

## ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

# Μοριακές τεχνικές για την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό μικροοργανισμών

Η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός (ταυτοποίηση και τυποποίηση) παθογόνων ή μη μικροοργανισμών αποτελούν θέματα μείζονος σημασίας για την κλινική και την εργαστηριακή πρακτική. Οι μοριακές διαγνωστικές τεχνικές είναι αρωγοί στην προσπάθεια για την τυποποίηση των μικροοργανισμών, αλλά και την αύξηση της διαγνωστικής ευαισθησίας ταυτόχρονα με τη συντόμωση της διαγνωστικής πράξης. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται ταχύτερη και ακριβέστερη αντιμετώπιση των παθογόνων μικροβίων, είτε αυτά έχουν ήδη προσβάλει ανθρώπους, ζώα και φυτά είτε υπάρχουν στα τρόφιμα και στο περιβάλλον των συγκεκριμένων ξενιστών. Η ανακάλυψη της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και των άλλων παρεμφερών μοριακών τεχνικών βοήθησε στην ταχεία ανάπτυξη της μοριακής διαγνωστικής πρακτικής. Επί πλέον, η PCR πραγματικού χρόνου επιτρέπει τον ποιοτικό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των μικροοργανισμών παρέχοντας σημαντική πληροφόρηση για τη θεραπεία του ξενιστή. Βέβαια, η χρήση της τεχνικής PCR πιθανόν να εμφανίσει περιορισμούς, όπως ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω επιμολύνσεων. Γι' αυτόν το σκοπό πραγματοποιείται μια προσπάθεια ανάπτυξης νέων ή τροποποιημένων μοριακών διαγνωστικών τεχνικών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη ασφάλεια, ευαισθησία και ειδικότητα. Οι περισσότερες από αυτές κάνουν δευτερεύοντα βήματα στα διαγνωστικά εργαστήρια, λόγω της κυριαρχίας της PCR, της αναγκαιότητας ύπαρξης ακριβούς και ειδικού εργαστηριακού εξοπλισμού με παράλληλη χρήση αυτού από καταρτισμένο προσωπικό και, τέλος, λόγω του υψηλότερου κόστους αναλώσιμων. Το πρόβλημα της υιοθέτησης τυποποιημένων μεθοδολογιών, ή έστω διαδικασιών, τεχνικών και πρωτοκόλλων έκδοσης αποτελεσμάτων γιγαντώνεται καθώς πλέον απαιτείται συμβατότητα αποτελεσμάτων για διεργαστηριακές συνεργασίες σε ευρύτερες γεωγραφικές περιοχές μεταξύ φορέων που υλοποιούν μοριακή διάγνωση. Σε αυτή την ανασκόπηση παρουσιάζονται οι κυριότερες μοριακές τεχνικές διάγνωσης που χρησιμοποιούνται σε κλινικές και εργαστηριακές εφαρμογές.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ραγδαία αύξηση του προσδόκιμου ζωής, στα πρώτα 70 χρόνια του 20ού αιώνα, λόγω καλύτερων συνθηκών ζωής (διατροφή, περιθαλψη) και βρεφικής φροντίδας συνοδεύτηκε από μια σημαντική μείωση της επίπτωσης των μολυσματικών μικροβιακών ασθενειών ως αίτιο θανάτου.<sup>1</sup> Παρά τις προόδους αυτές, οι μικροβιακές νόσοι παραμένουν μείζονες απειλές της υγείας και της ζωής, με μεγάλο οικονομικό και κοινωνικό κόστος (οι στατιστικές που τις εμφανίζουν σε ύφεση<sup>2-3</sup> παρουσιάζουν ελλείψεις,<sup>4-10</sup> επειδή οι μιν μικροοργανισμοί εξαλείφονται και αποκτούν αντοχή στα αντιμικροβιακά φαρμακευτικά προϊόντα, ενώ η ανοσία του γενικού πληθυσμού υποβαθμίζεται από τη μαζική επιβίωση ανοσοανεπαρκών ασθενών που κατέληγαν πριν από 20 έτη).

## 2. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

### 2.1. Φαινοτυπικές και μοριακές τεχνικές χωρίς ενίσχυση

Τον προηγούμενο αιώνα, οι κλινικοί μικροβιολόγοι αναζητούσαν ταχύτερες, ειδικότερες και περισσότερο ευαίσθητες τεχνικές για τον εντοπισμό των παθογόνων, όπως μορφολογία, φυσιολογία, μεταβολισμός. Οι παραδοσιακές μέθοδοι της μικροβιακής ταυτοποίησης βασίζονται αποκλειστικά στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του οργανισμού. Παραδείγματα αποτελούν οι δοκιμασίες αφομοίωσης θρεπτικών υλικών των βακτηρίων, η μορφολογία των μυκητιασικών αναπαραγωγικών οργάνων, η μορφολογία πρωτοζωικών και μεταζωικών παρασίτων και τα κυτταροπαθολογικά συμπτώματα των ιογενών νόσων. Μερικά φαινοτυπικά δοκίμια είναι αρκετά ειδικά για το

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2014, 31(1):23-40  
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2014, 31(1):23-40

Ι.Δ. Κυριαζής,<sup>1,2</sup>  
Μ.Ε. Καμπούρης,<sup>1</sup>  
Κ. Πουλάς,<sup>1</sup>  
Γ.Π. Πατρινός<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Ανοσολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Ρίο Πάτρας  
<sup>2</sup>Εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας, Τομέας Μικροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur, Αθήνα

Molecular techniques for the detection and characterization of microorganisms

Abstract at the end of the article

### Λέξεις ευρετηρίου

Μικροβιολογία  
Μοριακή διάγνωση

Υποβλήθηκε 28.5.2013  
Εγκρίθηκε 11.6.2013

χαρακτηρισμό του στελέχους. Σε αυτά περιλαμβάνονται η ισοενζυμική κατατομή, τα αντιβιογράμματα και η χρωματογραφική ανάλυση των κυτταρικών λιπαρών οξέων.<sup>11-13</sup> Ωστόσο, τα περισσότερα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που συχνά παρατηρούνται στο μικροβιολογικό εργαστήριο δεν παρέχουν επαρκή ευαισθησία για την ανίχνευση ούτε επαρκή ειδικότητα για την ταυτοποίηση και την τυποποίηση του στελέχους. Μεγάλη ώθηση στην κλινική διαγνωστική μικροβιολογία έδωσε η μελέτη του γονιδιώματος των παθογόνων μικροοργανισμών.

Οι πρώτες μελέτες υβριδισμού DNA διενεργήθηκαν για να διερευνηθεί η συγγένεια μεταξύ των βακτηρίων. Η κατανόηση της χημείας υβριδισμού των νουκλεϊκών οξέων κατέστησε δυνατή τη χρήση της τεχνολογίας των ιχνηθετών.<sup>14,15</sup> Προηγμένες μελέτες στο επίπεδο του πλασμιδίου και των βακτηριοφάγων επέτρεψαν την ανάπτυξη κατατομών πλασμιδίων και βακτηριοφάγων, αντίστοιχα,<sup>16-18</sup> με τους δύο φορείς κλωνοποίησης να είναι χρήσιμα εργαλεία για την επιδημιολογική διερεύνηση των μολυσματικών

ασθενειών.<sup>19-21</sup> Ταυτόχρονα, δημιουργήθηκαν και άλλα συστήματα ταυτοποίησης, βασισμένα στα νουκλεϊκά οξέα όπως ο πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων (RFLP) και η ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα (REA), η τυχαίοποιημένη ενίσχυση πολυμορφικού DNA (RAPD), οι υβριδιζόμενοι ιχνηθέτες νουκλεϊκών οξέων, η τεχνική ενίσχυσης του σήματος διακλαδιζόμενου DNA (bDNA), τα στυπώματα τύπου Southern (για DNA), Northern (για RNA) και Western (για πρωτεΐνες), η ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου (PFGE) και η ριβοτυπία. Οι τεχνικές αυτές, ωστόσο, καθώς και οι έλεγχοι των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών, παραμένουν ανεπαρκείς καθώς περιορίζονται από τη μικροβιακή ανάκτηση και ανάπτυξη, την απαίτηση για σημαντική ποσότητα μικροβιακού DNA (και μάλιστα σχετικά υψηλής καθαρότητας), τη δυσκολία διάγνωσης συλλοιμώξεων, τη χαμηλή επαναληψιμότητα (τουλάχιστον κάποιες από αυτές) και τη χαμηλή ευαισθησία που παρουσιάζουν. Η συνοπτική παράθεση του συνόλου των βασικών σύγχρονων μοριακών μεθόδων με τα αντίστοιχα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά τους εμφανίζεται, σε συγκριτική μορφή, στον πίνακα 1.

**Πίνακας 1.** Συγκριτικός πίνακας των βασικών σύγχρονων μοριακών μεθόδων.

Μοριακή μέθοδος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Τεχνικές κυκλικής ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Κατάλληλες για την ανίχνευση ευρείας ποικιλίας παθογόνων μέσω πολλαπλών διαφορετικών τροποποιήσεων</li> <li>- Κατάλληλες για μεγάλη ποικιλία δειγμάτων</li> <li>- Σε σχέση με τις ορολογικές μεθόδους είναι πιο ειδικές και πιο ευαίσθητες</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Επιμόλυνση δειγμάτων οδηγεί σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα</li> <li>- Περισσότερο δαπανηρές από τις ορολογικές μεθόδους</li> <li>- Απαιτούν σχολαστικές τεχνικές εργασίας και ποιοτικό έλεγχο</li> <li>- Απαιτούνται ξεχωριστές εγκαταστάσεις και ειδικά όργανα</li> </ul>
Τεχνικές ισοθερμικών αντιδράσεων	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Σε σύγκριση με την PCR:</li> <li>- Αρκετά αποτελεσματικές τεχνικές</li> <li>- Οι τεχνικές με κυρίαρχο προϊόν RNA παρουσιάζουν χαμηλή πιθανότητα επιμόλυνσης</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Σε σύγκριση με την PCR:</li> <li>- Δαπανηρές</li> </ul>
Φθορίζων εντοπισμένος/επιτόπιος υβριδισμός (FISH)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Επιτρέπει την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων άμεσα δίχως πρωθύστερη ενίσχυσή τους</li> <li>- Οικονομική</li> <li>- Μέτριες τεχνικές απαιτήσεις</li> <li>- Το τεχνικό μέρος της ανάλυσης είναι ταχύ</li> <li>- Δεν παρατηρείται επιμόλυνση στο εργαστήριο</li> <li>- Συνήθως πολύ ειδική</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Χαμηλή ευαισθησία</li> <li>- Η εξέταση των δειγμάτων είναι χρονοβόρα εκτός αν υπάρχει αυτόματο μικροσκόπιο, που είναι αρκετά δαπανηρό</li> </ul>
Τεχνικές ανάλυσης γονοτύπου	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ιδανικές για ανίχνευση μικροβιακής αντοχής και στελεχών υψηλού κινδύνου</li> <li>- Ο προσδιορισμός αλληλουχίας προσδίδει ακριβή στοιχεία και μεγάλο όγκο δεδομένων</li> <li>- Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για φυλογενετικές αναλύσεις</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας απαιτεί ακριβό εξοπλισμό και τεχνική αρτιότητα</li> <li>- Επίπονη τεχνική</li> </ul>
Φασματοσκοπία μάζας	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Κατάλληλη για τυποποίηση</li> <li>- Επιτρέπει την ανίχνευση γνωστών και νέων μεταλλάξεων</li> <li>- Εξαιρετικά ταχεία σε σχέση με τον προσδιορισμό της αλληλουχίας</li> <li>- Κατάλληλη για την ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Όχι κατάλληλη για την ανάλυση μεγάλων ολιγονουκλεοσιδικών αλληλουχιών λόγω χαμηλής ευαισθησίας</li> <li>- Η μέθοδος MALDI είναι επιρρεπής σε επιμολύνσεις μετάλλων</li> </ul>
Μικροσυστοιχίες	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων και αντισωμάτων</li> <li>- Πολύ καλή ευαισθησία</li> <li>- Ικανότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης διαφορετικών παθογόνων</li> <li>- Κατάλληλη για την ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Υπερβολικά δαπανηρή για να προσαρμοστεί ως διαγνωστική τεχνική ρουτίνας</li> <li>- Συνήθως χρειάζεται στάδιο ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων πριν από την ανάλυση</li> </ul>

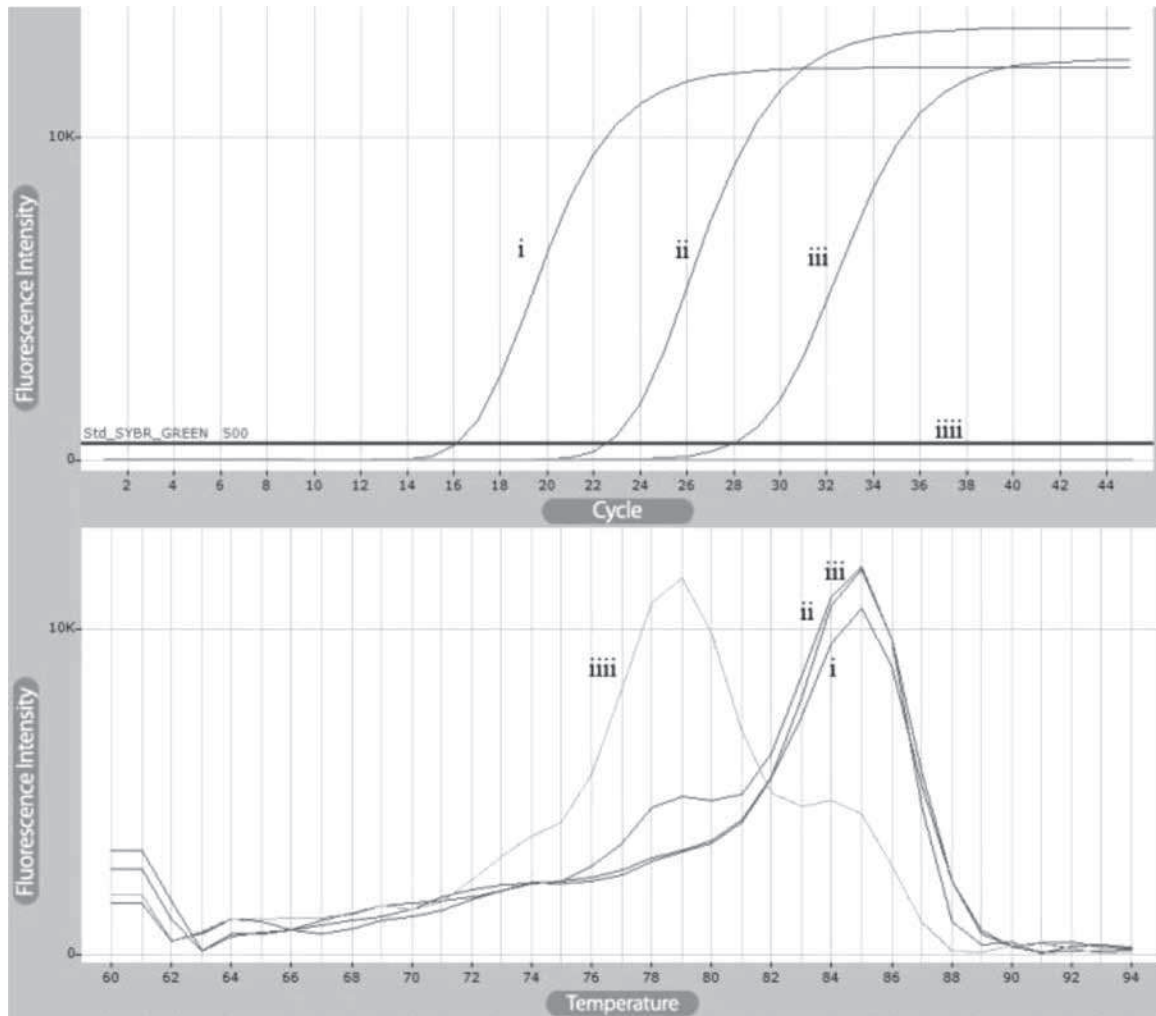
## 2.2. Τεχνικές κυκλικής ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων

Η τεχνολογία ενίσχυσης των νουκλεϊκών οξέων έχει ανοίξει νέες προοπτικές στη μικροβιακή διάγνωση και τυποποίηση,<sup>21-24</sup> με αποτέλεσμα η ανάπτυξη των παθογόνων να μην είναι πλέον απαραίτητη για τη μικροβιακή ταυτοποίηση. Οι μοριακές μέθοδοι έχουν πλέον υπερβεί τις παραδοσιακές μεθόδους διάγνωσης για την πλειονότητα των παθογόνων. Η απομόνωση της θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης και η εφεύρεση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR),<sup>23</sup> όχι μόνο έχουν απλουστεύσει και επιταχύνει την *in vitro* ενίσχυση του DNA, αλλά επέτρεψαν την ανάπτυξη μιας σειράς μοριακών εργαλείων, τα οποία είναι χρήσιμα για τη γενετική τυποποίηση, το χαρακτηρισμό και τη φυλογενετική ανάλυση των παθογόνων. Η κατοχύρωση της PCR με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας οδήγησε στην ανάπτυξη μιας σειράς εναλλακτικών τεχνικών που επιτρέπουν επίσης την ειδική ενίσχυση των νουκλεϊκών οξέων, όπως η LMA (ligation-mediated amplification)<sup>25</sup> και η TBA (transcription-based amplification).<sup>26</sup> Με τη σειρά τους, αυτές οι τεχνικές τελειοποιήθηκαν, με αποτέλεσμα την εμφάνιση νέων όπως η TMA (transcription-mediated amplification), η NASBA (nucleic acid sequence-based amplification), η LCR (ligase chain reaction), η SDA (strand displacement amplification), η LLA (linear linked amplification) και η LAMP (loop mediated isothermal amplification), που αποτελούν διαφορετικές προσεγγίσεις βελτιστοποίησης της ενίσχυσης των νουκλεϊκών οξέων.

**2.2.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.** Η βασική τεχνική της PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους ενίσχυσης επιλεγμένων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων. Απαιτείται η παρουσία ενός ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών που προσδένονται στους δύο κλώνους της αλληλουχίας-στόχου σε πλησιέστερη φυσική απόσταση.<sup>27,28</sup> Κάθε κύκλος αποτελείται από τρία στάδια: (α) Αποδιάταξη DNA, στην οποία η διπλή έλικα του DNA-στόχου αποδιάσσεται, (β) υβριδοποίηση των εκκινητών, που πραγματοποιείται σε χαμηλότερη θερμοκρασία, στην οποία οι εκκινητές υβριδοποιούνται με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο μόριο-στόχο τους και (γ) επιμήκυνση της αντίδρασης, στην οποία η DNA πολυμεράση επιμηκύνει τις αλληλουχίες των υβριδισμένων εκκινητών με κατεύθυνση 5'–3' χρησιμοποιώντας ως μήτρα τον DNA-στόχο όπου έχουν προσδεθεί οι εκκινητές. Στο τέλος του κάθε κύκλου (ο καθένας αποτελείται από τα παραπάνω τρία στάδια), η ποσότητα των προϊόντων της PCR θεωρητικά διπλασιάζεται. Η όλη διαδικασία διεξάγεται σε έναν προγραμματισμένο θερμικό κυκλοποιητή και ολοκληρώνεται μετά από 30–50 κύκλους, με αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση του συνολικού αριθμού των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου.

Η PCR είναι η πλέον αναπτυσσόμενη και περισσότερο διαδεδομένη μέθοδος ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων. Οι απλές PCR, με εξειδικευμένα ανά αναζητούμενο παράγοντα ζεύγη εκκινητών, γνώρισαν σημαντική διαγνωστική επιτυχία σε μερικές περιπτώσεις (π.χ. ειδική ανίχνευση και κατ' είδος ταυτοποίηση μυκήτων γένους *Candida*<sup>29,30</sup> σε δείγματα αίματος σε μία εργαστημέρα έναντι των 2–5 που απαιτούσε η εμφάνισή τους σε αιμοκαλλιέργειες), σε άλλες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται ακόμη, τουλάχιστον ως μέθοδοι αναφοράς για σύγκριση με νέες τεχνικές και πρακτικές, όπως στη διάγνωση του HPV,<sup>31</sup> ενώ σε άλλες, παρά την ευαισθησία και την ειδικότητά τους (π.χ. διαφορική διάγνωση ειδών *Aspergillus*), δεν υιοθετήθηκαν.<sup>32</sup>

**2.2.2. PCR πραγματικού χρόνου.** Στο πρώτο σύστημα PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR, R-T PCR) χρησιμοποιείται αφ' ενός βρωμιούχο αιθίδιο και αφ' ετέρου μια κάμερα CCD για την παρακολούθηση της εξέλιξης των αντιδράσεων ενίσχυσης μέσα σε κλειστό σωλήνα αντίδρασης.<sup>33</sup> Σήμερα, υπάρχουν αρκετοί ιχνηθέτες και πολλές φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται στην R-T PCR. Οι παρεμβαλλόμενες σε δίκλωνο μόριο DNA (dsDNA) χρωστικές παρουσιάζουν ελάχιστο ή καθόλου φθορισμό όταν βρίσκονται ελεύθερες σε διάλυμα, ενώ παράγουν ποσοτική αύξηση του φθορισμού, όταν δεσμεύονται σε dsDNA. Η R-T PCR, σε αντίθεση με τη συμβατική PCR, επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του DNA μέσα σε ένα μεγάλο δυναμικό εύρος. Τα στάδια της ενίσχυσης και της ανάλυσης πραγματοποιούνται μέσα σε κλειστό σωλήνα, ώστε να μη χρειάζονται περαιτέρω τεχνικές ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού των προϊόντων ενίσχυσης (amplicons). Για τον ποσοτικό προσδιορισμό, η R-T PCR (εικ. 1) εκμεταλλεύεται την αναλογική σχέση του πρώτου κύκλου στον οποίο το προϊόν ενίσχυσης είναι σε ανιχνεύσιμη ποσότητα (threshold circle ή Ct) με τον αρχικό αριθμό των αντιγράφων του νουκλεϊκού στόχου. Η επαλήθευση της ενίσχυσης της ορθής αλληλουχίας μπορεί να επιτευχθεί με ανάλυση της καμπύλης τήξης του DNA. Σε περίπτωση χρησιμοποίησης παρεμβαλλόμενων χρωστικών, μετράται η κινητική της αποδιάταξης του ενισχυμένου θραύσματος, ώστε να αποτυπωθεί η κλίση της καμπύλης τήξης σε σχέση με τη θερμοκρασία που επιτρέπει την τήξη του προϊόντος. Στις περιπτώσεις χρήσης ιχνηθέτη, τα υβρίδια αυτού με το προϊόν μπορούν να αναλυθούν με παρόμοιο τρόπο, μόνο που η θερμοκρασία τήξης προσδιορίζεται μέσω της αποδιάταξης του ιχνηθέτη από τον DNA-στόχο και όχι από τη θερμοκρασία τήξης του προϊόντος ενίσχυσης. Και στις δύο περιπτώσεις, η θερμοκρασία τήξης (Tm) είναι ανάλογη με το ποσοστό GC (γουανίνη-κυτοσίνη) στο εκάστοτε μελετώμενο δίκλωνο μόριο, από την απόλυτη σειρά των βάσεων στη μελετώμενη αλληλουχία και από το μήκος αυτής. Πρωτόκολλα R-T PCR χρησιμοποιούνται, μεταξύ άλλων, για



**Εικόνα 1.** Διάγνωση με real-time PCR και χρήση SYBRGreen παρασίτων του γένους *Leishmania*. Επάνω: Σκούρο γκρι: (i): 10.000 παράσιτα, (ii): 1.000 παράσιτα, (iii): 100 παράσιτα. Ανοικτό γκρι: 0 παράσιτα. Καμπύλη ενίσχυσης με τον ουδό (threshold value). Όσο περισσότερα κύτταρα υπάρχουν στο δείγμα τόσο πιο γρήγορα εισέρχεται στην εκθετική φάση ενίσχυσης. Κάτω: Καμπύλη τήξης [χρησιμοποιείται όταν η ανίχνευση του προϊόντος της αντίδρασης πραγματοποιείται με παρεμβαλλόμενες βαφές (SYBRgreen)] και δείχνει διμερές εκκινήτων στην αντίδραση της PCR, εκεί όπου δεν υπάρχει γενετικό υλικό (ανοικτό γκρι). Τα αποτελέσματα ανήκουν στο Εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Pasteur.

πρωτόζωα όπως η *Leishmania* με χρωστική SYBRGreen<sup>34</sup> και για βακτήρια όπως η *Legionella* με χρωστική SYTO9.<sup>35</sup>

**2.2.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση.** Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση (reverse-transcriptase PCR, rtPCR) αναπτύχθηκε για να είναι εφικτή η ενίσχυση αλληλουχιών RNA. Στη διαδικασία αυτή, οι RNA-στόχοι πρώτα μετατρέπονται σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) μέσω ενός ειδικού ενζύμου, της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase), και στη συνέχεια ενισχύονται με την κλασική μέθοδο της PCR. Η rtPCR έχει διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη διάγνωση λοιμώξεων που προέρχονται από RNA ιούς όπως στη γρίπη των πτηνών,<sup>36</sup> στον εντοπισμό βιώσιμων ειδών μυκοβακτηρίων, καθώς και στην παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας αντιμικροβιακών θεραπειών.<sup>37,38</sup>

**2.2.4. Επάλληλη PCR.** Η επάλληλη (nested) PCR έχει σχεδιαστεί ώστε να αυξηθεί η ειδικότητα, καθώς ανιχνεύει μικρότερες ποσότητες στόχου εντός υποβάθρου με παρόμοιες αλληλουχίες χάρη στη χρήση δύο ζευγών εκκινήτων.<sup>22,39</sup> Το πρώτο χρησιμοποιείται στον πρώτο γύρο της ενίσχυσης (15–30 κύκλοι) και τα προϊόντα ενίσχυσης υποβάλλονται σε ένα δεύτερο γύρο ενίσχυσης με το έτερο ζεύγος εκκινήτων που είναι ειδικό για μια εσωτερική αλληλουχία του προϊόντος του πρώτου γύρου.<sup>39,40</sup> Η επάλληλη PCR έχει εξαιρετικά υψηλή ειδικότητα, λόγω της διπλής διαδικασίας ενίσχυσης και μπορεί να διακρίνει μεταξύ παρόμοιων αλλά όχι ίδιων αλληλουχιών ή να επιτρέψει ανίχνευση και ταυτοποίηση σε πολύπλοκα διαγνωστικά προβλήματα, ακριβώς λόγω των δύο διαδοχικών και εξαρτημένων αντιδράσεων. Χρησιμοποιείται σε σημαντικές, επίφοβες λοιμώξεις όπως οι ιστοπλασμώσεις,<sup>41</sup> αλλά γενικότερα εμ-

φανίζει υψηλή πιθανότητα διασταυρούμενων αντιδράσεων κατά τη μεταφορά των προϊόντων ενίσχυσης του πρώτου γύρου σε ένα δεύτερο σωλήνα αντίδρασης. Αυτό μπορεί να αποφευχθεί είτε μέσω φυσικού διαχωρισμού των δύο μειγμάτων ενίσχυσης με ένα στρώμα από κερί ή λάδι ή με τον ειδικό σχεδιασμό των εκκινητών ώστε να λειτουργούν σε διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδοποίησης.<sup>22</sup>

**2.2.5. Πολυπλεκτική PCR.** Η πολυπλεκτική PCR (multiplex PCR) είναι μια αντίδραση ενίσχυσης στην οποία δύο ή περισσότερα ζεύγη εκκινητών, ειδικά για διαφορετικούς στόχους, εισάγονται στον ίδιο σωλήνα αντίδρασης. Έτσι, μπορούν να ενισχυθούν ταυτόχρονα περισσότερες από μία μοναδικές αλληλουχίες στόχοι σε ένα δείγμα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην πολυπλεκτική PCR πρέπει να σχεδιαστούν προσεκτικά ώστε να έχουν παρόμοιες θερμοκρασίες τήξης, γεγονός που απαιτεί συχνά εκτενή εμπειρικό έλεγχο. Αυτή η συνένδυση των πολλαπλών στόχων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαγνωστικές χρήσεις, ώστε να πραγματοποιούνται εσωτερικοί έλεγχοι ή να ανιχνευτούν πολλαπλά παθογόνα από ένα μόνο εξεταζόμενο δείγμα,<sup>37,40,42</sup> όπως είναι η παρασιτολογική εφαρμογή όπου ανιχνεύονται 7 διαφορετικά γαστρεντερικά παράσιτα.<sup>43</sup> Η ποσοτική ανταγωνιστική PCR, μια παραλλαγή της πολυπλεκτικής PCR, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της ποσότητας του DNA ή RNA-στόχου σε ένα δείγμα.<sup>44</sup>

**2.2.6. Ευρέος φάσματος PCR.** Μια εφαρμογή της κλασικής PCR είναι η PCR ευρέος φάσματος (broad-spectrum PCR), στην οποία ενισχύονται συντηρημένες αλληλουχίες που περιέχουν φυλογενετικές πληροφορίες ώστε να επιτυγχάνεται πάραυτα ο εντοπισμός και η ταυτοποίηση μικροοργανισμών. Μέσω της PCR ευρέος φάσματος εντοπίστηκαν πολλά νέα, δύσκολα ως προς την ταυτοποίηση και την καλλιέργειά τους παθογόνα από δείγμα ιστού ή αίματος από ασθενείς.<sup>45-47</sup> Πρωτόκολλα PCR που ενισχύουν αλληλουχίες rDNA (ριβοσωμικό DNA) προσφέρουν τη δυνατότητα ταχείας ταυτοποίησης βακτηρίων στοχεύοντας τη μικρή βακτηριακή υπομονάδα (16S) rRNA ή καλά συντηρημένες περιοχές DNA όλων των βακτηρίων και λοιπών μικροοργανισμών (π.χ. τις μεταγραφόμενες ενδιάμεσες αλληλουχίες του μείζονος συμπλέγματος του ριβοσωμικού RNA των μυκήτων) ώστε να επιτυγχάνεται εντοπισμός και ενδεχομένως αδρή τυποποίηση του μικροοργανισμού.<sup>48-50</sup> Η λεπτομερέστερη ταυτοποίηση επιτυγχάνεται με έλεγχο του προϊόντος ενίσχυσης είτε με αλληλούχιση, είτε με άλλες μεταενισχυτικές τεχνικές, όπως REA, SSCP.

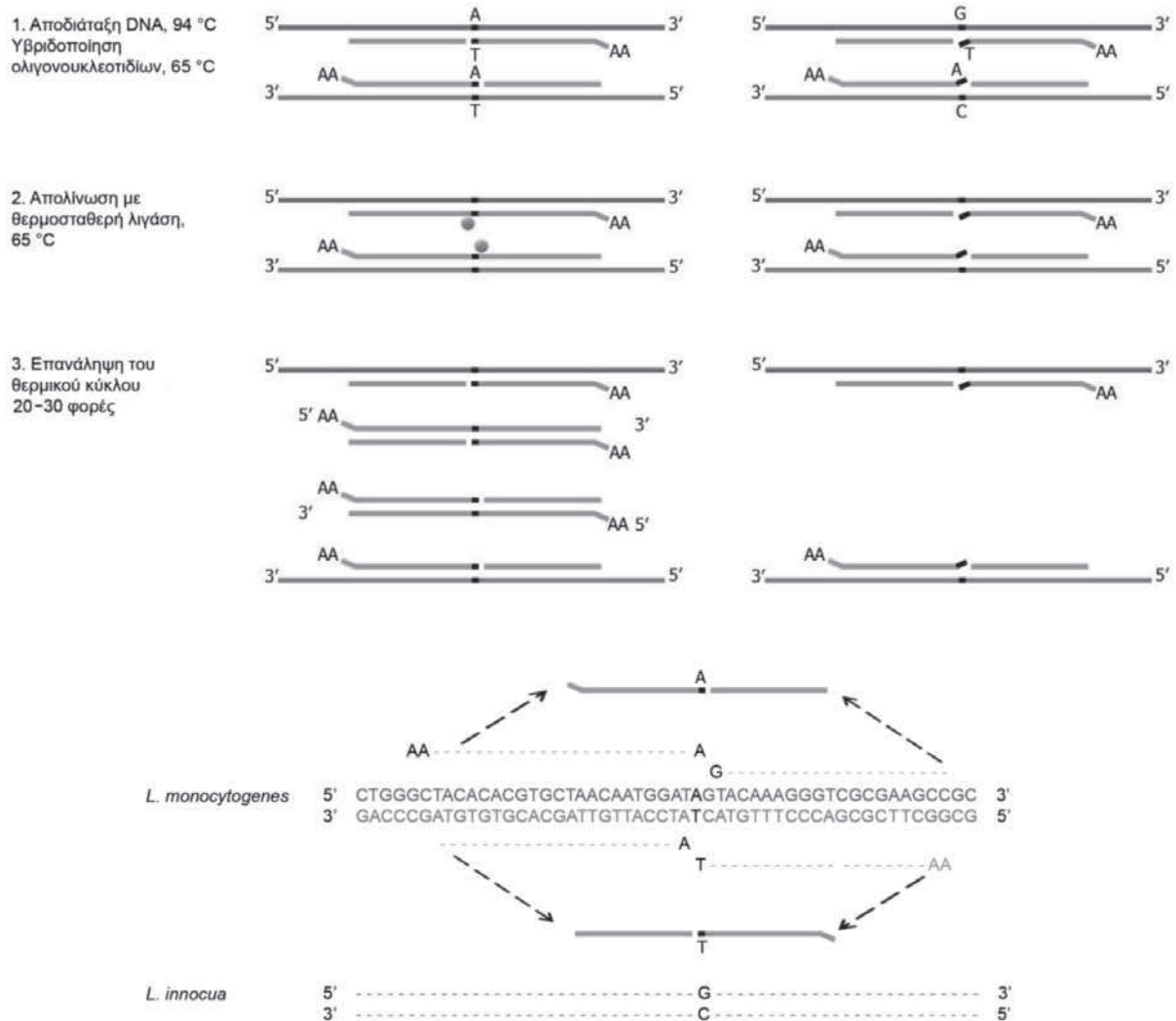
**2.2.7. Αλυσιδωτή αντίδραση λιγάσης.** Η αλυσιδωτή αντίδραση λιγάσης (ligase chain reaction, LCR) είναι μια ειδική και ευαίσθητη μέθοδος,<sup>51</sup> που χρησιμοποιεί ένα θερμόφιλο ένζυμο (μια DNA λιγάση αντί πολυμεράσης) και δύο ζεύγη εκκινητών (στην ουσία πρόκειται για ολιγονουκλε-

οτίδια και όχι για εκκινητές επιμήκυνσης). Κάθε ζεύγος εκκινητών σχεδιάζεται, ώστε οι εκκινητές του ζεύγους να διατάσσονται πάνω στο στόχο εν σειρά και τα δύο ζεύγη να είναι συμπληρωματικά (εικ. 2). Αντί για την επέκταση των εκκινητών με κατεύθυνση 5'-3', όπως θα γινόταν με χρήση πολυμεράσης, επί θετικής αντίδρασης συνδέονται με τη δράση της λιγάσης οι δύο διαδοχικοί εκκινητές κάθε ζεύγους με φωσφοδιεστερικό δεσμό, παράγοντας ένα αθροιστικό ολιγονουκλεοτίδιο. Τα προϊόντα αυτά λειτουργούν ως μήτρες στους διαδοχικούς κύκλους της LCR για την πρόσδεση και τη σύνδεση επί πλέον συμπληρωματικών ζευγών εκκινητών. Η ενίσχυση είναι εξαιρετικά ειδική επειδή η λιγάση έχει ιδιαίτερα υψηλή ευαισθησία στις αναντιστοιχίες των βάσεων, ιδίως στο 3' άκρο των εκκινητών, στοιχείο που την καθιστά ιδανική τεχνική για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων αντικατάστασης (SNP) ακόμη και σε πραγματικό χρόνο (real time). Το δεδομένο αυτό αποδεικνύεται από τη χρήση της για τη διάκριση δύο ειδών, όπως τα *Listeria monocytogenes* και *L. innocua*, που διαφέρουν κατά μία βάση σε συγκεκριμένη αλληλουχία.<sup>52</sup> Συνεπώς, η εφαρμογή της στη λειτουργία των microchips<sup>53</sup> ή των microarrays<sup>54</sup> δεν προβλέπεται για το ορατό μέλλον. Εν τούτοις, η είσοδος της τεχνολογίας LCR στην κλινική πρακτική εξελίσσεται με βραδείς ρυθμούς λόγω της παντοκρατορίας της PCR στην αγορά και της ακαμψίας που ενέχει, καθώς η θετική διαγνωστική της αξία είναι χαμηλή εκτός από την περίπτωση εξαιρετικά σαφών διαγνωστικών προβλημάτων.

### 2.3. Τεχνικές ισοθερμικών αντιδράσεων

Σε αντίθεση με την PCR, οι ισοθερμικές τεχνικές ενίσχυσης βασίζονται στη χρήση διακριτών ενζύμων που δεν απαιτούν θερμικό κυκλοποιητή (δηλαδή κύκλους θέρμανσης και ψύξης). Οι ισοθερμικές ενισχύσεις είναι ταχείες και απαιτούν συνήθως <1 ώρα για να εκτελεστούν. Κάποιες από τις ισοθερμικές αντιδράσεις είναι η ενίσχυση μέσω μεταγραφής (TBA), η αυτοτροφοδοτούμενη αναπαραγωγή αλληλουχίας (3SR), η αλληλουχοεξαρτώμενη ενίσχυση νουκλεϊκού οξέος (NASBA) που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση *Salmonella enterica*,<sup>55</sup> η τεχνολογία ενίσχυσης RNA μέσω σήματος (SMART), η ενίσχυση μετά από εκτόπιση αλυσίδας (SDA), η ισοθερμική ενίσχυση κυλιόμενου κύκλου (RCA), η ισοθερμική ενίσχυση μέσω βρόγχου (LAMP), η ισοθερμική ενίσχυση πολλαπλής αντικατάστασης (IMDA), η εξαρτώμενη από ελικάση ενίσχυση (HDA), η ισοθερμική ενίσχυση ενός εκκινητή (SPIA) και η κυκλική ενίσχυση μέσω ελικάσης (cHDA).

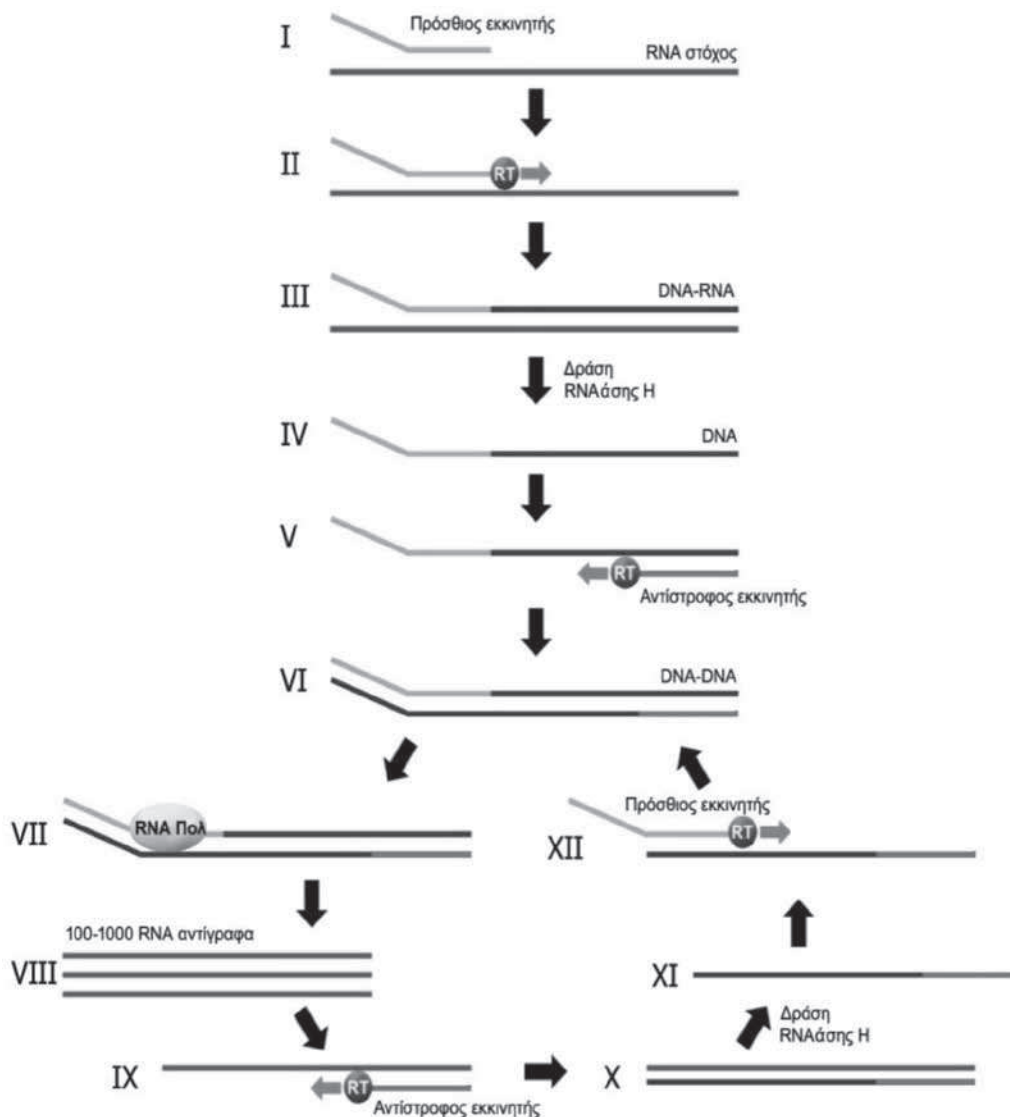
Παρακάτω περιγράφονται μερικές από τις βασικές ισοθερμικές αντιδράσεις που χρησιμοποιούνται ευρέως στη διάγνωση παθογόνων οργανισμών.



**Εικόνα 2.** Διαφοροδιαγνωστική εφαρμογή της LCR. Γραφική απεικόνιση LCR όπου διαχωρίζονται τα είδη *Listeria monocytogenes* και *Listeria innocua* λόγω μίας σημειακής μετάλλαξης στο νουκλεοσίδιο 1258 (SNP) του 16S rDNA τους. Το DNA αποδιατάσσεται και οι τέσσερις LCR εκκινητές υβριδοποιούνται στις συμπληρωματικές αλληλουχίες τους. Η θερμοσταθερή λιγάση θα συνδέσει τους τέλεια υβριδοποιημένους εκκινητές, ενώ οι σημειακοί πολυμορφισμοί δεν επιτρέπουν τη δράση της λιγάσης. Οι εκκινητές οι οποίοι περιέχουν την αλληλουχία που ανιχνεύει τη σημειακή μετάλλαξη έχουν μια δινουκλεοσιδική ουρά AA στα 5' άκρα τους, ώστε να αποφεύγεται η σύνδεση με τα 3' άκρα τους. Ι.Δ. Κυριαζής (πρωτότυπη ιδέα σχεδίου).<sup>54</sup>

2.3.1. Συστήματα ενίσχυσης βασισμένα στη μεταγραφή. Τα συστήματα ενίσχυσης βασισμένα στη μεταγραφή (transcription-based amplification, TBA) περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1989 και περιλαμβάνουν τη σύνθεση ενός DNA μορίου, συμπληρωματικού προς το νουκλεϊκό στόχο (συνήθως RNA) και στην *in vitro* μεταγραφή μέσω cDNA βιβλιοθήκης.<sup>26</sup> Παραλλαγές της διαδικασίας αποτελούν (α) η αυτοτροφοδοτούμενη αναπαραγωγή αλληλουχίας (3SR), (β) η αλληλουχοεξαρτώμενη ενίσχυση νουκλεϊκού οξέος (NASBA) και (γ) η ενίσχυση μέσω μεταγραφής (TMA).<sup>56,57</sup> Τρία ένζυμα χρησιμοποιούνται στην αντίδραση, η αντίστροφη μεταγραφή, η RNAάση H και η T7 DNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση. Για να επιτευχθεί η ενίσχυση απαιτείται η σύσταση της βιβλιοθήκης cDNA από τους RNA στόχους

(υποκινητή) με τη χρήση εκκινητών που περιέχουν θέση δέσμευσης για την RNA πολυμεράση (εικ. 3). Ακολούθως, η RNAάση H αποικοδομεί τον αρχικό RNA κλώνο στα σχηματισμένα RNA-DNA υβρίδια, αφού έχει χρησιμεύσει ως το πρότυπο για τον πρώτο εκκινητή. Ο δεύτερος εκκινητής συνδέεται στο νέο cDNA και επεκτείνεται, με αποτέλεσμα το σχηματισμό δίκλωνου cDNA, οι κλώνοι του οποίου είναι ικανοί να χρησιμεύσουν ως μεταγραφικά πρότυπα για την RNA πολυμεράση. Όπως και στην ενίσχυση μέσω της Qβ ρεπλικάσης, έτσι και στις TBA, το RNA είναι το κυρίαρχο προϊόν ενίσχυσης. Αυτό προσδίδει στις εν λόγω τεχνικές την ελαχιστοποίηση του κινδύνου επιμόλυνσης, που υποβοηθείται επίσης από την τέλεση των συγκεκριμένων τεχνικών υπό ισοθερμικές συνθήκες σε ένα και μόνο δοκιμαστικό



**Εικόνα 3.** Ενίσχυση μέσω μεταγραφής (TMA). (α) Ο πρόσθιος εκκινητής υβριδοποιείται στον RNA στόχο. (β) Η αντίστροφη μεταγραφάση δημιουργεί ένα DNA αντίγραφο του RNA στόχου. (γ) RNA-DNA υβρίδιο. (δ) Η δράση της RNAάσης H της αντίστροφης μεταγραφάσης αποδομεί το RNA. (ε) Ο αντίστροφος εκκινητής προσδένεται στο cDNA και η αντίστροφη μεταγραφάση δημιουργεί ένα δίκλωνο cDNA αντίγραφο. (στ) Δίκλωνο cDNA που εμπεριέχει αλληλουχία υποκινητή. (ζ) Η RNA πολυμεράση αρχίζει τη μεταγραφή του RNA από DNA εκμαγείο. (η) Παραγωγή 100–1.000 RNA αντιγράφων. (θ) Ο οπίσθιος εκκινητής προσδένεται στο κάθε RNA αντίγραφο και η αντίστροφη μεταγραφάση δημιουργεί DNA αντίγραφο. (ι) RNA:DNA υβρίδιο. (κ) Η δράση της RNAάσης H της αντίστροφης μεταγραφάσης αποδομεί το RNA. (λ) Ο πρόσθιος εκκινητής προσδένεται στο νεοσύστατο DNA μόριο και η αντίστροφη μεταγραφάση δημιουργεί δίκλωνο DNA μόριο. Ι.Δ. Κυριαζής (πρωτότυπη ιδέα σχεδίου, Gen-Probe Inc).

σωλήνα για κάθε δείγμα.<sup>56</sup> Η ενίσχυση του RNA όχι μόνο επιτρέπει την ανίχνευση ιικού RNA, αλλά μειώνει το όριο ανίχνευσης για ορισμένα παθογόνα βακτήρια και μύκητες, επειδή ως στόχοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόρια RNA (rRNA) που βρίσκονται σε μεγάλο αριθμό αντιγράφων ανά κύτταρο σε σχέση με στόχους DNA.<sup>57</sup>

**2.3.2. Ισοθερμική ενίσχυση μέσω βρόγχου (LAMP).** Η LAMP (loop mediated isothermal amplification) είναι μια ταχεία ισοθερμική αντίδραση και πραγματοποιείται σε ένα στάδιο. Χρησιμοποιούνται 4 ή 6 εκκινητές που αναγνωρίζουν 6 ή 8, αντίστοιχα, ανεξάρτητες αλληλουχίες σε επιλεγμένο νου-

κλεικό στόχο του παθογόνου για την έναρξη της ενίσχυσης. Η LAMP ολοκληρώνεται με μια ειδική πολυμεράση (Bst) ικανή να πραγματοποιεί αυτοκυκλική μετατόπιση αλυσίδας της αλληλουχίας-στόχου.<sup>58</sup> Η ύπαρξη των δύο εσωτερικών εκκινητών δημιουργεί βρόγχο στα άκρα της αλληλουχίας που παράγεται, καθώς περιέχουν τη νοηματική και την αντινοηματική αλληλουχία. Το ζεύγος των εξωτερικών εκκινητών δημιουργεί περισσότερο ευνοϊκές συνθήκες για τη διαδικασία μετατόπισης της αλυσίδας από την Bst. Επί πλέον, η προσθήκη στο μείγμα της αντίδρασης των εκκινητών-βρόγχων επισπεύδει την ενίσχυση του στόχου,

καθώς αυτοί προσδένονται σε επιπρόσθετα μέρη όπου δεν είναι εφικτό να προσδεθούν οι εσωτερικοί εκκινητές.<sup>59</sup> Κατ' επέκταση, η μαζική σύνθεση DNA κατά την αντίδραση έχει άμεση σχέση με την αύξηση της θολερότητας του διαλύματος (για την οποία ευθύνεται ο σχηματισμός του πυροφωσφορικού μαγνησίου ως παραπροϊόντος) και η μέτρησή της, με τη χρήση θολοσίμετρου, επιτρέπει την ποιοτική παρακολούθηση της αντίδρασης.<sup>60</sup>

**2.3.3. Ενίσχυση μετά από εκτόπιση αλυσίδας.** Η ενίσχυση μετά από μεταφορά και αντικατάσταση αλυσίδας (sequence displacement amplification, SDA)<sup>61</sup> είναι μια τεχνολογία πολλαπλασιασμού νουκλεϊκών οξέων που βασίζεται στην ικανότητα της DNA πολυμεράσης να επιμηκύνει σε 5'-3' κατεύθυνση έναν κλώνο DNA που έχει υποστεί θραύση κάποιου φωσφοδιεστερικού δεσμού, με παράλληλο εκτοπισμό του υπόλοιπου κομμένου τμήματος. Οι εκτοπισμένοι μονοί κλώνοι χρησιμοποιούνται κατόπιν ως υπόστρωμα για επί πλέον ταυτόχρονη αντιγραφή μέσω κοπής και εκτόπισης. Η εν λόγω ισοθερμική ενίσχυση του DNA χρησιμοποιεί, για την επίτευξη εκθετικής ενίσχυσης του στόχου, ειδικούς εκκινητές, μια DNA πολυμεράση και μια ενδονουκλεάση περιορισμού που δημιουργεί στα επιλεγμένα σημεία τις θραύσεις, οι οποίες επιτρέπουν επιμηκύνσεις και εκτοπίσεις. Η βασική τεχνολογία πίσω από τη μέθοδο SDA είναι η ανακάλυψη περιοριστικών ενδονουκλεασών, ειδικών στην πέψη συγκεκριμένων αλληλουχιών. Αν και η SDA είναι πολύπλοκη, μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε μονόκλωνο (ssDNA) όσο και σε δίκλωνο (dsDNA) DNA και χρησιμοποιείται για τη διάγνωση χλαμυδίων και *Neisseria gonorrhoeae*.<sup>62</sup>

## 2.4. Τεχνικές υβριδοποίησης

**2.4.1. Φθορίζων εντοπισμένος/επιτόπιος υβριδισμός.** Ο φθορίζων εντοπισμένος/επιτόπιος υβριδισμός (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) είναι μια κυτταρογενετική-μοριακή τεχνική, η οποία χρησιμοποιεί DNA ή RNA ιχνηθέτες σημασμένους με φθοριοφόρο μόριο.<sup>63</sup> Με τη χρήση της FISH είναι δυνατός ο προσδιορισμός του αριθμού και της τοποθεσίας συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA σε κύτταρα, στοιχείο το οποίο διαχωρίζει τη συγκεκριμένη τεχνική από τις υπόλοιπες τεχνικές υβριδοποίησης νουκλεϊκών οξέων (Northern και Southern blot). Ειδικότερα με την DNA-FISH είναι δυνατή η παρατήρηση μεμονωμένων γονιδίων, τμημάτων ή ολόκληρων χρωμοσωμάτων, η αποσαφήνιση ισορροπημένων ή μη μεταθέσεων, η αναγνώριση χρωματοσωμικών διπλασιασμών και ανασυνδυασμών. Η ευαισθησία της κλασικής τεχνικής FISH είναι ανώτερη της κλασικής χρώσης των χρωμοσωμάτων με Giemsa (καρυότυπος) και της συγκριτικής υβριδοποίησης γονιδιώματος (comparative genome hybridization, CGH). Οι παραλλαγές της FISH

(η TSA-FISH [tyramide signal amplification] και η νεότερη two-pass TSA-FISH) έχουν παραπλήσια διακριτική ικανότητα ανίχνευσης SNP με τη μέθοδο R-T PCR. Για την πραγματοποίηση της μεθοδολογίας FISH χρησιμοποιούνται διάφοροι τύποι ιχνηθετών, όπως αυτοί των επαναλαμβανόμενων DNA αλληλουχιών, οι συνθετικοί DNA ιχνηθέτες, οι εξειδικευμένοι ιχνηθέτες συγκεκριμένων γονιδίων ή γενετικών τόπων (gene specific probes, locus specific probes, LSI) και, τέλος, οι ιχνηθέτες ολόκληρων χρωμοσωμάτων.

Η γενική διαδικασία για τη FISH περιλαμβάνει τη μονιμοποίηση των χρωμοσωμάτων ή των ιστών επάνω σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα. Το πρωτογενές υλικό στη συνέχεια έρχεται σε επαφή με χημικές ουσίες προκειμένου τα κύτταρα να καταστούν διαπερατά και να αποδιαταχθεί το DNA, έτσι ώστε ο ιχνηθέτης να μπορεί ευκολότερα να υβριδοποιηθεί με το υπόστρωμα-στόχο. Ο σημασμένος είτε με ραδιενέργεια είτε με φθορισμό ιχνηθέτης σχεδιάζεται ώστε να είναι συμπληρωματικός του νουκλεϊκού οξέος-στόχου. Για να καταστεί εφικτή η υβριδοποίηση, η αντικειμενοφόρος διαβρέχεται με διάλυμα που περιέχει το σημασμένο ιχνηθέτη. Η περίσσεια του ιχνηθέτη ξεπλένεται και στη συνέχεια ανιχνεύεται η θέση ή και η ύπαρξη του ιχνηθέτη με αυτοραδιογραφία, ανοσοκυτταροχημεία και μικροσκοπία.

Τα σήματα των ιχνηθετών γίνονται ορατά με μικροσκόπιο φθορισμού χρησιμοποιώντας ειδικά φίλτρα για τον ακριβή διαχωρισμό των φθοριοχρωμάτων και πρόσφατα με τη χρήση ειδικών μηχανών λήψης (CCD), οι οποίες προσέδωσαν στην τεχνική FISH μεγάλη ευαισθησία, αλλά και δυνατότητες ποσοτικής μέτρησης των εικόνων φθορισμού και ανίχνευσης σημάτων σε μήκη κύματος πέραν του ορατού, για το ανθρώπινο μάτι, φάσματος. Η FISH μπορεί να εφαρμοστεί σε κυτταρολογικό και βιοπτικό υλικό μετά από ειδική επεξεργασία.

**2.4.2. Υβριδισμός ιχνηθέτη σε ταινία.** Ο υβριδισμός ιχνηθέτη σε ταινία (line probe assay, LiPA) είναι μια άλλη τεχνολογία βασισμένη στον υβριδισμό νουκλεϊκών οξέων. Ειδικοί ολιγονουκλεοσιδικοί ιχνηθέτες εντυπώνονται σε προκαθορισμένες θέσεις σε μια ταινία νιτροκυτταρίνης, σχηματίζοντας παράλληλες εγκάρσιες γραμμές και υβριδοποιούνται με PCR προϊόντα σημασμένα με βιοτίνη. Ο κάθε ιχνηθέτης βρίσκεται σε μια γραμμή, που καθίσταται εμφανής σε περίπτωση θετικής αντίδρασης υβριδισμού. Μια από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες LiPA εφαρμογές είναι η ταχεία ανίχνευση της αντοχής στη ριφαμπικίνη του *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>64</sup> Η διάγνωση από δείγματα πτυέλων πραγματοποιείται σε 5 ώρες, σε σχέση με τη χρονική διάρκεια των 1-2 μηνών που απαιτούνται για τις συμβατικές τεχνικές ευαισθησίας φαρμάκων. Στην Ευρώπη,



ως μέθοδος αναφοράς για τη διάγνωση του HPV και την ταυτοποίηση των υποτύπων χρησιμοποιούνται διάφορες ταινίες υβριδισμού που έχουν λάβει την έγκριση της Ευρωπαϊκής Ένωσης.<sup>65</sup>

**2.4.3. Μικροσυστοιχίες.** Οι DNA μικροσυστοιχίες (microarrays) έχουν τρεις κύριες πιθανές διαγνωστικές χρήσεις στην κλινική μικροβιολογία, που αναφέρονται στην ανίχνευση και στην ταυτοποίηση παθογόνων (ή και στην ανάλυση ιδιοτήτων τους, όπως η αντοχή μικροοργανισμών μεγάλης επίπτωσης, π.χ. οι ζυμομύκητες *Candida albicans* έναντι αντιβιοτικών), αλλά και στην ανακάλυψη νέων.<sup>66-68</sup> Παρά το γεγονός ότι οι DNA μικροσυστοιχίες προσφέρουν τη δυνατότητα να εξετάζεται ευθύς αμέσως μεγάλος αριθμός παραγόντων, η απόδοσή τους εξαρτάται από την ποσότητα νουκλεϊκών οξέων των παθογόνων μικροοργανισμών στα υπό διερεύνηση δείγματα. Σε γενικές γραμμές, απαιτούν ενίσχυση PCR χρησιμοποιώντας ειδικά ζεύγη εκκινητών, με αποτέλεσμα αυξημένη πολυπλοκότητα για την αποφυγή αλληλεπιδράσεων μεταξύ της συστοιχίας και των εκκινητών. Επί πλέον, το σχετικά υψηλό κόστος αποτελεί τροχοπέδη για την εφαρμογή των μικροσυστοιχιών σε διαγνωστικά μικροβιολογικά εργαστήρια.

Οι DNA μικροσυστοιχίες αποτελούνται από μια σειρά ακινητοποιημένων DNA ανιχνευτών οργανωμένων σε ομοιογενείς τόπους κυκλικού σχήματος και διατεταγμένων κανονικά σε ένα στερεό υπόστρωμα, όπως μια γυάλινη πλάκα (αντικειμενοφόρος) ή ένα chip πυριτίου (silicon chip). Οι ιχνηθέτες μπορεί να είναι DNA μόρια μήκους έως αρκετών χιλιάδων βάσεων (από μια cDNA βιβλιοθήκη ή συντιθέμενα μέσω PCR) ή μικρά (20–80 βάσεις) συνθετικά ολιγονουκλεοσίδια. Τα τελευταία μπορούν να συντεθούν με χρήση συμβατικών μεθόδων και να εντυπωθούν στο υπόστρωμα ή να συντεθούν απ' ευθείας πάνω στην επιφάνεια, εφαρμόζοντας μια σειρά από διαφορετικές μεθόδους, όπως η φωτολιθογραφία (π.χ. Affymetrix GeneChip® Arrays), η inkjet τεχνολογία (π.χ. Agilent Sure Print technology) ή η χημική σύνθεση μέσω μικροηλεκτροδίων (π.χ. CombiMatrix Corporation's CustomArray™). Τέλος, μικροσυστοιχίες εναιωρήματος, στις οποίες οι DNA ιχνηθέτες είναι προσαρμοσμένοι σε μοναδικά ταυτοποιήσιμα μικροσφαιρίδια (Luminex), προσφέρουν μια εναλλακτική λύση στις επίπεδες μικροσυστοιχίες DNA, καθώς η τρισδιάστατη κινητική αντίδραση επιτρέπει το μειωμένο χρόνο υβριδισμού, με αποτέλεσμα να υπάρχει ελαττωμένο κόστος και δυνατότητα εξέτασης περισσότερων δειγμάτων.

Οι νουκλεϊκοί στόχοι του δείγματος συχνά επισημαίνονται με φθορίζουσες χρωστικές. Μετά την υβριδοποίηση στη μικροσυστοιχία, οι μη δεσμευμένοι στόχοι απομακρύνονται με διαδοχικές πλύσεις. Στη συνέχεια, οι υβριδισμένοι στόχοι ανιχνεύονται με μικροσκόπιο φθορισμού.

Ενώ οι DNA μικροσυστοιχίες προσφέρουν τη δυνατότητα μαζικής ανίχνευσης παθογόνων σε ένα πλακίδιο ή chip, πρέπει να υπενθυμίζεται ότι αποτελούν μόνο το τελικό βήμα σε ένα διαγνωστικό πρωτόκολλο. Μολονότι είναι εφικτό, όλα τα παθογόνα (ιοί, βακτήρια, μύκητες, πρωτόζωα) να «εκπροσωπούνται» ως συγκεκριμένοι τύποι σε μια ενιαία μικροσυστοιχία, είναι απίθανο να έχει απομονωθεί και ενισχυθεί το γενετικό υλικό από ένα τόσο ευρύ φάσμα παραγόντων προερχόμενων από δείγματα ιστών. Η συνδρομική προσέγγιση για το σχεδιασμό διαγνωστικής μικροσυστοιχίας παθογόνων είναι πιθανόν πιο ρεαλιστική. Γίνεται χρήση των διαθέσιμων κλινικών πληροφοριών για τον προσδιορισμό της πλέον κατάλληλης στρατηγικής για την προετοιμασία του νουκλεϊκού στόχου από το δείγμα. Τυπικές στρατηγικές ενίσχυσης που εφαρμόζονται είναι η χρήση πολλαπλών διαειδικών PCR εκκινητών, εκκινητών πολυπλεκτικής ή ευρέος φάσματος PCR (multiplex και universal), που προσδίδουν αρκετά καλή ευαισθησία.

## 2.5. Φασματοσκοπία μάζας

Η φασματομετρία μάζας (mass spectrometry) είναι μια τεχνολογία που επιτρέπει τη μέτρηση της μοριακής μάζας του δείγματος, η οποία όμως παραμένει απλησίαστη για διαγνωστικές εξετάσεις ρουτίνας. Σε αυτή την τεχνική, το δείγμα ιονίζεται, με τα ιόντα να διαχωρίζονται ανάλογα με το λόγο της μάζας προς το φορτίο και να ανιχνεύονται σύμφωνα με το ιοντικό ρεύμα. Οι μέθοδοι ιονισμού του δείγματος περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων το χημικό ιονισμό (chemical ionization), τον ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization), το βομβαρδισμό με ταχεία άτομα (fast-atom bombardment, FAB), τον ιονισμό με ηλεκτρικό πεδίο (field ionization), τον ιονισμό με laser (laser ionization), τον ιονισμό εκρόφησης με laser παρουσία υποβοηθητικής ουσίας (matrix-assisted laser desorption ionisation, MALDI),<sup>69</sup> το θερμικό ιονισμό (thermal ionization) και το δευτερογενή ιονισμό (secondary ionization). Από τις πλέον διαδεδομένες φασματοσκοπίες είναι η MALDI, που χρησιμοποιείται ευρέως στην ανάλυση σημειακών μεταλλάξεων στο γονότυπο (SNP), αλλά και στο αποτύπωμα πεπτιδικών μαζών για το χαρακτηρισμό και την ταυτοποίηση πρωτεϊνών. Πρόσφατα, μια μέθοδος που στηρίζεται σε ευρείας κλίμακας RT-PCR ακολουθούμενη από φασματομετρία μάζας με ιονισμό ηλεκτροψεκασμού έχει εφαρμοστεί για την παρακολούθηση της εξάπλωσης των γονοτύπων του ιού της νέας γρίπης (A.H1N1).<sup>70</sup>

## 2.6. Χημικοί ιχνηθέτες πραγματικού χρόνου

Όλες οι τεχνολογίες που βασίζονται σε ιχνηθέτες και έχουν αναπτυχθεί για τη διάγνωση σε πραγματικό χρόνο βασίζονται

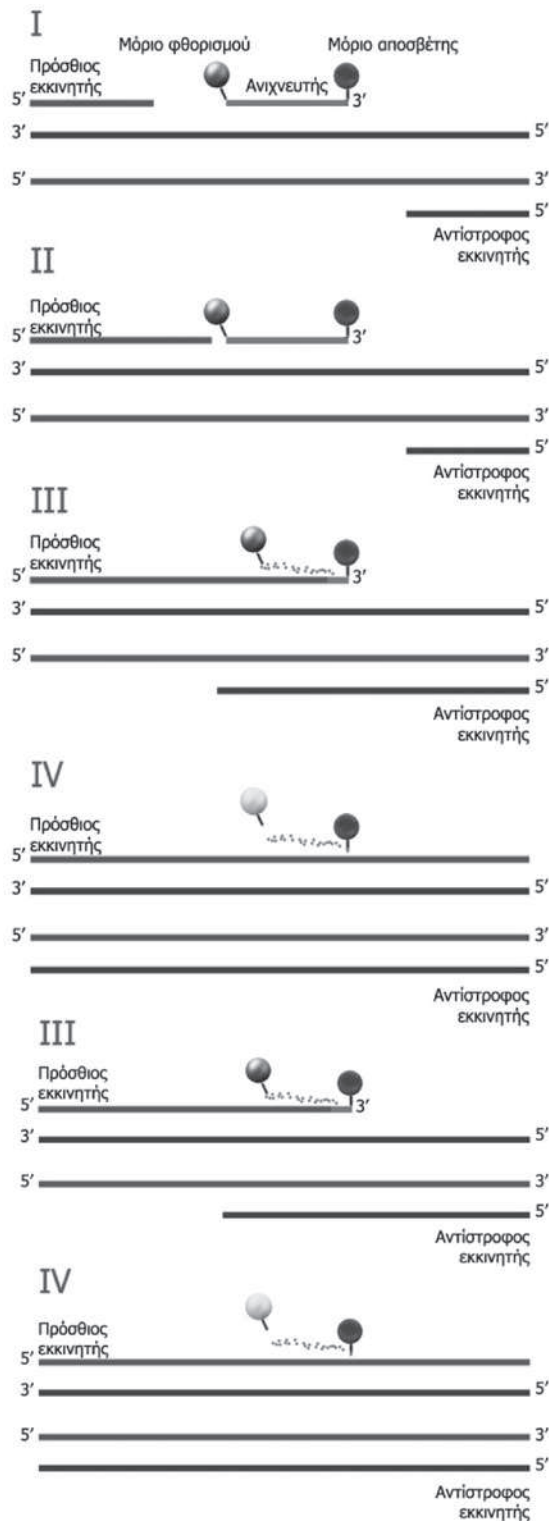
στην παρουσία ενός φθοριοφόρου μορίου (reporter) και ενός μορίου καταστολής φθορισμού (quencher). Η επιλογή των φθοριοφόρων μορίων αλλά και των καταστολέων εξαρτάται από το θερμικό κυκλοποιητή, την παραλλαγή της PCR που θα χρησιμοποιηθεί, καθώς και τα καθορισμένα, για όλα αυτά τα μόρια, φάσματα διέγερσης, εκπομπής και απορρόφησης (πίν. 2).

2.6.1. *Ιχνηθέτες Taqman και 3'MGB*. Οι τεχνολογίες ιχνηθετών, Taqman (5'-3' υδρολυόμενος ιχνηθέτης)<sup>71</sup> και 3' MGB, στηρίζονται και οι δύο στην ίδια αρχή (εικ. 4). Και τα δύο συστήματα φέρουν στο 5' άκρο του ολιγονουκλεοσιδικού ιχνηθέτη ένα φθοριοφόρο μόριο και στο 3' άκρο ένα μόριο παρεμπόδισης φθορισμού. Οι ιχνηθέτες στην Taqman έχουν μέγεθος 20–30 νουκλεοτιδίων ενώ ο φθορισμός του μορίου αναφοράς παρεμποδίζεται από τη γειτνίασή του με τον καταστολέα. Υδρόλυση του ιχνηθέτη Taqman μέσω της 5'–3' εξωνουκλεολυτικής δράσης της Taq DNA πολυμεράσης στους 60 °C διαχωρίζει το φθοριοφόρο από τον καταστολέα, με αποτέλεσμα την εκπομπή σήματος από το πρώτο. Η θερμοκρασία επώασης κατά την επιμήκυνση του DNA είναι κρίσιμη, επειδή σε υψηλότερες θερμοκρασίες (η θερμοκρασία 72 °C χρησιμοποιείται συνήθως στη συμβατική PCR για το βήμα της επιμήκυνσης) η Taq DNA πολυμεράση θα

εκτοπίσει τον ιχνηθέτη χωρίς να τον αποικοδομήσει μέσω της δράσης της ως 5'–3' εξωνουκλεάση. Αποτέλεσμα της υδρόλυσης του ανιχνευτή αποτελεί το γεγονός ότι το φθορίζον σήμα αυξάνεται σε συνάρτηση με τον αριθμό των κύκλων ενίσχυσης και επιτρέπει την ειδική ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του DNA-στόχου. Η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση επικίνδυνων HPV τύπων αποτέλεσε το κατ' εξοχήν πεδίο εφαρμογής του συστήματος Taqman.<sup>72</sup> Οι 3' MGB ιχνηθέτες έχουν στο 3' άκρο τους ένα φθοριοφόρο μόριο ικανό να δεσμεύεται στη μικρή αύλακα του δίκλωνου DNA σε αντίθεση με το σύστημα φθοριοφόρου καταστολέα, με αποτέλεσμα τη βελτιωμένη δέσμευση των ιχνηθετών (μέσω της αυξημένης θερμοκρασίας τήξης των εκκινητών) και τη χρήση μικρότερων αλληλουχιών, έχοντας καλύτερη απόδοση.<sup>73</sup> Η μέθοδος της πολυπλεκτικής Taqman επιτυγχάνεται με τη χρήση ιχνηθετών, οι οποίοι επισημαίνονται με διαφορετικά φθοριοφόρα που έχουν διαφορετικά μέγιστα διέγερσης/εκπομπής. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται ως βασικό εργαλείο για την εργαστηριακή επιτήρηση της γρίπης είναι η PCR πραγματικού χρόνου με τη χρήση τεχνολογίας Taqman, που επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση των τύπων γρίπης Α και Β. Οι αλληλουχίες των εκκινητών και των ιχνηθετών έχουν

**Πίνακας 2.** Φθοριοφόρα και καταστολείς των χημικών ιχνηθετών.

Φθοριοφόρο	Εναλλακτικό φθοριοφόρο	Φάσμα διέγερσης (nm)	Φάσμα εκπομπής (nm)
FAM		495	515
TET	CAL Fluor Gold 540	525	540
HEX	JOE, VIC, CAL Fluor Orange 560	535	555
Cy3	NED, Quasar 570, Oyster 556	550	570
TMR	CAL Fluor Red 590	555	575
ROX	LC Red 610, CAL Fluor Red 610	575	605
Texas Red	LC Red 610, CAL Fluor Red 610	585	605
LC Red 640	CAL Fluor Red 635	625	640
Cy5	LC Red 670, Quasar 670, Oyster 645	650	670
LC Red 705	Cy5.5	680	710
Καταστολείς	Μέγιστο απορρόφησης (nm)		
DDQ-I	630		
Dabcyl	475		
Eclipse	530		
Iowa Black	532		
BHQ-1	534		
QSY-7	571		
BSQ-2	580		
DDQ-II	630		
Iowa Black RQ	645		
QSY-21	660		
BHQ-3	670		



**Εικόνα 4.** Ιχνηθέτες τύπου Taqman. (I) Πρόσδεση στο δίκλωνο DNA μόριο-στόχο του ζεύγους των εκκινητών και του σημασμένου ειδικού ιχνηθέτη. (II) Αντιγραφή των συμπληρωματικών κλώνων με τη χρήση DNA πολυμεράσης. (III) Δράση 5' εξωνουκλεάσης της DNA πολυμεράσης, με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση του ιχνηθέτη και την απελευθέρωση του φθοριοχρώματος. (IV) Το φθοριοχρώμα απομακρύνεται από το μόριο παρεμπόδισης, με αποτέλεσμα παρατηρήσιμο φθορισμό. Ι.Δ. Κυριαζής (πρωτότυπη ιδέα PREMIERBiosoft).

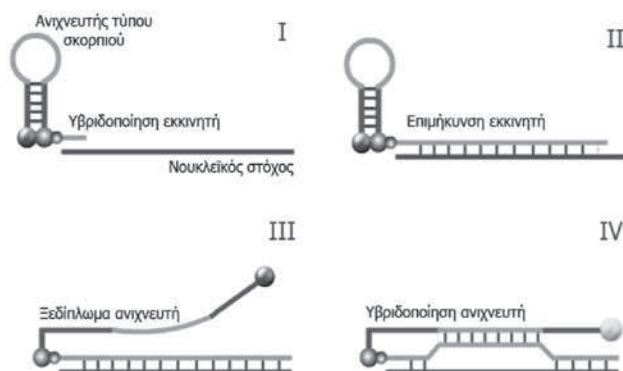
σχεδιάσει από εργαστήρια που μετέχουν στο Ευρωπαϊκό Δίκτυο Επιτήρησης Γρίπης (ECDC, πρώην EISS) και διατίθενται για χρήση αποκλειστικά από τα Εθνικά Εργαστήρια Αναφοράς Γρίπης. Το πρωτόκολλο και η ορθή χρήση της αλληλουχίας των εκκινητών και των ιχνηθετών βελτιστοποιούνται από το εκάστοτε κέντρο αναφοράς βάσει του εξοπλισμού που διαθέτει. Στην Ελλάδα, για παράδειγμα, χρησιμοποιούνται τα φθοριοφόρα FAM και TET για τη διάγνωση του ιού τύπου A και B, αντίστοιχα, με καταστολέα και για τα δύο το BHQ-1.

**2.6.2. Μοριακοί φάροι και εκλειπτικοί MGB ιχνηθέτες.** Οι μοριακοί φάροι (molecular beacons)<sup>74</sup> και οι εκλειπτικοί MGB ιχνηθέτες<sup>75</sup> χρησιμοποιούν τη δευτεροταγή δομή του ολιγονουκλεοτιδίου ώστε να συνυπάρχει ένα φθοριοφόρο μόριο και ένα μόριο παρεμπόδισης σε τόσο κοντινή απόσταση, όταν ο ιχνηθέτης δεν είναι δεσμευμένος, ώστε να μην εκπέμπεται σήμα φθορισμού. Όταν και οι δύο τύποι ιχνηθετών υβριδοποιηθούν στον DNA-στόχο, ξεδιπλώνονται, με αποτέλεσμα να υπάρχει αρκετή απόσταση μεταξύ του φθοριοφόρου και του καταστολέα ώστε να εκπέμπεται σήμα φθορισμού. Σε αντίθεση με τους Taqman ιχνηθέτες, οι εκλειπτικοί MGB ιχνηθέτες και οι μοριακοί φάροι δεν υδρολύονται επειδή οι θερμοκρασίες που επικρατούν στο στάδιο της επιμήκυνσης είναι 72 °C ή υψηλότερες. Ωστόσο, οι εκλειπτικοί MGB ιχνηθέτες θεωρούνται πιο σταθεροί από τους μοριακούς φάρους (πιθανόν λόγω του 5' MGB τμήματος) και φαίνεται να παράγουν καλύτερο λόγο σήματος φθορισμού προς θόρυβο από τους μοριακούς φάρους, που έχουν αξιοποιηθεί για τη μελέτη της έκφρασης *Staphylococcus aureus*.<sup>76</sup>

**2.6.3. Ιχνηθέτες FRET.** Η τεχνική μεταφοράς ενέργειας φθορισμού με αντήχηση (fluorescence resonance energy transfer, FRET) βασίζεται στη μεταφορά ενέργειας μεταξύ δύο φθοριοφόρων μορίων που βρίσκονται σε ξεχωριστούς ιχνηθέτες, οι οποίοι υβριδίζονται εν σειρά σε κοντινή απόσταση επί του ίδιου κλώνου της αλληλουχίας-στόχου. Το ένα φθοριοφόρο (δότης) βρίσκεται στο 3' άκρο του προηγούμενου ιχνηθέτη και το άλλο στο 5' άκρο του ακόλουθου ιχνηθέτη (δέκτης). Η τεχνική χρησιμοποιείται, μεταξύ άλλων, στον εντοπισμό ηπατίτιδας C επί κυττάρων για τον έλεγχο αντι-ιικών παραγόντων.<sup>77</sup> Η ανάλυση της καμπύλης τήξης στην τεχνική FRET υπολογίζει τη θερμοκρασία στην οποία οι δεσμευμένοι ιχνηθέτες διαχωρίζονται από το προϊόν-στόχο. Έτσι, ένα ζεύγος εκκινητών χρησιμοποιείται για να ενισχύσει ένα νουκλεϊκό στόχο, ικανό για διαειδική και ενδοειδική διάκριση, με ταυτόχρονη σχεδίαση ιχνηθετών FRET ώστε να συνδέονται σε διάφορες περιοχές εντός του τμήματος του στόχου. Αυτή η τεχνολογία προσφέρεται για την ανίχνευση SNP, καθώς μια μοναδική αναντιστοιχία μεταξύ των αλληλουχιών του ιχνηθέτη και του στόχου θα αποφέρει αρκετά διαφορετική θερμοκρασία τήξης επι-

τρέποντας έτσι την ανίχνευση. Η iFRET,<sup>78</sup> παραλλαγή της τεχνικής FRET, χρησιμοποιεί μια παρεμβαλλόμενη χρωστική (SYBR Green I), που λειτουργεί ως φθοριοφόρο-δότης, και ένα μόνο ιχνηθέτη με το φθοριοφόρο-δέκτη. Η τεχνολογία iFRET φαίνεται να έχει πλεονεκτήματα έναντι της κλασικής FRET από πλευράς κόστους και ισχύος του σήματος, αλλά δεν έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως.

**2.6.4. Ιχνηθέτες τύπου σκορπιού.** Οι ιχνηθέτες τύπου σκορπιού<sup>79</sup> εκτελούν τη διπλή λειτουργία του ιχνηθέτη και του εκκινητή (εικ. 5). Η δομή τους αποτελείται από ένα μοριακό φάρο που έχει συνδεδεμένο στο 3' άκρο του έναν εκκινητή. Το ενδιάμεσο τμήμα (μικρή σφαίρα στην εικόνα 5) μεταξύ του φάρου και του εκκινητή έχει μια ειδική αλληλουχία που αποτρέπει την αντιγραφή της αλληλουχίας του φάρου. Ο βρόγχος του φάρου είναι συμπληρωματικός με την αλληλουχία που συντίθεται στο 3' άκρο από τον εκκινητή. Μετά την επιμήκυνση των εκκινητών, την αποδιάταξη και την υβριδοποίηση, η αλληλουχία του βρόγχου υβριδοποιείται στις νεοσυντιθέμενες συμπληρωματικές αλληλουχίες που γειτνιάζουν με τον εκκινητή, με αποτέλεσμα την παραγωγή σήματος φθορισμού αφού διαχωρίζεται το μόριο παρεμπόδισης με το φθοριοφόρο. Αν και λόγω πολυπλοκότητας δεν έτυχαν ευρείας αξιοποίησης, οι ιχνηθέτες του εν λόγω τύπου βρέθηκαν να υποκαθιστούν την επάλληλη PCR για τον εντοπισμό και την κατ' είδος ταυτοποίηση του παρασιτικού γένους *Cryptosporidium* και είναι συμβατοί με την R-T PCR.<sup>80</sup> Σε αντίθεση με τους μοριακούς φάρους, οι ιχνηθέτες τύπου σκορπιού δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση καμπύλης τήξης του DNA.



**Εικόνα 5.** Ιχνηθέτες τύπου σκορπιού. (I) Υβριδοποίηση της περιοχής εκκινητή του ιχνηθέτη στην αλληλουχία-στόχο. (II) Επιμήκυνση του εκκινητή. (III) Εκδίπλωση του ιχνηθέτη με αυτόματη απελευθέρωση του φθοριοφόρου από το μόριο παρεμπόδισης. (IV) Υβριδοποίηση της αλληλουχίας του βρόγχου του ιχνηθέτη-σκορπιού με τη συμπληρωματική αλληλουχία του στόχου και εκπομπή φθορισμού από το φθοριοφόρο. Ι.Δ. Κυριαζής (πρωτότυπη ιδέα PREMIERBiosoft).

## 2.7. Ανάλυση των προϊόντων ενίσχυσης

**2.7.1. Παρεμβαλλόμενες χρωστικές.** Μετά την ενίσχυση του νουκλεϊκού στόχου, η συμβατική τεχνική εντοπισμού των προϊόντων είναι η ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων αгарόζης αλλά και αгарόζης Metaphor, συνδυασμένη με χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. Αρκετές χημικές τεχνολογίες έχουν αναπτυχθεί ώστε να «οπτικοποιηθούν» τα προϊόντα, αλλά και να αυξηθεί τόσο η ευαισθησία όσο και η ειδικότητα των τεχνικών ενίσχυσης. Η SYBRGreen I<sup>81</sup> αποτελεί σήμερα τυπική επιλογή, αν και έχουν περιγραφεί και άλλες χημικές χρωστικές ουσίες, όπως η Bebo,<sup>82</sup> η LC Green<sup>83</sup> και η SYTO9.<sup>84</sup>

Οι παρεμβαλλόμενες χρωστικές χημικές ουσίες είναι οικονομικότερες και απλούστερες από τη χρήση ιχνηθετών, με αποτέλεσμα να αποτελούν την πρώτη επιλογή. Μειονέκτημα της χρήσης τους είναι η σύνδεσή τους με οποιοδήποτε δίκλωνο DNA, π.χ. με μη ειδικά προϊόντα και με διμερή εκκινητών αν αυτοί υβριδοποιούνται. Για την ανάλυση των προϊόντων έχουν αναπτυχθεί και άλλες μετα-ενισχυτικές τεχνικές που συνδράμουν στη διάγνωση παθογόνων, αλλά και στην υποειδική ταυτοποίηση μικροβίων ώστε να χορηγηθεί η κατάλληλη φαρμακευτική αγωγή στον ασθενή. Αρκετές από τις εν λόγω τεχνολογίες βοηθούν στην επιδημιολογία των μολυσματικών νόσων, καθώς η επιλογή συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων έντονου πολυμορφισμού επιτρέπει τη σύγκριση με μεγάλη διακριτική ικανότητα και την υποειδική ταυτοποίηση ή και την τυποποίηση των παθογόνων παραγόντων. Η συγκριτική γονιδιωματική μικροοργανισμών είναι εφικτό να εφαρμοστεί λόγω της ικανότητας εντοπισμού σημειακών μεταλλάξεων σε λειτουργικές ή ρυθμιστικές περιοχές γονιδίων, με αποτέλεσμα την αναγνώριση γονοτυπικών πολυμορφισμών με ή χωρίς φαινοτυπική αντιστοίχιση. Οι επιδημιολογικές αυτές μελέτες ενδιαφέρουν περισσότερο τα εκάστοτε κέντρα αναφοράς των νοσημάτων παρά τα διαγνωστικά κέντρα, προκειμένου να ελεγχεται η εξάπλωση, η μολυσματικότητα και η μεταλλαξιγένεση. Η ενημέρωση αυτή φιλτράρεται και παρέχεται στην επιστημονική κοινότητα για πρόληψη έναντι νέων στελεχών ή νέων μεταλλάξεων σε προϋπάρχοντα στελέχη.

**2.7.2. Δοκιμασία προστασίας υβριδισμού.** Στη δοκιμασία HPA (hybridization protection assay), ο ιχνηθέτης και το προϊόν της ενίσχυσης επωάζονται από κοινού σε έναν ενιαίο δοκιμαστικό σωλήνα και η πρόσδεσή του στο στόχο μετράται χωρίς περαιτέρω τεχνικές ανάλυσης.<sup>85</sup> Ο ιχνηθέτης, που προηγουμένως έχει σημανθεί με εστέρα ακριδίνης, προστίθεται σε ένα δείγμα που περιέχει PCR προϊόντα για ταυτοποίηση. Η ταχεία αποσαφήνιση ύπαρξης γενετικής ανταπόκρισης βακτηριακών στελεχών (π.χ. *Mycobacterium tu-*

*berculosis*) σε ορισμένα αντιβιοτικά είναι μια από τις πλέον ενδιαφέρουσες εφαρμογές.<sup>86</sup>

Σε ένα θετικό δείγμα, ο δεσμευμένος ιχνηθέτης προστατεύεται από αλκαλική υδρόλυση και εκπέμπει ανιχνεύσιμο φως μετά την προσθήκη υπεροξειδίων. Η HPA δεν απαιτεί τη σύνδεση του ενισχυμένου DNA σε ένα στερεό υπόστρωμα, όπως συμβαίνει σε μια ταινία υβριδισμού, μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσα σε λίγες ώρες και δεν υπάρχει σπατάλη DNA ιχνηθετών που δεν θα δεσμευτούν στο υπόστρωμα.<sup>87</sup>

**2.7.3. Αλληλούχηση.** Η αλληλούχηση (sequencing) προσφέρει άμεση, ακριβή ανάλυση των προϊόντων ενίσχυσης. Αφού αναλυθεί η πρωτοταγής δομή του προϊόντος PCR, ακολουθεί προαιρετικά μια αυτοματοποιημένη φυλογενετική ανάλυση βασισμένη στη σύγκριση με DNA αλληλουχίες ήδη κατατεθειμένες σε βάσεις δεδομένων (π.χ. GenBank) προς διευκρίνιση της ταυτότητας του παθογόνου. Ο προσδιορισμός αλληλουχίας περιλαμβάνει δύο προσεγγίσεις. Η πρώτη είναι ένας ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός, που συμβαίνει σε πλάκες ηλεκτροφόρων πολυακρυλαμίδης ή σε γυάλινα τριχοειδή και η δεύτερη είναι η ανακατασκευή της αλληλουχίας μέσω υβριδοποίησης σε τυχαία ολιγονουκλεοτίδια που βρίσκονται προσκολλημένα σε μια σταθερή επιφάνεια-μήτρα.<sup>48</sup> Ο αυτοματοποιημένος κατά Sanger προσδιορισμός αλληλουχίας επιτυγχάνεται μέσω της εκπομπής ειδικών φθορίζουσών χρωστικών που περιέχει το κάθε νουκλεοτίδιο (A, G, C, T), προσδίδοντας μια σειρά χρωματικών κορυφών, οι οποίες αντιστοιχούν στην πρωτοταγή δομή της αλληλουχίας-στόχου. Με αυτόν τον τρόπο αναλύονται περιοχές της τάξης των 700–800 ζευγών βάσεων. Η μέθοδος χρησιμοποιείται για ακριβή ταυτοποίηση και ταξινόμηση μικροοργανισμών όπου υπάρχουν γονιδιωματικά δεδομένα, ιδίως όταν άλλες μορφές ταυτοποίησης παρουσιάζουν δυσχέρειες, όπως ασταθή ταξινομική υπόσταση ή ενδιάμεσα χαρακτηριστικά σε κεφαλαιώδεις ιδιότητες, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τους μυκηλιακούς μύκητες, όπως το γένος *Aspergillus*.<sup>88</sup> Ο προσδιορισμός μέσω πυροαλληλούχησης, όπου ανιχνεύεται κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του dsDNA το προϊόν πυροφωσφορικό οξύ, επιτρέπει να αναλυθούν μικρά θραύσματα της τάξης των 50 ζευγών βάσεων. Εξέλιξη της τεχνολογίας “sequencing” αναπτύχθηκε από την 454 LifeSciences, όπου μπορούν να αναλυθούν πλέον 400.000.000 ζεύγη βάσεων μέσα σε 7 ώρες.<sup>89</sup>

**2.7.4. Πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας.** Στην SSCP (single strand conformation polymorphism),<sup>90</sup> ο νουκλεϊκός στόχος υποβάλλεται στην κατάλληλη PCR. Ο στόχος, που ενέχει πολυμορφική θέση, επιτρέπει χάρη αυτής το διαχωρισμό διαφορετικών ταξινομικών βαθμίδων ή στελεχών. Αρχικά, γίνεται αποδιάταξη των δύο αλυσίδων στους 94 °C σε ένα διάλυμα φορμαμίδιου και στη συνέχεια τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδιου. Η στερεοδιαμόρφωση στο μονό-

κλωνο DNA βασίζεται στις φυσικοχημικές ιδιότητες της αλληλουχίας των νουκλεοσιδίων. Οι διαφοροποιήσεις της αλληλουχίας επιφέρουν διαφορετική στερεοδιαμόρφωση που αντικατοπτρίζεται στη διαφορετική ταχύτητα μετανάστευσης των δειγμάτων στο πήκτωμα. Η τεχνική αυτή είναι αρκετά ευαίσθητη ώστε να ανιχνεύονται μονήρεις αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων (SNP) και συνεπώς μπορεί να επιτρέψει υποειδική ταυτοποίηση αλλά και τυποποίηση, όπως π.χ. στον παράγοντα της ποικιλόχρου πιτυρίωσης.<sup>91</sup>

**2.7.5. Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων.** Στη μετα-ενισχυτική RFLP ανάλυση (restriction fragment length polymorphism), η ενισχυμένη αλληλουχία-στόχος πέπτει με συγκεκριμένη ή συγκεκριμένες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, δημιουργώντας μια κατατομή μεγέθους θραυσμάτων όταν θα ηλεκτροφορηθεί σε πήκτωμα αγαρόζης. Η εικόνα που προκύπτει αντιπαραβάλλεται με γνωστά πρότυπα PCR-RFLP ώστε να ταυτοποιηθεί το είδος, ακόμη και να τυποποιηθεί το στέλεχος του παθογόνου μικροοργανισμού. Προκαθορισμένη ενισχυμένη αλληλουχία με υποψία έστω και μίας σημειακής μετάλλαξης (SNP) επιτρέπει σε συγκεκριμένα παθογόνα να τυποποιούνται σε υποειδικό επίπεδο. Οι περιοριστικές πέψεις σε προϊόν PCR αποτέλεσαν μια πολλά υποσχόμενη εφαρμογή στη μοριακή ιατρική μυκητολογία τόσο σε επίπεδο ειδών<sup>90</sup> όσο και ποικιλιών,<sup>92</sup> που όμως δεν αξιοποιήθηκε στην καθημερινή κλινική πράξη καθώς απαιτούσε καλά εκπαιδευμένο σε μοριακή μεθοδολογία προσωπικό και αντίστοιχη υποδομή.

**2.7.6. Ηλεκτροφόρηση ηλεκτροφόρων πηκτωμάτων σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE).** Η PFGE (pulse-field gel electrophoresis)<sup>93</sup> χρησιμοποιείται όταν τα ηλεκτροφορούμενα τμήματα DNA λόγω πολύ μεγάλου μεγέθους δεν μπορούν να διαχωριστούν σε απλή ηλεκτροφόρηση. Τέτοιες είναι οι περιπτώσεις ολόκληρων χρωμοσωμάτων αλλά και των θραυσμάτων που έχουν παραχθεί μετά από πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες χαμηλής συχνότητας (rare cutters) σε ολικό DNA (συνήθως βακτηρίων αλλά και μυκήτων). Η PFGE είναι δυσκολότερη από μια απλή ηλεκτροφόρηση, αλλά παρέχει συνολικά γονιδιωματικά πρότυπα αποτελούμενα από 5–20 διακριτές ζώνες-θραύσματα που κυμαίνονται περίπου σε 10–800 χιλιάδες ζευγών βάσεων (kbp).<sup>94</sup> Η μέθοδος χρησιμοποιείται εκτενώς για την επιδημιολογική διερεύνηση και τη συσχέτιση με πρότυπα αντοχής σε αντιβιοτικά.<sup>95,96</sup> Η σχετική απλότητα των προτύπων PFGE διευκολύνει την εφαρμογή της μεθόδου στην τυποποίηση και στην επιδημιολογική έρευνα των παθογόνων βακτηρίων. Για το σκοπό αυτόν έχουν δημιουργηθεί και δύο μεγάλα δίκτυα, το ENEMTI από το European Laboratories Scientific Research Foundation και το CDC-PulseNet από πανεπιστήμια των ΗΠΑ και του Καναδά, όπου συλλέγουν στοιχεία για την καλύτερη τυποποίηση σημαντικών παθογόνων βακτηρίων μέσω της PFGE.

2.7.7. *Τυποποίηση πολυτοπικής αλληλούχησης.* Η MLST (multilocus sequencing typing) είναι μια τεχνική ανάλυσης DNA αλληλουχιών με ευρεία επιδημιολογική εφαρμογή. Στην τεχνική αυτή, τα στελέχη ταυτοποιούνται σύμφωνα με τις διαφορές αλληλουχίας σε έναν αριθμό προσεκτικά επιλεγμένων γενετικών τόπων. DNA κωδικές αλληλουχίες 7–10 διαφορετικών μεταβολικών γονιδίων (house-keeping genes) μεγέθους περίπου 450 ζευγών βάσεων ενισχύονται (αν αυτό απαιτείται) με PCR και κατόπιν αλληλουχούνται. Για κάθε γενετικό δείκτη οι διαφορετικές αλληλουχίες των εξεταζόμενων στελεχών αντιμετωπίζονται ως διαφορετικά αλληλόμορφα γονίδια και κάθε στέλεχος καθορίζεται από την αλληλική κατατομή των χρησιμοποιούμενων δεικτών (allelic profile),<sup>97</sup> η οποία στη συνέχεια συγκρίνεται με πρότυπες αλληλικές κατατομές ώστε να ταυτοποιηθεί και να τυποποιηθεί ο παθογόνος οργανισμός. Η τεχνική χρησιμοποιείται ευρέως για την τυποποίηση βακτηρίων, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τις μελέτες αντοχής στα αντιβιοτικά στελεχών του χρυσίζοντος σταφυλοκόκκου.<sup>97</sup>

2.7.8. *Πολυεστιακή τυποποίηση με μικροδορυφορικές αλληλουχίες (MLMT).* Η MLMT (multilocus microsatellite typing) είναι μια μοριακή τεχνική μεγάλης διακριτικής ικανότητας που χρησιμοποιείται για τη διεξαγωγή πληθυσμιακών και γενετικών μελετών, όπως π.χ. επιδημιολογικές μελέτες για τον πρωτοπαθώς παθογόνο μύκητα *Penicillium marneffei*<sup>98</sup> και το παράσιτο *Leishmania donovani*.<sup>99</sup> Σημαντικό πλεονέκτημα της τεχνικής MLMT είναι ότι, σε αντίθεση με τις μεθόδους MLST και MLEE, επιτρέπει την περαιτέρω διαφοροποίηση στελεχών στα ευκαρυωτικά παθογόνα.<sup>100</sup> Οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες είναι περιοχές επαναλαμβανόμενων νουκλεοσιδικών μοτίβων 1–6 ζευγών βάσεων, οι οποίες μεταλλάσσονται με ταχύτερους ρυθμούς από το υπόλοιπο γονιδίωμα, μεταβάλλοντας κυρίως τον αριθμό των επαναλήψεών τους. Η φυσική επιλογή δεν επηρεάζει την εξέλιξη των μικροδορυφορικών αλληλουχιών και τα αποτελέσματα που προκύπτουν είναι επαναλήψιμα. Ο πολυμορφισμός αυτός εξετάζεται στα υπό μελέτη δείγματα με PCR με τη χρήση εκκινητών που υβριδοποιούνται πριν και μετά από τις αλληλουχίες των εν λόγω περιοχών. Το προϊόν είτε αλληλουχείται, για μεγαλύτερη ακρίβεια, είτε ηλεκτροφορεύεται σε πήκτωμα υψηλής διακριτικής ισχύος ώστε η προσθαφαίρεση και μίας μόνο επανάληψης να κα-

θίσταται αντιληπτή σε σύγκριση με συνηλετροφορούμενα πρότυπα και μάρτυρες.

2.7.9. *Ισοενζυμική πολυεστιακή ηλεκτροφόρηση.* Η μοριακή τεχνική της ισοενζυμικής πολυεστιακής ηλεκτροφόρησης (multilocus enzyme electrophoresis, MLEE) αποτελεί τη μέθοδο αναφοράς για την ταυτοποίηση, την ταξινόμηση και την τυποποίηση στελεχών αρκετών παθογόνων, όπως βακτηρίων, παρασίτων και μυκήτων και βασίζεται στις πρωτεΐνες τους.<sup>101</sup> Στην τεχνική αυτή, πολλαπλά ένζυμα από το υπό εξέταση απομονωμένο στέλεχος υπόκεινται σε ηλεκτροφόρηση επί πηκτώματος αμύλου. Η ηλεκτροφόρηση διαχωρίζει τα ένζυμα, βάσει του μοριακού βάρους του εκάστοτε ενζύμου και του ηλεκτρικού φορτίου που φέρει, με αποτέλεσμα να μεταναστεύουν σε διαφορετικά σημεία μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται. Η ηλεκτροφορητική κατατομή, η οποία δημιουργείται, οπτικοποιείται με τη χρήση μεθόδων χρώσης που περιλαμβάνουν ειδικά υποστρώματα ενζύμων ή συνένζυμα αφ' ενός και χρώσεις αφ' ετέρου, και συγκρίνεται με γνωστές κατατομές πρότυπων στελεχών. Όταν εκτιμάται ένα συγκεκριμένο ένζυμο, που έχει σχεδόν το ίδιο μοριακό βάρος σε κάθε απομονωθέν στέλεχος, οι διαφορές στην κινητικότητα μεταξύ των στελεχών οφείλονται στην αλλαγή του φορτίου του μορίου λόγω των αντικαταστάσεων νουκλεοτιδίων που έχουν συμβεί, αφού για τη δομή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας ευθύνεται πρωτογενώς η αλληλουχία του DNA. Με αυτόν τον τρόπο οι διαφορετικές κινητικές επιδόσεις των ενζύμων δημιουργούν ξεχωριστές και μοναδικές ισοενζυμικές ηλεκτροφορητικές κατατομές που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένο στέλεχος του παθογόνου οργανισμού. Με την εν λόγω μέθοδο διαχωρίζονται ακόμη και σήμερα τα ζυμοδέματα των διαφορετικών ειδών του πρωτοζωικού γένους *Leishmania*<sup>102</sup> και διευκρινίζεται η επιδημιολογία του βακτηρίου *Listeria monocytogenes*.<sup>103</sup>

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Οι συγγραφείς ευχαριστούν θερμά τη γραφίστρια Μαρία Μαρίνου-Φούσκη που πραγματοποίησε τη δημιουργία και τις τροποποιήσεις των εικόνων 2, 3, 4, 5 της παρούσας ανασκόπησης.

## ABSTRACT

## Molecular techniques for the detection and characterization of microorganisms

I.D. KYRIAZIS,<sup>1,2</sup> M.E. KAMBOURIS,<sup>1</sup> K. POULAS,<sup>1</sup> G.P. PATRINOS<sup>1</sup><sup>1</sup>Laboratory of Molecular Biology and Immunology, Department of Pharmacy, School of Health Sciences, University of Patras, Rio Patras, <sup>2</sup>Laboratory of Cellular Immunology, Department of Microbiology, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece*Archives of Hellenic Medicine* 2014, 31(1):23–40

The detection and characterization of pathogenic and non-pathogenic microorganisms are currently of paramount importance in clinical and laboratory practice. Molecular techniques can offer more accurate characterization, increase sensitivity and reduce the diagnosis time without substantial increase in cost. They thus result in faster and more appropriate treatment and also promote prevention procedures, guiding decisions on the introduction and composition of prophylactic therapy. The discovery of the polymerase chain reaction (PCR) and other similar molecular techniques, based on amplification of nucleic acid traces, has contributed to the rapid growth of diagnostic methodology, as real-time PCR enables the simultaneous qualitative and quantitative determination of microorganisms. Novel and modified molecular techniques are being evolved to improve reliability and enhance sensitivity. These are based on new insights into the chemistry of synthesis and detection and the use of improved incubation and detection hardware. The majority of the new techniques are only gradually being introduced into the routine of diagnostic laboratories, because of the domination of the PCR, the need for expensive specialized laboratory equipment and instrumentation, which in turn require experienced, expert personnel for effective operation, and their high overall operating cost of, taking into consideration the reagents and the maintenance costs. The need for standardization, if not of techniques, at least operating procedures and the recording of data to enable comparison, cooperation and interaction among centers further complicates the choice and applicability of these new and promising, but also unproven methods. This review presents the main molecular diagnostic methods used in microbiology laboratories.

**Key words:** Microbiology, Molecular diagnosis

## Βιβλιογραφία

1. <http://www.who.int/healthinfo/statistics/bodgbddeathdaly-estimates.xls>
2. MICHAUD CM. Global burden of infectious disease. In: Lederberg J (ed) *Encyclopedia of microbiology*. Academic Press, San Diego, 2000:529–540
3. [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/GBD\\_report\\_2004update\\_full.pdf](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf)
4. <http://www.who.int/bulletin/volumes/83/3/171.pdf>
5. MELTZER MI. Economic consequences of infectious diseases. In: Lederberg J (ed) *Encyclopedia of microbiology*. Academic Press, San Diego, 2000:137–155
6. BOSCH FX, DE SANJOSÉ S. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Dis Markers* 2007, 23:213–227
7. KREMSDORF D, SOUSSAN P, PATERLINI-BRECHOT P, BRECHOT C. Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: Paradigms for viral-related human carcinogenesis. *Oncogene* 2006, 25:3823–3833
8. LEVRERO M. Viral hepatitis and liver cancer: The case of hepatitis C. *Oncogene* 2006, 25:3834–3847
9. MALFERTHEINER P, SIPPONEN P, NAUMANN M, MOAYYEDI P, MÉGRAUD F, XIAO SD ET AL. *Helicobacter pylori* eradication has the potential to prevent gastric cancer: A state-of-the-art critique. *Am J Gastroenterol* 2005, 100:2100–2115
10. MOSS SF, BLASER MJ. Mechanisms of disease: Inflammation and the origins of cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2005, 2:90–97
11. THURM V, GERICKE B. Identification of infant food as a vehicle in a nosocomial outbreak of *Citrobacter freundii*: Epidemiological subtyping by allozyme, whole-cell protein and antibiotic resistance. *J Appl Bacteriol* 1994, 76:553–558
12. STOAKES L, JOHN MA, LANNIGAN R, SCHIEVEN BC, RAMOS M, HARLEY D ET AL. Gas-liquid chromatography of cellular fatty acids for identification of staphylococci. *J Clin Microbiol* 1994, 32:1908–1910
13. TENOVER FC, ARBEIT R, ARCHER G, BIDDLE J, BYRNE S, GOERING R ET AL. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1994, 32:407–415
14. EISENSTEIN BI. New molecular techniques for microbial epidemiology and the diagnosis of infectious diseases. *J Infect Dis* 1990, 161:595–602
15. LOW DE, McGEER A. The use of molecular biology techniques for diagnostic microbiology and hospital epidemiology. *New Horiz* 1995, 3:161–169

16. MAYER LW. Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev* 1988, 1:228–243
17. WACHSMUTH K. Genotypic approaches to the diagnosis of bacterial infections: Plasmid analyses and gene probes. *Infect Control* 1985, 6:100–109
18. PITT TL, GASTON MA. Bacteriophage typing. *Methods Mol Biol* 1995, 46:15–26
19. SADER HS, HOLLIS RJ, PFALLER MA. The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious diseases. *Clin Lab Med* 1995, 15:407–431
20. SAHM DF, O'BRIEN TF. Detection and surveillance of antimicrobial resistance. *Trends Microbiol* 1994, 2:366–371
21. WAGAR EA. Direct hybridization and amplification applications for the diagnosis of infectious diseases. *J Clin Lab Anal* 1996, 10:312–325
22. ERLICH HA, GELFAND D, SNINSKY JJ. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 1991, 252:1643–1651
23. MULLIS KB, FALOONA FA. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987, 155:335–350
24. PERSING DH. Polymerase chain reaction: Trenches to benches. *J Clin Microbiol* 1991, 29:1281–1285
25. WU DY, WALLACE RB. The ligation amplification reaction (LAR) – amplification of specific DNA sequences using sequential rounds of template-dependent ligation. *Genomics* 1989, 4:560–569
26. KWONG DY, DAVIS GR, WHITFIELD KM, CHAPPELLE HL, DIMICHELE LJ, GINGERAS TR. Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:1173–1177
27. EISENSTEIN BI. The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N Engl J Med* 1990, 322:178–183
28. WHITE TJ, MADEJ R, PERSING DH. The polymerase chain reaction: Clinical applications. *Adv Clin Chem* 1992, 29:161–196
29. VELEGRAKI A, KAMBOURIS M, KOSTOUROU A, CHALEVELAKIS G, LEGAKIS NJ. Rapid extraction of fungal DNA from clinical samples for PCR amplification. *Med Mycol* 1999, 37:69–73
30. HOLMES AR, CANNON RD, SHEPHERD MG, JENKINSON HF. Detection of *Candida albicans* and other yeasts in blood by PCR. *J Clin Microbiol* 1994, 32:228–231
31. TSIODRAS S, GEORGOULAKIS J, CHRANIOTI A, VOULGARIS Z, PSYRRI A, TSIVILIKA A ET AL. Hybrid capture vs PCR screening of cervical human papilloma virus infections. Cytological and histological associations in 1270 women. *BMC Cancer* 2010, 10:53
32. KAMBOURIS ME, REICHARD U, LEGAKIS NJ, VELEGRAKI A. Sequences from the aspergillopepsin PEP gene of *Aspergillus fumigatus*: Evidence on their use in selective PCR identification of *Aspergillus* species in infected clinical samples. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999, 25:255–264
33. HIGUCHI R, DOLLINGER G, WALSH PS, GRIFFITH R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio-technology (NY)* 1992, 10:413–417
34. ZHANG WW, MIRANDA-VERASTEGUI C, AREVALO J, NDAO M, WARD B, LLANOS-CUENTAS A ET AL. Development of a genetic assay to distinguish between *Leishmania viannia* species on the basis of isoenzyme differences. *Clin Infect Dis* 2006, 42:801–809
35. GIGLIO S, MONIS PT, SAINT CP. *Legionella* confirmation using real-time PCR and SYTO9 is an alternative to current methodology. *Appl Environ Microbiol* 2005, 71:8944–8948
36. LEE MS, CHANG PC, SHIEN JH, CHENG MC, SHIEH HK. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J Virol Methods* 2001, 97:13–22
37. JOU NT, YOSHIMORI RB, MASON GR, LOUIE JS, LIEBLING MR. Single-tube, nested, reverse transcriptase PCR for detection of viable *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1997, 35:1161–1165
38. SALOMON RN. Introduction to reverse transcription polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 1995, 4:2–3
39. HAQQI TM, SARKAR G, DAVID CS, SOMMER SS. Specific amplification with PCR of a refractory segment of genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 1988, 16:11844
40. ROBERTS TC, STORCH GA. Multiplex PCR for diagnosis of AIDS-related central nervous system lymphoma and toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 1997, 35:268–269
41. BIALEK R, FEUCHT A, AEPINUS C, JUST-NÜBLING G, ROBERTSON VJ, KNOBLOCH J ET AL. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *J Clin Microbiol* 2002, 40:1644–1647
42. BEJ AK, MAHBUBANI MH, MILLER R, DICESARE JL, HAFF L, ATLAS RM. Multiplex PCR amplification and immobilized capture probes for detection of bacterial pathogens and indicators in water. *Mol Cell Probes* 1990, 4:353–365
43. TANIUCHI M, VERWEIJ JJ, NOOR Z, SOBUZ SU, LIESHOUT LV, PETRI WA Jr ET AL. High throughput multiplex PCR and probe-based detection with Luminex beads for seven intestinal parasites. *Am J Trop Med Hyg* 2011, 84:332–337
44. PIATAK M Jr, LUK KC, WILLIAMS B, LIFSON JD. Quantitative competitive polymerase chain reaction for accurate quantitation of HIV DNA and RNA species. *Biotechniques* 1993, 14:70–81
45. RELMAN DA, LOUITT JS, SCHMIDT TM, FALKOW S, TOMPKINS LS. The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens. *N Engl J Med* 1990, 323:1573–1580
46. RELMAN DA, FALKOW S. Identification of uncultured microorganisms: Expanding the spectrum of characterized microbial pathogens. *Infect Agents Dis* 1992, 1:245–253
47. SHAMANIN V, DELIUS H, DE VILLIERS EM. Development of a broad spectrum PCR assay for papillomaviruses and its application in screening lung cancer biopsies. *J Gen Virol* 1994, 75:1149–1156
48. KIRSCHNER P, SPRINGER B, VOGEL U, MEIER A, WREDE A, KIEKENBECK M ET AL. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: Report of a 2-year experience in a clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1993, 31:2882–2889
49. MONSTEIN HJ, KIHLESTRÖM E, TIVELJUNG A. Detection and identification of bacteria using in-house broad range 16S rDNA PCR amplification and genus-specific DNA hybridization probes, located within variable regions of 16S rRNA genes. *APMIS* 1996, 104:451–458



50. VELEGRAKI A, KAMBOURIS ME, SKINIOTIS G, SAVALA M, MITROUS-SIA-ZIOUVA A, LEGAKIS NJ. Identification of medically significant fungal genera by polymerase chain reaction followed by restriction enzyme analysis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999, 23:303–312
51. BARANY F. Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88:189–193
52. WIEDMANN M, WILSON WJ, CZAJKA J, LUO J, BARANY F, BATT CA. Ligase chain reaction (LCR) – overview and applications. *PCR Methods Appl* 1994, 3:S51–S64
53. LOU XJ, PANARO NJ, WILDING P, FORTINA P, KRICKA LJ. Mutation detection using ligase chain reaction in passivated silicon-glass microchips and microchip capillary electrophoresis. *Biotechniques* 2004, 37:392, 394, 396–398
54. BUSTI E, BORDONI R, CASTIGLIONI B, MONCIARDINI P, SOSIO M, DONADIO S ET AL. Bacterial discrimination by means of a universal array approach mediated by LDR (ligase detection reaction). *BMC Microbiol* 2002, 2:27
55. SIMPKINS SA, CHAN AB, HAYS J, PÖPPING B, COOK N. An RNA transcription-based amplification technique (NASBA) for the detection of viable *Salmonella enterica*. *Lett Appl Microbiol* 2000, 30:75–79
56. GUATELLI JC, WHITFIELD KM, KWOH DY, BARRINGER KJ, RICHMAN DD, GINGERAS TR. Isothermal, *in vitro* amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87:1874–1878
57. COMPTON J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 1991, 350:91–92
58. NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, YONEKAWA T, WATANABE K, AMINO N ET AL. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000, 28:E63
59. NAGAMINE K, HASE T, NOTOMI T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes* 2002, 16:223–229
60. MORI Y, KITAO M, TOMITA N, NOTOMI T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J Biochem Biophys Methods* 2004, 59:145–157
61. WALKER GT, FRAISER MS, SCHRAM JL, LITTLE MC, NADEAU JG, MALINOWSKI DP. Strand displacement amplification – an isothermal, *in vitro* DNA amplification technique. *Nucleic Acids Res* 1992, 20:1691–1696
62. MORSE SA. New tests for bacterial sexually transmitted diseases. *Curr Opin Infect Dis* 2001, 14:45–51
63. BOTTARI B, ERCOLINI D, GATTI M, NEVIANI E. Application of FISH technology for microbiological analysis: Current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006, 73:485–494
64. MORGAN M, KALANTRI S, FLORES L, PAI M. A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2005, 5:62
65. ARNEY A, BENNETT KM. Molecular diagnostics of human papillomavirus. *Lab Med* 2010, 41:523–530
66. YOO SM, LEE SY. Diagnosis of pathogens using DNA microarray. *Recent Pat Biotechnol* 2008, 2:124–129
67. EHRENREICH A. DNA microarray technology for the microbiologist: An overview. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006, 73:255–273
68. YAN L, ZHANG J, LI M, CAO Y, XU Z, GAO P ET AL. DNA microarray analysis of fluconazole resistance in a laboratory *Candida albicans* strain. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2008, 40:1048–1060
69. TOST J, GUT IG. Genotyping single nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry in clinical applications. *Clin Biochem* 2005, 38:335–350
70. SAMPATH R, RUSSELL KL, MASSIRE C, ESHOO MW, HARPIN V, BLYN LB ET AL. Global surveillance of emerging influenza virus genotypes by mass spectrometry. *PLoS One* 2007, 2:e489
71. HEID CA, STEVENS J, LIVAK KJ, WILLIAMS PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996, 6:986–994
72. GRAVITT PE, PEYTON C, WHEELER C, APPLE R, HIGUCHI R, SHAH KV. Reproducibility of HPV 16 and HPV 18 viral load quantitation using TaqMan real-time PCR assays. *J Virol Methods* 2003, 112:23–33
73. KUTYAVIN IV, AFONINA IA, MILLS A, GORN VV, LUKHTANOV EA, BELOUSOV ES ET AL. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res* 2000, 28:655–661
74. PIATEK AS, TYAGI S, POL AC, TELENTI A, MILLER LP, KRAMER FR ET AL. Molecular beacon sequence analysis for detecting drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Biotechnol* 1998, 16:359–363
75. AFONINA IA, REED MW, LUSBY E, SHISHKINA IG, BELOUSOV YS. Minor groove binder-conjugated DNA probes for quantitative DNA detection by hybridization-triggered fluorescence. *Biotechniques* 2002, 32:940–944, 946–949
76. KUECHENMEISTER LJ, ANDERSON KL, MORRISON JM, DUNMAN PM. The use of molecular beacons to directly measure bacterial mRNA abundances and transcript degradation. *J Microbiol Methods* 2009, 76:146–151
77. YU X, UPRICHARD SL. Cell-based hepatitis C virus infection fluorescence resonance energy transfer (FRET) assay for antiviral compound screening. *Curr Protoc Microbiol* 2010, Chapter 17, Unit 17.5
78. HOWELL WM, JOBS M, BROOKES AJ. iFRET: An improved fluorescence system for DNA-melting analysis. *Genome Res* 2002, 12:1401–1407
79. SOLINAS A, BROWN LJ, McKEEN C, MELLOR JM, NICOL J, THELWELL N ET AL. Duplex Scorpion primers in SNP analysis and FRET applications. *Nucleic Acids Res* 2001, 29:E96
80. STROUP SE, ROY S, McHELE J, MAROV, NTABAGUZI S, SIDDIQUE A ET AL. Real-time PCR detection and speciation of *Cryptosporidium* infection using Scorpion probes. *J Med Microbiol* 2006, 55:1217–1222
81. BECKER A, REITH A, NAPIWOTZKI J, KADENBACH B. A quantitative method of determining initial amounts of DNA by polymerase chain reaction cycle titration using digital imaging and a novel DNA stain. *Anal Biochem* 1996, 237:204–207
82. BENGTTSSON M, KARLSSON HJ, WESTMAN G, KUBISTA M. A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2003, 31:e45
83. WITTEWER CT, REED GH, GUNDRY CN, VANDERSTEEN JG, PRYOR RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis

- using LCGreen. *Clin Chem* 2003, 49:853–860
84. MONIS PT, GIGLIO S, SAINT CP. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Anal Biochem* 2005, 340:24–34
  85. ARNOLD LJ Jr, HAMMOND PW, WIESE WA, NELSON NC. Assay formats involving acridinium-ester-labeled DNA probes. *Clin Chem* 1989, 35:1588–1594
  86. KOGA H, MIYAMOTO J, OHNO H, OGAWA K, TOMONO K, TASHIRO T ET AL. A rapid drug susceptibility test for *Mycobacterium tuberculosis* using the hybridization protection assay. *J Antimicrob Chemother* 1997, 40:189–194
  87. NELSON NC, KACIAN DL. Chemiluminescent DNA probes: A comparison of the acridinium ester and dioxetane detection systems and their use in clinical diagnostic assays. *Clin Chim Acta* 1990, 194:73–90
  88. ARABATZIS M, KAMBOURIS M, KYPRIANOU M, CHRYSAKI A, FOUSTOUKOU M, KANELLOPOULOU M ET AL. Polyphasic identification and susceptibility to seven antifungals of 102 *Aspergillus* isolates recovered from immunocompromised hosts in Greece. *Antimicrob Agents Chemother* 2011, 55:3025–3030
  89. VOELKERDING KV, DAMES SA, DURTSCHI JD. Next-generation sequencing: From basic research to diagnostics. *Clin Chem* 2009, 55:641–658
  90. ORITA M, IWAHANA H, KANAZAWA H, HAYASHI K, SEKIYA T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:2766–2770
  91. GAITANIS G, VELEGRAKI A, ALEXOPOULOS EC, CHASAPI V, TSIGNONIA A, KATSAMBAS A. Distribution of *Malassezia* species in pityriasis versicolor and seborrhoeic dermatitis in Greece. Typing of the major pityriasis versicolor isolate *M. globosa*. *Br J Dermatol* 2006, 154:854–859
  92. VELEGRAKI A, KIOSSES VG, KANSOUZIDOU A, SMILAKOU S, MITROUSIA-ZIOUVA A, LEGAKIS NJ. Prospective use of RFLP analysis on amplified *Cryptococcus neoformans* URA5 gene sequences for rapid identification of varieties and serotypes in clinical samples. *Med Mycol* 2001, 39:409–417
  93. SCHWARTZ DC, CANTOR CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 1984, 37:67–75
  94. TENOVER FC, ARBEIT RD, GOERING RV, MICKELSEN PA, MURRAY BE, PERSING DH ET AL. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995, 33:2233–2239
  95. KANELLOPOULOU M, STAMOS G, PETINNELLI I, SAVALA M, TZIMO-GIANNI A, LEGAKIS NJ ET AL. Subtyping and antifungal susceptibilities of *Candida* spp in the intensive care unit of a Greek general hospital. *Int J Antimicrob Agents* 2001, 18:179–183
  96. HINI S, KAMBOURIS M, PERDIOS I, VELEGRAKI A. Candidiasis in HIV-positive patients in Greece: Conventional epidemiological data and evaluation of the clinical resistance of *Candida* species to seven antifungal agents. *e-JST* 2010, 4:87–93
  97. ENRIGHT MC, DAY NP, DAVIES CE, PEACOCK SJ, SPRATT BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000, 38:1008–1015
  98. FISHER MC, DE HOOG S, AKOM NV. A highly discriminatory multilocus microsatellite typing (MLMT) system for *Penicillium marneffeii*. *Mol Ecol Notes* 2004, 4:515–518
  99. GOUZELOU E, HARALAMBOUS C, AMRO A, MENTIS A, PRATLONG F, DEDET JP ET AL. Multilocus microsatellite typing (MLMT) of strains from Turkey and Cyprus reveals a novel monophyletic *L. donovani* sensu lato group. *PLoS Negl Trop Dis* 2012, 6:e1507
  100. SCHÖNIAN G, KUHL S, MAURICIO IL. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology* 2011, 138:405–425
  101. TIBAYRENC M. Multilocus enzyme electrophoresis for parasites and other pathogens. *Methods Mol Biol* 2009, 551:13–25
  102. PRATLONG F, DEREURE J, BUCHETON B, EL-SAF S, DESSEIN A, LANOTTE G ET AL. Sudan: The possible original focus of visceral leishmaniasis. *Parasitology* 2001, 122:599–605
  103. NØRRUNG B, SKOVGAARD N. Application of multilocus enzyme electrophoresis in studies of the epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Denmark. *Appl Environ Microbiol* 1993, 59:2817–2822

*Corresponding author:*

G.P. Patrinos, Laboratory of Molecular Biology and Immunology, Department of Pharmacy, University of Patras, University Campus, Rion, GR-265 04 Patras, Greece  
e-mail: gpatrinos@upatras.gr