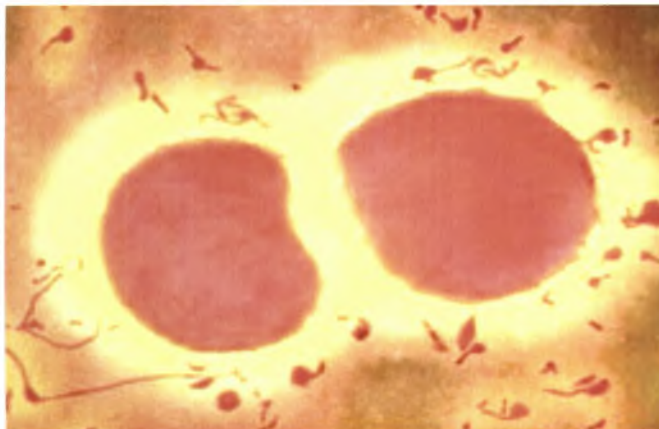


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**« ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΟΡΟΟΜΑΔΩΝ
ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *NEISSERIA MENINGITIDIS* ΣΕ
ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ »**



ΔΡΑΚΟΠΟΥΛΟΥ ΖΑΧΑΡΟΥΛΑ

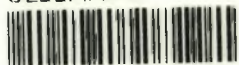
ΛΑΡΙΣΑ 2007



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 5424/1
Ημερ. Εισ.: 26-03-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2007
ΔΡΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087327

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η πτυχιακή εργασία με τίτλο « Ταυτόχρονη ανίχνευση ορομάδων μηνιγγιτιδόκοκκου σε βιολογικά υλικά » πραγματοποιήθηκε στην **Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας** και ειδικότερα, στο **Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας (Ε. Κ. Α. Μ.)**.

Υπεύθυνος καθηγητής: **Μαρκουλάτος Παναγιώτης**

Μέλη τριμελούς επιτροπής: **Π. Μαρκουλάτος**
Ζ. Μαμούρης
Τ. Τζανακάκη

Ημερομηνία κατάθεσης πτυχιακής εργασίας: **22 Ιουνίου 2007**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή μου, κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη, για την ανάθεση και την επίβλεψη της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

Ευχαριστώ πολύ την κ. Τζένη Κουρέα-Κρεμαστινού, Καθηγήτρια της Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας για την δυνατότητα που μου παρείχε να εργασθώ στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας, με σκοπό να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου εργασία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Τζανακάκη Τζωρτζίνα, Επιστημονική Υπεύθυνη του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Μηνιγγίτιδας της Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας, για την επίβλεψη και την πολύτιμη καθοδήγηση που μου παρείχε κατά την διάρκεια πραγματοποίησης της εργασίας μου.

Ευχαριστώ θερμά τις τεχνολόγους του εργαστηρίου, Ταμπάκη Αλεξάνδρα, Καραγιάννη Ελένη, Σιουμάλα Μαρία, τον βιολόγο Κεσανόπουλο Κωνσταντίνο, την βιοχημικό Ξηρογιάννη Αθανασία και την Καζάνη Γιούλη για την εξαιρετική βοήθειά τους, η οποία συντέλεσε σημαντικά στην ολοκλήρωση του πειραματικού μέρους. Τέλος, τους ευχαριστώ για την θερμή φιλοξενία στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας, για την ευγένεια με την οποία με αντιμετώπισαν, καθώς και για την αρμονική και δημιουργική συνεργασία μας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1. Μηνιγγίτιδα	6
2. Μηνιγγιτιδοκοκκική νόσος	7
3. Ιστορική αναδρομή της μηνιγγιτιδοκοκκικής λοίμωξης	8
4. Χαρακτηριστικά της <i>N. Meningitidis</i>	9
4.1. Μορφολογία	9
4.2. Καλλιέργεια	9
4.3. Βιοχημικές ιδιότητες	10
4.4. Ανθεκτικότητα	10
5. Αντιγονική δομή του μηνιγγιτιδόκοκκου και ταξινόμηση	11
5.1. Πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης (OMPs)	12
5.2. Λιποολιγοσακχαρίτες (LOS)	13
5.3. Πολυσακχαριδικό έλυτρο (CPS)	13
6. Διάγνωση μηνιγγιτιδοκοκκικής λοίμωξης με συμβατικές τεχνικές	15
6.1. Οσφυονωτιαία παρακέντηση	15
6.2. Μακροσκοπική εξέταση	15
6.3. Μικροσκοπική εξέταση	15
6.4. Καλλιέργεια	15
6.5. Ζύμωση των σακχάρων	16
6.6. Οροδιάγνωση	16
6.7. Οροτυπική ταυτοποίηση	16
6.8. Έλεγχος της ευαισθησίας σε αντιβιοτικά	17
7. Θεραπεία	18
8. Πρόληψη	19
8.1. Χημειοπροφύλαξη	19
8.2. Εμβολιασμός	19
9. Διάγνωση μηνιγγιτιδοκοκκικής λοίμωξης με μοριακές τεχνικές	21
10. Σκοπός της εργασίας	23

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	24
1. Δείγματα ασθενών	25
2. Μηνιγγιτιδοκοκκικά στελέχη	25
2.1. Καλλιέργεια μηνιγγιτιδοκοκκικών στελεχών	25
2.2. Φύλαξη στελεχών μηνιγγιτιδόκοκκου	26
3. Απομόνωση DNA	27
3.1. Απομόνωση του DNA από στελέχη μηνιγγιτιδόκοκκου	27
3.2. Απομόνωση του DNA από εγκεφαλονωτιαίο υγρό	27
3.3. Απομόνωση του DNA από ολικό αίμα	28
4. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης	30
4.1. Αντιδραστήρια	30
4.2. Εκκινητές	30
4.3. Πρωτόκολλο της PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των οροομάδων A, B, C, W135, Y	31
4.4. Θετικός και αρνητικός μάρτυρας	32
4.5. Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή για την τετραπλή PCR	33
5. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR	34
5.1. Αντιδραστήρια	34
5.2. Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης	35
5.3. Ενοφθαλμισμός πηκτώματος αγαρόζης	35
5.4. Συνθήκες ηλεκτροφόρησης	35
5.5. Ανάγνωση αποτελεσμάτων	36
6. Πειραματικά στάδια για την ανάπτυξη της τετραπλής PCR	37
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	49
1. Αναλυτικά αποτελέσματα των πειραματικών σταδίων 1-19	50
2. Τελικά αποτελέσματα	64
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	67
Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	71

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Μηνιγγίτιδα

Ως μηνιγγίτιδα ορίζεται η φλεγμονή των μηνίγγων του εγκεφάλου. Πρόκειται για μία νόσο που απασχολεί διεθνώς την επιστημονική κοινότητα, διότι μπορεί να προκαλέσει τον θάνατο μέσα σε λίγες ώρες από την έναρξη των συμπτωμάτων. Τα τελευταία περιλαμβάνουν έντονη κεφαλαλγία, πυρετό, ναυτία, εμετό, φωτοφοβία και δυσκαμψία του αυχένα. Είναι δυνατό, επίσης, να αναγνωριστούν νευρολογικά συμπτώματα, όπως, λήθαργος, παραλήρημα, κώμα ή/και σπασμοί. Συνήθως, οι ασθενείς εμφανίζουν τουλάχιστον δύο από τα συμπτώματα, ενώ τα βρέφη μπορεί να μην εκδηλώσουν κανένα από αυτά (Τζένη Κουρέα Κρεμαστινού, 1996), (Lambert HP, 1991), (Diederik van de Beek, 2006).

Η μηνιγγίτιδα μπορεί να προκληθεί από διάφορους μικροοργανισμούς, είτε από βακτήρια είτε από ιούς. Όταν προκαλείται από ιούς ονομάζεται **ιογενής** και αποτελεί την πιο συχνή μορφή μηνιγγίτιδας, η οποία είναι σπανίως σοβαρή και δεν αντιμετωπίζεται με αντιβιοτικά. Κύρια αιτία της ιογενούς μηνιγγίτιδας είναι οι εντεροϊοί, ενώ συχνά ενοχοποιούνται οι ιοί της παρωτίτιδας και οι ερπητοϊοί .

Η μηνιγγίτιδα που προκαλείται από βακτήρια ονομάζεται **βακτηριακή**, είναι λιγότερο συχνή, αλλά περισσότερο σοβαρή και απαιτεί άμεση θεραπεία με αντιβιοτικά. Οι μικροοργανισμοί *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* και *Haemophilus influenzae* αποτελούν τα βασικότερα βακτήρια, που ευθύνονται για το 90% των περιπτώσεων βακτηριακής μηνιγγίτιδας (G. Tzanakaki, 2005). Άλλα βακτήρια που προκαλούν τη νόσο είναι η *Listeria monocytogenes*, στρεπτόκοκκοι, σταφυλόκοκκοι και Gram αρνητικά βακτήρια (κυρίως *Escherichia coli*).

2. Μηνιγγιτιδοκοκκική νόσος

Ο μικροοργανισμός *N.meningitidis* είναι υπεύθυνος για το 70% των περιστατικών βακτηριακής μηνιγγίτιδας. Τα κλινικά σύνδρομα που προκαλούνται, εκτός της μηνιγγίτιδας, είναι πολλά και περιλαμβάνουν λανθάνουσα μικροβαιμία (χωρίς σηπτικό σοκ), μηνιγγοκοκκαιμία (μηνιγγοκοκκική σηψαιμία), μηνιγγοεγκεφαλίτιδα, πνευμονία και σηπτική αρθρίτιδα (Lee H. Harisson, 2006). Τα συμπτώματα διαφέρουν μεταξύ αυτών, όπως για παράδειγμα στην σηψαιμία, όπου χαρακτηριστική είναι η εμφάνιση πορφυρικού εξανθήματος εντοπισμένου ή διάσπαρτου σε όλο το σώμα (Τζένη Κουρέα Κρεμαστινού, 1996), (Εικόνα 1). Η τελευταία, αποτελεί το πιο θνησιγόνο μηνιγγιτιδοκοκκικό σύνδρομο. Ωστόσο, όσοι επιβιώνουν συχνά αποκτούν μόνιμες βλάβες (Lee H. Harisson, 2006).

Παρά τις πρόσφατες προόδους στην κατανόηση της παθογένειας και της ανοσολογίας του μηνιγγιτιδοκοκκου, καθώς και στην παραγωγή αποτελεσματικών εμβολίων έναντι ορισμένων οροομάδων του μικροβίου, η νόσος εξακολουθεί να αποτελεί διεθνώς σημαντικό πρόβλημα στη δημόσια υγεία (Τζένη Κουρέα Κρεμαστινού, 1996).

Εικόνα 1. Μηνιγγιτιδοκοκκικό πορφυρικό εξάνθημα



3. Ιστορική αναδρομή της μηνιγγιτιδοκοκκικής λοίμωξης

Η μηνιγγίτιδα περιγράφεται για πρώτη φορά αιώνες πριν, στην εποχή του Ιπποκράτη, ο οποίος αναφέρει στο βιβλίο του «Η Νούσος» τον «Πυρετό του ΚΝΣ». Ως κλινική οντότητα, η βακτηριακή μηνιγγίτιδα, αναγνωρίστηκε κατά τη διάρκεια της επιδημίας την άνοιξη του 1806 στη Βιέννη, από τον Gaspard Vieusseux (Vieusseux G., 1806). Το κλινικό σύνδρομο της νόσου, όμως, είχε περιγραφεί και νωρίτερα από τους Elias Mann και Lothario Danielson σε μία μικρή πόλη της Μασσαχουσέτης το 1804 (Daniels L., 1806).

Η αναγνώριση του αιτιολογικού παράγοντα της βακτηριακής μηνιγγίτιδας έγινε πολύ αργότερα από τον Weichseilbaum το 1887 (Branham SE, 1956), ο οποίος έδωσε στο βακτήριο το όνομα *Diplococcus intracellularis*, επειδή οι κόκκοι εντοπιζόνταν μέσα στα λευκοκύτταρα. Αργότερα, ο μικροοργανισμός εμφανίζεται με διάφορες ονομασίες, όπως *Neisseria intracellularis*, η οποία επινοήθηκε από την Αμερικανική Εταιρεία Βακτηριολογίας το 1962. Ο όρος που επικράτησε και χρησιμοποιείται έως σήμερα είναι *Neisseria meningitidis*.

Στις αρχές του εικοστού αιώνα ανακαλύφθηκε ότι υγιή άτομα μπορούν να είναι φορείς του μηνιγγιτιδόκοκκου. Τα ευρήματα αυτά βοήθησαν στην κατανόηση των επιδημιών που είχαν εκδηλωθεί σε στρατόπεδα νεοσύλλεκτων, όπου συσχετίστηκαν οι επιδημίες με την αυξημένη συχνότητα φορείας σε κλειστούς πληθυσμούς.

Το 1915 προτάθηκε το πρώτο μοντέλο για τις οροομάδες, σύμφωνα με το οποίο τα βακτήρια διακρίνονταν σε τύπους I-IV (Gordon, 1915). Το 1950 υιοθετήθηκε το σύστημα που χρησιμοποιούσε γράμματα αντί για αριθμούς και ταξινομούσε τα βακτήρια σε οροομάδες A, B, C και D. Το τελευταίο εφαρμόζεται και σήμερα, έχοντας αναγνωρίσει πλέον 13 οροομάδες, οι A, B, C, W135, X, Y και Z (περισσότερο γνωστές) και οι H, I, K, L, 29E, D (λιγότερο γνωστές και συναντώνται σπάνια στα μηνιγγιτιδοκοκκικά στελέχη).

Η χρήση αντιβιοτικών ξεκίνησε το 1937 με τη χρήση της σουλφοναμίδης ως μέσο χημειοπροφύλαξης, η οποία μείωσε σημαντικά την φορεία. Λίγα χρόνια αργότερα, κατά την περίοδο 1941-43 αναγνωρίστηκαν τα πρώτα ανθεκτικά στη σουλφοναμίδα στελέχη μηνιγγιτιδόκοκκου. Με την επακόλουθη εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών σε παγκόσμια κλίμακα και την έλλειψη αποτελεσματικής

χημειοπροφύλαξης, ξεκίνησε η έρευνα για την παρασκευή εμβολίων κατά των ορομαδών A, C, Y, W-135.

Τον εικοστό αιώνα καταγράφηκαν πολλές επιδημίες, όπως η ενδημική μηνιγγίτιδα στην Αφρικανική Ήπειρο, η οποία περιγράφηκε από τον G. William στις Δυτικές ακτές της Αφρικής και έκτοτε περιγράφεται συνέχεια (Lapeyssonie L., 1963). Μέχρι σήμερα έχουν ενοχοποιηθεί για επιδημίες οι ορομάδες A, B και C.

4. Χαρακτηριστικά της *N. Meningitidis*

4.1. Μορφολογία

Το βακτήριο *N.meningitidis* είναι ένας αρνητικός κατά Gram διπλόκοκκος διαστάσεων 0,6x0,8 μm. Οι κόκκοι είναι καφεοειδείς με τις κοίλες επιφάνειες αντικρυστές. Είναι ακίνητοι, ασπορογόνοι, συχνά φέρουν έλυτρο και αρκετά στελέχη μία ή περισσότερες βλεφαρίδες. Όλα τα στελέχη φέρουν ινίδια. Είναι αερόβιος μικροοργανισμός, επιρρεπής σε αυτόλυση, και για τον λόγο αυτό μπορεί να παρατηρηθεί σημαντική ποικιλία μεγέθους και σχήματος των κυττάρων σε παλαιότερες καλλιέργειες. Σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα αναπτύσσει διαφανείς αποικίες διαμέτρου 1-5 mm, δεν προκαλεί αιμόλυση και δεν παράγει χρωστική. Οι αποικίες έχουν κυρτό σχήμα, η παρουσία δε μεγάλης ποσότητας πολυσακχαρίτη στο θρεπτικό μέσο ενθαρρύνει την εμφάνιση βλενωδούς μακροσκοπικής μορφολογίας.

4.2. Καλλιέργεια

Άριστες συνθήκες για την ανάπτυξη του μηνιγγιτιδόκοκκου επιτυγχάνονται σε περιβάλλον με αυξημένη υγρασία, θερμοκρασία 35-37°C και παρουσία 5-10% CO₂. Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργειά του είναι το αιματούχο και σοκολατόχρωμο άγαρ, Levinthal άγαρ (βρασμένο αιματούχο άγαρ), άγαρ ή ζυμός τρυπτικάσης και σόγιας, Muller Hinton άγαρ ή

ζωμός. Στο αιματούχο άγαρ οι αποικίες του εμφανίζονται σε μεγαλύτερο σχήμα, είναι γυαλιστερές, γκριζωπές και με διάμετρο περίπου 1 mm.

4.3. Βιοχημικές ιδιότητες

Η *N. meningitidis* είναι θετική στις δοκιμές οξειδάσης και καταλάσης. Προκαλεί ζυμώσεις στη γλυκόζη και τη μαλτόζη, όχι όμως στη λακτόζη, τη σουκρόζη και τη φρουκτόζη. Δεν παράγει υδρόθειο και ινδόλη (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Ταυτοποίηση του μικροοργανισμού *N. meningitidis*.

	G	M	S	L	F
<i>N.gonorrhoeae</i>	+	-	-	-	-
<i>N.meningitidis</i>	+	+	-	-	-
<i>N.lactamica</i>	+	+	-	+	-
<i>N.subflava</i>	+	+	-	-	+
<i>N.perflava</i>	+	+	+	-	+
<i>N.sicca</i>	+	+	+	-	+
<i>N.flavescens</i>	*	*	-	-	-
<i>Brahamella</i> <i>catarrhalis</i>	-	-	-	-	-

G=Γλυκόζη, M=Μαλτόζη, S=Σουκρόζη, L= Λακτόζη, F=Φρουκτόζη.

*Μπορεί να εμφανιστούν θετικά μετά από συνεχείς ανακαλλιέργειες.
(Μέθοδος Gallerie Pasteur)

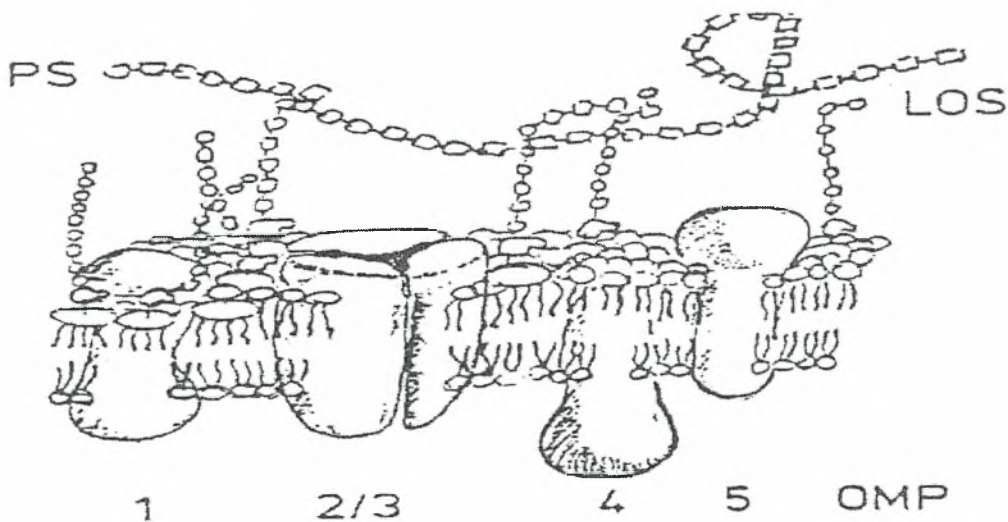
4.4. Ανθεκτικότητα

Ο μηνιγγιτιδόκοκκος είναι ένα πολύ ευπαθές μικρόβιο. Καταστρέφεται ταχύτατα εκτός του οργανισμού. Είναι πολύ ευαίσθητο στην ξηρασία, στο ηλιακό φως, στην θερμότητα και σε όλα σχεδόν τα αντισηπτικά.

5. Αντιγονική δομή του μηνιγγιτιδόκοκκου και ταξινόμηση

Η *N.meningitidis* είναι ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο, το οποίο περιβάλλεται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη, την πεπτιδογλυκάνη και την εξωτερική μεμβράνη (μεμβράνη κυτταρικού τοιχώματος). Η πεπτιδογλυκάνη βρίσκεται ανάμεσα στις δύο μεμβράνες και αποτελεί το 5-10% του ξηρού βάρους του κυτταρικού τοιχώματος. Η εξωτερική μεμβράνη αποτελείται από πρωτεΐνες (Outer Membrane Proteins-OMP) και λιποπολυσακχαρίτες (LPS), οι οποίοι είναι γνωστοί ως ενδοτοξίνες και ενοχοποιούνται για το τοξικό σοκ. Το όνομα των τελευταίων άλλαξε σε λιποολιγοσακχαρίτες (LOS), (Εικόνα 2).

Εικόνα 2. Σχηματική παράσταση της δομής της εξωτερικής μεμβράνης



Πολλά στελέχη μηνιγγιτιδόκοκκου περιβάλλονται από πολυσακχαριδικό έλυτρο (CPS) και φέρουν στην επιφάνειά τους ινίδια. Τα επιφανειακά ινίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση του μικροοργανισμού στον βλεννογόνο του ρινοφάρυγγα. Η ύπαρξη του ελύτρου καθιστά το βακτήριο ιδιαίτερα ανθεκτικό στους ανοσολογικούς μηχανισμούς του ξενιστή, γεγονός που επιτρέπει την επιβίωσή του στην κυκλοφορία και αυξάνει τη λοιμογόνο ικανότητά του.

5.1. Πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης (OMPs)

Οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης ταξινομούνται σε πέντε τάξεις ανάλογα με το μοριακό τους βάρος (Πίνακας 2). Η εξωτερική μεμβράνη του μηνιγγιτιδόκοκκου περιέχει από 2 έως 5 κύριες πρωτεΐνες, οι οποίες αναδείχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμίδης (Van der Ley, 1991). Κάθε μηνιγγιτιδοκοκκικό στέλεχος περιλαμβάνει είτε την τάξη 2 είτε την τάξη 3 των OMPs. Η τάξη 1 εμφανίζει ποσοτική ποικιλομορφία και δεν εκφράζεται σε όλα τα στελέχη, ενώ η τάξη 5 παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια. Οι τάξεις 1, 2, 3 και 5 κατανέμονται στην επιφάνεια του μηνιγγιτιδόκοκκου. Η τάξη 4 είναι κοινή για όλα τα στελέχη και δεν εντοπίζεται στην επιφάνεια του οργανισμού.

Οι τάξεις 2 και 3 των πρωτεϊνών έχουν μεταβλητές υδρόφιλες περιοχές, που εκφράζουν τον ορότυπο (Frasch, 1976). Η τάξη 2 των OMPs διαχωρίζει τα μηνιγγιτιδικά στελέχη στους ορότυπους 1, 2a, 2b και η τάξη 3 σε ορότυπους 4, 14, 15, 16.

Η τάξη 1 των OMPs έχει βρεθεί ότι περιλαμβάνει δύο μεταβλητές περιοχές, τη μεταβλητή περιοχή 1 (VR1) και τη μεταβλητή περιοχή 2 (VR2). Κάθε μία από αυτές διαχωρίζει τα μηνιγγιτιδοκοκκικά στελέχη σε συγκεκριμένους υπότυπους. Οι τελευταίοι δηλώνονται με αραβικό αριθμό που ακολουθεί το πρόθεμα -P-. Η μεταβλητή περιοχή 1 (VR1) καθορίζει τους υπότυπους P1.5, P1.7 και P1.12, ενώ η μεταβλητή περιοχή 2 (VR2) τους υπότυπους P1.1, P1.2, P1.3, P1.4, P1.6, P1.9, P1.10, P1.14, P1.15, P1.16 (Van der Ley, 1991).

Πίνακας 2. Κύριες τάξεις επιφανειακών πρωτεϊνών της *N.meningitidis*

Τάξη πρωτεΐνης	Μοριακό Βάρος
1	44.000-47.000
2	40.000-42.000
3	37.000-39.000
4	33.000-34.000
5	26.000-30.000

5.2. Λιποολιγοσακχαρίτες (LOS)

Η μοριακή ποικιλομορφία των LOS αποτελεί την βάση για την ταξινόμηση των μηνιγγιτιδόκοκκων σε 11 **ανοσολογικούς τύπους**, (L1-L11). Ωστόσο, η ανοσολογική τυποποίηση με βάση τους λιποολιγοσακχαρίτες συχνά παραλείπεται από την φαινοτυπική περιγραφή των στελεχών, πιθανόν λόγω της πολυπλοκότητας των μεθόδων τυποποίησης και γιατί δεν υπάρχουν ακόμα αρκετά διαθέσιμα αντισώματα. Επιπλέον, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων ανοσοτυποποίησης είναι δύσκολη, διότι τα μηνιγγιτιδοκοκκικά στελέχη συχνά εκφράζουν διάφορους ανοσολογικούς τύπους και η έκφρασή τους μπορεί να επηρεαστεί από τις συνθήκες ανάπτυξης του μικροοργανισμού (Poolman, 1983).

5.3. Πολυσακχαριδικό έλυτρο (CPS)

Τα πολυσακχαριδικά αντιγόνα του ελύτρου αποτέλεσαν τη βάση για τον διαχωρισμό των μηνιγγιτιδόκοκκων σε **οροομάδες**. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί 13 οροομάδες, οι οποίες συμβολίζονται με κεφαλαία γράμματα του λατινικού αλφαβήτου και είναι οι εξής: A, B, C, Y, W-135, X, H, I, K, L, Z, 29E και D. Από αυτές οι A, B και C αποτελούν το 90% των απομονωθέντων στελεχών από ασθενείς, με την οροομάδα B να αποτελεί πλέον το 50-70% των περιστατικών. Οι οροομάδες H, I, K και L είναι σπάνιες και δεν έχουν απομονωθεί από ασθενείς (Lambert HP, 1991).

Τα στελέχη που απομονώνονται από ασθενείς έχουν έλυτρο, το οποίο αποτελείται από υψηλού μοριακού βάρους πολυσακχαρίτες (Πίνακας 3). Αντίθετα, τα στελέχη χωρίς έλυτρο σπάνια προκαλούν νόσο και απομονώνονται συχνά από ασυμπτωματικούς φορείς (Lee H. Harisson, 2006), (Claus, 2002). Όλα τα πολυσακχαριδικά έλυτρα (CPS) με μοριακό βάρος 100 kDa και άνω είναι ισχυρά ανοσογόνα, με εξαίρεση αυτό της οροομάδας B , που έχει μικρή ανοσογόνο δράση. Επίσης, η δομή του πολυσακχαριδικού αντιγόνου B εμφανίζει πολλές ομοιότητες με αυτή του *Escherichia coli* K1, μικροοργανισμού που ευθύνεται για πολλά περιστατικά νεογνικής μηνιγγίτιδας, υποθέτοντας έτσι την ύπαρξη ενός κοινού μηχανισμού υπεύθυνου για την μικρή ανοσογόνο δράση τους (Kasper, 1973).

Πίνακας 3. Χημική σύσταση ελύτρου στις οροομάδες A, B, C, W-135 του μηνιγγιτιδόκοκκου

Οροομάδα	Σύσταση ελύτρου
A	N-ακετυλο-D-μανοζαμινο-1-φωσφορικό
B	N-ακετυλο-νευραμινικό οξύ
C	N-ακετυλο-ο-ακετυλο-νευραμινικό οξύ
Y	N-ακετυλο-ο-ακετυλο-νευραμινικό οξύ
W-135	Γαλακτοζο- N-ακετυλο-νευραμινικό οξύ

6. Διάγνωση μηνιγγιτιδοκοκκικής λοίμωξης με συμβατικές τεχνικές

6.1. Οσφυονωτιαία παρακέντηση

Είναι απαραίτητη προκειμένου να επιβεβαιωθεί η διάγνωση πυώδους μηνιγγίτιδας και πρέπει να γίνει πριν την έναρξη αντιμικροβιακής φαρμακευτικής αγωγής. Ακολουθεί μακροσκοπική και μικροσκοπική εξέταση του **εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY)**.

6.2. Μακροσκοπική εξέταση

Η εικόνα που παρουσιάζει το ENY στη μηνιγγιτιδοκοκκική και γενικότερα στη βακτηριακή μηνιγγίτιδα είναι παθογνωμική, εφόσον αυτό παρουσιάζεται θολερό. Συχνά το ENY είναι διαυγές σε περιπτώσεις μηνιγγίτιδας όταν αυτές είναι ιογενούς αιτιολογίας (Τζένη Κουρέα Κρεμαστινού, 1996).

6.3. Μικροσκοπική εξέταση

Η μικροσκοπική παρατήρηση χρωματισμένου κατά Gram παρασκευάσματος βοηθά στον προσδιορισμό Gram αρνητικών ενδοκυττάρων ή εξωκυττάρων διπλόκοκκων. Στο 80% των δειγμάτων ασθενών, που δεν έχουν προηγουμένως υποβληθεί σε θεραπεία, παρατηρούνται με την χρώση αυτή οι διπλόκοκκοι που αποτελούν τον αιτιολογικό παράγοντα της νόσου (Sperger G, 1992).

6.4. Καλλιέργεια

Η καλλιέργεια σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα αίματος, όπως σε σοκολατόχρωμο ή αιματούχο άγαρ και σε New York City Medium (σε περιπτώσεις φορέας), βοηθά στην απομόνωση και τυποποίηση της *N.meningitidis* (Τζ. Κουρέα Κρεμαστινού, Εργ. Πρωτ.).

6.5. Ζύμωση των σακχάρων (GALLERIE PASTEUR)

Η μέθοδος διαχωρίζει την *N. meningitidis* από τις άλλες Ναισέριες με βάση την ικανότητα ζύμωσης των σακχάρων. Τα σάκχαρα που χρησιμοποιούνται έχουν αναφερθεί παραπάνω (Πίνακας 1). Ο έλεγχος γίνεται με την διαδικασία της οξειδωσης, όπου παρατηρείται αλλαγή χρώματος από κόκκινο σε κίτρινο. Επίσης, εντοπίζεται το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση με την υδρόλυση του ONPG, η οποία διαπιστώνεται με την παρατήρηση κίτρινου χρώματος (Τζ. Κουρέα Κρεμαστινού, Εργ. Πρωτ.).

6.6. Οροδιάγνωση

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση της οροομάδας είναι η συγκόλληση του αντιορού σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Οι οροομάδες που χρησιμοποιούνται είναι οι παρακάτω: A, B, C, D, W- 135, X, Y, Z, Polyvalent A to D, Polyvalent W to Z. Τα πιθανά αποτελέσματα της μεθόδου είναι:

1. στέλεχος θετικό για μία οροομάδα (συγκόλληση θετική),
2. στέλεχος πολυδύναμο, (όταν δίνει θετική συγκόλληση παρουσία όλων των αντιορών),
3. στέλεχος μη τυποποιήσιμο, (όταν δεν δίνει θετική συγκόλληση με κανέναν από τους αντιορούς),
4. στέλεχος αυτοσυγκολλόμενο, (όταν δίνει θετικό αποτέλεσμα συγκόλλησης χωρίς την παρουσία των αντιορών (Τζ. Κουρέα Κρεμαστινού, Εργ. Πρωτ.)).

6.7. Οροτυπική ταυτοποίηση

Η μέθοδος που εφαρμόζεται είναι η whole-cell ELISA. Βασίζεται στη χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων, τα οποία έχουν ειδικότητα προς έναν συγκεκριμένο ορότυπο ή υπότυπο (Τζ. Κουρέα Κρεμαστινού, Εργ. Πρωτ.).

Επομένως, με βάση τα παραπάνω, η περιγραφή των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών του μηνιγγιτιδόκοκκου περιλαμβάνει την **οροομάδα** (βάσει των πολυσακχαριδικών αντιγόνων του ελύτρου), τον **ορότυπο** (βάσει των αντιγονικών διαφορών στις τάξεις 2 και 3 των OMPs), τον **υπότυπο** (βάσει των αντιγονικών διαφορών στην τάξη 1 των OMPs) και τον **ανοσότυπο** (βάσει των LOS). Έτσι, ο φαινότυπος περιγράφεται με την παρακάτω σειρά, οροομάδα: ορότυπος: υπότυπος: ανασότυπος. Για παράδειγμα, B:2b:P1.5,12:L3,7,9.

6.8. Έλεγχος της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Η μέθοδος που ακολουθείται για τον έλεγχο ευαισθησίας του μηνιγγιτιδόκοκκου σε αντιβιοτικά (για τον έλεγχο χημειοπροφύλαξης και χημειοθεραπείας) είναι ο προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (M.I.C.). Η τελευταία προσδιορίζεται με την μέθοδο του E- test (Τζ. Κουρέα Κρεμαστινού, Εργ. Πρωτ.).

7. Θεραπεία

Στα μέσα του περασμένου αιώνα οι Schwentker και συν. απέδειξαν ότι οι **σουλφοναμίδες** θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν επιτυχώς για τη θεραπεία της μηνιγγιτιδοκοκκικής μηνιγγίτιδας και μηνιγγοκοκκαιμίας (Schwentker FF, 1937). Οι Feldman και συν. επιβεβαίωσαν αυτές τις παρατηρήσεις (Feldman HA, 1942), ενώ λίγο αργότερα διαπιστώθηκε ότι οι χαμηλές δόσεις **πενικιλίνης** είχαν ταυτόσημα θεραπευτικά αποτελέσματα με αυτά των σουλφοναμιδών (Bowler, 1994). Ωστόσο, έχουν παρουσιαστεί στελέχη με αντοχή στις σουλφοναμίδες και μειωμένη ευαισθησία στην πενικιλίνη.

Πιστεύεται ότι η **αντοχή** σε αντιβιοτικά προκύπτει από μεταφορά γενετικού υλικού μεταξύ ειδών *Neisseriae*. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η παρουσία πρωτεΐνης εξωτερικής μεμβράνης τάξης 2 σε ευαίσθητα στην πενικιλίνη στελέχη *N.cinerea*. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη 2 των ευαίσθητων στελεχών *N.cinerea* διαφέρει κατά ένα μόνο κωδικόνιο από αυτό των ανθεκτικών στελεχών *N.meningitidis* (Bowler, 1994). Επίσης, η γενετική ανάλυση μηνιγγιτιδοκοκκικών στελεχών έχει δείξει ότι η ευαισθησία στις σουλφοναμίδες ρυθμίζεται από το χρωμοσωμικό γονίδιο διϋδροπτεροϊκής συνθετάσης (*dhps*), που κωδικοποιεί τη σύνθεση του ενζύμου-στόχου για τις σουλφοναμίδες. Η αντοχή στις σουλφοναμίδες προσδιορίζεται από τις διαφορές νουκλεοτιδίων στα γονίδια *dhps* μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι το γονίδιο *dhps* ευαίσθητου στελέχους μηνιγγιτιδόκοκκου είναι το ίδιο με το αντίστοιχο γονίδιο ευαίσθητου στελέχους γονόκοκκου (Fermer C, 1995).

Η επιλογή του αντιβιοτικού πρέπει να βασίζεται όχι μόνο στην *in vitro*, αλλά και στην *in vivo* δράση τους, έχοντας στις περιπτώσεις μηνιγγίτιδας επαρκή διείσδυση στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό.. Τα κύρια αντιβιοτικά επιλογής είναι η αμπικιλίνη και η πενικιλίνη, ενώ η χλωραμφαινικόλη αποτελεί μία πιο οικονομική λύση. Άριστη εναλλακτική θεραπεία αποτελούν τα αντιβιοτικά τρίτης γενεάς των κεφαλοσπορινών (κεφτιαζόνη και κεφοταξίμη).

8. Πρόληψη

Η λοίμωξη είναι δυνατό να αποφευχθεί με εμβολιασμό ή χημειοπροφύλαξη. Προκειμένου να είναι αποτελεσματική η πρόληψη, πρέπει να είναι γνωστός ο τρόπος μετάδοσης της *N.meningitidis*. Η μετάδοση γίνεται από άνθρωπο σε άνθρωπο, με σταγονίδια ή δια της επαφής, κυρίως με τις ρινοφαρυγγικές εκκρίσεις φορέων, παρά με άμεση επαφή με πάσχοντες, οι οποίοι δεν μεταδίδουν τη λοίμωξη μετά την έναρξη της θεραπείας. Η μετάδοση δεν γίνεται με την κοινή χρήση αντικειμένων, δεδομένου ότι ο μηνιγγιτιδόκοκκος είναι ευαίσθητος στις αλλαγές θερμοκρασίας και υγρασίας.

8.1. Χημειοπροφύλαξη

Σκοπός της **χημειοπροφύλαξης** είναι η καταπολέμηση της ρινοφαρυγγικής φορείας. Έχει άμεσα αποτελέσματα, δρα εντός 24 ωρών από την λήψη των αντιβιοτικών από το στόμα και η προστασία από τη λοίμωξη διαρκεί μερικές εβδομάδες. Οι φαρυγγικές πλύσεις με εναιώρημα αντιμικροβιακών σκευασμάτων δεν επαρκούν στην καταπολέμηση της φορείας. Η χημειοπροφύλαξη ενδείκνυται μόνο στις απολύτως απαραίτητες περιπτώσεις, κατά τις οποίες πρέπει να προστατευτούν τα άτομα του στενού περιβάλλοντος του ασθενούς. Δεν προτείνεται κατά τη διάρκεια επιδημιών, γιατί δεν μπορεί να ελέγξει την εξάπλωση της επιδημίας. Συνήθως, χορηγείται ριφαμπικίνη επί δύο ημέρες ή σπιραμικίνη επί πέντε ημέρες (Τζένη Κουρέα Κρεμαστινού, 1996).

8.2. Εμβολιασμός

Ο μηχανισμός της χυμικής ανοσίας είναι απαραίτητος για την επαρκή προστασία από την μηνιγγιτιδοκοκκική λοίμωξη. Η φορεία παρέχει προστασία μόνο όταν ο μηνιγγιτιδόκοκκος του ρινοφάρυγγα είναι ίδιας οροομάδας με αυτόν που προκαλεί την επιδημία. Έτσι, κρίνεται απαραίτητος ο **εμβολιασμός** για την ανοσοποίηση του οργανισμού και την αποτελεσματική προστασία από τον μηνιγγιτιδόκοκκο.

Παρά τις προόδους που έχουν σημειωθεί στον τομέα της έρευνας για την παρασκευή εμβολίων κατά του μηνιγγιτιδόκοκκου, δεν έχει επιτευχθεί έως σήμερα εμβόλιο κατά της οροομάδας Β. Υπάρχουν, όμως, τέσσερα αντιγόνα για τις οροομάδες Α, C, Υ, W-135. Κυκλοφορούν σε ενέσιμη μορφή και περιέχουν τα αντιγόνα Α και C, ή είναι πολυδύναμα (**MPSV4**) και περιέχουν τα αντιγόνα Α, C, Υ, W-135 σε αναλογία 50 µg από το καθένα. Όλα τα αντιγονικά περιεχόμενα του MPSV4 βρέθηκε ότι είναι ανοσογόνα σε ενήλικες και παιδιά μεγαλύτερης ηλικίας. Το 2005, παρασκευάστηκε το πολυδύναμο συζευγμένο εμβόλιο για τις οροομάδες Α, C, Υ, W-135 (**MCV4**), στο οποίο τα πολυσακχαριδικά αντιγόνα είναι συνδεδεμένα με μία πρωτεΐνη-φορέα (τοξίνη διφθερίτιδας) και περιέχονται 4 µg από το καθένα. Τα συζευγμένα εμβόλια είναι εξαρτώμενα από τα Τ-λεμφοκύτταρα και προκαλούν καλύτερες ανοσιακές απαντήσεις (Τζένη Κουρέα Κρεμαστινού, 1996), (Lee H. Harisson, 2006).

Απειλή για την αποτελεσματικότητα των εμβολίων αποτελούν οι μηχανισμοί με τους οποίους αλλάζει ο φαινότυπος του μηνιγγιτιδόκοκκου κάτω από την πίεση της φυσικής επιλογής. Για παράδειγμα, μπορεί να επιτευχθεί γενετική αλλαγή μέσω οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις φορείας δύο στελεχών ταυτόχρονα. Επίσης, μπορεί να τροποποιήσει κάποια γονίδιά του μέσω ανασυνδυασμού ή να αλλάξει την γονιδιακή του έκφραση μέσω μεταθετών στοιχείων προκειμένου να «επιζήσει» από την ανοσιακή πίεση (5). Με κάποιον από τους μηχανισμούς αυτούς μπορεί ένα στέλεχος μηνιγγιτιδόκοκκου να αλλάξει οροομάδα (μεταλλαγή στην κάψα, capsular switching) και να μετατραπεί σε κάποια που δεν περιλαμβάνεται στα υπάρχοντα εμβόλια, γεγονός που θα αποτελούσε κίνδυνο για την δημόσια υγεία.

9. Διάγνωση μηνιγγιτιδοκοκκικής νόσου με μοριακές τεχνικές

Η ταχεία εργαστηριακή επιβεβαίωση της κλινικής διάγνωσης με προσδιορισμό και της οροομάδας του μηνιγγιτιδόκοκκου είναι σημαντική, συμβάλλοντας στην αποτελεσματική θεραπεία του ασθενούς, στην έγκαιρη χορήγηση χημειοπροφύλαξης στο περιβάλλον του, στην εντόπιση επιδημικών εξάρσεων και στην άμεση λήψη των απαραίτητων μέτρων προφύλαξης. Επίσης, επιτρέπει τη λεπτομερή καταγραφή και παρακολούθηση της επιδημιολογίας της νόσου. Η γνώση αυτή είναι απαραίτητη για τη λήψη αποφάσεων σχετικά με την εφαρμογή του εμβολιασμού με τα νεότερα συζευγμένα εμβόλια του μηνιγγιτιδόκοκκου και τη διαμόρφωση της εθνικής πολιτικής κάθε χώρας, καθώς και για την παρακολούθηση των επιδημιολογικών μεταβολών που μπορεί να προκύψουν από την εφαρμογή του εμβολιασμού αυτού.

Οι **μοριακές τεχνικές** και ιδιαίτερα η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), δίνουν τη δυνατότητα γρήγορης και ακριβούς τυποποίησης και ταυτοποίησης του μηνιγγιτιδόκοκκου, ακόμα και όταν οι κλασσικές τεχνικές αποτυγχάνουν. Πράγματι, η καλλιέργεια του ENY ή του αίματος είναι αρνητική σε πολλές περιπτώσεις συστηματικής μηνιγγιτιδοκοκκικής νόσου λόγω της αντιμικροβιακής αγωγής που χορηγείται στους ασθενείς ακόμα και πριν την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο (Tzanakaki G., 2003). Επίσης, η καλλιέργεια μπορεί να είναι αρνητική όταν το μικροβιακό φορτίο του δείγματος είναι χαμηλό ή δεν είναι εφικτή σε περιπτώσεις κατάληξης του ασθενούς πριν τη λήψη του βιολογικού υλικού.

Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR) αποτελεί το σημαντικότερο ίσως βήμα προόδου στη βιολογία τα τελευταία χρόνια. Με την τεχνική αυτή πολλαπλασιάζεται επιλεκτικά το επιθυμητό τμήμα ενός μορίου DNA. Ο μηχανισμός της βασίζεται στον επαναλαμβανόμενο κύκλο των τριών παρακάτω αντιδράσεων:

1. **αποδιάταξη του DNA (denaturation).** Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των δυο συμπληρωματικών αλυσίδων του DNA υπό την επίδραση της κατάλληλης θερμοκρασίας, η οποία κυμαίνεται από 93 έως 95°C.
2. **υβριδισμός των εκκινητών στο DNA στόχο (annealing).** Στο στάδιο αυτό οι εκκινητές (primers) υβριδίζονται με τις συμπληρωματικές περιοχές του DNA-στόχου σε θερμοκρασία που συνήθως κυμαίνεται από 50 έως 65°C.
3. **επέκταση των εκκινητών (extension).** Στο στάδιο αυτό γίνεται η επιμήκυνση των εκκινητών με τη βοήθεια της θερμοανθεκτικής πολυμεράσης Taq και παρουσία τεσσάρων ειδών dNTPs. Η επιθυμητή θερμοκρασία κυμαίνεται στους 72°C.

Στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας εφαρμοζόταν μέχρι πρόσφατα **πολλαπλή PCR** για την ταυτόχρονη ανίχνευση των μικροοργανισμών *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* τύπου β και *Streptococcus pneumoniae* (G. Tzanakaki, 2005). Πρόσφατα, η πολλαπλή PCR τροποποιήθηκε ώστε να περιλαμβάνει και την ανίχνευση της *Listeria monocytogenes*. Με αυτόν τον τρόπο είναι εφικτή η διάγνωση της μηνιγγιτιδοκοκκικής λοίμωξης μέσα σε λίγες ώρες από την παραλαβή του δείγματος.

Για την ταυτοποίηση της οροομάδας του μηνιγγιτιδόκοκκου εφαρμόζονταν **μεμονωμένες PCR** με τις οποίες είναι δυνατή η ανίχνευση των οροομάδων A, B, C, W-135 και Y (Tzanakaki G, 2003), (Muhamed-Kheir Taha, 2000). Οι εκκινητές για τις B, C, W-135 και Y στοχεύουν σε διαφορετικές περιοχές του γονιδίου *siaD* (Frosch M, 1991) και οι εκκινητές για την οροομάδα A στοχεύουν στο γονίδιο *orf-2* (John S. Swartley, 1998). Τα παραπάνω γονίδια είναι υπεύθυνα για τη βιοσύνθεση του ελύτρου σε κάθε οροομάδα.

Τα ποσοστά της ευαισθησίας και της ειδικότητας της μεθόδου της PCR για τη διάγνωση της μηνιγγιτιδοκοκκικής νόσου και της οροομαδοποίησης είναι υψηλά, γεγονός που καθιστά τη μέθοδο ιδιαίτερα χρήσιμη στις περιπτώσεις που οι συμβατικές τεχνικές αποτυγχάνουν (G. Tzanakaki, 2005), (Tzanakaki G, 2003), (Muhamed-Kheir Taha, 2000).

10. Σκοπός της εργασίας

Η γρήγορη και ακριβής διάγνωση της οροομάδας του μηνιγγιτιδόκοκκου σε βιολογικά υλικά είναι αναγκαία στην αντιμετώπιση των επιδημιών από *N. meningitidis*. Η ταυτοποίηση της οροομάδας των βακτηρίων που απομονώνονται από βιολογικά υλικά ασθενών οδηγεί με ασφάλεια στον εντοπισμό του αιτιολογικού παράγοντα της επιδημίας. Έτσι, μπορούν να ληφθούν τα απαραίτητα μέτρα προφύλαξης, συμπεριλαμβανομένης και της χορήγησης του κατάλληλου εμβολίου στον πληθυσμό.

Επομένως, η ταυτοποίηση της οροομάδας του μηνιγγιτιδόκοκκου σε βιολογικά υλικά ασθενών είναι ιδιαίτερα σημαντική κατά την περίοδο και όχι μόνο επιδημιών. Είναι, επίσης, σημαντική για την διεξαγωγή επιδημιολογικών μελετών, την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των υπαρχόντων εμβολίων και την αναγνώριση της ανάγκης για την παρασκευή νέων.

Προκειμένου να μειωθεί ο χρόνος αλλά και το κόστος της τεχνικής της μοριακής τυποποίησης του μηνιγγιτιδόκοκκου αναπτύχθηκε μία **τετραπλή PCR** με υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία, με την οποία είναι πλέον εφικτή η ταυτόχρονη ανίχνευση των οροομάδων του μηνιγγιτιδόκοκκου, με απώτερο σκοπό την αντικατάσταση των μεμονομένων PCR, που εφαρμόζονταν μέχρι σήμερα.

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Δείγματα ασθενών

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από **197 ασθενείς**, τα οποία είχαν σταλεί στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας από τα περιφερικά νοσοκομεία της χώρας κατά το χρονικό διάστημα 2003-2007. Τα δείγματα περιελάμβαναν αίμα και εγκεφαλονωτιαίο υγρό, ενώ λίγα προέρχονταν από αιμοκαλλιέργεια. Όλα τα δείγματα είχαν ταυτοποιηθεί ως θετικά για μηνιγγιτιδόκοκκο (με PCR ή PCR πραγματικού χρόνου). Από τα αποτελέσματα των δοκιμών ως προς την τυποποίηση για οροομάδα με τις μεμονωμένες PCR προέκυψε ότι: 16 δείγματα ανήκαν στην οροομάδα Α, 128 στην οροομάδα Β, 6 στην οροομάδα C, 6 στην οροομάδα W135, 1 στην οροομάδα Υ. Σαράντα (40) δείγματα ήταν μη τυποποιήσιμα με τους υπάρχοντες εκκινητές (non groupable).

2. Μηνιγγιτιδοκοκκικά στελέχη

Τα μηνιγγιτιδοκοκκικά στελέχη που απομονώθηκαν από βιολογικά υλικά ασθενών με τις κλασικές μεθόδους απομόνωσης και εστάλησαν στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας για περαιτέρω τυποποίηση, καλλιεργήθηκαν σε κατάλληλα θρεπτικά υλικά και στη συνέχεια απομονώθηκε το DNA.

2.1. Καλλιέργεια μηνιγγιτιδοκοκκικών στελεχών

Η καλλιέργεια έγινε σε σοκολατόχρωμο ή αιματούχο άγαρ και ακολούθησε επώαση στους 37⁰C, σε περιβάλλον 5-10% CO₂, για 24 ή 48 ώρες.

Παρασκευή σοκολατόχρωμου άγαρ

1. Ζυγίζουμε 39 g από *Columbia agar* (OXOID) σε 1 λίτρο απεσταγμένο νερό.
2. Θερμαίνουμε το υλικό με συνεχή ανάδευση μέχρι βρασμού.
3. Αποστειρώνουμε το υλικό στους 121⁰C για 15 λεπτά.
4. Προσθέτουμε 5% αίμα και θερμαίνουμε το υλικό μέχρι να διασπαστούν τα ερυθρά αιμοσφαίρια.
5. Αναδεύουμε καλά και μοιράζουμε το υλικό σε τρυβλία.

2.2. Φύλαξη στελεχών μηνιγγιτιδόκοκκου

Από τις 24ωρες καλλιέργειες επιλέγεται ορισμένος αριθμός αποικιών, γίνεται εναιώρημα σε ζωμό Heart infusion και η φύλαξή τους γίνεται σε θερμοκρασία -70°C .

Παρασκευή ζωμού Heart infusion

1. Ζυγίζουμε 18,5 g σκόνης Heart infusion broth (OXOID) και το διαλύουμε σε 500 mL απεσταγμένο νερό.
2. Θερμαίνουμε το υλικό με συνεχή ανάδευση μέχρι βρασμού και μοιράζουμε 80 mL από το υλικό σε γυάλινα φιαλίδια, όπου προσθέτουμε 20 mL γλυκερίνης.
3. Αποστειρώνουμε το υλικό στους 121°C για 15 λεπτά.
4. Μοιράζουμε περίπου 1mL του υλικού σε cryovials (Simport-2 mL) άσηπτα με την βοήθεια του λύχνου Bunsen και έπειτα τα τοποθετούμε σε κλίβανο θερμοκρασίας 37°C για έλεγχο τυχόν επιμόλυνσης.
5. Το υλικό φυλάσσεται στους $+4^{\circ}\text{C}$.

Επίσης, για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε αίμα αλόγου που είχε επιμολυνθεί με μηνιγγιτιδόκοκκο ως θετικός μάρτυρας για τον έλεγχο της ποιότητας της τεχνικής (quality control).

3. Απομόνωση DNA

3.1. Απομόνωση του DNA από στελέχη μηνιγγιτιδόκοκκου

1. Παρασκευάζουμε εναιώρημα από βακτηριακές αποικίες σε 200 μL Tris.
2. Αναδεύουμε ισχυρά (Vortex).
3. Βράζουμε σε υδατόλουτρο για 10 λεπτά.
4. Φυγοκεντρούμε στις 14.000 στροφές για 12 λεπτά.
5. Συλλέγουμε όλο το υπερκείμενο και απορρίπτουμε το ίζημα.

3.2. Απομόνωση του DNA από εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY)

1. Μεταγγίζουμε σε Eppendorf ποσότητα ίση με 500 μL ENY και το φυγοκεντρούμε σε 4.000 στροφές για 10 λεπτά.
2. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και κρατάμε το ίζημα, που πρέπει να είναι 150 μL .
3. Προσθέτουμε 650 μL απεσταγμένο-αποστειρωμένο H_2O και 150 μL Chellex/Tween 80*.
4. Βράζουμε για 30 λεπτά.
5. Φυγοκεντρούμε στις 10.000 στροφές για 8 λεπτά.
6. Μεταγγίζουμε από το υπερκείμενο ποσότητα ίση με 150 μL σε νέο Eppendorf.

*Πρωτόκολλο παρασκευής Chellex/Tween 80

Για 100 mL υλικού προσθέτουμε σε 70 mL απεσταγμένου νερού τα παρακάτω:

- 15 g Chellex (Sigma)
- 0.1 g SDS
- 1 mL Tween 80
- 1 mL Igepal (Sigma)
- H_2O ώστε ο τελικός όγκος να είναι 100mL και αποστειρώνουμε.

3.3. Απομόνωση του DNA από ολικό αίμα

Η απομόνωση από το αίμα γίνεται με το kit της Macherey-Nagel, NucleoSpin® Blood QuickPure σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας. Το NucleoSpin® Blood QuickPure έχει σχεδιαστεί για την ταχεία, μικρής κλίμακας και υψηλής καθαρότητας απομόνωση γενομικού DNA από ολικό αίμα, ορό, πλάσμα ή άλλα βιολογικά υλικά. Το απομονωμένο DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας ως στόχος για υβριδισμό στην PCR ή σε οποιαδήποτε ενζυμική αντίδραση.

Το NucleoSpin® Blood QuickPure επιτρέπει την γρήγορη απομόνωση ποσότητας μεγαλύτερης από 10 µg καθαρού γενομικού DNA από αρχική ποσότητα 200 µL ολικού ανθρώπινου αίματος. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε αίμα στο οποίο έχει προστεθεί EDTA, κιτρικό ή ηπαρίνη.

Η λύση των κυττάρων επιτυγχάνεται με την επώαση του ολικού αίματος σε θερμοκρασία 70°C, παρουσία ενός διαλύματος υψηλής περιεκτικότητας σε αποδιατακτικά ιόντα και πρωτεΐνάσης K. Το DNA προσδένεται σε στήλη που περιέχει μεμβράνη πυριτίου (silica membrane – NucleoSpin Blood QuickPure columns) με την πρόσθεση αιθυλικής αλκόολης στο προϊόν της λύσης. Η διαδικασία της πρόσδεσης είναι αμφίδρομη, ειδικά για τα νουκλεϊκά οξέα. Οι επιμολύνσεις απομακρύνονται με πλύση με αλκοολούχο ρυθμιστικό διάλυμα. Το καθαρό γενωμικό DNA εκλούεται κάτω από κατάλληλες συνθήκες σε ελαφρά αλκαλικό περιβάλλον.

Πρωτόκολλο απομόνωσης από ολικό αίμα

1. Βγάζουμε την πρωτεΐνάση K από τους -20 °C και την αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου. Μεταφέρουμε το δείγμα σε θερμοκρασία δωματίου. Προθερμαίνουμε το υδατόλουτρο στους 70°C.
2. Σε πωματιζόμενο πλαστικό σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης προσθέτουμε 25 µL διαλύματος πρωτεΐνάσης K και 200 µL αίματος.
3. Προσθέτουμε 25 µL από το διάλυμα BQ1 και αναδεύουμε ισχυρά για 10 έως 15 δευτερόλεπτα (Vortex).
4. Επωάζουμε το δείγμα για 10 λεπτά στους 70 °C. Παρατηρείται αλλαγή στο χρώμα του διαλύματος σε καφέ.

5. Προσθέτουμε 200 μL αιθυλικής αλκοόλης καθαρότητας 96-100% και αναδεύουμε ισχυρά (Vortex).
6. Μεταφέρουμε το δείγμα στη στήλη και φυγοκεντρούμε στην μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό.
7. Τοποθετούμε τη στήλη σε νέο σωληνάριο συλλογής όγκου 2 mL και προσθέτουμε 200 μL BQ2. Φυγοκεντρούμε στη μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό. Απορρίπτουμε το έκλυμα και επανατοποθετούμε την στήλη στο σωληνάριο συλλογής.
8. Προσθέτουμε 350 μL BQ2 στη στήλη και φυγοκεντρούμε στη μέγιστη ταχύτητα για 3 λεπτά.
9. Μεταφέρουμε τη στήλη σε νέο πωματιζόμενο κωνικό σωληνάριο και προσθέτουμε 90 μL προθερμασμένο στους 70 $^{\circ}\text{C}$ BE. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και φυγοκεντρούμε στη μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό.
10. Το DNA φυλάσσεται στους -20 $^{\circ}\text{C}$.

4. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης

4.1. Αντιδραστήρια

1. Ρυθμιστικό διάλυμα 10x (PCR buffer), (παρέχεται μαζί με το ένζυμο της Taq πολυμεράσης, Finnzymes).
2. Ένζυμο θερμοανθεκτικής πολυμεράσης 2 U/μL (hot start Taq DNA Polymerase, Finnzymes).
3. Μίγμα τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων 20 mM το καθένα (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), (ABgene®).
4. Διάλυμα MgCl₂ 25 mM (ABgene®).
5. Απεσταγμένο-αποστειρωμένο νερό.
6. Δύο εκκινητές για κάθε ορομάδα σε συγκέντρωση 10 pmol/μL (Πίνακας 4)), (VBC Biotech).

4.2. Εκκινητές

Ο σχεδιασμός των εκκινητών πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των προγράμματος FastPCR (Kalendar R Fast PCR, 2005) και BLAST με το οποίο έγινε έλεγχος για τυχόν μεταξύ τους υβριδισμό ή υβριδισμό σε ανθρώπινο γενωμικό υλικό .

Η αλληλουχία των εκκινητών για όλες τις ορομάδες, καθώς και τα γονίδια στα οποία στοχεύουν φαίνονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη.

Εκκινητές	Γονίδιο (οροομάδα)	Αλληλουχία	Μέγεθος Προϊόντος (bp)
A1	orf-2 (A)	5'-cgcaataggtgtatatattcttcc-3'	400
A2	orf-2 (A)	5'-cgtaatagtttcgatatgccttctt-3'	
SA1	orf-2 (A)	5'-tgttgacatgaaactcagcacag-3'	337
SA2	orf-2 (A)	5'-tcttgatgtactgggtgcatcg-3'	
B1	siaD (B)	5'-ggatcatttcagtgtttccacca-3'	450
B2	siaD (B)	5'-gcatgctggaggaataagcattaa-3'	
C1	siaD (C)	5'-tcaaatgagtttgccaatagaaggt-3'	250
C2	siaD (C)	5'-caatcacgatttgcccaattgac-3'	
W/Y1	siaD (W/Y)	5'-tccgagcaggaaatttatgagaa-3'	197
W/Y2	siaD (W/Y)	5'-gccattccagaaatatcaccag-3'	

4.3. Πρωτόκολλο της PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των οροομάδων A, B, C, Y, W-135

Ο τελικός όγκος του διαλύματος της αντίδρασης είναι 25μL και το διάλυμα περιλαμβάνει: ρυθμιστικό διάλυμα (buffer), 1,3 X, εκκινητές σε συγκεντρώσεις 0,28 μM, 0,24 μM, 0,12 μM και 0,2 μM για τις οροομάδες A, B, C και W-135 αντίστοιχα, MgCl₂ 4,5 mM, dNTPs 0.8 mM και 1,2 U Taq πολυμεράσης ανά αντίδραση. Οι ποσότητες που πρέπει να αναμιχθούν από κάθε αντιδραστήριο για την παρασκευή του μίγματος για μία αντίδραση φαίνονται στον Πίνακα 5.

ΣΗΜ. Η προσθήκη των αντιδραστηρίων γίνεται πάντα στους +4°C.

Πίνακας 5. Ποσότητες αντιδραστηρίων ανά αντίδραση PCR.

Ρυθμιστικό διάλυμα	3,25 μ L
dNTPs	1,00 μ L
MgCl ₂	1,25 μ L
Εκκινητής A1	0,70 μ L
Εκκινητής A2	0,70 μ L
Εκκινητής B1	0,60 μ L
Εκκινητής B2	0,60 μ L
Εκκινητής C1	0,40 μ L
Εκκινητής C2	0,40 μ L
Εκκινητής W/Y1	0,50 μ L
Εκκινητής W/Y2	0,50 μ L
Hot start Taq πολυμεράση	0,60 μ L
Διάλυμα DNA	5,00 μ L
H ₂ O	9,50 μ L

4.4. Θετικός και αρνητικός μάρτυρας

Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται όγκος νερού ίσος με τον όγκο που προστίθεται από το δείγμα, (5 μ L). Η χρήση του αρνητικού μάρτυρα γίνεται με σκοπό τον έλεγχο επιμόλυνσης κατά την εφαρμογή της PCR.

Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιείται όγκος από μίγμα που περιέχει γενωμικό DNA από στελέχη ορομάδας A, B, C και W ή Y, ίσος με τον όγκο του δείγματος, (5 μ L). Η χρήση του θετικού μάρτυρα αποσκοπεί στον έλεγχο της σωστής λειτουργίας της τεχνικής της PCR.

Για την παρασκευή του θετικού μάρτυρα απομονώνεται DNA από στελέχη κάθε ορομάδας και αραιώνεται μέχρι να επιτευχθεί συγκέντρωση 5ng/ μ L. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης γίνεται με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου.

Για την παρασκευή 100 μL θετικού μάρτυρα αναμιγνύονται 20 μL διαλύματος DNA από τις οροομάδες A, B, C και W ή Y (γιατί, όπως αναφέρεται αναλυτικά παρακάτω, χρησιμοποιείται κοινό ζεύγος εκκινήτων για τις δύο οροομάδες) και συμπληρώνουμε με 20 μL νερό.

4.5. Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή για την τετραπλή PCR

Το τελικό πρόγραμμα όπως διαμορφώθηκε και χρησιμοποιήθηκε για την ταυτόχρονη ανίχνευση των τεσσάρων οροομάδων του μηνιγγιτιδόκοκκου παρουσιάζεται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Τελικές συνθήκες της τετραπλής PCR που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός Κύκλων
1	95 ⁰ C	10:00 min	1
	95 ⁰ C	00:50	
2	60 ⁰ C	00:45	10
	68 ⁰ C	01:30	
	95 ⁰ C	00:50	
3	59 ⁰ C	00:45	25
	68 ⁰ C	01:45	
4	68 ⁰ C	03:00	1
5	4 ⁰ C	∞	

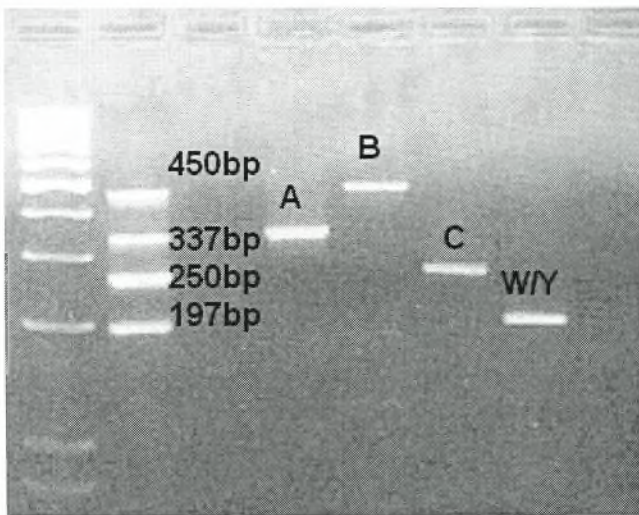
5. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR

5.1. Αντιδραστήρια

1. Αγαρόζη (HT®).
2. Κλιμακούμενος δείκτης μοριακού βάρους (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder).
3. Υδατικό διάλυμα βρωμιούχου εθιδίου 0,5 mg/mL (Sigma®)
4. Ρυθμιστικό διάλυμα TEB 1x (Tris- EDTA-Boric acid).
5. Loading buffer 10x (GeneRuler™).

Κατά την ηλεκτροφόρηση, τα προϊόντα της PCR διαχωρίζονται με βάση το **μοριακό τους βάρος**, αφού τα μικρότερα κομμάτια κινούνται πιο γρήγορα προς τον θετικό πόλο (Εικόνα 3).

Εικόνα 3. Τα προϊόντα της τετραπλής PCR .



Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα TEB 1x (Tris-EDTA- Boric acid Buffer), το οποίο χρησιμοποιείται τόσο για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης, όσο και σαν ρυθμιστικό διάλυμα κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης.

Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος (TEB) 5x

Σε 1 λίτρο H_2O διαλύουμε:

1. 27,2 g Boric acid (890mM), (Sigma),
2. 3,7 g $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ (20mM), (Sigma),
3. 54 g Tris Base (890mM) (Sigma).

Το TEB 5x αραιώνεται σε 1x ως εξής: για 1 λίτρο προσθέτουμε 200mL TEB 5X σε 800mL H_2O .

5.2. Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

Για τον διαχωρισμό των προϊόντων της συγκεκριμένης PCR χρησιμοποιείται πήκτωμα πυκνότητας 2%. Για την παρασκευή πηκτώματος πυκνότητας 2% των 100mL ζυγίζουμε 2g αγαρόζης και τη διαλύουμε σε 100 mL TEB. Για την παρασκευή mini-gel πυκνότητας 2% όγκου 30 mL διαλύουμε 0,6 g αγαρόζης σε 30 mL TEB. Θερμαίνουμε μέχρι βρασμού, ενώ κατά διαστήματα αναδεύουμε. Όταν η φιάλη αποκτήσει θερμοκρασία ανεκτή στο γυμνό χέρι προσθέτουμε 75 μ L βρωμιούχου εθιδίου και αναδεύουμε. Μεταφέρουμε το υγρό πήκτωμα στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και περιμένουμε να στερεοποιηθεί.

5.3. Ενοφθαλμισμός πηκτώματος αγαρόζης

Αναμιγνύουμε το προϊόν της PCR με 5 μ L από το loading buffer και ενοφθαλμίζουμε ποσότητα ίση με 18 μ L στο αντίστοιχο πηγαδάκι της γέλης. Επίσης, ενοφθαλμίζουμε ποσότητα ίση με 6 μ L ladder γνωστού μοριακού βάρους.

5.4. Συνθήκες ηλεκτροφόρησης

Το πήκτωμα όγκου 100 mL ηλεκτροφορείται στα 140 V για 40 λεπτά περίπου, σε αντίθεση με το πήκτωμα όγκου 30 mL το οποίο ηλεκτροφορείται στα 120 V για 30 λεπτά περίπου.

5.5. Ανάγνωση αποτελεσμάτων

Το DNA στο ηλεκτροφορημένο πήκτωμα γίνεται ορατό όταν αυτό εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία, με τη βοήθεια του βρωμιούχου εθιδίου, το οποίο δεσμεύεται στο δίκλωνο DNA κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης.

2. Πειραματικά στάδια για την ανάπτυξη της τετραπλής PCR

Όλες οι πειραματικές δοκιμές που έγιναν βασίστηκαν στα χαρακτηριστικά των ζευγών των εκκινητών (Tm), του ενζύμου της taq πολυμεράσης, καθώς και των επιθημητών προς ενίσχυση τμημάτων του DNA (Tavi's guide). Παρακάτω περιγράφονται τα βασικότερα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν μέχρι την τελική διαμόρφωση της πολλαπλής PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των οροομάδων του μηνιγγιτιδόκοκκου σε βιολογικά υγρά.

Πειραματικό στάδιο 1. Αρχική προσέγγιση

Οι **συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων** στο στάδιο αυτό ήταν οι παρακάτω:

- Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) 1x,
- Εκκινητές για την οροομάδα A (A1, A2) 0,3 μ M,
- Εκκινητές για την οροομάδα B (B1, B2) 0,3 μ M,
- Εκκινητές για την οροομάδα C (C1, C2) 0,2 μ M,
- Εκκινητές για την οροομάδα W (W/Y1, W/Y2) 0,2 μ M,
- MgCl₂ 3,5 μ M,
- dNTPs 0,8 mM,
- taq DNA πολυμεράση 1U.

Οι **θερμοκρασίες και οι χρόνοι** που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 7.

Αρχικά, τα δείγματα DNA που δοκιμάστηκαν ήταν δείγματα που είχαν απομονωθεί από στελέχη μηνιγγιτιδόκοκκου οροομάδας A, B, C και W αντίστοιχα και είχαν όλα συγκέντρωση ίση με 0,5 ng/ μ L.

Πίνακας 7. Χρόνοι και θερμοκρασίες πειραματικού σταδίου 1.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος (min)	Αριθμός Κύκλων
1	95 °C	10:00	1
	95 °C	00:45	
2	59 °C	00:45	8
	68 °C	01:30	
3	95 °C	00:45	
	57 °C	00:40	33
	68 °C	01:20	
4	68 °C	03:00	1
5	4 °C	∞	

Πειραματικό στάδιο 2. Ελάττωση της συγκέντρωσης των εκκινητών για την οροομάδα B

Στο στάδιο αυτό, πραγματοποιήθηκε ελάττωση της συγκέντρωσης των εκκινητών για την οροομάδα B (B1 και B2), από 0,3 μM σε 0,2 μM, ενώ δεν έγινε καμία μεταβολή στις θερμοκρασίες, στους χρόνους και στον αριθμό των κύκλων.

Αρχικά έγιναν δοκιμές σε στελέχη οροομάδων A,B, C, W/Y συγκέντρωσης 0,5 ng/μL, οι οποίες έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα, αφού είχαν ενισχυθεί επαρκώς όλες οι οροομάδες μεμονωμένα αλλά και ο θετικός μάρτυρας. Στη συνέχεια, δοκιμάστηκαν δείγματα DNA από στελέχη και των πέντε οροομάδων μικρότερης συγκέντρωσης (5 pg/μL). Στο στάδιο αυτό δοκιμάστηκαν για πρώτη φορά κλινικά δείγματα.

Πειραματικό στάδιο 3. Τροποποίηση προγράμματος με αύξηση της θερμοκρασίας υβριδισμού

Στο στάδιο αυτό, τροποποιήθηκε το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή με αύξηση της θερμοκρασίας υβριδισμού στο 2^ο και 3^ο στάδιο αντίστοιχα. Με αυτόν τον τρόπο οι εκκινητές υβριδίζονται σε πιο ειδικές συνθήκες. Το νέο πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή, όπως αυτό διαμορφώθηκε, φαίνεται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8. Χρόνοι και θερμοκρασίες που χρησιμοποιήθηκαν κατά το πειραματικό στάδιο 3.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος (min)	Αριθμός Κύκλων
1	95 °C	10:00	1
	95 °C	01:00	
2	60 °C	00:45	8
	68 °C	01:30	
	95 °C	00:45	
3	58 °C	00:40	33
	68 °C	01:20	
4	68 °C	03:00	1
5	4 °C	∞	

Ακολούθησαν δοκιμές σε μηνιγγιτιδοκοκκικά στελέχη όλων των οροομάδων, καθώς επίσης, σε δύο δείγματα ασθενών αρνητικά για μηνιγγιτιδόκοκκο και σε δύο δείγματα που είχαν ταυτοποιηθεί για οροομάδα με τις μεμονωμένες PCR.

Πειραματικό στάδιο 4. Μείωση αριθμού κύκλων και εισαγωγή ενός επιπλέον σταδίου

Σε αυτό το στάδιο, τροποποιήθηκε το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή και ειδικότερα, μειώθηκε ο συνολικός αριθμός των κύκλων ενώ εισάχθηκε ένα επιπλέον στάδιο, μέσω του οποίου έγινε εφικτή η σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας υβριδισμού (T_a), από τους 60 °C στους 59 °C και τέλος στους 58 °C, (Πίνακας 9). Επίσης, το 2^ο στάδιο, όπου $T_a=60$ °C, εφαρμόστηκε σε 5 κύκλους. Το 3^ο στάδιο, όπου $T_a=59$ °C, εφαρμόστηκε σε 5 κύκλους. Το 4^ο στάδιο, όπου $T_a=58$ °C, εφαρμόστηκε σε 27 κύκλους. Με αυτόν τον τρόπο επιδιώκεται η πολύ ειδική ενίσχυση των αλληλουχιών-στόχων.

Με το παραπάνω πρόγραμμα έγιναν δοκιμές σε DNA από στελέχη όλων των οροομάδων, σε κλινικά δείγματα αρνητικά για μηνιγγιτιδόκοκκο ή για οροομάδα και σε θετικά δείγματα που είχαν ταυτοποιηθεί για οροομάδα.

Πίνακας 9. Χρόνοι και θερμοκρασίες που χρησιμοποιήθηκαν κατά το πειραματικό στάδιο 4.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος (min)	Κύκλοι
1	95 °C	10:00	1
	95 °C	00:50	
2	60 °C	00:45	5
	68 °C	01:30	
	95 °C	00:50	
3	59 °C	00:45	5
	68 °C	01:30	
	95 °C	00:50	
4	58 °C	00:45	27
	68 °C	01:30	
5	68 °C	03:00	1
6	4 °C	∞	

Πειραματικό στάδιο 5. Αύξηση της συγκέντρωσης των εκκινητών της οροομάδας A και μείωση της συγκέντρωσης των εκκινητών της οροομάδας B

Σκοπός του σταδίου αυτού ήταν η ενίσχυση του σήματος του προϊόντος της οροομάδας A, με αύξηση της συγκέντρωσης των εκκινητών A1, A2 από 0,3 μM σε 0,4 μM . Συγχρόνως, μειώθηκε η συγκέντρωση των εκκινητών για την οροομάδα B (B1, B2) από 0,2 μM σε 0,16 μM , γιατί είναι πολύ σημαντική η διατήρηση της ισορροπίας του συστήματος.

Πειραματικό στάδιο 6. Κατάργηση ενός σταδίου από το πρόγραμμα για την αύξηση της ευαισθησίας

Το επόμενο βήμα ήταν η κατάργηση του 4^{ου} σταδίου, με $T_a=58^\circ\text{C}$, από το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή (Πίνακας 9). Με αυτόν τον τρόπο, προέκυψε ένα στάδιο με $T_a=60^\circ\text{C}$ που επαναλαμβάνεται σε 10 κύκλους και ένα στάδιο με $T_a=59^\circ\text{C}$ που επαναλαμβάνεται σε 27 κύκλους (Πίνακας 10). Με αυτές τις συνθήκες επιχειρήθηκε μια ειδικότερη ενίσχυση των DNA-στόχων.

Με βάση το παρόν πρόγραμμα έγιναν αρκετές δοκιμές αρνητικών και θετικών δειγμάτων η οροομάδα των οποίων είχε ταυτοποιηθεί προηγουμένως με τις μεμονωμένες PCR.

Πίνακας 10. Χρόνοι και θερμοκρασίες που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό στάδιο 6.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος (min)	Κύκλοι
1	95 °C	10:00	1
	95 °C	00:50	
2	60 °C	00:45	10
	68 °C	01:30	
	95 °C	00:50	
3	59 °C	00:45	27
	68 °C	01:30	
4	68 °C	03:00	1
5	4 °C	∞	

Πειραματικό στάδιο 7. Αύξηση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος

Με σκοπό την ενίσχυση του σήματος των προϊόντων έγινε μία κλιμακούμενη αύξηση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος της PCR από 1x σε 1,2x, 1,3x και 1,4x αντίστοιχα. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η συγκέντρωση 1,3x ήταν η πιο ικανοποιητική.

Πειραματικό στάδιο 8. Αύξηση της συγκέντρωσης των εκκινητών της ορομάδας B

Στο στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σε βιολογικά υλικά ασθενών με συγκέντρωση ρυθμιστικού διαλύματος 1,3x. Επίσης, αυξήθηκε η συγκέντρωση των εκκινητών B1, B2 από 0,16 μM σε 0,2 μM.

Πειραματικό στάδιο 9. Μείωση της συγκέντρωσης του $MgCl_2$

Στο στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε κλιμακούμενη μείωση της συγκέντρωσης του $MgCl_2$, λόγω της αύξησης του ρυθμιστικού διαλύματος που είχε προηγηθεί (το οποίο περιέχει $MgCl_2$) με αποτέλεσμα την περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του $MgCl_2$ σε 4,25 mM από 3,5 mM, που ήταν αρχικά. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να σχετίζεται με την εξασθένηση του σήματος των μεγαλύτερων σε ζεύγη βάσεων (bp) προϊόντων που είχε παρατηρηθεί. Για τον λόγο αυτό, έγινε η κλιμακούμενη μείωση στη συγκέντρωση του $MgCl_2$ που περιλάμβανε την εφαρμογή των παρακάτω συγκεντρώσεων:

- 4,25 mM,
- 4 mM,
- 3,75 mM,
- 3,5 mM,

Η δοκιμή έγινε αρχικά στον θετικό μάρτυρα και κατόπιν σε κλινικά δείγματα.

Πειραματικό στάδιο 10. Κλιμακούμενη αύξηση του ενζύμου της taq DNA πολυμεράσης

Στο στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε κλιμακούμενη αύξηση του ενζύμου της taq DNA πολυμεράσης από συγκέντρωση 1 U σε 1,2 U και 1,4 U. Η δοκιμή αυτή βασίστηκε στην υπόθεση ότι η αύξηση του ενζύμου θα ευνοούσε την επέκταση των μεγαλύτερων προϊόντων.

Η πρώτη εφαρμογή έγινε μόνο στον θετικό μάρτυρα.

Ταυτόχρονα δοκιμάστηκε η αύξηση της συγκέντρωσης των εκκινήτων της οροομάδας A (A1, A2) από 0,4 μM έως 0,52 μM , ενώ οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων εκκινήτων παρέμειναν 0,2 μM . Η εφαρμογή έγινε μόνο στον θετικό μάρτυρα

Πειραματικό στάδιο 11. Σχεδιασμός νέου ζεύγους εκκινητών για την οροομάδα A

Με βάση την πολύ συχνή έλλειψη ενίσχυσης των προϊόντων των οροομάδων A και B και το γεγονός ότι τα προϊόντα των οροομάδων αυτών δεν ήταν ευδιάκριτα, λόγω της μικρής διαφοράς στο μέγεθός τους, αποφασίστηκε να σχεδιαστεί νέο ζεύγος εκκινητών για την οροομάδα A.

Με τον σχεδιασμό αυτό, οι παλιοί εκκινητές A1/A2, των οποίων το προϊόν είχε μέγεθος 400bp, αντικαταστήθηκαν από τους SA1/SA2, των οποίων το προϊόν έχει μέγεθος 337 bp (βλ. 4.2. Εκκινητές).

Η πρώτη δοκιμή έγινε με όλους τους εκκινητές σε ίσες συγκεντρώσεις (0,2 μM), buffer 1,3x, MgCl₂ 3,5 mM, dNTPs 0,8 mM και ταq πολυμεράση 1,4U, ενώ οι συνθήκες του θερμοκυκλοποιητή δεν μεταβλήθηκαν (Πίνακας 10).

Πειραματικό στάδιο 12. Ποιοτικός έλεγχος της τεχνικής

Ακολούθησαν δοκιμές σε γνωστούς θετικούς μάρτυρες για τον ποιοτικό έλεγχο της τεχνικής (quality control) για όλες τις οροομάδες, καθώς και σε αρνητικά κλινικά δείγματα.

Πειραματικό στάδιο 13. Μείωση της συγκέντρωσης της taq DNA πολυμεράσης

Στο στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε μία κλιμακούμενη μείωση στη συγκέντρωση της taq DNA πολυμεράσης από 1,4 U σε 1,2 U και 1 U με σκοπό τη δημιουργία πιο ειδικών συνθηκών.

Στη συνέχεια έγιναν δοκιμές σε ικανό αριθμό θετικών για μηνιγγιτιδόκοκκο κλινικών δειγμάτων για την επαλήθευση του αποτελέσματος.

Πειραματικό στάδιο 14. Μείωση αριθμού κύκλων

Στο στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε τροποποίηση του προγράμματος του θερμοκυκλοποιητή. Ειδικότερα, μειώθηκε ο αριθμός των κύκλων από 27 σε 25 στο 3^ο στάδιο και το πρόγραμμα διαμορφώθηκε όπως φαίνεται στον Πίνακα 11.

Η δοκιμή έγινε σε ένα αρνητικό και σε θετικά δείγματα για *N.meningitidis*, που σε προηγούμενα πειράματα είχαν αναπτύξει μη ειδικά προϊόντα.

Πίνακας 11. Χρόνοι και θερμοκρασίες που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό στάδιο 14.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος (min)	Αριθμός Κύκλων
1	95 °C	10:00	1
	95 °C	00:50	
2	60 °C	00:45	10
	68 °C	01:30	
	95 °C	00:50	
3	59 °C	00:45	25
	68 °C	01:30	
4	68 °C	03:00	1
5	4 °C	∞	

Πειραματικό στάδιο 15. Αύξηση χρόνου επέκτασης

Στο στάδιο αυτό διατηρήθηκε η μείωση των κύκλων και για να επιτευχθεί αύξηση της ευαισθησίας τροποποιήθηκε εκ νέου το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή. Αυτή τη φορά αυξήθηκε ο χρόνος επέκτασης (extention time) στο 3^ο στάδιο από 1:30 min σε 1:45 min (Πίνακας 12).

Η δοκιμή έγινε σε θετικά κλινικά δείγματα στα οποία δεν είχε προκύψει θετικό αποτέλεσμα με τις προηγούμενες συνθήκες.

Πίνακας 12. Χρόνοι και θερμοκρασίες που εφαρμόστηκαν κατά το πειραματικό στάδιο 15.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος (min)	Κύκλοι
1	95 °C	10:00	1
	95 °C	00:50	
2	60 °C	00:45	10
	68 °C	01:30	
	95 °C	00:50	
3	59 °C	00:45	25
	68 °C	01:45	
4	68 °C	03:00	1
5	4 °C	∞	

Πειραματικό στάδιο 16. Αύξηση της συγκέντρωσης των εκκινητών της οροομάδας A

Προκειμένου να βελτιωθεί η εικόνα του θετικού μάρτυρα, η ειδικότητα και η ευαισθησία της μεθόδου αυξήθηκε η συγκέντρωση των εκκινητών της οροομάδας A (A1/A2) από 0,2 μM σε 0,24 μM και μειώθηκε η συγκέντρωση των εκκινητών της οροομάδας C (C1/ C2) από 0,2 μM σε 0,16 μM .

Η εφαρμογή της δοκιμής έγινε σε θετικά και αρνητικά για μηνιγγιτιδόκοκκο κλινικά δείγματα.

Πειραματικό στάδιο 17. Κλιμακούμενη αύξηση της συγκέντρωσης του MgCl_2

Στο στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε κλιμακούμενη αύξηση της συγκέντρωσης του MgCl_2 από 3,5 mM σε 4 mM και 4,5 mM. Το πείραμα βασίστηκε στην υπόθεση ότι αύξηση του MgCl_2 θα βοηθούσε στην αύξηση της ειδικότητας του ενζύμου.

Η πρώτη δοκιμή έγινε σε ένα αρνητικό για μηνιγγιτιδόκοκκο δείγμα και σε ένα θετικό οροομάδας B, που σε προηγούμενες δοκιμές εμφάνιζε ένα μη ειδικό προϊόν ίδιου μοριακού βάρους με αυτό της οροομάδας C. Ακολούθησαν πολυάριθμες δοκιμές σε κλινικά δείγματα για την επαλήθευση του αποτελέσματος της τροποποίησης που εφαρμόστηκε.

Πειραματικό στάδιο 18. Αύξηση στον αριθμό των κύκλων του 3^{ου} σταδίου

Στο στάδιο αυτό τροποποιήθηκε το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή με αύξηση στον αριθμό των κύκλων στο 3^ο στάδιο από 25 σε 27, με σκοπό την αύξηση της ευαισθησίας.

Η εφαρμογή έγινε σε κλινικά δείγματα στα οποία δεν είχε αναπτυχθεί προϊόν με τις προηγούμενες συνθήκες.

Πειραματικό στάδιο 19. Τροποποίηση των συγκεντρώσεων των εκκινητών

Στο στάδιο αυτό τροποποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις των εκκινητών για τις ορομάδες Α και Β. Ειδικότερα, οι συγκεντρώσεις των εκκινητών Α1/Α2 αυξήθηκαν από 0,24 μΜ σε 0,28 μΜ, των εκκινητών Β1/Β2 αυξήθηκαν από 0,2 μΜ σε 0,24 μΜ και των εκκινητών C1/C2 μειώθηκαν από 0,16 μΜ σε 0,12 μΜ.

Οι νέες τροποποιήσεις εφαρμόστηκαν σε όλα τα θετικά για μηνιγγιτιδόκοκκο κλινικά δείγματα στα οποία δεν είχε προκύψει προϊόν με τις προηγούμενες συνθήκες.

Πειραματικό στάδιο 20. Τελικό στάδιο πειραμάτων

Το τελικό στάδιο για την ανάπτυξη της μεθόδου ήταν η εφαρμογή σε όλα τα θετικά κλινικά δείγματα που είχαν ταυτοποιηθεί με τις μεμονωμένες PCR κατά τα έτη 2003 έως 2006, καθώς και σε νέα δείγματα που απομονώθηκαν το τρέχον έτος, τα οποία δεν ήταν ταυτοποιημένα. Στην τελευταία περίπτωση γινόταν ένας επιπλέον έλεγχος με τις μεμονωμένες PCR για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος.

Πειραματικό στάδιο 21. Έλεγχος κατώτατου ορίου ανίχνευσης και ειδικότητας.

Επίσης, έγιναν δοκιμές σε στελέχη όλων των ορομάδων και σε βιολογικά υλικά που επιμολύνθηκαν από μηνιγγιτιδόκοκκο για τον έλεγχο του κατώτατου ορίου ανίχνευσης της τεχνικής καθώς, επίσης, και σε δείγματα θετικά για άλλα βακτήρια για τον έλεγχο διασταυρούμενων αντιδράσεων.

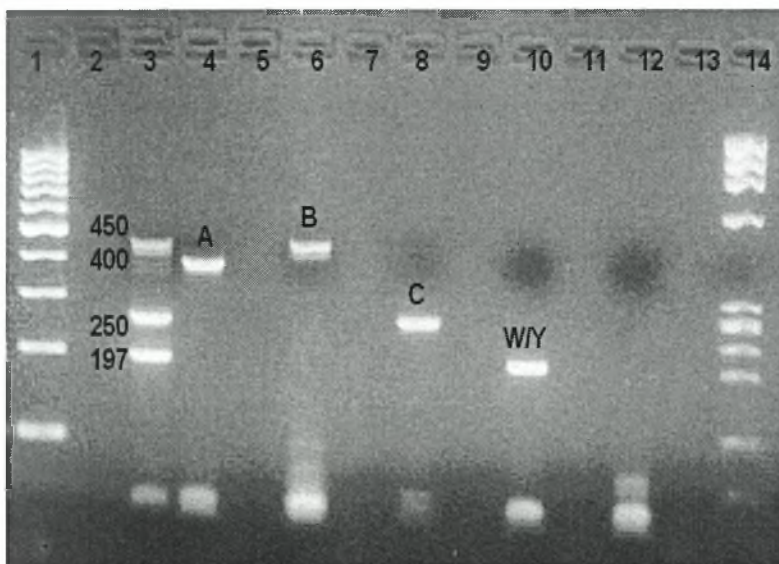
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Αναλυτικά αποτελέσματα των πειραματικών σταδίων 1-19

Πειραματικό στάδιο 1. Αρχική προσέγγιση

Με τις συνθήκες που εφαρμόστηκαν σχηματίστηκαν πολλά διμερή των εκκινητών B1/B2 (Εικόνα 4, διαδρομή 6), ενώ το προϊόν της οροομάδας A ήταν πολύ ασθενές στον θετικό μάρτυρα (διαδρομή 3). Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι εκκινητές για την οροομάδα B (B1/B2) ενδεχομένως να ήταν σε περίσσεια και ότι ίσως παρεμπόδιζαν την ενίσχυση του προϊόντος της οροομάδας A, το οποίο βρίσκεται πολύ κοντά ως προς το μέγεθος του προϊόντος για την οροομάδα B, όταν αυτά ενισχύονται ταυτόχρονα.

Εικόνα 4. Αποτελέσματα πρώτου πειραματικού σταδίου.



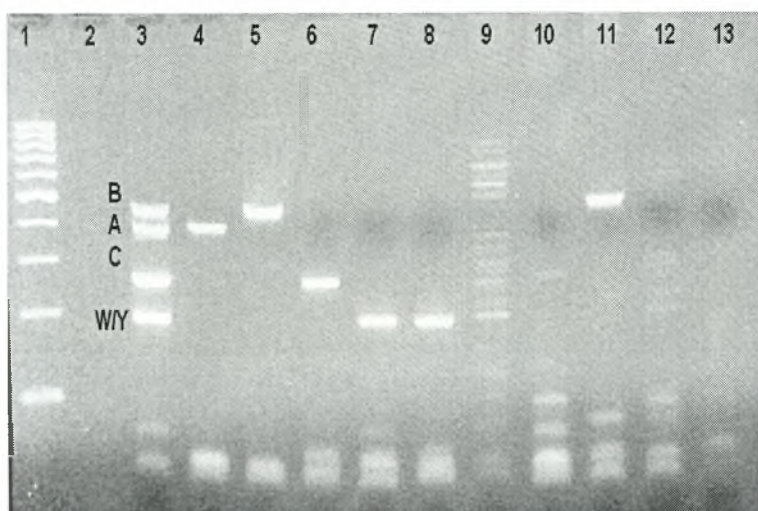
Πειραματικό στάδιο 2. Ελάττωση της συγκέντρωσης των εκκινητών για την οροομάδα B

Στην Εικόνα 5 παρατηρούνται ο θετικός μάρτυρας (διαδρομή 3), τα προϊόντα από τις πέντε οροομάδες στελεχών (A διαδρομή 4, B διαδρομή 5, C διαδρομή 6, W διαδρομή 7, Y διαδρομή 8), δύο δείγματα DNA από δείγματα αίματος που είχαν διαγνωστεί αρνητικά για μηνιγγιτιδόκοκκο (διαδρομές 9, 10), ένα δείγμα αίματος που είχε τυποποιηθεί ως οροομάδα B με την μεμονωμένη PCR (διαδρομή 11), ένα ακόμα δείγμα αίματος που είχε τυποποιηθεί ως οροομάδα Y (διαδρομή 12) και τέλος ο αρνητικός μάρτυρας (διαδρομή 13), που εξασφαλίζει ότι δεν έχει συμβεί επιμόλυνση.

Κατά το στάδιο αυτό παρατηρήθηκε ότι το DNA από στελέχη μηνιγγιτιδόκοκκου όλων των οροομάδων έδωσε πολύ ισχυρό προϊόν. Όμως, τα αρνητικά δείγματα εμφάνισαν πολλά μη ειδικά προϊόντα, όπως και το θετικό δείγμα οροομάδας Y. Μόνο το θετικό δείγμα οροομάδας B είχε ισχυρό προϊόν, χωρίς μη ειδικά προϊόντα.

Συνεπώς, απαιτούνταν αλλαγές στο πρόγραμμα ή στα αντιδραστήρια που θα εξασφάλιζαν μεγαλύτερη ειδικότητα, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η εμφάνιση μη ειδικών προϊόντων.

Εικόνα 5. Δοκιμή των πρώτων κλινικών δειγμάτων.

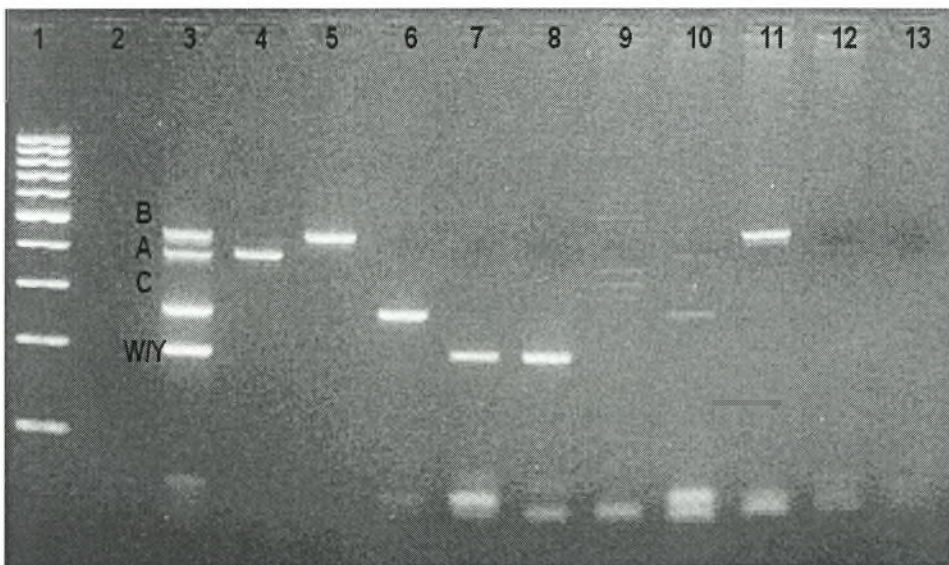


Πειραματικό στάδιο 3. Τροποποίηση προγράμματος με αύξηση της θερμοκρασίας υβριδισμού

Η Εικόνα 6 παρουσιάζει τα προϊόντα από τα στελέχη όλων των οροομάδων (οροομάδα A διαδρομή 4, οροομάδα B διαδρομή 5, οροομάδα C διαδρομή 6, οροομάδα W διαδρομή 7, οροομάδα Y διαδρομή 8), τα οποία εξακολουθούσαν να έχουν πολύ προϊόν της PCR και καθαρή εικόνα. Στα προϊόντα των αρνητικών δειγμάτων (διαδρομές 9, 10) παρατηρήθηκε μείωση των μη ειδικών προϊόντων. Το δείγμα αίματος οροομάδας B (διαδρομή 11) είχε ισχυρό και καθαρό προϊόν, σε αντίθεση με το δείγμα αίματος οροομάδας Y, το οποίο δεν εμφάνισε το επιθυμητό προϊόν, παρά μόνο μη ειδικά προϊόντα.

Με την τροποποίηση αυτή προέκυψε ότι οι συνθήκες αυτές δεν εξασφάλιζαν την απαιτούμενη ειδικότητα και συνεπώς χρειάζονταν περαιτέρω τροποποιήσεις.

Εικόνα 6. Αποτελέσματα της αύξησης της θερμοκρασίας υβριδισμού.

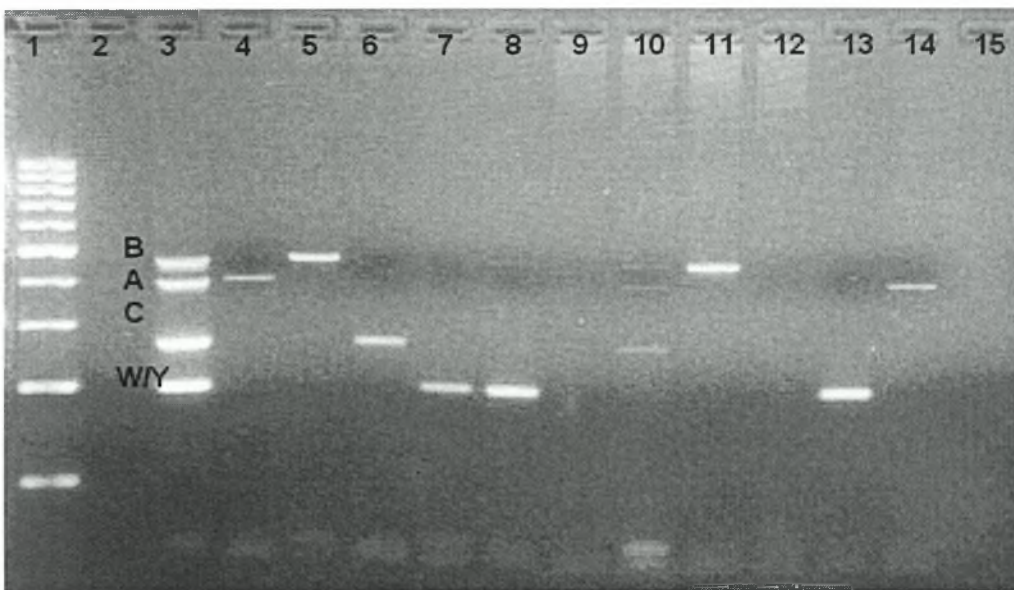


Πειραματικό στάδιο 4. Μείωση αριθμού κύκλων και εισαγωγή ενός επιπλέον σταδίου

Η ποιότητα των αποτελεσμάτων βελτιώθηκε σημαντικά με τις τροποποιήσεις του προγράμματος, αφού μειώθηκαν τα μη ειδικά προϊόντα. Ωστόσο, μειώθηκε το σήμα του προϊόντος της ορομάδας A.

Στην Εικόνα 7 παρατηρείται η μείωση των μη ειδικών προϊόντων σε αρνητικό για μηνιγγιτιδόκοκκο κλινικό δείγμα (διαδρομή 9). Παρατηρήθηκε, όμως, η ύπαρξη μη ειδικών προϊόντων σε θετικό για μηνιγγιτιδόκοκκο και αρνητικό για ορομάδα δείγμα (διαδρομή 10). Επίσης, διαπιστώθηκε η μείωση του προϊόντος της ορομάδας A (διαδρομές 4, 14).

Εικόνα 7. Αποτελέσματα από την εισαγωγή νέου σταδίου και την μείωση των κύκλων.

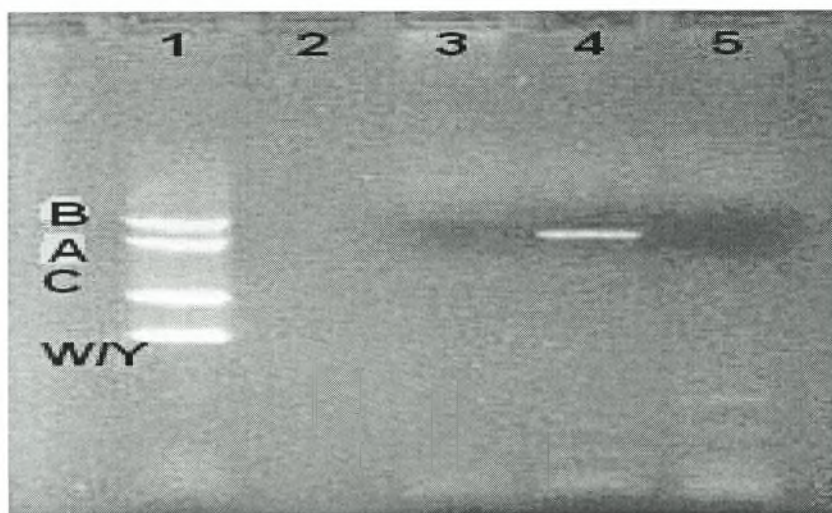


Πειραματικό στάδιο 5. Αύξηση της συγκέντρωσης των εκκινητών της οροομάδας A και μείωση της συγκέντρωσης των εκκινητών της οροομάδας B

Μετά την τροποποίηση της συγκέντρωσης των εκκινητών παρατηρήθηκε βελτίωση στην ένταση του προϊόντος της οροομάδας A (Εικόνα 8, διαδρομή 4). Επίσης, ήταν καθαρότερη η εικόνα του αρνητικού δείγματος (διαδρομή 3). Ωστόσο, εμφανίστηκαν μη ειδικά προϊόντα σε κάποια θετικά δείγματα, με μοριακό βάρος μικρότερο από αυτό του προϊόντος της οροομάδας A (η φωτογραφία δεν προβάλλεται).

Επομένως, οι νέες συγκεντρώσεις έδωσαν επιθυμητό αποτέλεσμα, χωρίς όμως να εξασφαλίσουν πολύ ειδικές συνθήκες.

Εικόνα 8. Αποτελέσματα από την αλλαγή της συγκέντρωσης των εκκινητών.

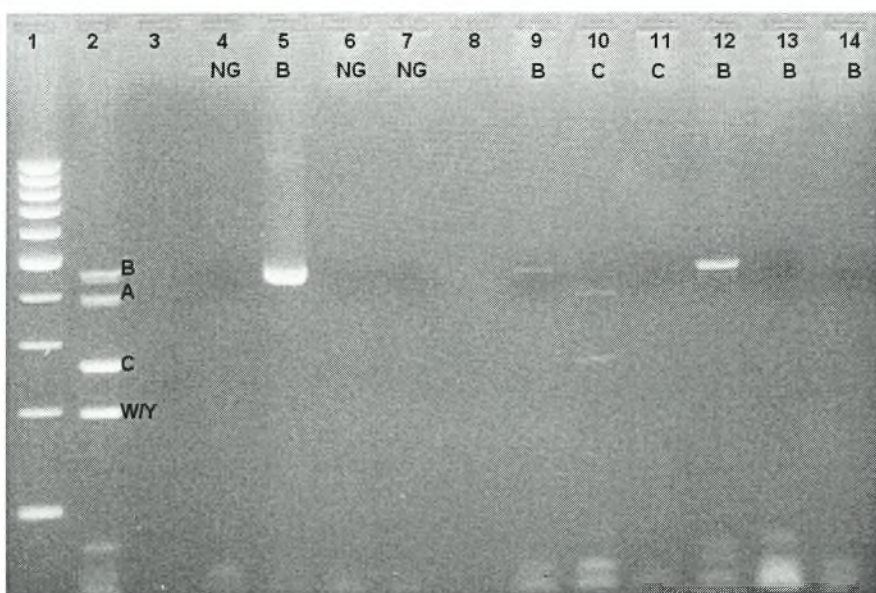


Πειραματικό στάδιο 6. Κατάργηση ενός σταδίου από το πρόγραμμα για την αύξηση της ευαισθησίας

Τα αποτελέσματα της τροποποίησης του προγράμματος του θερμοκυκλοποιητή έδειξαν ελάχιστη μείωση των μη ειδικών προϊόντων, ενώ κάποια θετικά δείγματα ήταν μη ανιχνεύσιμα. Επομένως, φαίνεται να μειώθηκε πολύ η ευαισθησία της τεχνικής, λόγω των πολύ αυστηρών συνθηκών.

Πράγματι, στην Εικόνα 9, παρατηρήθηκε ότι δεν ανιχνεύθηκε προϊόν PCR σε θετικά για οροομάδα δείγματα (διαδρομές 11, 13), ενώ σε ένα το αποτέλεσμα ήταν πάρα πολύ αχνό (διαδρομή 14). Αντίθετα, τα αποτελέσματα στα αρνητικά δείγματα ήταν ικανοποιητικά (διαδρομές 4, 6, 7).

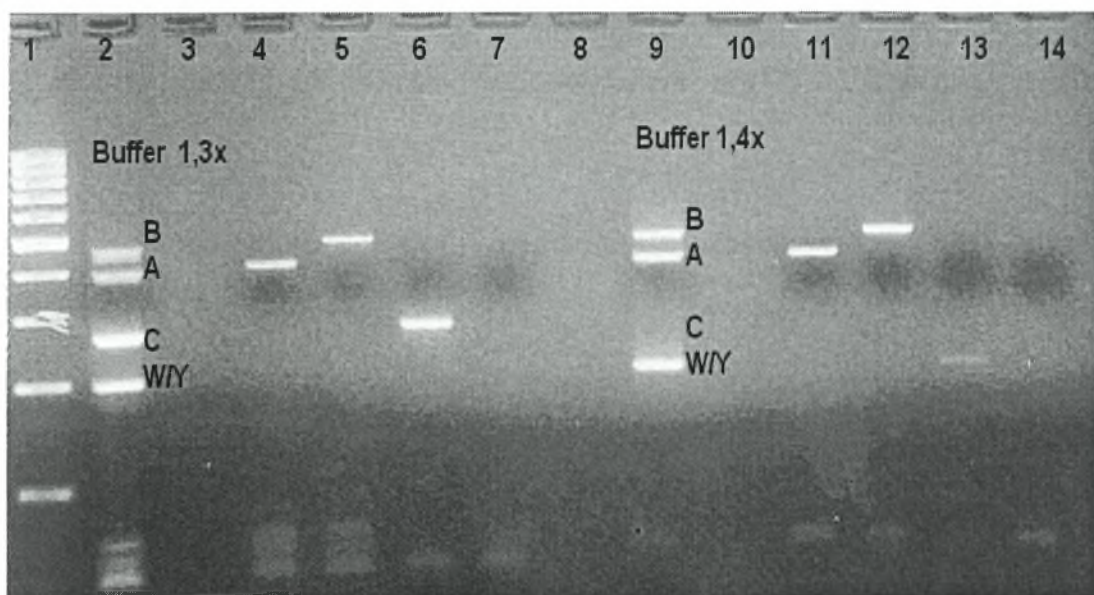
Εικόνα 9. Αποτελέσματα από την κατάργηση του ενός σταδίου από το πρόγραμμα.



Πειραματικό στάδιο 7. Αύξηση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος

Με την αύξηση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος παρατηρήθηκε ότι στη συγκέντρωση 1,3x το προϊόν του θετικού μάρτυρα είχε αναπτυχθεί πολύ καλά (Εικόνα 10, διαδρομή 2), καθώς και το DNA από τα στελέχη οροομάδας A με συγκέντρωση 5pg/μL (διαδρομή 4), οροομάδας B με συγκέντρωση 5pg/μL (διαδρομή 5), οροομάδας C με συγκέντρωση 5pg/μL (διαδρομή 6). Αντίθετα, στη δοκιμή με συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος 1,4x έχει ανασταλεί ο σχηματισμός του προϊόντος της οροομάδας C τόσο στον θετικό μάρτυρα (διαδρομή 9), όσο και στο στέλεχος οροομάδας C με συγκέντρωση 5ng/μL (διαδρομή 13).

Εικόνα 10. Αποτελέσματα από την κλιμακούμενη αύξηση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος.



Πειραματικό στάδιο 8. Αύξηση της συγκέντρωσης των εκκινητών της οροομάδας B

Από τις δοκιμές σε βιολογικά υλικά προέκυψε ότι σε μερικά δεν ανιχνεύθηκε οροομάδα με την παρούσα τεχνική, ενώ σταδιακά παρατηρήθηκε εξασθένιση του σήματος των οροομάδων A και B στον θετικό μάρτυρα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η έλλειψη του προϊόντος οροομάδας B ήταν συχνότερη.

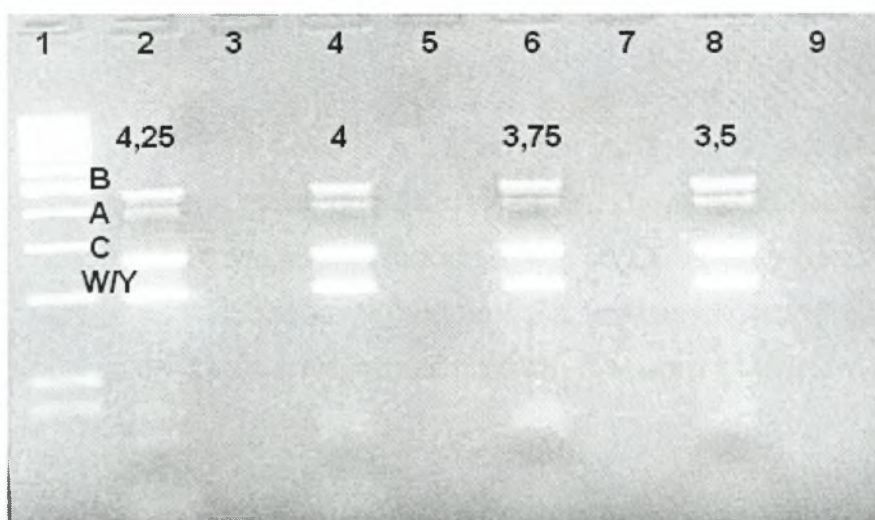
Με την αύξηση της συγκέντρωσης των εκκινητών για την οροομάδα B που πραγματοποιήθηκε δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη ενίσχυση του προϊόντος για τη συγκεκριμένη οροομάδα.

Πειραματικό στάδιο 9. Μείωση της συγκέντρωσης του $MgCl_2$

Τα αποτελέσματα από την κλιμακούμενη μείωση της συγκέντρωσης του $MgCl_2$ φαίνονται στην Εικόνα 11. Παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση 3,5 mM του $MgCl_2$ έδωσε το καλύτερο αποτέλεσμα (διαδρομή 8).

Αντίθετα, οι δοκιμές σε κλινικά δείγματα, έδειξαν ότι τα μεγαλύτερα προϊόντα, δηλαδή αυτά των οροομάδων A και B, δεν ενισχύονταν ικανοποιητικά.

Εικόνα 11. Αποτελέσματα από την κλιμακούμενη μείωση της συγκέντρωσης του $MgCl_2$.

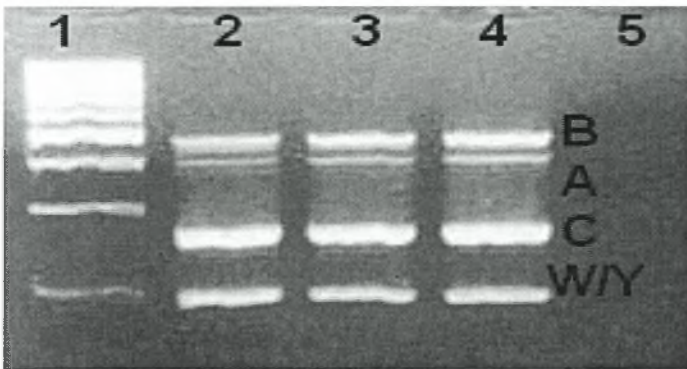


Πειραματικό στάδιο 10. Κλιμακούμενη αύξηση του ενζύμου της taq DNA πολυμεράσης

Η κλιμακούμενη αύξηση του ενζύμου της taq DNA πολυμεράσης που δοκιμάστηκε στον θετικό μάρτυρα είχε σαν αποτέλεσμα να ενισχυθεί το προϊόν της οροομάδας B, όχι όμως και το προϊόν της οροομάδας A.

Η αύξηση στη συγκέντρωση των εκκινητών της οροομάδας A δεν επέφερε θετικό αποτέλεσμα, όπως παρατηρήθηκε στην Εικόνα 12.

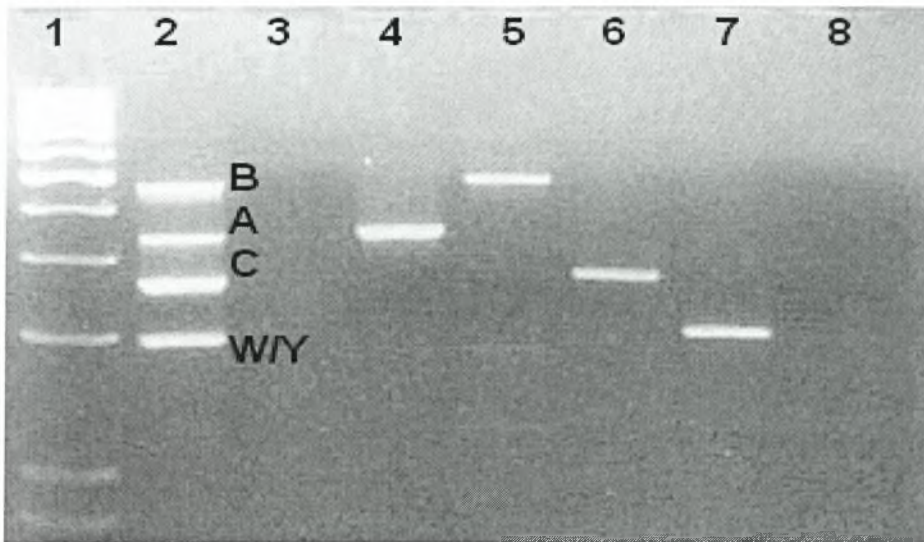
Εικόνα 12. Αποτελέσματα από την αύξηση της συγκέντρωσης των εκκινητών για την οροομάδα A1,A2.



Πειραματικό στάδιο 11. Σχεδιασμός νέου ζεύγους εκκινητών για την οροομάδα A

Στην Εικόνα 13 φαίνεται η χρήση των νέων εκκινητών SA1 και SA2 στον θετικό μάρτυρα (διαδρομή 2) και σε στελέχη μηνιγγιτιδόκοκκου διαφορετικών οροομάδων (οροομάδα A διαδρομή 4, οροομάδα B διαδρομή 5, οροομάδα C διαδρομή 6, οροομάδα W διαδρομή 7). Τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά και κατά συνέπεια συνεχίστηκε η χρήση των νέων εκκινητών.

Εικόνα 13. Αποτελέσματα της πρώτης δοκιμής των εκκινητών της οροομάδας A (SA1/ SA2).



Πειραματικό στάδιο 12. Ποιοτικός έλεγχος της τεχνικής

Οι δοκιμές που έγιναν στους θετικούς μάρτυρες για τον ποιοτικό έλεγχο της τεχνικής (quality control) είχαν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Οι δοκιμές σε κλινικά δείγματα αρνητικά για μηνιγγιτιδόκοκκο οδήγησαν στην ανάπτυξη μη ειδικών προϊόντων. Κατά συνέπεια, έπρεπε οι συνθήκες εφαρμογής της μεθόδου να γίνουν πιο ειδικές.

Πειραματικό στάδιο 13. Μείωση της συγκέντρωσης της taq DNA πολυμεράσης.

Με την μείωση της συγκέντρωσης της taq πολυμεράσης σε 1,2 U παρατηρήθηκε αύξηση της ειδικότητας της μεθόδου χωρίς να παρατηρηθεί μείωση της ευαισθησίας.

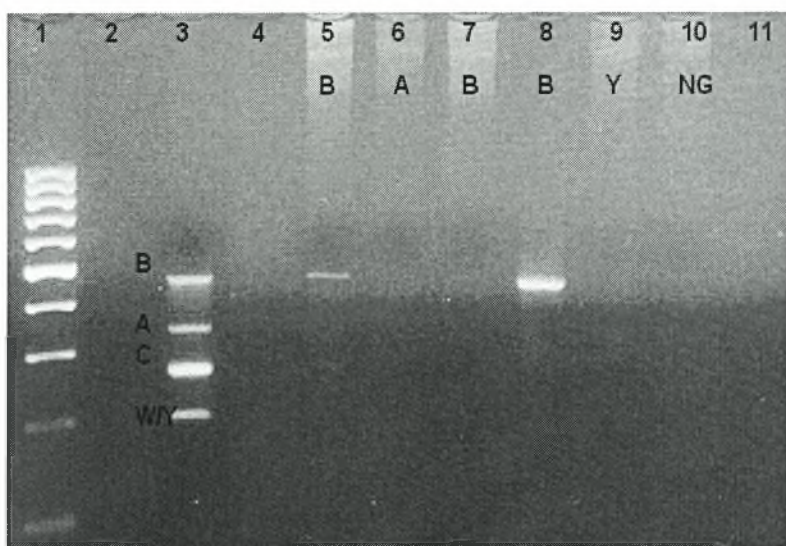
Στις δοκιμές που έγιναν σε κλινικά δείγματα παρατηρήθηκε ότι στα περισσότερα από αυτά, παρόλο που ανιχνευόταν προϊόν, δεν μπορούσε να γίνει ικανοποιητική τυποποίηση λόγω της εμφάνισης και μη ειδικών

προϊόντων. Επιπλέον, συχνά είχαν ίδιο μοριακό βάρος με το προϊόν της ορομάδας C ή της WY. Κατά συνέπεια, η μείωση του ενζύμου δεν ήταν επαρκής για την εξασφάλιση της ειδικότητας της μεθόδου.

Πειραματικό στάδιο 14. Μείωση αριθμού κύκλων.

Μετά την τροποποίηση του προγράμματος του θερμοκυκλοποιητή, περιορίστηκαν μεν σημαντικά τα μη ειδικά προϊόντα στα κλινικά δείγματα (Εικόνα 14), αλλά μόνο σε δύο από τα δείγματα αναπτύχθηκε προϊόν (ορομάδας B διαδρομή 5, ορομάδας B διαδρομή 8).

Εικόνα 14. Αποτελέσματα από την μείωση των κύκλων.

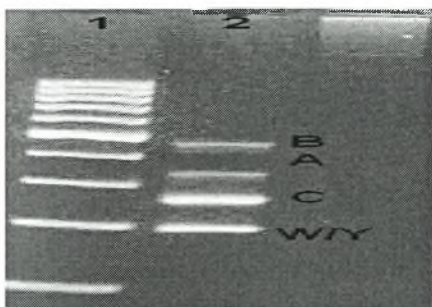


Πειραματικό στάδιο 15. Αύξηση χρόνου επέκτασης.

Τα αποτελέσματα από την αύξηση του χρόνου επέκτασης του τρίτου σταδίου στο πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή ήταν ικανοποιητικά δεδομένου ότι σε κάποια από τα κλινικά δείγματα προέκυψε προϊόν, ενώ με τις προηγούμενες συνθήκες δεν είχε αναπτυχθεί προϊόν σε κανένα από αυτά.

Επίσης, αξιοσημείωτη ήταν η εικόνα του θετικού μάρτυρα, όπου, το σήμα των οροομάδων A και B ήταν ασθενέστερο και της οροομάδας C ήταν εμφανώς εντονότερο από τις υπόλοιπες οροομάδες (Εικόνα 15).

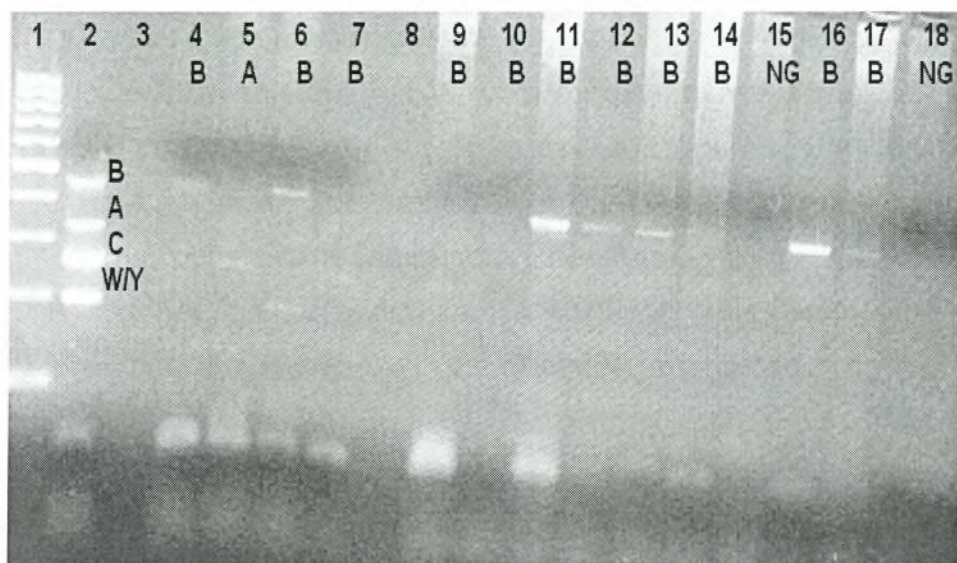
Εικόνα 15. Θετικός μάρτυρας.



Πειραματικό στάδιο 16. Αύξηση της συγκέντρωσης των εκκινητών της οροομάδας A.

Με την αύξηση της συγκέντρωσης των εκκινητών της οροομάδας A παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση στην εικόνα του θετικού μάρτυρα, αν και το σήμα των προϊόντων των οροομάδων C και W-135/Y είναι πιο ισχυρό από το σήμα των προϊόντων των οροομάδων A και B (Εικόνα 16), (διαδρομή 2). Σε ορισμένα από τα κλινικά δείγματα διαπιστώθηκε η ανάπτυξη μη ειδικών προϊόντων (διαδρομές 5, 7, 9), σε άλλα δεν προέκυψε προϊόν (διαδρομή 14), ενώ σε μερικά ενισχύθηκε το DNA-στόχος ταυτόχρονα με μη ειδικά προϊόντα (διαδρομές 6,12).

Εικόνα 16. Αποτελέσματα της τροποποίησης της συγκέντρωσης των εκκινητών A1/A2 και C1/C2.



Για να αποκλεισθεί το ενδεχόμενο επιμόλυνσης των δειγμάτων που εμφάνιζαν μη ειδικά προϊόντα στο ύψος των προϊόντων των ορομάδων C και W/Y έγιναν ξανά δοκιμές για την ορομάδα με τις μεμονωμένες PCR. Διαπιστώθηκε ότι τα προβλήματα οφείλονται όντως στην χαμηλή ειδικότητα της μεθόδου, όπως αυτή είχε διαμορφωθεί έως αυτό το σημείο και όχι σε επιμολύνσεις.

Πειραματικό στάδιο 17. Κλιμακούμενη αύξηση της συγκέντρωσης του MgCl₂.

Με το πείραμα της κλιμακούμενης αύξησης της συγκέντρωσης του MgCl₂ διαπιστώθηκε σημαντική μείωση της έντασης του σήματος του μη ειδικού προϊόντος όταν το MgCl₂ αυξήθηκε σε συγκέντρωση 4,5 mM.

Με τις επιπρόσθετες δοκιμές που ακολούθησαν επιβεβαιώθηκε η επίλυση του προβλήματος των μη ειδικών προϊόντων. Ωστόσο, παρέμεινε το πρόβλημα της χαμηλής ευαισθησίας, αφού πολλά από τα θετικά δείγματα δεν ανιχνεύονταν (κυρίως οροομάδων A και B). Επίσης, στον θετικό μάρτυρα η οροομάδα C είχε πιο έντονο σήμα σε σχέση με τις υπόλοιπες.

Πειραματικό στάδιο 18. . Αύξηση του αριθμού των κύκλων του 3^{ου} σταδίου.

Η αύξηση των κύκλων στο πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή δεν οδήγησε στην ενίσχυση της ευαισθησίας της μεθόδου, αφού δεν αναπτύχθηκε προϊόν σε κανένα από τα δείγματα που δοκιμάστηκαν.

Πειραματικό στάδιο 19. Τροποποίηση των συγκεντρώσεων των εκκινητών.

Τα αποτελέσματα από την τροποποίηση των συγκεντρώσεων των εκκινητών των οροομάδων A και B ήταν ικανοποιητικά, αφού με την αλλαγή αυτή τυποποιήθηκαν ως προς την οροομάδα σχεδόν όλα τα θετικά δείγματα που δεν είχαν ανιχνευθεί με τις προηγούμενες PCR.

Οι δοκιμές που έγιναν στα κλινικά δείγματα επιβεβαίωσαν ότι οι συνθήκες αυτές σε συνδυασμό με τις συγκεκριμένες αναλογίες των αντιδραστηρίων ήταν οι ιδανικές για την επιτυχή εφαρμογή της τετραπλής PCR για την ταυτόχρονη ταυτοποίηση του μηνιγγιτιδόκοκκου ως προς την οροομάδα.

2. Τελικά αποτελέσματα

Πειραματικό στάδιο 20. Τελικό στάδιο πειραμάτων.

Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε κλινικά δείγματα τα οποία προήλθαν από 197 ασθενείς και είχαν σταλεί στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας κατά την χρονική περίοδο 2003 έως 2007. Η **ευαισθησία** της μεθόδου, με βάση τις δοκιμές στα δείγματα που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια των ετών 2003 έως 2006 και σε σύγκριση με την ταυτοποίηση από την προηγούμενη τεχνική, ανήλθε σε ποσοστό **81%** σε αντίθεση με την ευαισθησία της τεχνικής σε δείγματα που εστάλησαν για τυποποίηση το 2007, όπου το ποσοστό ανήλθε σε **100%** (Πίνακες 13 και 14). Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από την παλαιότητα των δειγμάτων, σε συνδυασμό με την πολλαπλή χρήση τους για διαγνωστικούς και ερευνητικούς σκοπούς και με τον τρόπο φύλαξής τους (Alice J. Sigurdson, 2006).

Πίνακας 13. Σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο τεχνικών σε δείγματα που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια των ετών 2003-2006.

Έτη 2003-2006			
Οροομάδα	Μεμονωμένη PCR	Τετραπλή PCR	Νέες τυποποιήσεις
A	16	3	1 δείγμα οροομάδας A τυποποιήθηκε ως B
B	107	91	1 δείγμα οροομάδας B τυποποιήθηκε ως C
C	5	5	
W135	5	1	
Υ	1	0	
Μη τυποποιήσιμα	34	30	4 μη τυποποιήσιμα τυποποιήθηκαν ως B

Πίνακας 14. Σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο τεχνικών σε δείγματα του έτους 2007.

Ετος 2007			
Οροομάδα	Μεμονωμένη PCR	Τετραπλή PCR	Νέες τυποποιήσεις
A	0	0	
B	21	21	
C	1	1	
W135	1	1	
Υ	0	0	
Μη τυποποιήσιμα	6	6	

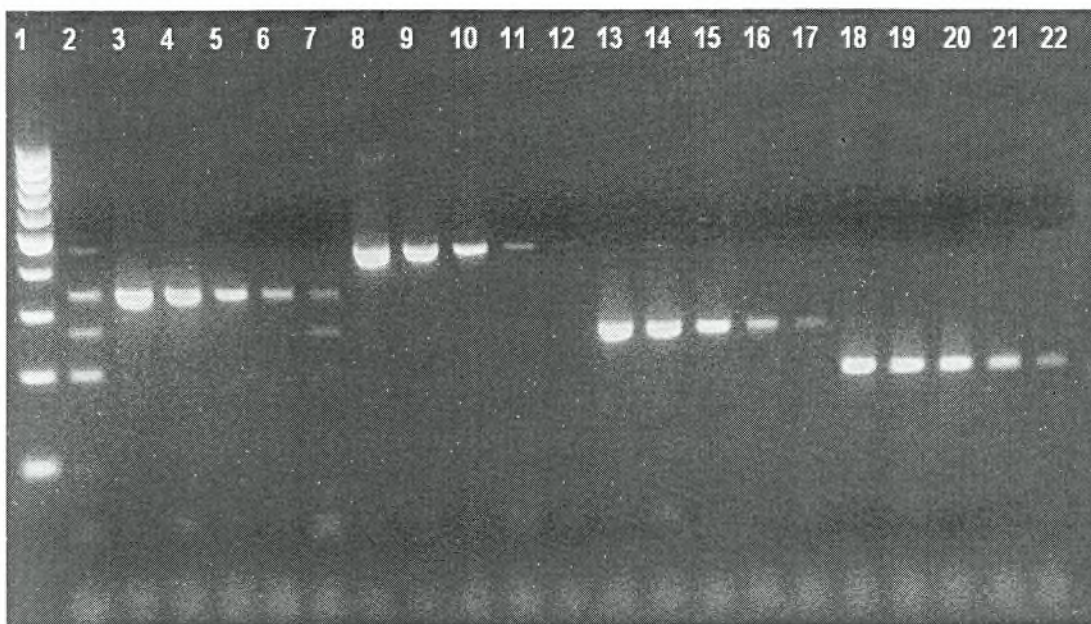
Πειραματικό στάδιο 21. Έλεγχος κατώτατου ορίου ανίχνευσης και ειδικότητας.

Η **ειδικότητα** της τεχνικής ελέγχθηκε σε κλινικά δείγματα ασθενών με μηνιγγίτιδα, άλλης βακτηριακής αιτιολογίας. Συγκεκριμένα, έγιναν δοκιμές σε δείγματα με *S.pneumoniae*, *L.monocytogenes* και *H.influenzae*, βακτήρια που ενοχοποιούνται πιο συχνά για μηνιγγίτιδα μετά τη *N.meningitides*. Δεν παρατηρήθηκε η ανάπτυξη προϊόντος σε κανένα από τα δείγματα, γεγονός που σημαίνει ότι η ειδικότητα της μεθόδου είναι **100%**.

Για τον προσδιορισμό του **κατώτατου ορίου ανίχνευσης** της τεχνικής έγιναν δοκιμές σε **στελέχη** μηνιγγιτιδόκοκκου όλων των οροομάδων με κλιμακούμενη μείωση της συγκέντρωσης του DNA. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 17, το κατώτερο όριο ανίχνευσης για όλες τις οροομάδες (οροομάδα A διαδρομή 7, οροομάδα B διαδρομή 12, οροομάδα C διαδρομή 17, οροομάδες W 135/Υ διαδρομή 22) είναι **1 pg/μL**. Όμως, το προϊόν της οροομάδας B που προέκυψε, από αρχική συγκέντρωση βακτηριακού DNA ίση με 1 pg/μL, ήταν ασθενέστερο σε σχέση με τις υπόλοιπες οροομάδες.

Για τον έλεγχο του κατώτατου ορίου ανίχνευσης και σε βιολογικά υλικά επιμολύνθηκε αίμα υγιούς ατόμου με στελέχη μηνιγγιτιδόκοκκου, έτσι ώστε η συγκέντρωση του μηνιγγιτιδοκοκκικού DNA να είναι ίση με **1 pg/μL**. Με τον τρόπο αυτό, παρασκευάστηκε ένα δείγμα για κάθε οροομάδα, καθώς και ένα που περιείχε στελέχη όλων των οροομάδων. Στα δείγματα αυτά εφαρμόστηκε η τετραπλή PCR και διαπιστώθηκε ότι και στα βιολογικά υλικά το κατώτερο όριο ανίχνευσης είναι 1 pg/μL για όλες τις οροομάδες, με εξαίρεση το προϊόν της οροομάδας B, που ήταν πολύ ασθενές στη συγκέντρωση 1 pg/μL και κατά συνέπεια δεν ήταν πάντα ευδιάκριτο. Στο δείγμα που περιείχε μηνιγγιτιδόκοκκο από όλες της οροομάδες η ανίχνευση ήταν επιτυχής.

Εικόνα 17. Προσδιορισμός της ευαισθησίας της σε στελέχη μηνιγγιτιδόκοκκου.



Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το βακτήριο *N.meningitidis* αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες της βακτηριακής μηνιγγίτιδας, ενώ πολύ συχνά ενοχοποιείται για μηνιγγοκοκκαιμία, μηνιγγοεγκεφαλίτιδα και πνευμονία. Για τον λόγο αυτό, είναι αναγκαία η ταχεία και ακριβής διάγνωση της μηνιγγιτιδοκοκκικής λοίμωξης. Εξίσου σημαντική είναι η τυποποίηση του μηνιγγιτιδόκοκκου ως προς την ορομάδα, διότι είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό και την αντιμετώπιση των επιδημικών εξάρσεων, καθώς και για την διεξαγωγή επιδημιολογικών μελετών, οι οποίες εξετάζουν την αποτελεσματικότητα των υπαρχόντων εμβολίων και καθορίζουν την ανάγκη για εξέλιξή τους.

Η μέθοδος που εφαρμοζόταν μέχρι τώρα σε παγκόσμιο επίπεδο για την τυποποίηση της ορομάδας του μηνιγγιτιδόκοκκου είναι οι μεμονωμένες PCR (Muhamed-Kheir Taha, 2000), όπου σε κάθε αντίδραση είναι εφικτή η ανίχνευση μίας και μόνο ορομάδας. Το γεγονός αυτό είχε ως συνέπεια την εφαρμογή μέχρι και πέντε διαφορετικών αντιδράσεων PCR (μία για κάθε ορομάδα), στα βιολογικά υλικά. Κατά συνέπεια, πρόκειται για μία χρονοβόρα και αρκετά υψηλού κόστους τεχνική. Για τον λόγο αυτόν πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία που είχε ως σκοπό την ανάπτυξη μίας τετραπλής PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των ορομάδων του μηνιγγιτιδόκοκκου σε στελέχη και βιολογικά υλικά.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις ορομάδες B, C, W/Y στοχεύουν σε διαφορετικές περιοχές του γονιδίου **siaD**. Το γονίδιο αυτό ανήκει στο οπερόνιο *siaA-D* και κωδικοποιεί για την πολυσιαλική τρानσφεράση, η οποία συμμετέχει στον πολυμερισμό του σιαλικού οξέος στο πολυσακχαριδικό έλυτρο των βακτηρίων. Διαφορές στην αλληλουχία μεταξύ των *siaD* γονιδίων των τεσσάρων παραπάνω ορομάδων συνεπάγονται λειτουργικές διαφορές στις πολυσιαλικές τρानσφεράσες που παράγονται από τις ορομάδες αυτές. Το γεγονός αυτό έχει σαν συνέπεια τις δομικές και αντιγονικές διαφορές μεταξύ των ορομάδων. Στις διαφορές αυτές της αλληλουχίας των *siaD* γονιδίων βασίστηκε ο σχεδιασμός των εκκινητών για τις ορομάδες B, C, W/Y (Muhamed-Kheir Taha, 2000), (John S. Swartley, 1998), (William S. Probert, 2002). Ωστόσο, επιδημιολογικές μελέτες αποδεικνύουν ότι τα κρούσματα από βακτήρια των ορομάδων W-135 και Y είναι σπάνια. Με βάση το γεγονός αυτό και λόγω της μεγάλης ομολογίας που παρατηρείται μεταξύ των *siaD* γονιδίων των δύο ορομάδων επιλέχθηκε ένα

ζεύγος εκκινητών, το οποίο στοχεύει σε όμοια περιοχή των *sisA* γονιδίων των οροομάδων W-135 και Y και ενισχύει ταυτόχρονα και τις δύο οροομάδες (William S. Probert, 2002). Οι δε εκκινητές για τις οροομάδες B, C που χρησιμοποιήθηκαν είχαν σχεδιαστεί από τους Taha και συν. (Muhamed-Kheir Taha, 2000).

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την οροομάδα A στοχεύουν στο γονίδιο **orf2**. Αυτό ανήκει στο οπερόνιο *orf1-orf4*, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση του πολυσακχαριδικού ελύτρου οροομάδας A. Πιστεύεται ότι το γονίδιο *orf2* κωδικοποιεί για τη σύνθεση της (α 1 \rightarrow 6) UDP-ManNAc πολυμεράσης. Η περιοχή αυτή, που εντοπίζεται το οπερόνιο *orf1-4*, έχει μήκος 218 bp και δεν έχει καμία ομολογία με την αντίστοιχη περιοχή μήκους 134 bp, που εντοπίζεται στις οροομάδες με έλυτρο σιαλικού οξέος (John S. Swartley, 1998). Αρχικά, για την οροομάδα A, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που είχαν σχεδιαστεί από τους Taha και συν. (Muhamed-Kheir Taha, 2000).

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, όμως, διαπιστώθηκε η ανάγκη για σχεδιασμό νέων εκκινητικών μορίων για την οροομάδα A. Οι παρατηρήσεις που συνηγόρησαν σε αυτή την απόφαση ήταν η δυσκολία διάκρισης των προϊόντων των οροομάδων A και B μετά την ηλεκτροφόρηση, λόγω της μικρής διαφοράς τους στο μοριακό τους βάρος και η έντονη ενίσχυση του προϊόντος της οροομάδας B σε σχέση με το προϊόν της οροομάδας A. Η επιλογή των εκκινητικών μορίων βασίστηκε στα παρακάτω κριτήρια:

1. τη μοναδικότητα των περιοχών των γονιδίων που θα ενισχύσουν στις προς ανίχνευση οροομάδες του μηνιγγιτιδόκοκκου,
2. οι αντίστοιχες αντιδράσεις να πραγματοποιούνται σε όσο το δυνατόν πλησιέστερη θερμοκρασία,
3. τα τελικά προϊόντα να διαφέρουν σε μέγεθος έτσι ώστε να είναι δυνατός ο εύκολος διαχωρισμός τους, όταν ηλεκτροφορηθούν σε πήκτωμα αγαρόζης ως αποτέλεσμα πολλαπλής PCR.

Τελικά, σχεδιάστηκε ένα νέο ζεύγος εκκινητών που οδήγησε στην παραγωγή ενός προϊόντος για την οροομάδα A μικρότερου μοριακού βάρους, το οποίο σε συνδυασμό με τις κατάλληλες συνθήκες έδωσε λύση στα παραπάνω προβλήματα. Οι νέοι εκκινητές που σχεδιάστηκαν στοχεύουν επίσης στο γονίδιο *orf2* (accession no. AL157959).

Αρχικά, η ανάπτυξη της τεχνικής έγινε σε στελέχη μηνιγγιτιδόκοκκου που είχαν απομονωθεί από καθαρές καλλιέργειες. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε σε βιολογικά υλικά, κυρίως αίμα και ENY, και βελτιστοποιήθηκε. Η τεχνική βασίζεται στην εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας υβριδισμού στους πρώτους κύκλους της αντίδρασης, η οποία μειώνεται κατά 1 °C στους επόμενους κύκλους. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται αρχικά ο εξειδικευμένος υβριδισμός των εκκινητικών μορίων στα γονίδια στόχους, ενώ στους επόμενους κύκλους εξασφαλίζεται η υψηλή απόδοση της PCR.

Η ευαισθησία της με βάση δείγματα που παραλαμβάνονταν την ίδια ημέρα είναι 100%, σε αντίθεση με την ευαισθησία της τεχνικής όπως αυτή προέκυψε από δείγματα παλαιότερων ετών και είναι 81%. Μετά το τέλος των πειραμάτων, η παρούσα τεχνική εφαρμόζεται από το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας με απόλυτη επιτυχία. Η ειδικότητα της ανέρχεται σε 100%, αφού οι εκκινητές δεν οδηγούν στην ανάπτυξη προϊόντος σε κλινικά δείγματα ασθενών με μηνιγγίτιδα άλλης βακτηριακής αιτιολογίας. Το δε ελάχιστο όριο ανίχνευσης είναι 1 ρg/μL για όλες τις οροομάδες και δεν επηρεάζεται από το είδος του βιολογικού υλικού.

Η παρούσα τεχνική της τετραπλής PCR είναι μία απλή και αξιόπιστη τεχνική, με την οποία μπορεί να γίνει η ταυτοποίηση της οροομάδας του μηνιγγιτιδόκοκκου σε βιολογικά υλικά. Είναι ταχεία και χαμηλότερου κόστους σε σχέση με τις μεμονωμένες PCR που εφαρμόζονταν έως τώρα για τον σκοπό αυτό.

Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Τζένη-Κουρέα Κρεμαστινού, Τζωρτζίνα Τζανακάκη, Αριστέα Βελεγράκη. Η μηνιγγιτιδοκοκκική νόσος. Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας. Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας. Αθήνα 1996.
- Lambert HP. Infections of the central nervous system. BC Decker, Philadelphia & E. Arnold, London 1991.
- Diederik van de Beek, Jan de Gans, Allan R. Tunkel and Eelco F.M. Wijdicks. Community-Acquired Bacterial Meningitis in adults. N. Engl J Med 2006; 354: 44-53.
- G. Tzanakaki, M. Tsopanomichalou, K. Kesanopoulos, R. Matzourani, M. Sioumala, A. Tabaki and J. Kremastinou. Simultaneous single-tube PCR assay for the detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae type B* and *Streptococcus pneumoniae*. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 386-390.
- Lee H. Harisson. Prospects for Vaccine Prevention of Meningococcal Infection. Clinical Microbiology Reviews, Jan.2006, p. 142-164.
- Vieusseux G. Journal de Medicin Chirurgie Pharmacil, 1806; XI: 163.
- Daniels L. Mann E. Letter in the Medical and Agricultural Register Vol 1, No 5 (Daniel Adams Ed) 1806; Manning and Loring Publishers, Boston.
- Branham SE. Milestones in the history of the history of the meningococcus. Can J Microbiol 1956; 2: 175-188.
- Gordon, MH and E.G.P. Murray. 1915 Identification of the meningococcus. I.R. Army Med. Corps 25: 411-423.
- Lapeyssonnie L. La menigite cerebrospinale en Afrique. Bull WHO 1963; 28 (supplement): 1-100.
- Frasch, CE, McNelis, RM & Gotschlich, EC (1976). Strain-specific variation in the protein and lipopolysaccharide composition of the group B meningococcal outer membrane. J Bacteriol 127: 973-981.
- Van der Ley, P, Heckels, JE, Virjie, M, Hoogerhout, P & Poolman, JT (1991). Topology of outer membrane porins in pathogenic *Neisseria spp.* Infect Immun 59: 2963-2971.

- Poolman, JT, Hopman, CT & Zanen, HC (1983). Immunogenicity of meningococcal antigens as detected in patient sera. *Infect Immun* 40: 398-406.
- Claus, H., M.C. Maiden, R. Maay, M. Frosch and U. Vogel 2002. Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport. *Microbiology* 148: 1813-1819.
- Kasper, DL, Winkelhake, JL, Brandt, BL & Artenstein, MS (1973). Immunochemical similarity between bactericidal antibodies in antisera to *Neisseria meningitides*. *J Infect Dis* 127: 378-387.
- Sperger G, Spiegel A, Bandon D, Nahor N, Pica JJ. Etude comparative de trois examens bacteriologiques de la meningite cerebrospinale en periode epidemique. *Bull WHO* 1992 ;70 (3) : 359-362.
- Τζ. Κουρέα – Κρεμαστινού, Τζωρτζίνα Τζανακάκη. Εργαστηριακά Πρωτόκολλα, Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας.
- Tzanakaki G, Tsolia M, Vlachou V et al. Evaluation of non-culture diagnosis of invasive meningococcal disease by polymerase chain reaction (PCR). *FEMS Immune Med Microbiol* 2003: 39: 31-36.
- Muhamed-Kheir Taha. Simultaneous approach for nonculture PCR-Based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*. *Journal of Chemical Microbiology*, Feb 2000. p 855-857.
- Frosch M, U. Edwards, K. Bousset, B. Krausse and C. Weisgerber. 1991. Evidence for a common molecular origin of the capsule gene loci in gram-negative bacteria expressing group II capsular polysaccharides. *Mol. Microbiol.* 5: 1251-1263.
- John S. Swartley, Li-Jun Liu, Yoon K. Miller, Larry E. Martin, Srilatha Edupuganti and Davis S. Stephens. Characterization of the Gene Cassette Required for Biosynthesis of the (α1→6)-Linked N-Acetyl-D-Mannosamine-1-Phosphate Capsule of Serogroup A *Neisseria meningitidis*. *Journal Of Bacteriol.* March. 1998. p. 1533-1539.
- Schwentker FF, Gelman S, Long PH, The treatment of meningococcal meningitis with sulphonamide. Preliminary report. *JAMA.* 1937; 108:1407.
- Feldman HA, Sweet LA, Dowling HF. Sulfadiazine therapy of purulent meningitis. *War Med* 1942; 2: 995-1007.

- Kinsman JM, D' Alonzo CA. Meningococemia: A description of the clinical picture and a comparison of the efficacy of sulfadiazine and penicillin in the treatment of thirty cases. *Ann Intern Med* 1946; 24: 606-617.
- Bowler LD, Zhany QY, Riou J-Y, Spratt BG. Interspecies recombination between the penA genes of *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria* species during the laboratory stimulation. *J Bacteriol* 1994; 176: 333-337.
- Fermer C, Kristiansen BE, Skold O, Swedberg G. Sulfonamide resistance in *Neisseria meningitidis* as defined by site-directed mutagenesis could have its origin in other species. *J Bacteriol* 1995; 177(16): 4669-4675.
- William S. Probert, Susan L. Bystrom, Shideh Khashe, Kimmi N. Schrader and Jane D. Wong. 5' Exonuclease Assay for Detection of Serogroup Y *Neisseria meningitidis*. *Journal of Clin Microbiol*, Nov. 2002, p. 4325-4328.
- Kalendar R (2005) FastPCR: A PCR primer design and repeat sequence searching software with additional tools for the manipulation and analysis of the DNA and protein. Available at: <http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr.htm> Accessed: 04 November 2004.
- PCR and multiplex PCR guide. www.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/Guide.html
- Alice J. Sigurdson, Mina Ha, Mark Cosentino, Tracie Franklin, Kashif A. Haque, Ying Qi, Cynthia Glaser, Yvonne Reid, Jim B. Vaught and Andrew W. Bergen. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15(2). February 2006.

