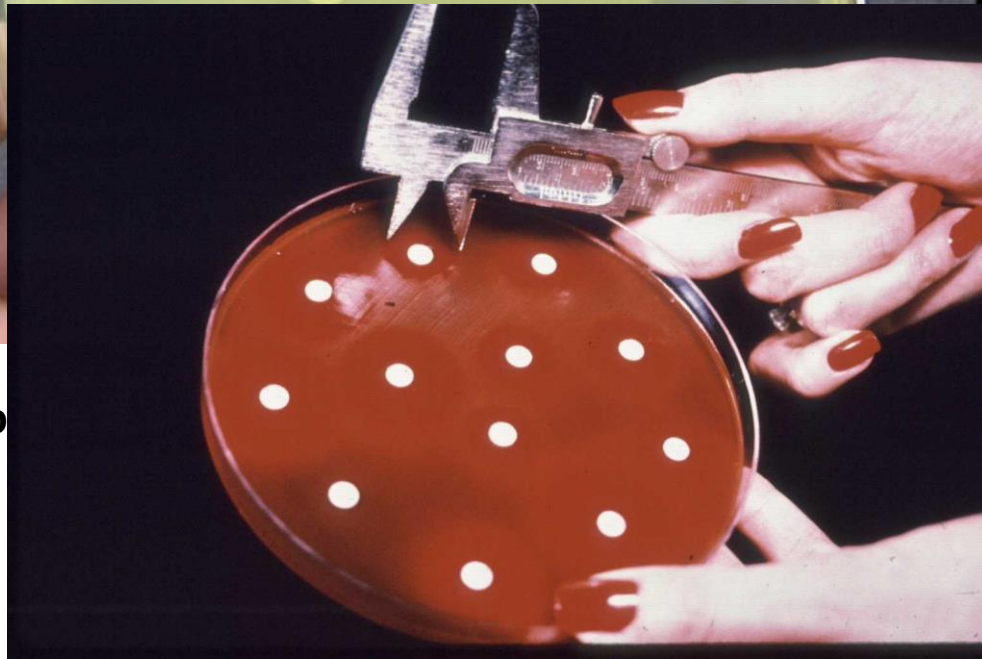
## Ανάγνωση αποτελεσμάτων

- Προσπίπτων

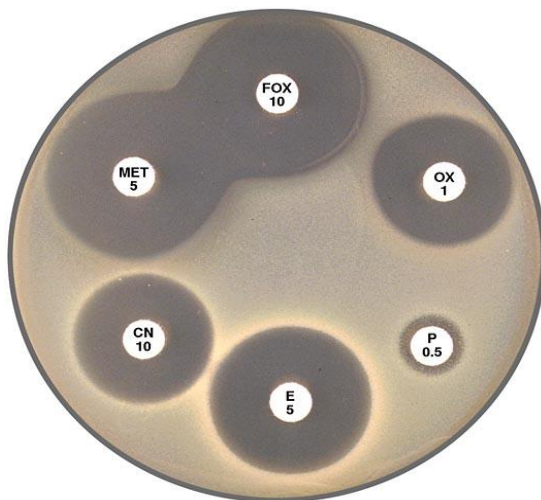
- Πίσω πλευρά



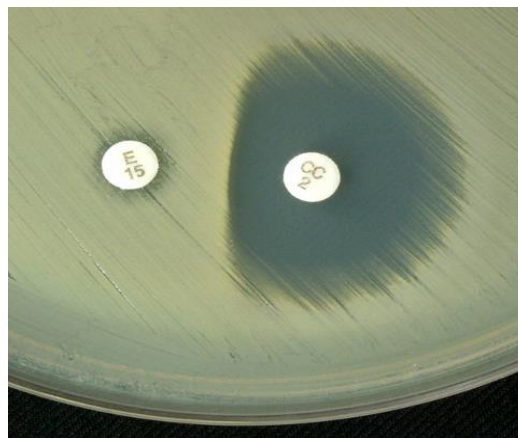
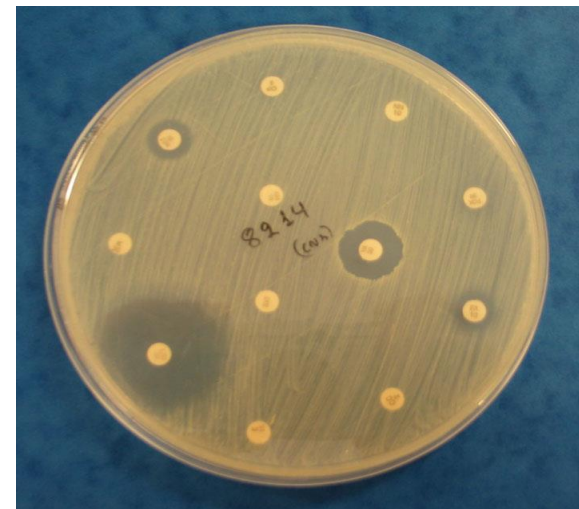
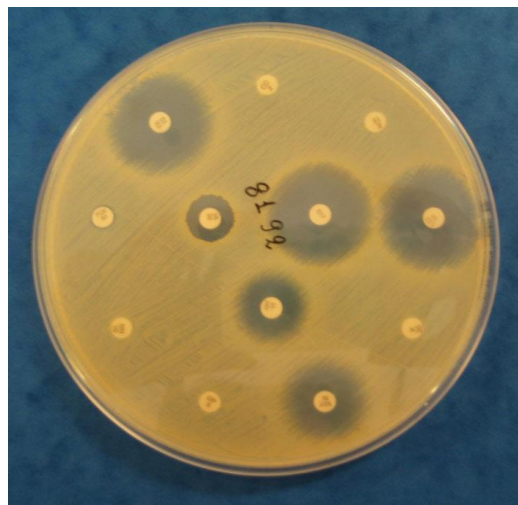
- Επιφάνεια αιματούχο







Penicillin-ανθεκτικοί και  
Cefoxitin-ευαίσθητοι  
σταφυλόκοκκοι



Επαγωγίμη αντοχή στην clindamycin (*erm*-  
mediated)

# ΕΡΜΗΝΕΙΑ

- Σύμφωνα με τους πίνακες της EUCAST χαρακτηρίζουμε το βακτήριο ως:
  - Ευαίσθητο
  - Μετρίως ευαίσθητο
  - Ανθεκτικό



www.eucast.org

NA  
Not Applicable

Disk diffusion (EUCAST standardised disk diffusion method)  
 Medium:  
 Inoculum:  
 Incubation:  
 Reading:  
 Quality control:

Antimicrobial agent	MIC breakpoint (mg/L)		Disk content (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)		Notes
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Antimicrobial agent A	1 <sup>1</sup>	1 <sup>1</sup>	X	20 <sup>A</sup>	20 <sup>A</sup>	1. Notes that are general comments and/or relating to MIC breakpoints
Antimicrobial agent B, <i>S. aureus</i>	2 <sup>2</sup>	4	Y	26	23	2. New comment
Antimicrobial agent C	IE	IE		IE	IE	Removed comment
Antimicrobial agent D	-	-		-	-	
Antimicrobial agent E	IP	IP		IP	IP	A. Comment on disk diffusion
Antimicrobial agent F (screen)	NA	NA	Y	25	25	
Antimicrobial agent G	0.5	2	Z	30	24	

NA means Not Applicable and is mostly used for agents with zone diameter screening breakpoints where there are no clinical MIC breakpoints.

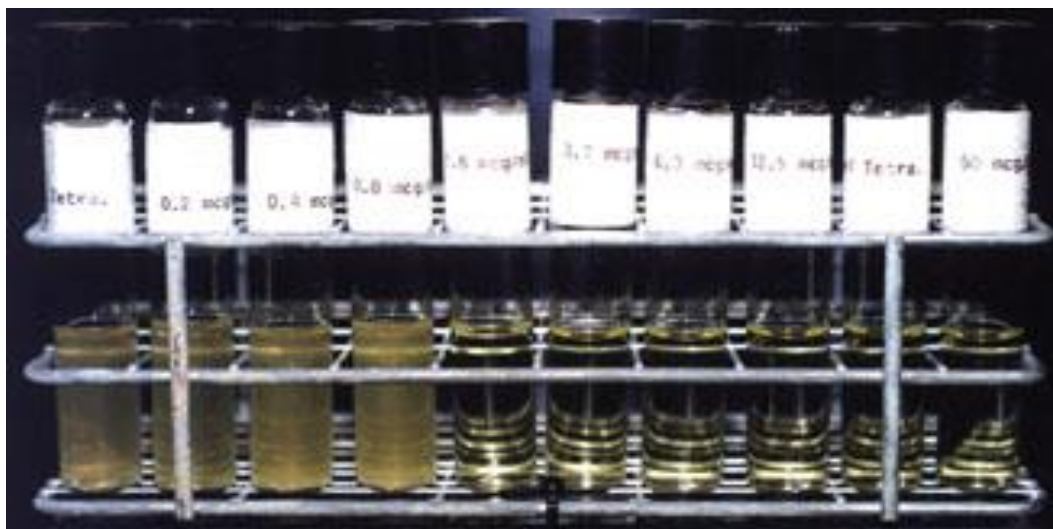
# ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ (MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION -MIC)

- **Μέθοδος αραιώσεων σε ζωμό (broth dilution method)**
  - **Μακρο-μέθοδος (macrodilution)**
  - *Μικρο-μέθοδος (microdilution)*
- **Μέθοδος αραιώσεων σε άγαρ (agar dilution method)**

- ✓ **Μέθοδοι αναφοράς (Standard Reference Methods)**
- ✓ **Μέθοδοι προτυποποιημένες**

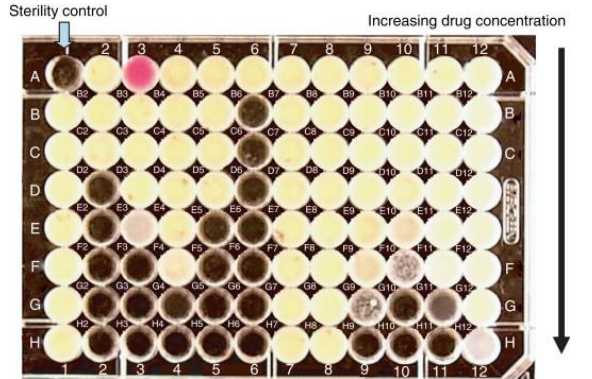
# ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΣΕ ΖΩΜΟ

- ✓ Μακρομέθοδος: σωληνάκια

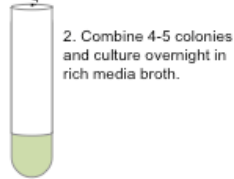
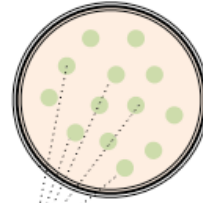


**MIC = 1.6  $\mu$ g/ml.**

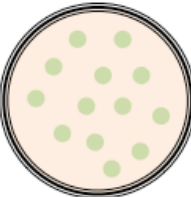
✓ Μικρομέθοδος:  
πλάκα μικροτιτλοποίησης



1. Obtain isolated colonies of bacterial strain to test.



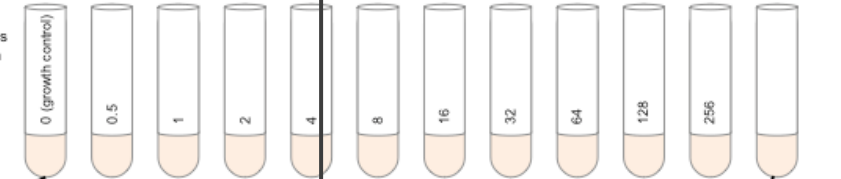
2. Combine 4-5 colonies and culture overnight in rich media broth.



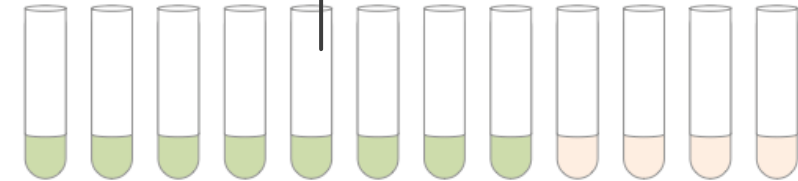
4. Plate aliquot of growth control (i.e., no antibiotic added) to verify cfu/ml counts of viable bacteria. Incubate overnight and count colonies.

**Broth dilution method for measuring minimum inhibitory concentration of antibiotics**

3. After overnight incubation shown at left, add rich broth with appropriate dilution series of test antibiotic to test tubes. Example concentrations (mg/L) are shown below. Inoculate bacteria to a final density of  $5 \times 10^5$  cfu/ml.

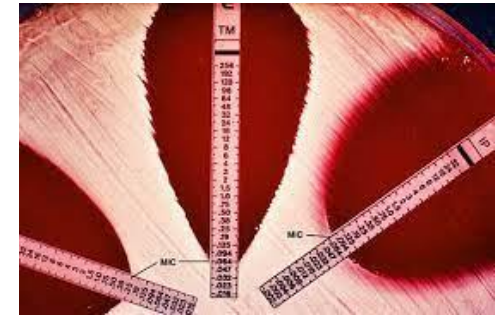
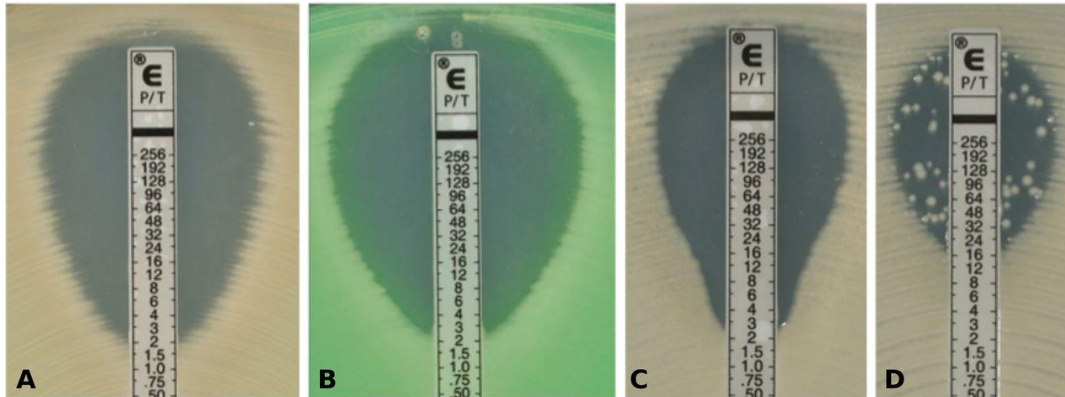


No bacteria; broth control



5. After overnight incubation, check cultures for growth. The MIC is the lowest concentration of antibiotic that prevents visible growth. In this example, the MIC is 64 mg/L.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΣΕ ΖΩΜΟ



# E-TEST

ΤΑΙΝΙΕΣ ΜΕ 15 ΔΙΑΒΑΘΜΙΣΜΕΝΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟΥ

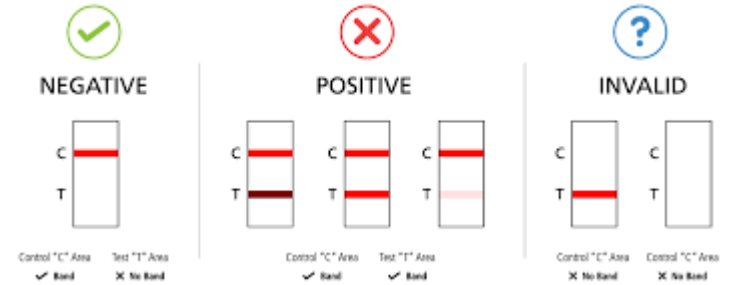
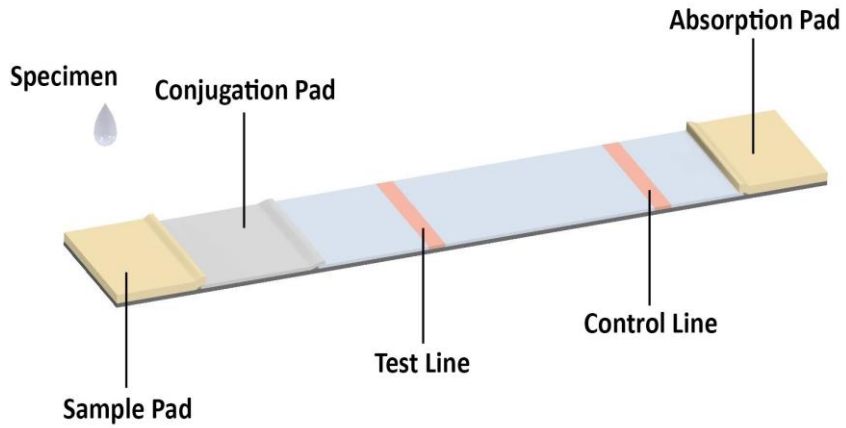
# RAPID DIAGNOSTIC TESTS

- Υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία
- Υψηλή αρνητική και θετική προγνωστική αξία - negative and positive predictive values
- Υψηλή ακρίβεια συγκρινόμενα με μεθοδολογίες gold standard
- Απλό στη χρήση
- Γρήγορο αποτέλεσμα
- **ΑΚΡΙΒΟ**





# RAPID DIAGNOSTIC TESTS

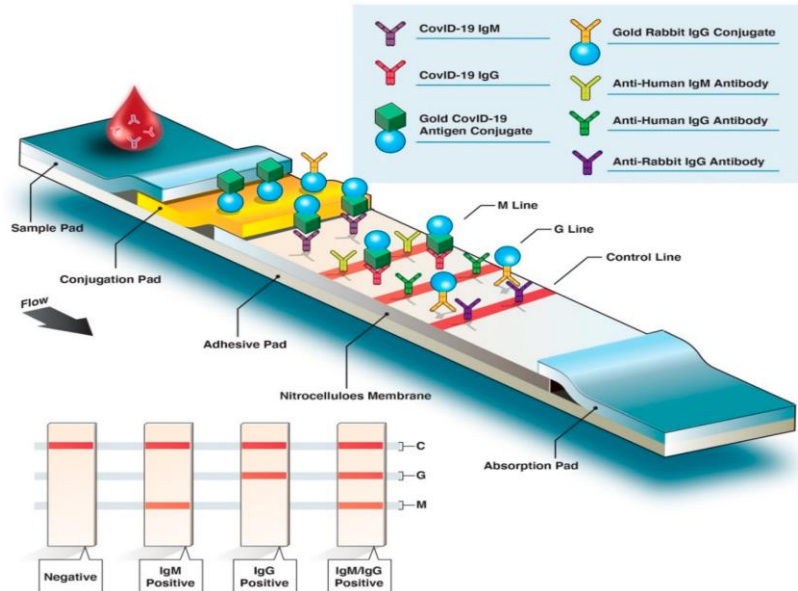


Conjugation Pad: SARS-CoV-2 Nucleoprotein Antibody (rabbit MAb) and chicken IgY

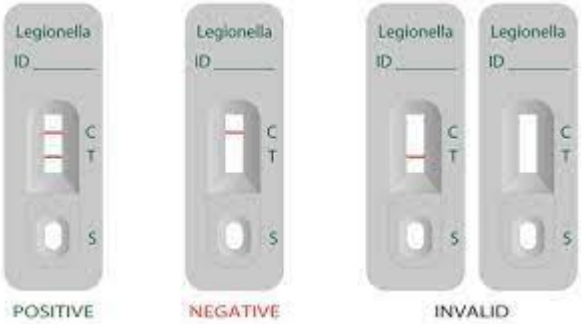
Test Line: SARS-CoV-2 Nucleoprotein Antibody (rabbit MAb)

Control Line: Goat anti-chicken IgY

## Rapid diagnostic tests covid 19



# RAPID DIAGNOSTIC TESTS



## RAPID DIAGNOSTIC TESTS

Pathogens	Generic name of test	Mechanism	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Positive Predictive Value (%)	Negative Predictive Value (%)	Time to perform test
Respiratory Syncytial Virus	RSV Immunoassay	Qualitative detection of RSV antigen by immunoassay	89-93	93 - 99	96-97	80-89	15 minutes
Influenza A Virus	Rapid Flu A	Detection of influenza A nucleoprotein antigen	78-82	92 - 94	80-91	90-97	10-15 minutes
Influenza B Virus	Rapid Flu B	Detection of influenza B nucleoprotein antigen	58-71	96 - 97	Not available	Not available	10-15 minutes
Influenza A & B Viruses	Rapid Flu A & B	Non-differential detection of both influenza A & B by neuraminidase enzyme assay	52-73	92-99	95-98	74-80	22 minutes
Influenza A + B Viruses	Influenza A + B	Differential detection of both influenza A & B by Immunoassay	72 – 82	96 – 99	80-90	90-97	10 minutes
Epstein Barr Virus	Mono Spot	Detection of heterophile antibodies	91-99	96	97-98	99	3-5 minutes
HIV	Rapid HIV	Detects HIV-I antibody	99	99	Not available	Not available	10-20 minutes

## RAPID DIAGNOSTIC TESTS

Pathogens	Mechanism	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Positive Predictive Value (%)	Negative Predictive Value (%)	Time to perform test
Group A Streptococcus	Detects group A staphylococcal carbohydrate antigen by immunoassay	89-94 (Compared to culture)	95-99	55-89	90-97	5 minutes
<i>Helicobacter pylori</i>	Detects immunoglobulin G antibodies specific to H. <i>pylori</i>	85-90 (Compared to biopsy)	80-89	85	79	5-10 minutes
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Detects antibodies to <i>B. burgdorferi</i> using recombinant antigen	72 (Compared to ELISA)	97	Not available	Not available	20 minutes

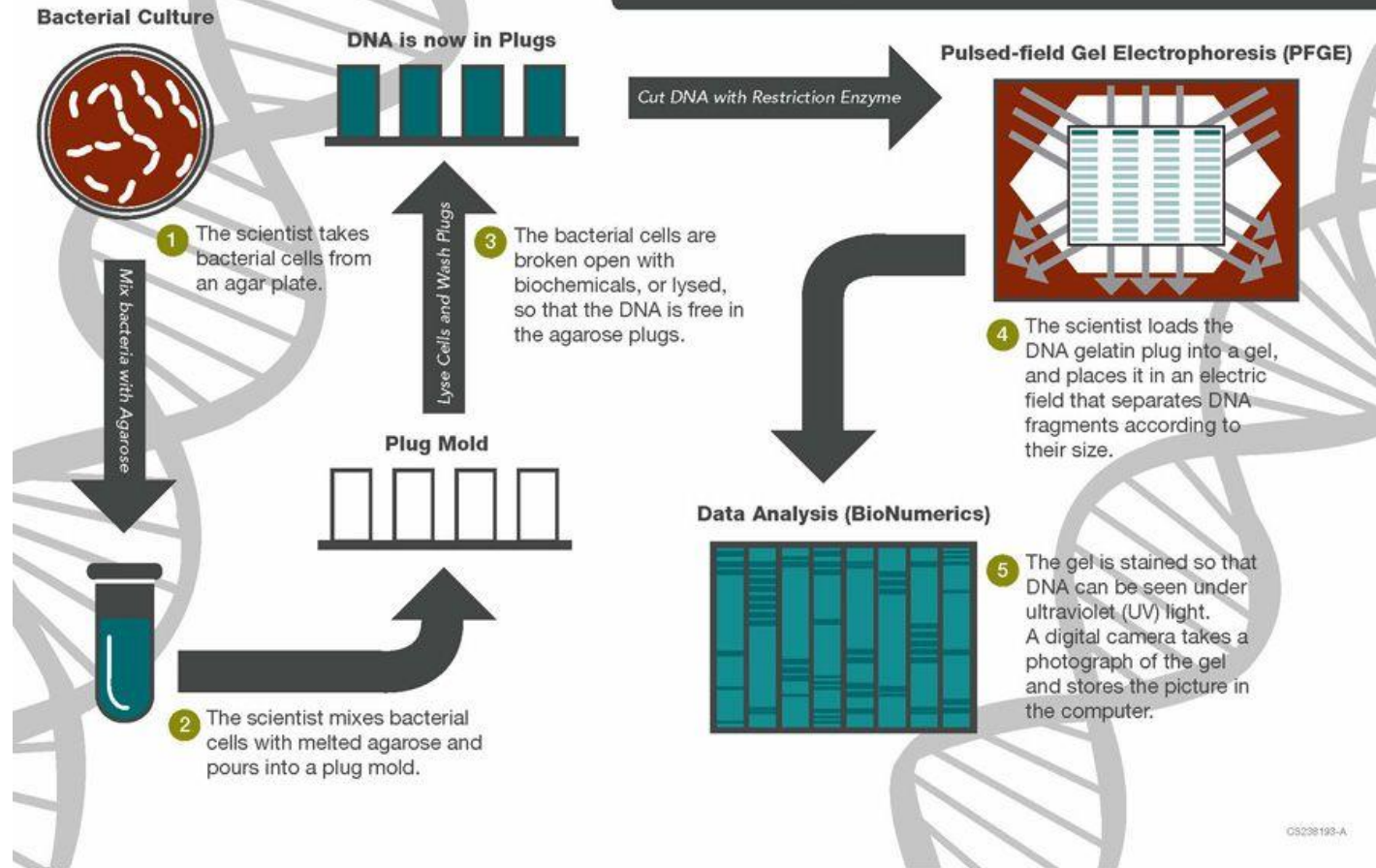
# ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

- Πλεονεκτήματα
  - Ευαισθησία
    - Ανιχνεύουν πολύ μικρές ποσότητες μικροβιακού **DNA** και **RNA** ακόμα και όταν ο μικροβιακός παράγοντας δεν πολλαπλασιάζεται ή δεν δίνει σημεία λοίμωξης
  - Ειδικότητα
  - Ασφάλεια

# ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

- Ηλεκτροφορητική ανάλυση του **DNA** και πολυμορφισμός μήκους των θραυσμάτων περιορισμού
  - Τα στελέχη των μικροοργανισμών διακρίνονται με βάση το **DNA** ή το **RNA** τους ή από τα θραύσματα του DNA ή του RNA που παράγονται όταν αυτό πέπτεται με ειδικά ένζυμα –ενδονουκλεάσες περιορισμού
    - Οι ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες του **DNA** και τεμαχίζουν το **DNA** του δείγματος σε διαφορετικές θέσεις
    - Τα μικρότερα θραύσματα, όπως αυτά των πλασμιδίων, διαχωρίζονται με κοινές ηλεκτροφορητικές μεθόδους
    - Τα μεγαλύτερα, όπως των βακτηρίων, διαχωρίζονται με την ηλεκτροφόρηση επί πηκτής σε παλλόμενο πεδίο (**pulsed-field gel electrophoresis**)

# The Pulsed-field Gel Electrophoresis Process

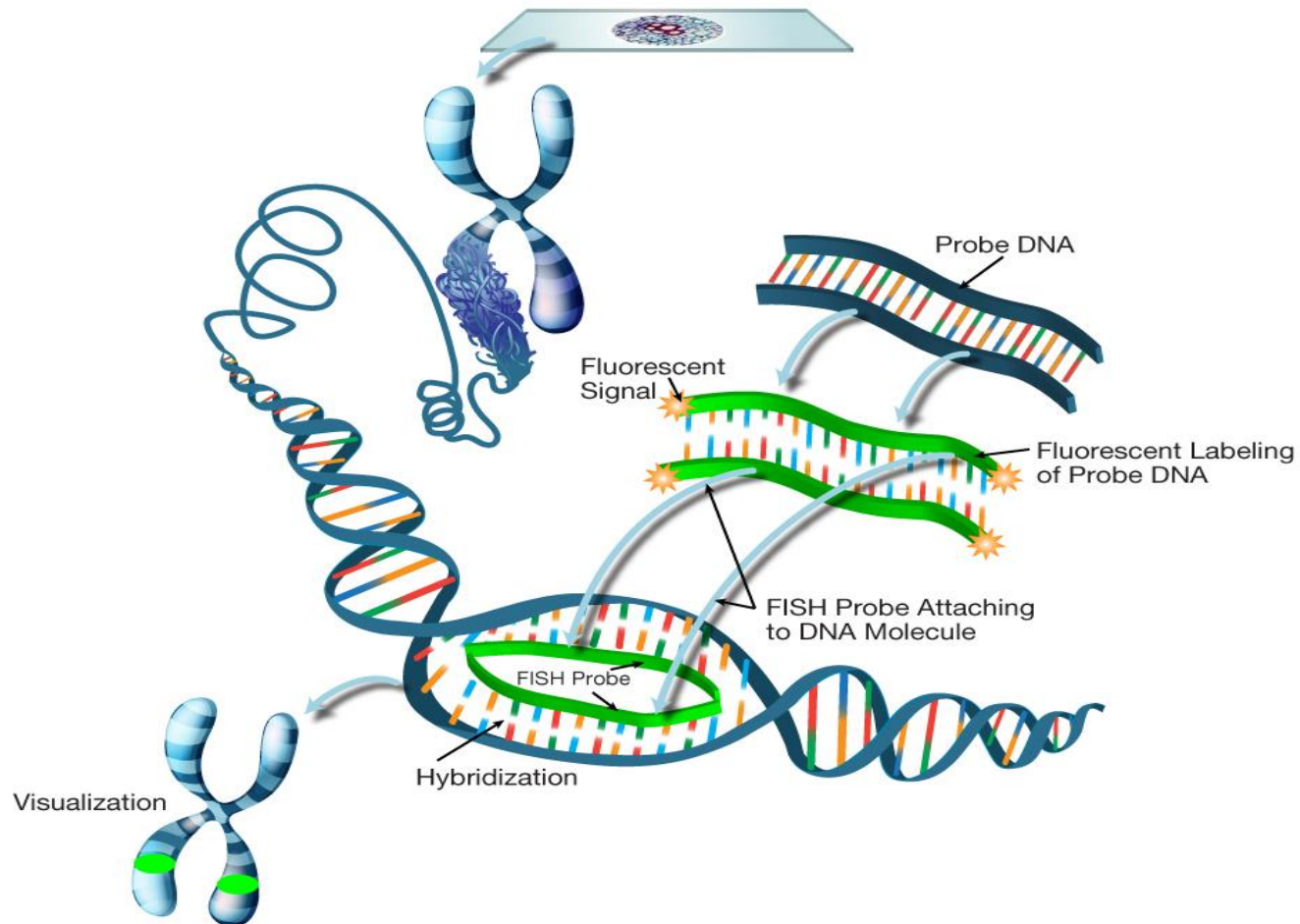


# ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΝΟΥΚΛΕΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

- **Ανιχνευτές DNA**
  - Συντίθενται με χημικές μεθόδους ή με κλωνοποίηση συγκεκριμένων τμημάτων του γονιδιώματος
    - στους RNA ιούς παράγονται αντίγραφα **DNA** με ανάστροφη μεταγραφή
  - Μετά την μετουσίωση του **DNA** (θερμική ή χημική ) προστίθεται ο ανιχνευτής και αφήνεται να υβριδοποιηθεί (συνδεθεί) με την πανομοιότυπη ακολουθία στο δείγμα
  - οι ανιχνευτές του DNA σημαίνονται με **νουκλεοτίδια χημικά τροποποιημένα ή σεσημασμένα με ραδιοϊσότοπο** ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευσή τους και ο ποσοτικός προσδιορισμός



# FLUORESCENCE IN-SITU HYBRIDIZATION (FISH)

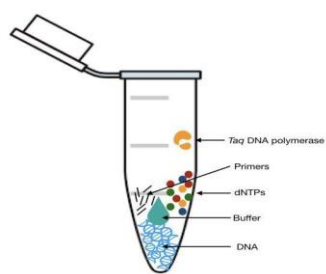
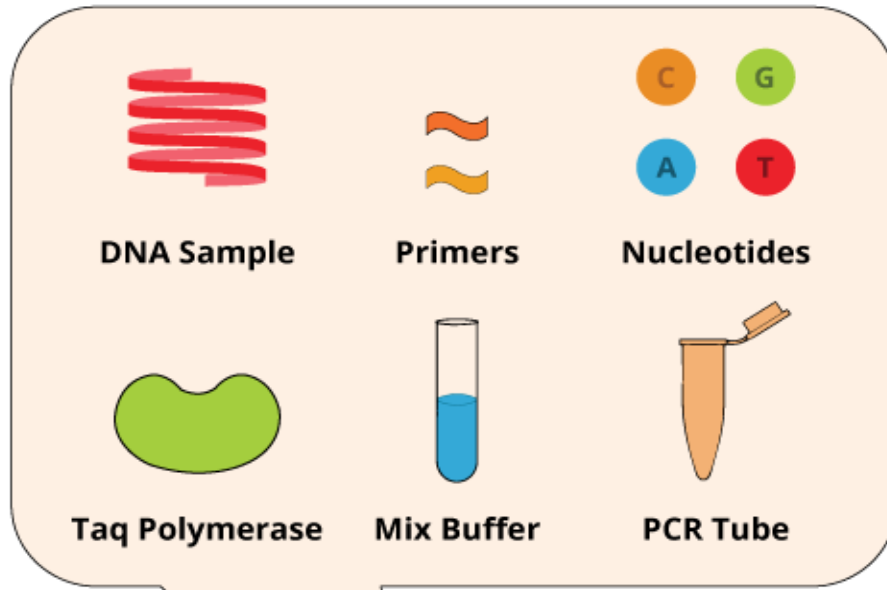


# ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

- Πολλαπλασιάζει κατά εκατομμύρια φορές απλά αντίγραφα DNA
- Το δείγμα επωάζεται :
  - με δύο μικρού μήκους εκκινητές, οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί των άκρων γνωστής ακολουθίας που αποτελεί το στόχο εντός του ολικού **DNA**
  - Μία θερμοάντοχη **DNA** πολυμεράση
  - Νουκλεοτίδια
  - Ρυθμιστικά διαλύματα
- Οι εκκινητές συνδέονται στις κατάλληλες ακολουθίες και λειτουργούν σαν εκκινητές για την πολυμεράση η οποία αντιγράφει αυτό το τμήμα του **DNA**
- Κάθε τμήμα του **DNA** λειτουργεί σαν εκμαγείο και η διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές-20-40 για να ενισχυθεί η αρχική ακολουθία
  - Πολλαπλασιασμός του στόχου 1.000.000 φορές σε λίγες ώρες

# ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

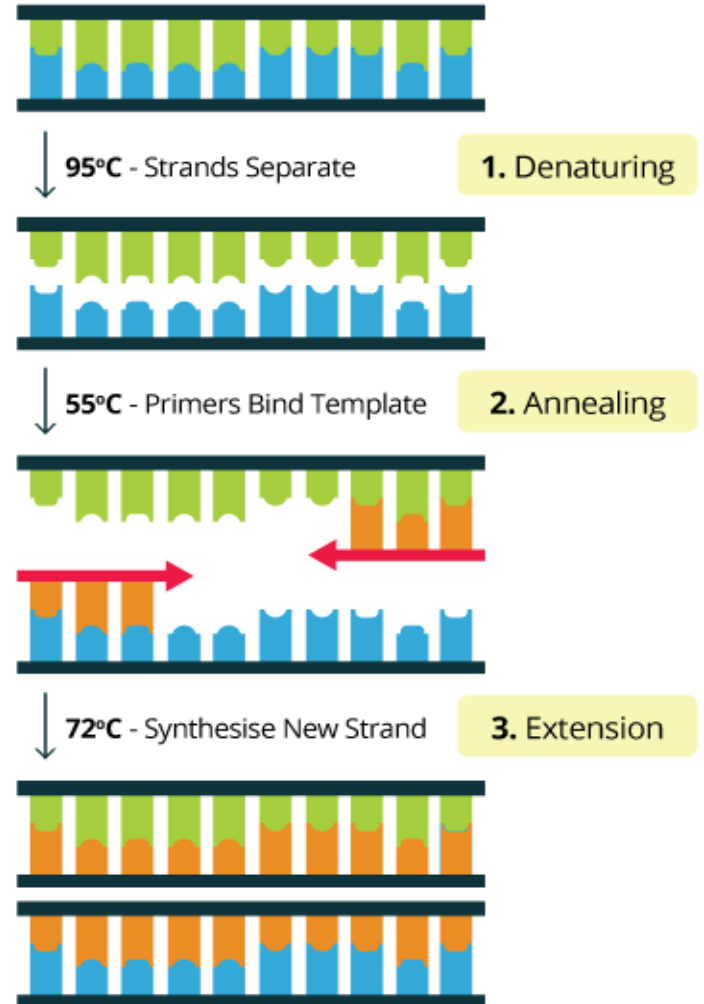
## PCR Components



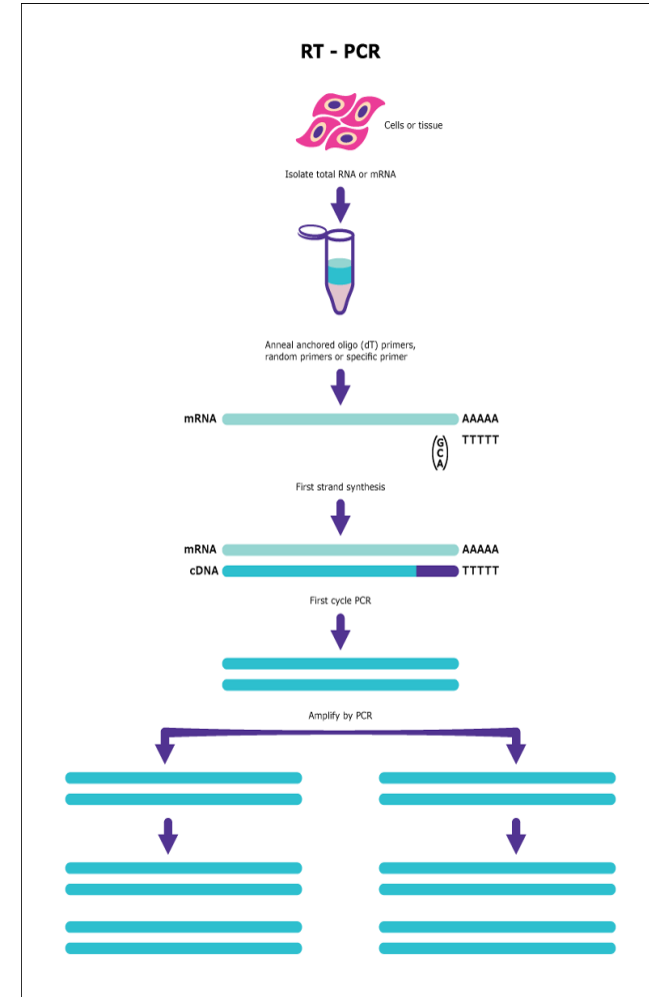
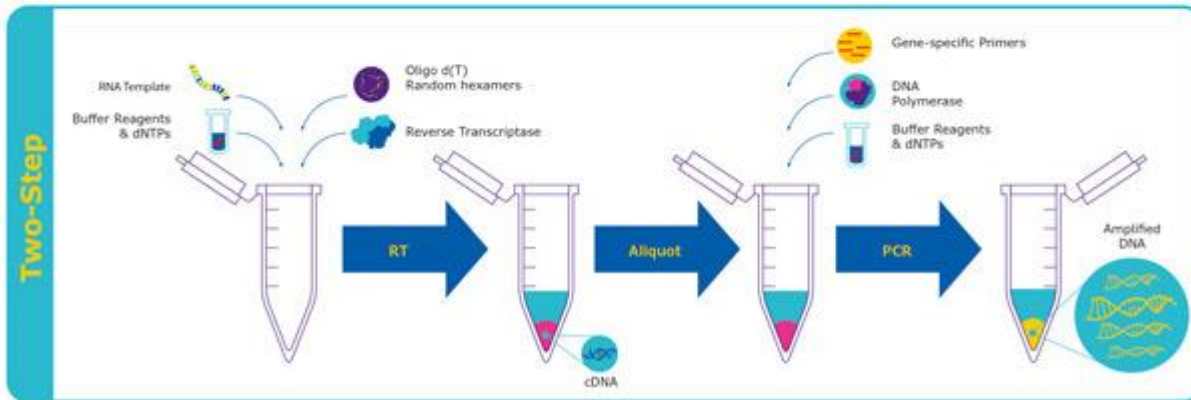
Thermal Cycler



## PCR Process (One Cycle)

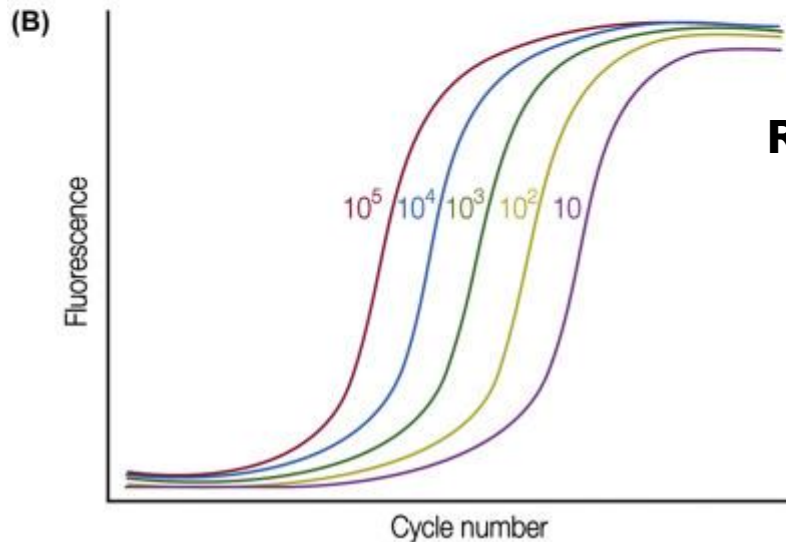
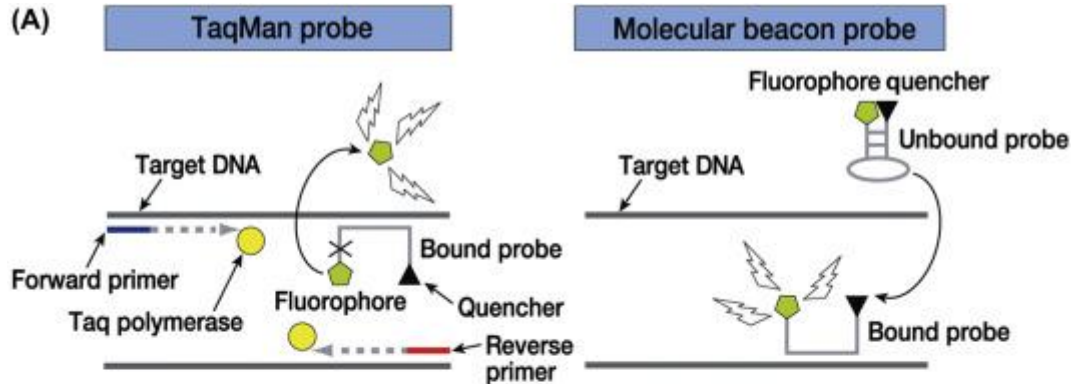


# RT-PCR - αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση



Χρησιμοποιείται αντίστροφη μεταγραφάση για να μετατραπεί το RNA των ιών σε DNA πριν την ενίσχυση

# Real-time PCR σε πραγματικό χρόνο

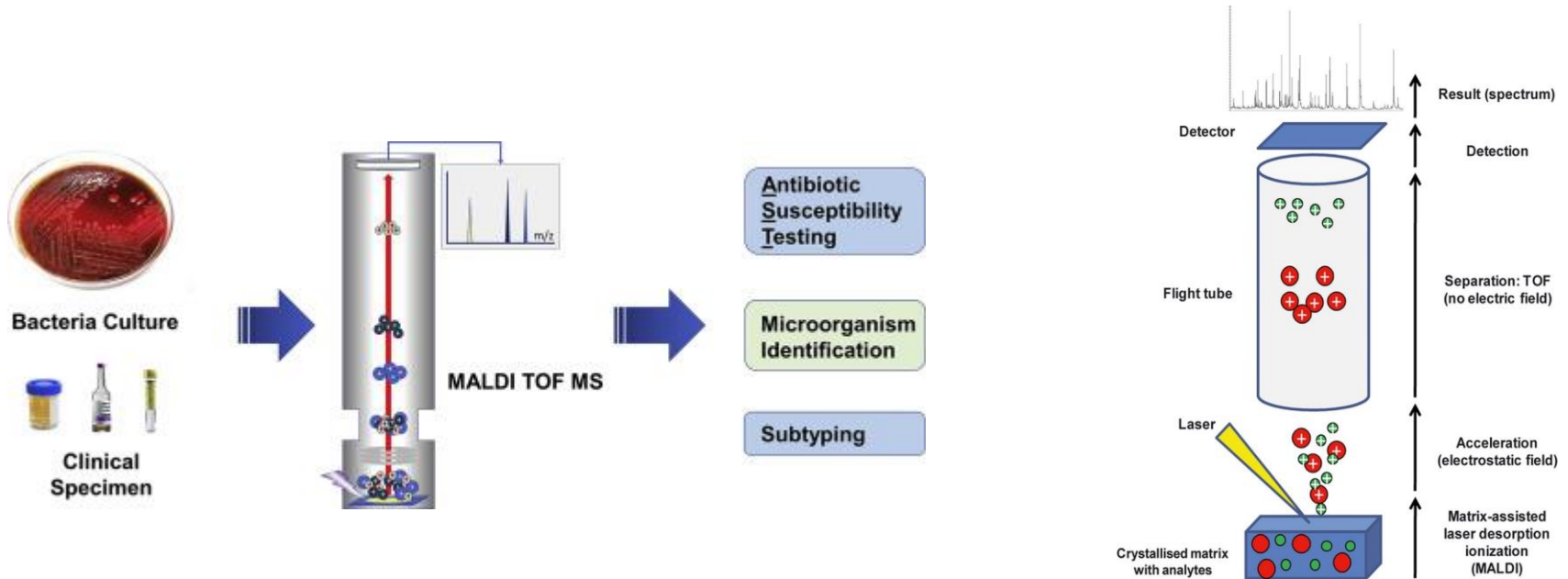


## Real-time PCR σε πραγματικό χρόνο

Ποσοτική μέτρηση του **DNA** ή του **RNA**

Η παραγωγή δίκλωνου DNA μετρείται με την αύξηση του φθορισμού ενός μορίου συνδεδεμένου με το πολλαπλασιαζόμενο DNA

# MALDI-TOF-Φασματοσκοπία μάζας



Το DNA ή το RNA εισέρχεται στον αναλυτή, ιονίζεται και κατακερματίζεται.

Τα θραύσματα διαχωρίζονται βάση του λόγου του φορτίου/ μάζα

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία προσδιορίζεται με ανάλυση της μάζας των ιονισμένων θραυσμάτων

Η σύγκριση συγκεκριμένων γονιδίων π.χ. 16S RNA με μια τράπεζα γονιδιακών αλληλουχιών επιτρέπει την ταχεία ανίχνευση μικροβίου, την ταυτοποίηση βακτηρίων και ιών και το διαχωρισμό μικροβιακών στελεχών