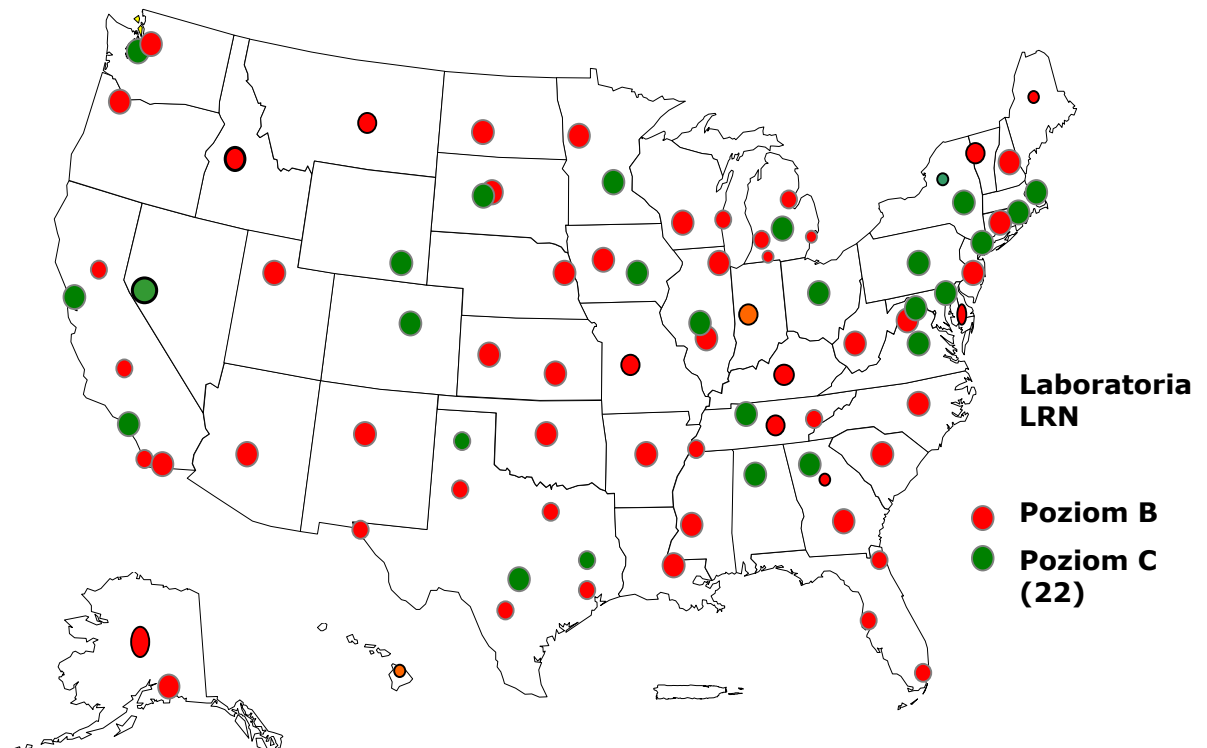


# LRN - Laboratory Response Network

Sieć laboratoriów w USA, które będą zdolne do szybkiej odpowiedzi na zagrożenie związane z uwolnieniem czynników zakaźnych lub w przypadku użycia toksyn lub pojawienia się groźnej epidemii

Każde laboratorium

- stosuje określone metody identyfikacji czynników biologicznych (protokoły CDC)
- używa wystandaryzowanych odczynników i kontroli
- ma zapewniony dostęp do bezpiecznego przesyłania danych
- ma zapewniony dostęp do najnowszych technik i pomoc w szkoleniu pracowników
- przechodzi testy kończące się certyfikatem
- personel jest szczepiony i zatwierdzony !



# LRN - Laboratory Response Network

Zadania poszczególnych typów laboratoriów:

## Laboratoria A: Poziom bezpieczeństwa A, BSL-2,

Laboratoria kliniczne (publiczne lub prywatne), analizują materiał kliniczny i identyfikują czynnik etiologiczny. Ich zadaniem jest wykluczenie obecności patogenu związanego z bronią biologiczną lub groźną epidemią (przy pomocy 8 klasycznych technik: barwienie Grama, test na oksydazę, katalazę, ureazę, ruchliwość, hemolizę,  $\beta$  -laktamazę i tworzenie satelit ). Protokoły dostępne w internecie.

Jeśli nie jest to możliwe - lub w razie podejrzeń - materiał przekazywany jest do laboratorium B.

Nie analizują próbek pobranych ze środowiska.

## Laboratoria B: Poziom bezpieczeństwa B, BSL-2 + procedury BSL-3

Identyfikują określony czynnik, mają uprawnienia do analizy próbek pobranych ze środowiska.

## Laboratoria C: Poziom bezpieczeństwa BSL-3

laboratoria referencyjne

Identyfikują określone czynniki przy pomocy technik molekularnych.

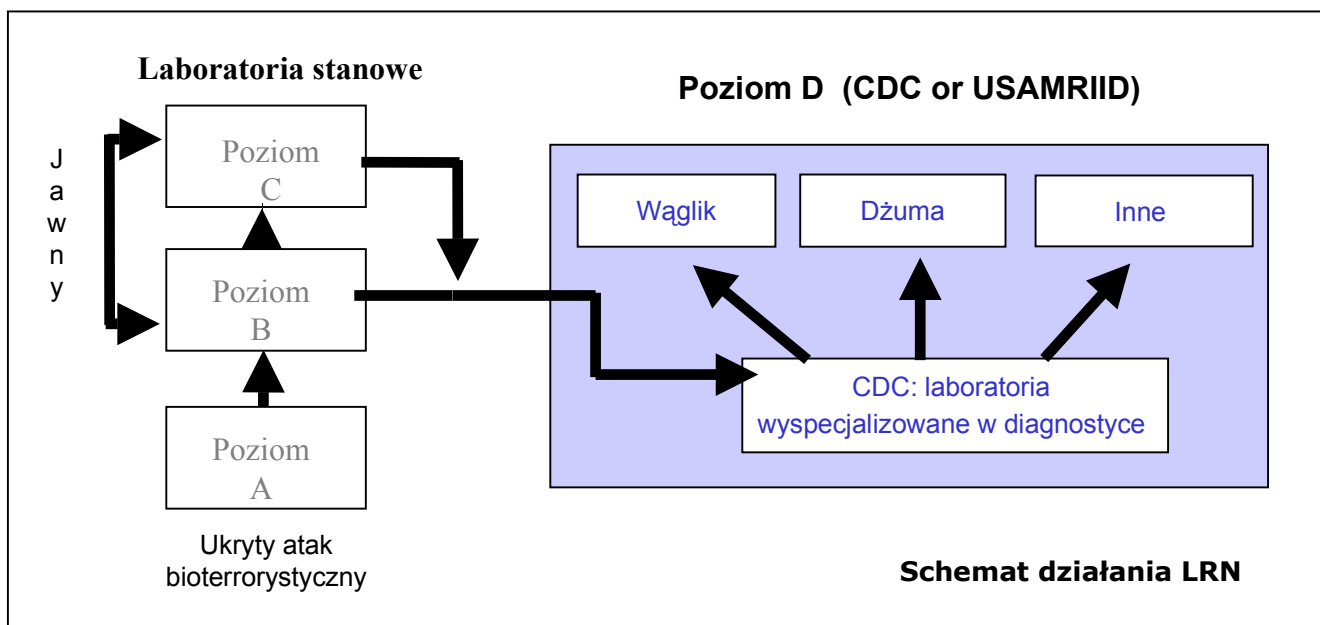
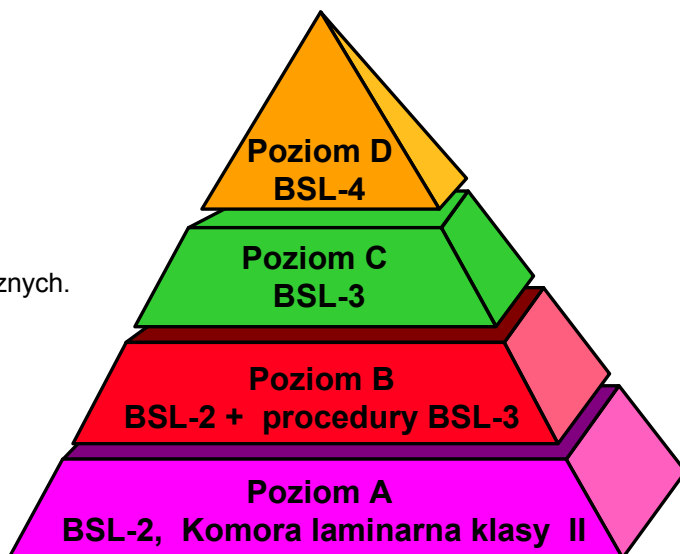
Przeprowadzają testy toksyczności  
analizują próbki pobrane ze środowiska.

Uczestniczą w testowaniu nowych metod diagnostycznych.

## Laboratoria D: Poziom bezpieczeństwa BSL-4

Analizują materiał kliniczny w przypadku szczególnie niebezpiecznych chorób, przechowują wirulentne oraz referencyjne szczepy.

Przeprowadzają genetyczną analizę porównawczą -  
detekcja genetycznie zmodyfikowanych czynników.  
Opracowują nowe techniki diagnostyczne.



# BSL - Biosafety level

## Klasy bezpieczeństwa biologicznego

### **BSL-1**

Praca ze znanymi czynnikami biologicznymi, o których wiadomo, że nie wywołują chorób u zdrowych dorosłych osób np. *B. subtilis*

sala ćwiczeń dla studentów:

nie wolno pić, jeść, żuć gumy (!), używać kosmetyków (np. szminek),

myjemy ręce, nosimy fartuch, a w razie potrzeby jednorazowe rękawiczki i okulary ochronne

materiał biologiczny traktujemy zawsze jako potencjalne źródło zakażenia - płytki, szkło laboratoryjne zatapiamy w detergencie, dezynfekujemy stoły laboratoryjne, niczego, co miało kontakt z bakteriami nie wyrzucamy do śmietnika! Po użyciu, ostre rzeczy wrzucamy do specjalnego pojemnika.

Absolutnie nie wolno kłaść płytek, ez, preparatów na zeszyty, książki lub inne rzeczy, które zabiera się do domu.

Długie włosy!

# BSL - Biosafety level

## BSL-3

Praca z czynnikami zakaźnymi, które wywołują choroby i są przenoszone drogą kropelkową lub wziewną

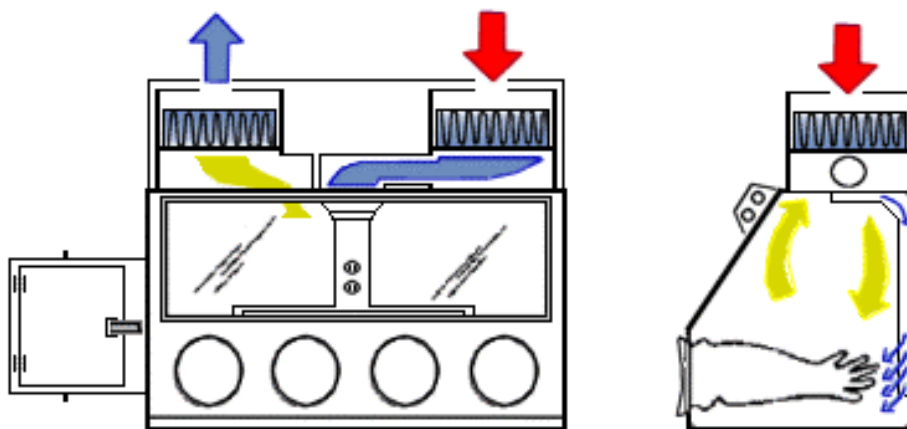
Praca z mało poznanymi czynnikami zakaźnymi

Wszystkie czynności, które mogą prowadzić do powstania zakaźnego aerozolu:

- namnażanie większych ilości bakterii/wirusów
- przygotowywanie szczepionek

BSL-2 + ściśle kontrolowany dostęp do laboratorium, osobne wejście, podwójne drzwi, komora laminarna klasy III

Powietrze w pomieszczeniu filtrowane przez filtry HEPA, ujemne podciśnienie, odkażanie wszystkich odpadów i przedmiotów, które miały styczność z materiałem biologicznym, odkażanie fartuchów przed praniem



Komora BSL-3

# BSL - Biosafety level

## BSL-4

Praca z czynnikami zakaźnymi, które wywołują śmiertelne choroby i są wysoce zakaźne/ przenoszone wziewną

BSL-3 + laboratorium w osobnym budynku otoczone strefą ochronną, oddzielne generatory prądu

Personel pracuje w kombinezonach, po wyjściu przechodzi odkażanie (prysznic)



Praca w laboratorium BSL-4, CDC

# BSL - Biosafety level

## BSL-2

Praca z czynnikami zakaźnymi, które wywołują choroby u ludzi np. *B. anthracis*; ryzyko zakażenia się drogą pokarmową, poprzez błony śluzowe, uszkodzenia skóry,

BSL- 1 + laboratorium oddzielone od głównego szlaku komunikacyjnego w budynku, niedostępne dla osób trzecich, opatrzone symbolem



Wyposażenie: komora laminarna klasy II, autoklaw

Fartuchy laboratoryjne, które zostają w laboratorium, jednorazowe rękawiczki i w razie potrzeby okulary ochronne

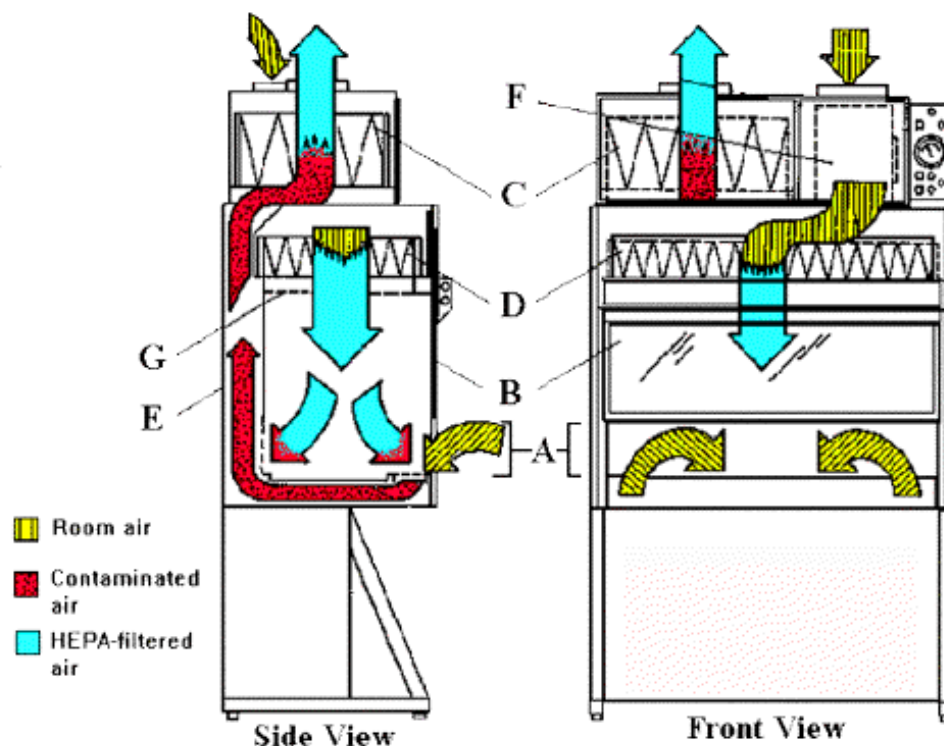
UWAGA! W rękawiczkach nie wolno odbierać telefonów ani dotykać innych przedmiotów, które mogły by w ten sposób ulec skażeniu

Przeszkolony personel, szczepiony przeciw HBV i innym czynnikom zakaźnym

*Opracowany plan działania w przypadku zakażenia*

Figure 6. The Class II, Type B2 BSC

A. front opening, B. sash C. exhaust HEPA filter, D. supply HEPA filter, E. negative pressure exhaust plenum, F. blower, G. filter screen, NOTE: The cabinet exhaust needs to be connected to the building exhaust system



## Poziom bezpieczeństwa wymagany przy pracy z patogenami - przykłady

### Poziom A: BSL-2

Praca z patogenami (jeśli nie istnieje niebezpieczeństwo powstawania aerozolu): *C. botulinum*, *C. diphtheriae*, *M. leprae*, *V. cholerae*, *Salmonella*, wirus Denga, wirus zapalenia wątroby typu A, grypy, wścieklizny, wirus HIV, wirus polio

Jedynie diagnostyka (materiał kliniczny): *Coxiella burnetti* i inne riketsje, węglik, tularemia, gruźlica, dżuma

### Poziom B: BSL-2 + procedury BSL-3

*B. anthracis*, *C. botulinum*, *Y. pestis*, wirus zapalenia wątroby typu B, wirus Hanta

### Poziom C: BSL-3

*Coxiella burnetti* i inne riketsje, *F. tularensis*, *M. tuberculosis*, *M. bovis*  
wirus gorączki Rift, wenezuelskie końskie zapalenie mózgu, żółta febra, wirus zachodniego Nilu

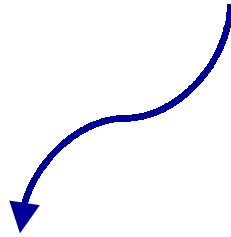
### Poziom D: procedury BSL-4

wirusy: ospa, Marburg, Ebola, Junin, Krym-Kongo, Omsk, Lassa, Machupo, Sabia

wirus polio po zaprzestaniu szczepień

# Diagnostyka

Lekarz: objawy choroby, pobiera materiał kliniczny



Laboratorium diagnostyczne:

Metody  
„klasyczne”

Metody biologii  
molekularnej

Izolacja czynnika  
etiologicznego

- izolacja nie zawsze jest możliwa
- lub jest niewskazana w warunkach standardowego laboratorium klinicznego (wysokie ryzyko zakażeń)

**barwienie Grama lub inne  
testy biochemiczne,  
serologiczne, hemoliza,  
ruchliwość, antybiogram**

**Pośrednio wykrywają obecność  
czynnika etiologicznego**

- wykrywają obecność antygeny
- wykrywają obecność swoistych sekwencji DNA
- szukają genetycznego wzoru patogenu

**Umożliwiają badanie  
retrospektywne - odwołują się do  
„pamięci immunologicznej”  
organizmu**

- wykrywają obecność swoistych przeciwciał

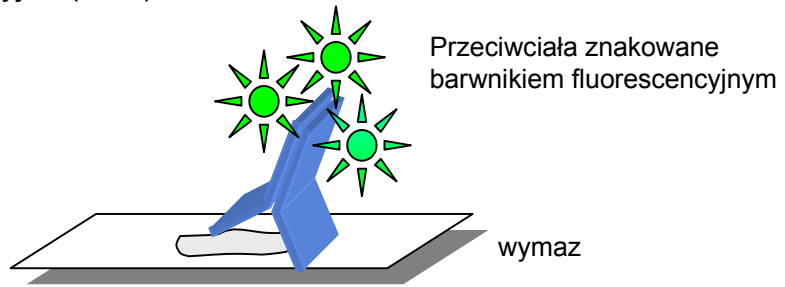




# Techniki wykrywające antygen

w surowicy (pobiera się krew) lub w wydzielinach

- testy immunofluorescencyjne (DFA)



Zasada działania testu DFA

- test ELISA: sandwich ELISA

in situ:

(w tkankach, pobiera się biopsję)

- test immunofluorescencyjny

- test immunoenzymatyczny

Przygotowanie ultracienkich skrawków



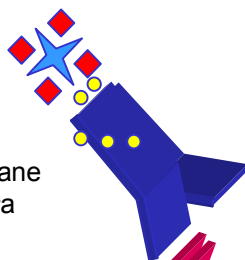
Utrwalanie



Immunodetekcja:

Streptawidyna  
- Peroksydaza

Biotynylowane przeciwciała



Przeciwciała monoklonalne  
lub poliklonalne

Badany skrawek tkanki

Widoczny pod  
mikroskopem

kolorowy precipitat

np.

AEC

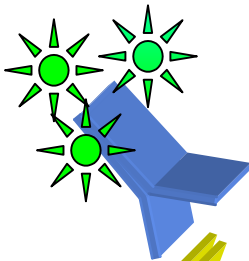
CZERWONY  
KOLOR

# Techniki wykrywające swoiste przeciwciała

## test IFA

immunofluorescencji pośredniej

Przeciwciała znakowane barwnikiem fluorescencyjnym

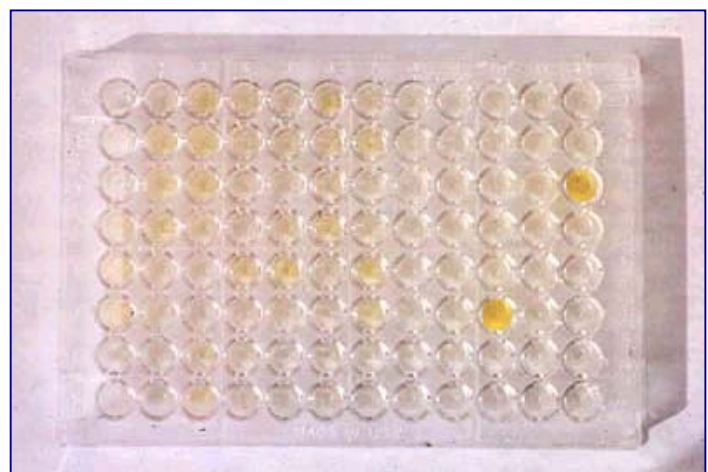
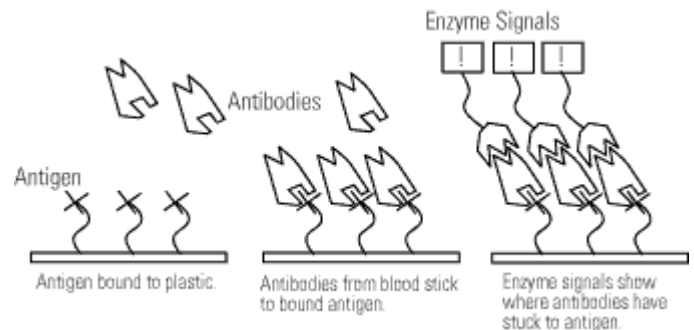
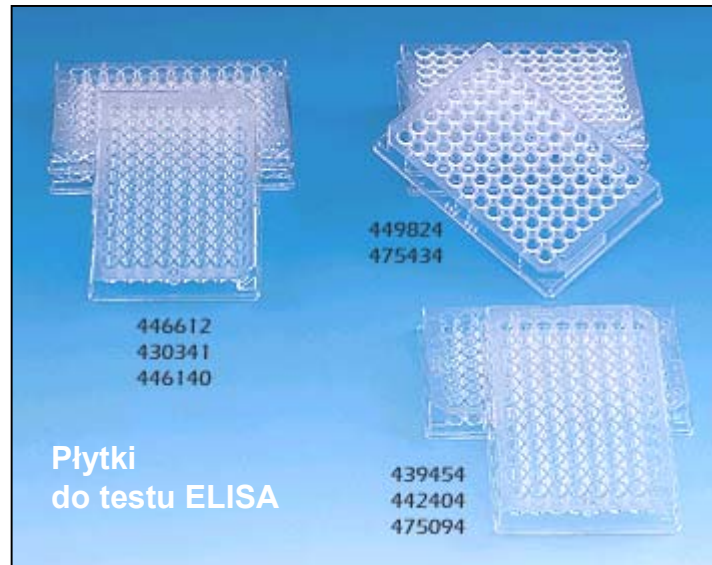


Swoiste przeciwciała obecne w surowicy



Preparat bakterii

## test ELISA



Wynik odczytuje spektrofotometr

# Techniki związane z analizą DNA

- pozwalają oznaczyć mikroorganizm do gatunku

np. na podstawie analizy genu kodującego 16S r RNA

można zidentyfikować: *C. burnetti*, *F. tularensis*;

nie można: *Y. pestis*, *B. Anthracis*

- pozwalają określić wyspy patogenności

- pozwalają określić lekooporność

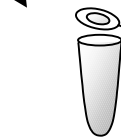
- pozwalają stwierdzić, czy dane szczepy pochodzą z tego samego źródła tj. czy są identyczne - analiza polimorfizmu

- wykorzystują:

amplifikacja określonych fragmentów DNA, hybrydyzacja

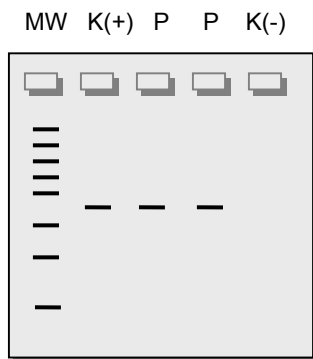
# Standardowa łańcuchowa reakcja polimerazy DNA

- Matryca DNA (z próbki klinicznej)
- + bufor
- + primery
- + mieszanina trójfosforanów nukleotydów
- + enzym:  
termostabilna polimeraza DNA

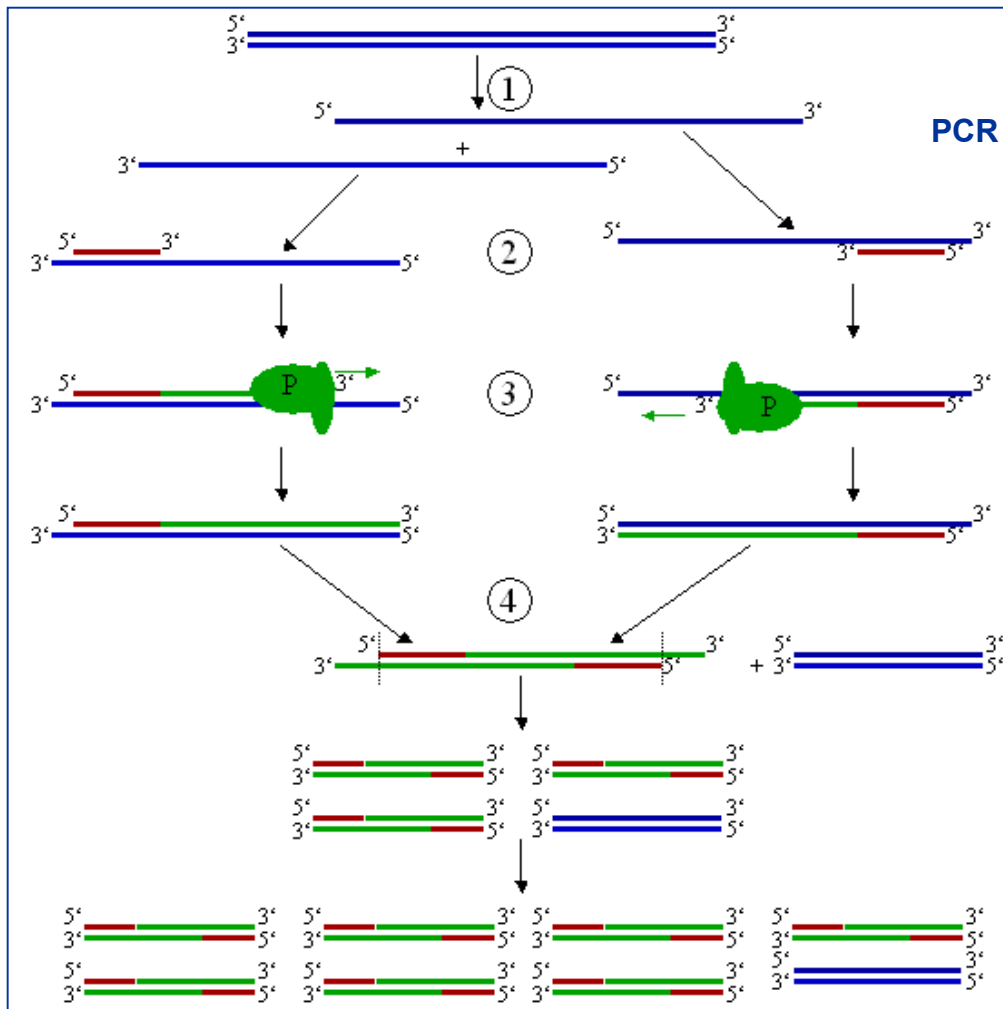


Przeprowadzamy PCR

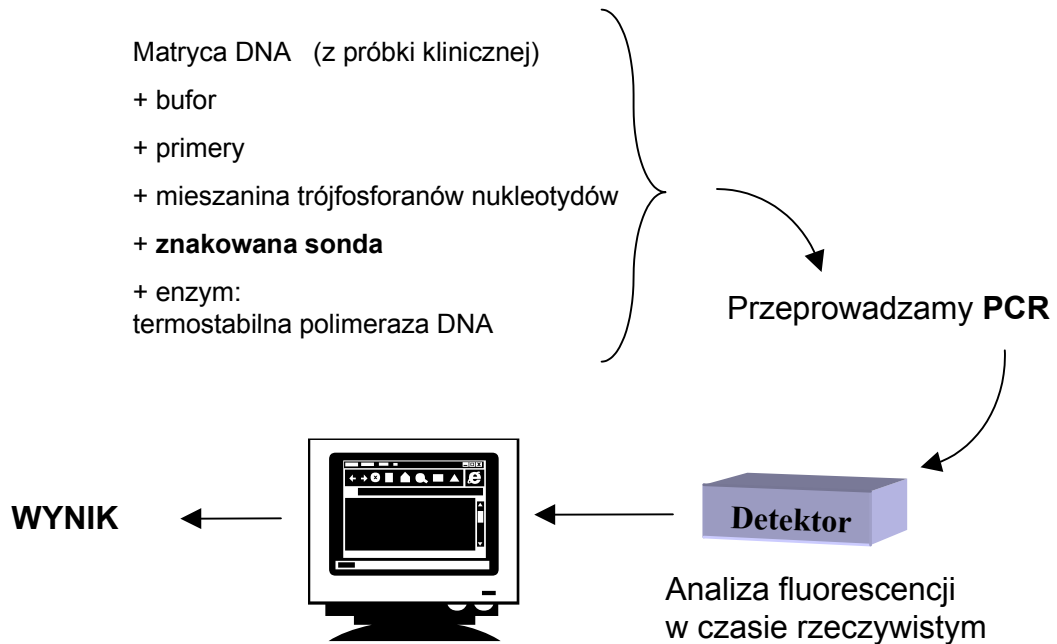
**Elektroforeza**  
zamplifikowanych  
fragmentów w żelu  
agarozowym



**WYNIK**



# Real-time PCR

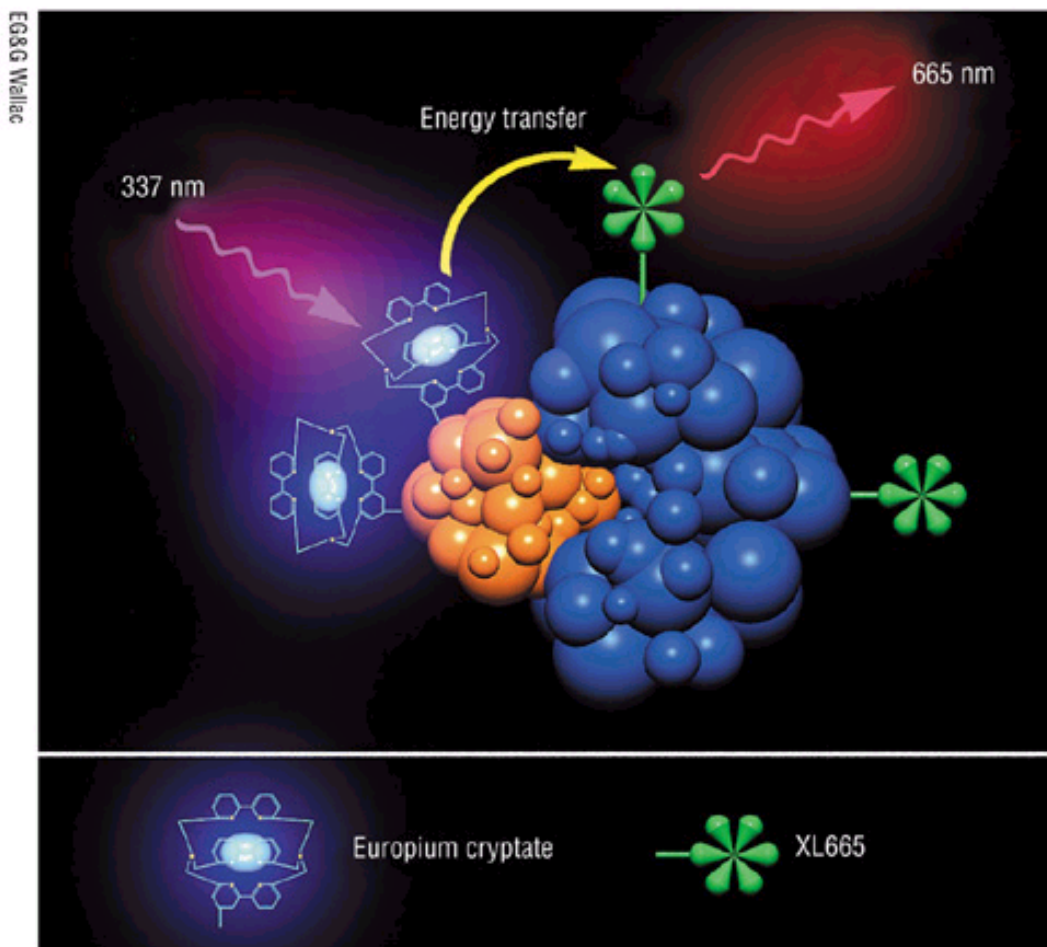


## TaqMan

wykorzystuje:

- aktywność egzonukleolityczną 5'-3' polimerazy Taq
- zjawisko fluorescencji: wzbudzony barwnik - fluorofor - emituje światło o określonej długości fali
- zjawisko wygaszania fluorescencji: substancja - wygaszacz-pochłania emitowane fale świetlne, jeśli znajdzie się w bliskiej odległości od fluorochromu ok. 10 do 100 Angströmów.
- zjawisko rezonansowego przenoszenia energii fluorescencji (FRET)

# FLUORESCENCYJNY REZONANS ENERGETYCZNY (FRET)



*Modern Drug Discovery*, 1999, 2(3), 61, 63-64, 66, 68, 71.  
Copyright © 1999 by the American Chemical Society.

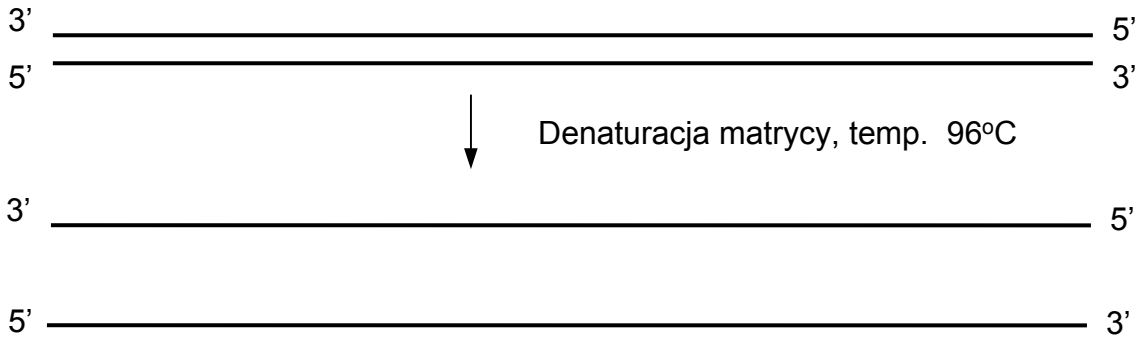
<http://pubs.acs.org/hotartcl/mdd/99/jun/wedin.html>

**Zjawisko rezonansowego przenoszenia energii fluorescencji ze wzbudzonego fluorofora (donor) na drugi fluorofor (akceptor), znajdujący się w odpowiednio bliskiej odległości (1-10 nm), który emituje światło fluorescencyjne.**

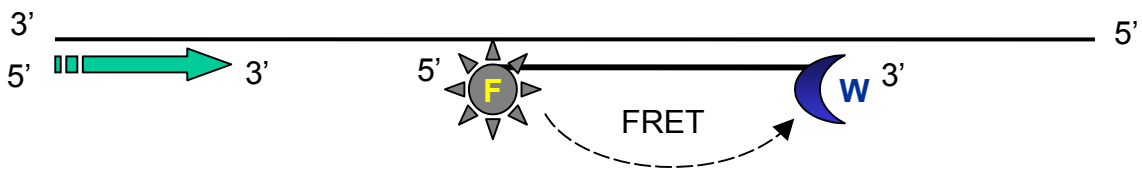
**FRET można wykorzystać do badania interakcji pomiędzy cząsteczkami biologicznymi znakowanymi odpowiednimi fluoroforami. Związanie się cząsteczek wywołuje emisję światła.**

np. wiązanie przeciwciał z antygenem, podjednostek czynników transkrypcyjnych z DNA, śledzenie tworzenia się/dysocjacji kompleksów białek w komórkach (mikroskopia)

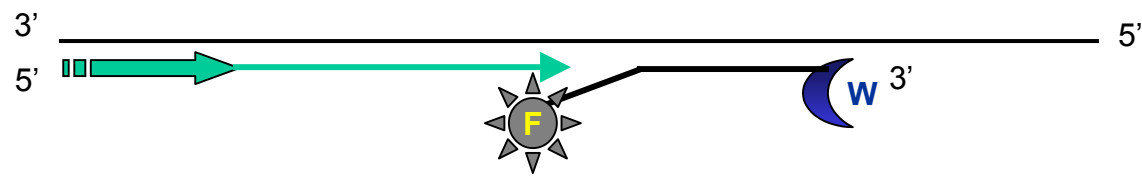
# TaqMan



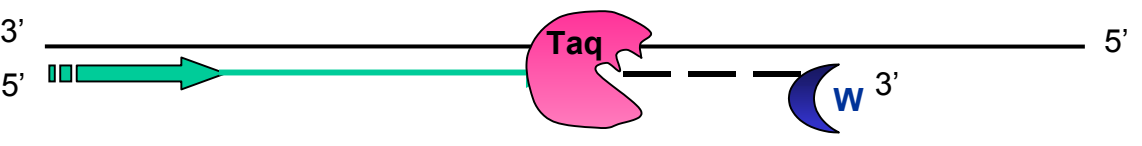
Przyłączenie primerów i sondy znakowanej barwnikiem fluorescencyjnymi i wygaszaczem.  
Bliskość wygaszacza sprawia, że energia emitowana przez barwnik jest pochłaniana



Polimeryzacja  
zawsze 5' → 3'



Polimeraza Taq odcina fragment sondy z flourochromem.  
Emitowane fale świetlne są wykrywane przez detektor.



Mierzona fluorescencja jest wprost proporcjonalna do ilości powstałego produktu PCR

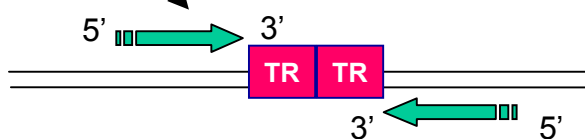
istnieje wiele odmian oraz zastosowań PCR

- nested PCR
- multiplex PCR
- Multiple-Locus-Variable number tandem repeat Analysis (MLVA) - użyta do analizy węglik.

### Variable Number Tandem Repeats - VNTR

konserwatywna sekwencja flankująca

**Wielokrotne tandemowe powtórzenia**  
ok. 10 do 90 p.z.



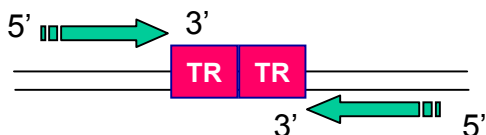
#### Szczep A



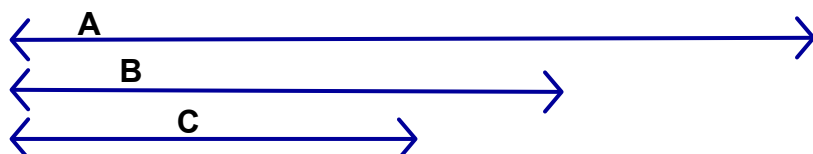
#### Szczep B



#### Szczep C



Powstają fragmenty o różnej długości



MW A B C K(-)

