

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ - ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Ε. ΠΕΤΕΙΝΑΚΗ

**ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ
ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΛΑΣΣΙΚΩΝ
ΣΥΜΒΑΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ
ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΛΑΨΑ Ν. ΔΗΜΗΤΡΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2009

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ - ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Ε. ΠΕΤΕΙΝΑΚΗ

**ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ
ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΛΑΣΣΙΚΩΝ
ΣΥΜΒΑΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ
ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΛΑΨΑ Ν. ΔΗΜΗΤΡΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2009

Στους γονείς μου που πάντα με στηρίζουν

Στην καθηγήτριά μου κ. Έφη Πετεινάκη

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Ευθυμία Πετεινάκη

Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ.

(Επιβλέπουσα)

Γεώργιος Νταλέκος

Καθηγητής Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ.

Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης

Καθηγητής Πνευμονολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Ευθυμία Πετεινάκη

Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ.

Γεώργιος Νταλέκος

Καθηγητής Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ.

Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης

Καθηγητής Πνευμονολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ.

Ιωάννης Μεσσήνης

Καθηγητής Γυναικολογίας-Μαιευτικής του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ.

Γεώργιος Συρογιαννόπουλος

Καθηγητής Παιδιατρικής του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ.

Επαμεινώνδας Ζακυνθινός

Αναπληρωτής Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ.

Ζωή Νταϊλιάνα

Επίκουρη Καθηγήτρια Ορθοπαιδικής- Τραυματιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Π.Θ.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνοματεπώνυμο: Κλάψα Ν. Δήμητρα
Τόπος Γέννησης: Λάρισα
Ημερομηνία γέννησης: 13 Απριλίου 1982
Οικογενειακή κατάσταση: Άγαμη

ΣΠΟΥΔΕΣ

2000 - 2005 Πτυχίο Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Βαθμός πτυχίου: Λίαν καλώς
7.89

ΣΤΑΔΙΟΔΡΟΜΙΑ – ΒΡΑΒΕΙΑ

9/2005-Σήμερα Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο εργαστήριο
Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας,
2007 Πιθανός ο ρόλος του *Haemophilus influenzae* τύπου b στην παθογένεια
της υποτροπιάζουσας φαρυγγοαμυγδαλίτιδας”, 3^ο Εθνικό Συνέδριο
Κλινικής Μικροβιολογίας και 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο
Νοσοκομειακών Λοιμώξεων και Υγιεινής, Αθήνα “ΕΙΔΙΚΟ
ΒΡΑΒΕΙΟ” από την Εταιρία Κλινικής Μικροβιολογίας και
Εργαστηριακής Διαγνωστικής

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Foroulis CN, Gerogianni I, Kouritas VK, Karetsi E, Gourgoulisanis K, **Klapsa D**, Petinaki E. Direct detection of *Clostridium sordellii* by broad range PCR in pleural fluid of a patient with pneumonic empyema. Scand J Infect Dis. 2007;39(6-7):617-9
2. Liakopoulos V, Petinaki E, Efthimiadi G, **Klapsa D**, Giannopoulou M, Dovas S, Eleftheriadis T, Mertens PR, Stefanidis I. Clonal relatedness of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the haemodialysis unit of a single university centre in Greece. Nephrol Dial Transplant. 2008 Aug;23(8):2599-603. Epub 2008 Feb 27.

3. Gerogianni I, Papala M, **Klapsa D**, Zinzaras E, Petinaki E, Gourgoulialis KI. Whole-blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection in an unselected Greek population. *Respirology*. 2008 Mar; 13(2):270-4

4. Malli E, Spiliopoulou I, Kolonitsiou F, **Klapsa D**, Giannitsioti E, Pantelidi K, Pratti A, Panopoulou M, Grapsa S, Alepopoulou E, Neonakis I, Frantzidou F, Alexiou-Danie S, Bakola D, Koutsia-Carouzou C, Malamou-Lada H, Zerva L, Vlahaki E, Kartali-Ktenidou S, Anastassiou ED, Petinaki E. In vitro activity of daptomycin against Gram-positive cocci: the first multi-centre study in Greece. *IJAA* 2008 May, 32:525-528

5. Malli E, Spiliopoulou I, Kolonitsiou F, Neocleous C, **Klapsa D**, Pantelidi K, Panopoulou M, Grapsa S, Alepopoulou E, Neonakis I, Alexiou-Daniel S, Bakola D, Koutsia-Carouzou C, Malamou-Lada H, Zerva L, Vlahaki E, Kartali-Ktenidou S, Anastassiou E, Petinaki E. In vitro activity of tigecycline against Gram-positive cocci: a multi-centre study in Greece. *J Antimicrob Chemother*. 2008 Aug 27. 344.

6. Skoulakis Ch, Tigiroglou E, Gkarelis K, **Klapsa D**, Damani A, Papadakis Ch. Petinaki E. Level of *Streptococcus pyogenes* in patients with recurrent tonsillitis and tonsillar hypertrophy. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 2008 August, 1-5, iFirst article

7. Liakopoulos A, Neocleous Ch, **Klapsa D**, Kanellopoulou M, Spiliopoulou I., Mathiopoulos K.D, Papafrangas E and Petinaki E. A T2504A mutation in the 23S rRNA gene responsible for high-level resistance to linezolid of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother*. 2009 May 9. [Epub ahead of print].

8. **Δ. Κλάψα**, Ε. Τιγκίρογλου, Ε. Μάλλη, Μ. Μοράβα, Α. Πραττή, Μ. Καρανίκα, Δ. Βαλαγιάννης, Χ. Σκουλάκης, Ε. Πετεινάκη, Πιθανός ο ρόλος του *Haemophilus influenzae* τύπου b στην παθογένεια της υποτροπιάζουσας φαρυγγοαμυγδαλίτιδας. Εφαρμ. Κλινική Μικροβιολογία & Εργαστ. Διαγνωστική, Περίοδος Β΄, Τόμος 11, Τεύχος 1, 33-40, 2007

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

2006

- E. Malli, **D. Klapsa**, A. Vasdeki, M. Morava, M. Pitsitaki, E. Petinaki, A. N. Maniatis, “Direct detection of *Cardiobacterium hominis* by broad-range 16S rRNA PCR and sequencing in the serum of a patient with infective endocarditis”, 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, April 1-4/2006, Nice
- M. Βέργη, **Δ. Κλάψα**, M. Οικονόμου, Δ. Καίρης, Λ. Σπαλιάρα, M. Μοράβα, E. Πετεινάκη, A.N. Μανιάτης, Χρ. Κούτσια-Καρούζου, “Συχνότητα του *ica*-οπερονίου σε στελέχη κοαγκουλάση-αρνητικών σταφυλοκόκκων που απομονώθηκαν από ορθοπαιδικές λοιμώξεις”, 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Απρίλιος 12-15/2006, 108, Αθήνα
- **Δ. Κλάψα**, M. Βέργη, M. Οικονόμου, Δ. Καίρης, M. Μοράβα, E. Μάλλη, A. Πραττή, E. Πετεινάκη, Χρ. Κούτσια-Καρούζου, A.N. Μανιάτης, “Έλλατωμένη έκφραση των *icaA* και *icaC* γονιδίων επηρεάζει το σχηματισμό της βιομεμβράνης”, 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Απρίλιος 12-15/2006, 107, Αθήνα

2007

- E. Μάλλη, **Δ. Κλάψα**, A. Πραττή, M. Καρανίκα, M. Μοράβα, E. Γερογιάννη, K. Γουργουλιάνης, E. Πετεινάκη, “Άμεση ανίχνευση *Clostridium sordellii* σε πλευριτικό υγρό ασθενούς με εμπύημα με τη χρήση ευρέως φάσματος 16SrRNA PCR”, 3^ο Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας και 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσοκομειακών Λοιμώξεων και Υγιεινής, Φεβρουάριος 6-8/2007, 10, Αθήνα
- **Δ. Κλάψα**, E. Τιγκίρογλου, E. Μάλλη, M. Μοράβα, A. Πραττή, M. Καρανίκα, Δ. Βαλαγιάννης, X. Σκουλάκης, E. Πετεινάκη, “Πιθανός ο ρόλος του *Haemophilus influenzae* τύπου b στην παθογένεια της υποτροπιάζουσας φαρυγγοαμυγδαλίτιδας”, 3^ο Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας και 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσοκομειακών Λοιμώξεων και Υγιεινής, Φεβρουάριος 6-8/2007, 61, Αθήνα, **“ΕΙΔΙΚΟ ΒΡΑΒΕΙΟ” από την Εταιρία Κλινικής Μικροβιολογίας και Εργαστηριακής Διαγνωστικής**

2008

- **Δ. Κλάψα**, Z. Νταιλιάννα, Μ. Σταυροπούλου, Σ. Μπαρτζιάλη, Α. Νταμάνη, Κ. Μαλίζος, Ε. Πετεινάκη, “Μικροβιολογική διάγνωση ορθοπαιδικών λοιμώξεων: Συγκριτική μελέτη καλλιεργείων και 16S rRNA PCR”, 5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Απρίλιος 9-12/2008, 115, Θεσσαλονίκη
- **D. Klapsa**, M. Auzou, S. Bartziali, E. Vlahaki, M. Vergi, C. Koutsia-Carouzou, E. MNalamou-Lada, R. Leclercq, E. Petinaki, “Distribution of Nocardia species in clinical specimens in Greece”, 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, April 19-22/2008, Barcelona, Spain
- M. Kanellopoulou, E. Petinaki, M. Martsoukou, **D. Klapsa**, B. Raitsiou, K. Valakis, E. Papafrangas, “Emergence of a linezolid-resistant Staphylococcus cohnii after exposure to this drug”, 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, April 19-22/2008, Barcelona, Spain
- M. Karanika, **D. Klapsa**, C. Neokleous, I. Spiliopoulou, C. Koutsia-Carouzou, M. Economou, K. Karaiskos, K. Kouraki, D. Krikou, M. Anifantaki, E. Vlahaki, E. Petinaki, “Epidemiology of vancomycin-resistant Enterococcus faecium in Greek hospitals by PFGE and MLST”, 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, April 19-22/2008, Barcelona, Spain
- Ε. Γερογιάννη, Μ. Παπαλά, Α. Καραδόντα, **Δ. Κλάψα**, Μ. Γκουτζίδου, Κ.Ι. Γουργουλιάνης, Ε. Πετεινάκη, “*Mycobacterium canettii*: πρώτη απομόνωση σε ασθενή με φυματίωση στην Ελλάδα“, 17^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Νοέμβριος 20-23/2008, ΑΑ 079, Αλεξανδρούπολη
- Ε. Γερογιάννη, Μ. Παπαλά, Α. Καραδόντα, **Δ. Κλάψα**, Μ. Γκουτζίδου, Κ.Ι. Γουργουλιάνης, Ε. Πετεινάκη, “Άμεση ανίχνευση *M. tuberculosis complex* σε κλινικό δείγμα και προσδιορισμό μεταλλάξεων σε ισονιαζίδη και ριφαμπικίνη με μοριακή μέθοδο: σύγκριση με κλασικές μεθόδους“, 17^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, Νοέμβριος 20-23/2008, ΕΑ 41, Αλεξανδρούπολη

2009

- Α. Νταμάνη, Χ. Νεοκλέους, **Δ. Κλάψα**, Μ. Πανοπούλου, Ι. Σπηλιοπούλου, Φ. Κολονίτσιου, Σ. Γράψα, Ε. Αλεποπούλου, Κ. Κουράκη, Δ. Κρίκου, Ε. Βλαχάκη, Χ. Κούτσια-Καρούζου, Λ. Ζέρβα, Σ. Καρτάλη-Κτενίδου, Ε. Αναστασίου, Α. Μανιάτης, Ε. Πετεινάκη, “Παγκόσμιοι Επιδημικοί κλώνοι βανκομυκίνη-ανθεκτικού *Enterococcus faecium* σε Ελληνικά νοσοκομεία”, 4^ο Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας & Νοσοκομειακών Λοιμώξεων, Φεβρουάριος 12-14/2009, 22, Αθήνα
- **Δ. Κλάψα**, Χ. Σκέντου, Μ. Σταυροπούλου, Φ. Αναστασίου, Ε. Μάλλη, Ε. Πετεινάκη, “Συχνότητα *Chlamydia trachomatis* σε εγκύους στην περιοχή της Θεσσαλίας”, 4^ο Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας & Νοσοκομειακών Λοιμώξεων, Φεβρουάριος 12-14/2009, 63, Αθήνα
- Ε. Tigiroglou, **D. Klapsa**, Α. Damani, Α. Liakopoulos, C. Skoulakis, Ε. Petinaki. "Prevalence of EBV and CMV in tonsils among patients with recurrent tonsillitis and tonsillar hypertrophy in Greece", 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), May 16-19/2009, Helsinki, Finland
- C. Neocleous, **D. Klapsa**, Α. Liakopoulos, Ι. Gerogianni, Κ. Gourgoulialis, Ε. Petinaki. "Prevalence of *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, and *Legionella pneumophila* among patients with atypical pneumonia in central Greece", 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), May 16-19/2009, Helsinki, Finland
- **D. Klapsa**, Η. Skentou, Μ. Stavropoulou, Α. Damani, F. Anastassiadou, Ι. Messinis, Ε. Petinaki. "Prevalence of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, herpes simplex virus type 1,2 and papilloma virus in pregnant women in central Greece", 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), May 16-19/2009, Helsinki, Finland

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η Ιατρική Μικροβιολογία καλείται να λύσει το πρόβλημα της διάγνωσης των λοιμωδών νοσημάτων με ταχύτητα και ακρίβεια. Οι συμβατικές μέθοδοι ανίχνευσης των παθογόνων μικροοργανισμών βασίζονται στους φαινοτυπικούς χαρακτήρες τους, οι οποίοι μεταξύ άλλων περιλαμβάνουν: χρωστικές ιδιότητες για την αναγνώρισή τους με το μικροσκόπιο, καλλιέργεια σε διάφορα θρεπτικά υλικά, ταυτοποίηση βάσει βιοχημικών χαρακτήρων κλπ. Ωστόσο, σε κάποιες περιπτώσεις η απομόνωση και η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών με τις κλασσικές μικροβιολογικές μεθόδους δεν είναι πάντα εφικτή.

Η εμφάνιση των πρώτων εφαρμογών της Μοριακής Μικροβιολογίας γέμισε με ενθουσιασμό τον κόσμο της κλασσικής Μικροβιολογίας, όπως είχε γίνει προηγουμένως με την εμφάνιση των ανοσοενζυμικών μεθόδων και των μονοκλωνικών αντισωμάτων.

Η ανακάλυψη της PCR, της αλυσιδωτής αντίδρασης θερμοανθεκτικής πολυμεράσης και γενικότερα οι τεχνικές πολλαπλασιασμού των νουκλεϊνικών οξέων αποτέλεσαν μια μεγάλη καινοτομία στη Μοριακή Βιολογία και Μικροβιολογία, μια επανάσταση στη διάγνωση και στην ταυτοποίηση.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σύγκριση της ειδικότητας και της ευαισθησίας των μοριακών τεχνικών σε σχέση με τις κλασσικές συμβατικές μεθόδους στη διάγνωση των βακτηριακών λοιμώξεων, σε κλινικά δείγματα ασθενών του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Η μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Για την επίτευξη της διδακτορικής μου διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα της διατριβής μου Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Έφη Πετεινάκη, για την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας. Την ευχαριστώ επίσης για την πολύτιμη καθοδήγηση που μου προσέφερε, την υπομονή που υπέδειξε και την αμέριστη βοήθεια και στήριξη που μου παρείχε. Η συνεργασία μαζί της αποτέλεσε πηγή πολύτιμων γνώσεων και σωστού τρόπου σκέψης και θεώρησης της επιστήμης της Μικροβιολογίας. Επίσης θα ήθελα την ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, ελπίζοντας να υπήρξα αντάξιά της.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τους Καθηγητές κ. Κ. Γουργουλιάνη και κ. Γ. Νταλέκο, μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής για το ενδιαφέρον τους προς την

διατριβή μου, τις χρήσιμες παρατηρήσεις και το χρόνο που διέθεσαν διορθώνοντας τα κείμενά μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στο Διευθυντή της ΜΕΘ Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ε. Ζακυνθινό, στην Επίκουρη Καθηγήτρια Ορθοπαιδικής –Τραυματιολογίας κ. Ζ. Νταιλιάνα, στη Λέκτορα Μαιευτικής –Γυναικολογίας κ. Χ. Σκέντου και στην Επιμελήτρια Β' Πνευμονολογίας κ. Ε. Γερογιάννη για το κλινικό υλικό της μελέτης.

Τέλος ευχαριστώ θερμά την τεχνολόγο κ. Μ. Σταυροπούλου όπως και όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας για τη συνεργασία και τη συμβολή του στην ολοκλήρωση της διατριβής μου.

Δ. Κλάψα

Λάρισα, 23-6-2009

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	14
----------------	----

ΜΕΡΟΣ Α: ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	18
1.1 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΗΣΗ ΑΜΕΣΩΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ	18
1.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	19
1.3 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΦΟΡΟΔΙΑΓΝΩΣΗΣ.....	20
1.4 ΑΝΤΙΒΙΟΓΡΑΜΜΑ-ΔΟΚΙΜΕΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	20
1.5 ΟΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ.....	21
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ.....	23
2.1 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΧΩΡΙΣ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ.....	24
2.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ.....	30
2.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ	44

ΜΕΡΟΣ Β: ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ	48
2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	49
2.1 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΥΠΟ ΕΞΕΤΑΣΗ ΥΛΙΚΩΝ	49
2.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA	50
2.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	51
2.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA	56
2.5 ΑΝΑΣΤΡΟΦΟΣ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ.....	57
2.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΚΟΛΟΥΘΙΑΣ DNA (DNA sequencing)	59
2.7 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΛΑΣΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ	59
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	62

3.1 ΚΛΙΝΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΧΩΡΙΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΛΩΡΙΔΑ	62
3.2 ΚΛΙΝΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΜΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΛΩΡΙΔΑ	68
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	71
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	76
6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	78
7. ABSTRACT.....	79

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	80
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	86

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην κλινική πρακτική, ο ρόλος του σύγχρονου μικροβιολογικού εργαστηρίου συνίσταται στη γρήγορη και αξιόπιστη ταυτοποίηση του αιτιολογικού παράγοντα της λοίμωξης, με στόχο τη χορήγηση κατάλληλης αντιμικροβιακής θεραπείας. Η εμπειρική θεραπεία, η οποία συχνά περιλαμβάνει περισσότερα του ενός αντιβιοτικά, μπορεί να βοηθά τον κλινικό γιατρό να κερδίσει τη μάχη με τη συγκεκριμένη λοίμωξη, αλλά μακροπρόθεσμα έχει σοβαρές συνέπειες. Οι μικροοργανισμοί υπό τη συνεχή πίεση της αντιμικροβιακής θεραπείας αναπτύσσουν ολόένα και περισσότερο πολύπλοκους μηχανισμούς αντοχής, με αποτέλεσμα σήμερα να βρισκόμαστε αντιμέτωποι με πολυανθεκτικά μικρόβια.

Οι συνηθέστερες τεχνικές που εφαρμόζονται στο μικροβιολογικό εργαστήριο, για τη διάγνωση της λοίμωξης είναι η άμεση μικροσκόπηση του παθολογικού υλικού (Gram-χρώση, Z-N, κλπ)) και η καλλιέργειά του σε διάφορα θρεπτικά υλικά. Στη συνέχεια, μετά την απομόνωση του μικροοργανισμού, ακολουθεί ταυτοποίηση αυτού βάσει των φαινοτυπικών και βιοχημικών χαρακτήρων και έλεγχος της ευαισθησίας του σε διάφορα αντι-μικροβιακά φάρμακα. Αν και η Gram-χρώση συμβάλλει σημαντικά στην αρχική προσέγγιση της λοίμωξης (παρουσία πολυμορφοπύρηνων ή και μικροβίων), χαρακτηρίζεται από χαμηλή ευαισθησία, διότι απαιτεί ικανό αριθμό μικροβιακών κυττάρων στο δείγμα. Από την άλλη μεριά, η απομόνωση, η ταυτοποίηση και ο έλεγχος της ευαισθησίας του υπεύθυνου μικροοργανισμού με τις συμβατικές τεχνικές απαιτεί στις καλύτερες συνθήκες χρόνο τουλάχιστον 2 ημερών. Επιπρόσθετα, δεν είναι σπάνιες οι περιπτώσεις βακτηρίων που είτε απομονώνονται δύσκολα με τις παραδοσιακές μεθόδους (π.χ. χλαμύδια, ρικέτσιες), είτε απαιτούν μακρά περίοδο επώασης όπως *Mycobacterium tuberculosis* κλπ. Η εισαγωγή των ορολογικών δοκιμασιών στη διαγνωστική των λοιμώξεων έγινε με σκοπό να καλυφθούν κάποια κενά των καλλιεργητικών μεθόδων (διάγνωση ιογενών λοιμώξεων). Παρότι η οροδιαγνωστική συνέβαλλε σημαντικά στη διάγνωση της λοίμωξης, είχε και η ίδια αρκετούς περιορισμούς, όπως μη ανίχνευση αντισωμάτων σε ασθενείς με ανοσοανεπάρκεια, μη ανίχνευση αντισωμάτων στην αρχή της λοίμωξης κλπ.

Οι παραπάνω περιορισμοί οδήγησαν τα τελευταία 15 χρόνια στην ανάγκη εφαρμογής νέων τεχνικών, που βασίζονται στη μοριακή βιολογία. Σήμερα οι μέθοδοι μοριακής βιολογίας συνεισφέρουν σημαντικά στην άμεση ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών σε κλινικά δείγματα (αίμα, ENY, ιστοί, πτύελα κτλ), καθώς είναι γρήγορες και αξιόπιστες. Οι μοριακές τεχνικές προσφέρουν δυνατότητα ανίχνευσης

του ή των παθογόνων μικροοργανισμών άμεσα στο κλινικό δείγμα, αξιόπιστη ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους, χαρακτηρισμό νέων παθογόνων, ανίχνευση γονιδίων αντοχής και γονιδίων παθογονικότητας.

Τα ποιο σημαντικά πλεονέκτημα των μοριακών τεχνικών στη διάγνωση είναι, α)η δυνατότητα ανίχνευσης του μικροοργανισμού, ακόμη και αν έχει προηγηθεί αντιμικροβιακή θεραπεία (ΕΝΥ, ορθοπεδικές λοιμώξεις), γεγονός που καθιστά αδύνατη την απομόνωση του μικροοργανισμού στην κοινή καλλιέργεια, β) η γρήγορη ανίχνευση του αιτιολογικού παράγοντα βαριών λοιμώξεων (ενδοκαρδίτιδα, σηψαιμία, αρθρίτιδα, πλευρίτιδα), στις οποίες συχνά οι καλλιέργειες παραμένουν αρνητικές, γ)η ανίχνευση βραδέως αναπτυσσόμενων μικροοργανισμών (μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης), αλλά και μη αναπτυσσόμενων στα συνήθη χρησιμοποιούμενα θρεπτικά υλικά (χλαμμύδια).

Σήμερα το μικροβιολογικό εργαστήριο έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιεί, μια ποικιλία μοριακών τεχνικών που είτε μπορεί να σχεδιάσει το ίδιο (*in house* μέθοδοι), είτε να τα προμηθευτεί ως έτοιμα διαγνωστικά kits στο εμπόριο. Οι τεχνικές που υιοθετούνται καθορίζονται κατά κανόνα από τον τύπο του εξεταστέου δείγματος. Τα εξεταστέα υλικά διαχωρίζονται σε εκείνα τα υλικά που διαθέτουν μια πληθώρα μικροοργανισμών ως φυσιολογική χλωρίδα και σε εκείνα που δεν διαθέτουν χλωρίδα. Στα υλικά με φυσιολογική χλωρίδα η ανίχνευση του παθογόνου μικροβίου γίνεται με τη χρήση εκκινητών (της PCR) ειδικών για τα συγκεκριμένα μικρόβια, ενώ στα υλικά χωρίς χλωρίδα υπάρχει η δυνατότητα χρήσης εκκινητών (της PCR) ειδικών για ένα μεγάλο φάσμα μικροβίων (βακτηριακό DNA). Μετά την επιβεβαίωση της παρουσίας βακτηριακού DNA στο κλινικό δείγμα ακολουθεί μια συμπληρωματική διαδικασία, η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κατά Sanger για την ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι κλασικές τεχνικές και οι μοριακές τεχνικές σε ασθενείς που νοσηλεύτηκαν στο Περιφερειακό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας με κλινική υποψία λοίμωξης. Ο εστιασμός στις μοριακές τεχνικές έχει ως σκοπό την διερεύνηση της χρησιμότητά τους στα κλινικά εργαστήρια με στόχο την επίλυση διαγνωστικών προβλημάτων.

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΥΝΗΘΕΙΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

1.1 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΗΣΗ ΑΜΕΣΩΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ

Οι μικροοργανισμοί είναι δυνατό να αναγνωριστούν με την άμεση ετοιμασία μικροσκοπικών παρασκευασμάτων από κλινικό υλικό που λαμβάνεται από τον ασθενή.

Νωπό παρασκεύασμα

Είναι δυνατή η ανίχνευση του μικροοργανισμού με άμεση εξέταση στο μικροσκόπιο (χωρίς χρώση) του κλινικού δείγματος. Η συγκεκριμένη μέθοδος ενδείκνυται για τη διάγνωση μυκήτων και παρασίτων. Επιπλέον πληροφορεί για παρουσία πτυσφαιρίων, ερυθρών αιμοσφαιρίων κλπ

Κεχρωσμένο παρασκεύασμα

Η χρώση των μικροσκοπικών παρασκευασμάτων χρησιμεύει στην καλύτερη ορατότητα και παρέχει μια πρώτη διαφοροδιαγνωστική δυνατότητα όσον αφορά το μέγεθος, τη μορφολογία και τον τρόπο χρώσεων του οργανισμού με μια συγκεκριμένη χρωστική (Gram-θετικός κόκκος, Gram-αρνητικό βακτηρίδιο κλπ)

- **Χρώσεις ρουτίνας:** η χρώση Gram η οποία καθιστά ορατό ένα ευρύ φάσμα βακτηρίων (Gram-αρνητικοί διπλόκοκκοι σε ΕΝΥ, στρεπτόκοκκοι, σταφυλόκοκκοι κλπ.) η βασικότερη χρώση η οποία προσφέρει ουσιαστική βοήθεια στο Κλινικό Μικροβιολογικό Εργαστήριο, αφού διαχωρίζει τα βακτήρια σε δύο κύριες ομάδες : Gram-αρνητικά βακτήρια (κόκκινα στο παρασκεύασμα), Gram-θετικά βακτήρια (μπλέ στο παρασκεύασμα). Η διαφορά στο χρώμα αντανακλά ουσιαστικές διαφορές στη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος.
- **Ειδικές χρώσεις:** Αυτές μπορούν να χρωματίσουν ειδικά ορισμένα είδη βακτηρίων τα οποία δεν μπορούν να αναδειχτούν με τις συνήθεις χρώσεις ρουτίνας. Για παράδειγμα, η χρώση Ziehl-Neelsen για οξυάντοχα βακτηρίδια (μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης), η χρώση κατά Neisser (υπόνοια διφθερίτιδας), και οι χρώσεις ανοσοφθορισμού (*Pneumocystis carinii*) για μικροοργανισμούς οι οποίοι δεν αναδεικνύονται με την χρώση Gram.

Η μικροσκόπηση ενώ συμβάλλει σημαντικά στη άμεση και ταχεία διάγνωση, ωστόσο προϋποθέτει 1. την κατάλληλη επιλογή χρώσης και 2. εμπειρία για την

μορφολογική αναγνώριση. Η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται από χαμηλή ευαισθησία, διότι απαιτεί ικανό αριθμό μικροβιακών κυττάρων στο δείγμα.

1.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Για την καλλιέργεια των βακτηρίων χρησιμοποιούνται υλικά καλλιέργειας με οργανικά θρεπτικά συστατικά ως πηγή ενέργειας. Το κλινικό δείγμα (ENY, ούρα, πτύελα κλπ) εμβολιάζεται στο θρεπτικό υλικό και στη συνέχεια το τρυβλίο επωάζεται περίπου για 24 ώρες σε θερμοκρασία 37°C. Αυτό που επιδιώκεται είναι η παραγωγή μεμονωμένων αποικιών του μικροοργανισμού οι οποίες διαφέρουν μεταξύ των διαφόρων μικροοργανισμών ως προς το σχήμα, την όψη, το χρώμα και την οσμή. Μεμονωμένες αποικίες μικροβίων που θεωρούνται ως παθογόνα ανακαλλιεργούνται εκ νέου όπου και αναπτύσσονται, προκειμένου να έχουμε καθαρή καλλιέργεια. Η καθαρή καλλιέργεια είναι απαραίτητη για την οριστική ταυτοποίηση του μικροοργανισμού (π.χ. με τη χρήση βιοχημικών αντιδράσεων) και για τον καθορισμό της ευαισθησίας του στα διάφορα αντιμικροβιακά φάρμακα (αντιβιογράμματα).

Σε υλικά όπου ο αρχικός αριθμός των μικροβιακών κυττάρων είναι μικρός, γίνεται εμπλουτισμός του κλινικού δείγματος σε υγρό θρεπτικό ζωμό, ενώ στη συνέχεια ακολουθεί ανακαλλιέργεια σε στερεά θρεπτικά υλικά ώστε να έχουμε μεμονωμένες αποικίες παθογόνων βακτηρίων. . Συνήθη θρεπτικά υλικά είναι:

- **Εμπλουτισμένα θρεπτικά μέσα:** Είναι ευρέως φάσματος για τα συνηθέστερα παθογόνα βακτήρια:
 - *Θρεπτικός ζωμός* για τον εμπλουτισμό μικρού αριθμού βακτηρίων
 - *Αιματούχο άγαρ:* Γενικής χρήσης θρεπτικό υλικό για σχεδόν όλα τα βακτήρια που μπορούν να αναπτυχθούν στο άγαρ.
 - *Άγαρ του Schadler:* Για αναερόβια μικρόβια (εμπλουτισμένο με αιμίνη και βιταμίνη K).
- **Υλικά καλλιέργειας που περιέχουν δείκτες**

Αυτά τα υλικά αναδεικνύουν χαρακτηριστικές μεταβολικές ιδιότητες για κάποιον ή κάποιους μικροοργανισμούς. Συχνά αυτά τα υλικά με δείκτες αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών σε μια μεικτή καλλιέργεια (π.χ. το υλικό MacConkey που επιτρέπει την ανάπτυξη των εντεροβακτηριακών και των ψευδομονάδων αλλά αναστέλλει την ανάπτυξη των σταφυλοκόκκων).

- **Επιλεκτικά υλικά καλλιέργειας:** Αυτά επιτρέπουν την ανάπτυξη ορισμένων βακτηρίων και καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό άλλων μικροοργανισμών. Συχνά αυτά περιέχουν δείκτες και λειτουργούν όπως τα προηγούμενα.
- **Ειδικά θρεπτικά υλικά:** Αυτά είναι υλικά για μικροοργανισμούς με υψηλές και σύνθετες διατροφικές απαιτήσεις, π.χ. το υλικό καλλιέργειας Lowenstein-Jensen για τα μυκοβακτηρίδια της φυματίωσης.

Η καλλιέργεια αποτελεί **gold standard** της μικροβιολογικής διαγνωστικής προσέγγισης των βακτηριακών λοιμώξεων. Δυστυχώς είναι περισσότερο χρονοβόρα από τις μοριακές τεχνικές. Επιπλέον, μια σειρά από σημαντικούς μικροοργανισμούς δεν καλλιεργούνται καθόλου ή μόνο με μεγάλη δυσκολία στα καλλιεργητικά υλικά π.χ. μυκοβακτηρίδια, χλαμμύδια, ρικέτσιες κλπ .

1.3 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

Κάθε βακτήριο παρουσιάζει ένα συνδυασμό μεταβολικών αντιδράσεων, ο οποίος είναι χαρακτηριστικός για τον μικροοργανισμό. Οι βιοχημικές αντιδράσεις των μικροοργανισμών είναι δυνατό να ελεγχθούν είτε με ειδικά θρεπτικά υλικά ή με απλές ενζυμικές δοκιμασίες. Μερικές από τις τελευταίες και από τις πλέον εύχρηστες είναι η δραστηριότητα καταλάσης και η δραστηριότητα οξειδάσης.

Για τις παραπάνω αντιδράσεις είναι απαραίτητες οι καθαρές καλλιέργειες.

1.4 ANTIBIOGRAMMA – ΔΟΚΙΜΕΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ANTIBIOTIKA

Σκοπός των δοκιμών ευαισθησίας είναι να γίνει έλεγχος του μικροοργανισμού σε διάφορα αντιμικροβιακά φάρμακα με σκοπό την εφαρμογή της καταλληλότερης αντιμικροβιακής θεραπείας. Οι δοκιμασίες ευαισθησίας, ανάλογα με την περίπτωση είναι:

- **Δοκιμασία διάχυσης σε άγαρ:** Δίσκοι εμποτισμένοι με το αντιβιοτικό τοποθετούνται πάνω σε άγαρ Mueller-Hinton, στο οποίο έχει επιστρωθεί εναιώρημα του μικροοργανισμού πυκνότητας 0.5 της κλίμακας Mc Farland. Μετά από 18-24 ώρες επώασης μετρώνται οι διάμετροι των ζωνών αναστολής της

ανάπτυξης Η μέθοδος είναι επαρκής για τα περισσότερα βακτήρια που απομονώνονται στην καθημερινή ρουτίνα, δεν προσφέρεται όμως για τα αναερόβια βακτήρια.

- **Δοκιμασία διαδοχικών αραιώσεων:** Με αυτή γίνεται προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοστατικής συγκέντρωσης του αντιβιοτικού (MIC). Σε μια σειρά από μικρά σωληνάκια, όπου έχει εναποτεθεί το αντιβιοτικό σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις, εμβολιάζεται ένα εναιώρημα του προς εξέταση μικροοργανισμού. Μετά την επώαση, προσδιορίζεται η μικρότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού, η οποία είχε τη δυνατότητα να αναστείλει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού.
- **Δοκιμασία E (E-test):** Προσδιορισμό της ελάχιστης βακτηριοστατικής συγκέντρωσης του αντιβιοτικού με τη χρήση μιας πλαστικής ταινίας η οποία είναι εμποτισμένη με μια ορισμένη και σταθερή διαβάθμιση της συγκέντρωσης του αντιβιοτικού. Αυτή τοποθετείται πάνω στο άγαρ που έχει ομογενώς εμβολιασθεί με το ερευνούμενο μικρόβιο. Η αναγνώριση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης γίνεται στο σημείο τομής της ελλειπτικής καμπύλης αναστολής με την κλίμακα.
- **Δοκιμασία αραιώσης σε άγαρ:** Το αντιβιοτικό εγχέεται μέσα στο άγαρ σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Τα προς εξέταση απομονωμένα βακτήρια εμβολιάζονται στο άγαρ. Προσδιορίζεται η μικρότερη ποσότητα του αντιβιοτικού η οποία αναστέλλει την ορατή ανάπτυξη του μικροβίου.

Ο προσδιορισμός της ευαισθησίας του μικροοργανισμού χρειάζεται συνήθως 18-24 ώρες.

1.5 ΟΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

Οι ορολογικές δοκιμασίες στηρίζονται στην ανίχνευση στον ορό των ασθενών ειδικών αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων μικροβιακών αντιγόνων, τα οποία και προκάλεσαν την παραγωγή τους. Οι σημαντικότερες μέθοδοι για τον προσδιορισμό του τίτλου των αντισωμάτων είναι οι ανοσοενζυμικές δοκιμασίες, οι δοκιμασίες σύνδεσης του συμπληρώματος, ο ανοσοφθορισμός κλπ.

Οι τεχνικές αυτές έδωσαν λύση σε αρκετές αλλά όχι σε όλες τις περιπτώσεις που η απομόνωση του μικροοργανισμού ήταν δύσκολη. Συχνά απαιτείται η λήψη δύο δειγμάτων με διαφορά 15νθημέρου το ένα από το άλλο, ενώ υπάρχουν περιπτώσεις που τα αποτελέσματα είναι ψευδώς θετικά ή και ψευδώς αρνητικά. Η πρώτη

περίπτωση είναι αποτέλεσμα διασταυρούμενων αντιδράσεων με αντιγόνα άλλου μικροοργανισμού. Ενώ η δεύτερη, παρατηρείται όταν η λήψη του ορού έχει γίνει σε πολύ πρώιμο στάδιο ή όταν ο ασθενής πάσχει από ανοσοανεπάρκεια και αδυνατεί να παράγει αντισώματα.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

Οι μικροβιολόγοι πάντοτε αναζητούσαν ταχύτερους και αποτελεσματικότερους τρόπους ανίχνευσης και ταυτοποίησης των παθογόνων μικροοργανισμών. Οι μέθοδοι της Μοριακής Βιολογίας εισήχθησαν στο κλινικό εργαστήριο πριν πολλά χρόνια, ώστε να αποτελούν σήμερα ισχυρά διαγνωστικά «εργαλεία». Η εισαγωγή της μοριακής τεχνολογίας από τη βασική εργαστηριακή έρευνα στα κλινικά εργαστήρια διήρκεσε περισσότερο από μια δεκαετία [1,2]. Οι τεχνικές αυτές μετέβαλαν ριζικά τους τρόπους ανίχνευσης και ταυτοποίησης των μικροοργανισμών, και εφαρμόζονται πλέον είτε απευθείας στα κλινικά δείγματα είτε μετά από την ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε καλλιέργειες.

Οι μοριακές δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν από τους πρώτους μοριακούς μικροβιολόγους αποκλειστικά για την ανίχνευση διατροφικά απαιτητικών, δύσκολα καλλιεργούμενων μικροοργανισμών αλλά και για τον προσδιορισμό της αιτίας σημαντικών επιδημιών. Όσο βέβαια το κόστος και η δυσκολία εφαρμογής των τεχνικών μειώνεται τόσο εξαπλώνεται η χρήση τους στο χώρο της Διαγνωστικής Μικροβιολογίας.

Οι τεχνικές της Μοριακής Μικροβιολογίας μπορεί να ομαδοποιηθούν ως εξής:

- Τεχνικές όπου η ανίχνευση μικροοργανισμών επιτυγχάνεται χωρίς την τεχνική της ενίσχυσης των νουκλεϊνικών οξέων. Αυτές οι τεχνικές στηρίζονται στη ενίσχυση ενός σήματος που παράγεται (συνήθως φως ή χρώμα), σαν αποτέλεσμα επιτυχούς υβριδοποίησης του νουκλεϊκού οξέος-*ιχνηθέτη* με το νουκλεϊκό οξύ-*στόχο*.
- Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τεχνικές ενίσχυσης των νουκλεϊνικών οξέων.

2.1 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΧΩΡΙΣ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

2.1.1 Ανίχνευση με τεχνικές υβριδοποίησης

«Magic bullets», «Silver bullets», είναι μερικά ονόματα που χρησιμοποιήθηκαν για να χαρακτηρίσουν τα πρώτα εργαλεία της μοριακής γενετικής, τους ιχνηθέτες DNA. Στη διαγνωστική μικροβιολογία οι σημασμένοι ιχνηθέτες χρησιμοποιήθηκαν σαν μια «αρπάγη» η οποία μέσα από πλήθος νουκλεϊνικών οξέων, υβριδοποιεί ειδικές συμπληρωματικές αλληλουχίες DNA ενός μικροοργανισμού για να αποκαλυφθεί άμεσα η ύπαρξή του, με την παραγωγή ενός σήματος.

Οι τεχνικές υβριδοποίησης με ιχνηθέτες DNA, είναι οι πρώτες ιστορικά τεχνικές που στηρίζονται στα νουκλεϊνικά οξέα για την ανίχνευση μικροοργανισμών σε κλινικά δείγματα [3,4]. Οι ιχνηθέτες DNA είναι μικρά, σεσημασμένα, μονής έλικας τμήματα DNA, τα οποία σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν για να υβριδοποιηθούν με συμπληρωματικές αλληλουχίες μικροβίων στόχων. Η πιο συνηθισμένη εφαρμογή είναι η χρήση ως ιχνηθέτη ενός ειδικού κλωνοποιημένου θραύσματος DNA ή ενός συνθετικού ολιγονουκλεοτιδίου. Και οι δύο τύποι μπορούν να ανιχνεύσουν τον μικροοργανισμό στόχο, μερικές φορές ακόμη και μέσα σε ένα πολυμικροβιακό περιβάλλον, λόγω της μεγάλης ειδικότητας. Το 1980, η περιγραφή DNA ιχνηθετών για την ανίχνευση του εντεροτοξικού *Escherichia coli* σε δείγματα κοπράνων, έδωσε ελπίδες ότι η τεχνολογία των νουκλεϊκών οξέων θα αντικαταστήσει τις κλασικές τεχνικές καλλιέργειας [5]. Ωστόσο, μετά την εφαρμογή αυτή, ακολούθησε μια συγκρατημένη προσέγγιση, εξαιτίας των τεχνικών περιορισμών που προέκυψαν, με σημαντικότερο το μεγάλο μέγεθος του DNA-στόχου που έπρεπε να αναλυθεί, και της χαμηλής ευαισθησίας της μεθόδου[6].

Οι τεχνικές διάγνωσης που δε στηρίζονται στην ενίσχυση των νουκλεϊκών οξέων θεωρούνται πλέον λιγότερο ευαίσθητες από τις τεχνικές ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων (δίνουν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα στις περιπτώσεις όπου ο αριθμός των μικροβιακών κυττάρων είναι μικρός), ωστόσο πλεονεκτούν στην μεγάλη ειδικότητα που έχουν, αφού σπάνια δίνουν ψευδώς-θετικά αποτελέσματα. Σε κλινικά δείγματα όπου ο αριθμός των μικροβιακών κυττάρων είναι ικανοποιητικός ενδείκνυται η εφαρμογή τεχνικής υβριδισμού.

2.1.2 Βασικές αρχές υβριδοποίησης νουκλεϊκών οξέων

Η τεχνική της υβριδοποίησης στηρίζεται στην ιδιότητα του DNA να αποδιατάσσεται. Ήδη από το 1960-1961 οι Marmur, Doty και Schildkraut [7,8] έδειξαν ότι οι συμπληρωματικές έλικες DNA μπορεί να αποχωριστούν με θερμότητα σε αλκαλικό περιβάλλον. Τα νουκλεϊκά οξέα δημιουργούν διπλές έλικες που συγκρατούνται με δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα σε αντικριστά νουκλεοτίδια. Όταν οι δεσμοί υδρογόνου σπάσουν με επίδραση θερμότητας ή σε αλκαλικό περιβάλλον οι δύο έλικες αποχωρίζονται και αυτό το φαινόμενο ονομάζεται αποδιάταξη του DNA.

Σε αυτό το στάδιο αν προστεθεί ο ιχνηθέτης και σε ένα επόμενο βήμα εξουδετερωθεί το αλκαλικό pH και μειωθεί η θερμοκρασία, μπορεί να γίνει ανασύνδεση του ιχνηθέτη, δηλαδή να δημιουργηθούν δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στον ιχνηθέτη και τις συμπληρωματικές αλληλουχίες που τυχόν υπάρχουν στο αποδιαταγμένο μόριο-στόχος. Το 1968, ο David Kohne, με τεχνικές υβριδοποίησης, πρώτος κατάφερε να απομονώσει ένα από τα γονίδια rRNA στην *Escherichia coli* που σήμερα χρησιμοποιούνται σαν «παγκόσμιοι ιχνηθέτες» μιας και έχουν ομολογία με όλα τα βακτηριακά είδη και θα μπορούσαν να τα ταυτοποιήσουν όλα [9].

Η ειδικότητα και η ταχύτητα μιας αντίδρασης υβριδοποίησης εξαρτάται από τη θερμοκρασία, τη συγκέντρωση του άλατος, το pH, τη συγκέντρωση και το μέγεθος του ιχνηθέτη.

Μια θετική αντίδραση υβριδοποίησης αναγνωρίζεται από το ειδικό«σήμα» της ένωσης με την οποία έχει σημειωθεί ο ιχνηθέτης.

Έτσι, τα αναγκαία «συστατικά» μιας αντίδρασης είναι: α) ο ιχνηθέτης β) το μόριο-σηματοδότησης γ) το νουκλεϊκό οξύ-στόχος δ) οι ακριβείς συνθήκες υβριδοποίησης.

2.1.3. Κατασκευή και επιλογή του ιχνηθέτη

Η βασική αρχή που λαμβάνεται υπόψη για την επιλογή του σωστού ιχνηθέτη είναι να υβριδοποιείται με το μόριο-στόχο αλλά όχι με άλλα νουκλεϊκά οξέα που πιθανόν να βρίσκονται στο εξεταστέο δείγμα. Κάθε μικροοργανισμός φέρει τουλάχιστον μια μοναδική αλληλουχία που τον διακρίνει από τους άλλους και κατά συνέπεια αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ιχνηθέτης. Ο ιχνηθέτης που επιλέγεται μπορεί να αποτελεί τμήμα DNA που δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνη, αλλά συνήθως πρόκειται για

αλληλουχία που κωδικοποιεί μια χαρακτηριστική ιδιότητα του βακτηρίου όπως μια τοξίνη, έναν λοιμογόνο παράγοντα ή επίτοπους της εξωτερικής μεμβράνης. Η διαδικασία αυτή προϋποθέτει την κλωνοποίηση τέτοιων αλληλουχιών, ενώ στη συνέχεια μπορεί να μη χρησιμοποιηθεί παρά ένα μέρος τους σαν ιχνηθέτης.

2.1.4. Τύποι σήμανσης του ιχνηθέτη

Κύριο βήμα της διεργασίας του υβριδισμού, είναι η άμεση ή έμμεση σήμανση του ιχνηθέτη με ένα ανιχνεύσιμο μόριο-σηματοδότη. Στην άμεση σήμανση το μόριο-σηματοδότης προσδένεται σταθερά στον ιχνηθέτη, σε ενδιάμεση ή τελική περιοχή του ιχνηθέτη και η ανίχνευση γίνεται χωρίς άλλο βήμα μετά την υβριδοποίηση. Η έμμεση μέθοδος σηματοδότησης επιτελείται σε τρία στάδια όπου η μονάδα σηματοδότησης προσδένεται στον ιχνηθέτη, ενώ ανιχνεύεται στη συνέχεια μέσω μιας ειδικά σηματοδοτημένης πρωτεΐνης που προσκολλάται σε αυτήν.

Οι μέθοδοι της άμεσης ή έμμεσης σηματοδότησης χωρίζονται σε ενζυματικές, χημικές ή συνθετικές [10]. Το πρώτο είδος σήμανσης ιχνηθετών που χρησιμοποιήθηκε είναι τα ραδιενεργά ισότοπα ^{32}P και ^{35}S . Μετά την υβριδοποίηση η αποκάλυψη γίνεται είτε με αυτοραδιογραφία είτε με μέτρηση της ραδιενεργής ακτινοβολίας σε μετρητή. Η χρήση όμως ιχνηθετών σηματοδοτημένων ραδιενεργά δεν είναι πλέον εύχρηστη λόγω της βραχείας ημιζωής των ισοτόπων και γιατί αποφεύγεται η χρήση ραδιενεργών υλικών. Σήμερα είναι πιο συχνή η χρήση μη ραδιενεργών μορίων, όπως η βιοτίνη ή η διγοξυγενίνη.

2.1.5. Τύποι υβριδοποίησης

Οι αντιδράσεις υβριδοποίησης στην ανίχνευση και ταυτοποίηση μικροοργανισμών επιτελούνται με τρεις τρόπους, *in situ*, σε υγρή ή στερεή φάση.

A) Υβριδοποίηση *in situ*: Οι *in situ* τεχνικές υβριδοποίησης χρησιμοποιήθηκαν για πολλά χρόνια, στη μοριακή παθολογία για την ανίχνευση χρωμοσωμικών μεταθέσεων, την ενίσχυση γονιδίων αλλά και την αναγνώριση παθογόνων παραγόντων [11]. Αυτές οι κάποτε περίπλοκες τεχνικές, μετατράπηκαν σε εύχρηστες και ημιαυτοποιημένες δοκιμές. Διακρίνονται σε δυο κατηγορίες, την *in situ* υβριδοποίηση φθορισμού (FISH), στη οποία ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές, σηματοδοτημένοι με φθορίζων μόριο ανιχνεύονται απευθείας με μικροσκόπιο φθορισμού

και την *in situ* χρωμογόνο υβριδοποίηση (CISH), στη οποία ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές, είναι σημασμένοι, ώστε μια ενζυμική αντίδραση να παράγει φως ορατό με κλασικό μικροσκόπιο. Τα τελευταία χρόνια μελέτες απέδειξαν την δυνατότητα εφαρμογής και τα πλεονεκτήματα της *in situ* υβριδοποίησης, στα κλινικά μικροβιολογικά εργαστήρια [12,13,14].

Β) Υβριδοποίηση σε υγρή φάση: Είναι η πλέον διαδεδομένη στη μοριακή μικροβιολογία, γιατί η πιθανότητα να συναντηθούν και να υβριδοποιηθούν συμπληρωματικές αλληλουχίες DNA-στόχου και ιχνηθέτη, είναι μεγαλύτερη. Γενικά, στην υγρή φάση η αντίδραση της υβριδοποίησης επιτυγχάνεται 5-10 φορές πιο γρήγορα απ' ό,τι επάνω σε στερεό υπόστρωμα [15], ενώ η προσθήκη «επιταχυντών» βελτιστοποιεί την αντίδραση. Ένα επιπρόσθετο στάδιο μετά την υβριδοποίηση είναι αναγκαίο για την αποκάλυψη του αποτελέσματος. Στα περισσότερα εμπορευματοποιημένα kits που διατίθενται για τη διάγνωση μικροοργανισμών εφαρμόζεται αυτός ο τύπος υβριδοποίησης. Οι μικροοργανισμοί λύνονται και μετά την υβριδοποίηση, τα υβρίδια ιχνηθέτης και DNA-στόχου διαχωρίζονται μέσα από την υγρή φάση με μια από τις παραλλαγές της μεθόδου υβριδοποίησης «τύπου σάντουιτς». Σε αυτές τις μεθόδους απαραίτητα στοιχεία είναι ο ιχνηθέτης-παγίδα, το DNA-στόχος και ο ιχνηθέτης-ανιχνευτής κατάλληλα σημασμένοι. Υπάρχουν πολλές παραλλαγές πρωτοκόλλου, ωστόσο το ακόλουθο είναι το βασικότερο. Το πρώτο στάδιο είναι η υβριδοποίηση του ιχνηθέτη-ανιχνευτή με το DNA-στόχο και ακολουθεί η προσθήκη του ιχνηθέτη-παγίδα προσκολλημένο σε στερεό υπόστρωμα. Σε ένα επόμενο στάδιο το σύμπλοκο σημασμένος ιχνηθέτης-ανιχνευτής/DNA-στόχος/ιχνηθέτης-παγίδα απομακρύνεται και ανιχνεύεται το αποτέλεσμα της υβριδοποίησης στο κατάλληλο για το σηματοδότη υπόστρωμα [16].

Γ) Υβριδοποίηση σε στερεή φάση: Ο Southern, το 1975 περιέγραψε τη μεταφορά DNA μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή επάνω σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και στη συνέχεια την ανίχνευση ειδικών τμημάτων DNA μετά από υβριδοποίηση [17]. Αυτή η τεχνική αποτέλεσε ένα από τα μεγαλύτερα βήματα της μοριακής βιολογίας. Στην πορεία έγιναν πολλές βελτιώσεις της μεθόδου, με τη χρήση τροποποιημένων πρωτοκόλλων και διάφορων ειδών μεμβρανών, όπως ενεργοποιημένης νιτροκυτταρίνης ή νάιλον.

Για την απλή χρήση της μεθόδου στη Διαγνωστική Μικροβιολογία δεν χρειάζεται ηλεκτροφόρηση. Είναι αρκετές λίγες μόνο σταγόνες από δείγμα απομονωμένου DNA στον κατάλληλο τύπο μεμβράνης (φίλτρο), ώστε να δημιουργηθεί μια κηλίδα. Τα

νουκλεϊνικά οξέα αποδιατάσσονται και προσδένονται στη μεμβράνη συνήθως με θέρμανση στους 80°C υπό κενό για δύο ώρες ή με έκθεση σε UV όταν πρόκειται για νάιλον μεμβράνη. Ακολουθεί ένα στάδιο προϋβριδοποίησης, για να ελαχιστοποιηθεί η μη ειδική προσκόλληση του ιχνηθέτη και προστίθεται ο σημασμένος ιχνηθέτης για να επιτελεστεί η αντίδραση υβριδοποίησης. Όταν η αντίδραση ολοκληρωθεί, τα φίλτρα πλένονται για να απομακρυνθεί η περίσσια ιχνηθέτη, και η αποκάλυψη γίνεται με το κατάλληλο σύστημα ανίχνευσης. Από τις τεχνικές υβριδοποίησης η τεχνική Southern είναι απαραίτητο «εργαλείο» στη μοριακή τυποποίηση.

2.1.6. Εφαρμογές ιχνηθετών στη Διαγνωστική Μικροβιολογία

Οι ιχνηθέτες DNA αποτελούν ένα εργαλείο απαραίτητο για την ταχεία διάγνωση με όλες τις ευεργετικές συνέπειες για τον ασθενή και την οικονομία. Επεμβατικές διαγνωστικές μέθοδοι μπορεί να αποφευχθούν, όπως επίσης και άχρηστη ή επιβλαβής θεραπεία (π.χ. θεραπεία σε λοίμωξη CMV) ή ακόμη και παραμονή ασθενών σε θαλάμους για μεγάλο διάστημα μέχρι να δοθεί το αποτέλεσμα της καλλιέργειας (φυματίωση). Στη χώρα μας ήδη υπάρχουν εμπορευματοποιημένα kits που εφαρμόζονται σε πολλά εργαστήρια.

Η τεχνολογία των ιχνηθετών βρήκε θαυμάσια εφαρμογή στην ανίχνευση των μυκοβακτηριδίων για την επιβεβαίωση της καλλιέργειας των *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare* και *M. gordonae* [18,19]. Έχουν αναπτυχθεί kits (Gen-Probe) για την επιβεβαίωση από καθαρό καλλιέργημα. Το σύστημα αυτό χρησιμοποιείται ευρέως στις ΗΠΑ, ενώ η συνδυασμένη χρήση του με καλλιέργεια σε ζωμό του συστήματος BACTEC αποτελεί ένα επιπλέον προτέρημα για τη γρήγορη ανίχνευση μυκοβακτηριδίων από δείγματα του αναπνευστικού συστήματος. Η ανίχνευση του ιχνηθέτη στηρίζεται στη χημειοφωταύγεια και η υβριδοποίηση επιτελείται σε υγρή φάση. Στο σύστημα αυτό ο ιχνηθέτης *M. tuberculosis* ανιχνεύει όλα τα μέλη του *M. tuberculosis complex*, συμπεριλαμβανόμενων και των *M. bovis* και *M. africanum* (σπανιότατα συνδεδεμένα με μυκοβακτηριδιακή λοίμωξη στον άνθρωπο) και *M. simiae*, ένα μυκοβακτηρίδιο παθογόνο σε ανώτερα θηλαστικά αλλά όχι στον άνθρωπο. Έτσι το αποτέλεσμα της εξέτασης μπορεί να θεωρηθεί θετικό όταν το τεστ γίνεται από αποικία, πριν την ταυτοποίηση με κλασικές μεθόδους.

Για άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς του αναπνευστικού συστήματος δεν υπάρχει εμπορευματοποιημένο kit ιχνηθετών παρά μόνο για είδη της *Legionella*,

συμπεριλαμβανόμενης και της *Legionella pneumophila*, του πιο παθογόνου είδους αυτού του γένους. Ωστόσο, η ευαισθησία της μεθόδου αυτής δεν φαίνεται να είναι υψηλότερη από τις τεχνικές άμεσου ανοσοφθορισμού [20] ενώ για τον *Haemophilus influenzae* και το *Mycoplasma pneumoniae* οι υπάρχοντες εμπορευματοποιημένοι ιχνηθέτες άμεσης ανίχνευσης δεν έχουν υιοθετηθεί από διαγνωστικά εργαστήρια ρουτίνας.

Η χρήση των ιχνηθετών για την άμεση ανίχνευση μικροοργανισμών από δείγματα κοπράνων θα μπορούσε να απαλλάξει τους εργαστηριακούς από πολύ και χρονοβόρα εργασία. Δεν υπάρχουν όμως μέχρι στιγμής ιχνηθέτες παρά μόνο για την επιβεβαίωση ορισμένων ειδών από καθαρό καλλιέργημα (GenProb). Οι ιχνηθέτες που έχουν αναπτυχθεί για εντεροπαθογόνους μικροοργανισμούς, υπολείπονται σε ευαισθησία και παρότι η απομόνωση του DNA από τα κόπρανα θα μπορούσε να αυξήσει την ευαισθησία, δεν έχουν καθιερωθεί. Άλλα συστήματα ιχνηθετών έχουν αναπτυχθεί για την αναγνώριση ειδικών γονιδιακών περιοχών εντεροτοξινών, της τοξίνης I του τοξικού συνδρόμου του *S.aureus* όπως επίσης και για την υποτυποποίηση *Clostridium perfringens* [21]. Ωστόσο, προς το παρόν, σ' αυτές τις περιπτώσεις μόνο από καθαρό καλλιέργημα μπορεί να γίνει υβριδοποίηση.

Η διάγνωση της σηψαιμίας είναι ένα από τα πρωταρχικά καθήκοντα του διαγνωστικού εργαστηρίου μιας και πρόκειται για κατάσταση άμεσης ανάγκης για την υγεία του ασθενή. Το γεγονός ότι μέσα σε μια αιμοκαλλιέργεια μπορεί ο αριθμός των μικροοργανισμών να ανέρχεται μόνο σε λίγες δεκάδες την ώρα της λήψης (μικρός αριθμός) οδήγησε στην αποτροπή της χρήσης ιχνηθετών. Πρόλα αυτά υπάρχουν συστήματα εμπορευματοποιημένων ιχνηθετών (GenProbe) για την επιβεβαίωση θετικών αιμοκαλλιέργειών από το BACTEC [22,23]. Ιχνηθέτες για τη διάγνωση στρεπτοκόκκων της ομάδας B, *S. aureus*, *H. influenzae*, *enterococcus spp.* και πνευμονιοκόκκου έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε ένα πρωτόκολλο [24] για την ανίχνευση των παραπάνω μικροοργανισμών μέσα από θετική αιμοκαλλιέργεια BACTEC.

Όσον αφορά τα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα, επιτυχώς χρησιμοποιούνται εμπορευματοποιημένοι ιχνηθέτες (GenProbe) για την *N. gonorrhoeae* και *C. trachomatis* σε δυο ξεχωριστά ή σε ένα τεστ και για τους δυο μικροοργανισμούς απευθείας από το δείγμα. Το σημαντικότερο επίτευγμα των τεχνικών υβριδοποίησης όσον αφορά τα νοσήματα αυτά είναι η χρήση ιχνηθετών για τη διάγνωση και τυποποίηση των Human Papilloma viruses για τους οποίους

υπάρχουν εμπορευματοποιημένα kits [25]. Επίσης υπάρχουν ιχνηθέτες για την ανίχνευση *Gardnerella vaginalis* όπως και *Trichomonas vaginalis* μέσα σε κολπικό υγρό. Στην πρώτη μάλιστα περίπτωση ο ποσοτικός προσδιορισμός είναι εφικτός [26] με την υβριδοποίηση και χρήσιμος εφόσον το 60% των γυναικών φέρουν *G. vaginalis* στον κόλπο [27]. Στο εμπόριο υπάρχει kit (Micro Probe) για την άμεση ανίχνευση ταυτόχρονα των δυο παραπάνω μικροοργανισμών από κολπικό υγρό.

Εμπορευματοποιημένοι ιχνηθέτες υπάρχουν για την επιβεβαίωση από καλλιέργεια παθογόνων μυκήτων όπως *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* της GenProbe. Επίσης, έχουν αναπτυχθεί ιχνηθέτες που αναγνωρίζουν έλμινθες και πρωτόζωα, αλλά δεν διατίθενται, προς το παρόν, στο εμπόριο ούτε είναι σε ευρεία χρήση.

2.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Παρότι οι τεχνικές υβριδοποίησης χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και ταυτοποίηση πλήθους μικροοργανισμών, το DNA-στόχος βρίσκεται σε τέτοιες ποσότητες μέσα στα δείγματα ώστε συνήθως πρέπει να προηγηθεί καλλιέργεια για να επιτύχει η δοκιμασία υβριδοποίησης.

Οι περισσότεροι λοιμογόνοι παράγοντες ή κυτταρικές δομές που πρόκειται να ανιχνευθούν υπάρχουν σε περιορισμένες ποσότητες μόνο. Ορισμένοι μικροοργανισμοί δεν επιδέχονται καλλιέργεια, ενώ άλλοι απαιτούν μεγάλο χρόνο καλλιέργειας πριν γίνει δυνατή η ανίχνευσή τους με δοκιμές υβριδοποίησης. Για τον εντοπισμό περιορισμένων ποσοτήτων νουκλεϊνικών οξέων με ιχνηθέτες DNA, χωρίς καλλιέργεια κυττάρων, χρειάζεται κάποια μέθοδος της ενίσχυσης της ανίχνευσης.

Ο πολλαπλασιασμός πολύ μικρών ποσοτήτων νουκλεϊνικών οξέων πριν από την εκτέλεση δοκιμών υβριδοποίησης αποτελεί μια διαδικασία που απλουστεύει και διευκολύνει τις δοκιμασίες υβριδοποίησης. Υπάρχουν δυο γενικές στρατηγικές για τις δοκιμές πολλαπλασιασμού με ιχνηθέτες: Η αλληλουχία του νουκλεϊνικού οξέος-στόχου μπορεί να πολλαπλασιαστεί αυξάνοντας, έτσι, τον αριθμό των διαθέσιμων νουκλεϊνικών οξέων-στόχων προς ανίχνευση, ενώ η άλλη λύση είναι ο εφοδιασμός του ιχνηθέτη με ένα σύστημα πολλαπλασιασμού που επιτρέπει σε μια πολύ μικρή

αντίδραση υβριδοποίησης να εκπέμπει ένα ανιχνεύσιμο σήμα. Στην πράξη μπορεί να επιλεγεί είτε μία είτε ένας συνδυασμός και των δυο. Ο πολλαπλασιασμός των νουκλεϊνικών οξέων επιτεύχθηκε με την PCR.

2.2.1. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction)

Στην αρχή της δεκαετίας του '80, μετά την επίτευξη της παραγωγής συνθετικών νουκλεοτιδίων, αναπτύχθηκε μία εννοιολογικά απλή διεργασία πολλαπλασιασμού, δηλαδή αύξησης του αριθμού των θραυσμάτων των νουκλεϊνικών οξέων που περιέχονται σε ένα δείγμα [28]. Έτσι μετά από μεγάλες έρευνες ο Saiki [29] ανέφερε την πρώτη πρακτική εφαρμογή ενζυματικού πολλαπλασιασμού νουκλεϊνικών οξέων. Το 1989, η διεργασία αυτή θεωρήθηκε “η σημαντικότερη επιστημονική εξέλιξη της χρονιάς” [30,31]. Η εν λόγω διεργασία ονομάζεται αλυσιδωτή αντίδραση της θερμοανθεκτικής πολυμεράσης (PCR). Μέσα σε λίγα χρόνια και μετά από ορισμένες βελτιώσεις, η PCR εξελίχθηκε στην πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο πολλαπλασιασμού νουκλεϊνικών οξέων, ιδιαίτερα του DNA.

Κατά την PCR χρησιμοποιείται μία θερμοανθεκτική πολυμεράση για την παραγωγή πολλαπλών αντιγράφων ειδικών τμημάτων DNA μέσα από ένα δείγμα στο οποίο περιέχονται περισσότερα μόρια DNA άσχετα προς το DNA-στόχο. Έτσι, μία ειδική αλληλουχία DNA ενός ιού ή βακτηρίου μπορεί από ένα μόνο αντίγραφο να πολλαπλασιαστεί μέσα σε λίγη ώρα σε ανιχνεύσιμα επίπεδα.

Η PCR βρήκε εφαρμογή στην ανίχνευση μικρών αριθμών βακτηρίων και ιών σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα. Εντυπωσιακό είναι ότι για να ανιχνευτεί ο ιός HIV μέσα σε αίμα ασθενούς αρκεί μία αλληλουχία προς 100.000 ισοδύναμες αλληλουχίες ανθρώπινου γενώματος! Εξάλλου ειδικές αλληλουχίες HIV μπορούν να ανιχνευτούν μέσα σε λίγες ώρες είτε σαν εξωκυττάρια μόρια RNA είτε σαν μόρια DNA ενδοκυττάριου προϊόντος [32,33], ενώ τα ειδικά αντισώματα ανιχνεύονται κατά την πορεία της νόσου, οκτώ εβδομάδες αργότερα περίπου.

Η PCR χρησιμοποιείται επίσης με επιτυχία στην παρασκευή μεγάλων ποσοτήτων ιχνηθετών DNA που σημαίνονται μάλιστα κατά την αντίδραση με ραδιενεργό ισότοπο ή με μη ραδιενεργό σήμανση [34,35].

Τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη αντιδραστηρίων PCR σε kits, η αυξημένη διάθεση σύνθεσης ολιγονουκλεοτιδίων με χαμηλό κόστος και η αύξηση των

διαθέσιμων πληροφοριών για τις αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων στο DNA με τις τεχνικές προσδιορισμού αλληλουχιών (sequencing), επέτρεψαν την εφαρμογή νέας τεχνολογίας για την επίλυση ακόμη και παλιών προβλημάτων και στα ερευνητικά εργαστήρια μικροβιολογίας.

Μια από τις πιο ενδιαφέρουσες εφαρμογές της PCR ήταν η ανάλυση αρχειοθετημένων δειγμάτων ιστού διατηρημένων σε παραφίνη [36] και μουσειακών δειγμάτων [37]. Πρόσφατα περιγράφηκε ο *in situ* πολλαπλασιασμός DNA με PCR σε μονιμοποιημένα κύτταρα και ιστούς [38,39]. Αυτή η διαδικασία μπορεί να παράσχει ένα ευαίσθητο μέσο καθορισμού της διάταξης παθογόνων μικροοργανισμών μέσα σε ιστούς. Επιπλέον τέτοιες αναδρομικές επιδημιολογικές μελέτες συμβάλουν στη διερεύνηση της συχνότητας και εκδήλωσης λοιμωδών νοσημάτων σε προηγούμενα χρόνια. Ο αριθμός των εφαρμογών της PCR ως ευαίσθητης και ειδικής εξέτασης για την ανίχνευση παθογόνων βακτηρίων, μυκήτων και παρασίτων έχει αυξηθεί σε μεγάλο βαθμό.

2.2.2. Βασικές αρχές της PCR

Η PCR είναι μια τεχνική που μπορεί να πολλαπλασιάσει αλληλουχίες DNA, απουσία ζωντανών οργανισμών (*in vitro*). Απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή της, είναι η γνώση της αλληλουχίας του DNA στόχου για τον σχεδιασμό συνθετικών DNA-ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητές), το καθένα συμπληρωματικό με κάθε μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA στόχου. Αναλυτικότερα, το ένζυμο της αντίδρασης βάση ενός δίκλωνου μορίου (εκμαγείο) και παρουσία ενός ζεύγους κατάλληλων εκκινητών, των τεσσάρων dNTPs, και ιόντων Mg^{++} , συνθέτει *in vitro* έναν τεράστιο αριθμό αντιγράφων από το αρχικό μόριο.

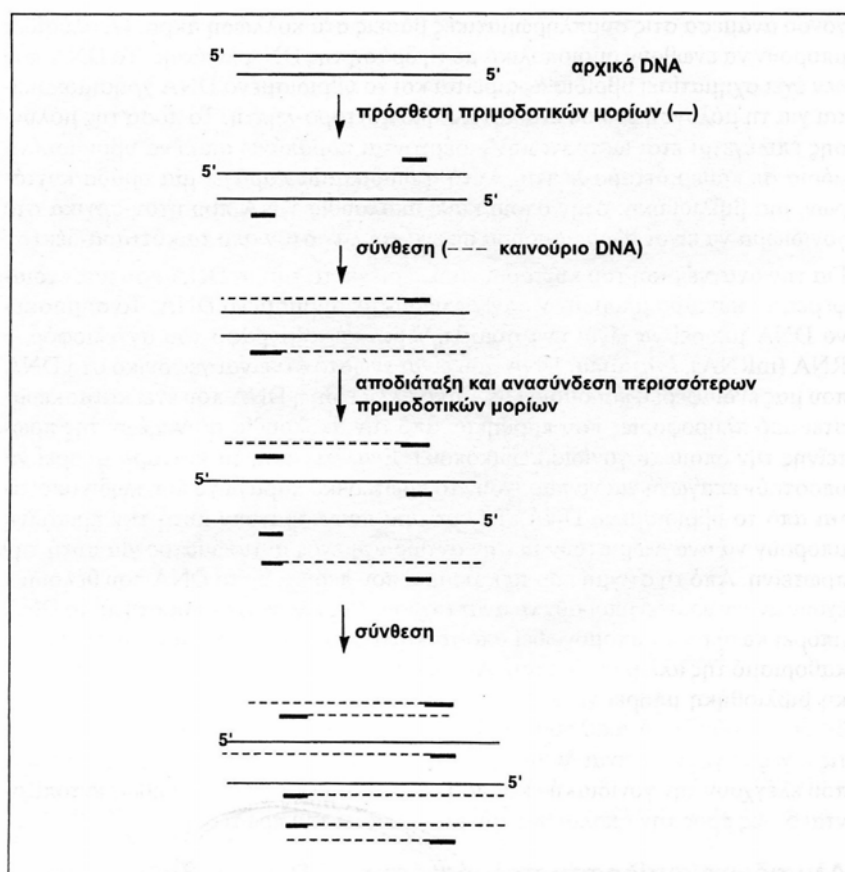
Στη στοιχειώδη μορφή της η PCR περιλαμβάνει τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται και είναι :

(i) *Το στάδιο αποδιάταξης* του εκμαγείου DNA, όπου το μίγμα της αντίδρασης επωάζεται σε υψηλή θερμοκρασία (90-95⁰C) ώστε το δίκλωνο DNA διαχωρίζεται σε δυο μονόκλωνες αλυσίδες που μπορούν να υβριδοποιηθούν με τους εκκινητές,

(ii) *Το στάδιο ανασύνδεσης* με εκκινητές, όπου η θερμοκρασία στην αντίδραση του μίγματος κατεβαίνει για να μπορέσουν οι εκκινητές να συνδεθούν στις συμπληρωματικές αλληλουχίες-στόχους. Η επανασύνδεση γίνεται συνήθως σε

θερμοκρασία που κυμαίνεται μεταξύ 40 έως 70°C, ανάλογα με το μήκος των εκκινητών και την αλατότητα του διαλύματος.

(iii) Το στάδιο της επιμήκυνσης, που λαμβάνει χώρα σε μέση θερμοκρασία (72°C). Οι εκκινητές επεκτείνονται με την συνεχή προσθήκη των συμπληρωματικών προς το εκμαγείο dNTPs, από την DNA πολυμεράση. Τα τρία αυτά στάδια αποτελούν ένα «θερμικό κύκλο». Ένα τυπικό πρωτόκολλο PCR περιλαμβάνει 20 με 40 θερμικούς κύκλους [40,41].



Εικόνα 1: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι αποδιάταξης, ανασύνδεσης πριμοδοτικών μορίων και σύνθεσης. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι η εκθετική παραγωγή του τμήματος DNA που εκτείνεται μεταξύ των πριμοδοτικών τμημάτων.

Κάθε φορά που συμπληρώνεται ένας κύκλος, η αλληλουχία-στόχος θεωρητικά διπλασιάζεται. Έτσι η επανάληψη των αποτελεσμάτων των θερμικών κύκλων είναι μια γεωμετρική συσσώρευση πολλαπλασιασθέντων αλληλουχιών-στόχων.

Κατά τη διάρκεια όλων των θερμικών κύκλων ενός πρωτοκόλλου PCR, οι αντιδράσεις επέκτασης κάθε εκκινητή απολήγουν σε διάφορες αποστάσεις από τον εκκινητή, με αποτέλεσμα προϊόντα πολλαπλασιασμού που περιέχουν αντίθετες έλικες

DNA απροσδιοριστού μήκους. Μετά το δεύτερο κύκλο, όμως, αρχίζει να συσσωρεύεται ένα ειδικό προϊόν πολλαπλασιασμού, που γρήγορα γίνεται το κυρίαρχο προϊόν. Πρόκειται για το προϊόν της PCR ή αμπλικόνιο.

Αρχικά, για τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό νουκλεϊνικών οξέων δηλαδή για την επέκταση των εκκινητών, χρησιμοποιήθηκε μια πολυμεράση της *E. coli*, το Klenow fragment DNA polymerase I. Η πολυμεράση όμως αυτή ευάλωτη στους 94°C γρήγορα καταστρεφόταν και έτσι κάθε φορά έπρεπε να προστίθεται στην αντίδραση κι άλλη ποσότητα ενζύμου. Η βελτίωση της PCR με τη χρήση ενός θερμοάντοχου ενζύμου, της Taq DNA πολυμεράσης, οδήγησε σε ημιαυτοματοποίηση και απλούστευση της διεργασίας, σε σημείο που σήμερα χρησιμοποιείται ευρύτατα από τα ερευνητικά εργαστήρια [30]. Η Taq DNA πολυμεράση, είναι ένα “θαυματουργό” ένζυμο που απομονώθηκε από ένα θερμοφίλο βακτήριο, το *Thermus aquaticus*, που ζει σε θερμές πηγές σε θερμοκρασίες 70⁰ έως 75⁰ C [30]. Η δραστηριότητα της Taq DNA polymerase είναι 800bp/min στους 75⁰ C και έχει διάρκεια ημιζωής περίπου 40min στους 95⁰C, αντέχοντας, έτσι, την επαναλαμβανόμενη θερμική ανακύκλωση της PCR. Το ένζυμο προστίθεται μια φορά στην αρχή της αντίδρασης, απλουστεύοντας έτσι σε μεγάλο βαθμό το χειρισμό του δείγματος. Επιπλέον, η εκτέλεση των αντιδράσεων ανασύνδεσης και επέκτασης σε υψηλότερες θερμοκρασίες μειώνει σημαντικά το μη ειδικό πολλαπλασιασμό. Το στάδιο ανασύνδεσης, που τώρα επιτελείται σε υψηλές θερμοκρασίες, μπορεί να επιλέγεται αυστηρότερα για κάθε εκκινητή [30].

Μία άλλη καινοτομία για την καλύτερευση της PCR ήταν η ανάπτυξη του θερμικού κυκλωτή με δυνατότητα προγραμματισμού. Ο θερμικός κυκλωτής, στην ουσία ένα θερμαντικό σώμα με δυνατότητα προγραμματισμού, μπορεί να εκτελεί κύκλους θέρμανσης και ψύξης μόνος του ώστε να αποφεύγονται οι μεταφορές των σωλήνων από υδατόλουτρο σε υδατόλουτρο.

2.2.3. Άλλες μέθοδοι πολλαπλασιασμού νουκλεϊνικών οξέων

Εκτός από την κλασική αντίδραση PCR του πολλαπλασιασμού νουκλεϊνικών οξέων, που γίνεται με τη βοήθεια της θερμοανθεκτικής πολυμεράσης, τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκαν άλλες μέθοδοι πολλαπλασιασμού, εξαιρετικά χρήσιμες στη Διαγνωστική Μικροβιολογία. Μερικές από αυτές έχουν ήδη εμπορευματοποιηθεί με

τη μορφή kits. Οι κυριότερες είναι: η αλυσιδωτή αντίδραση της λιγάσης (Ligase chain reaction), τα συστήματα πολλαπλασιασμού που βασίζονται σε μεταγραφή (TMA, Transcription-mediated amplification), τα συστήματα πολλαπλασιασμού που βασίζονται στην αλληλουχία των νουκλεϊνικών οξέων (NASBA, Nucleic acid sequence-based amplification) και ο πολλαπλασιασμός με Qb ρεπλικάση.

Η αλυσιδωτή αντίδραση της λιγάσης [42,43] ή δοκιμή πρόσδεσης ολιγονουκλεοτιδίου, είναι άλλη μια τεχνική για την ανίχνευση ή τον πολλαπλασιασμό μιας αλληλουχίας-στόχου. Αντίθετα με την PCR (που δημιουργεί νέα μόρια DNA με εκκινητές-ανεξάρτητα ολιγονουκλεοτίδια) η αντίδραση της λιγάσης χρησιμοποιεί μια θερμοανθεκτική λιγάση για να ενώσει δύο ολιγονουκλεοτίδια που βρίσκονται ακριβώς δίπλα το ένα στο άλλο [44,45].

Οι τεχνικές NASBA και TMA είναι εμπορικά διαθέσιμες και διέπονται από την ίδια βασική αρχή, δηλαδή απαιτείται η δράση τριών ενζύμων: της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT), της RNase H και της T7 DNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση. Συνοπτικά στη βασική μέθοδο ένα ολιγονουκλεοτίδιο που περιέχει μια αλληλουχία υποκινητή στο 5' για την RNA πολυμεράση χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την αντίστροφη μεταγραφάση για τη δημιουργία ενός αντιγράφου cDNA από το στόχο RNA. Μετά την αποδιάταξη ένα δεύτερο ολιγονουκλεοτίδιο συμπληρωματικό του υποκινητή της RNA πολυμεράση ανασυνδέεται στην νέα έλικα του DNA. Αντίστροφη μεταγραφάση προστίθεται για να παραχθεί ένα μόριο διπλής έλικας DNA (ds DNA). Εν συνεχεία μπορεί να χρησιμοποιηθεί η RNA πολυμεράση, ως εκκινητή της αντίδρασης για να παραχθούν πολλαπλά αντίγραφα (10-10.000) του RNA.

Η μέθοδος πολλαπλασιασμού με ρεπλικάση Qb πήρε το όνομά της από τη ρεπλικάση του βακτηριοφάγου Qb. Πρόκειται για μια κατευθυνόμενη από το RNA πολυμεράση ειδική του φάγου Qb, η οποία έχει την ιδιότητα να πολλαπλασιάζει μόρια RNA από ένα στόχο RNA [46]. Μοιάζει με την PCR στο ότι και οι δύο τεχνικές πολλαπλασιάζουν νουκλεϊνικά οξέα, ωστόσο ο πολλαπλασιασμός του RNA χρησιμεύει περισσότερο στην ενίσχυση ανίχνευσης σημάτων παρά ως μέθοδος αύξησης της ποσότητας του νουκλεϊνικού οξέος-στόχου όπως στην PCR.

2.2.4. Παραλλαγές της PCR

Στην πορεία έγιναν πολλές τροποποιήσεις στη βασική αντίδραση της PCR, οι οποίες επεκτείνανε την χρήση των τεχνικών αυτών και διεύρυναν το φάσμα ανίχνευσης των μικροοργανισμών [47]. Οι περισσότερες τροποποιήσεις είναι πλέον τυποποιημένες και εφαρμόζονται σε πολλά κλινικά εργαστήρια. Ανάμεσα στις παραλλαγές οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες στη Μοριακή Διαγνωστική Μικροβιολογία είναι οι πιο κάτω: PCR με αντίστροφη μεταγραφάση (RT-PCR, reverse transcriptase), διπλή ή εμφωλεάζουσα PCR (nested PCR), PCR ευρέως φάσματος (broad-range PCR) και η ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (real-time Quantitative-PCR).

A) PCR με αντίστροφη μεταγραφάση (RT-PCR)

Οι ρετροϊοί είναι RNA ιοί οι οποίοι σε κάποιο κύκλο της ζωής τους συνθέτουν DNA με εκμαγείο το RNA του γονιδιώματος. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται με τη δράση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (RT, reverse transcriptase). Κατά την αντίδραση της PCR με αντίστροφη μεταγραφάση επιτελείται αντίστροφη μεταγραφή ενός στόχου RNA ώστε να παραχθούν υβρίδια RNA-cDNA και στη συνέχεια μια δεύτερη PCR, με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό ενός στόχου-RNA [48].

Με αυτή τη τεχνική το εύρος των εφαρμογών της PCR στη διάγνωση των λοιμωδών νοσημάτων μπορεί να επεκταθεί σε μεγάλο βαθμό εφόσον ανιχνεύονται στόχοι RNA. Για παράδειγμα η RT-PCR χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ορισμένων ιικών γονιδιωματικών στόχων που υπάρχουν μόνο ως RNA (ιός ηπατίτιδας C, ιός της γρίπης, πικορναϊός) και δεν υπόκεινται σε αντίστροφη με ενδιάμεσο DNA κατά τον κύκλο ζωής τους. Η ανίχνευση του RNA μπορεί επίσης να είναι χρήσιμη για τον εντοπισμό μικροοργανισμών όπως τα βακτήρια και οι μύκητες, μιας και περιέχουν χιλιάδες μόρια mRNA ή rRNA. Επιπλέον, η ειδική ανίχνευση του RNA μπορεί να αποδειχτεί χρήσιμη για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής θεραπείας (λόγω της ταχύτερης παραγωγής στόχων RNA) ή για τη μελέτη παθογενών καταστάσεων που μοιάζουν να συνδέονται με ειδική έκφραση γονιδίων, όπως η σχέση ανάμεσα στα νεοπλάσματα του γεννητικού συστήματος και την έκφραση των ιικών ογκογονιδίων E6 και E7 των human papilloma virus [49]

B) Διπλή ή εμφωλεάζουσα PCR (nested PCR)

Η παραλλαγή αυτή της PCR σχεδιάστηκε με σκοπό να αυξηθεί η ευαισθησία της αντίδρασης. Πρόκειται για δύο συνεχόμενες αντιδράσεις PCR με 25 περίπου κύκλους

για την κάθε μία. Στην πρώτη PCR χρησιμοποιείται ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων που περικλείει την ευρύτερη περιοχή της ακολουθίας που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Στη συνέχεια το προϊόν του πρώτου πολλαπλασιασμού μεταφέρεται σε δεύτερο δοκιμαστικό σωλήνα και επιτελείται η δεύτερη αντίδραση PCR με ένα ή περισσότερα ζεύγη ολιγονουκλεοτιδίων ειδικών ως προς την εσωτερική αλληλουχία που πολλαπλασιάστηκε με το πρώτο ζεύγος εκκινητών [50]. Έτσι αυξάνεται η ειδικότητα και η ευαισθησία της εξέτασης.

Ένα σοβαρό πρόβλημα της διπλής PCR είναι η μόλυνση του προϊόντος της πρώτης αντίδρασης κατά τη μεταφορά στο δεύτερο δοκιμαστικό σωλήνα, το οποίο αντιμετωπίστηκε με τη μέθοδο του διπλού πρωτοκόλλου του ενός σωλήνα.

Η nested PCR αποδείχτηκε χρήσιμη για την ανίχνευση μικροοργανισμών οι οποίοι βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις στο αίμα και στους ιστούς, όπως η *Rickettsia*, η *Bartonella* και άλλοι [51].

Δ) Ενίσχυση νουκλεϊνικών οξέων σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR)

Δύο τεχνολογικά πλεονεκτήματα είχαν σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη της ενίσχυσης των νουκλεϊνικών οξέων σε πραγματικό χρόνο. Το πρώτο ήταν η ανάπτυξη μεθόδων ταχύτερης εναλλαγής της θερμοκρασίας του θαλάμου αντίδρασης. Η κλασική PCR πραγματοποιείται σε κυκλωτή ο οποίος περιέχει κεφαλή με μεταλλικό ή συμπαγές υλικό το οποίο εναλλάσσει τη ζέστη με το κρύο σε σχετικά αργούς ρυθμούς. Η ταχύτατη παραγωγή θερμού αέρα και η απομάκρυνσή του μέσω ειδικών καναλιών του μηχανήματος real-time, επιτρέπει την ταχύτατη εξέλιξη των κύκλων της αντίδρασης. Επίσης η χρήση μικρότερων όγκων αντίδρασης συμβάλλει στην ταχεία εναλλαγή θερμικής ενέργειας.

Το δεύτερο τεχνικό πλεονέκτημα ήταν η ανάπτυξη ενός ομοιογενούς μίγματος αντίδρασης. Στο μίγμα αυτό τα φθορίζοντα μόρια τα οποία χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του ενισχυμένου προϊόντος, είναι παρόντα στον ίδιο χώρο που εξελίσσεται η αντίδραση. Επιπλέον μετά το τέλος κάθε κύκλου γίνεται από το μηχανήμα μια εκτίμηση του φθορισμού που εκπέμπεται. Το αποτέλεσμα είναι η δυνατότητα παρατήρησης της αντίδρασης να εξελίσσεται σε πραγματικό χρόνο (“real-time”). Αυτή η παραλλαγή της κλασικής PCR, έχει το πλεονέκτημα της μεγάλης ταχύτητας. Η τεχνική αυτή έχει εφαρμοστεί επιτυχώς σε μεγάλη ποικιλία κλινικά σημαντικών μικροοργανισμών, οι οποίοι μέχρι πρόσφατα ανιχνεύονταν αποκλειστικά με την κλασική PCR.

Γ) Ευρέως φάσματος PCR (broad-range PCR)

Η ειδικότητα του ζεύγους εκκινητών καθορίζεται από μια πληθώρα παραγόντων. Μερικοί από αυτούς είναι τεχνικοί, όπως η θερμοκρασία ανασύνδεσης των εκκινητών, η σύσταση του μίγματος της αντίδρασης (πχ. συγκέντρωση αλάτων) και κάποιοι άλλοι έχουν να κάνουν με τη συμπληρωματικότητα των εκκινητών με την αλληλουχία στόχο. Η ειδικότητα της PCR αντανakλά τη μοναδικότητα της αλληλουχίας με την οποία συνδέονται οι εκκινητές. Σε αρκετές περιπτώσεις είναι επιθυμητή αυτή η μοναδικότητα, εφόσον επιδιώκεται να εντοπιστεί ένας μόνο μικροοργανισμός. Για παράδειγμα αποδείχτηκε ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί ένα αντιγόνο ειδικό για το είδος *Coccidioides* είναι χρήσιμος στόχος για τον διαχωρισμό του από άλλους μύκητες [52]. Η αποτυχία σχεδιασμού αντίδρασης, ειδικής για το είδος έχει σαν αποτέλεσμα ανεπιθύμητες διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλα συγγενικά είδη. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το εμπορικώς διαθέσιμο kit για την ανίχνευση του μικροοργανισμού *N.gonorrhoeae*, ο οποίος είναι γνωστό ότι κάνει διασταυρούμενες αντιδράσεις με όλα τα είδη *Neisseria* [53].

Η ιδέα ενός συστήματος ανίχνευσης, μιας ευρύτερης ομάδας μικροοργανισμών, προτάθηκε εκφράζοντας την ανάγκη για την ύπαρξη μιας διαδικασίας στηριζόμενη στην PCR ικανή να επιλύσει προβλήματα στην κλινική πράξη και σε επείγουσες καταστάσεις [54]. Τα πειράματα λοιπόν επικεντρώθηκαν στη χρήση αλληλουχιών του 16S ή 23S rRNA γονιδίου, ένα εξελικτικά συντηρημένο γονίδιο που υπάρχει αποκλειστικά στα βακτηριακά είδη [55,56]. Σχεδιάζοντας εκκινητές συμπληρωματικούς με αυτή την περιοχή, οι ερευνητές θεωρητικά, μπορούν να επιβεβαιώσουν την παρουσία οποιουδήποτε βακτηρίου σε στείρα μικροοργανισμών, κλινικά δείγματα (όπως το εγκεφαλονωτιαίο υγρό και το πλήρες αίμα).

Τόσο οι ειδικοί όσο και οι ευρέως-φάσματος εκκινητές είναι χρήσιμοι αναλόγως των προβλημάτων που πρέπει να επιλυθούν. Υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα στη χρήση των ευρέως-φάσματος εκκινητών, αλλά και περιορισμοί επίσης.

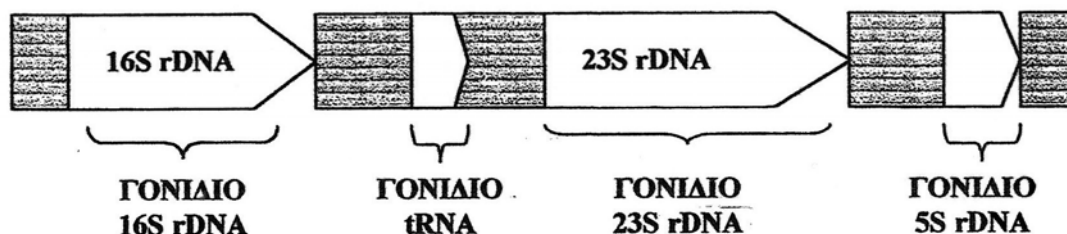
Το κύριο πλεονέκτημα που προκύπτει από τη χρήση της ευρέως-φάσματος PCR είναι ότι κάθε μέλος μιας μεγάλης ομάδας μπορεί να ανιχνευτεί με μια μονάχα αντίδραση. Όταν προκύψει θετικό αποτέλεσμα, το προϊόν της PCR επεξεργάζεται με διάφορους τρόπους ώστε να ταυτοποιηθεί πιο μέλος της ομάδας είναι. Οι τεχνικές επεξεργασία είναι, υβριδοποίηση με συγκεκριμένους ανιχνευτές, ανάλυση της

αλληλουχίας του προϊόντος, ανάλυση με μικροσυστοιχίες και ενζυμικές ανοσοδιαδικασίες [57,58].

Ο βασικός περιορισμός αυτής της παραλλαγής της PCR είναι ότι όσο μεγαλύτερη είναι η ομάδα μικροοργανισμών που στοχεύει, τόσο πιθανότερο είναι να ανιχνεύσει μικροοργανισμούς φυλογενετικά συγγενείς, οι οποίοι όμως δεν αποτελούν μέλη της ομάδας. Για παράδειγμα χρησιμοποιήθηκε η ευρέως-φάσματος PCR για να ανιχνεύσει όλα τα κλινικώς σημαντικά μυκοβακτηρίδια, ωστόσο μπορούσε να ενισχύσει και όλα τα κομμάτια DNA βακτηριδίων (υψηλής συγκέντρωσης σε γουανίνη-κυτοσίνη) που είναι συγγενικά με αυτά. Αυτός ο περιορισμός μπορεί να αντιμετωπιστεί χρησιμοποιώντας υψηλής ειδικότητας ανιχνευτές, όμως δεν εξαλείφεται πλήρως. Ένα ακόμη πρόβλημα αποτελεί η παρουσία περισσότερων από ένα μικροοργανισμό σε ένα δείγμα, όπου οι εκκινητές της PCR καταναλώνονται γρήγορα. Επιπλέον είναι δύσκολο να λάβεις χρήσιμες πληροφορίες από την ανάλυση της αλληλουχίας μιας τέτοια αντίδρασης λόγω της μεικτής εικόνας που εμφανίζεται.

- **Εφαρμογές ευρέως φάσματος PCR**

Πιθανότατα οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι στόχοι της ευρέως φάσματος PCR, είναι γονίδια που κωδικοποιούν ριβοσωμικές υπομονάδες (rDNA) για τα βακτήρια, τους μύκητες και τα παράσιτα [59,60]. Αυτά τα γονίδια είναι ιδιαιτέρως χρήσιμα για την ευρέως φάσματος PCR αλλά και για την ταξινόμηση των μικροοργανισμών επειδή διαθέτουν περιοχές συντηρημένες αλλά και μεταβαλλόμενες. Οι υψηλά συντηρημένες περιοχές αποτελούν τον κατάλληλο στόχο για τους ευρέως-φάσματος εκκινητές, και αντίστοιχα οι μεταβαλλόμενες περιοχές (Δια-Γονιδιακές Περιοχές) αποτελούν τον κατάλληλο στόχο για τους ανιχνευτές ειδικούς για το είδος. Αυτές οι εφαρμογές χρησιμοποιήθηκαν για να βοηθήσουν στον προσδιορισμό της αιτίας της βακτηριακής μηνιγγίτιδας, της μολυσματικής ενδοκαρδίτιδας και άλλων βακτηριακών λοιμώξεων [61,62,63,64,60]. Όπως και με την καλλιέργεια, η παρουσία βακτηρίων ως επιμόλυνση, αποτελεί προβληματισμό για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της ευρέως-φάσματος PCR [65,66].



Εικόνα 2: Σχηματική παράσταση της οργάνωσης του rDNA των βακτηρίων (κατά Stryer). Οι γρμμοσκιασμένες περιοχές υποδηλώνουν την παρουσία των Δια-Γονιδιακών Περιοχών (μη-συντηρημένες).

Αυτός ο τύπος εφαρμογής χρησιμοποιήθηκε φυσικά από πολλές διαφορετικές ομάδες και για την ανίχνευση των μυκοβακτηριδίων [67,68]. Οι πιο συχνές τεχνικές ανάλυσης μετά την PCR, είναι η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, οι μικροσυστοιχίες DNA και οι πολλαπλοί ανιχνευτές.

Για την ανίχνευση των μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκαν ποικίλοι γενετικοί τύποι ως στόχο της ευρέως-φάσματος PCR που μοιάζουν με το rDNA γονίδιο, μιας και διαθέτουν συντηρημένες και μεταβαλλόμενες περιοχές. Αυτοί οι εναλλακτικοί στόχοι περιλαμβάνουν την RNA πολυμεράση (rpoB), την πρωτεΐνη θερμικού σοκ (hsp, heat-shock protein), και τον παράγοντα επιμήκυνσης-Tu (tuf) (). Ο χαρακτηρισμός των μικροοργανισμών, ιδιαίτερα των μυκοβακτηριδίων από το γονίδιο rpoB, έχει ενδιαφέρον μιας και η ανάλυση του γονιδίου αυτού δίνει πληροφορίες για την ανθεκτικότητα των μυκοβακτηριδίων στη ριφαμπικίνη.

2.2.5. Ανάλυση μετά την ενίσχυση

Μετά την ολοκλήρωση της ενίσχυσης του νουκλεϊνικού οξέως, το προϊόν της αντίδρασης πρέπει να αναλυθεί. Οι μέθοδοι ανάλυσής του μπορεί να είναι από απλό προσδιορισμό του μεγέθους, με ηλεκτροφόρηση σε τζέλ, μέχρι αναλυτική περιγραφή της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων που το συνθέτουν, μέσω της ανάλυσης της αλληλουχίας.

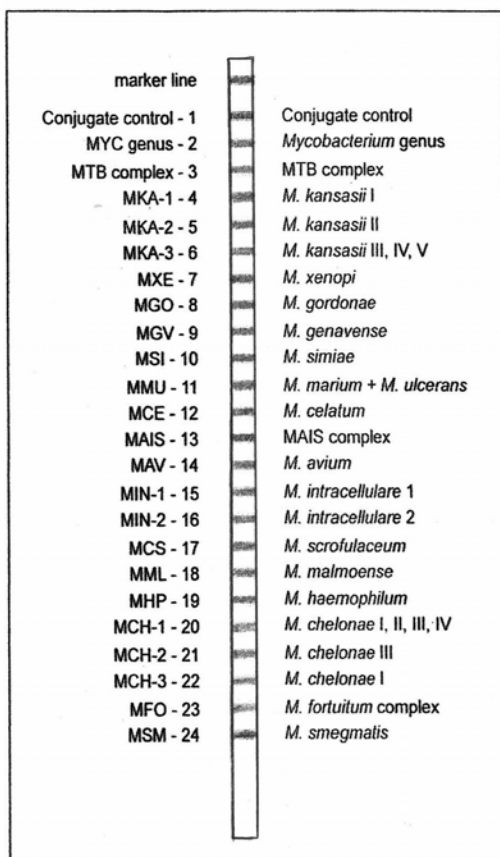
A) Ανάλυση με μικροσυστοιχίες

Μια μεγάλη ποικιλία μικροσυστοιχιών συχνά γνωστά και ως “τσιπ γονιδίων” χρησιμοποιήθηκαν για χρόνια από τη βασική επιστήμη για διάφορους σκοπούς συμπεριλαμβανομένων και των μολυσματικών ασθενειών [69,70]. Αυτές οι διατάξεις ανιχνεύουν ταυτόχρονα μεγάλο αριθμό σημάτων, και έχουν εφαρμογή στην ανίχνευση γενετικών (DNA) διαφορών αλλά και διαφορών στην έκφραση (mRNA). Είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για τον προσδιορισμό των γονιδίων τα οποία εκφράζονται σαν απάντηση σε διάφορα ερεθίσματα.

Συνοπτικά τα προϊόντα της ενίσχυσης των νουκλεϊνικών οξέων, που προκύπτουν από την ευρέως-φάσματος PCR μεταφέρονται στις μικροσυστοιχίες. Οι τελευταίες διαθέτουν συχνά χιλιάδες θέσεις υβριδοποίησης, κάθε μια από τις οποίες παρέχουν διαφορετική πληροφορία, ανάλογα με τη νουκλεοτιδική σύσταση του προϊόντος. Το σήμα που παράγεται από τις μικροσυστοιχίες είναι είτε φθορισμός, είτε ηλεκτρισμός. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι η ικανότητα να ανιχνεύει χιλιάδες αντιδράσεις υβριδισμού ταυτόχρονα. Από το πλεονέκτημα αυτό απορρέει και ο μεγαλύτερος περιορισμός, ο οποίος είναι η δυσκολία στην επεξεργασία και ερμηνεία των αποτελεσμάτων που προϋποθέτει κατάλληλο λογισμικό και γνώση. Ένας επιπλέον περιορισμός αποτελεί το μεγάλο κόστος εφαρμογής. Παρόλα αυτά οι μικροσυστοιχίες θα χρησιμοποιηθούν στη διάγνωση των μολυσματικών ασθενειών και θα αποτελέσουν στο μέλλον τη ρουτίνα του μικροβιολογικού εργαστηρίου.

B) Τεχνικές ανάστροφου υβριδισμού

Μια ιδιαίτερα αποτελεσματική μέθοδος είναι η ακινητοποίηση όλων των ανιχνευτών που μας ενδιαφέρουν, σε μια ταινία νιτροκυτταρίνης. Στη συνέχεια προστίθεται το προϊόν της ενίσχυσης (προϊόν της PCR) στην ταινία και προσδιορίζεται με ποιόν από τους ανιχνευτές υβριδοποιείται. Αυτή η τεχνική ονομάζεται ανάστροφος υβριδισμός, μιας και το προϊόν προστίθεται μετά την ακινητοποίηση του ανιχνευτή σε ταινία νιτροκυτταρίνης. Είναι δηλαδή η ανάστροφη διαδικασία του υβριδισμού κατά Southern (υβριδισμός σε στερεή φάση). Η τεχνική αυτή έχει επίσης το πλεονέκτημα της χρήσης χρωμογόνου αντί ραδιενεργού αντίδρασης για την ανίχνευση του υβριδισμού.



Εικόνα 3: Η ταινία ανάστροφου υβριδισμού που φαίνεται, αποδεικνύει ότι τα κλινικά σημαντικά μυκοβακτηρίδια μπορούν να ταυτοποιηθούν με τη μέθοδο της PCR ακολουθούμενη από τον ανάστροφο υβριδισμό του προϊόντος.

Γ) Προσδιορισμός ακολουθίας DNA (DNA sequencing)

Ο προσδιορισμός της ακολουθίας ενισχυμένου προϊόντος DNA, είναι η πιο κοινή μέθοδος ανάλυσης μετά την ενίσχυση. Παρά τη χρησιμότητα της διαδικασίας, είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη συγκριτικά με τον απλό υβριδισμό και απαιτεί γνώσεις ειδικού λογισμικού και γενετικών βάσεων δεδομένων. Η ανάλυση της ακολουθίας είναι ιδιαίτερα χρήσιμη όταν αναλύεται μια ομάδα μικροοργανισμών για τον προσδιορισμό των συντηρημένων και μεταβλητών περιοχών, σε προϊόν της ευρέως-φάσματος PCR. Η ανάλυση των μεταβλητών περιοχών αποτελεί ένα “εργαλείο” για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών [60,61]. Απεδείχθη επίσης χρήσιμη για την ανάλυση γενετικών μεταλλάξεων σε ιικά γονιδιώματα, που μπορεί να έχουν σαν αποτέλεσμα ανοχή σε αντιϊκά φάρμακα [71].

- **Παραδοσιακή ανάλυση της ακολουθίας DNA**

Αρχικά η παραδοσιακή ανάλυση της ακολουθίας χρησιμοποιήθηκε μόνο σε ερευνητικά εργαστήρια, ωστόσο σήμερα αποτελεί εργαλείο πολλών εργαστηρίων μοριακής παθολογίας και μοριακής μικροβιολογίας. Αυτή η τεχνική, γνωστή και ως μέθοδος Sanger παράγει μια σκάλα από τμήματα DNA, το καθένα από τα οποία τελειώνει σε μια συγκεκριμένη βάση. Το κλειδί στη μέθοδο αυτή είναι η χρήση των τριφωσφορικών διδεοξυριβονουκλεοζιτών, όπου η ομάδα 3'-OH της δεοξυριβόζης που υπάρχει στα κανονικά νουκλεοτίδια λείπει, παρεμποδίζοντας έτσι την προσθήκη του επομένου νουκλεοτιδίου. Τέσσερις διαφορετικοί τριφωσφορικοί νουκλεοζίτες που τερματίζουν την αλυσίδα χρησιμοποιούνται σε ξεχωριστές αντιδράσεις σύνθεσης DNA με την ίδια μήτρα μονόκλωνου DNA για να προσδιοριστεί ολόκληρη η αλληλουχία. Στη συνέχεια τα παράγωγα των τεσσάρων αυτών αντιδράσεων αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου σε παράλληλες διαδρομές και η αλληλουχία του DNA διαβάζεται στην πηκτή από κάτω προς τα πάνω.

Η μέθοδος αυτή βρήκε πολλές εφαρμογές. Επιτυχώς χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση βακτηρίων, μυκοβακτηρίων και μυκήτων. Τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν ριβοσωμικές υπομονάδες όπως προαναφέραμε αποτελούν στόχους για την ταυτοποίηση αυτού του τύπου. Η ταυτοποίηση στηριζόμενη στην ακολουθία χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του αιτιολογικού παράγοντα μιας πληθώρας μολύνσεων, ωστόσο είναι απαραίτητη για αργά αναπτυσσόμενους μικροοργανισμούς και νοκάρδιες [68,72].

- **Ανάλυση της ακολουθίας με σύνθεση (Pyrosequencing)**

Η τεχνική αυτή είναι μια νέα μέθοδος ανάλυσης της ακολουθίας η οποία βασίζεται στη σύνθεση σε αντίθεση με τη μέθοδο Sanger, η οποία στηρίζεται στον τερματισμό. Αυτή η τεχνολογία χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση πολυμορφισμών ενός νουκλεοτιδίου (SNPs) που σχετίζονται με γενετικές ασθένειες και τη νεοπλασία. Επίσης χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση και τον διαχωρισμό των μικροοργανισμών [73]. Αντίθετα με την παραδοσιακή ανάλυση η τεχνολογία αυτή βασίζεται στην ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων σε νεοσυντεθόμενη αλυσίδα DNA. Οι περιορισμοί αυτής της τεχνικής είναι η δυνατότητα ανάλυσης μόνο μικρών αλληλουχιών (~30bp), η δυσκολία ανάλυσης εάν στο διάλυμα είναι παρούσα εκτεταμένη δευτεροταγής δομή και αδυναμία να χαρακτηρίσει επακριβώς περιοχές

που έχουν περισσότερα από τέσσερα ίδια νουκλεοτίδια στη σειρά. Το πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι η εύκολη εφαρμογή.

2.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Ο όρος τυποποίηση αφορά τη διαδικασία με την οποία διαπιστώνεται εάν στελέχη ενός βακτηρίου συνδέονται κλωνικά μεταξύ τους ή όχι. Συχνά στους νοσοκομειακούς μικροβιολόγους και λοιμωξιολόγους δημιουργείται η ανάγκη προσδιορισμού της συγγένειας μεταξύ στελεχών ώστε να προσδιοριστεί εάν πρόκειται για μετάδοση λόγω χειρισμού. Η διαδικασία της τυποποίησης βασίζεται στην αρχή ότι στελέχη του ίδιου είδους (μη σχετιζόμενα επιδημιολογικά μεταξύ τους) διαφέρουν συχνά σε ένα σύνολο χαρακτηριστικών. Αντίθετα, στελέχη που συνδέονται κλωνικά μεταξύ τους έχουν κοινά χαρακτηριστικά.

Η τυποποίηση προσφέρει ουσιαστική βοήθεια στην παρακολούθηση των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων, διότι διευκρινίζει αν οι λοιμώξεις προέρχονται από ένα ή περισσότερους κλώνους, ώστε να ληφθούν τα κατάλληλα μέτρα περιορισμού της διασποράς. Επιπλέον η μεγάλη διασπορά της αντοχής ιδιαίτερα στο νοσοκομειακό περιβάλλον επιβάλλει την επιδημιολογική διερεύνηση, η οποία βασίζεται στην τυποποίηση των παθογόνων βακτηρίων. Στελέχη ενός βακτηρίου με συγκεκριμένο φαινότυπο αντοχής που απομονώνονται μέσα στο νοσοκομείο θα πρέπει να ελέγχονται πάντα για τυχόν κλωνική συγγένεια.

Η τυποποίηση των βακτηρίων στο παρελθόν βασιζόταν σε τεχνικές όπως η βιοτυπία, η οροτυπία, η λυσιτυπία. Σήμερα η χρησιμοποίηση των παραπάνω μεθόδων έχει μειωθεί σημαντικά και τη θέση τους παίρνουν οι σύγχρονες μοριακές μέθοδοι τυποποίησης. Οι νέες μέθοδοι βασίζονται στην ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδιώματος του μικροοργανισμού και έχουν τη δυνατότητα να ανιχνεύουν ακόμη και πολύ μικρές αλλαγές.

Έχουν περιγραφεί πολλές μοριακές μέθοδοι για την ανάλυση της σχέσης μεταξύ στελεχών [PCR-RFLP(restriction-fragment-length polymorphism), nested-PCR, RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA), rep-PCR (repetitive), PFGE Pulsed-field gel electrophoresis) και MLST (Multilocus sequence typing)], ωστόσο η

τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE) θεωρείται ως μέθοδος αναφοράς για την τυποποίηση μικροοργανισμών που ενοχοποιούνται για ενδο-νοσοκομειακές λοιμώξεις.

2.3.1. Ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE)

Η ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο είναι μια μέθοδος που δεν βασίζεται στην ενίσχυση των νουκλεϊνικών οξέων, αλλά στην χρήση μιας ομάδας ενζύμων που ονομάζονται περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Συνοπτικά η διαδικασία περιλαμβάνει την πέψη των DNA των υπό εξέταση βακτηρίων από μια ενδονουκλεάση περιορισμού και στη συνέχεια ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης σε εναλλασσόμενο πεδίο. Μια ενδονουκλεάση περιορισμού διασπά διπλή έλικα DNA σε περιορισμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες αναγνώρισης. Ο αριθμός και το μέγεθος των θραυσμάτων που παράγονται από τη διαδικασία πέψης ενός δεδομένου τμήματος DNA επηρεάζονται από την αλληλουχία αναγνώρισης αλλά και από τη σύσταση του DNA. Όταν τα ένζυμα χρησιμοποιηθούν κάτω από άριστες συνθήκες, είναι εξαιρετικά ειδικά και τα παράγωγά τους είναι υψηλής αναπαραγωγιμότητας. Τα θραύσματα που παράγονται από την πέψη διαχωρίζονται χρησιμοποιώντας ποικίλου τύπου πηκτώματα ηλεκτροφόρησης. Όταν συγκρίνονται τμήματα DNA διαφορετικών στελεχών που έχουν κοπεί με το ίδιο ένζυμο, οι διαφορές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία θα προκαλέσουν διαφορές στο μέγεθος και συνεπώς στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα των θραυσμάτων.

Η PFGE έχει εφαρμοστεί για την υποτυποποίηση αρκετών GRAM + και GRAM – βακτηρίων, συμπεριλαμβανόμενων των *Listeria monocytogenes* [74], *N.meningitidis* [75], *Sreptococcus faecium* [76] και πολλά άλλα.

Τα μειονεκτήματα της PFGE είναι οι χρονοβόρες και κουραστικές διαδικασίες που απαιτούνται για την απομόνωση και λύση του γενωμικού DNA, τα ακριβά ένζυμα και αντιδραστήρια που απαιτούνται και οι πολύπλοκοι πειραματισμοί για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών ηλεκτροφόρησης. Αυτά τα μειονεκτήματα εμπόδισαν την εκτεταμένη χρήση της PFGE.

2.3.2. Τυποποίηση πολυτοπικού προσδιορισμού αλληλουχίας (MLST)

Τα τελευταία χρόνια εφαρμόζεται μια νέα μέθοδος που βασίζεται στην ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων των σταθερών γονιδίων του γένους ενός βακτηρίου (housekeeping genes). Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας ίδιων στόχων DNA από ανόμοια στελέχη και στη συνέχεια ταξινόμηση των μεταλλάξεων συνθέτουν μια μέθοδο που ορίζεται συγκριτικός προσδιορισμός αλληλουχίας. Δύο στρατηγικές έχουν χρησιμοποιηθεί για να δώσουν γονοτυπικά δεδομένα, τυποποίηση πολυτοπικού προσδιορισμού αλληλουχίας (MLST), η οποία συγκρίνει την ποικιλία των αλληλουχιών σε πολυάριθμους στόχους-γονίδια σταθερά του είδους, και τυποποίηση μονοτοπικού προσδιορισμού αλληλουχίας, η οποία συγκρίνει ποικιλία αλληλουχιών σε έναν και μόνο στόχο.

Η μέθοδος αυτή απαιτεί τη μελέτη και τον καθορισμό των γονιδίων που σε κάθε βακτήριο είναι σταθερά (συντηρημένα) και επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως στόχοι για την ανάλυση και σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Επίσης απαιτείται και ο κατάλληλος εξοπλισμός.

Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι η δυνατότητα αντικειμενικής καταγραφής και κωδικοποίησης των μεταλλάξεων που θα ανιχνευθούν, ο καθορισμός του γονοτύπου του στελέχους και η κατάθεση αυτών των δεδομένων σε τράπεζα πληροφοριών προσβάσιμη από όλους τους ερευνητές (κοινή παγκόσμια γλώσσα).

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ

Στόχος του Κλινικού Μικροβιολογικού Εργαστηρίου είναι η γρήγορη και αξιόπιστη ταυτοποίηση του αιτιολογικού παράγοντα της λοίμωξης, με σκοπό την εφαρμογή αιτιολογικής θεραπείας από τον θεράποντα ιατρό. Εργαλεία για την επίτευξη του συγκεκριμένου στόχου αποτελούν *η άμεση μικροσκόπηση του κλινικού δείγματος, η καλλιέργεια, ο ορολογικός έλεγχος και οι μοριακές τεχνικές.*

Η μέχρι σήμερα κλασσική διαγνωστική προσέγγιση της λοίμωξης, η οποία περιλαμβάνει την άμεση μικροσκόπηση, την καλλιέργεια και την ανίχνευση αντισωμάτων στον ορό του ασθενούς, αδυνατεί να καλύψει όλες τις ανάγκες του κλινικού μικροβιολογικού εργαστηρίου. Μερικά από τα προβλήματα που μένουν άλυτα είναι τα ακόλουθα:

- Αδυναμία καλλιέργειας κάποιων βακτηρίων λόγω δυσκολίας στην απομόνωσή τους (χλαμμύδια, ρικέτσιες) ή λόγω βραδείας ανάπτυξής τους (μυκοβακτηρίδια)
- Αδυναμία απομόνωσης του παθογόνου αιτίου λόγω προηγηθείσης αντιμικροβιακής θεραπείας
- Ταυτοποίηση κάποιων βακτηρίων π.χ. αζυμωτικών Gram-αρνητικών βακτηριδίων

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η αξιολόγηση της εφαρμογής των μοριακών τεχνικών στην επίλυση προβλημάτων της κλινικής διαγνωστικής των λοιμώξεων. Αναλυτικότερα, πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη σχετικά με την ειδικότητα και την ευαισθησία των μοριακών τεχνικών σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους σε μεγάλο αριθμό κλινικών δειγμάτων. Τα κλινικά δείγματα που μελετήθηκαν περιλάμβαναν:

1. κλινικά δείγματα με απουσία φυσιολογικής χλωρίδας (αίμα, ENY, πλευριτικό, αρθρικό υγρό και ιστοί). Στα δείγματα αυτά εφαρμόστηκε η τεχνική της ευρέως φάσματος *16S rRNA* PCR και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά της Gram χρώση, της ανίχνευσης αντιγόνου άμεσα στο κλινικό δείγμα ή αντισωμάτων στον ορό των ασθενών και των καλλιιεργειών.
2. κλινικά δείγματα με φυσιολογική χλωρίδα (πτύελα, γαστρικά, βρογχικές εκκρίσεις και κοιλικά επιχρίσματα), όπου εφαρμόστηκε η χρήση ειδικών εκκινητών έναντι μικροοργανισμών δυνητικά παθογόνων. Τα αποτελέσματα της μοριακής ανίχνευσης συγκρίθηκαν με αυτά της Gram χρώση, της ανίχνευσης αντιγόνου ή αντισωμάτων και των καλλιιεργειών.

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

2.1 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΥΠΟ ΕΞΕΤΑΣΗ ΥΛΙΚΩΝ

Το εξεταστέο υλικό μπορεί να περιέχει φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα ή όχι. Ο σημαντικός αυτός διαχωρισμός είναι καθοριστικός για τις τεχνικές που θα εφαρμοστούν σε κάθε περίπτωση, ώστε να ανιχνευθεί το παθογόνο μικρόβιο. Όσον αφορά τις μοριακές τεχνικές, τα αρχικά στάδια χειρισμού των δειγμάτων είναι κοινά και για τις δυο προσεγγίσεις (υλικά με χλωρίδα και χωρίς). Συγκεκριμένα αρχικά γίνεται εκχύλιση του DNA από το κλινικό δείγμα και έλεγχος του εξαγόμενου DNA για την παρουσία αναστολέων της PCR με τη χρήση εκκινητών που στοχεύουν στο γονίδιο της β_2 σφαιρίνης των ευκαρυωτικών κυττάρων.

Το επόμενο στάδιο επεξεργασίας για τα στείρα υλικά είναι η εφαρμογή ευρέως φάσματος PCR στο απομονωμένο DNA, με ζεύγος εκκινητών που στοχεύουν στο *16S rRNA* γονίδιο. Η ταυτοποίηση του βακτηρίου προκύπτει σε ένα δεύτερο στάδιο, το οποίο περιλαμβάνει τη νουκλεοτιδική ανάλυση του προϊόντος της PCR, και σύγκριση με γνωστές αλληλουχίες. Αντίστοιχα στα υλικά που φέρουν φυσιολογική χλωρίδα εφαρμόσαμε PCR με ζεύγος εκκινητών ειδικό για συγκεκριμένο μικροοργανισμό. Τα υλικά που μελετήσαμε στην παρούσα εργασία, καθώς και οι τεχνικές που εφαρμόστηκαν παραπείθονται στον πίνακα 1:

Πίνακας 1: Συνολικός αριθμός και μέθοδοι επεξεργασίας των δειγμάτων που προέρχονται από το Περιφερικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας

	Αριθμός δειγμάτων	Μοριακές τεχνικές	Κλασικές τεχνικές
Υλικά χωρίς χλωρίδα			
Αίματα	326	<i>16SrRNA</i> PCR	Gram & Καλλιέργεια
Πλευριτικά υγρά	80	<i>16SrRNA</i> PCR	Gram & Καλλιέργεια
ΕΝΥ	136	<i>16SrRNA</i> PCR	Gram & Καλλιέργεια
Αρθρικά υγρά	40	<i>16SrRNA</i> PCR	Gram & Καλλιέργεια
Ιστοί	52	<i>16SrRNA</i> PCR	Gram & Καλλιέργεια
Υλικά με χλωρίδα			
Βρογχικές εκ., γαστρικά, πτύελα	295	PCR & υβριδισμός	Z-N & Καλλιέργεια
Τραχηλικά	270	PCR	Ανίχνευση αντιγόνου

2.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA

Κρίσιμο στάδιο για την μοριακή επεξεργασία των κλινικών δειγμάτων είναι η απομόνωση του νουκλεϊκού οξέος (DNA), ανθρώπινου αλλά και μικροβιακού. Για να βελτιστοποιηθεί η διαγνωστική δυνατότητα (ευαισθησία) των μοριακών τεχνικών, προηγήθηκε της απομόνωσης του DNA επεξεργασία αναλόγως με τον τύπο του δείγματος.

Συγκεκριμένα η προετοιμασία για τα δείγματα πλευριτικό, αρθρικό, εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) και αίμα περιλαμβάνει τη φυγοκέντρωση στις 13.000rpm για 10λεπτά και τη λήψη δείγματος για την απομόνωση από το ίζημα. Επιπλέον στα κλινικά δείγματα με μεγάλο ιξώδες, όπως είναι τα πτύελα και οι βρογχικές εκκρίσεις, προστέθηκε Proteinase K (Bioline) και ακολούθησε επώαση στους 56°C μέχρι την πλήρη διαλυτοποίησή τους. Η απομόνωση, εκχύλιση του DNA για τα παραπάνω δείγματα πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό kit QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen, Hilden). Σύμφωνα με το kit, αρχικά μια μικρή ποσότητα δείγματος (200μl) επωάζεται με Proteinase K σε θερμοκρασία 56°C ώστε να υδρολυθούν οι μεμβράνες και να απελευθερωθεί το DNA. Η προσθήκη στη συνέχεια του λυτικού buffer (Buffer AL) δημιούργησε κατάλληλες συνθήκες αλλατότητας και pH για την πρόσδεση του DNA στην μεμβράνη της στήλης διαχωρισμού (QIAamp Spin Columns). Ακολούθησαν δυο φυγοκεντρήσεις με τα buffer καθαρισμού (AW1 και AW2) για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών και άλλων προσμίξεων και το καθαρό πλέον DNA εκλύεται από τη στήλη με απευθείας προσθήκη στη μεμβράνη 50μl Buffer AE (αντί των 200μl, που προτείνει το kit).

Στην περίπτωση που το κλινικό δείγμα ήταν ιστός, η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό kit ChargeSwitch gDNA Tissue Kits (Invitrogen, Carlsbad, USA). Η απομόνωση περιλαμβάνει τέσσερα στάδια. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται λύση του ιστού με επώασή του σε διάλυμα Proteinase K για ένα ολόκληρο βράδυ και σε θερμοκρασία 55°C. Στο δεύτερο στάδιο προστίθεται στο παραπάνω μίγμα κατάλληλο διάλυμα (Purification buffer), το οποίο χαμηλώνει το pH του διαλύματος (<6.0). Σε χαμηλό pH οι ειδικές μαγνητικές μπίλιες εμφανίζουν θετικό φορτίο και δεσμεύουν το αρνητικά φορτισμένο DNA. Στο επόμενο στάδιο καθαρίζονται οι μαγνητικές μπίλιες από πρωτεΐνες και άλλες προσμίξεις με το wash

buffer. Στο τελικό στάδιο το DNA εκλούεται από τις μαγνητικές μπίλιες, με την προσθήκη ενός buffer που τις ουδετεροποιεί (pH 8.5).

2.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

2.3.1 Συστατικά και ρυθμιστικοί παράγοντες της PCR

Τα βασικά συστατικά μιας PCR αντίδρασης είναι το DNA (ή RNA) που θα χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα, η DNA πολυμεράση, τα dNTPs, οι εκκινητές και το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα.

Όσον αφορά στο **υπόστρωμα**, η τεχνική απαιτεί ελάχιστη ποσότητα αρχικού υλικού: για DNA γονιδιώματος είναι αρκετή ποσότητα μικρότερη του μικρογραμμαρίου. Θεωρητικά υπάρχει η δυνατότητα της ενζυμικής ενίσχυσης ενός και μόνο μορίου DNA, ωστόσο σε αυτά τα πειράματα θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην αποφυγή επιμολύνσεων. Το αρχικό υλικό DNA δεν είναι απαραίτητο να έχει την υψηλή καθαρότητα και ακεραιότητα που απαιτούνται για άλλες τεχνικές (όπως Southern blot και in situ υβριδισμός). Οι πηγές απομόνωσης του DNA ποικίλλουν και μπορεί να είναι ιστοί ή σωματικά υγρά (αίμα, πτύελα, τραχηλικό κ.ά.). Ως υπόστρωμα της αντίδρασης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και RNA, εφόσον προηγηθεί ανάστροφη μεταγραφή του σε cDNA (RT PCR αντίδραση).

Οι **DNA πολυμεράσες** είναι ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση σύνθεσης πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων από μονομερή τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) χρησιμοποιώντας ως μήτρα την μία από τις δύο αρχικές αλυσίδες DNA. Η εισαγωγή των θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών στην τεχνική της PCR αποτέλεσε μία από τις βασικότερες τεχνολογικές βελτιώσεις της. Πριν την ανακάλυψή τους, επειδή οι πολυμεράσες που χρησιμοποιούνταν ήταν ευαίσθητες στις υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνταν για την αποδιάταξη του DNA, ήταν αναγκαία η συνεχής προσθήκη φρέσκου ενζύμου σε κάθε PCR κύκλο. Η συχνότερα χρησιμοποιούμενη πολυμεράση στην PCR είναι η Taq που προέρχεται από τον οργανισμό *Thermus aquaticus*. Η πολυμεράση Tth προερχόμενη από το βακτήριο *Thermus thermophilus* μπορεί να δράσει ως ανάστροφη μεταγραφάση του RNA.

Κατά την διάρκεια του πολυμερισμού απαιτούνται υψηλής καθαρότητας **dNTPs** σε συγκεντρώσεις 100-200 μM . Σε μικρότερες συγκεντρώσεις (10-100 μM) η

πολυμεράση παρουσιάζει μεγαλύτερη πιστότητα, ωστόσο η βέλτιστη συγκέντρωση των dNTPs εξαρτάται και από την συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου (MgCl_2). Τα ιόντα μαγνησίου δημιουργούν ένα διαλυτό σύμπλεγμα με τα dNTPs το οποίο είναι απαραίτητο για την ενσωμάτωσή τους στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA, ενώ συγχρόνως είναι απαραίτητα για την ενεργότητα της πολυμεράσης. Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στην ποσότητά τους διότι μικρότερες συγκεντρώσεις ιόντων μαγνησίου ελαττώνουν την απόδοση της PCR αντίδρασης, ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ελαττώνουν την ειδικότητα της αντίδρασης και προκαλούν την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων. Οι συνήθεις ιδανικές συγκεντρώσεις ιόντων μαγνησίου είναι περίπου 25 mM/αντίδραση [48].

Ως προς τους **εκκινητές (primers)**, πρόκειται για συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια τα οποία χρησιμεύουν ως εκκινητές της DNA πολυμεράσης για την αντίδραση επέκτασης και ταυτόχρονα εξασφαλίζουν την ειδικότητα της αντίδρασης. Η γνώση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας γύρω από την περιοχή που επιθυμούμε να ενισχύσουμε αποτελεί την βάση για τον σχεδιασμό του ζεύγους των εκκινητών. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι εκκινητές σχεδιάζονται έτσι ώστε να έχουν πλήρη ομολογία με την αλληλουχία-στόχο. Είναι στατιστικώς αποδεδειγμένο ότι όταν μία αλληλουχία DNA έχει μήκος τουλάχιστον 20bp τότε είναι μοναδική στο γονιδίωμα. Συνεπώς, η επιλογή εικοσαμερών για εκκινητές επιτρέπει την ειδική ενίσχυση αλληλουχιών. Πράγματι, αυτό είναι και το μέσο μήκος των εκκινητών στην συντριπτική πλειοψηφία των εφαρμογών. Τους δίνει τέτοια θερμοδυναμική σταθερότητα ώστε σε θερμοκρασία περίπου 55°C να αποδιατάσσονται. Η συνήθης συγκέντρωση ενός εικοσαμερούς εκκινητή σε μία PCR αντίδραση είναι 0.5 μM .

Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών υπολογίζεται από τα αντίστοιχα T_m των ολιγονουκλεοτιδίων ως εξής: $(\text{αριθμός των βάσεων A+T}) \times 2^\circ\text{C} + (\text{αριθμός των βάσεων G+C}) \times 4^\circ\text{C}$ [77], και συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 37°C και 60°C. Ανάμεσα σε αυτές τις τιμές βρίσκεται η ιδανική θερμοκρασία υβριδισμού T_m κατά την οποία το 50% των μορίων είναι αποδιαταγμένο. Υψηλές θερμοκρασίες επιτυγχάνουν πιο εξειδικευμένο υβριδισμό, χαμηλότερης όμως απόδοσης. Η επιλογή χαμηλότερης θερμοκρασίας αυξάνει την απόδοση εις βάρος της ειδικότητας, με αποτέλεσμα τον κίνδυνο δημιουργίας παραπροϊόντων της PCR αντίδρασης, εάν οι εκκινητές προσδεθούν σε άλλες μόνο θέσεις του γονιδιώματος με σχετική μόνο ομολογία ως προς αυτούς.

Για την PCR χρησιμοποιούνται διάφορα **ρυθμιστικά διαλύματα** που ρυθμίζουν την τιμή του pH και ταυτόχρονα προμηθεύουν τους απαραίτητους παράγοντες και σταθεροποιητικές ουσίες για την μέγιστη απόδοση της πολυμεράσης. Στο εμπόριο υπάρχουν διαθέσιμα αρκετά ρυθμιστικά διαλύματα. Ένα τυπικό ρυθμιστικό διάλυμα περιλαμβάνει τα εξής: Tris-HCl σε τελική συγκέντρωση 10 mM και pH 8.4, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.01% ζελατίνη, 0.01% NP40 και 0.01% Tween 20. Τα μη ιονικά απορρυπαντικά μπορούν να αντικατασταθούν από 0.1% Triton X-100, ενώ είναι δυνατόν να διαφέρει και η συγκέντρωση των αλάτων.

2.3.2 Σχεδιασμός των εκκινητών και συνθήκες των αντιδράσεων PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση είναι μία *in vitro* ενζυμική σύνθεση τμημάτων DNA με την βοήθεια δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών που βρίσκονται εκατέρωθεν της περιοχής του δίκλωνου DNA που πρόκειται να επιμηκυνθεί [78].

5 μl από το εκχυλισμένο DNA κάθε δείγματος υφίσταται ενζυμική ενίσχυση σε τελικό όγκο 50 μl. Η αντίδραση περιλαμβάνει 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος, 100 μM από το κάθε dNTP, 1.5mM MgCl₂, 1pM από κάθε εκκινητή και 0.1U Taq πολυμεράση (Fermentas). Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται δύο δείγματα με όλα τα υλικά της PCR εκτός του εκχυλισμένου DNA ως ελεγκτικά στοιχεία (αρνητικοί μάρτυρες) για πιθανή επιμόλυνση στην αντίδραση. Η αντίδραση επωάζεται σε κατάλληλο πρόγραμμα του κυκλοποιητή (PTC-200 Peltier Cycler, MJ RESEARCH), αναλόγως με τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν.

A) Συνθήκες των αντιδράσεων PCR

β2-σφαιρίνη: Για τον έλεγχο της επιτυχούς εκχύλισης του DNA, και της καταλληλότητάς του (απουσία αναστολέων) να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα από την Taq πολυμεράση, ελέγχθηκαν όλα τα δείγματα με ενίσχυση της περιοχής του γονιδίου της β2-σφαιρίνης. Το γονίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο μάρτυρας, μιας και πρόκειται για ένα γονίδιο που περιέχουν όλα τα ανθρώπινα κύτταρα. Το μίγμα προ-επωάστηκε για 4min στους 94°C και ακολούθησαν 35 κύκλοι ενίσχυσης με τις συνθήκες που παρατίθενται ακολούθως. Οι συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν είναι: 95°C για 1min, 58°C για 1min και 72°C για 1min. Το προϊόν της PCR αντίδρασης έχει μήκος 280bp και ακολουθεί ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

16S rRNA: Η ευρέως φάσματος 16S rRNA PCR (broad range 16S rRNA PCR) είναι μια μέθοδος που εφαρμόζεται σε κλινικά δείγματα για την ανίχνευση του βακτηριακού DNA [54,56]. Οι εκκινητές στοχεύουν σε συγκεκριμένες καλά διατηρημένες περιοχές του DNA, κοινές του γονιδιώματος όλων σχεδόν των βακτηρίων. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης πληροφορεί για την παρουσία ή όχι βακτηριακού DNA στο κλινικό δείγμα. Στο στάδιο αυτό δεν είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε το γένος και το είδος του μικροοργανισμού, οπότε, ακολουθεί ένα δεύτερο στάδιο το οποίο περιγράφεται στη συνέχεια. Το προϊόν της πρώτης αντίδρασης έχει μήκος περίπου 600 bp και οι συνθήκες που εφαρμόζονται είναι οι ακόλουθες: 94°C για 5min, 35 κύκλοι ενίσχυσης στους 94°C για 11sec, 62°C για 1min και 72°C για 1min, και τέλος 72°C για 10 min.

Mycobacteria spp: Πρόκειται για multiplex PCR και μπορεί να ανιχνεύσει τα ακόλουθα είδη των μυκοβακτηρίων: *M. tuberculosis complex*, *M. avium spp.*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. marinum*/*M. ulcerans* και το *M. xenopi*. Οι εκκινητές είναι σεσημασμένοι με βιοτίνη και διατίθενται από την εταιρία Hain. Η σύσταση μιας τέτοιας αντίδρασης είναι η ακόλουθη: 5 μl από το εκχυλισμένο DNA, 35μl PNM (Primers Nucleotide Mix), 5μl 10x buffer, 1.5mM MgCl₂ και 1U Taq πολυμεράση σε τελικό όγκο αντίδρασης 50μl. Οι συνθήκες της αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκαν είναι: 95°C για 5min, 10 κύκλοι ενίσχυσης στους 95°C για 30sec και 58°C για 2min, και 20 κύκλοι ενίσχυσης στους 95°C για 25sec, 53°C για 40sec και 70°C για 40sec. Το προϊόν της PCR αναλύεται μετά το τέλος της αντίδρασης με υβριδισμό ο οποίος θα περιγραφεί στη συνέχεια. Ωστόσο για τον έλεγχο της αντίδρασης πολλαπλασιασμού, το δείγμα ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αгарόζης 2%, και το προϊόν έχει μήκος περίπου 200 - 230bp.

Mycobacterium tuberculosis Complex: Πρόκειται επίσης για multiplex PCR που μπορεί να ανιχνεύσει και να ταυτοποιήσει τα ακόλουθα είδη μυκοβακτηριδίων της φυματίωσης: *M. tuberculosis*/*M. canettii*, *M. africanum*, *M. bovis BCG*, *M. bovis ssp. bovis*, *M. bovis ssp. caprae*, *M. microti*. Η σύσταση της αντίδρασης και οι συνθήκες ενίσχυσης του προϊόντος είναι όμοιες με τις παραπάνω. Διαφοροποιούνται μόνο οι εκκινητές και οι ειδικές ταινίες της αντίδρασης υβριδισμού, που ακολουθεί πάντα μετά την ενίσχυση. Επίσης το προϊόν της αντίδρασης έχει μήκος 215bp και 117bp για τα BCG στελέχη.

Mycobacteria MTBDR : Ο μοριακός έλεγχος της αντοχής του μυκοβακτηρίου της φυματίωσης (*M. tuberculosis Complex*) σε ισονιαζίδη και ριφαμπικίνη μπορεί να γίνει τόσο σε καλλιέργημα όσο και απευθείας σε κλινικό δείγμα. Συγκεκριμένα, παρουσία μετάλλαξης στο γονίδιο *rpoB* επιβεβαιώνει αντοχή στην ριφαμπικίνη. Για την ισονιαζίδη η αντοχή μπορεί να είναι είτε χαμηλού επιπέδου οπότε η μετάλλαξη ανιχνεύεται στο γονίδιο *inhA*, είτε υψηλού επιπέδου οπότε συνυπάρχει μετάλλαξη και στο γονίδιο *katG*. Στην ηλεκτροφόρηση το προϊόν του μυκοβακτηρίου της φυματίωσης έχει μήκος 115bp, το *rpoB* έχει μήκος 166bp, το *katG* 120bp, και το *inhA* 110bp. Η μεθοδολογία είναι όμοια και το αποτέλεσμα προκύπτει από τον υβριδισμό.

Chlamydia trachomatis: Πρόκειται για nested PCR. Δύο αντιδράσεις PCR, στην πρώτη προστίθεται 5μl DNA και 5μl Taq 1U στο mix της αντίδρασης που διαθέτει στο εμπόριο η εταιρία Alert (Torino, Italy). 1μl του προϊόντος της πρώτης PCR αποτελεί εκμαγείο για τη δεύτερη PCR. Οι συνθήκες κυκλοποίησης που εφαρμόζονται για την πρώτη αντίδραση είναι οι ακόλουθες: 4min στους 95°C και ακολουθούν 35 κύκλοι ενίσχυσης στους 95°C για 1min, 58°C για 1min και 72°C για 1min ενώ για την δεύτερη αντίδραση οι συνθήκες είναι: 2min στους 95°C και ακολουθούν 30 κύκλοι ενίσχυσης στους 95°C για 1min, 55°C για 1min και 72°C για 1min. Το προϊόν της δεύτερης PCR ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, και έχει μήκος 312bp.

Neisseria meningitidis: Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές *N.meni-1* και *N.meni-2* οι οποίοι περιγράφονται παρακάτω. Οι εκκινητές στοχεύουν στο γονίδιο *ctrA* και σχεδιάστηκαν για την συγκεκριμένη μελέτη από εμάς. Οι συνθήκες της ενίσχυσης είναι οι εξής: 95°C για 30 sec, 57°C για 40 sec και 72°C για 1 min, και επαναλαμβάνονται 35 κύκλοι. Το προϊόν της PCR αντίδρασης έχει μήκος περίπου 110 bp και ακολουθεί ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης 3,5% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Streptococcus pneumoniae: Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *S.pneum-1* και *S.pneum-2*, οι οποίοι περιγράφονται παρακάτω. Οι . Οι εκκινητές στοχεύουν στο γονίδιο *ply* και σχεδιάστηκαν για την συγκεκριμένη μελέτη από εμάς. Οι συνθήκες της ενίσχυσης είναι οι εξής: 95°C για 1 min, 55°C για 40 sec και 72°C για 1 min, και επαναλαμβάνονται 35 κύκλοι. Το προϊόν της PCR αντίδρασης έχει μήκος περίπου 80 bp και ακολουθεί ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης 3,5% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

***Haemophilus influenzae* type b:** Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *H.influ-1* και *H.influ-2*. . Οι εκκινητές στοχεύουν στο γονίδιο *bex* και σχεδιάστηκαν για την συγκεκριμένη μελέτη από εμάς. Οι συνθήκες της ενίσχυσης είναι οι εξής: 95°C για 15 sec, 50°C για 30 sec και 75°C για 30 sec, και επαναλαμβάνονται 40 κύκλοι. Το προϊόν της PCR αντίδρασης έχει μήκος περίπου 167 bp και ακολουθεί ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

B) Σχεδιασμός των εκκινητών

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις PCR αντιδράσεις που περιγράφηκαν ανωτέρω είναι οι ακόλουθοι:

β2-1 : 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'

β2-2 : 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'

16SrRNA-1 : 5'-TGC CAG CAG CCG CGG TAA TAC-3'

16SrRNA-2 : 5'-CGC TCG TTG CGG GAC TTA ACC-3'

N.meni-1 : 5'-GCT GCG GTA GGT GGT TCA A-3'

N.meni-2 : 5'-TTG TCG CGG ATT TGC AAC TA-3'

S.pneum-1 : 5'-TGC AGA GCG TCC TTT GGT CTA T-3'

S.pneum-2 : 5'-CTC TTA CTC GTG GTT TCC AAC TTG A-3'

H.influ-1 : 5'-TAT CAC ACAAATAGCGGTTGG-3'

H.influ-2 : 5'-GGC CAA GAG ATA CTC ATA GAA CGT T-3'

2.4 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA

Το DNA ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης ή ακρυλαμιδίου. Η επιλογή του συγκεκριμένου πηκτώματος εξαρτάται από το μέγεθος του DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί και από την διακριτική ικανότητα που θέλουμε να επιτύχουμε. Το πήκτωμα αγαρόζης είναι καταλληλότερο για την ηλεκτροφόρηση μεγάλων τμημάτων DNA καθώς και για μεγάλες διαφορές μεγέθους τμημάτων που πρόκειται να

διαχωριστούν. Η συνήθης συγκέντρωση του πηκτώματος αгарόζης είναι 1 έως 2%. Αντίθετα, το πήκτωμα ακρυλαμιδίου επιλέγεται για μικρότερα τμήματα DNA και για διάκριση μικρών μεταξύ τους διαφορών μεγέθους. Το πήκτωμα ακρυλαμιδίου αποτελείται από μείγμα ακρυλαμιδίου/bis-ακρυλαμιδίου σε αναλογία 19:1. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, για τους ανωτέρω λόγους, η ηλεκτροφόρηση του DNA έγινε σε πηκτώματα αгарόζης, LE Agarose (ISCBioEspress).

Όσον αφορά στον τρόπο παρασκευής του πηκτώματος αгарόζης ανάλογα με την επιθυμητή πυκνότητα της γέλης ποσότητα αгарόζης διαλύεται σε διάλυμα 1X TBE και η αгарόζη τήκεται με βρασμό σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 10 λεπτά. Το TBE (Ambion) είναι ρυθμιστικό διάλυμα με pH 8.3 το οποίο αποτελείται από 10.8 g/l Tris, 5.5 g/l βορικό οξύ και 0.002M EDTA. Ακολούθως, η αгарόζη αφήνεται να κρυώσει και προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο, EtBr (Research Organics) σε τελική συγκέντρωση 0.5 µg/ml. Το διάλυμα αυτό τοποθετείται σε δοχείο που περιέχει «κτένα» η οποία δημιουργεί τα «πηγάδια» για το φόρτωμα των δειγμάτων. Η πήξη για την αгарόζη επιτυγχάνεται με την πτώση της θερμοκρασίας της.

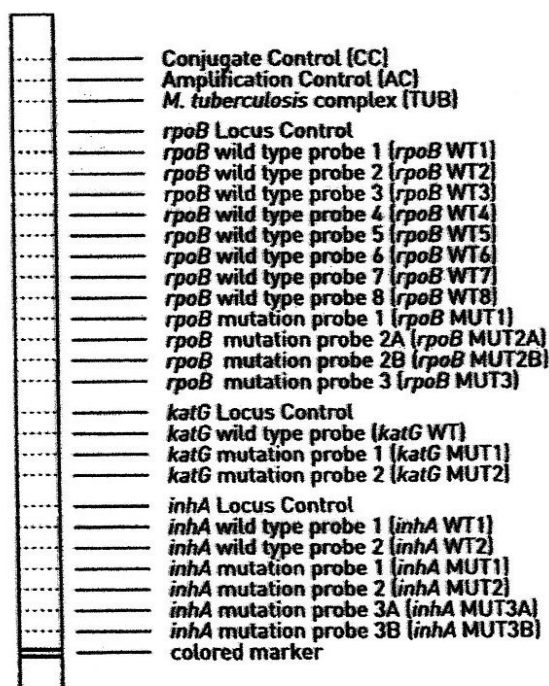
Το στερεοποιημένο πήκτωμα μετά την αφαίρεση της «κτένας», εμβαπτίζεται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης (EC105-LVD Submarine Gel System Classic, Thermo Electron Co) που περιέχει 1X TBE. Το δείγμα DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί, επαναιωρείται σε διάλυμα φόρτωσης (loading buffer, Fermentas) και εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση από το τροφοδοτικό (EC105-LVD, Thermo Electron Co.). Το διάλυμα φόρτωσης περιέχει 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανό του ξυλενίου και 25% φικόλη. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης οι ζώνες του DNA γίνονται άμεσα ορατές με έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη (UV) ακτινοβολία (MiniBisPro, Bio-Imaging Systems).

2.5 ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ

Όπως περιγράψαμε στην εισαγωγή η ενίσχυση του προϊόντος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους (χρώση, ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, υβριδισμός κλπ) Στη συγκεκριμένη εργασία σε ορισμένες αντιδράσεις ακολούθησε υβριδισμός. Οι αντιδράσεις αυτές αφορούσαν την ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων σε επίπεδο γένους και είδους, και στην ανίχνευση μεταλλάξεων που αφορούσαν την αντοχή των μυκοβακτηριδίων σε κάποια

αντιφυματικά φάρμακα. Τα στάδια του υβριδισμού ήταν απολύτως όμοια για τις τρεις αντιδράσεις

Συνοπτικά τα στάδια υβριδοποίησης είναι τα ακόλουθα: χημική αποδιάταξη του προϊόντος της ενίσχυσης παρουσία κατάλληλου διαλύματος (<2% NaOH), υβριδοποίηση των μονόκλωνων αλυσίδων με τους συμπληρωματικούς ιχνηθέτες που βρίσκονται ακινητοποιημένοι σε ταινίες νιτροκυτταρίνης (ταινίες ειδικές για κάθε αντίδραση ενίσχυσης). Στη συνέχεια ακολουθεί αυστηρό πλύσιμο της ταινίας για απομάκρυνση των μη υβριδοποιημένων αλυσίδων (STR διάλυμα), και προστίθεται ένζυμο (streptavidin-conjugated alkaline phosphatase) που προσδένεται στο υβριδοποιημένο μόριο. Με το κατάλληλο υπόστρωμα (Dimethyl Sulfoxide) το ένζυμο αντιδρά και χρωματίζει τις ζώνες στις οποίες έχει σχηματιστεί το σύμπλοκο DNA-στόχος/ιχνηθέτης. Οι ζώνες που έχουν χρωματιστεί συγκρίνονται με ένα υπόδειγμα (δίνεται από την αντίστοιχη εταιρία) και ταξινομείται το μικρόβιο στο είδος στο οποίο ανήκει.



Εικόνα 1: Ταινία υβριδοποίησης για την ανίχνευση αντοχής στα αντιβιοτικά ριφαμικίνη και ισονιαζίδη (*Mycobacterium* MTBDR, Hain) των μυκοβακτηρίων της φυματίωσης. Ο χρωματισμός των διακεκομμένων γραμμών ερμηνεύεται ως αντίδραση υβριδοποίησης.

2.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΚΟΛΟΥΘΙΑΣ DNA (DNA sequencing)

Στα προϊόντα της PCR με εκκινητές που στοχεύουν στο γονίδιο 16S rRNA γίνεται ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Προηγουμένως της ανάλυσης τα προϊόντα της αντίδρασης καθαρίζονται με το εμπορικό kit PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA). Με αυτή την διαδικασία απομακρύνονται τα υπολείμματα των εκκινητών, των dNTPs, του ενζύμου και των αλάτων. Αναλυτικότερα το προϊόν της PCR αναμιγνύεται με χαοτροπικό άλας (binding buffer) και μεταφέρεται σε ειδική στήλη διαχωρισμού. Εκεί το DNA προσδένεται εκλεκτικά στην μεμβράνη της στήλης και όλες οι άλλες προσμίξεις απομακρύνονται με πλύσεις (wash buffer). Τελικά το DNA εκλύεται από τη στήλη με προσθήκη διαλύματος χαμηλού pH ή νερού (elution buffer).

Στη συνέχεια η νουκλεοτιδική αλληλουχία του προϊόντος προσδιορίζεται σύμφωνα με τη μέθοδο κατά Sanger. Η αλληλουχία που προκύπτει συγκρίνεται με άλλες γνωστές αλληλουχίες που είναι αποθηκευμένες στην GenBank, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα BLAST, που βρίσκεται στο Website του National Center for Biotechnology Information [79]. Τα κριτήρια ταυτοποίησης σε επίπεδο είδους, καθορίζονται ως εύρεση ομοιότητας αλληλουχιών $\geq 99\%$ με την αλληλουχία του πρότυπου στελέχους της τράπεζας (GenBank), και αντίστοιχα σε επίπεδο γένους, εύρεση ομοιότητας $\geq 97\%$ με την πρότυπη αλληλουχία. Στην περίπτωση αδυναμίας ταυτοποίησης μιας αλληλουχίας 16S rDNA, (ποσοστό ομοιότητας μικρότερο του 97% με τις ήδη αποθηκευμένες αλληλουχίες της τράπεζας) ακολουθεί φυλογενετική ανάλυση με τη μέθοδο Drancourt, και το βακτήριο ταυτοποιείται σε νέο γένος [80].

2.7 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΛΑΣΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

2.7.1 Χρώσεις (Gram / Ziehl-Neelsen)

Η μικροσκοπήση είναι απαραίτητη και αναντικατάστατη δοκιμασία για την αναζήτηση μικροβίων άμεσα στο κλινικό δείγμα (ΕΥ, πτύελα, ούρα, κολπικό, κλπ). Τα στάδια της χρώσης διαφοροποιούνται ανάλογα με τον τύπο χρώσης που εφαρμόζεται, ωστόσο η γενική τεχνική προετοιμασίας του παρασκευάσματος είναι κοινή και σε γενικές γραμμές η εξής: το υπό εξέταση δείγμα φυγοκεντρείται, εκτός

αν είναι πολύ θολерό (δηλαδή πυώδες) οπότε και εξετάζεται χωρίς φυγοκέντρωση. Μια σταγόνα του ιζήματος μεταφέρετε πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, αφήνετε να στεγνώσει στον αέρα, και εν συνεχεία χρωματίζεται Στην περίπτωση που το δείγμα είναι ιστός, προηγείται ομογενοποίηση αυτού. Τα στάδια της χρώσης κατά Gram είναι τα εξής: Αρχικά το παρασκεύασμα χρωματίζεται με τη χρωστική κρυσταλικό ιώδες, η οποία χρωματίζει έντονα όλα τα βακτήρια, και στη συνέχεια προστίθεται το διάλυμα Lugol το οποίο σταθεροποιεί τη χρώση, στην μικροβιακή κυτταροπλασματική μεμβράνη. Σε ένα επόμενο στάδιο προστίθεται οινόπνευμα το οποίο αποχρωματίζει μια ομάδα μικροβίων μόνο (Gram αρνητικά). Για να δούμε τα μικρόβια αυτά, τα μεταχρωματίζουμε με μια χρωστική αντίθετου χρώματος, τη σαφρανίνη.

Ορισμένα μικρόβια δεν χρωματίζονται με τις συνηθισμένες χρώσεις, όπως για παράδειγμα τα μυκοβακτηρίδια, τα οποία απαιτούν ειδική οξυάντοχη χρώση, τη χρώση Ziehl-Neelsen. Σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα στρώνουμε το πιο πυώδες μέρος του υλικού (πτύελα, βρογχικές εκκρίσεις, γαστρικά), χρωματίζουμε με τη φαινικούχο φουξίνη και θερμαίνουμε με φλόγα για 3-5min. Το αφήνουμε να κρυώσει, το ξεπλένουμε με νερό βρύσης και αποχρωματίζουμε με οξιτισμένο οινόπνευμα. Ξεπλένουμε με νερό και μεταχρωματίζουμε με το κυανό του μεθυλενίου για 20-30 sec. Τέλος ξεπλένουμε, στεγνώνουμε και μικροσκοπούμε.

2.7.2 Καλλιέργεια

Υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία θρεπτικών υλικών ανάπτυξης. Η επιλογή του κατάλληλου καθορίζεται από τον τύπο του υλικού και από τα αποτελέσματα που λάβαμε κατά τη μικροσκοπήση, το πρώτο στάδιο επεξεργασίας. Όσον αφορά τα υλικά που στερούνται μικροβιακή χλωρίδα, μολιάζονται 10ml σε δύο τρυβλία που περιέχουν αιματούχο άγαρ. Το ένα τρυβλίο θα τοποθετηθεί μέσα σε δοχείο ειδικό για αναερόβια καλλιέργεια, και τα δυο θα επωαστούν στους 37°C. Μετά από 24ωρη επώαση, εάν έχουν αναπτυχθεί αποικίες προχωρούμε στην ταυτοποίηση του μικροβίου (βιοχημικές δοκιμές). Όταν υπάρχει υποψία παρουσίας μικροβίου που δεν αναπτύσσεται σε κλασικά υλικά, το δείγμα μολιάζεται και σε επιπλέον θρεπτικά υλικά. Για παράδειγμα τα μυκοβακτηρίδια καλλιεργούνται σε Lowenstein-Jensen και αναπτύσσονται μετά από 3-4 εβδομάδες επώασης. Συγκεκριμένα καλλιεργούνται σε αερόβια ατμόσφαιρα με 5-10% CO₂ μετά από απολύμανση του υλικού, ώστε να καταστραφεί η συνοδός χλωρίδα και να επιτευχθεί συγχρόνως εμπλουτισμός.

Οι νεότερες τεχνικές καλλιέργειας περιλαμβάνουν φιαλίδια με ειδικούς ζωμούς για τον εμπλουτισμό της ανάπτυξης μικρού αριθμού μικροβίων. Για τα μυκοβακτηρίδια οι ζωμοί αυτοί μειώνουν σημαντικά τον χρόνο ανίχνευσης των θετικών δειγμάτων σε 10-14 ημέρες (φιαλίδια MGIT 960).

2.7.3 Έλεγχος μικροβιακών αντιγόνων

α. *Αντιγόνα έναντι διαφόρων βακτηρίων άμεσα σε Εγκεφαλονωτιαία Υγρά (ENY).* Χρησιμοποιήθηκε εμπορική μέθοδος για την ανίχνευση αντιγόνων έναντι β-αιμολυτικού στρεπτοκόκκου ομάδας B, μηνιγγιτιδοκόκκου, πνευμονιοκόκκου και αιμοφίλου σε ENY, παράλληλα με την καλλιέργεια και την μοριακή τεχνική. Η διαδικασία εκτέλεσης της μεθόδου έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

β. *Αντιγόνα έναντι Chlamydia trachomatis.* Τα χλαμύδια του τραχώματος είναι ενδοκυττάρια βακτήρια, δεν αναπτύσσονται στα συνήθη καλλιεργητικά υλικά και η διάγνωσή τους από τις κλασικές τεχνικές επιτυγχάνεται μόνο με την ανίχνευση αντιγόνου του μικροοργανισμού άμεσα σε τραχηλικό επίχρισμα ή σε ούρα. Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε η μέθοδος ανίχνευσης αντιγόνων των χλαμυδίων σε τραχηλικά επιχρίσματα με τη μέθοδο του άμεσου ανοσοφθορισμού.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για να συγκριθεί η ειδικότητα και η ευαισθησία των μοριακών και κλασικών τεχνικών στη διάγνωση των λοιμώξεων, εξετάσαμε κατά τη διάρκεια των 2006 έως 2008, στο πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας μια πληθώρα υλικών. Τα υλικά που μελετήσαμε είναι τα εξής: Α) **Υλικά στείρα μικροβίων** (δεν διαθέτουν φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα) δηλαδή αίμα, ΕΝΥ, αρθρικά υγρά, πλευριτικά υγρά και ιστοί, και Β) **Υλικά με μικροβιακή χλωρίδα** δηλαδή βρογχικές εκκρίσεις, πτύελα, γαστρικά υγρά, τραχηλικά επιχρίσματα, Στις ενότητες που ακολουθούν παραθέτουμε αναλυτικά τα αποτελέσματα που λάβαμε.

3.1 ΚΛΙΝΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΧΩΡΙΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΛΩΡΙΔΑ

3.1.1 Λοιμώξεις αίματος

Εξετάστηκαν 326 δείγματα αίματος από διαφορετικούς ασθενείς της Παθολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας με κλινική υποψία για λοίμωξης,. Τα δείγματα αναλύθηκαν τόσο με την κλασική αιμοκαλλιέργεια όσο και με την ευρέως φάσματος *16S rRNA* PCR. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, 300 δείγματα από τα 326 ήταν αρνητικά και με τις δυο μεθόδους (αιμοκαλλιέργεια και ευρέως φάσματος PCR). Ανίχνευση DNA ως αποτέλεσμα επιμόλυνσης δεν παρατηρήθηκε στην έρευνά μας. Η ειδικότητα της PCR ήταν 100%. Από τις 26 θετικές αιμοκαλλιέργειες, η PCR έδωσε θετικό αποτέλεσμα μόνο σε 9 δείγματα (ευαισθησία 34.6%) (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Σύγκριση ειδικότητας και ευαισθησίας της αιμοκαλλιέργειας και της ευρέως φάσματος *16S rRNA* PCR στη διάγνωση λοιμώξεων του αίματος

Τεχνική		Αριθμός δειγμάτων	% Ευαισθησία	% Ειδικότητα
Αιμοκαλλιέργεια	Θετικά	26	100%	100%
	Αρνητικά	300		
<i>16S rRNA</i> PCR	Θετικά	9	34.6%	100%
	Αρνητικά	317		
Σύνολο		326		

Στα 9 δείγματα που τόσο η μοριακή τεχνική όσο και η καλλιέργεια έδειξαν παρουσία μικροοργανισμού, η ταυτοποίηση σε επίπεδος είδους και γένους που προέκυψε βάσει βιοχημικών δοκιμασιών και η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ήταν όμοια και φαίνεται αναλυτικά στον πίνακα 2.

Πίνακας 2: Ταυτοποίηση των μικροοργανισμών με τις κλασικές και μοριακές τεχνικές σε βακτηριαμίες

Ταυτοποιηθέντες μικροοργανισμοί	Τεχνική	
	Καλλιέργεια- Βιοχημικές δοκιμές	PCR+ Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	0
<i>Enterococcus faecium</i>	1	0
<i>Escherichia coli</i>	2	4
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	1
<i>Serratia</i>	2	1
<i>Brucella spp.</i>	3	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	1
<i>Salmonella spp</i>	1	0
<i>Klebsiella</i>	1	0
<i>Acinetobacter baumani</i>	1	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	1
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0
<i>Neisseria meningitides</i>	1	1
Σύνολο	26	9

3.1.2 Λοιμώξεις εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY)

Εξετάστηκαν 136 ENY ασθενών διαφόρων κλινικών του Νοσοκομείου μας , που ήταν ύποπτοι για λοίμωξη του κεντρικού νευρικού συστήματος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που λάβαμε από την ευρέως φάσματος PCR, 10 δείγματα ασθενών ήταν θετικά (Πίνακας 3). Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ταυτοποίησε τα 6 από αυτά ως *Neisseria meningitides* και τα 4 ως *Streptococcus pneumoniae*. Όσον αφορά την καλλιέργεια των δειγμάτων μόνο τα 3 από τα 10 ήταν θετικά και σ' αυτά απομονώθηκε μηνιγγιτιδόκοκκος (Πίνακας 4). Η ανίχνευση αντιγόνων αιμοφίλου, πνευμονιόκοκκου και μηνιγγιτιδόκοκκου ήταν αρνητική στα 9 από τα 10 δείγματα. Σε ένα μόνο δείγμα στο οποίο ανιχνεύθηκε γενετικό υλικό

πνευμονιόκοκκου το αντιγόνο βρέθηκε θετικό. Για τα υπόλοιπα 126 ENY το αρνητικό αποτέλεσμα που έδωσε η PCR ήταν απόλυτα σύμφωνο, με το αποτέλεσμα που έδωσαν η καλλιέργεια και η Gram χρώση.

Πίνακας 3: Σύγκριση ειδικότητας και ευαισθησίας της καλλιέργειας και της ευρέως φάσματος 16S rRNA PCR στη διάγνωση λοιμώξεων του ENY

Τεχνική		Αριθμός δειγμάτων	%Ευαισθησία	%Ειδικότητα
Καλλιέργεια- Gram χρώση	Θετικά	3	30%	100%
	Αρνητικά	133		
PCR	Θετικά	10	100%	100%
	Αρνητικά	126		
Σύνολο		136		

Πίνακας 4: Ταυτοποίηση των μικροοργανισμών με τις κλασικές και μοριακές τεχνικές σε λοιμώξεις ENY

Ταυτοποιηθέντες μικροοργανισμοί	Τεχνική	
	Καλλιέργεια- Βιοχημικές δοκιμές	PCR+Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας
<i>Neisseria meningitides</i>	3	6
<i>Streptococcus</i>		4
<i>S. pneumoniae</i>		
Σύνολο	3	10

3.1.3 Συλλογή πλευριτικού υγρού

Εξετάστηκαν 80 δείγματα πλευριτικού υγρού, ασθενών της Πνευμονολογικής κλινικής, με κλινική υποψία για λοίμωξη. Ο αριθμός των εμπυρήνων κυττάρων ήταν μεγαλύτερος του 500κ/κκχ και ο τύπος ήταν πολυμορφοπυρηνικός. Τα αποτελέσματα που πήραμε ήταν τα εξής: 64 δείγματα ήταν αρνητικά και με τις δυο μεθόδους (καλλιέργεια-Gram χρώση και ευρέως φάσματος PCR). Από τα 6 δείγματα που έδωσε θετικά η PCR, μόνο τα 2 ήταν θετικά και στην καλλιέργεια. Οι

μικροοργανισμοί που ταυτοποιήθηκαν από την ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας βρίσκονται στον πίνακα 6.

Πίνακας 5: Σύγκριση ειδικότητας και ευαισθησίας της καλλιέργειας και της ευρέως φάσματος 16S rRNA PCR στη διάγνωση λοιμώξεων πλευρικού υγρού

Τεχνική		Αριθμός δειγμάτων	%Ευαισθησία	%Ειδικότητα
Καλλιέργεια-	Θετικά	2	33%	100%
Gram χρώση	Αρνητικά	78		
PCR	Θετικά	6	100%	100%
	Αρνητικά	74		
Σύνολο		80		

Πίνακας 6: Ταυτοποίηση των μικροοργανισμών με τις κλασικές και μοριακές τεχνικές σε λοιμώξεις πλευριτικού υγρού

Ταυτοποιηθέντες μικροοργανισμοί	Τεχνική	
	Καλλιέργεια- Βιοχημικές δοκιμές	PCR+Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας
<i>Clostridium sordellii</i>	1	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	2
<i>Staphylococcus aureus</i>		2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		1
Σύνολο	2	6

Όπως παρατηρούμε στον παραπάνω πίνακα, σε πλευριτικό υγρό ασθενούς με εικόνα εμπύματος ανιχνεύτηκε βακτηριακό DNA, με την ευρέως φάσματος 16S rRNA PCR. Με την ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ταυτοποιήθηκε ως *Clostridium sordellii* [81]. με ποσοστό ομοιότητας 100%. Η ταυτοποίηση δόθηκε μέσα σε διάστημα 2 ημερών ενώ με τις κλασικές μεθόδους μέσα σε 17 μέρες.

3.1.4 Λοιμώξεις αρθρικού υγρού

Κατά τη διάρκεια του 2008 μελετήθηκαν 40 δείγματα αρθρικού υγρού ασθενών με υποψία σηπτικής αρθρίτιδας. Σε όλα τα δείγματα η κλασική καλλιέργεια ήταν αρνητική, ενώ η ευρέως φάσματος PCR ανίχνευσε 4 δείγματα που ήταν θετικά για παρουσία βακτηριακού DNA. Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ταυτοποίησε, με ομολογία μεγαλύτερη από 98% τα μικρόβια *S. aureus* σε 3 από τα 4 δείγματα, και *Ralstonia pickettii* στο εναπομείναν δείγμα.

Πίνακας 7: Σύγκριση ειδικότητας και ευαισθησίας της καλλιέργειας και της ευρέως φάσματος 16S rRNA PCR στη διάγνωση λοιμώξεων αρθρικού υγρού

Τεχνική	Αριθμός δειγμάτων	%Ευαισθησία	%Ειδικότητα
Καλλιέργεια-Θετικά		-	-
Gram χρώση	Αρνητικά 40		
PCR	Θετικά 4	100%	100%
	Αρνητικά 36		
Σύνολο	40		

Πίνακας 8: Ταυτοποίηση των μικροοργανισμών με τις μοριακές τεχνικές σε λοιμώξεις πλευριτικού υγρού

Ταυτοποιηθέντες μικροοργανισμοί	Τεχνική
	Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας
<i>S. aureus</i>	3
<i>Ralstonia pickettii</i>	1
Σύνολο	4

3.1.5 Λοιμώξεις ιστών ορθοπεδικής

Μελετήθηκαν πενήντα δύο ιστοί από διαφορετικούς ασθενείς, με κλινικά σημεία λοίμωξης, που νοσηλεύθηκαν στην Ορθοπεδική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας κατά το χρονικό διάστημα 2005-2009. Η άμεση μικροσκοπήση έδειξε την παρουσία άφθονων πυσσφαιρίων, δείγμα φλεγμονής. Η Gram-χρώση όλων των δειγμάτων ήταν αρνητική. Από τα 52 δείγματα τα 22 ήταν

θετικά για παρουσία μικροοργανισμού και με την καλλιέργεια και με την PCR, και δεν υπήρξαν διαφορές ως προς την ταυτοποίηση του μικροοργανισμού. Από τα υπόλοιπα τριάντα δείγματα, με αρνητικές καλλιέργειες, τα 22 έδωσαν θετικό αποτέλεσμα με την μοριακή μέθοδο. Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας έδειξε ότι το ανιχνευθέν γενετικό υλικό ανήκε στους μικροοργανισμούς που φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 10.

Πίνακας 9: Σύγκριση ειδικότητας και ευαισθησίας της καλλιέργειας και της ευρέως φάσματος 16S rRNA PCR στη διάγνωση ορθοπεδικών λοιμώξεων

Τεχνική		Αριθμός δειγμάτων	%Ευαισθησία	%Ειδικότητα
Καλλιέργεια-Gram χρώση	Θετικά	22	52.4%	100%
	Αρνητικά	30		
PCR	Θετικά	42	100%	100%
	Αρνητικά	10		
Σύνολο		52		

Πίνακας 10: Ταυτοποίηση των μικροοργανισμών με τις κλασικές και μοριακές τεχνικές σε ορθοπεδικές λοιμώξεις

Ταυτοποιηθέντες μικροοργανισμοί	Τεχνική	
	Καλλιέργεια- Βιοχημικές δοκιμές	Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας
<i>E. coli</i>	7	14
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	9
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5	8
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	1
<i>Streptococcus group B</i>	1	1
<i>Streptococcus group A</i>		1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1
<i>Fusobacterium</i>		1
<i>Kingella kingae</i>		3
<i>Eikenella corrodens</i>		1
<i>Bacteroides f. + Peptostrept</i>	1	1
Σύνολο	22	42

3.2 ΚΛΙΝΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΜΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΛΩΡΙΔΑ

3.2.1 Ανίχνευση μυκοβακτηριδίων σε γαστρικά, πτύελα, και βρογχικές εκκρίσεις

Μελετήθηκαν 295 κλινικά δείγματα της Πνευμονολογικής Κλινικής και της Μονάδας Εντατικής Θεραπείας (γαστρικά, πτύελα, και βρογχικές εκκρίσεις) ασθενών υπόπτων για λοίμωξη από μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης. Τα δείγματα εξετάστηκαν με τις κλασικές συμβατικές μεθόδους (χρώση Ziehl-Nielsen, καλλιέργεια) άλλα και με τις μοριακές τεχνικές, για την παρουσία μυκοβακτηριδίων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, 263 δείγματα από τα 295 ήταν αρνητικά τόσο με τις συμβατικές μεθόδους όσο και με τον συνδυασμό PCR-υβριδισμό. Από τα 32 θετικά δείγματα σύμφωνα με τα αποτελέσματα των καλλιιεργειών, μόνο τα 6 ήταν θετικά με τις μοριακές τεχνικές, που δείχνει ότι η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου είναι 19,35% και 100% αντίστοιχα (Πίνακας 11).

Πίνακας 11: Ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων με τις κλασικές και μοριακές τεχνικές σε λοιμώξεις αναπνευστικού συστήματος

	Αριθμός	Ταυτοποιηθέντες μικροοργανισμοί
Μοριακή(-) / Κλασική(+)	16	<i>M. tuberculosis complex</i>
	4	<i>M. fortuitum</i>
	3	<i>M. gordonae</i>
	2	Άτυπα μυκοβακτηρίδια
Μοριακή(+) Κλασική(+)	6	<i>M. tuberculosis complex</i>
Μοριακή(+) Κλασική(-)	1	<i>M. fortuitum</i>
Σύνολο	32	

Σημειώνεται ότι τα αποτελέσματα της μοριακής τεχνικής ήταν διαθέσιμα σε 24 ώρες σε σχέση με τις συμβατικές καλλιέργειες που για την ολοκλήρωσή τους χρειάστηκαν 10 ± 5 ημέρες. Όπως παρατηρούμε στα αποτελέσματα η ευαισθησία της μοριακής μεθόδου στη διάγνωση είναι εξαιρετικά χαμηλή. Τονίζεται ωστόσο ότι παρότι η μοριακή ανίχνευση υπολείπεται σε ευαισθησία της καλλιέργειας, η εξέταση αυτή πρέπει να ζητείται από τον κλινικό ιατρό, διότι επί θετικού αποτελέσματος μπορεί να ξεκινήσει άμεσα αντιφυματική θεραπεία. Επιπλέον σημαντική βοήθεια προσφέρει η δυνατότητα ελέγχου μεταλλάξεων που σχετίζονται με αντοχή του

μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης σε ριφαμπικίνη (RIF) και ισονιαζίδη (INH). Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοσθεί είτε άμεσα στο κλινικό δείγμα είτε σε στέλεχος που έχει απομονωθεί στην καλλιέργεια. Τα στελέχη *M. tuberculosis complex* που αναπτύχθηκαν και ταυτοποιήθηκαν με τις κλασικές τεχνικές, μελετήθηκαν με την τεχνική PCR- υβριδισμό (MTBDR) για την αντοχή σε RIF και INH (Πίνακας 12). Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα του αντιβιογράμματος και συνέπιπταν πλήρως.

Πίνακας 12: Αντοχές των 22 στελεχών *M. Tuberculosis complex* στα αντιβιοτικά RIF και INH με μοριακές και κλασσικές μεθόδους.

Στελέχη MTBC	Αντιβιοτικά	
	Ριφαμπικίνη (RIF)	Ισονιαζίδη(INH)
15	ευαίσθητα	ευαίσθητα
4	ανθεκτικά	ευαίσθητα
2	ευαίσθητα	υψηλή αντοχή
1	ευαίσθητα	χαμηλή αντοχή

3.2.2 Λοιμώξεις από χλαμύδια σε τραχηλικό επίχρισμα

Κατά τη διάρκεια του 2008 μελετήθηκαν 270 τραχηλικά επιχρίσματα γυναικών που προσήλθαν στα εξωτερικά ιατρεία της Γυναικολογικής Κλινικής, για τακτικό γυναικολογικό έλεγχο. Για την ανίχνευση χλαμυδίων του τραχώματος (*Chlamydia trachomatis*), εφαρμόσαμε απευθείας στο κλινικό δείγμα άμεσο ανοσοφθορισμού παράλληλα με μοριακή τεχνική όπου χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές. Τα αποτελέσματα που πήραμε από τη συγκριτική αυτή μελέτη είναι τα εξής: 262 δείγματα ήταν αρνητικά τόσο με τις κλασικές όσο και με τις μοριακές μεθόδους. Από τα 8 δείγματα που έδωσε θετικά η PCR μόνο τα 4 ήταν θετικά και με τον άμεσο ανοσοφθορισμό. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της PCR είναι 100% (Πίνακας 13).

Πίνακας 13: Σύγκριση ειδικότητας και ευαισθησίας των ορολογικών μεθόδων και της PCR με ειδικούς εκκινητές για *Chlamydia tr.*

Τεχνική		Αριθμός δειγμάτων	% Ευαισθησία	% Ειδικότητα
Άμεσος ανοσοφθορισμός	Θετικά	4	50%	100%
	Αρνητικά	266		
PCR	Θετικά	8	100%	100%
	Αρνητικά	262		
Σύνολο		270		

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ταχεία διάγνωση του αιτιολογικού παράγοντα της λοίμωξης βοηθά σημαντικά στην εφαρμογή αιτιολογικής θεραπείας και συμβάλλει στη μείωση του κόστους νοσηλείας, και στον περιορισμό της αντοχής στα αντιβιοτικά [82,83]. Η συμβολή των κλασσικών μεθόδων στη διάγνωση των λοιμώξεων είναι μακρά και σημαντική. Εν τούτοις ορισμένα βακτηριακά είδη είναι δύσκολο να απομονωθούν, είτε γιατί αναπτύσσονται βραδέως λόγω των αυστηρών διατροφικών απαιτήσεων, είτε γιατί δεν αναπτύσσονται καθόλου λόγω προηγηθείσας εμπειρικής θεραπείας με αντιμικροβιακούς παράγοντες.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σύγκριση των μοριακών μεθόδων και των κλασσικών συμβατικών τεχνικών στη διάγνωση των βακτηριακών λοιμώξεων. Για την μοριακή ανίχνευση των μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη τόσο εκκινητές ειδικοί για κάποιους παθογόνους μικροοργανισμούς αλλά και εκκινητές ευρέως φάσματος. Ειδικότερα εφαρμόσαμε την ευρέως φάσματος *16S rRNA* PCR μόνο σε κλινικά δείγματα που στερούνται φυσιολογική χλωρίδα και συγκεκριμένα στο αίμα, το ΕΝΥ, το πλευριτικό υγρό, το αρθρικό υγρό και τους ιστούς ορθοπαιδικών λοιμώξεων που πάρθηκαν κάτω από άσηπτες συνθήκες. Ενώ στα κλινικά δείγματα με φυσιολογική χλωρίδα (πτύελα, βρογχικές εκκρίσεις, γαστρικά και τραχηλικά) χρησιμοποιήθηκαν ζεύγη εκκινητών ειδικών για τους μικροοργανισμούς *Mycobacterium tuberculosis complex*, *Mycobacterium* spp. και *Chlamydia trachomatis* αντίστοιχα.

Για να εκτιμήσουμε την χρησιμότητα της ευρέως φάσματος PCR εξετάσαμε 326 δείγματα αίματος. Τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά και με τις δύο μεθόδους για τα 300 από τα 326 δείγματα. Από τα 26 θετικά δείγματα των αιμοκαλλιιεργειών, η PCR έδωσε θετικό αποτέλεσμα μόνο σε 9 δείγματα (ευαισθησία 34,61%). Η ειδικότητα της μεθόδου είναι 100% εφόσον δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην ταυτοποίηση των δύο μεθόδων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας η χαμηλή ευαισθησία της PCR στο αίμα, μπορεί να εξηγηθεί λόγω του μικρού αριθμού των βακτηρίων που κυκλοφορούσαν στο αίμα κατά τη λήψη του δείγματος. Από την άλλη μεριά, πρόσθετες βελτιώσεις στα συστήματα επώασης των αιμοκαλλιιεργειών έχουν ως αποτέλεσμα την μεγαλύτερη ευαισθησία των κλασσικών καλλιιεργειών έναντι της

PCR, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις εκείνες που ο αριθμός των βακτηρίων είναι μικρότερος από 1000 κύτταρα ανά ml.

Σε προηγούμενες μελέτες έχει αποδειχθεί η καλή συσχέτιση των αποτελεσμάτων των αιμοκαλλιιεργειών και της ευρέως φάσματος PCR σε νεογνά και σε τοξικομανείς, με ευαισθησία και ειδικότητα 87-100% [89]. Ωστόσο αυτές οι έρευνες έγιναν σε περιορισμένο αριθμό ασθενών. Αντίθετα σε άλλες έρευνες, οι ευρέως φάσματος 16S rRNA PCR εμφανίζονται να έχουν χαμηλή ειδικότητα. Συγκεκριμένα, σε εμπύρετους ουδετεροπενικούς ασθενείς, σε εμπύρετους ασθενείς της ΜΕΘ, σε ασθενείς μετά από μεγάλες επεμβάσεις ή μετά από μεταμόσχευση, βακτηριακό DNA ανιχνεύτηκε σε ποσοστό άνω του 25% των στείρων αιμοκαλλιιεργειών [90,91].

Μια ενδιαφέρουσα πρακτική εφαρμογή της ευρέως φάσματος PCR αναφέρθηκε από τους Fredricks και Relman το 1999 [92]. Κοκκοβάκιλλος ανιχνεύτηκε με το μικροσκόπιο σε εγκεφαλονοτιαίο (ENY) υγρό, 53χρονης γυναίκας με πρόσφατους πονοκεφάλους και μειωμένο επίπεδο συνείδησης. Η αρχική υποψία για μηνιγγιτιδοκοκκική μηνιγγίτιδα δεν επιβεβαιώθηκαν με την καλλιέργεια. Η εφαρμογή στο ENY της ευρέως φάσματος 16S rRNA PCR έδειξε την παρουσία DNA *Haemophilus influenza*.. Αυτό το case report καθώς επίσης και πολλές άλλες μελέτες επιβεβαίωσαν τη χρησιμότητα και την διαγνωστική ευαισθησία της ευρέως φάσματος PCR σε ασθενείς με αρνητικές καλλιέργειες [93,94]. Τα συμπεράσματα της μελέτης μας είναι απολύτως σύμφωνα με τα παραπάνω. Από τα 136 δείγματα ENY που αναλύθηκαν τα 10 έδωσαν θετικό αποτέλεσμα με την PCR (σε έξι δείγματα ανιχνεύθηκε *N. meningitidis* και σε 4 *S. pneumoniae*. Μόνο 3 από τα 10 θετικά δείγματα είχαν θετική καλλιέργεια, όπου απομονώθηκε μηνιγγιτιδοκοκκός. Σε ασθενείς με πιθανή βακτηριακή λοίμωξη του ΚΝΣ η αντιμικροβιακή θεραπεία αρχίζει άμεσα, πριν από την παρακέντηση, και ως εκ τούτου συχνά οι καλλιέργειες είναι στείρες. Επίσης από τα επτά δείγματα που δεν ανίχνευσε η καλλιέργεια τα 3 ήταν *S. pneumoniae*. Το γεγονός της αδυναμίας να αναπτυχθεί το μικρόβιο αυτό στην κλασική καλλιέργεια παρατήρησαν και σε μια πρόσφατη μελέτη, όπου έγινε σύγκριση των δύο τεχνικών (κλασικές και ευρέως-φάσματος PCR) σε 382 παιδιατρικά δείγματα [95]. Οι συγγραφείς προτείνουν ότι ο *S. pneumoniae* είναι ένας μικροοργανισμός που δυσκολεύεται να αναπτυχθεί εξαιτίας της αυτόλυσης που υφίσταται και επιπλέον ότι συνήθως καλύπτεται από την προηγηθείσα αντιμικροβιακή θεραπεία.

Ένα σημαντικό εύρημα της παρούσας μελέτης είναι η ανίχνευση δύο βακτηρίων, διατροφικά απαιτητικών, που σπάνια έχει αναφερθεί στο παρελθόν, να σχετίζονται με παρόμοιες λοιμώξεις. Συγκεκριμένα ανιχνεύτηκε *Clostridium sordellii* σε πλευριτικό υγρό ασθενούς με εμπύημα και *Ralstonia pickettii* σε αρθρικό υγρό ασθενούς. Το εύρημα αυτό είναι αποτέλεσμα της ευρέως-φάσματος PCR που εξαιτίας της φύσης της μπορεί να ανιχνεύει σπάνια αλλά και νέα μικρόβια [96,97]. Λοίμωξη ανθρώπου από *Clostridium sordellii* σπάνια έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία. Πρόσφατα αναφέρθηκαν 3 περιστατικά στα οποία υπάρχει συσχέτιση μεταξύ εμπυήματος που προκλήθηκε από *Clostridium sordellii* και πνευμονίας, καθώς επίσης και 1 περιστατικό στο οποίο η κλινική εικόνα ενέπλεκε στα δύο προηγούμενα και βακτηριακή ενδοκαρδίτιδα [98,99,100]. Το περιστατικό της μελέτης μας αφορά άνδρα 56 ετών με πυρετό και βήχα για ένα 20ήμερο που είχε ήδη πάρει αντιμικροβιακή θεραπεία.. Η 16S rRNA PCR ακολουθούμενη από ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ταυτοποίησε τον αιτιολογικό παράγοντα ως *Clostridium sordellii* με ποσοστό ομοιότητας 100%. Η ταυτοποίηση έγινε σε διάστημα 2 ημερών ενώ με τις κλασικές μεθόδους (καλλιέργεια) ο μικροοργανισμός αναπτύχθηκε και ταυτοποιήθηκε σε 17 ημέρες, [81]. Οι μοριακές μέθοδοι προσφέρουν ταχύτητα στην ταυτοποίηση του μικροοργανισμού και βοηθούν στην εφαρμογή αιτιολογικής αντιμικροβιακής θεραπείας.

Επίσης εντυπωσιακά είναι τα αποτελέσματα της ευρέως-φάσματος PCR ακολουθούμενης από την ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στη διάγνωση των ορθοπαιδικών λοιμώξεων στις οποίες οι καλλιέργειες είναι ψευδώς αρνητικές, λόγω προηγούμενης αντιμικροβιακής θεραπείας, σχηματισμού βιομεμβράνης ή ακόμη και λόγω κακής λήψης του δείγματος. Πρόσφατη μελέτη σε 525 δείγματα ασθενών με οστικές και αρθρικές λοιμώξεις, οι Fenollar et al, 2006 [96], πρότειναν τη χρήση της ευρέως-φάσματος 16S rRNA PCR, η οποία ήταν ιδιαιτέρως χρήσιμη στην αξιολόγηση των αρνητικών καλλιεργειών. Από τη σύγκριση της μοριακής μεθόδου με την κλασική καλλιέργεια προέκυψε ότι η ευαισθησία και η ειδικότητα της πρώτης μεθόδου είναι 92,5% και 95,7%, ενώ τα ποσοστά για τη δεύτερη μέθοδο είναι 86,7% και 89% αντίστοιχα. Στην ίδια μελέτη ανιχνεύθηκαν επίσης μικρόβια που δεν αποικίζουν τον άνθρωπο (*Alkanindiges illinoisensis*), που ποτέ στο παρελθόν δεν αναφέρθηκε να ενοχοποιούνται για τέτοιες λοιμώξεις (*Prevotella buccalis*) και επιβεβαίωσε τον σπουδαίο ρόλο των αναερόβιων βακτηρίων σε τέτοιες λοιμώξεις. Στην παρούσα μελέτη η μοριακή μέθοδος κατάφερε να δώσει λύση σε 22 δείγματα

με ψευδώς αρνητική καλλιέργεια και υποψία λοίμωξης, επιβεβαιώνοντας τη χρησιμότητα της εφαρμογής της ευρέως-φάσματος PCR σε αρνητικές καλλιέργειες.

Σε πληθώρα προηγούμενων μελετών έχουν εφαρμοσθεί οι μοριακές τεχνικές και ειδικότερα η PCR, για τη βελτίωση της διάγνωσης σε εργαστήρια μυκοβακτηριδίων [101,102,103,104]. Από αυτές τις μελέτες προκύπτει η κλινική ευαισθησίας των μοριακών τεχνικών να είναι μεγαλύτερη από 74% συγκριτικά πάντα με την κλασική καλλιέργεια. Αντίθετα σε άλλες μελέτες η PCR εμφανίζεται να έχει μικρή ειδικότητα και ευαισθησία όπως η εργασία των Noortdhoek et al 1994 [105]. Στην παραπάνω εργασία οι ερευνητές ήρθαν αντιμέτωποι με το ποσοστό των 77% ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων της PCR, ποσοστό που δεν αναφέρθηκε ξανά στη βιβλιογραφία μιας και στις περισσότερες μελέτες το ποσοστό αυτό κυμαίνεται από 1-5%. Στην παρούσα συγκριτική μελέτη δεν αντιμετωπίσαμε πρόβλημα ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων στην μοριακή τεχνική, της οποίας η ειδικότητα είναι 100%. Αυτό το ποσοστό πιθανότατα προκύπτει από την μέθοδο που εφαρμόσαμε, το συνδυασμό της PCR με υβριδισμό που όπως γνωρίζουμε χαρακτηρίζεται από μεγάλη ειδικότητα. Εντούτοις η ευαισθησία της μεθόδου (19,36% σε σχέση με την καλλιέργεια) είναι χαμηλή, και μπορεί να εξηγηθεί από τη μικρή συγκέντρωση του μικροβίου στο κλινικό δείγμα. Από την άλλη μεριά οι καλλιέργειες ευνοούν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, ιδιαίτερα όταν ο αριθμός των μικροβιακών κυττάρων είναι εξαιρετικά χαμηλός, έστω και μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα.

Ως σημαντικό μειονέκτημα των μοριακών τεχνικών αναφέρεται, η αδυναμία τους να δώσουν πληροφορίες σχετικά με την έκφραση αντοχής του μικροοργανισμού σε διάφορα αντιμικροβιακά φάρμακα. [106]. Σήμερα, με τη χρήση μοριακών τεχνικών μπορούν πλέον να ανιχνεύουμε γονίδια που σχετίζονται με τη μικροβιακή αντοχή. Τέτοια είναι τα γονίδια *erm A*, *ermB*, *ermC* που σχετίζονται με αντοχή στην ερυθρομυκίνη, τα γονίδια *Aac(6')-aph(2'')* με τις αμινογλυκοσίδες, τα *vanA*, *vanB* με την βανκομυκίνη [107,108]. Είναι σημαντικό ωστόσο να αναφέρουμε ότι όλοι οι μηχανισμοί αντοχής δεν σχετίζονται με κάποιο γνωστό γονίδιο, και έτσι οι μοριακές τεχνικές δεν μπορούν να αντικαταστήσουν εξ ολοκλήρου τον κλασσικό έλεγχο ευαισθησίας. [109,110]. Στη μελέτη μας ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις σε ισονιαζίδη και ριφαμπικίνη στελεχών *M. tuberculosis complex*. Από τα 22 στελέχη *M. tuberculosis* τα 15 δεν έφεραν μεταλλάξεις με αντοχή σε ριφαμπικίνη και ισονιαζίδη, τα 4 είχαν αντοχή σε ριφαμπικίνη και τα υπόλοιπα 3 είχαν αντοχή και σε ισονιαζίδη. Τα αποτελέσματα ήταν συμβατά με αυτά του κλασσικού αντιβιογράμματος. Από την

μελέτη μας συμπεραίνουμε την χρησιμότητα των μοριακών τεχνικών στην ταχεία ανίχνευση μεταλλάξεων σε γονίδια αντοχής του μυκοβακτηριδίου. Τα αποτελέσματα της μοριακής ανίχνευσης της αντοχής ήταν διαθέσιμα σε 6 ώρες έναντι 12 ημερών του κλασσικού αντιβιογράμματος.

Ιδιαίτερη βοήθεια προσφέρουν οι μοριακές τεχνικές στη διάγνωση λοίμωξης από *Chlamydia trachomatis*. Ο μικροοργανισμός δεν ανιχνεύεται σε κοινή καλλιέργεια τραχηλικού ή ουρηθρικού εκκρίματος και η διάγνωση απαιτεί εξειδικευμένες εξετάσεις. Μέχρι σήμερα η διάγνωση βασιζόταν στον άμεσο ανοσοφθορισμό του κλινικού δείγματος [111]. Η εξέταση αυτή ενώ χαρακτηρίζεται από εξαιρετική ειδικότητα έχει χαμηλή ευαισθησία. Έτσι η PCR έχει εισαχθεί ως ταχεία και αξιόπιστη μέθοδος για τη διάγνωση χλαμυδιακής λοίμωξης. Σε αυτό το συμπέρασμα καταλήγει και η μελέτη μας.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η ταχεία και αξιόπιστη ταυτοποίηση του υπεύθυνου μικροοργανισμού, σε συνδυασμό με τη γνώση της φυσικής αντοχής του μικροβίου και την επιδημιολογία της αντοχής στην περιοχή, συμβάλλει στην εφαρμογή αιτιολογικής θεραπείας.
- Οι μοριακές μέθοδοι είναι σημαντικό εργαλείο για τη διάγνωση των βακτηριακών λοιμώξεων. Η ευρέως φάσματος *16S rRNA* PCR στοχεύοντας σε κοινές, διατηρημένες αλληλουχίες του βακτηριακού DNA, βοηθά στην ανίχνευση και ταυτοποίηση μεγάλου φάσματος μικροβίων.
- Η μέγιστη συμβολή των μοριακών μεθόδων εστιάζεται σε περιπτώσεις ασθενών με ισχυρή υποψία βακτηριακών λοιμώξεων, στους οποίους οι καλλιέργειες παραμένουν στείρες, είτε λόγω προηγηθείσας αντιμικροβιακής θεραπείας, είτε λόγω παρουσίας βραδέως αναπτυσσόμενων μικροβίων. Όπως προέκυψε και από την παρούσα εργασία, η εφαρμογή της ευρέως φάσματος PCR στα ENY, τα πλευριτικά υγρά, τα αρθρικά υγρά και τους ιστούς οθροπεδικών λοιμώξεων υπήρξε ιδιαίτερα χρήσιμη.
- Στις περιπτώσεις βακτηριαιμίας φαίνεται οι μοριακές τεχνικές να υπολείπονται σε ευαισθησία σε σχέση με τις κλασσικές καλλιέργειες. Επίσης το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση ανίχνευσης των μυκοβακτηριδίων σε πτύελα, βρογχικές εκκρίσεις και γαστρικά.
- Ιδιαίτερως χρήσιμη είναι η συμβολή των μοριακών μεθόδων (PCR-υβριδισμός) στην ταυτοποίηση από καθαρό καλλιέργημα του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης και άτυπων μυκοβακτηριδίων όπως και στον προσδιορισμό μεταλλάξεων που κωδικοποιούν αντοχές σε ριφαμπικίνη και ισονιαζίδη.
- Είναι γεγονός ότι ο μοριακές τεχνικές είναι σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο στην αρένα των λοιμώξεων. Ωστόσο και αυτές έχουν κάποιους περιορισμούς. Η ανίχνευση βακτηριακού DNA στο κλινικό δείγμα δεν σημαίνει οπωσδήποτε βιώσιμο μικροοργανισμό. Γι αυτό και ενώ οι μοριακές τεχνικές προσφέρουν μεγάλη βοήθεια στην τεκμηρίωση της φυματίωσης, έχουν μηδενική διαγνωστική αξία στην παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας, γιατί έχει βρεθεί ότι γενετικό υλικό νεκρού μυκοβακτηριδίου υπάρχει στα πτύελα ασθενών για πολύ καιρό μετά την χορήγηση θεραπείας. Για το λόγο αυτό, η αξιολόγηση του αποτελέσματος των μοριακών τεχνικών απαιτεί εμπειρία, γνώση των περιορισμών και επικοινωνία με τον κλινικό ιατρό.

- Παρά τα τρία κύρια πλεονεκτήματα των μοριακών τεχνικών, που είναι η *ταχύτητα*, η *ειδικότητα* και η *ευαισθησία*, οι τεχνικές αυτές αδυνατούν να αντικαταστήσουν τις κλασσικές καλλιέργειες. Πιστεύουμε όμως ότι ο συνδυασμός τους θα συμβάλλει ουσιαστικά στη διάγνωση και στη θεραπεία των λοιμώξεων.

6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η σύγκριση της ειδικότητας και της ευαισθησίας των μοριακών τεχνικών σε σχέση με τις κλασσικές συμβατικές μεθόδους στη διάγνωση των βακτηριακών λοιμώξεων. Στο χρονικό διάστημα 2006-2009 αναλύθηκαν με τις δύο μεθόδους: 326 αίματα, 136 ENY, 80 πλευριτικά υγρά, 40 αρθρικά υγρά, 52 ιστοί, 295 γαστρικά-πτύελα-βρογχικές εκκρίσεις και 270 τραχηλικά δείγματα ασθενών από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Στα κλινικά δείγματα χωρίς μικροβιακή χλωρίδα εφαρμόσαμε την ευρέως φάσματος *16S rRNA* PCR, και στα αποτελέσματα προέκυψε μεγαλύτερο ποσοστό ευαισθησίας συγκριτικά με την καλλιέργεια : ENY (100% έναντι 30%), πλευριτικά υγρά (100% έναντι 33%), αρθρικά υγρά (100% έναντι 0%) και ιστοί ορθοπεδικών λοιμώξεων (100% έναντι 52,4%). Αντίθετα, η εφαρμογή της ευρέως φάσματος PCR στο αίμα είχε μικρότερη ευαισθησία (34,6%) από την κλασική καλλιέργεια. Στα κλινικά δείγματα με φυσιολογική χλωρίδα εφαρμόσαμε PCR με εκκινητές ειδικούς για παθογόνα βακτήρια. Συγκεκριμένα στην ανίχνευση μυκοβακτηριδίων η μοριακή μέθοδος υστερεί των κλασσικών μεθόδων με ποσοστό ευαισθησίας μόνο 19,4%. Συνεισφέρει όμως σημαντικά στην ταυτοποίηση μυκοβακτηριδίων από άμεσο καλλιέργημα και στον προσδιορισμό των μεταλλάξεων που κωδικοποιούν αντοχές σε δύο κύρια αντιφυματικά αντιβιοτικά, τη ριφαμπικίνη και την ισονιαζίδη. Επίσης ουσιαστική βοήθεια φαίνεται να προσφέρει η PCR στη διάγνωση χλαμυδιακών λοιμώξεων σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό. Συμπερασματικά, οι μοριακές τεχνικές βοηθούν σημαντικά στη διάγνωση των βακτηριακών λοιμώξεων.


7. ABSTRACT

The aim of this project was to compare the specificity and sensitivity of molecular and culture methods in diagnosis of bacterial infections. During 2006-2009 we analyzed: 326 blood samples, 136 Cerebrospinal fluids, 80 pleuric fluids, 40 articular fluids, 52 tissues, 295 gastric-sputum-bronchial egests και 270 cervical specimens from patients admitted to the University Hospital of Larissa. Broad range 16S *rRNA* PCR was applied to sterile clinic specimens, and it was found to be more sensitive than cultures of: CSF (100% against 30%), pleuritic fluids (100% against 33%), articular fluids (100% against 0%) και orthopaedic infection tissues (100% against 52,4%). In contrast broad range 16S *rRNA* PCR method in blood studies was less sensitive (34,6%) than cultures. PCR with primers specific for pathogenic bacteria was applied to specimens with natural floral. Molecular methods are substandard especially in the ability of detecting mycobacteria having a percentage of sensitivity only 19,4%. However, they have an important advantage in identification of mycobacteria using direct culture, and in determination of mutations encoding resistance to rifampicin and isoniazid. In addition the PCR method is useful for diagnosis of Chlamydia infections in comparison with immunofluorescence. In conclusion, molecular techniques provide important assistance in successful diagnosis of bacterial infections.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1



Δ) Ανίχνευση και ταυτοποίηση μυκοβακτηριδίων άμεσα στο κλινικό δείγμα. Μέθοδος: PCR σε συνδυασμό με υβριδισμό. Στα δείγματα 1, 4 ανιχνεύθηκε μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης (*Mycobacterium tuberculosis complex*), ενώ στα δείγματα 2, 3, 5, 6 ανιχνεύθηκαν άτυπα μυκοβακτηρίδια (*Mycobacterium kansasii*, *M. chelonae*, etc)

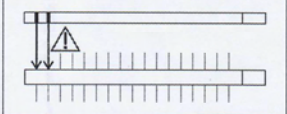


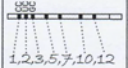
GenoType® Mycobacterium CM/AS 12

VER 1.0
00299-0507-02-3

29	5	2007
dd	mm	yyyy

#		
---	---	---



 1,2,3,5,7,10,12	species
--	---------

	CC	GC	UC	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	M	
1.																			<i>M. peregrinum + M. tuberculosis-komplex</i>
2.																			<i>M. chelonae</i>
3.																			<i>M. fortuitum</i>
4.																			<i>M. tuberculosis-komplex</i>
5.																			<i>M. scrofulaceum</i>
6.																			<i>M. kansasii</i>

LOT

HYB


min

STR

min

SUB

min



β) Άμεσα σε κλινικό δείγμα ανίχνευση και ταυτοποίηση του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης στα διάφορα είδη του . Μέθοδος : PCR σε συνδυασμό με υβριδισμό.

HAIN
LIFESCIENCE

GenoType® MTBC 12
VER 1.X

3 1 2008
dd mm yyyy

#					species
---	--	--	--	--	---------

#	Patient ID	CC	UC	MTBC	5	6	7	8	9	10	11	12	13	M	Species
1.	7926														<i>M. tuberculosis</i> / <i>M. Canettii</i>
2.	7028														<i>M. Canettii</i>
3.	3044														<i>M. Canettii</i>
4.	8952														<i>M. canettii</i>
5.	7637														<i>M. canettii</i>
6.	1177														<i>M. canettii</i>
7.	3332														BCG
8.	4671														<i>M. canettii</i>
9.	3142														<i>M. canettii</i>
10.	Χαρίσσα μυλο														<i>M. canettii</i>
11.	Γιάννης	πτύελος													(-)
12.	-/-														(-)

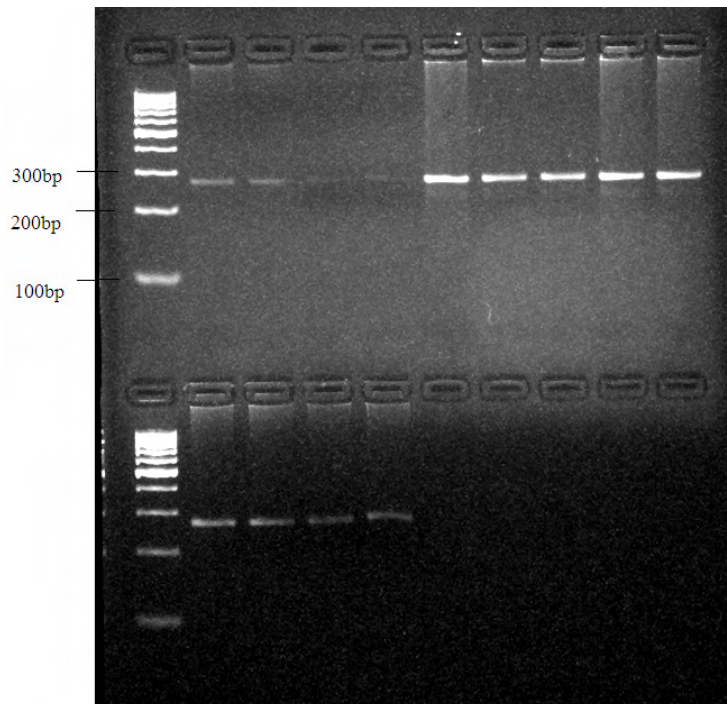
CC UC MTBC 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M

LOT _____ HYB _____ min STR _____ min SUB _____ min

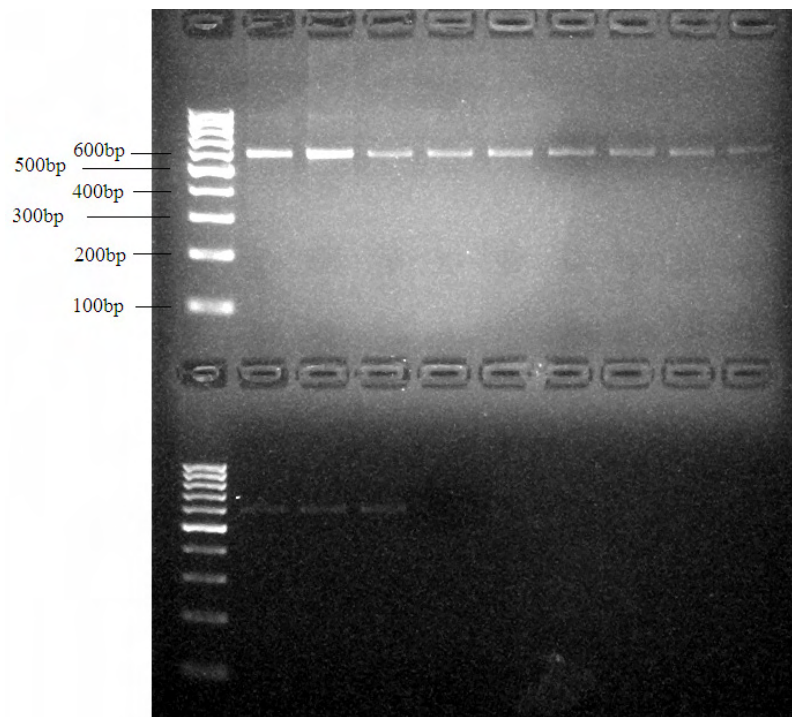
[illegible]

II) Εικόνες που προέκυψαν από ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR με διάφορους εκκινητές:

α) β_2 -σφαιρίνη. Το προϊόν όπως βλέπουμε στην εικόνα που ακολουθεί έχει μέγεθος 280 bp. Συνιστάται να εφαρμόζεται σε κάθε υπό εξέταση δείγμα, ώστε να επιβεβαιώνεται η καλή εξαγωγή του DNA και η απουσία αναστολέων.

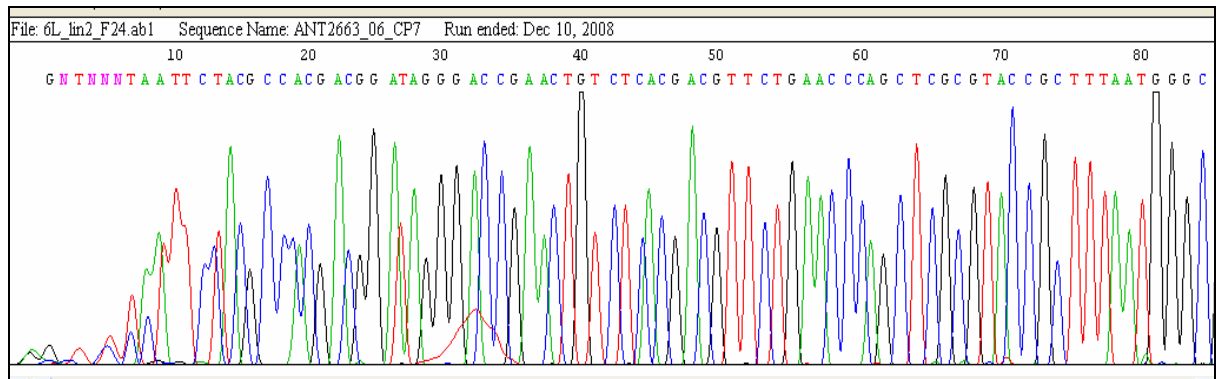


β) *16S rRNA*. Το προϊόν όπως βλέπουμε στην εικόνα που ακολουθεί έχει μέγεθος περίπου 600 bp. Πιστοποιεί την παρουσία βακτηριακού γενετικού υλικού. Στη φάση αυτή δεν μπορεί να ταυτοποιηθεί ο μικροοργανισμός σε επίπεδο γένους και είδους και απαιτείται ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του προϊόντος.

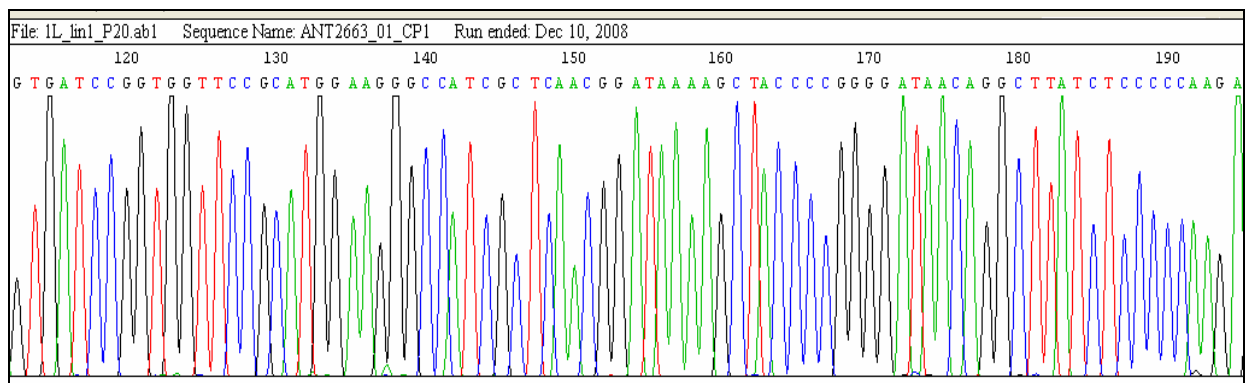


III) Ηλεκτροφορογράμματα που προέκυψαν από την ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του προϊόντος του *16 S rRNA* . Κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε ένα νουκλεοτίδιο.

Εικόνα α) Νουκλεοτιδική αλληλουχία *Cardiobacterium spp*



Εικόνα β) Νουκλεοτιδική αλληλουχία *Staphylococcus aureus*



BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Pitt TL, Saunders NA. Molecular bacteriology: a diagnostic tool for the millennium. *J Clin Pathol* 2000, 53:71-75.
2. Naber SP. Molecular pathology–diagnosis of infectious disease. *N Engl J Med* 1994, 331:1212-15.
3. Musial CE, Tice LS, Stockman L, et al. Identification of mycobacteria from culture by using the Gen-Probe rapid diagnostic system for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1988, 26:2120-23.
4. Drake TA, Hindler JA, Berlin OG, et al. Rapid identification of *Mycobacterium avium* complex in culture using DNA probes. *J Clin Microbiol* 1987, 25:1442-45.
5. Moseley SL, Hug I, Alim AR, So M, Samadpour-Motalebi M, Falkow S. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* by DNA colony hybridization. *J Infect Dis* 1980, 142:892-98.
6. Engleberg NC, Eisenstein BI. Detection of microbial nucleic acids for diagnostic purpose. *Annu Rev Med* 1992, 43:147-55.
7. Doty P, Marmur J, Eigner J, Schildkraut C. Strand separation and specific recombination in deoxyribonucleic acids: physical chemical studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1960, 46(4):461-76.
8. Schildkraut CL, Marmur J, Doty P. The formation of hybrid DNA molecules and their use in studies of DNA homologies. *J Mol Biol* 1961, 3:595-617.
9. Kohne DE. Isolation and characterization of bacterial ribosomal RNA cistrons. *Biophys J* 1968, 8(10):1104-18.

10. Matthew JA and Kricka LJ. Analytical strategies for the use of DNA probes. *Analyt Bioch* 1988, 169:1-25.
11. McNicol AM, Farquharson MA. In situ hybridization and its diagnostic applications in pathology. *J Pathol* 1997, 182:250-261.
12. Hogardt M, et al. Specific and rapid detection by fluorescent in situ hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2000, 38:818-825.
13. Jansen GJ, et al. Rapid identification of bacteria in blood cultures by using fluorescently labeled oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol* 2000, 38:814-817.
14. Oliveira K, et al. Direct identification of *Staphylococcus aureus* from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2003, 41:889-891.
15. Bryan RN, Ruth JL, Smith RD, Le Bon JM. Diagnosis of clinical samples with synthetic oligonucleotide hybridization probes. In: Leive L. (ed). *Microbiology-1986*. American Society for Microbiology, Washington, 1986:113-6.
16. Wolcott MJ, Advances in nucleic acid-based detection methods. *Clin Microbiol Reviews* 1992, 5:370-86.
17. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated dy gel electrophoresis. *J Molec Biolog* 1975, 98:503-17.
18. Conville PS, Keiser JF, Witebsky FG. Mycobacterium caused dy simultaneous infection with Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare detected dy analysis of BACTEC 13A Bottle with the Gen-Probe kit. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1989, 12:217-19.
19. Lim SD, Todd J, Lopez J, Ford E, Janda JM. Genotypic identification of pathogenic Mycobacterium species by using a nonradioactive oligonucleotide probe. *J Clin Microbiol* 1991, 29:1276-78.

20. Pasculle AW, Veto GE et al. Laboratory and clinical evaluation of commercial DNA probe for the detection of *Legionella* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 1989, 27:2350-58.
21. Van Damme-Jongsten et al. Synthetic DNA probes for detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strain isolated from outbreaks of food poisoning. *J Clin Microbiol* 1990, 28:131-33.
22. Daly JA, Clifton NL, Seskin KC, Gooch WM. Use of rapid, nonradioactive DNA probes in culture confirmation tests to detect *Streptococcus* spp. from pediatric patients with significant infections. *J Clin Microbiol* 1991, 29:80-82.
23. Denys GA, Carey RB. Identification of *Streptococcus pneumoniae* with a DNA probe. *J Clin Microbiol* 1992, 30:2725-27.
24. Davis TE, Fuller DD. Direct identification of bacterial isolates in blood cultures by using a DNA probe. *J Clin Microbiol* 1991, 29:2193-96.
25. Ranki M, Leinonen AW, Jalana T, Nieminen P, Soaeres VRX, Paavonen J, et al. Use of the AffiProbe HPV test kit for detection of human papillomavirus DNA in genital scrapes. *J Clin Microbiol* 1990, 28:2076-81.
26. Sheiness D, Dix K, Watanabe S, Hillier SL. High levels of *Gardnerella vaginalis* detected with an oligonucleotide probe combined with elevated pH as a diagnostic indicator of bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 1992, 30:642-48.
27. Eschenbach DA, Hillier S, Critchlow, Stevens C, DeRouen T, Holmes KK. Diagnosis and clinical manifestations of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1988, 158:819-28.
28. Mullis KB, Fallona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzing reaction. *Methods Enzymol* 1987, 155:335-350.

29. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985, 230:1530-4.
30. Saiki RK, Gelfand S, Stoffel SJ, Scharf R, Higuchi GT, Horn KB, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988, 239:487-91.
31. Guyer RL, Koshland DE. The molecule of the year. *Science* 1984, 246:1543-46.
32. Murakaw GJ, Zaia JA, Spallone PA, et al. Direct detection of HIV-1 in RNA from AIDS and ARC patient samples. *DNA* 1988, 7:287-95.
33. Ou CY, Kwok S, Mitchell SW et al. DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Science* 1988, 239:295-7.
34. Schowalter DB, Sommer SS. The generation of radiolabelled DNA and RNA probes with polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1989, 177:90-4.
35. An SF, Franklin D, Fleming KA. Generation of digoxigeninlabelled double-stranded and single-stranded probes using the polymerase chain reaction. *Mol and Cellular Probes* 1992, 6:193-200.
36. Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB, Manos MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: effects of fixative and fixation time. *Am J Clin Pathol* 1991, 95:117-124.
37. Persing DH, Telford III SR, Rys PN, Dodge DE, White TJ, Malawista SE, et al. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in museum specimens of *Ixodes dammini* ticks. *Science* 1990, 249:1420-23.
38. Chiu KP, Cohen, Morris D, Jordan G. Intracellular amplification of proviral DNA in tissue sections using the polymerase chain reaction. *J Histochem Cytochem* 1992, 40:333-41.

39. Nuovo GJ, Gallery F, MacConnel P, Becker J, Bloch W. An improved technique for the in situ detection of DNA after polymerase chain reaction. *Pathology* 1992, 139:1239-44.
40. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990, 262:56-65.
41. Eisenstein BI. The polymerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N Engl J Med* 1990, 332:178-183.
42. Wu DY, Wallace RB. The ligation amplification reaction (LAR)-amplification of specific DNA sequences using sequential rounds of template-dependent ligation. *Genomics* 1989, 4:560-69.
43. Winn-Deen ES, Jovannisci DM. Sensitive fluorescence method for detecting DNA ligation amplification products. *Clin Chem* 1991, 37:1522-23.
44. Backman K. Ligase chain reaction: diagnostic technology for the 1990s and beyond. *Clin Cem* 1992, 38:457-58.
45. Barany F. Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proc Natl Acad Sci* 1991, 88:189-93.
46. Haruna I, Spiegelman S. Specific tempate requirements of RNA replicases. *Proc Natl Acad Sci* 1965, 54:579-87.
47. Persing D. Polymerase chain reaction: trenches to benches. *J Clin Microbiol* 1991, 29:1281-1285.
48. Myers TW, Gelfand DH. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry* 1991, 30:7661-66.

49. Munger K, Phelps WC, Bubbs V, Howley PM, Schiegl R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* 1989, 63:4417-21.
50. Haqqi TM, Sarkar G, David CS, Sommer SS. Specific amplification of refractory segment of genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 1988, 16:11844.
51. Zeaiter Z, et al. Diagnosis of Bartonella endocarditis by real-time nested PCR assay using serum. *J Clin Microbiol* 2003, 41(3):919-925.
52. Pan S, Cole Gt. Molecular and biochemical characterization of Coccidioides immitis-specific antigen. *Infect Immun* 1995, 63:3994-4002.
53. Farrell DJ. Evaluation of AMPLICOR Neisseria gonorrhoeae PCR using cppB nested PCR and 16S rRNA PCR. *J Clin Microbiol* 1999, 37:386-390.
54. Wilson KH, Blitchington RB, Green RC. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990, 323:1573-80.
55. Chen K, Niemark H, Rumore P, et al. Broad range DNA probes for detecting and amplifying eubacterial nucleic acids. *FEMS Microbiol Lett* 1989, 57:19-24.
56. Greigen K, Loeffelholz M, Purohit A. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1994, 32:335-51.
57. Martineau F, et al. Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels. *J Clin Microbiol* 2001, 39:2541-47.
58. Fukushima M, et al. Detection and identification of Mycobacterium species isolates by DNA microarray. *J Clin Microbiol* 2003, 41:2605-15.

59. Harris KA, Hartley JC. Development of broad-range 16S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. *J Med Microbiol* 2003, 52(8):685-691.
60. Schuurman T, et al. Prospective study of use of PCR amplification and sequencing of 16S ribosomal DNA from cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis in clinical setting. *J Clin Microbiol* 2004, 42:734-740.
61. Gauduchon V, et al. Molecular diagnosis of infective endocarditis by PCR amplification and direct sequencing of DNA from valve tissue. *J Clin Microbiol* 2003, 41:763-766.
62. Rantakokko-Jalava K, Jalava J. Optimal DNA isolation method for detection of bacteria in clinical specimens by broad-range PCR. *J Clin Microbiol* 2001, 39:3587-3582.
63. Qian Q, et al. Direct identification of bacteria from positive blood cultures by amplification and sequencing of the 16S rRNA gene: evaluation of BACTEC 9240 instrument true-positive and false-positive results. *J Clin Microbiol* 2001, 39:3587-3582.
64. Rothman RE, et al. Detection of bacteremia in emergency department patients at risk for infective endocarditis using universal 16S rRNA primers in a decontaminated polymerase chain reaction assay. *J Infect Dis* 2002; 186:1677-1681.
65. Bastien P, Chabbert E, Lachaud L. Contamination management of broad-range or specific PCR: is there any difference? *J Clin Microbiol* 2003, 41:2272.
66. Grahn N, et al. Identification of mixed bacterial DNA contamination in broad-range PCR amplification of 16S rDNA V1 and V3 variable regions by pyrosequencing of cloned amplicons. *FEMS Microbiol Lett* 2003, 219:87-91.

67. Cloud JL, et al. Identification of *Mycobacterium* spp. by using a commercial 16S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencing libraries. *J Clin Microbiol* 2002, 40:400-406.
68. Hall L, et al. Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol* 2003, 41:1447-1453.
69. Baghurst PA. Chips with everything. *Aust N Z J Public Health* 2002, 26:106-7.
70. Bryant PA, et al. Chips with everything:DNA microarrays in infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 2004, 4:100-11.
71. Coen DM. Antiviral Drug Resistance. *Ann N Y Acad Sci* 1990, 616:224-237.
72. Cloud JL, et al. Evaluation of partial 16S ribosomal DNA sequencing for identification of nocardia species by using the MicroSeq 500system with an expanded database. *J Clin Microbiol* 2004, 42:578-84.
73. Ahmandian A, et al. Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Anal Biochem* 2000, 280:103-10.
74. Brosch R, Buchrieser C, Rocourt J. Subtyping of *Listeria monocytogenes* serovar-4d by use of low-frequency-cleavage restriction endonucleases and pulsed field gel electrophoresis. *Res Microbiol* 1991, 142:667-75.
75. Bygraves JA, Maiden MCJ. Analysis of the clonal relationships between strains of *Neisseria meningitidis* by pulsed field gel electrophoresis. *J Gener Microbiol* 1992, 138:523-31.
76. Miranda AG, Singh KV, Murray BE. DNA fingerprinting of *Enterococcus faecium* by pulsed-field gel electrophoresis may be a useful epidemiologic tool. *J Clin Microb.* 1991, 29:2752-57.

77. Suggs SV, Wallace RB, Hirose T, Kawashima EH and Itakura K. Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human β 2-microglobulin. PNAS USA 1981; 78: 6613-6615.
78. Saiki RK, Chang CA, Levenson CH, Warren TC, Boehm CD, Kazazian HH Jr, et al. Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. N Engl J Med 1988, 319: 537-541.
79. Altschul X, Stephen F, Thomas L, Madden X, Alajandro A, Schaffer, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 1997, 25:3389-3402.
80. Drancout M, Bollet C, Carlouz A, Martelin R, Gayral JP, Raoult D. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. J Clin Microbiol 2000, 38:3623-3630.
81. Foroulis CN, Gerogianni I, Kouritas VK, Karetsi E, Gourgoulis K, Klapsa D, et al. Direct detection of *Clostridium sordellii* by broad range PCR in pleural fluid of a patient with pneumonic empyema. Scand J Infect Dis. 2007, 39(6-7):617-9
82. Gould IM A review of the role of antibiotic policies in the control of antibiotic resistance. J Antimicrob Chemother 1999, 43:459-465.
83. Gould IM Antibiotic policies and control of resistance. Curr Opin Infect Dis 2002, 15:395-400.
84. Fredricks DN & Relman DA. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. CID 1999, 29:475-488.
85. Giovannoni SJ, Britschgi TB, Moyer CL, Field KG. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. Nature 1990, 345:20.

86. Gray JP, Herwig RP. Phylogenic analysis of the bacterial communities in marine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62:4049-4059.
87. Hutter G, Schlagenhauf U, Valenza G, Horn M, Burgemeister S, Claus H, et al. Molecular analysis of bacteria in periodontitis: evaluation of clone libraries, novel phylotypes and putative pathogens. *Microbiology* 2003, 149:67-75.
88. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J. Bacteriol.* 2001, 183 : 3770-3783.
89. Lagorgia N, Coppola B, Carbone R et al. Rapid detection of neonatal sepsis using polymerase chain reaction. *Acta Pediatr* 1997, 86:1097-1099.
90. Sleight J, Cursons R, La Pine M. Detection of bacteraemia in critically ill patients using 16SrRNA polymerase chain reaction and DNA sequencing. *Intensive Care Med* 2001, 27:1269-1273.
91. Ley BE, Linton CJ, Bennett DM, Jatal H, Foot AB, Millar MR. Detection of bacteraemia in patients with fever and neutropenia using 16SrRNA gene amplification by polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998, 17:247-253.
92. Fredricks DN, Relman DA. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. *Clin Infect Dis* 1999, 29(3):475-486 quiz 487-488.
93. Pandit L, Kumar S, Karunasagar I. Diagnosis of partially treated culture-negative bacterial meningitis using 16S rRNA universal primers and restriction endonuclease digestion. *J Med Microbiol* 2005, 54(6):539-542.
94. Xu J, Moore JE, Millar BC, Webb H, Shields MD, Goldsmith CE. Employment of broad range 16S rRNA PCR and sequencing in the detection of aetiological agents of meningitis. *New Microbiol* 2005, 28(2):135-143.

95. Harris KA, and Hartley JC. Development of broad-range 16S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. *J Med Microbiol* 2003, 52:685-691.
96. Fenollar F, Roux V, Stein A, Drancourt M, and Raoult D, Analysis of 525 samples to determine the usefulness of PCR amplification and sequencing of 16S rRNA gene for diagnosis of Bone and Joint Infections. *J Clin Microbiol* 2006, 44(3):1018-1028.
97. Gatselis N, Malli E, Papadamou G, Petinaki E, Dalekos GN. Direct detection of *Cardiobacterium hominis* in serum from a patient with infective endocarditis by broad-range bacterial PCR. *J Clin Microbiol* 2006, 44:669-672.
98. Fischer M, Bhatnagar J, Guarner J, Reagan S, Hacker JK, van Meter SH, et al. Fatal toxic shock syndrome associated with *Clostridium sordellii* after medical abortion. *N Engl J Med* 2005, 353:2352-60.
99. Buchman AL, Ponsillo M, Nagami PH. Empyema caused by *Clostridium sordellii*, a rare form of pleuropulmonary disease. *J Infect* 1991, 22:171-4.
100. File TM Jr, Fass RJ, Perkins RL. Pneumonia and empyema caused by *Clostridium sordellii*. *Am J Med Sci* 1977, 274:211-212.
101. Manjunath N, Shankar P, Rajan L, Bhargava A, Saluja S, and Shriniwas. Evaluation of polymerase chain reaction for the diagnosis of tuberculosis. *Tubercle* 1991, 72:21-27.
102. Pao CC, Yen TS, You JB, Maa JS, Fiss EH, and Chang CH. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. *J. Clin. Microbiol* 1990, 28:1877-1880.
103. Wilson, SM, McNerney R, Nye PM, Godfrey-Faussett PD, Stoker NG, and Voller A. Progress toward a simplified polymerase chain reaction and its application to diagnosis of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol* 1993, 31:776-782.

104. Sritharan V, and Barker RH. A simple method for diagnosing M. tuberculosis infection in clinical samples using PCR. Mol. Cell. Probes 1991, 5:385-395.
105. Noortdhoek GT, Kolk AHJ et al. Sensitivity and specificity of PCR for detection of Mycobacterium tuberculosis: a blind comparison study among seven laboratories. J Clin Microbiol 1994, 32:277-284.
106. Rantakokko-Jalava K, Nikkari S, Jalava J, Eerola E, Skurnik M, Meurman O et al. Direct amplification of rRNA gene in diagnosis of bacterial infections. J Clin Microbiol 2000, 38:32-39.
107. Jasir A, Tanna A, Efstratiou A, Schalten C. Unusual occurrence of M Type 77 antibiotic-resistant group A streptococci in southern Sweden. J Clin Microbiol 2001, 39:586-90.
108. Martineau F, Picard FJ, Grenier L, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Multiplex PCR assay for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patients infected after cardiac surgery. The ESPRit Trial. J Antimicrob Chemother 2000, 46:527-34.
109. Maeda S, Yoshida H, Matsunaga H, Ogura K, Kawamata O, Shiratori Y et al. Detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains by a preferential homoduplex formation assay. J Clin Microbiol 2000, 38:210-4.
110. Gallo J, Raska M, Dendis M, Floschutz AV, Kolar M. Molecular diagnosis of prosthetic joint infection. A review of evidence. Biomed 2004, 148(2):123-129.
111. Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections. Clin Microbiol Rev 1997, 10:160-84.