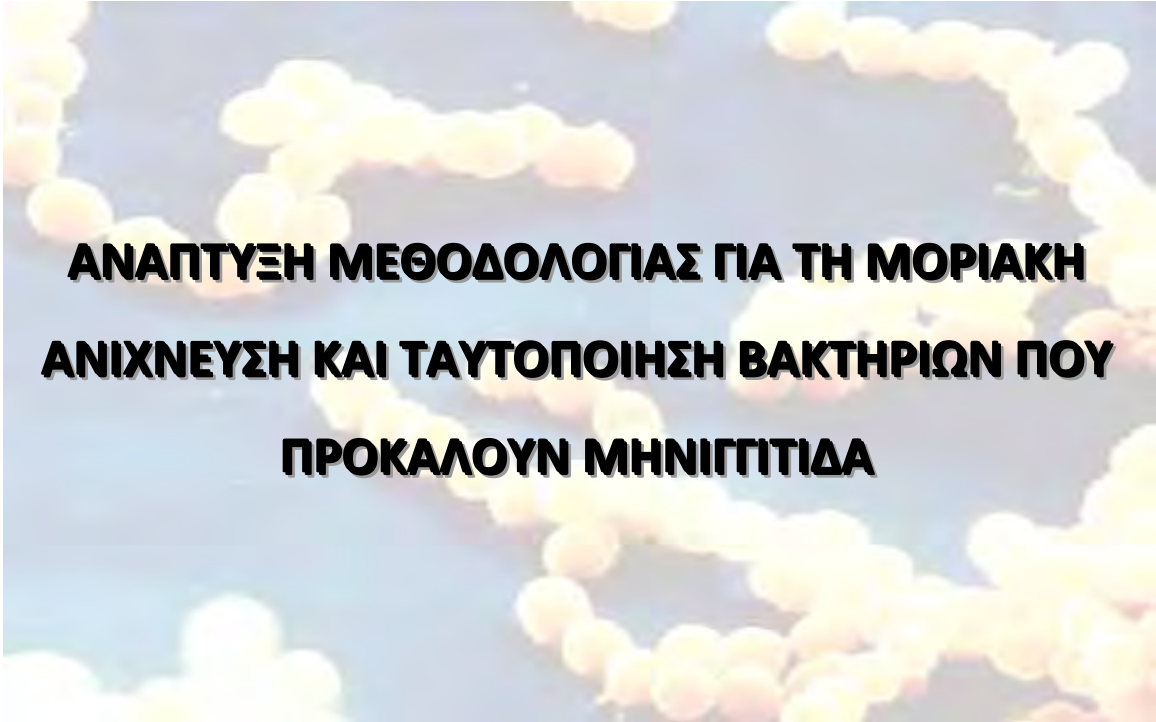




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Αθανασία Χ. Σηρογιάννη



**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ
ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ**

2010

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ
ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με Έμφαση στη Βιοτεχνολογία
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας , Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ζ. ΜΑΜΟΥΡΗΣ

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας , Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σ. ΛΕΒΕΙΔΙΩΤΟΥ-ΣΤΕΦΑΝΟΥ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας
Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ

Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας , Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ζ. ΜΑΜΟΥΡΗΣ

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας , Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σ. ΛΕΒΕΙΔΙΩΤΟΥ- ΣΤΕΦΑΝΟΥ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας
Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Γ. ΒΡΥΩΝΗ

Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας
Ιατρική Σχολή Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Σ. ΠΟΥΡΝΑΡΑΣ

Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας
Τμήμα Ιατρικής , Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κ. ΓΚΑΡΤΖΟΝΙΚΑ

Λέκτορας Μικροβιολογίας
Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ

Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αθανασία Χ. Ξηρογιάννη

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ
ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αθανασία Χ. Ξηρογιάννη

2010

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ

Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων:15

Συνολικός αριθμός σελίδων: 176

Αριθμός πινάκων: 45

Αριθμός εικόνων: 45

Αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών: 89

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή περιγράφεται αναλυτικά η μεθοδολογία ανάπτυξης τριών τεχνικών πολλαπλής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (multiplex PCR) και αξιολογείται η αξιοπιστία τους ως μοριακές τεχνικές σε σχέση με τις κλασικές μεθόδους, καθώς και η δυνατότητα εφαρμογής τους απευθείας σε κλινικά δείγματα.

Αρχικά περιγράφεται η μεθοδολογία ανάπτυξης μιας τεχνικής multiplex PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των μικροοργανισμών *H.influenzae*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *Streptococcus* spp. και η εφαρμογή της σε κλινικά δείγματα ασθενών με μηνιγγίτιδα ή/και βακτηριαιμία, όπως εγκεφαλονωτιαίο υγρό και ολικό αίμα καθώς και σε δείγματα ασθενών με λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος (βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, πτύελα, ωτικό υγρό, πλευριτικό υγρό). Η ευαίσθητη και ακριβής τεχνική που αναπτύχθηκε αποδεικνύεται πολύ χρήσιμη ως διαγνωστική τεχνική για την έγκαιρη επιβεβαίωση και αντιμετώπιση ασθενειών όπως η μηνιγγίτιδα, η βακτηριαιμία και η πνευμονία, αλλά και για τη συμβολή και προσθήκη επιδημιολογικών στοιχείων που σχετίζονται με την πρόκληση των λοιμώξεων από αυτούς τους μικροοργανισμούς. Από την άλλη πλευρά, ο τρόπος λήψης των δειγμάτων του αναπνευστικού συστήματος και τα υψηλά ποσοστά φορέας των

εξεταζόμενων μικροοργανισμών στο ρινοφάρυγγα, καθιστούν την τεχνική χρήσιμη και αναγκαία κατά περίπτωση στη διάγνωση λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος, υπό τον όρο της προσεκτικής αξιολόγησης των δειγμάτων ανάλογα με την ηλικία και το ιστορικό του ασθενούς.

Στη συνέχεια, περιγράφεται η μεθοδολογία ανάπτυξης μιας διπλής PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των μικροοργανισμών *S. pyogenes* και *S. agalactiae* που εφαρμόστηκε στα θετικά για *Streptococcus* spp. δείγματα σύμφωνα με την προηγούμενη τεχνική. Η τεχνική που αναπτύχθηκε εμφάνισε 100% ειδικότητα και ευαισθησία συγκρινόμενη με τις κλασικές μεθόδους και ανέδειξε τον *S. pyogenes* ως το δεύτερο σε συχνότητα, μετά τον πνευμονιόκοκκο, μικροοργανισμό στις λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος.

Η τρίτη πολλαπλή PCR, αναπτύχθηκε αρχικά για την ανίχνευση τριών γονιδίων που προσδίδουν αντοχή στις μακρολίδες-λινκοσαμίδες-στρεπτογραμμίνη B (MLS_B), αντιβιοτικά που χορηγούνται στη θεραπεία λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος και έπειτα συγχωνεύθηκε με τη διπλή PCR για την ανίχνευση των *S. pyogenes* και *S. agalactiae* σε μια πενταπλή τεχνική. Η πενταπλή τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση στελεχών *S. pyogenes* και *S. agalactiae* και ταυτόχρονα το χαρακτηρισμό τους ως ανθεκτικά στα MLS_B αντιβιοτικά. Όμως, καθώς διαπιστώθηκε είναι δύσκολο να εφαρμοστεί απευθείας σε δείγματα του αναπνευστικού συστήματος, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις μικτής λοίμωξης ή σε περιπτώσεις λανθασμένης λήψης του δείγματος (επιμολύνσεις από τη φυσιολογική χλωρίδα). Στις περιπτώσεις αυτές, είναι απαραίτητες οι κλασικές μέθοδοι καλλιέργειών καθώς και η διερεύνηση της αντοχής με τη μέθοδο της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (MIC, E-test).

Συμπερασματικά, στην παρούσα διατριβή αποκαλύπτονται τα «δυνατά» και τα «αδύνατα» σημεία της PCR ως διαγνωστικής μεθόδου στον τομέα της Μικροβιολογίας, τα οποία μας οδηγούν σε μια πολύ προσεκτική και κατά περίπτωση χρήση της εκάστοτε μεθοδολογίας (μοριακής ή κλασικής) προκειμένου τα αποτελέσματα να είναι πάντα αξιόπιστα..

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας (ΕΚΑΜ), που ανήκει στον Τομέα Δημόσιας και Διοικητικής Υγιεινής της Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας (ΕΣΔΥ) σε συνεργασία με το εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, από το 2006 ως το 2009.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Παναγιώτη Μαρκουλάτο και επιβλέποντα της διδακτορικής διατριβής, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την ανάληψη του θέματος έως και την ολοκλήρωση της διατριβής. Προπάντων, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την καθοδήγηση και την ουσιαστική ηθική συμπαράσταση και κατανόηση από τα φοιτητικά μου χρόνια έως και σήμερα, αποτελώντας πάντα πρότυπο όχι μόνο καθηγητή αλλά και ανθρώπου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της Συμβουλευτικής Επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Ζήση Μαμούρη και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Σταματίνα Λεβειδιώτου-Στεφάνου για το ενδιαφέρον και τις χρήσιμες υποδείξεις τους.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής, τους Επίκουρους Καθηγητές κ. Γ. Βρυώνη και κ. Σ. Πουρνάρα και τους Λέκτορες κ. Κ. Γκαρτζονίκα και κ. Δ. Μόσιαλο για τις παρατηρήσεις και τις χρήσιμες υποδείξεις τους.

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην Καθηγήτρια του Τομέα Δημόσιας και Διοικητικής Υγιεινής, κα Τζένη Κουρέα-Κρεμαστινού, που με τίμησε με την αποδοχή της συνεργασίας μου με τον Τομέα Δημόσιας και Διοικητικής Υγιεινής και το ΕΚΑΜ. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Τζωρτζίνα Τζανακάκη, Επιστημονική Υπεύθυνη του ΕΚΑΜ, για τη στενή επιτήρηση, στήριξη και καθοδήγηση καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής, καθώς και τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις της.

Ευχαριστώ όλο το προσωπικό και τους συνεργάτες του ΕΚΑΜ για τη συνεργασία, και προπάντων τους φίλους και συναδέλφους Δρ. Κωνσταντίνο Κεσανόπουλο και Δρ. Ζαχαρούλα Κυριακοπούλου, η εμπειρία των οποίων αποδείχθηκε πολύτιμος σύμβουλος. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα, τις Ιατρούς Μικροβιολόγους, Δρ. Φανή Μάρκου (Γ.Ν. Σερρών), Δρ. Αντωνία Μακρή (Μικ/κό Εργαστήριο Νοσ. Παίδων Πεντέλης), Δρ. Αναστασία Πάγκαλη (Δ/τρια Μικ/κού Εργ. Νοσ. Παίδων «Αγ. Σοφία») και Δρ. Σταματίνα Λεβειδιώτου (Αναπληρώτρια

Καθηγήτρια, Μικ/κό Εργ. Παν/κού Ν. Ιωαννίνων) για την αποστολή στελεχών που αποτέλεσαν μέρος του υλικού της διατριβής, καθώς και τις Ιατρούς Μικροβιολόγους, Δρ. Αλίκη Βογιατζή (Δ/τρια Μικ/κού Εργαστηρίου Νοσ. Παίδων Πεντέλης) και Δρ. Αθηνά Αργυροπούλου (Μικ/κό Εργ. Γ.Ν. Αθηνών «Ευαγγελισμός») και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Δρ. Μαρίζα Τσολιά (Β' Παν/κή Παιδ/κή Κλινική Νοσ. Παίδων «Π. & Α. Κυριακού») για τη συλλογή, αποστολή και αξιολόγηση μέρους των κλινικών δειγμάτων που αποτέλεσαν υλικό της διατριβής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	- 1 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	- 1 -
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	- 1 -
1.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ	- 1 -
1.1.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ	- 1 -
1.1.1.1 Ορισμός.....	- 1 -
1.1.1.2 Κλινική εκδήλωση και παθογένεια	- 1 -
1.1.1.3 Μικροοργανισμοί που προκαλούν μηνιγγίτιδα.....	- 2 -
1.1.1.4 Διάγνωση	- 4 -
1.1.2 ΒΑΚΤΗΡΙΑΙΜΙΑ	- 6 -
1.1.2.1 Ορισμός.....	- 6 -
1.1.2.2 Κλινική εκδήλωση και παθογένεια	- 6 -
1.1.2.3 Διάγνωση	- 6 -
1.1.3. ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	- 8 -
1.1.3.1 Λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος	- 9 -
1.1.3.2 Λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος.....	- 10 -
1.2 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ ΚΑΙ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	- 12 -
1.2.1 <i>Haemophilus influenzae</i>	- 12 -
1.2.1.1 Δομή και γενικά χαρακτηριστικά	- 12 -
1.2.1.2 Ταξινόμηση.....	- 13 -
1.2.1.3 Παθογένεια-Επιδημιολογία	- 13 -
1.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Ψευδομονάδα πνοκυανική)	- 15 -
1.2.2.1 Δομή και γενικά χαρακτηριστικά.....	- 15 -
1.2.2.2 Παθογένεια- Επιδημιολογία	- 17 -
1.2.3 <i>Staphylococcus aureus</i> ή Σταφυλόκοκκος χρυσίζων	- 19 -
1.2.3.1 Δομή και γενικά χαρακτηριστικά.....	- 19 -
1.2.3.2 Παθογένεια	- 19 -
1.2.4 <i>Streptococcus</i> spp.	- 22 -
1.2.4.1 Δομή και γενικά χαρακτηριστικά-Ταξινόμηση	- 22 -
1.2.4.2 Παθογένεια	- 23 -
1.2.5 <i>Streptococcus pneumoniae</i> (Πνευμονιόκοκκος)	- 24 -
1.2.5.1 Δομή και γενικά χαρακτηριστικά.....	- 24 -
1.2.5.2 Ταξινόμηση.....	- 24 -
1.2.5.3 Παθογένεια- Επιδημιολογία	- 26 -
1.2.5.4 Πρόληψη-Εμβόλια	- 27 -
1.2.6 <i>Streptococcus pyogenes</i> (Group A <i>Streptococcus</i>)	- 28 -
1.2.6.1 Δομή και γενικά χαρακτηριστικά.....	- 28 -
1.2.6.2 Ταξινόμηση.....	- 28 -
1.2.6.3 Παθογένεια και επιδημιολογία.....	- 28 -
1.2.7 <i>Streptococcus agalactiae</i> (Group B <i>Streptococcus</i>)	- 29 -
1.2.7.1 Δομή και γενικά χαρακτηριστικά.....	- 29 -
1.2.7.2 Παθογένεια	- 32 -
1.3 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΠΟΥ ΧΟΡΗΓΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΑΠΟ ΣΤΡΕΠΤΟΚΟΚΚΟΥΣ- ΜΑΚΡΟΛΙΔΕΣ, ΛΙΝΚΟΣΑΜΙΔΕΣ ΚΑΙ ΣΤΡΕΠΤΟΓΡΑΜΙΝΕΣ- ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΟΧΗΣ	- 33 -
1.3.1 ΜΑΚΡΟΛΙΔΕΣ	- 33 -
1.3.2 ΛΙΝΚΟΣΑΜΙΔΕΣ	- 34 -
1.3.3 ΣΤΡΕΠΤΟΓΡΑΜΙΝΕΣ	- 34 -
1.3.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ	- 35 -
1.3.5 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ	- 35 -
1.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ ΚΑΙ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	- 38 -
1.4.1 ΚΛΑΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	- 38 -
1.4.1.1 Μέθοδοι ταυτοποίησης του <i>H. influenzae</i>	- 39 -
1.4.1.2 Μέθοδοι ταυτοποίησης της <i>P. aeruginosa</i>	- 40 -

1.4.1.3 Μέθοδοι ταυτοποίησης του <i>S. aureus</i>	41 -
1.4.1.4 Μέθοδοι ταυτοποίησης των στρεπτοκόκκων	42 -
1.4.2 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ: ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR)	44 -
1.4.2.1 Η PCR ως μέθοδος ανίχνευσης και ταυτοποίησης μικροοργανισμών.....	44 -
1.4.2.2 Παραλλαγές της PCR	44 -
1.4.2.3 Η PCR στη διάγνωση βακτηριακής μηνιγγίτιδας/ βακτηριαμίας.....	46 -
1.4.2.4 Η PCR στη διάγνωση λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος.....	47 -
1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	49 -
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	50 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	50 -
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	50 -
2.1 ΥΛΙΚΑ	50 -
2.1.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	50 -
2.1.2 ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	53 -
2.1.2.1 Κλινικά δείγματα ασθενών με μηνιγγίτιδα ή/και βακτηριαιμία.....	53 -
2.1.2.2 Κλινικά δείγματα ασθενών με λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος ...	55 -
2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	56 -
2.2.1 ΚΑΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	56 -
2.2.2 ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	57 -
2.2.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΡΕΠΤΟΚΟΚΚΩΝ ΣΤΗΝ ΕΡΥΘΡΟΜΥΚΙΝΗ.....	58 -
2.2.3.1 Μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) - (E-Test)	58 -
2.2.3.2 Μέθοδος διάχυσης δίσκων (Kirby-Bauer).....	58 -
2.2.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ (DNA).....	60 -
2.2.4.1 Μέθοδος απομόνωσης γενετικού υλικού από βακτηριακό στέλεχος.....	60 -
2.2.4.2 Μέθοδος απομόνωσης γενετικού υλικού από ολικό αίμα.....	60 -
2.2.4.3 Μέθοδος απομόνωσης γενετικού υλικού από ENY και πλευριτικό υγρό.....	61 -
2.2.4.4 Μέθοδος απομόνωσης γενετικού υλικού από αιμοκαλλιέργεια.....	62 -
2.2.4.5 Μέθοδος απομόνωσης γενετικού υλικού από πτύελα, BAL και βρογχικές εκκρίσεις.....	63 -
2.2.5 ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΙ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ (PRIMERS)- ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	64 -
2.2.5.1 Επιλογή και σχεδιασμός εκκινητικών μορίων.....	64 -
2.2.5.2 Έλεγχος εκκινητικών μορίων- <i>in silico</i> PCR.....	64 -
2.2.5.3 Ανάπτυξη τεχνικών πολλαπλής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (multiplex PCR)	65 -
2.2.6 ΠΟΛΛΑΠΛΗ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> ΚΑΙ <i>Streptococcus spp.</i>	66 -
2.2.6.1 Υλικά.....	66 -
2.2.6.2 Πειραματικά στάδια ανάπτυξης της τεχνικής.....	68 -
2.2.6.3 Εφαρμογή σε κλινικά δείγματα.....	74 -
2.2.6.4 Ειδικότητα και ευαισθησία.....	74 -
2.2.6.5 Ανάγνωση αποτελεσμάτων.....	75 -
2.2.7 ΠΟΛΛΑΠΛΗ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ <i>Streptococcus pyogenes</i> (GROUP A <i>Streptococcus</i>) ΚΑΙ <i>Streptococcus agalactiae</i> (GROUP B <i>Streptococcus</i>)	76 -
2.2.7.1 Υλικά.....	76 -
2.2.7.2 Πειραματικά στάδια ανάπτυξης της τεχνικής.....	78 -
2.2.7.3 Εφαρμογή σε κλινικά δείγματα.....	81 -
2.2.7.4 Ειδικότητα και ευαισθησία.....	81 -
2.2.7.5 Ανάγνωση αποτελεσμάτων.....	81 -
2.2.8 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ...	82 -

2.2.9 ΠΟΛΛΑΠΛΗ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΙΣ ΜΑΚΡΟΛΙΔΕΣ-ΛΙΝΚΟΣΑΜΙΔΕΣ-ΣΤΡΕΠΤΟΓΡΑΜΜΙΝΗ Β ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΗ ΣΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ - ΣΥΓΧΩΝΕΥΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ <i>S.pyogenes</i> ΚΑΙ <i>S.agalactiae</i>	- 83 -
2.2.9.1 Υλικά.....	- 83 -
2.2.9.3 Εφαρμογή σε κλινικά δείγματα.....	- 88 -
2.2.9.4 Ειδικότητα.....	- 88 -
2.2.9.5 Ανάγνωση αποτελεσμάτων.....	- 88 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	- 89 -
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	- 89 -
3.1 ΠΟΛΛΑΠΛΗ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ <i>H. influenzae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> και <i>Streptococcus spp.</i> ...	- 89 -
3.1.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ.....	- 89 -
3.1.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	- 101 -
3.1.2.1 Κλινικά δείγματα ασθενών με βακτηριακή μηνιγγίτιδα ή βακτηριαιμία.-	101 -
3.1.2.2 Κλινικά δείγματα ασθενών με λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος ...	104 -
3.1.3 ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ.....	- 107 -
3.2 ΠΟΛΛΑΠΛΗ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ <i>Streptococcus pyogenes</i> (Group A <i>Streptococcus</i>) ΚΑΙ <i>Streptococcus agalactiae</i> (Group B <i>Streptococcus</i>).....	- 108 -
3.2.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΤΑΔΙΩΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ.....	- 108 -
3.2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	- 116 -
3.2.2.1 Κλινικά δείγματα ασθενών με βακτηριακή μηνιγγίτιδα ή βακτηριαιμία-	116 -
3.2.2.2 Κλινικά δείγματα ασθενών με λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος ...	118 -
3.2.3 ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ.....	- 119 -
3.2.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ..	- 120 -
3.3 ΠΟΛΛΑΠΛΗ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΙΣ ΜΑΚΡΟΛΙΔΕΣ-ΛΙΝΚΟΣΑΜΙΔΕΣ-ΣΤΡΕΠΤΟΓΡΑΜΜΙΝΗ Β ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΗ ΣΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ- ΣΥΓΧΩΝΕΥΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ <i>S.pyogenes</i> ΚΑΙ <i>S.agalactiae</i>	- 122 -
3.3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΩΝ E-test ΚΑΙ D-test.....	- 122 -
3.3.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ.....	- 123 -
3.3.3 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	- 129 -
3.3.4 ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ.....	- 131 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	- 132 -
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	- 132 -
ΠΟΛΛΑΠΛΗ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ <i>H. influenzae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> και <i>Streptococcus spp.</i> ...	- 132 -
Πειραματικά στάδια ανάπτυξης της τεχνικής.....	- 133 -
Εφαρμογή σε κλινικά δείγματα ασθενών με μηνιγγίτιδα/βακτηριαιμία.....	- 136 -
Ειδικότητα και ευαισθησία.....	- 139 -
ΠΟΛΛΑΠΛΗ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ <i>Streptococcus pyogenes</i> (GROUP A <i>Streptococcus</i>) ΚΑΙ <i>Streptococcus agalactiae</i> (GROUP B <i>Streptococcus</i>).....	- 140 -
Πειραματικά στάδια ανάπτυξης της τεχνικής.....	- 140 -
Εφαρμογή σε κλινικά δείγματα.....	- 140 -
Ταυτοποίηση δειγμάτων αναπνευστικού συστήματος.....	- 141 -
ΠΟΛΛΑΠΛΗ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΙΣ ΜΑΚΡΟΛΙΔΕΣ – ΛΙΝΚΟΣΑΜΙΔΕΣ -ΣΤΡΕΠΤΟΓΡΑΜΜΙΝΗ Β, ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΗ ΣΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ-	

ΣΥΓΧΩΝΕΥΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ <i>S.pyogenes</i> ΚΑΙ <i>S.agalactiae</i>	- 144 -
Πειραματικά στάδια ανάπτυξης της τεχνικής	- 144 -
Εφαρμογή σε βακτηριακά στελέχη	- 144 -
Εφαρμογή σε κλινικά δείγματα	- 147 -
ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	- 149 -
ABSTRACT	- 151 -
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	- 153 -
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	- 164 -

ΕΙΚΟΝΕΣ

ΕΙΚΟΝΑ 1. <i>HAEMOPHILUS INFLUENZAE</i>	12 -
ΕΙΚΟΝΑ 2. <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	15 -
ΕΙΚΟΝΑ 3. ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ <i>P.AERUGINOSA</i>	18 -
ΕΙΚΟΝΑ 4. <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	19 -
ΕΙΚΟΝΑ 5. ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	21 -
ΕΙΚΟΝΑ 6.ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΣΤΡΕΠΤΟΚΟΚΚΩΝ ΣΕ ΑΙΜΑΤΟΥΧΑ ΤΡΙΒΛΙΑ ΟΠΟΥ ΠΑΡΑΤΗΡΕΙΤΑΙ.....	22 -
ΕΙΚΟΝΑ 7. <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	24 -
ΕΙΚΟΝΑ 8. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ <i>S. PNEUMONIAE</i> ΣΕ ΑΙΜΑΤΟΥΧΟ ΑΓΑΡ.	24 -
ΕΙΚΟΝΑ 9. <i>STREPTOCOCCUS PYOGENES</i>	28 -
ΕΙΚΟΝΑ 10. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ <i>S. PYOGENES</i> ΣΕ ΑΙΜΑΤΟΥΧΟ ΑΓΑΡ. Ο ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΣΧΗΜΑΤΙΖΕΙ ΜΙΚΡΕΣ ΑΣΠΡΕΣ-ΓΚΡΙ ΑΠΟΙΚΙΕΣ. ΓΥΡΩ ΑΠΟ ΤΙΣ ΑΠΟΙΚΙΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΕΙΤΑΙ ΔΙΑΦΑΝΗΣ ΖΩΝΗ Β-ΑΙΜΟΛΥΣΗΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙΤΑΙ ΑΠΟ ΤΙΣ ΣΤΡΕΠΤΟΛΥΣΙΝΕΣ.	28 -
ΕΙΚΟΝΑ 11. <i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i>	29 -
ΕΙΚΟΝΑ 12. ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΕΡΥΘΡΟΜΥΚΙΝΗΣ. ΜΕ ΚΟΚΚΙΝΟ Ο 14ΜΕΡΗΣ ΛΑΚΤΟΝΙΚΟΣ ΔΑΚΤΥΛΙΟΣ, ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΟ ΤΩΝ ΜΑΚΡΟΛΙΔΩΝ.	33 -
ΕΙΚΟΝΑ 13. ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΚΛΙΝΔΑΜΥΚΙΝΗΣ.....	34 -
ΕΙΚΟΝΑ 14. ΘΕΤΙΚΟ D-TEST. ΑΡΙΣΤΕΡΑ ΕΙΝΑΙ ΤΟΠΟΘΕΤΗΜΕΝΟΣ Ο ΔΙΣΚΟΣ ΕΡΥΘΡΟΜΥΚΙΝΗΣ, ΣΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ ΕΙΝΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟ. ΔΕΞΙΑ, Η ΖΩΝΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΛΙΝΤΑΜΥΚΙΝΗ ΠΑΡΑΜΟΡΦΩΝΕΤΑΙ ΣΕ ΕΥΘΕΙΑ, ΛΟΓΩ ΤΗΣ ΓΕΙΤΝΙΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΕΡΥΘΡΟΜΥΚΙΝΗ ΠΟΥ ΕΠΑΓΕΙ ΤΗΝ ΑΝΤΟΧΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΤΑΜΥΚΙΝΗ.....	37 -
ΕΙΚΟΝΑ 15. ΑΡΙ ΤΕΣΤ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ GRAM ΑΡΝΗΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ.....	39 -
ΕΙΚΟΝΑ 16. ΑΠΟΙΚΙΕΣ <i>P.AERUGINOSA</i> ΣΕ ΤΡΙΒΛΙΟ ΜΕ MACCONKEY ΑΓΑΡ.	40 -
ΕΙΚΟΝΑ 17. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ <i>S.AUREUS</i> ΚΑΙ <i>S.EPIDERMIDIS</i> ΣΕ ΑΓΑΡ ΜΑΝΝΙΤΟΛΗΣ. ΑΡΙΣΤΕΡΑ Η ΑΝΑΠΤΥΧΗ ΤΟΥ <i>S.AUREUS</i> ΕΠΕΦΕΡΕ ΑΛΛΑΓΗ ΤΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΜΕΣΟΥ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΑΠΟ ΡΟΖ ΣΕ ΚΙΤΡΙΝΟ.- 41 -	41 -
ΕΙΚΟΝΑ 18. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ ΤΩΝ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΟΥΣ Α) <i>S.AUREUS</i> Β) <i>STREPTOCOCCUS</i> SPP. Γ) <i>P. AERUGINOSA</i> Δ) <i>H.INFLUENZAE</i>	89 -
ΕΙΚΟΝΑ 19.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ 2 (ΠΙΝΑΚΑΣ 7, ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2).....	91 -
ΕΙΚΟΝΑ 20. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥ ΜΙΓΜΑΤΟΣ ΜΕ ΙΣΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ.....	91 -
ΕΙΚΟΝΑ 21. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ 3 (ΠΙΝΑΚΑΣ 8, ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2) ΣΤΗΝ ΤΕΤΡΑΠΛΗ PCR.	92 -
ΕΙΚΟΝΑ 22. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ 3 ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ.	94 -
ΕΙΚΟΝΑ 23. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ 3 ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ENY.....	95 -
ΕΙΚΟΝΑ 24.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΑΛΛΑΓΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ MgCl2.	96 -
ΕΙΚΟΝΑ 25.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ 4 (ΠΙΝΑΚΑΣ 9, ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2) ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ.....	97 -
ΕΙΚΟΝΑ 26. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ 4 (ΠΙΝΑΚΑΣ 9, ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2) ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ, ENY ΚΑΙ ΩΤΙΚΩΝ ΕΚΚΡΙΜΑΤΩΝ.	98 -
ΕΙΚΟΝΑ 27.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥ ΤΕΛΙΚΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΤΕΤΡΑΠΛΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ (ΠΙΝΑΚΑΣ 10, ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2) ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.	99 -
ΕΙΚΟΝΑ 28. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΜΕ ΔΟΚΙΜΗ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΜΕΤΡΗΜΕΝΗ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ.	100 -
ΕΙΚΟΝΑ 29.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ 1 (ΠΙΝΑΚΑΣ 13, ΚΕΦ. 2) ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ 52°C ΓΙΑ ΤΟΥΣ <i>S. PYOGENES</i> (ΔΙΑΔΡΟΜΗ 1, ΠΡΟΪΟΝ 314BP) ΚΑΙ <i>S.</i> <i>AGALACTIAE</i> (ΔΙΑΔΡΟΜΗ 2, ΠΡΟΪΟΝ 259BP).	108 -
ΕΙΚΟΝΑ 30.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ 1 (ΠΙΝΑΚΑΣ 13, ΚΕΦ. 2) ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ 49°C ΓΙΑ ΤΟ <i>S. AGALACTIAE</i> ΚΑΙ ΤΟ <i>S. PYOGENES</i>	109 -
ΕΙΚΟΝΑ 31. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ 1 (ΠΙΝΑΚΑΣ 13, ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2) ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ 49°C ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΠΛΗ PCR.	110 -
ΕΙΚΟΝΑ 32. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ 2 (ΠΙΝΑΚΑΣ 14, ΚΕΦ. ΑΛΛΑΙΟ 2) ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΠΛΗ PCR.	110 -
ΕΙΚΟΝΑ 33.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΗΣ PCR ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΣΤΡΕΠΤΟΚΟΚΚΩΝ.	112 -

ΕΙΚΟΝΑ 34. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ 2 ΤΗΣ ΔΙΠΛΗΣ PCR ΑΠΕΥΘΕΙΑΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ.....	- 113 -
ΕΙΚΟΝΑ 35. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΣΤΟ PCR MIX.	- 114 -
ΕΙΚΟΝΑ 36. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΕΝΥ ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΚΑΙ ΘΕΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>S. AGALACTIAE</i>	- 114 -
ΕΙΚΟΝΑ 37. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΩΤΙΚΩΝ ΕΚΚΡΙΜΑΤΩΝ ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΚΑΙ ΘΕΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>S. RYOGENES</i>	- 115 -
ΕΙΚΟΝΑ 38. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΟΚΙΜΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΣΕ ΧΑΜΗΛΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ.	- 115 -
ΕΙΚΟΝΑ 39. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΗΣ PCR ΣΕ ΣΤΕΛΕΧΗ <i>S. PNEUMONIAE</i> ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΗΝ ΕΡΥΘΡΟΜΥΚΙΝΗ, ΣΤΑ ΟΠΟΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΕ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ <i>MEF</i> (ΠΡΟΪΟΝ 360BP).	- 123 -
ΕΙΚΟΝΑ 40. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΗΣ PCR ΣΕ ΣΤΕΛΕΧΗ <i>S. RYOGENES</i> ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΗΝ ΕΡΥΘΡΟΜΥΚΙΝΗ, ΣΤΑ ΟΠΟΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΕ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ <i>ERM B</i> (ΠΡΟΪΟΝ 211BP).	- 124 -
ΕΙΚΟΝΑ 41. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΗΣ PCR ΣΕ ΣΤΕΛΕΧΗ <i>S. RYOGENES</i> ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΗΝ ΕΡΥΘΡΟΜΥΚΙΝΗ ΣΤΑ ΟΠΟΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΕ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ <i>ERM TR</i> (ΠΡΟΪΟΝ 459BP).	- 124 -
ΕΙΚΟΝΑ 42. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ 1 (ΠΙΝΑΚΑΣ 19, ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2) ΣΕ PCR MIX ΜΕ ΙΣΕΣ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ.....	- 125 -
ΕΙΚΟΝΑ 43. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΤΡΙΠΛΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ PCR ΜΕ ΤΙΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΤΟΥ ΠΙΝΑΚΑ 20 (ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2).	- 125 -
ΕΙΚΟΝΑ 44. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ 3 (ΠΙΝΑΚΑΣ 21) ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΝΤΑΠΛΗ ΤΕΧΝΙΚΗ.	- 126 -
ΕΙΚΟΝΑ 45. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΠΕΝΤΑΠΛΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ. .-	- 127 -

ΠΙΝΑΚΕΣ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΙΣ 2 MULTIPLEX PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ <i>H. INFLUENZAE</i> , <i>S. AUREUS</i> , <i>P. AERUGINOSA</i> , <i>STREPTOCOCCUS</i> SPP. ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ <i>S. PYOGENES</i> ΚΑΙ <i>S. AGALACTIAE</i>	51 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 2. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΤΡΙΠΛΗ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΣΔΙΔΟΥΝ ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΙΣ ΜΑΚΡΟΛΙΔΕΣ-ΛΙΝΚΟΣΑΜΙΔΕΣ-ΣΤΡΕΠΤΟΓΡΑΜΜΙΝΗ Β.....	52 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 3. ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΚΑΙ ΙΟΓΕΝΟΥΣ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ ΑΝΑ ΕΤΟΣ.	54 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 4. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΠΟΥ ΔΟΚΙΜΑΣΤΗΚΑΝ ΚΑΙ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ <i>H. INFLUENZAE</i> , <i>S. AUREUS</i> , <i>P. AERUGINOSA</i> , <i>STREPTOCOCCUS</i> SPP.	66 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 5. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ PCR ΚΑΙ ΘΕΡΜΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΠΟΙΗΤΗΣ.....	67 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 6. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΤΗΣ ΚΑΘΕ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΡΧΙΚΗ ΔΟΚΙΜΗ ΤΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ (ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ 1).....	68 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 7. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΤΗΣ ΚΑΘΕ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ PCR ΟΠΩΣ ΔΙΑΜΟΡΦΩΘΗΚΑΝ ΜΕ ΤΑ ΝΕΑ ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ (ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ 2).	69 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 8. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ PCR (ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ 3).	70 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 9. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ PCR ΟΠΩΣ ΔΙΑΜΟΡΦΩΘΗΚΑΝ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ (ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ 4).	72 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 10. ΤΕΛΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ PCR (ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ 5).	73 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 11. ΒΑΣΕΙ ΤΟΥ ΠΑΡΑΚΑΤΩ ΠΙΝΑΚΑ ΠΟΥ ΕΜΦΑΝΙΖΕΤΑΙ ΣΤΟ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ 2-way CONTINGENCY TABLE ANALYSIS ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗΚΑΝ Η ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ Η ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ.	75 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 12. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ <i>S. PYOGENES</i> ΚΑΙ <i>S. AGALACTIAE</i>	76 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 13. ΑΡΧΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΔΙΠΛΗΣ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ <i>S. PYOGENES</i> , <i>S. AGALACTIAE</i> (ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ 1).	78 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 14. ΑΡΧΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΔΙΠΛΗΣ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ <i>S. PYOGENES</i> , <i>S. AGALACTIAE</i> (ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ 2).	79 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 15. ΤΕΛΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΗΣ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ <i>S. PYOGENES</i> , <i>S. AGALACTIAE</i> (ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ 3).	80 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 16. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ <i>N. MENINGITIDIS</i> , <i>S. PNEUMONIAE</i> , <i>H. INFLUENZAE TYPE B</i> ΚΑΙ ΘΕΡΜΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΠΟΙΗΤΗΣ (ΤΖΑΝΑΚΑΚΙ <i>ET AL.</i> 2005).	82 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 17. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ <i>N. MENINGITIDIS</i> , <i>S. PNEUMONIAE</i> , <i>H. INFLUENZAE TYPE B</i> (ΤΖΑΝΑΚΑΚΙ <i>ET AL.</i> 2005).	82 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 18. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΕ ΜΑΚΡΟΛΙΔΕΣ-ΛΙΝΚΟΣΑΜΙΔΕΣ-ΣΤΡΕΠΤΟΓΡΑΜΜΙΝΗ Β.	83 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 19. ΑΡΧΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΤΡΙΠΛΗΣ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΣΔΙΔΟΥΝ ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ ΜΑΚΡΟΛΙΔΕΣ-ΛΙΝΚΟΣΑΜΙΔΕΣ-ΣΤΡΕΠΤΟΓΡΑΜΜΙΝΗ Β (ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ 1).	85 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 20. ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΤΡΙΠΛΗΣ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΙΣ ΜΑΚΡΟΛΙΔΕΣ-ΛΙΝΚΟΣΑΜΙΔΕΣ-ΣΤΡΕΠΤΟΓΡΑΜΜΙΝΗ Β (ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ 2).	86 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 21. ΤΕΛΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΠΕΝΤΑΠΛΗΣ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΙΣ ΜΑΚΡΟΛΙΔΕΣ-ΛΙΝΚΟΣΑΜΙΔΕΣ-ΣΤΡΕΠΤΟΓΡΑΜΜΙΝΗ Β ΚΑΙ ΤΩΝ <i>S. PYOGENES</i> ΚΑΙ <i>S. AGALACTIAE</i> (ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ 3).	87 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 22. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ 3 ΤΗΣ ΤΕΤΡΑΠΛΗΣ PCR ΜΕ ΤΟ ΝΕΟ ΖΕΥΓΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ <i>H. INFLUENZAE</i>	93 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 23. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ 3 ΤΗΣ ΤΕΤΡΑΠΛΗΣ PCR ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΥ ΑΝΗΚΑΝ ΣΕ ΑΛΛΑ ΓΕΝΗ Η ΕΙΔΗ.	94 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 24. ΑΡΙΘΜΟΣ ΤΩΝ ΠΙΘΑΝΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΜΕΝΩΝ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ/ΒΑΚΤΗΡΙΑΙΜΙΑΣ ΑΝΑ ΕΤΟΣ.	101 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 25. ΑΡΙΘΜΟΣ ΤΩΝ ΘΕΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ Η/ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΑΙΜΙΑΣ ΑΝΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟ ΚΑΙ ΕΤΟΣ.	102 -

ΠΙΝΑΚΑΣ 26. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ PCR ΣΤΑ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΑ ΙΟΓΕΝΟΥΣ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ. -	102 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 27. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ PCR ΑΝΑ ΟΜΑΔΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ .	103 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 28. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ PCR ΑΝΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΕ ΚΑΙ ΑΝΑ ΔΕΙΓΜΑ ΓΙΑ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΠΡΟΕΡΧΟΝΤΑΝ ΑΠΟ ΠΑΙΔΙΑ.	104 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 29. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ PCR ΑΝΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΕ ΚΑΙ ΑΝΑ ΔΕΙΓΜΑ ΓΙΑ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΥ ΠΡΟΕΡΧΟΝΤΑΝ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΕΝΗΛΙΚΕΣ.	105 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 30. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ PCR ΑΝΑ ΟΜΑΔΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.	106 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 31. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ PCR ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΟ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ 2-WAY CONTINGENCY TABLE ANALYSIS.	107 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 32. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΗΣ PCR ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΣΤΡΕΠΤΟΚΟΚΚΩΝ.	111 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 33. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΗΣ PCR ΣΕ ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΥ ΑΝΗΚΟΥΝ ΣΕ ΑΛΛΑ ΓΕΝΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ.	111 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 34. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΔΙΠΛΗΣ PCR ΑΝΑ ΟΜΑΔΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.	117 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 35. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΔΙΠΛΗΣ PCR ΑΝΑ ΟΜΑΔΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.	118 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 36. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ PCR ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΟ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ 2-WAY CONTINGENCY TABLE ANALYSIS.	119 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 37. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ PCR ΓΙΑ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΑΝΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΕ ΓΙΑ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΩΝ ΠΑΙΔΙΩΝ.	120 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 38. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ PCR ΓΙΑ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΑΝΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΕ ΓΙΑ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΩΝ ΕΝΗΛΙΚΩΝ. -	121 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 39. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΩΝ E-TEST ΚΑΙ D-TEST.	122 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 40. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΠΕΝΤΑΠΛΗΣ PCR ΓΙΑ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΣΤΡΕΠΤΟΚΟΚΚΩΝ ΟΜΑΔΑΣ Α (<i>S. PYOGENES</i>) ΚΑΙ Β (<i>S. AGALACTIAE</i>).	127 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 41. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΠΕΝΤΑΠΛΗΣ PCR ΓΙΑ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΠΡΟΣΔΙΔΟΥΝ ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ ΜΑΚΡΟΛΙΔΕΣ-ΛΙΝΚΟΣΑΜΙΔΕΣ-ΣΤΡΕΠΤΟΓΡΑΜΜΙΝΗ Β ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ. -	128 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 42. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΘΕΤΙΚΑ ΓΙΑ <i>STREPTOCOCCUS</i> SPP., <i>S. PYOGENES</i> ΚΑΙ <i>S. PNEUMONIAE</i> ΣΤΑ ΟΠΟΙΑ ΕΦΑΡΜΟΣΘΗΚΕ Η ΠΕΝΤΑΠΛΗ ΤΕΧΝΙΚΗ.	129 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 43. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΠΕΝΤΑΠΛΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΠΑΙΔΙΑ (N=139).	130 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 44. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΤΗΣ ΠΕΝΤΑΠΛΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΕΝΗΛΙΚΕΣ (N=27).....	130 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 45. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ E-TEST ΚΑΙ PCR.	131 -

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

1.1.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ

1.1.1.1 Ορισμός

Μηνιγγίτιδα ορίζεται η λοίμωξη των μηνίγγων, δηλαδή των μεμβρανών που καλύπτουν τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό. Η λοίμωξη οφείλεται συνήθως σε ιούς ή βακτήρια (ιογενής ή βακτηριακή μηνιγγίτιδα), ενώ σπανιότερα εμπλέκονται άλλοι οργανισμοί, όπως μύκητες και πρωτόζωα (Kwang 2010).

1.1.1.2 Κλινική εκδήλωση και παθογένεια

Η βακτηριακή μηνιγγίτιδα είναι σπανιότερη από την ιογενή, είναι όμως σοβαρότερης μορφής και πολλές φορές μπορεί να εξελιχθεί μοιραία αν δε θεραπευτεί άμεσα και με τα κατάλληλα αντιβιοτικά. Η κλινική εκδήλωση της νόσου χαρακτηρίζεται από έντονη κεφαλαλγία, πυρετό, ναυτία, έμετο, φωτοφοβία και δυσκαμψία του αυχένα. Συγχρόνως είναι δυνατό να αναγνωριστούν νευρολογικά συμπτώματα που περιλαμβάνουν λήθαργο, παραλήρημα, κώμα και σπασμούς. Ιδιαίτερα στα παιδιά, ο θάνατος μπορεί να προκληθεί μέσα σε λίγες ώρες, ενώ ένα μεγάλο ποσοστό των παιδιών που επιζούν παρουσιάζουν διανοητική ή σωματική αναπηρία (Kwang 2010).

Οι μικροοργανισμοί που προκαλούν τη λοίμωξη σχετίζονται συνήθως με άλλες πιο ήπιες λοιμώξεις. Για παράδειγμα, μια λοίμωξη του δέρματος, του γαστρεντερικού, του ουροποιητικού και συχνότερα του αναπνευστικού συστήματος μπορεί να εξελιχθεί σε μηνιγγίτιδα μέσω της διασποράς των βακτηρίων στην κυκλοφορία του αίματος (βακτηραιμία) και έπειτα στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) διαμέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Σε άλλες περιπτώσεις λοιμώξεων, κυρίως σε

περιοχές που βρίσκονται κοντά στο ΚΝΣ, όπως η ρινική κοιλότητα και τα αυτιά, τα βακτήρια περνούν και μολύνουν απευθείας τις μήνιγγες. Τέλος, μηνιγγίτιδα μπορεί να προκληθεί ύστερα από τραυματισμό ή εγχείρηση στο ΚΝΣ (Kwang 2010).

Η βακτηριακή μηνιγγίτιδα προσβάλλει άτομα όλων των ηλικιών, κυρίως όμως αυτά με μειωμένη άμυνα του ανοσοποιητικού συστήματος όπως βρέφη, παιδιά και ηλικιωμένους. Η μειωμένη άμυνα του ανοσοποιητικού είναι ο λόγος που εμφανίζονται επιρρεπείς στη λοίμωξη μετεγχειρητικοί ή ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς. Η ταχεία διασπορά των βακτηρίων μέσω της στενής καθημερινής επαφής ατόμων που συγχρωτίζονται, διευκολύνει την εμφάνιση της νόσου και την ομαδική προσβολή ατόμων σε σχολεία, παιδικούς σταθμούς και στρατόπεδα (Mishal *et al.* 2008).

1.1.1.3 Μικροοργανισμοί που προκαλούν μηνιγγίτιδα

Αν και όλα σχεδόν τα βακτήρια έχουν απομονωθεί ως αίτια της μηνιγγίτιδας, οι περισσότερες περιπτώσεις οφείλονται σε σχετικά περιορισμένο αριθμό βακτηρίων. Το είδος του βακτηρίου-αιτίου της μηνιγγίτιδας σχετίζεται άμεσα με την ηλικία και την υποκείμενη νόσο και κατάσταση του ατόμου (Kwang 2010).

Σε παιδιά και ενήλικες, η βακτηριακή μηνιγγίτιδα προκαλείται στο μεγαλύτερο ποσοστό από τους πιο συχνά εμπλεκόμενους στη λοίμωξη μικροοργανισμούς, *Haemophilus influenzae* type b (Hib), *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*. Σύμφωνα με παλιότερες σχετικές βιβλιογραφικές αναφορές, περίπου 80% των περιπτώσεων βακτηριακής μηνιγγίτιδας παγκοσμίως οφείλονταν σε αυτούς τους μικροοργανισμούς (Peltola 2000, Koedel *et al.* 2002). Τις δύο τελευταίες δεκαετίες, η εφαρμογή του προγράμματος εμβολιασμού για τον Hib, αλλά και η εισαγωγή εμβολίων για τους *N. meningitidis* και *S. pneumoniae* διαφοροποίησαν σημαντικά τα επιδημιολογικά δεδομένα της νόσου που οφείλονται σε αυτούς τους μικροοργανισμούς (Kwang 2010, Ladhani *et al.* 2010).

Η κλινική εικόνα της μηνιγγίτιδας και οι επιπλοκές είναι χαρακτηριστικές για καθέναν από τους μικροοργανισμούς. Στην περίπτωση της μηνιγγίτιδας από *N.meningitidis* (μηνιγγιτιδοκοκκική μηνιγγίτιδα) είναι συνήθης η εμφάνιση εξανθήματος και η βακτηραιμία. Πηγή της μόλυνσης είναι συνήθως κάποιος ασυμπτωματικός φορέας και σπάνια άτομο που πάσχει από τη νόσο, μόνο αν υπάρχει στενή επαφή, όπως π.χ. στα μέλη μιας οικογένειας. Η μηνιγγιτιδοκοκκική μηνιγγίτιδα

παρουσιάζεται κυρίως στα παιδιά ηλικίας 6 μηνών ως και 2 ετών και στα νεαρά ενήλικα άτομα. Εκδηλώνεται συνήθως με σποραδικά κρούσματα, μερικές φορές όμως μπορεί να πάρει διαστάσεις επιδημίας (Ala'Aldeen 2007).

Στις περιπτώσεις μηνιγγίτιδας από *H. influenzae* και *S. pneumoniae* η νόσος είναι συνήθως δευτεροπαθής, ως αποτέλεσμα ωτίτιδας, παραρρινοκολπίτιδας ή πνευμονίας. Η κλινική εικόνα της μηνιγγίτιδας από τον *H. influenzae* δεν εμφανίζει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, είναι δυνατόν όμως κάποιοι ασθενείς να εισέλθουν σε κώμα ή να παρουσιάσουν σπασμούς. Αναπτύσσεται κυρίως σε παιδιά μέχρι και 5 ετών και προκαλεί επιπλοκές όπως νοητική καθυστέρηση, διαταραχές της ακοής, της όρασης, της κινητικότητας και της ομιλίας (Slack 2007).

Η κλινική εικόνα της μηνιγγίτιδας από *S. pneumoniae*, δε διαφέρει από αυτή των δύο παραπάνω μικροοργανισμών, οι επιπλοκές όμως που παρατηρούνται στα παιδιά είναι πολύ πιο σοβαρές (ημιπληγία, υδροκέφαλο) με συνηθέστερη και πιο ήπια τη βαρηκοΐα. Η μηνιγγίτιδα από *S. pneumoniae* παρατηρείται με μεγαλύτερη συχνότητα σε παιδιά ηλικίας κάτω των 2 ετών και σε ενήλικες ηλικίας άνω των 50ετών (Kilian 2007).

Στην Ελλάδα, σύμφωνα με τα στοιχεία του Κέντρου Αναφοράς Μηνιγγίτιδας (EKAM) της Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας (ΕΣΔΥ) κατά την περίοδο 2000-2004, το ποσοστό των κρουσμάτων βακτηριακής μηνιγγίτιδας από τους μικροοργανισμούς *H.influenzae type b* (Hib), *N.meningitidis*, *S.pneumoniae*, ανέρχεται στο 65%, ενώ ποσοστό 35% των κρουσμάτων βακτηριακής μηνιγγίτιδας οφείλονται σε άλλα γένη ή είδη βακτηρίων.

Η ανάπτυξη βακτηριαμίας και μηνιγγίτιδας είναι ιδιαίτερα υψηλή και κατά τη νεογνική περίοδο. Η νόσος αναπτύσσεται κυρίως κατά τον πρώτο μήνα της ζωής και η θνητότητα είναι πολύ μεγάλη, ενώ παρατηρούνται σοβαρές επιπλοκές στα νεογνά που επιζούν. Τα βακτήρια-αίτια της μηνιγγίτιδας προέρχονται από τη χλωρίδα του κόλπου της μητέρας ή από το περιβάλλον του μαιευτηρίου ή του σπιτιού. Η μεταφορά των μικροοργανισμών στις μήνιγγες γίνεται μετά την ανάπτυξη βακτηριαμίας. Στην ανάπτυξη της νόσου συμβάλλουν και άλλοι ανοσολογικοί παράγοντες των πρώτων μηνών της ζωής, όπως π.χ. η χαμηλή βακτηριοκτόνος δράση των ουδετερόφιλων και η μειωμένη απόκριση των λευκών αιμοσφαιρίων στους χημειοτακτικούς παράγοντες (Kwang 2010).

Στις χαρακτηριστικές εκδηλώσεις της νόσου περιλαμβάνονται ο λήθαργος, η κωφρότητα, η άρνηση θηλασμού και ο ίκτερος. Οι επιπλοκές της νόσου είναι συχνές

και αναφέρονται η νοητική καθυστέρηση, η υδροκεφαλία, η ημιπληγία και η τετραπληγία. Στη μηνιγγίτιδα των νεογνών απομονώνονται σε μεγαλύτερο ποσοστό οι μικροοργανισμοί *Escherichia coli* και *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus*) που αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου από σηψαιμία ή μηνιγγίτιδα στα βρέφη στην πρώτη εβδομάδα της ζωής τους (Kwang 2010).

Οι ανοσολογικές ανεπάρκειες και τα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα δημιουργούν ιδιαίτερα ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη λοιμώξεων από παθογόνους και ευκαιριακά παθογόνους μικροοργανισμούς.

Τα συχνότερα αίτια μηνιγγίτιδας σε αυτές τις περιπτώσεις είναι η *Pseudomonas aeruginosa*, ο *Staphylococcus aureus* και η *Listeria monocytogenes*. Η *P.aeruginosa* εμπλέκεται στη λοίμωξη συνήθως σε νοσοκομειακό παθογόνο με υψηλή αντοχή στα αντιβιοτικά, όπως παρουσιάζεται τα τελευταία χρόνια (De Vos *et al* 1997), ενώ στο 56% των προσβεβλημένων ασθενών ανέρχεται η θνησιμότητα αυτών των νόσων από *S.aureus*, σύμφωνα με σχετική δημοσιευμένη δεκαετή έρευνα (Pedersen 2006).

Τέλος, η μηνιγγίτιδα από Gram αρνητικά βακτήρια παρατηρείται κυρίως σε άτομα με τραυματισμούς στο κρανίο, μετά από νευροχειρουργικές επεμβάσεις και ως επιπλοκή βακτηριαιμίας. Σε μικρότερα ποσοστά, η λοίμωξη αναπτύσσεται σε άτομα που νοσηλεύονται για διάφορα νοσήματα, όπως σακχαρώδη διαβήτη, κίρρωση, καρκίνο και ουρολοιμώξεις, ενώ σπανιότερα είναι αποτέλεσμα χρόνιας πυώδους ωτίτιδας. Τα συνηθέστερα αίτια της μηνιγγίτιδας από Gram αρνητικά βακτήρια είναι η *E.coli* και η *P.aeruginosa* (Laguna del-Estal *et al.* 2010).

1.1.1.4 Διάγνωση

Η διάγνωση της νόσου, βασίζεται πέρα από τα κλινικά χαρακτηριστικά, στην αξιολόγηση του υγρού που περιβάλλει το ΚΝΣ, του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY). Η λήψη του ENY γίνεται με οσφουονωτιαία παρακέντηση. Στις περιπτώσεις λοίμωξης, το ENY παρουσιάζεται συνήθως θολό λόγω της παρουσίας των λευκών αιμοσφαιρίων και αξιολογείται σε θετικό για την ύπαρξη βακτηρίων σε αυτό αν: α) ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων που εντοπίζονται στο ENY είναι περισσότερα από 1000 κύτταρα/mm³ και η αναλογία πολυμορφοπύρηνα/λεμφοκύτταρα, κυμαίνεται στα ποσοστά 60/30 – 90/10, β) τα επίπεδα των πρωτεϊνών ξεπερνούν τα 0,80 g/l (φυσιολογική τιμή < 0,60 g/l), γ) τα επίπεδα της γλυκόζης να είναι μειωμένα (< 0,40 g/l) και τέλος δ) το άμεσο παρασκεύασμα, η χρώση Gram και η μικροσκοπική

εξέταση αναδείξουν κάποιο βακτήριο (Κρεμαστινού και συν. 1996, Kwang 2010). Επιπλέον, εφαρμόζονται καλλιέργειες του ΕΝΥ ή του αίματος του ασθενή, προκειμένου να ανιχνευθεί και να ταυτοποιηθεί ο παθογόνος μικροοργανισμός. Την τελευταία δεκαετία, πέρα από τις κλασσικές μεθόδους ο εντοπισμός βακτηρίων στο ΕΝΥ και η περαιτέρω ταυτοποίησή τους πραγματοποιείται ως επί το πλείστον με μοριακές τεχνικές όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) (Kwang 2010).

1.1.2 ΒΑΚΤΗΡΙΑΙΜΙΑ

1.1.2.1 Ορισμός

Το αίμα των υγιών ατόμων είναι στείρο από μικροοργανισμούς (βακτήρια, μύκητες, παράσιτα, ιούς). Με τον όρο βακτηριαίμια χαρακτηρίζεται η κατάσταση εκείνη κατά την οποία κυκλοφορούν βακτήρια στο αίμα (Lynn 2004).

1.1.2.2 Κλινική εκδήλωση και παθογένεια

Σε ορισμένες περιπτώσεις, η παρουσία βακτηρίων στο αίμα δε συνοδεύεται από κλινικά συμπτώματα και καλείται ασυμπτωματική βακτηριαίμια. Στις περισσότερες, όμως, περιπτώσεις η βακτηριαίμια συνοδεύεται από κλινικές εκδηλώσεις και αντικειμενικά ευρήματα, όπως ρίγη, πυρετό και λευκοκυττάρωση. Μπορεί ακόμα να προκαλέσει μεγάλη πτώση της πίεσης (καταπληξία-σοκ) και να οδηγήσει στο θάνατο του ασθενούς (Lynn 2004). Βακτηριαίμια διαπιστώνεται στις ακόλουθες περιπτώσεις:

- α) Ασυμπτωματική βακτηριαίμια, κατά την οποία κυκλοφορούν στο αίμα βακτήρια της φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας μετά από μικροτραυματισμό. Συνήθως είναι παροδική, υπάρχουν όμως και περιπτώσεις που οδηγούν στην πρόκληση λοιμώξεων σε άλλους ιστούς, π.χ. παροδική βακτηριαίμια από *S. aureus* κατά τη διάνοιξη δοθίνα μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη αποστήματος στα οστά ή στους νεφρούς ή παροδική βακτηριαίμια από *Streptococcus viridans* από την εξαγωγή δοντιού μπορεί να οδηγήσει στην πρόκληση ενδοκαρδίτιδας (Humphreys 2007, Kilian 2007).
- β) Βακτηριαίμια που συνοδεύει άλλη σοβαρή εντοπισμένη λοίμωξη, όπως π.χ. μηνιγγίτιδα, πνευμονία (Ala' Aldeen 2007, Kilian 2007).
- γ) Βακτηριαίμια που συνοδεύει χρόνιες λοιμώξεις
- δ) Βακτηριαίμια ως αποτέλεσμα απότομης και μαζικής εισαγωγής βακτηρίων μετά από σοβαρό τραυματισμό.

1.1.2.3 Διάγνωση

Η διάγνωση της βακτηριαίμιας επιτυγχάνεται πρωταρχικά με την καλλιέργεια αίματος. Ο μικροοργανισμός ανιχνεύεται με την εφαρμογή κλασικών μεθόδων που περιλαμβάνουν ανακαλλιέργειες, ενοφθαλμισμό σε στερεά θρεπτικά υλικά, άμεσο

παρασκεύασμα και χρώση Gram, έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά. Η ταυτοποίηση του μικροοργανισμού θεωρείται απολύτως σημαντική και απαραίτητη, προκειμένου να χορηγηθεί η κατάλληλη θεραπεία στον ασθενή για την αντιμετώπιση της βακτηριαιμίας (Lynn 2004).

Τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη ολοένα και περισσότερων τεχνικών PCR για την ταυτοποίηση μικροοργανισμών που προκαλούν συνήθως βακτηριαιμία, -όπως ο *S.pneumoniae* και ο *S.aureus*- αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για τη διάγνωση της λοίμωξης (Zhang *et al.* 1995, Palomares *et al.* 2003).

1.1.3. ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Οι λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος αποτελούν την πλειονότητα των λοιμώξεων του ανθρώπου. Ανάλογα με τον εντοπισμό του παθογόνου μικροοργανισμού, διακρίνονται σε λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος και λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος.

Η ανώτερη αναπνευστική οδός περιλαμβάνει: το λάρυγγα, το ρινοφάρυγγα και το στοματοφάρυγγα, τη ρινική κοιλότητα και τις κοιλότητες με τις οποίες επικοινωνεί η ρινική κοιλότητα, δηλαδή τους παραρρίνιους κόλπους και το μέσο ους (Clements 2004, Pelton 2004).

Η κατώτερη αναπνευστική οδός περιλαμβάνει την τραχεία, τους βρόγχους, τα βρογχιόλια και τις κυψελίδες.

Η κατώτερη αναπνευστική οδός δεν περιέχει μικροοργανισμούς κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, σε αντίθεση με την ανώτερη αναπνευστική οδό (ρινοφάρυγγα) στην οποία παρατηρείται φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα, η οποία σχετίζεται άμεσα με την πρόκληση λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού..

Σύμφωνα με σχετικές βιβλιογραφικές αναφορές (Garcia-Rodriguez *et al.* 2002), η χλωρίδα του ρινοφάρυγγα ανακτάται κατά τον πρώτο χρόνο ζωής του ανθρώπου και η σύστασή της μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ζωής. Οι μικροοργανισμοί εισβάλλουν στον αναπνευστικό σωλήνα μέσω της εισπνοής και προσκολλώνται στα επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή. Τα παιδιά στα δύο πρώτα χρόνια της ζωής τους, αποικούνται ήδη σε ποσοστό 54% από το μικροοργανισμό *S. pneumoniae* και 44% από τον *H. influenzae*.

Η φορεία του ρινοφάρυγγα αποτελεί μια σημαντική «δεξαμενή» για τη διασπορά των μικροοργανισμών και των λοιμώξεων, αφού οι μικροοργανισμοί μπορεί να αποικούν για χρόνια έναν οργανισμό χωρίς να προκαλέσουν κάποια λοίμωξη, να μεταδίδονται όμως σε άλλο οργανισμό και να γίνονται παθογόνοι. Η ισορροπία φορείας-παθογένειας εξαρτάται και από παράγοντες που έχουν σχέση με τον ξενιστή. Εξασθένηση της άμυνας του ξενιστή μπορεί να δημιουργήσει συνθήκες για το μικροοργανισμό που να οδηγήσουν τελικά στη λοίμωξη (Garcia-Rodriguez *et al.* 2002).

1.1.3.1 Λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος

Τις λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος αποτελούν κυρίως η φαρυγγοαμυγδαλίτιδα (λοίμωξη του φάρυγγα), η επιγλωττίτιδα (λοίμωξη της επιγλωττίδας), η ωτίτιδα (λοίμωξη των ωτών) και η παραρρινοκολπίτιδα (λοίμωξη των παραρρίνιων κόλπων) (Clements 2004, Pelton 2004).

1.1.3.1.1 Φαρυγγίτιδα, επιγλωττίτιδα, παραρρινοκολπίτιδα

Η φαρυγγοαμυγδαλίτιδα, η επιγλωττίτιδα και η παραρρινοκολπίτιδα αποτελούν ήπιες σχετικά λοιμώξεις. Η φαρυγγοαμυγδαλίτιδα και η επιγλωττίτιδα προκαλούνται κυρίως από τους μικροοργανισμούς *S.pyogenes* και *H.influenzae* αντίστοιχα, ενώ η παραρρινοκολπίτιδα προκαλείται επιπλέον από τους μικροοργανισμούς *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* και άλλα αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Kilian 2007).

1.1.3.1.2 Ωτίτιδα

Ωτίτιδα είναι η λοίμωξη του ωτός και προσβάλλει κατά κύριο λόγο βρέφη και παιδιά. Διακρίνεται σε εξωτερική και μέση ωτίτιδα, ανάλογα με το αν η λοίμωξη είναι στον έξω ακουστικό πόρο ή στο μέσο ους αντίστοιχα (Pelton 2004).

Η έξω ωτίτιδα προκαλείται συνήθως μέσω της διακοπής των φυσικών μηχανισμών άμυνας (επιθήλιο) από παράγοντες όπως τραυματισμούς του ιστού, αλλεργίες, απομάκρυνση του φυσικού κεριού του ωτός ή περιβαλλοντικές αλλαγές, όπως υγρασία και υψηλές θερμοκρασίες (Pelton 2004). Η μέση ωτίτιδα είναι συνήθως αποτέλεσμα λοίμωξης του ρινοφάρυγγα και εξάπλωσης αυτής μέσω της ευσταχιανής σάλπιγγας στο μέσο ους. Στις περιπτώσεις μέσης ωτίτιδας η λοίμωξη μπορεί να εξαπλωθεί στο μέσο ους ή ακόμα και στις μήνιγγες του εγκεφάλου (Pavlovcinova *et al.* 2008).

Στις περιπτώσεις έξω ωτίτιδας εμπλέκονται συνήθως μικροοργανισμοί που ανήκουν στη φυσιολογική χλωρίδα του δέρματος όπως οι *Staphylococcus aureus* και *epidermidis* και σε συνθήκες αυξημένης υγρασίας η *P. aeruginosa*. Στη μέση ωτίτιδα εμπλέκονται συνήθως οι μικροοργανισμοί *S. pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*,

H. influenzae και *Moraxella catarrhalis*. Η οξεία μέση ωτίτιδα είναι από τις συχνότερες λοιμώξεις των βρεφών και των μικρών παιδιών.

Συμπτώματα της ωτίτιδας αποτελεί η ωταλγία, ο πυρετός, το οίδημα του ακουστικού πόρου και οι πυώδεις εκκρίσεις που μπορούν να προκαλέσουν παροδική μείωση της ακοής (Pavloncinova *et al.* 2008).

Η διάγνωση γίνεται σύμφωνα με την κλινική εικόνα και συμπτωματολογία. Για την ταυτοποίηση του παθογόνου μικροοργανισμού, λαμβάνεται το πυώδες έκκριμα με παρακέντηση δια του τυμπανικού υμένα (Pavloncinova *et al.* 2008).

Τα τελευταία χρόνια, αναπτύσσονται ευαίσθητες τεχνικές PCR που αποτελούν χρήσιμα εργαλεία για την ανίχνευση μικροοργανισμών σε δείγματα ωτικών εκκρίσεων (Kaur R. *et al.* 2010).

1.1.3.2 Λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος

Οι λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος επηρεάζονται από τη φορεία κυρίως επειδή ακολουθούν συνήθως προηγούμενες λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού και όχι λόγω της εισβολής μικροοργανισμών με την αναπνοή. Οι λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος περιλαμβάνουν τη βρογχίτιδα, τη βρογχιολίτιδα και την πνευμονία

Στις περιπτώσεις αυτές, οι μικροοργανισμοί πολλαπλασιάζονται στο επιθήλιο και προκαλούν φλεγμονή και αυξημένη έκκριση βλέννας. Σε προχωρημένη μορφή της λοίμωξης, η έκταση της φλεγμονής είναι δυνατόν να προκαλέσει νέκρωση του επιθηλίου ή ακόμα και απόφραξη των αεραγωγών. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν βήχα, πόνο στο στήθος, ταχύπνοια, πυρετό και υπερπαραγωγή βλεννωδών εκκρίσεων. Τα συμπτώματα μπορεί να είναι ειδικά της νόσου ή και μη ειδικά όπως ανορεξία, κακουχία, κεφαλαλγία, εφίδρωση, μυαλγίες ή αρθραλγίες. Η πνευμονία αποτελεί τη σοβαρότερη από τις νόσους του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος με σημαντικό ποσοστό θνησιμότητας (Yankaskas 2004, Baldwin and Macfarlane 2004).

1.1.3.2.1 Πνευμονία

Η πνευμονία είναι η σοβαρότερη από τις νόσους του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος. Παρατηρείται με μεγαλύτερη συχνότητα μετά από ιογενείς λοιμώξεις της ανώτερης αναπνευστικής οδού. Επίσης, η συχνότητα της πνευμονίας είναι

αυξημένη σε άτομα με καρδιακή ανεπάρκεια, διαβήτη και χρόνια νοσήματα του πνεύμονα (Kilian 2007).

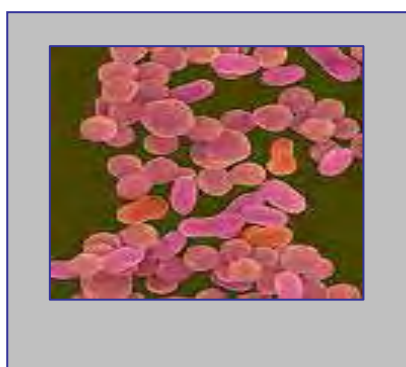
Η νόσος διαφοροποιείται σε δύο τύπους με βάση κυρίως την εμπλοκή των παθογόνων παραγόντων: σε πνευμονία κοινότητας και σε νοσοκομειακή πνευμονία. Στην πνευμονία της κοινότητας ο συνηθέστερος παθογόνος παράγοντας είναι ο *S. pneumoniae* (23 από τους 90 ορότυπους ευθύνονται για περισσότερο από το 90% των περιπτώσεων), ενώ στη νοσοκομειακή πνευμονία εμπλέκονται κυρίως Gram αρνητικοί μικροοργανισμοί όπως *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. και σταφυλόκοκκοι (Kilian 2007, Baldwin and Macfarlane 2004).

Η διάγνωση των λοιμώξεων του κατώτερου αναπνευστικού, εκτός από την κλινική εικόνα, απαιτεί μικροβιολογική εξέταση και αξιολόγηση κλινικών υλικών που λαμβάνονται από το αναπνευστικό σύστημα όπως: πτύελα, ρινικά και βρογχικά εκπλύματα. Στις περιπτώσεις πνευμονίας αξιολογείται επίσης το ολικό αίμα και το πλευριτικό υγρό. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται συνήθως κλασικές καλλιέργειες των παθολογικών υλικών ή αιμοκαλλιέργειες για την ανίχνευση βακτηρίων, που ακολουθούνται από μεθόδους ταυτοποίησης. Επίσης, χρησιμοποιούνται μοριακές τεχνικές ανίχνευσης και ταυτοποίησης απευθείας στα παθολογικά υλικά, όπως η PCR (Kilian 2007).

1.2 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ ΚΑΙ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

1.2.1 *Haemophilus influenzae*

1.2.1.1 Δομή και γενικά χαρακτηριστικά



Εικόνα 1. *Haemophilus influenzae*

Τα μέλη του γένους *Haemophilus* είναι Gram-αρνητικοί, μη κινητοί μικροοργανισμοί που δε σχηματίζουν σπόρια. Είναι υποχρεωτικά παράσιτα, προσκολλημένα στις βλενώδεις μεμβράνες του ανθρώπινου ανώτερου αναπνευστικού σωλήνα και αποτελούν το 10% της φυσιολογικής χλωρίδας αυτού.

Τα πιο γνωστά είδη που σχετίζονται με τον άνθρωπο είναι οι *H. influenzae*, *H. aegyptius*, *H. haemolyticus*, *H. parainfluenzae*, *H. parahaemolyticus*, *H. ducreyi* (Killian 2007).

Όλα τα είδη του γένους *Haemophilus*, είναι δυνητικά αναερόβια. Το όνομα του γένους οφείλεται στο γεγονός ότι για την *in vitro* ανάπτυξή τους απαιτούν αυξητικούς παράγοντες που περιλαμβάνονται στο αίμα: τον παράγοντα X και τον παράγοντα V (νικοτιναμίδικό δινουκλεοτίδιο της αδενίνης, NAD⁺). Ο *H. influenzae* απαιτεί και τις δύο αυτές ενώσεις προκειμένου να αναπτυχθεί, ενώ τα περισσότερα είδη απαιτούν μόνο μία από αυτές. Το NAD⁺ απελευθερώνεται σε αιματούχο μέσο καλλιέργειας από τα ερυθρά αιμοσφαίρια, ενώ ο παράγοντας X δεν απελευθερώνεται παρά μόνο αν επέλθει λύση των ερυθροκυττάρων. Για το λόγο αυτό, τα βακτήρια αυτού του γένους, καλλιεργούνται και αναπτύσσονται σε σοκολατόχρωμο άγαρ (περιέχει ερυθροκύτταρα που έχουν υποστεί λύση) και όχι στο αιματούχο (περιέχει φυσιολογικά ερυθροκύτταρα). Τα στελέχη αναπτύσσονται σε ατμόσφαιρα 5-10% CO₂ σε βέλτιστη θερμοκρασία 33°C -37°C (Killian 2007).

1.2.1.2 Ταξινόμηση

Τα στελέχη *H. influenzae* τυποποιούνται περαιτέρω ανάλογα με το αν φέρουν κάψα πολυσακχαρίτη (encapsulated or typable) ή όχι (nontypable). Στα στελέχη που περιέχουν κάψα, διακρίνονται 6 διαφορετικοί τύποι (a, b, c, d, e, f) ανάλογα με τη δομή του πολυσακχαρίτη. Επίσης, τα στελέχη *H. influenzae* ταξινομούνται σε έξι βιότυπους (I, II, III, IV, V, VI), βάσει ενός συνόλου βιοχημικών αντιδράσεων (Killian 2007).

1.2.1.3 Παθογένεια-Επιδημιολογία

Τα βακτήρια του γένους *Haemophilus*, δεν παράγουν τοξίνες ή άλλες εξωκυτταρικές ουσίες προκειμένου να προκαλέσουν λοίμωξη. Σημαντικό παράγοντα λοίμωξης αποτελεί η πολυσακχαριτική κάψα για τα στελέχη που την έχουν. Τα στελέχη με κάψα διεισδύουν στο επιθήλιο του ρινοφάρυγγα (ανώτερος αναπνευστικός σωλήνας) και εισβάλλουν απευθείας στα τριχοειδή. Τα μη τυποποιήσιμα στελέχη είναι λιγότερο διεισδυτικά, παρ' όλα αυτά προκαλούν ανοσολογική αντίδραση και εμπλέκονται στην πρόκληση λοιμώξεων (Killian 2007).

Πριν την εφαρμογή του προγράμματος εμβολιασμού, ο *H.influenzae* τύπου b αποτελούσε έναν από τους τρεις βασικούς μικροοργανισμούς στην πρόκληση βακτηριακής μηνιγγίτιδας στα βρέφη και παιδιά μέχρι 2 ετών, με σοβαρές μόνιμες βλάβες του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), όπως επιληψία και διανοητική καθυστέρηση ή ακόμα κώφωση και θάνατος. Η εφαρμογή του προγράμματος εμβολιασμού για τον Hib στα βρέφη με τα νέα συζευγμένα εμβόλια, μείωσε σημαντικά τα ποσοστά πρόκλησης λοιμώξεων από αυτόν το μικροοργανισμό στις αναπτυγμένες χώρες. Παρ' όλα αυτά, υψηλά παραμένουν τα ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας για τα μη εμβολιασμένα ή ελλιπώς εμβολιασμένα παιδιά (Killian 2007).

Τα υψηλά ποσοστά λοίμωξης οφείλονται στο γεγονός ότι ο *H.influenzae* είναι ένας από τους μικροοργανισμούς που αποικίζει το ρινοφάρυγγα από τα πρώτα κιόλας έτη. Συγκεκριμένα, υπολογίζεται ότι αποικίζει σε ποσοστό 44% των βρεφών και παιδιών ηλικίας ως 2 ετών, ενώ ο Hib εντοπίζεται στο ρινοφάρυγγα, σε ποσοστό 1-2% φυσιολογικών παιδιών. Η φορεία ευνοεί τη διασπορά των στελεχών από άτομο σε άτομο και την πρόκληση ασθενειών, όταν με άγνωστους μηχανισμούς ο

μικροοργανισμός διεισδύει στα επιθηλιακά κύτταρα και το ενδοθήλιο των τριχοειδών αγγείων και περνάει στην κυκλοφορία του αίματος. Επίσης, η φορεία μη τυποποιήσιμων στελεχών *Haemophilus* στα παιδιά, αποτελεί μία από τις βασικές αιτίες πρόκλησης λοιμώξεων του μέσου ωτός (οξεία μέση ωτίτιδα) (Killian 2007).

Στους ενήλικες, η φορεία στελεχών μη τυποποιήσιμων αιμόφιλων στον αναπνευστικό σωλήνα σε συνδυασμό με το γεγονός ότι στις περισσότερες περιπτώσεις έχουν εμβολιαστεί, αυξάνει σημαντικά τα ποσοστά πρόκλησης λοιμώξεων από μη τυποποιήσιμους αιμόφιλους και όχι από Hib. Οι λοιμώξεις που προκαλούνται συχνότερα από αυτού του είδους τους μικροοργανισμούς στους ενήλικες είναι η πνευμονία και η βρογχίτιδα και σπανιότερα η μηνιγγίτιδα ή σηψαιμία, οι οποίες σ' αυτήν την περίπτωση προκαλούνται μετά από προηγούμενη υποκείμενη λοίμωξη π.χ. πνευμονία ή ωτίτιδα ή τραύμα που ευνοεί την είσοδο των μικροοργανισμών στο ΚΝΣ ή στην κυκλοφορία του αίματος (Killian 2007).

Τέλος, τα στελέχη *H.influenzae* άλλων οροτύπων προκαλούν ευκαιριακές λοιμώξεις και συνήθως συνδέονται με περιστατικά πνευμονίας. Συχνότερα εμφανίζονται στελέχη οροτύπου f σε ασθενείς με λοιμώξεις, ενώ στελέχη των οροτύπων a, d, e απομονώνονται από το ρινοφάρυγγα υγιών ατόμων. Τα στελέχη οροτύπου c απομονώνονται σπάνια (Killian 2007).

1.2.2 *Pseudomonas aeruginosa* (Ψευδομονάδα πνοκυανική)

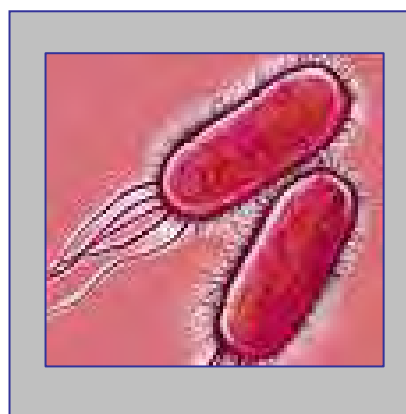
1.2.2.1 Δομή και γενικά χαρακτηριστικά

Το γένος *Pseudomonas* περιλαμβάνει περισσότερα από 140 είδη βακτηρίων. Μορφολογικά, τα βακτήρια του γένους αποτελούν Gram αρνητικοί αερόβιοι βάκιλλοι, μεγέθους 1,5-3 μm, η κίνηση των οποίων εξασφαλίζεται συνήθως από ένα και μοναδικό μαστίγιο. Τα περισσότερα από τα είδη του γένους είναι σαπροφυτικά, ενώ μόνο 25 από αυτά (τα πιο γνωστά *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. cepacia*, *P. strutzeri*, *P. maltophilia*, *P. putrefaciens*) προκαλούν στον άνθρωπο ευκαιριακές λοιμώξεις. Συγκεκριμένα, τα είδη *P. aeruginosa* και *P. maltophilia* (*Stenotrophomonas maltophilia* όπως ονομάζεται πλέον, μετά τη διαφορετική ταξινόμηση κάποιων στελεχών) απομονώνονται σε μεγάλο ποσοστό (80%) από κλινικά δείγματα ασθενών με λοιμώξεις από ψευδομονάδες, γι' αυτό και συγκεντρώνουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον (Blondel-Hill *et al.* 2007).

Ο μικροοργανισμός *P. aeruginosa* ή Ψευδομονάδα πνοκυανική φέρει τα γενικά μορφολογικά χαρακτηριστικά των βακτηρίων του γένους.

Όλα τα στελέχη έχουν την ικανότητα κίνησης μέσω του μαστιγίου, ενώ μερικά από αυτά έχουν περισσότερα από ένα μαστίγια.

Ο κυτταρικός φάκελος της *P. aeruginosa* είναι όμοιας μορφολογίας με αυτόν των Gram αρνητικών βακτηρίων και αποτελείται από την εσωτερική και εξωτερική κυτταρική μεμβράνη με ενδιάμεσο το στρώμα της πεπτιδογλυκάνης. Η εξωτερική μεμβράνη αποτελείται από φωσφολιπίδια, πρωτεΐνες και λιποπολυσακχαρίτες (LPS). Οι πρωτεΐνες της εξωκυτταρικής μεμβράνης είναι συντηρημένες ανάμεσα στα στελέχη, ενώ οι πολυσακχαριδικές αλυσίδες (αντιγόνα O) παίζουν ρόλο στην ορολογική διάκριση των στελεχών.



Εικόνα 2. *Pseudomonas aeruginosa*

Η *P. aeruginosa* είναι αερόβιος μικροοργανισμός. Παρόλο που μπορεί να χρησιμοποιεί παραπάνω από 75 οργανικές ενώσεις προκειμένου να αναπτυχθεί, μπορεί εύκολα να μεγαλώσει σε περιβάλλον οξικού οξέος και θεικού αμμωνίου απ' όπου εξασφαλίζει άνθρακα και άζωτο. Αναπτύσσεται συνήθως σε θερμοκρασίες 25°C έως 37°C, επιβιώνει όμως και σε πιο ακραίες θερμοκρασίες. Ιδιαίτερα, η ικανότητα του να αναπτύσσεται στους 42°C, τον διαχωρίζει από τα άλλα είδη του γένους. Εκτός από την αντοχή στα διάφορα θρεπτικά υλικά, η *P. aeruginosa* επιβιώνει σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων, στα ήπια αντισηπτικά και τα κοινά αντιβιοτικά (Blondel-Hill *et al.* 2007).

Φυσικό περιβάλλον της *P. aeruginosa* αποτελεί το έδαφος και ιδιαίτερα όπου υπάρχει νερό και βλάστηση. Επιπλέον, σπάνια αποτελεί μέρος της φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας υγιών ατόμων, αποικίζοντας περιοχές όπως ο γαστρεντερικός σωλήνας, το δέρμα, οι μασχάλες και το περίνεο (Blondel-Hill *et al.* 2007).

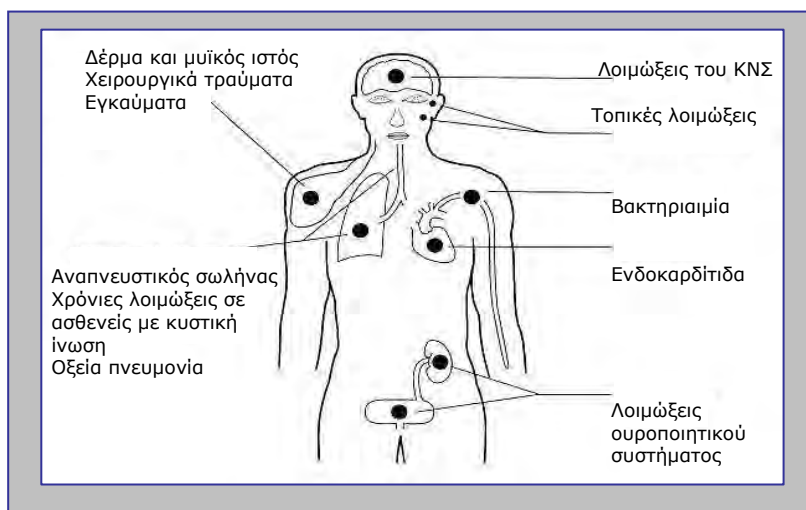
Η *P. aeruginosa* αποτελεί πρόβλημα για το νοσοκομειακό περιβάλλον που ευνοεί ιδιαίτερα την ανάπτυξη της καθώς εκεί βρίσκει πολυάριθμες δεξαμενές: στις υδραυλικές εγκαταστάσεις, στον εξοπλισμό για τον καθαρισμό και στο φαγητό, ενώ νέο φορτίο εισάγεται συνεχώς μέσω του φαγητού και των νεοεισαχθέντων ασθενών. Σε συνδυασμό δε με την αντοχή που παρουσιάζει στα κοινά αντισηπτικά και αντιβιοτικά αποτελεί πλέον έναν από τα κύρια αίτια νοσοκομειακών λοιμώξεων (Blondel-Hill *et al.* 2007).

1.2.2.2 Παθογένεια- Επιδημιολογία

Η παθογένεια των στελεχών του μικροοργανισμού οφείλεται στα διάφορα μόρια-τοξίνες που εκκρίνουν. Τα πιο γνωστά από αυτά είναι η τοξίνη Α που αναστέλλει τη σύνθεση των πρωτεϊνών, το εξωένζυμο S που εμποδίζει στάδια της ανάπτυξης των κυττάρων, ένα αιμολυτικό γλυκολιπίδιο με δράση κατά των μακροφάγων και η πρωτεΐνη λευκοσιδίνη που λύει τα λευκοκύτταρα. Επιπλέον, τα περισσότερα στελέχη εκκρίνουν μία ή περισσότερες χρωστικές με πιο γνωστές την πυοκυανίνη και τη φλουορεσκίνη (προηγούμενη ονομασία της πυοβερδίνης). Η πυοκυανίνη αναστέλλει την ανάπτυξη άλλων βακτηρίων και με αυτό τον τρόπο διευκολύνει την ανάπτυξη της *P. aeruginosa*. Σε συνδυασμό με την πυοβερδίνη-το κυριότερο σιδηροφόρο που παράγουν οι φθορίζουσες Ψευδομονάδες-, δίνουν στις καλλιέργειες χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα. Επιπλέον, η πυοκυανίνη μόνη της αλλά και σε συνδυασμό με την

πυογελίνη επάγει οξειδωτικό στρες και -τουλάχιστον in vitro- μπορεί να θανατώσει ενδοθηλιακά κύτταρα, συνεπώς έχει και τοξική δράση (Blondel-Hill *et al.* 2007).

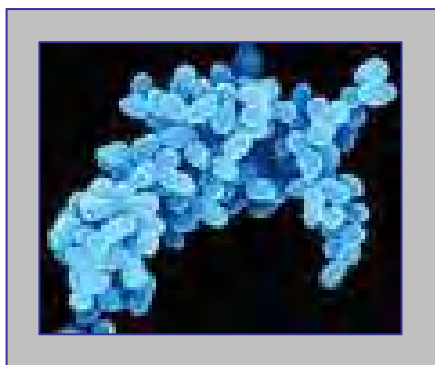
Από την πρώτη αναγνωρισμένη αναφερθείσα λοίμωξη από το μικροοργανισμό το 1890, η *P. aeruginosa* συνδέεται συνήθως με περιπτώσεις βακτηριαιμίας, με ποσοστό θνησιμότητας περίπου στο 50%. Η υψηλή θνησιμότητα οφείλεται σε συνδυασμό παραγόντων (υψηλή αντοχή του μικροοργανισμού στα αντιβιοτικά, η παραγωγή εξωκυτταρικών ενζύμων και τοξινών) με σημαντικότερο την εξασθένηση της άμυνας του ξενιστή. Έτσι εξηγείται το γεγονός ότι ο μικροοργανισμός σπάνια προκαλεί λοιμώξεις σε υγιείς οργανισμούς, αποτελεί όμως έναν από τους σημαντικότερους λοιμογόνους παράγοντες για τους νοσηλεύμενους ανοσοκατεσταλμένους ή μετεγχειρητικούς ασθενείς, ασθενείς με καρκίνο, κυστική ίνωση και εγκαύματα που αποικούνται σε μεγάλο βαθμό από το μικροοργανισμό. Σε αυτούς τους ασθενείς οι λοιμώξεις με *P. aeruginosa* πολύ συχνά καταλήγουν σε βακτηριαιμία, μηνιγγίτιδα, ενδοκαρδίτιδα ή ακόμα και πνευμονία από τη χρήση μολυσμένων ενδονοσοκομειακών αναπνευστικών συσκευών. Πιο ήπιες λοιμώξεις αποτελούν οι λοιμώξεις της ουροδόχου κύστης που προκαλούνται συνήθως μέσω της χρήσης καθετήρων, λοιμώξεις του κερατοειδή ύστερα από οφθαλμολογικές εγχειρήσεις και ωτίτιδες στα παιδιά (Blondel-Hill *et al.* 2007).



Εικόνα 3. Περιοχές λοίμωξης από *P.aeruginosa*.

1.2.3 *Staphylococcus aureus* ή Σταφυλόκοκκος χρυσίζων

1.2.3.1 Δομή και γενικά χαρακτηριστικά



Εικόνα 4. *Staphylococcus aureus*

Οι σταφυλόκοκκοι είναι Gram θετικοί κόκκοι διαμέτρου 0.5-1.0 μm. Αναπτύσσονται συνήθως σε ομάδες που διατάσσονται σε σταφυλοειδείς σχηματισμούς, σε ζεύγη και μερικές φορές σε μικρές αλυσίδες. Είναι, αερόβιοι μικροοργανισμοί που δε σχηματίζουν σπόρια και δεν κινούνται. Η διαμόρφωσή τους βοηθά στο να ξεχωρίσουν μικροσκοπικά από τους στρεπτόκοκκους που διατάσσονται συνήθως σε αλυσίδες.

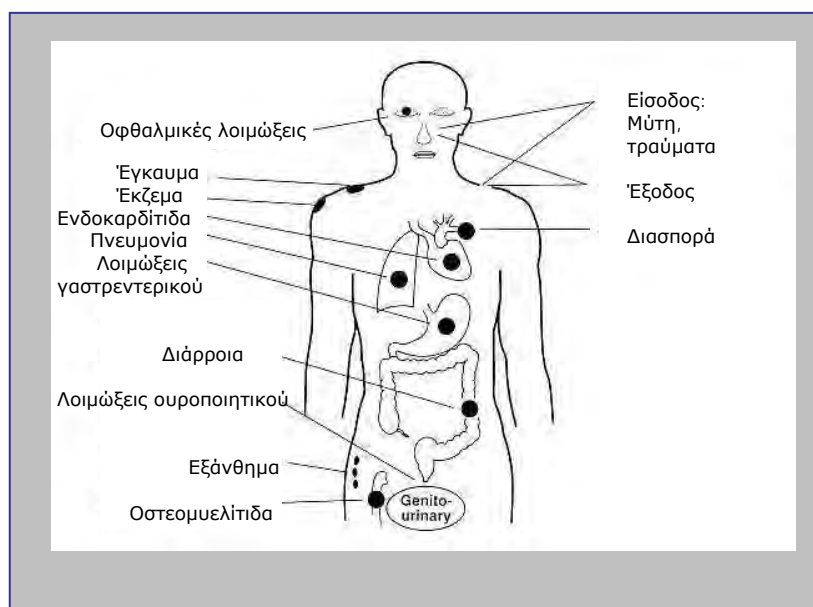
Αρκετά από τα βακτήρια του είδους αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος προκαλώντας μόνο ευκαιριακές λοιμώξεις (*S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. lugdunensis*). Το πιο γνωστό από αυτά που παρουσιάζει και την υψηλότερη παθογένεια είναι ο *S. aureus* ή *Σταφυλόκοκκος χρυσίζων* (Bannerman T. L and Peacock S. J. 2007).

1.2.3.2 Παθογένεια

Ο μικροοργανισμός αποικίζει συνήθως το δέρμα, ιδιαίτερα σε περιοχές που παρουσιάζονται κοιλότητες και αδένες, το έντερο και το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα, χωρίς να προκαλεί παθογόνο δράση στον ξενιστή. Λοιμώξεις του δέρματος και εκζέματα προκαλεί μόνο μετά από δερματικές βλάβες, όπως τραυματισμούς και εγκαύματα. Σοβαρότερες λοιμώξεις, συμπεριλαμβανομένων της βακτηριαιμίας, της πνευμονίας, της μηνιγγίτιδας και της ενδοκαρδίτιδας προκαλεί μόνο σε νοσηλευόμενους μετεγχειρητικούς ή ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Επιπλέον, σχετίζεται με την πρόκληση λοιμώξεων από πρόσθετα ιατρικά εμφυτεύματα σε καρδιολογικές και ορθοπεδικές επεμβάσεις. Τέλος, σχετίζεται με την πρόκληση περιστατικών διάρροιας ή τοξικού σοκ που προκαλούνται με την έκκριση

εντεροτοξινών από στελέχη που μολύνουν το φαγητό (Bannerman T. L and Peacock S. J. 2007).

Ο *S. aureus* εκκρίνει πολλούς παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την παθογένεια των στελεχών του όπως πρωτεΐνες που διευκολύνουν την προσκόλλησή του στους ιστούς του ξενιστή (λαμινίνη και φιβρονεκτίνη), παράγοντες που αναστέλλουν τη φαγοκύτωση (παραγωγή πολυσακχαριδικής κάψουλας, πρωτεΐνη Α) και τοξίνες που καταστρέφουν τους ιστούς (τοξίνες α, β, γ, λευκοσιδίνη) και ευθύνονται κατά κύριο λόγο για την πρόκληση διάρροιας, σηπτικού και τοξικού σοκ (toxic shock syndrome toxins, TSSTs). Η έκκριση των παραπάνω παραγόντων αποτελεί σημαντικό στοιχείο για την ταξινόμηση των στελεχών εφόσον διαφοροποιεί τα στελέχη που ευθύνονται για κάθε είδους λοίμωξη (Bannerman T. L and Peacock S. J. 2007).



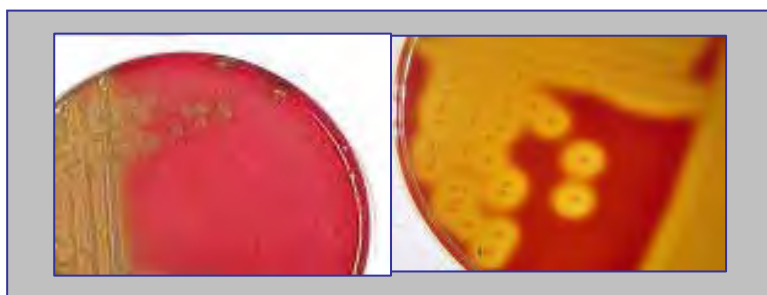
Εικόνα 5. Περιοχές λοίμωξης από *Staphylococcus aureus*

1.2.4 *Streptococcus* spp.

1.2.4.1 Δομή και γενικά χαρακτηριστικά-Ταξινόμηση

Το γένος *Streptococcus* της οικογένειας *Streptococcaceae* αποτελεί μια ετερογενή ομάδα Gram θετικών κόκκων που αναπτύσσονται συνήθως σε ζεύγη ή αλυσίδες. Στην πλειοψηφία τους είναι αερόβιοι μικροοργανισμοί που δεν κινούνται, εκτός από μερικά είδη που είναι υποχρεωτικά αναερόβια, δε σχηματίζουν σπόρια και είναι αρνητικοί στην αντίδραση καταλάσης (Spellerberg B. and Brandt C. 2007).

Η ταξινόμησή τους βασίζεται σε βασικά χαρακτηριστικά τους -όπως η μορφολογία των καλλιέργειών τους (μικρές ή μεγάλες αποικίες), το είδος της αιμόλυσης που προκαλούν όταν καλλιεργούνται σε αιματούχο άγαρ και η σύνθεση του κυτταρικού τους τοιχώματος- και όχι στην ονοματολογία των διαφόρων ειδών του γένους. Όσον αφορά το είδος της αιμόλυσης οι στρεπτόκοκκοι χωρίζονται σε: α-αιμολυτικούς, που εμφανίζουν πράσινη ζώνη ατελούς αιμόλυσης γύρω από τις αποικίες τους (οφείλεται στην καταστροφή της αιμοσφαιρίνης των ερυθροκυττάρων), β-αιμολυτικούς, που εμφανίζουν διαυγή ζώνη πλήρους αιμόλυσης γύρω από τις αποικίες τους (οφείλεται στην πλήρη λύση των ερυθροκυττάρων) (εικόνα 6) και γ-αιμολυτικούς που δεν εμφανίζουν αιμόλυση (Spellerberg B. and Brandt C. 2007).



Εικόνα 6. Καλλιέργειες στρεπτοκόκκων σε αιματούχα τριβλία όπου παρατηρείται α-αιμόλυση (αριστερά) και β-αιμόλυση (δεξιά).

Όσον αφορά τη σύνθεση του κυτταρικού τους τοιχώματος, οι β-αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι ταξινομήθηκαν το 1933 από τη Rebecca Lancefield σε 18 ομάδες (groups A to V) ανάλογα με τα αντίστοιχα πολυσακχαριδικά τους αντιγόνα. Παρ' όλα αυτά καμιά από τις δύο ταξινομήσεις δεν είναι απόλυτη καθώς υπάρχουν αποκλίσεις στις ομάδες. Για παράδειγμα, κάποιοι από τους ταξινομημένους ως

στρεπτόκοκκοι ομάδας A, (group A streptococci) παρουσιάζονται τελικά σα μη αιμολυτικοί.

Το 1984, δύο είδη που αποτελούσαν την ομάδα D των στρεπτοκόκκων αποσπάστηκαν ταξινομικά από το γένος για να αποτελέσουν το γένος των εντεροκόκκων (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*). Τέλος, για μια ομάδα στρεπτοκόκκων που ονομάζονται viridans (*Streptococcus viridans*) δεν έχει καθοριστεί ακόμα πλήρως η ονομασία και η ταξινόμησή τους (Spellerberg B. and Brandt C. 2007).

1.2.4.2 Παθογένεια

Οι στρεπτόκοκκοι προκαλούν από ήπιες μέχρι και θανατηφόρες λοιμώξεις. Για παράδειγμα, οι στρεπτόκοκκοι viridans αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας της στοματικής κοιλότητας. Τα πιο γνωστά τους μέλη, *S.mutans*, *S.sanguis*, *S. mitis* ευθύνονται για το σχηματισμό της οδοντικής πλάκας αλλά και σοβαρότερες λοιμώξεις όπως μηνιγγίτιδα, βακτηριαμία και πνευμονία (Spellerberg B. and Brandt C 2007).

Όμως, τα πιο σημαντικά παθογόνα του γένους για τον άνθρωπο αποτελούν ο πνευμονιόκοκκος (*Streptococcus pneumoniae*), μαζί με τους στρεπτόκοκκους ομάδας A -που στην πλειοψηφία τους ανήκουν στο είδος του πυογόνου στρεπτόκοκκου (*Streptococcus pyogenes*)- και τον στρεπτόκοκκο ομάδας B (*Streptococcus agalactiae*).

1.2.5 *Streptococcus pneumoniae* (Πνευμονιόκοκκος)

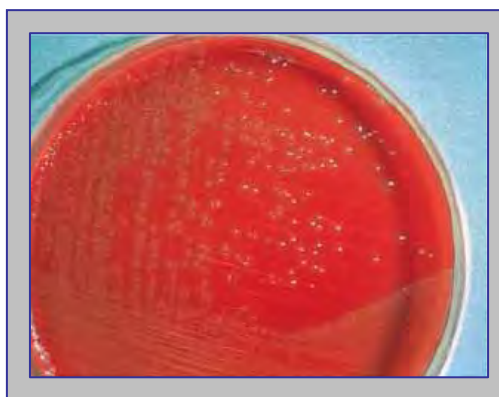
1.2.5.1 Δομή και γενικά χαρακτηριστικά



Εικόνα 7. *Streptococcus pneumoniae*

Ο μικροοργανισμός *Streptococcus pneumoniae* (πνευμονιόκοκκος) παρουσιάζεται με τη μορφή διπλοκόκκων μεγέθους 0.5-1.25μm (εικόνα 7). Δεν περιέχει αντιγόνο Lancefield και δεν ταξινομείται σε καμία από τις ομάδες (Spellerberg B. and Brandt C. 2007).

Για την ανάπτυξή του απαιτεί αιματούχο υλικό καλλιέργειας, στο οποίο σχηματίζει συνήθως μικρές αποικίες που περιβάλλονται από πράσινη ζώνη αιμόλυσης (α-αιμόλυση) (εικόνα 8). Οι αποικίες έχουν βλεννώδη υφή που οφείλεται στην παχιά πολυσακχαριτική κάψα που περιβάλλει τα περισσότερα στελέχη του μικροοργανισμού. Τα στελέχη που δεν περιβάλλονται από κάψα σχηματίζουν αποικίες με πιο «άγρια» υφή (Spellerberg B. and Brandt C. 2007).



Εικόνα 8. Καλλιέργεια *S. pneumoniae* σε αιματούχο άγαρ.

1.2.5.2 Ταξινόμηση

Η κάψα πολυσακχαριδικής φύσεως που περιβάλλει τα περισσότερα στελέχη του μικροοργανισμού, έχει το ρόλο του αντιγόνου και αποτελεί τον πιο σημαντικό λοιμογόνο παράγοντα, ενώ ταυτόχρονα προστατεύει το μικροοργανισμό από τη φαγοκύτωση. Η χημική δομή του πολυσακχαρίτη της κάψας διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στα στελέχη.

Βάσει της δομής του πολυσακχαρίτη της κάψας τα στελέχη ταξινομούνται σε διαφορετικούς τύπους (ορότυπους). Οι μέχρι πρόσφατα γνωστοί ορότυποι

ανέρχονταν στους 90 (Henrichsen 1995), ενώ τελευταία ανακαλύφθηκε ένας ακόμα ορότυπος (Park *et al.* 2007) και αναγνωρίζονται πλέον 91 ορότυποι του μικροοργανισμού. Οι ορότυποι ταξινομούνται σύμφωνα με δύο συστήματα: το Αμερικανικό, όπου χαρακτηρίζονται με αριθμούς που δόθηκαν ανάλογα με τη σειρά ανακάλυψής τους και το Δανέζικο, όπου χαρακτηρίζονται σύμφωνα με τις αντιγονικές τους ιδιότητες. Περισσότερο λειτουργικό αποδείχθη το Δανέζικο σύστημα και είναι αυτό που χρησιμοποιείται από τα ερευνητικά κέντρα και τα κέντρα αναφοράς (Hall 1998).

Από τους 91 ορότυπους οι 66 χωρίζονται σε ομάδες (οροομάδες), ενώ οι υπόλοιποι 25 δεν ομαδοποιούνται. Ανάμεσα στους ορότυπους της ίδιας οροομάδας, ο πολυσακχαρίτης έχει τους ίδιους ολιγοσακχαρίτες σε διαφορετική αλληλουχία.

1.2.5.3 Παθογένεια- Επιδημιολογία

Ο πνευμονιόκοκκος είναι παθογόνος μικροοργανισμός που προσβάλλει αποκλειστικά τον άνθρωπο. Σε φυσιολογική κατάσταση, αποτελεί μέρος της φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας του ρινοφάρυγγα και υπολογίζεται ότι ποσοστό 47-70% των υγιών ενηλίκων είναι φορείς. Οι πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις είναι συνήθως επακόλουθο της φορείας (ενδογενείς λοιμώξεις), ύστερα από διαταραχές της χλωρίδας του ρινοφάρυγγα και μειωμένη άμυνα του ξενιστή. Προδιαθετικούς παράγοντες για την ανάπτυξη λοίμωξης αποτελούν τα καρδιακά και πνευμονικά νοσήματα (Spellerberg B. and Brandt C. 2007).

Εκτός από την πολυσακχαριτική κάψα, άλλοι γνωστοί λοιμογόνοι παράγοντες του μικροοργανισμού είναι η πρωτεΐνη A και η πνευμολυσίνη. Η πνευμολυσίνη έχει σημαντική λειτουργία κυρίως στην αρχή των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων, αλληλεπιδρώντας με τη χοληστερόλη στα κύτταρα του ξενιστή και σχηματίζοντας ολιγομερή που οδηγούν στη λύση του κυττάρου (Jedrzejewski 2001).

Οι κυριότερες λοιμώξεις που προκαλεί ο πνευμονιόκοκκος είναι η πνευμονία, η μηνιγγίτιδα, η σηψαιμία και η ωτίτιδα. Χαρακτηριστικό των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων είναι ότι προσβάλλουν κυρίως ακραίες ηλικιακά ομάδες ασθενών (<2 και >60 ετών) και αποτελούν μία από τις σημαντικότερες αιτίες θνησιμότητας παγκοσμίως. Ιδιαίτερα η πνευμονιοκοκκική μηνιγγίτιδα αποτελεί τη βαρύτερη πνευμονιοκοκκική λοίμωξη και μετά τη μείωση του αριθμού των κρουσμάτων μηνιγγίτιδας από τον *H. influenzae type b* αποτελεί το συχνότερο λοιμογόνο

παράγοντα για τη νόσο, υπεύθυνο για το 47% του συνόλου των κρουσμάτων (Yogev & Guzman-Cottrill 2005).

1.2.5.4 Πρόληψη-Εμβόλια

Από το 1983 κυκλοφορεί ένα 23-δύναμο εμβόλιο που περιέχει τα αντιγόνα 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F. Οι 23 αυτοί ορότυποι ευθύνονται για το 87% της βακτηριαμικής πνευμονίας των ενηλίκων, σχεδόν το 100% της βακτηριαμίας και μηνιγγίτιδας των παιδιών και περίπου το 85% των περιπτώσεων οξείας μέσης ωτίτιδας. Το εμβόλιο αυτό είναι αποτελεσματικό σε παιδιά άνω των 2 ετών και ενήλικες, όχι όμως και σε μικρότερα παιδιά τα οποία είναι και σε μεγαλύτερο κίνδυνο.

Από το 2000, η εισαγωγή ενός νέου πρωτεϊνικού πολυσακχαριδικού συζευγμένου επταδύναμου εμβολίου (PCV7) φαίνεται να μειώνει σημαντικά τα επίπεδα των λοιμώξεων από το μικροοργανισμό (Poehling *et al.* 2006, Lexau *et al.* 2005). Το επταδύναμο εμβόλιο καλύπτει τους ορότυπους 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F και έχει εγκριθεί σε περισσότερες από 70 χώρες. Το νέο εμβόλιο επιφέρει σημαντικές αλλαγές στην επιδημιολογία του μικροοργανισμού, αφού μετά την εφαρμογή του στις Η.Π.Α. σημειώνεται μείωση κατά 75% των διεισδυτικών πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων που προκαλούνται από όλους τους ορότυπους και κατά 94% των διεισδυτικών πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων που προκαλούνται από τους ορότυπους που περιλαμβάνονται στο εμβόλιο (Center, 2007). Το νέο επταδύναμο εμβόλιο φαίνεται επίσης ότι προκάλεσε μείωση στην επίπτωση της οξείας μέσης ωτίτιδας από το μικροοργανισμό κατά 34% (Poehling *et al.* 2006, Lynch and Zhanel 2010, Hope *et al.* 2010).

Μετά την εφαρμογή του παραπάνω εμβολίου, σημειώθηκε αύξηση των λοιμώξεων του πνευμονιοκόκκου άλλων οροτύπων που δε συμπεριλαμβάνονταν σε αυτό, όπως ο 19A και ο 3. Συνεπώς, από το 2009 κυκλοφόρησε στην Ευρώπη ένα νέο συζευγμένο εμβόλιο, το οποίο περιλαμβάνει όλους τους ορότυπους του επταδύναμου, καθώς επίσης και τους ορότυπους 3, 19A, 1, 5, 7F και 6A (Bolton and Barson 2010, Gladstone *et al.* 2010).

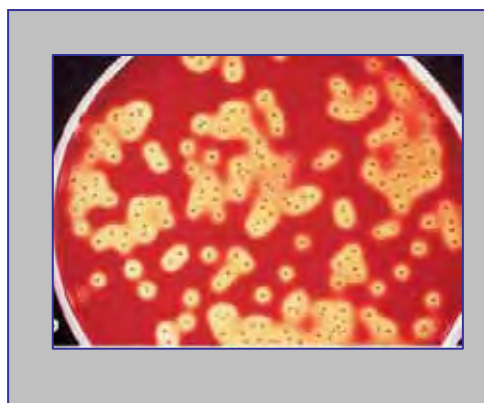
1.2.6 *Streptococcus pyogenes* (Group A *Streptococcus*)

1.2.6.1 Δομή και γενικά χαρακτηριστικά

Ο μικροοργανισμός *Streptococcus pyogenes* παρουσιάζεται με τη μορφή κόκκων μεγέθους 0.6-1μm που σχηματίζουν αλυσίδες (εικόνα 11). Στην πλειοψηφία τους τα στελέχη του ανήκουν στην ομάδα Lancefield A (Group A *Streptococcus*, GAS). Καλλιεργείται σε αιματούχο άγαρ και σχηματίζει αποικίες με β-αιμόλυση που προκαλείται από τις στρεπτολυσίνες (εικόνα 10) (Spellerberg B. and Brandt C. 2007).



Εικόνα 9. *Streptococcus pyogenes*



Εικόνα 10. Καλλιέργεια *S. pyogenes* σε αιματούχο άγαρ. Ο μικροοργανισμός σχηματίζει μικρές άσπρες-γκρι αποικίες. Γύρω από τις αποικίες παρατηρείται διαφανής ζώνη β-αιμόλυσης που προκαλείται από τις στρεπτολυσίνες.

1.2.6.2 Ταξινόμηση

Στο κυτταρικό τοίχωμα του μικροοργανισμού βρίσκεται προσδεδεμένη μια πρωτεΐνη, η πρωτεΐνη M η οποία έχει αντιφαγοκυτταρική δράση. Η δομή της πρωτεΐνης αυτής διαφέρει ανάμεσα στα στελέχη και έχουν ταυτοποιηθεί περισσότεροι από 50 τύποι βάσει της αντιγονικής ειδικότητάς τους, που χρησιμοποιούνται για περαιτέρω τυποποίηση των στελεχών (Kilian 2007).

1.2.6.3 Παθογένεια και επιδημιολογία

Εκτός από την πρωτεΐνη M, τα διάφορα στελέχη του μικροοργανισμού εκκρίνουν παράγοντες υπεύθυνους για την παθογένειά του όπως: τα λιποτειχοϊκά οξέα για

προσκόλληση στον ξενιστή, η κάψα υαλουρονικού οξέος που αναστέλλει τη φαγοκύττωση, στρεπτοκινάσες που καταστρέφουν το ινώδες και ευνοούν την είσοδο του μικροοργανισμού στους ιστούς, στρεπτολυσίνες που καταστρέφουν τις μεμβράνες των ερυθρών αιμοσφαιρίων και άλλες τοξίνες, όπως η πυρετογόνος τοξίνη, υπεύθυνη για την πρόκληση σήψης, σηπτικού σοκ και ρευματικού πυρετού (Kilian 2007).

Ο *S. pyogenes* αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του ρινοφάρυγγα. Όπως ακριβώς και στην περίπτωση του πνευμονιόκοκκου, μεταβολές στη χλωρίδα του ξενιστή, αλλά και άγνωστοι μηχανισμοί του μικροοργανισμού, εμπλέκονται στην πρόκληση λοιμώξεων. Η συχνότητα των λοιμώξεων διαφέρει ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή, την εποχή και την ηλικία του ατόμου. Επειδή ο άνθρωπος είναι ο μοναδικός οργανισμός-φορέας του μικροοργανισμού, η μετάδοση γίνεται από άνθρωπο σε άνθρωπο, είτε με άμεση επαφή ή με σταγονίδια. Η περίοδος επώασης είναι μία με τρεις ημέρες (Kilian 2007).

Οι λοιμώξεις από στρεπτόκοκκο ομάδας Α είναι συνήθως οξείες διεισδυτικές λοιμώξεις. Οι συνηθέστερες από αυτές είναι η φαρυγγοαμυγδαλίτιδα, η ωτίτιδα, η πνευμονία και η ιγμορίτιδα, που σπανιότερα από ότι οι λοιμώξεις από πνευμονιόκοκκο, καταλήγουν σε μηνιγγίτιδα (Kilian 2007).

1.2.7 *Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococcus)

1.2.7.1 Δομή και γενικά χαρακτηριστικά



Εικόνα 11. *Streptococcus agalactiae*

Ο μικροοργανισμός *Streptococcus agalactiae* παρουσιάζεται με τη μορφή κόκκων που σχηματίζουν αλυσίδες. Ανήκει στην ομάδα Lancefield B (Group B *Streptococcus*, GBS), καλλιεργείται σε αιματούχο άγαρ και σχηματίζει αποικίες με β-αιμόλυση.

Τα στελέχη του μικροοργανισμού ταξινομούνται περαιτέρω σε εννέα ορότυπους (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII), σύμφωνα με τη σύσταση της πολυσακχαριτιδικής κάψας (Kilian 2007).

1.2.7.2 Παθογένεια

Ο στρεπτόκοκκος ομάδας Β αποτελεί συνήθως μέρος της φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας του γαστρεντερικού σωλήνα και του ουρογεννητικού συστήματος.

Παρ' όλα αυτά αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες μηνιγγίτιδας και σηψαιμίας στα βρέφη με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Σύμφωνα με σχετικές μελέτες, ο μικροοργανισμός είναι υπεύθυνος για 2 με 3 περιπτώσεις των παραπάνω λοιμώξεων στις 1000 γεννήσεις. Η μετάδοση του μικροοργανισμού γίνεται από τη μητέρα στο βρέφος κατά τη γέννηση. Ο μικροοργανισμός που αποικίζει τον κόλπο ασυμπτωματικά, μολύνει τον αμνιακό σάκο από όπου μολύνεται και το βρέφος. Ο μικροοργανισμός εισέρχεται στους πνεύμονες, ύστερα από κατάποση του αμνιακού υγρού, διαπερνά το επιθήλιο και προκαλεί πνευμονία. Πολύ συχνά, ακολουθεί διασπορά του μικροοργανισμού στην κυκλοφορία του αίματος (βακτηραιμία) με επακόλουθο τη σήψη ή μηνιγγίτιδα. Οι παραπάνω λοιμώξεις εκδηλώνονται συνήθως τις πρώτες μέρες ζωής του βρέφους (Kilian 2007).

Στους ενήλικες ασθενείς ο στρεπτόκοκκος ομάδας Β συνδέεται συνήθως με περιστατικά πνευμονίας και μηνιγγίτιδας. Οι λοιμώξεις σχετίζονται συχνά με άλλη υποκείμενη νόσο, όπως σακχαρώδης διαβήτης ή καρκίνος και σε αρκετές περιπτώσεις είναι ενδονοσοκομειακές (Farley 2001).

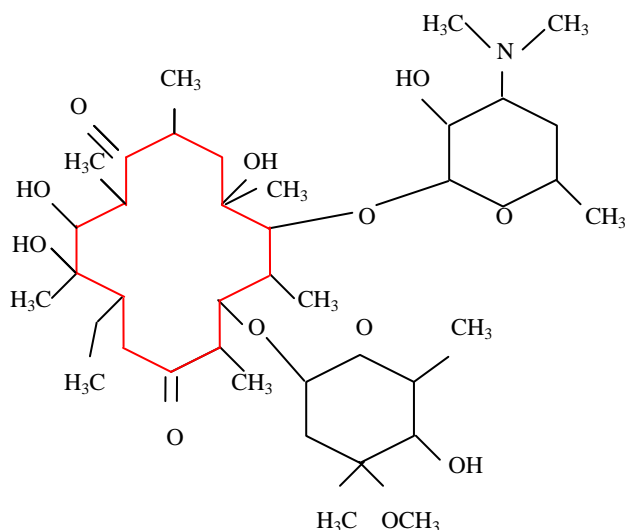
Από τους εννέα ορότυπους, οι πέντε (Ia, Ib, II, III, V) είναι υπεύθυνοι για την πλειοψηφία των λοιμώξεων. Ο ορότυπος III είναι υπεύθυνος για το 80% των περιστατικών της μηνιγγίτιδας σε βρέφη (Kilian 2007).

1.3 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΠΟΥ ΧΟΡΗΓΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΑΠΟ ΣΤΡΕΠΤΟΚΟΚΚΟΥΣ- ΜΑΚΡΟΛΙΔΕΣ, ΛΙΝΚΟΣΑΜΙΔΕΣ ΚΑΙ ΣΤΡΕΠΤΟΓΡΑΜΙΝΕΣ- ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΟΧΗΣ

Οι μακρολίδες, οι λινκοσαμίδες και οι στρεπτογραμίνες είναι διαφορετικές χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται ως αντιβιοτικά (MLS αντιβιοτικά), με κοινό τους χαρακτηριστικό τους μηχανισμούς δράσης και αντοχής.

1.3.1 ΜΑΚΡΟΛΙΔΕΣ

Οι μακρολίδες είναι μια ομάδα χημικών ενώσεων που χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ενός μακροκυκλικού λακτονικού δακτυλίου (που αποτελείται από 14 ως 16 άτομα άνθρακα) στον οποίο συνδέονται δεόξυ σάκχαρα. Κύριος εκπρόσωπος της ομάδας είναι η ερυθρομυκίνη που αποτελείται από ένα 14μερή λακτονικό δακτύλιο στον οποίο συνδέονται δύο σάκχαρα και απομονώθηκε το 1952 από το μύκητα *Streptomyces erythreus* (Yao J. D. C. and Moellerring R. C., 2007).



Εικόνα 12. Δομή της ερυθρομυκίνης. Με κόκκινο ο 14μερής λακτονικός δακτύλιος, χαρακτηριστικό των μακρολιδών.

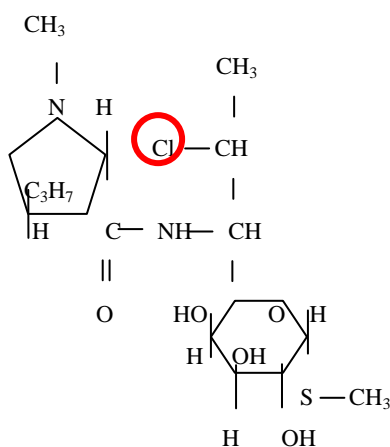
Οι μακρολίδες δρουν κατά των Gram θετικών οργανισμών, ιδιαίτερα των πνευμονιοκόκκων, στρεπτοκόκκων, σταφυλοκόκκων και κορυνοβακτηρίων. Οι μακρολίδες είναι τα αντιβιοτικά επιλογής για λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος και ιδιαίτερα την πνευμονία της κοινότητας και λοιμώξεις του γεννητικού συστήματος. Επίσης, είναι το φάρμακο επιλογής για τη θεραπεία

λοιμώξεων σε ασθενείς αλλεργικούς στην πενικιλίνη. Επειδή μεταβολίζονται στο ήπαρ, δε φτάνουν στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό σε θεραπευτικές συγκεντρώσεις, γι' αυτό δε χρησιμοποιούνται στη θεραπεία της μηνιγγίτιδας. Άλλες γνωστές και συχνά χρησιμοποιούμενες μακρολίδες είναι η κλαριθρομυκίνη και η αζιθρομυκίνη, συνθετικά παράγωγα της ερυθρομυκίνης (Yao J. D. C. and Moellerring R. C., 2007).

1.3.2 ΛΙΝΚΟΣΑΜΙΔΕΣ

Οι διαθέσιμες σήμερα λινκοσαμίδες είναι η λινκομυκίνη και η κλινταμυκίνη. Η λινκομυκίνη πήρε το όνομά της από την πόλη Λίνκολν των ΗΠΑ όπου απομονώθηκε για πρώτη φορά από το μύκητα *Streptomyces lincomensis*. Η αντικατάσταση μιας υδροξυλομάδας από ένα άτομο χλωρίου οδήγησε στην κλινταμυκίνη, η οποία αντικατέστησε πλήρως τη λινκομυκίνη (εικόνα 13) (Yao J. D. C. and Moellerring R. C. 2007).

Η κλινταμυκίνη είναι δραστική έναντι των στρεπτοκόκκων, σταφυλοκόκκων και αναερόβιων βακτηρίων. Είναι σημαντική κυρίως στην αντιμετώπιση αναερόβιων



λοιμώξεων και σαν εναλλακτική λύση σε περιπτώσεις αλλεργίας στα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Σε συνδυασμό με άλλα αντιβιοτικά χορηγείται για τη θεραπεία ουρογεννητικών λοιμώξεων και πνευμονίας. Δεν εισέρχεται στο ΚΝΣ και δε χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της μηνιγγίτιδας (Yao J. D. C. and Moellerring R. C., 2007).

Εικόνα 13. Δομή της κλινταμυκίνης.

1.3.3 ΣΤΡΕΠΤΟΓΡΑΜΙΝΕΣ

Οι στρεπτογραμίνες είναι φυσικά κυκλικά πεπτίδια που παράγονται από οργανισμούς του γένους *Streptomyces*. Η δράση των στρεπτογραμινών είναι όμοια με αυτή των μακρολιδών, ενώ φαίνεται πως και ο μηχανισμός αντοχής τους βασίζεται στην παραγωγή μεθυλασών (Yao J. D. C. and Moellerring R. C. 2007).

1.3.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ

Η αντιβακτηριακή δράση των παραπάνω αντιβιοτικών βασίζεται στην αναστολή της πρωτεϊνσύνθεσης μέσω της πρόσδεσής τους στην 50S ριβοσωμική υπομονάδα. Με την πρόσδεση των αντιβιοτικών στη ριβοσωμική υπομονάδα, εμποδίζεται η κίνηση του ριβοσώματος κατά μήκος του mRNA και διακόπτεται η διαδικασία της μετάφρασης (Yao J. D. C. and Moellerring R. C. 2007).

1.3.5 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ

Η αντοχή στις μακρολίδες, λινκοσαμίδες και στρεπτογραμίνες οφείλεται σε τέσσερις μηχανισμούς:

- α) Ενεργητική εξώθηση του αντιβιοτικού από το κύτταρο (αντλία εκροής),
- β) Μετατροπή του στόχου δράσης του αντιβιοτικού από μεθυλάσες,
- γ) Μετάλλαξη του στόχου δράσης (rRNA ριβοσωμικής υπομονάδας) στη θέση πρόσδεσης του αντιβιοτικού,
- δ) Υδρόλυση του αντιβιοτικού από εκκρινόμενα ένζυμα (Rice L. B and Bonomo R. A. 2007).

Ο πρώτος μηχανισμός αντοχής, αφορά μόνο τις 14μερείς και 15μερείς μακρολίδες (ερυθρομυκίνη, κλαριθρομυκίνη, αζιθρομυκίνη) και οφείλεται στην ύπαρξη των γονιδίων *mef* (macrolide efflux). Τα γονίδια *mef* (A/E) κωδικοποιούν την έκφραση μιας ATP-εξαρτώμενης αντλίας που βγάζει το αντιβιοτικό από το κύτταρο (αντλία εκροής, efflux pump) (Clancy *et al.*, 1996, Leclercq R. and Courvalin P., 2002). Ο φαινότυπος αντοχής ονομάζεται M και δεν επηρεάζει καθόλου τις 16μερείς μακρολίδες, τις λινκοσαμίδες και τη στρεπτογραμίνη B, αντιβιοτικά στα οποία τα στελέχη M παραμένουν ευαίσθητα.

Τα γονίδια *mefA* και *mefE* έχουν ανιχνευθεί στους μικροοργανισμούς *S. pyogenes* (Clancy *et al.*, 1996), *S. agalactiae* (Arpin *et al.* 1999), και *S. pneumoniae* (Tait-Kamradt A. *et al.* 1997), είναι κατά 90% ομόλογα και δίνουν προϊόντα στην ίδια PCR (Zeng X. *et al.* 2006). Τα γονίδια *mef* ανιχνεύονται σε χαμηλότερα ποσοστά στους *S. pyogenes* και *S. agalactiae*, σε αντίθεση με τον πνευμονιόκοκκο που ανιχνεύονται στην πλειοψηφία (70%) των ερυθρομυκίνη-ανθεκτικών στελεχών (Farell 2004).

Ο δεύτερος μηχανισμός αντοχής οφείλεται στην ύπαρξη των γονιδίων *erm* (erythromycin resistance methylase). Τα γονίδια *erm* (B, A/TR) κωδικοποιούν την παραγωγή μεθυλασών, που μεθυλιώνουν το rRNA της ριβοσωμικής υπομονάδας, με αποτέλεσμα τη μειωμένη συγγένεια πρόσδεσης για τις μακρολίδες, λινκοσαμίδες και στρεπτογραμίνη B (Leclercq R. and Courvalin P., 1991). Τα γονίδια *erm* εντοπίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα στους group A και B στρεπτόκοκκους απ' ότι στον πνευμονιόκοκκο (Azavedo *et al.* 2001). Ο φαινότυπος αντοχής ονομάζεται MLS_B (Macrolide-Lincosamide- Streptogramin B) και η έκφρασή του μπορεί να είναι ιδιοσυστασιακή (constitutive, cMLS_B) ή επαγώγιμη (inducible, iMLS_B). Στην περίπτωση της ιδιοσυστασιακής έκφρασης, η παραγωγή της μεθυλάσης είναι συνεχής και τα βακτηριακά στελέχη εμφανίζουν υψηλή αντοχή σε όλες τις μακρολίδες, τις λινκοσαμίδες και τη στρεπτογραμίνη B. Στην περίπτωση της επαγώγιμης έκφρασης, η παραγωγή της μεθυλάσης επάγεται από ουσίες-επαγωγείς που είναι οι 14μερείς και 15μερείς μακρολίδες. Φαινοτυπικά, τα στελέχη εμφανίζουν αντοχή στις μακρολίδες και ευαισθησία στις λινκοσαμίδες και ο φαινότυπος μοιάζει με το φαινότυπο M που περιγράφηκε παραπάνω. Η έκφραση της αντοχής στις λινκοσαμίδες πραγματοποιείται ύστερα από έκθεση του βακτηρίου στον επαγωγέα (ερυθρομυκίνη) (Swenson J. M. *et al.* 2007).

Εργαστηριακά, προκειμένου να διαχωριστεί ο φαινότυπος M από τον iMLS_B εφαρμόζεται υποχρεωτικά, σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute), το D-test ή μέθοδος διάχυσης δύο δίσκων, σε όλα τα στελέχη με αντοχή στην ερυθρομυκίνη και ευαισθησία στην κλινταμυκίνη. Το D-test πραγματοποιείται με την τοποθέτηση δίσκων ερυθρομυκίνης περιεκτικότητας 15μg και κλινταμυκίνης περιεκτικότητας 2μg σε απόσταση 12mm στο αντιβιογράμμα ρουτίνας σε Muller Hinton άγαρ και επώάζεται για 24 ώρες. Η ευθείαση της ζώνης αναστολής της κλινταμυκίνης στην πλευρά που είναι τοποθετημένος ο δίσκος της ερυθρομυκίνης (η ζώνη αναστολής μοιάζει με D) υποδηλώνει την επαγώγιμη αντοχή και το χαρακτηρισμό του στελέχους ως iMLS_B. Το αρνητικό D-test (φυσιολογική ζώνη αναστολής γύρω από την κλινταμυκίνη) υποδηλώνει το φαινότυπο M (εικόνα 14) (Swenson J. M. *et al.* 2007).



Εικόνα 14. Θετικό D-test. Αριστερά είναι τοποθετημένος ο δίσκος ερυθρομυκίνης, στην οποία το στέλεχος είναι ανθεκτικό. Δεξιά, η ζώνη αναστολής από την κλινταμυκίνη παραμορφώνεται σε ευθεία, λόγω της γειτνίασης με την ερυθρομυκίνη που επάγει την αντοχή του μικροοργανισμού στην κλινταμυκίνη.

Τέλος, ο τρίτος και τέταρτος μηχανισμός αντοχής αφορούν τις μακρολίδες, ανιχνεύονται όμως σε ένα ελάχιστο ποσοστό μικροοργανισμών (<5%) (Zeng X. *et al.* 2006).

1.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ ΚΑΙ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Για τη διάγνωση του αιτίου των παραπάνω λοιμώξεων (μηνιγγίτιδα, σηψαιμία και λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος) χρησιμοποιούνται κλασικές και μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης).

1.4.1 ΚΛΑΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι κλασικές μέθοδοι ανίχνευσης μικροοργανισμών σε κλινικά δείγματα περιλαμβάνουν: την άμεση μικροσκοπική παρατήρηση ύστερα από κατάλληλη χρώση (άμεσο παρασκεύασμα), την απομόνωση σε καλλιέργεια και την αναγνώριση μέσω μιας σειράς χαρακτηριστικών αντιδράσεων (βιοχημικές αντιδράσεις) (Kayser 2005).

Η χρώση και η μικροσκοπική παρατήρηση είναι οι πιο απλές και γρήγορες τεχνικές, που εφαρμόζονται εύκολα για όλα τα βακτήρια. Δίνουν τις πρώτες πληροφορίες για τη μορφολογία του μικροοργανισμού και κατευθύνουν τις περαιτέρω διαδικασίες καλλιέργειας σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό και βιοχημικές αντιδράσεις. Οι πιο συνήθεις χρώσεις είναι η χρώση με κυανό του μεθυλενίου και η χρώση Gram που διαφοροποιεί τους μικροοργανισμούς στις δύο μεγάλες ομάδες των Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων. Η ταυτοποίηση μέσω της μικροσκοπικής παρατήρησης δεν είναι πάντα εύκολη, είτε γιατί κάποια βακτήρια δε χρωματίζονται καλά με τις υπάρχουσες χρώσεις, είτε γιατί ακόμα και αν χρωματίζονται είναι δύσκολο να εντοπιστούν λόγω της μικρής συγκέντρωσής τους μέσα σε μερικά υλικά όπως για παράδειγμα στο αίμα, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στα πτύελα (Cox *et al.* 1997).

Η απομόνωση σε καλλιέργεια αποτελεί μια αξιόπιστη τεχνική ανίχνευσης. Τα περισσότερα βακτήρια αναπτύσσονται σε κοινά υγρά ή στερεά θρεπτικά υλικά, ενώ άλλα απαιτούν εμπλουτισμένα θρεπτικά υλικά για την ανάπτυξή τους, το πιο κοινό από τα οποία είναι το άγαρ εμπλουτισμένο με αίμα σε περιεκτικότητα 5%. Επιπλέον, υπάρχουν ειδικά εκλεκτικά θρεπτικά υλικά που επιτρέπουν την ανάπτυξη και ταυτόχρονα την ταυτοποίηση ορισμένων μόνο μικροοργανισμών (όπως το Charman για το *S.aureus* και το MacConkey άγαρ για τα Gram αρνητικά βακτήρια). Μερικοί

μικροοργανισμοί απαιτούν ειδικά μέσα ανάπτυξης (όπως ο *H. influenzae* απαιτεί σοκολατόχρωμο άγαρ που περιέχει λυμένα ερυθροκύτταρα).

Οι βακτηριακές καλλιέργειες επωάζονται συνήθως στους 37°C για 24 ώρες. Οι μικροοργανισμοί αναγνωρίζονται στην καλλιέργεια μέσω της μορφολογίας, του σχήματος και του χρώματος της αποικίας που σχηματίζεται. Μετά την ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού στην καλλιέργεια, ακολουθεί μια σειρά δοκιμών βιοχημικών αντιδράσεων οι οποίες ελέγχουν συνήθως την παρουσία ειδικών ενζύμων και στο σύνολό τους χαρακτηρίζουν το μικροοργανισμό. Τέτοιες είναι συνήθως οι αντιδράσεις καταλάσης, ουρεάσης και οξειδάσης, που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο παρουσίας των αντίστοιχων ενζύμων, στους σταφυλόκοκκους, πρωτεΐς και ψευδομονάδες αντίστοιχα. Επιπλέον, για κάποιους μικροοργανισμούς οι βιοχημικές αντιδράσεις που χρησιμοποιούνται βασίζονται στην ικανότητα ζύμωσης σακχάρων και την αλλαγή του χρώματος δεικτών pH, ανάλογα με την οξύτητα του προϊόντος. Τέτοια μεθόδος ταυτοποίησης είναι το API system (bioMerieux, Marcy l' Etoile, France) (εικόνα 15) που βασίζεται στον έλεγχο πολλών τέτοιων βιοχημικών αντιδράσεων ταυτόχρονα.



Εικόνα 15. Απi τεστ για την ταυτοποίηση των Gram αρνητικών βακτηρίων.

1.4.1.1 Μέθοδοι ταυτοποίησης του *H. influenzae*

Η ταυτοποίηση του *H. influenzae* βασίζεται συνήθως στη μικροσκοπική παρατήρηση ύστερα από χρώση Gram, στην απαίτηση του μικροοργανισμού για παράγοντες του αίματος -που απελευθερώνονται μόνο με τη λύση των ερυθροκυττάρων- προκειμένου να αναπτυχθεί και σε μια σειρά βιοχημικών αντιδράσεων που βασίζονται στη ζύμωση σακχάρων και κυκλοφορούν σε έτοιμα εμπορικά τεστ από διάφορες εταιρείες (API

NH test, bioMerieux, Vitek NHI Card V1308, bioMerieux, Haemophilus ID Test kit, Remel) (Kilian 2007).

Επιπλέον, με βάση μια σειρά βιοχημικών αντιδράσεων ο μικροοργανισμός τυποποιείται περαιτέρω σε έξι βιότυπους, ενώ η τυποποίηση για τους 7 διαφορετικούς ορότυπους των στελεχών που περιέχουν κάψα, γίνεται με το απλό τεστ της συγκολλητινοαντίδρασης με τους ειδικούς αντιορούς (καθένας για κάποιο από τα πολυσακχαριδικά αντιγόνα της κάψας) (Kilian 2007).

1.4.1.2 Μέθοδοι ταυτοποίησης της *P. aeruginosa*

Για την εργαστηριακή διάγνωση, ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται και απομονώνεται σε αιματούχο, tryptic soy ή MacConkey άγαρ. Ουσίες όπως η σετριμίδη, η ακεταμίδη, η νιτροφουραντοΐνη και το C390 προστίθενται στα μέσα ανάπτυξης σαν εκλεκτικοί παράγοντες, προκειμένου να απομονωθεί ο μικροοργανισμός από κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα (Blondel-Hill E. *et al.* 2007).



Εικόνα 16. Αποικίες *P.aeruginosa* σε τριβλίο με MacConkey άγαρ.

Οι αποικίες της περιβάλλονται συχνά από πράσινο χρώμα, άλλο αναγνωριστικό χαρακτηριστικό τους, που οφείλεται στην παραγωγή της κυανοπράσινης χρωστικής πυοβερδίνης. Ταυτοποιείται από τη χρώση Gram, από τη μορφολογία, το χρώμα και τη χαρακτηριστική οσμή της, ενώ ένα ακόμα κύριο γνώρισμα που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση του είναι η παραγωγή οξειδάσης. Για την αντίδραση της οξειδάσης χρησιμοποιείται υδατικό διάλυμα 1% του αντιδραστήριου τετρα-μεθυλο-παραφαινυλοδιαμίνη, με το οποίο καλύπτονται οι αποικίες. Μετά την απομάκρυνση του αντιδραστήριου, η αλλαγή του χρώματος των αποικιών σε μπλε-μωβ δηλώνει το θετικό αποτέλεσμα, την παραγωγή δηλαδή οξειδάσης από το μικροοργανισμό (Blondel-Hill E. *et al.* 2007).

Επιπλέον, για την ταυτοποίηση του μικροοργανισμού χρησιμοποιούνται έτοιμα εμπορικά συστήματα ταυτοποίησης που βασίζονται σε βιοχημικές αντιδράσεις, όπως το API20 NE (bioMerieux Vitek, Marcy l' Etoile, France) και το RapID NF Plus (Remel Inc., Lenexa, Kans.) (Blondel-Hill E. *et al.* 2007).

1.4.1.3 Μέθοδοι ταυτοποίησης του *S. aureus*

Στην εργαστηριακή διάγνωση, ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται συνήθως στους 37°C και απομονώνεται σε tryptic soy ή αιματούχο άγαρ. Εκλεκτικό μέσο ανάπτυξης για το μικροοργανισμό αποτελεί το άγαρ μαννιτόλης (Charman media), το οποίο λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε άλατα (7.5% περιεκτικότητα σε NaCl) αναστέλλει την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών και επιτρέπει την ανάπτυξη μόνο των σταφυλοκόκκων. Επιπλέον, χαρακτηριστικό της ανάπτυξης του *S.aureus* στο συγκεκριμένο μέσο, που δεν παρουσιάζουν οι άλλοι σταφυλόκοκκοι, είναι η αλλαγή του χρώματος του καλλιεργητικού μέσου από ροζ σε κίτρινο (εικόνα 17) (Bannerman T. L. and Peacock S. J. 2007).



Εικόνα 17. Καλλιέργεια *S.aureus* και *S.epidermidis* σε άγαρ μαννιτόλης. Αριστερά η ανάπτυξη του *S.aureus* επέφερε αλλαγή του χρώματος του μέσου καλλιέργειας από ροζ σε κίτρινο.

Για την ταυτοποίηση του μικροοργανισμού απαιτείται συνήθως μια σειρά βιοχημικών δοκιμασιών. Η πιο βασική από αυτές είναι η αντίδραση κοαγκουλάσης που βασίζεται στην πήξη του αίματος. Μια άλλη πολύ σημαντική αντίδραση για την ταυτοποίηση του μικροοργανισμού, είναι η αντίδραση θερμοανθεκτικής δεοξυριβονουκλεάσης (DNAάσης), ενός ενζύμου που παράγει μόνο ο *S.aureus*. Επιπλέον, άλλες βιοχημικές δοκιμασίες που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση του *S.aureus* είναι η αντίδραση καταλάσης και η συγκολλητινοαντίδραση (Bannerman T. L. and Peacock S. J. 2007).

Έτοιμα εμπορικά συστήματα ταυτοποίησης που βασίζονται σε βιοχημικές αντιδράσεις για την ταυτοποίηση του μικροοργανισμού περιλαμβάνει το API STAPH

(bioMerieux Vitek, Marcy l' Etoile, France) και το MicroScan Pos ID Panel (Dade MicroScan, Inc. West Sacramento, California) (Bannerman T. L. and Peacock S. J. 2007).

1.4.1.4 Μέθοδοι ταυτοποίησης των στρεπτοκόκκων

Στην εργαστηριακή διάγνωση, οι στρεπτόκοκκοι απαιτούν για την ανάπτυξή τους αιματούχα υλικά καλλιέργειας. Τα συνήθη αερόβια είδη αναπτύσσονται στους 37°C, καλύτερα παρουσία 5% v/v CO₂. Χαρακτηρίζονται συνήθως από το είδος της αιμόλυσης σε αιματούχο άγαρ, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 1.2.4.1. Μικροσκοπικά εμφανίζονται σα Gram θετικοί κόκκοι, διαχωρίζονται εντούτοις από τους σταφυλόκοκκους επειδή είναι αρνητικοί στην αντίδραση καταλάσης.

Πολύ διαδεδομένες είναι διάφορες μέθοδοι (συγκολλητινοαντίδραση, ELISA) που ανιχνεύουν αντιγόνα των στρεπτοκόκκων, οι οποίες όμως δεν είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες και μπορεί να δώσουν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα σε δείγματα που περιέχουν μικρό βακτηριακό φορτίο. Αντίθετα, ικανοποιητικά είναι συνήθως τα αποτελέσματα από τις δοκιμασίες συγκολλητινοαντίδρασης για τα αντιγόνα Lancefield, που χρησιμοποιούνται για περαιτέρω τυποποίηση των β-αιμολυτικών στρεπτοκόκκων (Spellerberg B. and Brandt C.2007).

Ο πυογόνος στρεπτόκοκκος (*S.pyogenes*), εκτός από το θετικό τεστ συγκολλητινοαντίδρασης για το αντιγόνο Lancefield A, ταυτοποιείται με το τεστ ευαισθησίας στο αντιβιοτικό βακιτρακίνη. Στην πλειοψηφία τους, τα στελέχη του *S.pyogenes* είναι ευαίσθητα στη βακιτρακίνη, η δοκιμασία όμως δεν είναι απόλυτα ακριβής, καθώς ένα 10% των στελεχών παρουσιάζονται ανθεκτικά στο αντιβιοτικό. Επιπλέον, κάποια στελέχη των ομάδων B, C και G είναι επίσης ευαίσθητα στη βακιτρακίνη (Spellerberg B. and Brandt C. 2007).

Μια άλλη γνωστή δοκιμασία ταυτοποίησης του μικροοργανισμού είναι το PYR τεστ, που ανιχνεύει το ένζυμο πυρολιδονυλική αμινοπεπτιδάση, που εκκρίνεται κυρίως από το συγκεκριμένο μικροοργανισμό. Το PYR τεστ κυκλοφορεί έτοιμο σε εμπορική συσκευασία. Η δοκιμασία αυτή όμως απαιτεί καθαρή καλλιέργεια του μικροοργανισμού, προκειμένου να μην προκύψουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα από άλλους μικροοργανισμούς που εκκρίνουν το ένζυμο, όπως για παράδειγμα οι εντερόκοκκοι (Spellerberg B. and Brandt C. 2007).

Ο στρεπτόκοκκος ομάδας Β (*S.agalactiae*), ταυτοποιείται άμεσα από τις δοκιμασίες συγκολλητινοαντίδρασης για τα αντιγόνα Lancefield, καθώς είναι το μόνο είδος που ανήκει στην ομάδα Β.

Μια άλλη δοκιμασία που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση του μικροοργανισμού είναι η δοκιμασία CAMP, που ανιχνεύει την ύπαρξη του παράγοντα CAMP, μιας εξωκυτταρικής πρωτεΐνης που δρα συνεργικά με τη σταφυλοκοκκική β-λυσίνη και προκαλεί λύση των ερυθροκυττάρων. Για τη δοκιμασία CAMP, το εξεταζόμενο στέλεχος καλλιεργείται μαζί με ένα στέλεχος σταφυλοκόκκου σε αιματούχο άγαρ και επωάζεται για 24 ώρες. Τη θετική δοκιμασία, δηλώνει ο σχηματισμός μιας ζώνης πλήρους αιμόλυσης, ανάμεσα στις αποικίες των δύο μικροοργανισμών, στο σημείο που συναντιούνται η β-λυσίνη από τα στελέχη σταφυλόκοκκου και ο παράγοντας CAMP από το στέλεχος στρεπτόκοκκου (Spellerberg B. and Brandt C. 2007).

Ο πνευμονιόκοκκος (*S.pneumoniae*) που δε φέρει αντιγόνο Lancefield, αναγνωρίζεται μικροσκοπικά μέσω της δοκιμασίας Quellung. Κατά τη δοκιμασία Quellung, μια σταγόνα από το μολυσμένο δείγμα ανακατεύεται με τον ειδικό αντιορό που ανιχνεύει αντιγόνο της κάψας του μικροοργανισμού και τη χρωστική μπλε του μεθυλενίου. Με αυτόν τον τρόπο, τα στελέχη του μικροοργανισμού που περιέχουν κάψα αναγνωρίζονται και ταυτοποιούνται με μικροσκοπική παρατήρηση.

Μια άλλη πολύ γνωστή δοκιμασία που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση του μικροοργανισμού και το διαχωρισμό του πνευμονιόκοκκου από τους άλλους αιμολυτικούς στρεπτόκοκκους είναι η δοκιμασία ευαισθησίας στην οπτοχίνη. Ο πνευμονιόκοκκος είναι ευαίσθητος στο αντιβιοτικό οπτοχίνη και ταυτοποιείται με επώαση της καλλιέργειας του μικροοργανισμού με δίσκους οπτοχίνης. Ο σχηματισμός ζώνης αναστολής της ανάπτυξης γύρω από τις αποικίες του μικροοργανισμού δηλώνει την ευαισθησία του μικροοργανισμού και το θετικό αποτέλεσμα της δοκιμασίας μέσω του οποίου ταυτοποιείται ο μικροοργανισμός (Spellerberg B. and Brandt C. 2007).

Τέλος, για την ταυτοποίηση των στρεπτοκόκκων κυκλοφορούν εμπορικές συσκευασίες με μια σειρά βιοχημικών δοκιμασιών, όπως το API Rapid ID 32 Strep system (bioMerieux, Marcy l' Etoile, France) (Spellerberg B. and Brandt C. 2007).

1.4.2 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ: ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR)

1.4.2.1 Η PCR ως μέθοδος ανίχνευσης και ταυτοποίησης μικροοργανισμών

Την τελευταία δεκαετία, η ολοένα αυξανόμενη εφαρμογή της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) έχει δώσει νέα ώθηση στις διαγνωστικές τεχνικές και ιδιαίτερα σε αυτές της Μικροβιολογίας. Η ικανότητα της PCR για ακριβή, ταχεία ανίχνευση και ταυτοποίηση μικροοργανισμών τείνει να αντικαθιστά όλο και περισσότερες συμβατικές μεθόδους (καλλιέργειες σε κατάλληλα θρεπτικά μέσα, ανοσολογικές μέθοδοι, βιοχημικές δοκιμασίες, μικροσκοπική παρατήρηση) που χρησιμοποιούνται ως σήμερα για αυτό το σκοπό.

Η PCR αποτελεί μια πιο ειδική και ευαίσθητη μέθοδο εφόσον στοχεύει σε γονιδιακό επίπεδο και έχει αποδειχθεί πως είναι ικανή να ανιχνεύσει την ύπαρξη μικροοργανισμών ακόμα και σε παθολογικά υλικά με πολύ χαμηλό μικροβιακό φορτίο. Συγκεκριμένα, η PCR, σύμφωνα με σχετικές δημοσιεύσεις, είναι ικανή να ανιχνεύσει την ύπαρξη παθογόνων βακτηρίων ακόμα και σε περιπτώσεις που οι καλλιέργειες είναι αρνητικές (Cherian *et al.* 1998, Pandit *et al.* 2005), όπως πολύ συχνά συμβαίνει όταν η λήψη των βιολογικών υλικών έχει γίνει μετά τη χορήγηση του αντιβιοτικού, οπότε ο πληθυσμός των βακτηρίων σε αυτά έχει μειωθεί σημαντικά (Tzanakaki *et al.* 2003). Για το λόγο αυτό, η PCR αποτελεί πλέον σημαντικό εργαλείο στη διάγνωση νόσων που σχετίζονται με μικροβιακές λοιμώξεις, όπως η μηνιγγίτιδα, η σηψαιμία και η πνευμονία, όπου η ταχεία και ακριβής ανίχνευση των μικροοργανισμών παίζουν σημαντικό ρόλο στη θεραπεία και την επιδημιολογική επιτήρηση.

1.4.2.2 Παραλλαγές της PCR

α) Multiplex PCR

Στη multiplex PCR ή πολλαπλή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, ενισχύονται ταυτόχρονα δύο ή περισσότερες αλληλουχίες γενετικού υλικού σε μία αντίδραση (Tang *et al.*, 1999).

Τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιούνται στις πολλαπλές PCR πρέπει να είναι σχεδιασμένα προσεκτικά, ώστε να έχουν όσο το δυνατόν πιο κοντινές θερμοκρασίες

υβριδισμού και να μην έχουν συμπληρωματικά άκρα ώστε να αποφεύγεται ο διμερισμός τους. Η ανάπτυξη τεχνικών πολλαπλής PCR αποτελεί χρονοβόρα διαδικασία, εφόσον απαιτεί τέλεια και συγχρονισμένη βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης ώστε τα αποτελέσματα να είναι εξίσου ικανοποιητικά για όλες τις αλληλουχίες που ενισχύονται.

Ιδιαίτερα σημαντική και χρήσιμη κρίνεται η εφαρμογή μεθόδων πολλαπλής PCR στη Μικροβιολογία, καθώς παρέχουν τη δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης δύο ή περισσότερων μικροοργανισμών σε ένα κλινικό δείγμα με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα.

β) Stepdown PCR

Στη stepdown PCR εφαρμόζονται δύο θερμοκρασίες υβριδισμού στο πρόγραμμα της αντίδρασης. Η πρώτη θερμοκρασία είναι αρκετά υψηλή σε σχέση με τα T_m (θερμοκρασίες τήξης) των εκκινητικών μορίων, εφαρμόζεται σε μικρό αριθμό κύκλων και εξασφαλίζει τον υβριδισμό τους μόνο σε ειδικές περιοχές, αποφεύγοντας με τον τρόπο αυτό το σχηματισμό μη ειδικών προϊόντων.

Η δεύτερη θερμοκρασία υβριδισμού είναι χαμηλότερη, κοντά στα T_m των εκκινητικών μορίων ή και χαμηλότερα και εξασφαλίζει τη μεγαλύτερη απόδοση της αντίδρασης. Σε αυτό το στάδιο, τα εκκινητικά μόρια υβριδίζονται στα ειδικά μόρια που έχουν ήδη παραχθεί στους πρώτους κύκλους της αντίδρασης, με αποτέλεσμα να αποφεύγεται και εδώ ο σχηματισμός μη ειδικών προϊόντων.

Η αποτελεσματικότητα της τεχνικής βασίζεται εκτός από την επιλογή των θερμοκρασιών και στην επιλογή του αριθμού των κύκλων σε κάθε στάδιο, εφόσον είναι προφανές ότι ο μεγάλος αριθμός κύκλων στο πρώτο στάδιο μπορεί να μειώσει σημαντικά την απόδοση της αντίδρασης, ενώ αντίθετα μικρός αριθμός κύκλων μπορεί να μη φέρει το επιθυμητό αποτέλεσμα και να οδηγήσει στο σχηματισμό μη ειδικών προϊόντων (Roux 2002).

γ) Hotstart PCR

Στη Hotstart PCR γίνεται προσωρινή αναστολή της δράσης του ενζύμου της Taq πολυμεράσης κατά τη διάρκεια προετοιμασίας του μίγματος της αντίδρασης. Με τον τρόπο αυτό, μειώνεται η πιθανότητα σχηματισμού μη ειδικών προϊόντων και αυξάνεται η συνολική απόδοση της αντίδρασης.

Η αναστολή της δράσης του ενζύμου επιτυγχάνεται συνήθως μέσω της πρόσδεσής του με κάποιο «αντίσωμα». Το ένζυμο αποσυνδέεται από το «αντίσωμα» και επανενεργοποιείται ύστερα από επώαση για συγκεκριμένο χρόνο, σε συγκεκριμένη θερμοκρασία, που συνήθως συμπίπτει με το χρόνο και τη θερμοκρασία που απαιτείται για την αρχική αποδιάταξη της αλληλουχίας που ενισχύεται. Έτσι, για τις περισσότερες Hotstart πολυμεράσες που κυκλοφορούν, ο αρχικός χρόνος και θερμοκρασία αποδιάταξης του προγράμματος της PCR, εκτός από την αποδιάταξη της αλληλουχίας στόχου εξασφαλίζουν ταυτόχρονα και την ενεργοποίηση του ενζύμου.

Η Hotstart PCR περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1991 (Mullis 1991) ενώ οι πρώτες πρακτικές εφαρμογές της πραγματοποιήθηκαν το 1992 (Chou *et al.*, 1992).

1.4.2.3 Η PCR στη διάγνωση βακτηριακής μηνιγγίτιδας/ βακτηριαιμίας

Όσον αφορά τη διάγνωση της βακτηριακής μηνιγγίτιδας ή βακτηριαιμίας, η PCR στοχεύει στην ανίχνευση βακτηρίων σε παθολογικά υλικά ασθενών όπως το ΕΝΥ ή το αίμα. Το γεγονός ότι και τα δύο υλικά είναι στείρα σε φυσιολογική κατάσταση, τα καθιστά εύκολα αξιολογήσιμα από μικροβιολογικής άποψης, δεδομένου ότι όποιος μικροοργανισμός ανιχνευθεί σε αυτά υποδηλώνει την αιτία της λοίμωξης.

Παγκοσμίως, οι περισσότερες από τις τεχνικές PCR για τη διάγνωση βακτηριακής μηνιγγίτιδας ή βακτηριαιμίας στοχεύουν στην ενίσχυση περιοχών του γονιδίου του 16S rRNA της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας των προκαρυωτικών (broad-range PCR). Τα μόρια του 16S rRNA περιέχουν εναλλάξ συντηρημένες περιοχές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το σχεδιασμό εκκινητικών μορίων για την ανίχνευση όλων των βακτηρίων και ετερογενείς περιοχές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το χαρακτηρισμό του είδους ή του γένους. Επομένως, οι τεχνικές αυτές ανιχνεύουν γενικά βακτήρια που ανήκουν σε διαφορετικά γένη ή είδη (Saravolatz LD *et al.* 2003, Olcen *et al.* 1995) και η περαιτέρω ταυτοποίηση του βακτηριακού παθογόνου ως προς το γένος ή το είδος γίνεται με μία από τις ακόλουθες τεχνικές: πέψη των προϊόντων με περιοριστικά ένζυμα και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε gel πολυακρυλαμίδης (Lu *et al.* 2000), αλληλούχηση (Xu *et al.* 2005, Tsai *et al.* 2004), FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) (Poppert *et al.* 2005), SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) (Turenne *et al.* 2000). Επίσης, αρκετές είναι οι δημοσιευμένες

τεχνικές PCR που στοχεύουν στην ενίσχυση ενός και μόνο γονιδίου για την ταυτοποίηση ενός μικροοργανισμού σε αίμα και ΕΝΥ, καθώς και οι τεχνικές αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR) και πολλαπλής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (multiplex PCR). Οι περισσότερες από αυτές αναφέρονται στην ανίχνευση των τριών κύριων παθογόνων μικροοργανισμών *N. meningitidis*, *H. influenzae type b*, *S. pneumoniae* (Corless *et al.*, 2001) ενώ πολύ λιγότερες στην ανίχνευση των *S. aureus*, *H. influenzae*, *Streptococcus spp.*, *P. aeruginosa* και αυτές σε μεμονωμένες τεχνικές και όχι σε multiplex PCR (Palomares *et al.* 2003, Balganes *et al.* 2000).

Στην Ελλάδα, από το 2003, εφαρμόζεται η τεχνική multiplex PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των μικροοργανισμών *N.meningitidis*, *H.influenzae type b*, *S.pneumoniae* (Tzanakaki *et al.* 2005), ενώ από το 2006 προστέθηκε και ο μικροοργανισμός *L.monocytogenes*. Επιπλέον, από το 2006 εφαρμόζονται δύο τεχνικές multiplex PCR για την ταυτοποίηση 9 οροτύπων του *S.pneumoniae* (1, 3, 4, 6, 14, 18, 19A, 19F, 23F) (Σιουμάλα κα 2007) και από το 2007 μία τετραπλή PCR για την ανίχνευση 5 ορομάδων (A, B, C, W/Y) της *N.meningitidis* (Drakopoulou *et al.* 2008).

1.4.2.4 Η PCR στη διάγνωση λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος

Όσον αφορά τις λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος, η αξιολόγηση των βιολογικών δειγμάτων που λαμβάνονται για την απομόνωση μικροοργανισμών - εκτός του πλευριτικού υγρού που είναι στείρο- καθίσταται ιδιαίτερα δύσκολη λόγω της φορέας του ρινοφάρυγγα, που έχει συνήθως ως αποτέλεσμα την ανίχνευση περισσότερων από ένα μικροοργανισμούς σε ένα κλινικό δείγμα και τη μη διάκριση παθογόνων και μη στελεχών. Παρ' όλα αυτά, τις περισσότερες φορές τα δείγματα εξετάζονται για την ύπαρξη μικροοργανισμών σε αυτά και το αποτέλεσμα συνεκτιμάται με τους κλινικούς γιατρούς σύμφωνα και με άλλα στοιχεία, όπως η υποκείμενη νόσος, το ιστορικό και η ηλικία του ασθενούς (Reimer and Carroll, 1998). Μάλιστα, τα τελευταία χρόνια η τεχνική της PCR βρίσκει και εδώ ολοένα και περισσότερες εφαρμογές.

Στις λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος, το πιο εύκολα αποκτώμενο υλικό, τα πτύελα, είναι και το πιο αμφισβητήσιμο (Reimer 1998). Κατά τη λήψη τους, τα πτύελα περνούν από τη στοματική κοιλότητα και έρχονται σε επαφή με τη

φυσιολογική χλωρίδα του στόματος, με αποτέλεσμα η μικροβιολογική εξέταση του δείγματος να ανιχνεύει αρκετούς μικροοργανισμούς χωρίς να διακρίνει τους παθογόνους. Δεδομένου ότι ο παθογόνος μικροοργανισμός θα πρέπει να βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με τους υπόλοιπους, αξία έχει η ποσοτική αξιολόγηση της μικροβιακής χλωρίδας. Εκεί ακριβώς βρήκαν εφαρμογή και οι μέθοδοι real-time PCR, που εξασφαλίζουν ταχεία, ακριβή, ευαίσθητη και ταυτόχρονα ποσοτική αξιολόγηση των δειγμάτων πτυέλων (Kais *et al.* 2006, Yang *et al.* 2005) σε αντίθεση με συμβατικές τεχνικές PCR, οι οποίες μπορεί να είναι επίσης ταχείες, ακριβείς και ευαίσθητες, στις περισσότερες περιπτώσεις όμως δε δίνουν σαφώς αξιολογήσιμα αποτελέσματα (Murdoch *et al.* 2003).

Από την άλλη, τα βρογχοκυψελιδικά εκπλύματα (BronchoAlveolar Lavage, BAL) αποτελούν ένα καλύτερα αξιολογήσιμο υλικό, εφόσον προέρχονται από το κατώτερο αναπνευστικό σύστημα και δεν επηρεάζονται από τη φυσιολογική χλωρίδα. Μάλιστα, σύμφωνα με πρόσφατες δημοσιεύσεις, η εφαρμογή της PCR σε BAL, αποτελεί μία από τις καλύτερες τεχνικές που βοηθούν στη διάγνωση της πνευμονίας ακόμα και σε ασθενείς που έχουν αρχίσει θεραπεία με αντιβιοτικά, λόγω της υψηλής ευαισθησίας της μεθόδου (Stralin *et al.* 2006, Marekovic *et al.* 2008).

1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η συχνότητα εμφάνισης των μικροοργανισμών *H. influenzae*, *Streptococcus* spp., *S. aureus*, *P. aeruginosa* ιδιαίτερα σε σοβαρές λοιμώξεις όπως η μηνιγγίτιδα, δημιούργησε την ανάγκη ύπαρξης μιας ακριβούς και ταχείας τεχνικής για την ταυτόχρονη ανίχνευσή τους.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν αρχικά, η ανάπτυξη μιας τεχνικής πολλαπλής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (multiplex PCR) για την ταυτόχρονη ανίχνευση των τεσσάρων παραπάνω μικροοργανισμών, με στόχο την εφαρμογή της απευθείας σε βιολογικά υλικά ασθενών με μηνιγγίτιδα ή βακτηριαιμία (αίμα και ENY). Η παρούσα τεχνική, ανιχνεύοντας με ακρίβεια τους παραπάνω μικροοργανισμούς στοχεύει επιπλέον να συμβάλλει στην προσθήκη επιδημιολογικών στοιχείων για τη νόσο και την καλύτερη επιτήρησή της.

Η συχνότητα εμφάνισης των στρεπτοκόκκων στα αποτελέσματα των εφαρμογών της τεχνικής δημιούργησε επιπλέον την ανάγκη για τη διάκριση των πιο συχνά εμφανιζόμενων ανάμεσά τους. Έτσι, οδήγησε στην ανάπτυξη μιας multiplex PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των μικροοργανισμών *S. pyogenes* (Group A *Streptococcus*) και *S. agalactiae* (Group B *Streptococcus*) με στόχο την εφαρμογή της στα θετικά για *Streptococcus* spp. δείγματα, σύμφωνα με την πρώτη multiplex PCR.

Η επιτυχημένη εφαρμογή των δύο παραπάνω τεχνικών στη συγκεκριμένη κατηγορία παθολογικών υλικών έδωσε τη δυνατότητα επέκτασης και εφαρμογής σε περισσότερα παθολογικά υλικά. Συνεπώς, οι δύο παραπάνω τεχνικές βρήκαν περαιτέρω εφαρμογή και σε μια πληθώρα δειγμάτων προερχόμενα από το αναπνευστικό σύστημα (πλευριτικό υγρό, πτύελα, βρογχικές εκκρίσεις, BAL, ωτικά εκκρίματα).

Τέλος, για να ολοκληρωθεί ένα σημαντικό κομμάτι της ανίχνευσης μικροοργανισμών σε υλικά προερχόμενα από το αναπνευστικό σύστημα, θεωρήθηκε χρήσιμη η ανάπτυξη μιας πολλαπλής τεχνικής PCR για την ανίχνευση των γονιδίων (*mefA/E*, *ermB*, *ermA/TR*) αντοχής των στρεπτοκόκκων στις μακρολίδες. Οι μακρολίδες, μαζί με τις πενικιλίνες αποτελούν φάρμακα επιλογής για τις λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος και η εμφάνιση όλο και περισσότερων ανθεκτικών στελεχών τα τελευταία χρόνια καθιστά αναγκαίο τον έλεγχο αντοχής στα αντιβιοτικά για αποτελεσματικότερη θεραπεία. Στόχος ήταν εφαρμογή της παραπάνω τεχνικής απευθείας σε κλινικά δείγματα που προέρχονται από το αναπνευστικό σύστημα.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

2.1.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Για την ανάπτυξη των τεχνικών της τετραπλής PCR για *H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Streptococcus* spp. και της διπλής PCR για *Streptococcus pyogenes* και *S. agalactiae* χρησιμοποιήθηκαν 210 στελέχη βακτηρίων τα οποία στάλθηκαν στο Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγιτίδας την περίοδο 2005-2008 από διάφορα νοσοκομεία της Ελλάδας (πίνακας 1). Τα στελέχη χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να επιβεβαιωθεί η καταλληλότητα των εκκινητικών μορίων και η ειδικότητα των πολλαπλών τεχνικών.

Τα παραπάνω στελέχη απομονώθηκαν από βιολογικά υλικά ασθενών με λοιμώξεις του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού συστήματος, καθώς και λοιμώξεις του ΚΝΣ (αίμα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, βρογχικές εκκρίσεις, ωτικά εκκρίματα, βρογχικά ή ρινικά εκπλύματα, πλευριτικό υγρό, πτύελα, πύον, υγρά τραύματος). Η αρχική ταυτοποίηση έγινε στα κατά τόπους νοσοκομεία, με χρώση Gram, τεστ συγκολλητινοαντίδρασης, API system (bioMerieux, Marcy l' Etoile, France) ή με το αυτόματο σύστημα ταυτοποίησης Microscan (Dade Behring, Marburg, Germany).

Για την ανάπτυξη της τεχνικής PCR για την ανίχνευση γονιδίων που προσδίδουν αντοχή στις μακρολίδες-λινκοσαμίδες-στρεπτογραμμίνη Β (*mefA/E*, *ermB*, *ermA/TR*) εκτός από τα στελέχη στρεπτοκόκκων που αναφέρονται στον πίνακα 1 χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον 252 στελέχη στρεπτοκόκκων (147 στελέχη *S. pneumoniae* και 105 στελέχη *S. pyogenes*) που συγκεντρώθηκαν στο Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγιτίδας κατά την τριετία 2007-2009.

Τα συγκεκριμένα στελέχη απομονώθηκαν από βιολογικά υλικά ασθενών με λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος (πτύελα, βρογχικά και ρινικά εκπλύματα, ωτικά εκκρίματα) και ταυτοποιήθηκαν στα κατά τόπους νοσοκομεία με κλασικές μεθόδους (καλλιέργειες, συγκολλητινοαντίδραση). Τα στελέχη που

χρησιμοποιήθηκαν στην ανάπτυξη της τεχνικής παρουσιάζονται συνολικά στον πίνακα 2.

Πίνακας 1. Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στις 2 multiplex PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των *H.influenzae*, *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *Streptococcus spp.* και αντίστοιχα την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών *S.pyogenes* και *S.agalactiae*.

Στελέχη	Αριθμός στελεχών
<i>Haemophilus influenzae</i>	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	60
<i>Streptococcus pyogenes</i>	10
<i>Streptococcus agalactiae</i>	10
<i>Streptococcus spp.</i>	7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	64
<i>Neisseria meningitidis</i>	5
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	7
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7
<i>Staphylococcus auricularis</i>	1
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	2
<i>Enterococcus spp.</i>	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	3
<i>Echerichia coli</i>	2
<i>Gardnerella vaginalis</i>	2
<i>Enterobacter cloacae</i>	1
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	1
<i>Salmonella spp.</i>	1
<i>Proteus spp.</i>	1
<i>Citrobacter spp.</i>	1
<i>Acinetobacter spp.</i>	3
ΣΥΝΟΛΟ	210

Πίνακας 2. Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην τριπλή PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση γονιδίων που προσδίδουν αντοχή στις μακρολίδες-λινκοσαμίδες-στρεπτογραμμίνη Β.

Στέλεχη	Αριθμός στελεχών
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	147
<i>Streptococcus pyogenes</i>	115
<i>Streptococcus agalactiae</i>	10
<i>Streptococcus spp.</i>	7
ΣΥΝΟΛΟ	279

Όλα τα στελέχη που συγκεντρώθηκαν στο Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας ανακαλλιεργήθηκαν εκ νέου πριν την οποιαδήποτε επεξεργασία και συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία -70°C σε θρεπτικό ζωμό (Heart Infusion Broth).

2.1.2 ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

2.1.2.1 Κλινικά δείγματα ασθενών με μηνιγγίτιδα ή/και βακτηριαμία

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 829 κλινικά δείγματα από 609 ασθενείς με μηνιγγίτιδα ή/και βακτηριαμία (τα δείγματα αντιστοιχούν σε 609 περιστατικά μηνιγγίτιδας/βακτηριαμίας όπως αναφέρονται παρακάτω) σύμφωνα με τα κλινικά χαρακτηριστικά. Τα δείγματα συγκεντρώθηκαν στο Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας την επταετία 2003-2009 και προέρχονταν από διάφορα νοσοκομεία της Ελλάδας, συνοδευόμενα με το αντίστοιχο επιδημιολογικό δελτίο.

Στο επιδημιολογικό δελτίο που συνοδεύει κάθε κλινικό δείγμα, καταγράφονται τα στοιχεία του ασθενούς και τα αποτελέσματα της κλινικής εξέτασης (δυσκαμψία του αυχένα, φωτοφοβία, κώμα, σπασμοί) και των εργαστηριακών εξετάσεων (αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων, αναλογία πολυμορφοπύρηνων/λευκοκυττάρων, CRP, αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων που μετρήθηκαν στο ENY και επίπεδα γλυκόζης του ENY) που επιβεβαιώνουν ή υποδηλώνουν κάποια από τις παραπάνω νόσους.

Τα δείγματα αποτελούνταν από: αίμα (n=365), εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) (n=459), αιμοκαλλιέργειες (n=3), βακτηριακά στελέχη (n=2).

Για την καλύτερη επεξεργασία των αποτελεσμάτων και τον υπολογισμό της ευαισθησίας και της ειδικότητας των τεχνικών, τα παραπάνω δείγματα χωρίστηκαν σε 4 ομάδες:

I) Δείγματα επιβεβαιωμένα θετικά με καλλιέργεια για έναν από τους προς εξέταση μικροοργανισμούς: 24 δείγματα που απομονώθηκαν από 20 ασθενείς [αίμα (n=8), ENY (n=14), στελέχη (n=2)].

*II) Δείγματα επιβεβαιωμένα θετικά με καλλιέργεια για άλλο μικροοργανισμό, εκτός από τους εξεταζόμενους: 26 δείγματα από 20 ασθενείς [αίμα (n=10), ENY (n=16)]. Τα δείγματα επιβεβαιώθηκαν θετικά για τους μικροοργανισμούς: *Cryptococcus* spp. (n=1), *Klebsiella pneumoniae* (n=3), *Pasteurella* spp. (n=1), *Mycobacterium tuberculosis* (n=1), *Escherichia coli* (n=5), *Enterococcus* spp. (n=1), *Staphylococcus hominis* (n=1), *Neisseria meningitidis* (n=2), *Listeria monocytogenes* (n=4), *Acinetobacter* spp. (n=1).*

III) Δείγματα με αρνητική καλλιέργεια: 534 δείγματα από 399 ασθενείς [αίμα (n=247), ENY (n=284), αιμοκαλλιέργειες (n=3)].

IV) Δείγματα προερχόμενα από ασθενείς με ιογενή μηνιγγίτιδα: 245 δείγματα από 170 ασθενείς [αίμα (n= 100), ENY (=145)].

Σύμφωνα με τις παραπάνω πληροφορίες, τα περιστατικά που εξετάστηκαν στην παρούσα διατριβή διακρίνονταν σε περιστατικά βακτηριακής μηνιγγίτιδας ή/και βακτηριαμίας και περιστατικά ιογενούς μηνιγγίτιδας. Ο αριθμός των περιστατικών που εξετάστηκαν ανά έτος παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3. Περιστατικά βακτηριακής και ιογενούς μηνιγγίτιδας ανά έτος.

ΕΤΟΣ	ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ/ΣΗΨΑΙΜΙΑΣ	ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΑ ΙΟΓΕΝΟΥΣ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ	ΣΥΝΟΛΟ
2003	22	-	22
2004	44	-	44
2005	64	-	64
2006	62	-	62
2007	123	17	140
2008	88	104	192
2009	36	49	85
ΣΥΝΟΛΟ	439	170	609

2.1.2.2 Κλινικά δείγματα ασθενών με λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 367 δείγματα από ισάριθμους ασθενείς (παιδιά $n_1=283$ και ενήλικες $n_2=84$) με λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος. Τα δείγματα συγκεντρώθηκαν στο Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγιτίδας την τριετία 2007-2009 και προέρχονταν από τα τρία δημόσια παιδιατρικά νοσοκομεία της Αθήνας και από το Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Ευαγγελισμός».

Τα δείγματα περιελάμβαναν: ωτικά εκκρίματα ($n=237/ n_1=237, n_2=0$), βρογχικές εκκρίσεις ($n=11/ n_1=0, n_2=11$), βρογχοκυψελιδικά εκπλύματα (bronchoalveolar lavage, BAL $n=72/ n_1=30, n_2=42$), πλευριτικά υγρά ($n=29/n_1=16, n_2=13$), πτύελα ($n=18 n_1=0, n_2=18$).

Τα δείγματα των ασθενών ταξινομήθηκαν στις 3 ακόλουθες ομάδες:

I) Δείγματα επιβεβαιωμένα θετικά με καλλιέργεια για έναν τουλάχιστον από τους προς εξέταση μικροοργανισμούς: 154 δείγματα [ωτικά εκκρίματα ($n=110$), BAL ($n=30$), βρογχικές εκκρίσεις ($n=6$), πτύελα ($n=6$), πλευριτικό υγρό ($n=2$)].

*II) Δείγματα επιβεβαιωμένα θετικά με καλλιέργεια για άλλο, εκτός από τους εξεταζόμενους, μικροοργανισμό: 19 δείγματα [ωτικά εκκρίματα ($n=8$), BAL ($n=8$), πτύελα ($n=1$), βρογχικές εκκρίσεις ($n=2$)] που ταυτοποιήθηκαν θετικά για τους μικροοργανισμούς: *Acinetobacter baumannii* ($n=3$), *Enterococcus faecalis* ($n=1$), *Candida albicans* ($n=1$), *Moraxella catarrhalis* ($n=5$), *Klebsiella* spp. ($n=1$), *Citrobacter* spp. ($n=1$), *Staphylococcus auricularis* ($n=1$), *Staphylococcus epidermidis* ($n=1$), *Stenotrophomonas maltophilia* ($n=2$), *Staphylococcus warneri* ($n=1$), *Serratia* spp. ($n=2$).*

*III) Δείγματα με αρνητική καλλιέργεια: 194 δείγματα/ 12 από αυτά είχαν θετική καλλιέργεια μόνο για *Streptococcus* spp. που προερχόταν από φυσιολογική χλωρίδα [ωτικά εκκρίματα ($n=119$), πλευριτικό υγρό ($n=27$), βρογχικές εκκρίσεις ($n=3$), BAL ($n=34$), πτύελα ($n=11$)].*

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Όλα τα στελέχη του γένους *Streptococcus* καλλιεργήθηκαν σε αιματούχο άγαρ, ενώ τα στελέχη *H. influenzae* και *N. meningitidis* σε σοκολατόχρωμο άγαρ (Columbia blood agar base, OXOID CM0331, Hampshire, England) και επώαστηκαν στους 37°C παρουσία 5% v/v CO₂ για 24 ώρες.

Όλα τα στελέχη του γένους *Staphylococcus* καλλιεργήθηκαν σε άγαρ μαννιτόλης (Chapman Mannitol salt agar, OXOID CM0085, Hampshire, England), ενώ τα στελέχη *P.aeruginosa* καθώς και όλα τα Gram αρνητικά στελέχη καλλιεργήθηκαν σε MacConkey άγαρ (Lab 30, Lab M, Lancashire, UK) και επώαστηκαν στους 37°C για 24 ώρες.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

- Παρασκευή αιματούχου/σοκολατόχρωμου άγαρ (5% v/v αίμα αλόγου)
 1. 39gr θρεπτικού υλικού (Columbia blood agar base, OXOID CM0331, Hampshire, England) διαλύονται σε 1L αποιονισμένο νερό και αναδεύονται υπό θέρμανση μέχρι βρασμού.
 2. Το υλικό αποστειρώνεται στους 121 °C για 15min.
 3. Για την παρασκευή σοκολατόχρωμου άγαρ: προστίθενται 50mL απινιδωμένου αίματος αλόγου (E & O Laboratories Limited, Burnhouse, Bonnybridge, Scotland) αμέσως μετά την αποστείρωση ώστε να επιτευχθεί λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, αναδεύεται και μοιράζεται στα τριβλία. Για την παρασκευή αιματούχου άγαρ, μετά την αποστείρωση και σε θερμοκρασία περίπου 55 °C, προστίθενται 50mL απινιδωμένου αίματος αλόγου.
 4. Το υλικό αναδεύεται και μοιράζεται στα τριβλία.

- Παρασκευή άγαρ μαννιτόλης
 1. 111gr θρεπτικού υλικού (Chapman Mannitol salt agar, OXOID CM0085, Hampshire, England) διαλύονται σε 1L αποιονισμένο νερό και αναδεύονται υπό θέρμανση μέχρι βρασμού.
 2. Το υλικό αποστειρώνεται στους 121 °C για 15min.
 3. Το υλικό μοιράζεται στα τριβλία.

- Παρασκευή MacConkey άγαρ
 1. 52gr θρεπτικού υλικού (Lab 30, Lab M, Lancashire, UK) διαλύονται σε 1L απιονισμένο νερό και αναδεύονται υπό θέρμανση μέχρι βρασμού.
 2. Το υλικό αποστειρώνεται στους 121 °C για 15min..
 3. Το υλικό μοιράζεται στα τριβλία.

Όλα τα παραπάνω θρεπτικά υλικά συντηρούνται στους 4°C.

2.2.2 ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Όλα τα βακτηριακά στελέχη συντηρήθηκαν στους -70°C σε θρεπτικό ζωμό (Heart Infusion Broth, OXOID CM0225, Hampshire, England). Για τη συντήρηση κάθε στελέχους χρησιμοποιήθηκε υλικό από 24ωρο καλλιέργημα. Το υλικό συλλέχθηκε με μικροβιολογικό κρίκο σε στείρες συνθήκες και τοποθετήθηκε σε σωληνάριο που περιείχε 1ml θρεπτικού ζωμού.

Παρασκευή θρεπτικού ζωμού συντήρησης

1. 18,5gr Brain Heart Infusion Broth (OXOID CM0225, Hampshire, England) διαλύονται σε 500mL απιονισμένου νερού και αναδεύονται υπό θέρμανση μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές.
2. Προστίθενται 125mL γλυκερόλης και αποστειρώνονται στους 121°C για 15min.
3. Το υλικό μοιράζεται σε cryovials όγκου ίσου με 1ml.
4. Για τον έλεγχο τυχόν επιμολύνσεων, τα cryovials τοποθετούνται σε θερμοκρασία 37°C για 24h.
5. Το υλικό συντηρείται στους 4°C.

2.2.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΡΕΠΤΟΚΟΚΚΩΝ ΣΤΗΝ ΕΡΥΘΡΟΜΥΚΙΝΗ

Από τα 279 στελέχη στρεπτοκόκκων (πίνακας 2), 173 (*S. pneumoniae* n=48, *S. pyogenes* n=115, *S. agalactiae* n=10) εξετάστηκαν ως προς την αντοχή τους στην ερυθρομυκίνη (βασικός εκπρόσωπος των 14μερών μακρολιδών) με τη μέθοδο του E-test. Επιπλέον, τα ανθεκτικά στελέχη *S. pyogenes* εξετάστηκαν με τη μέθοδο του D-test (που βασίζεται στη μέθοδο διάχυσης δίσκων και περιγράφηκε στο κεφάλαιο 1) για την επαγόμενη αντοχή στην κλινταμυκίνη.

2.2.3.1 Μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) - (E-Test)

Παρασκευάζεται εναιώρημα από 24ωρο καλλιέργημα του στελέχους, σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 5mL διαλύματος P.B.S. (Phosphate Buffer Saline) 0.01M (Sigma P3813, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Το εναιώρημα πρέπει να έχει θολερότητα ίση με 0,5 της κλίμακας McFarland. Εμποτίζεται σ' αυτό βαμβακοφόρος στυλεός και επιστρώνεται σε τριβλία Mueller Hinton άγαρ. Τοποθετείται η ταινία που περιέχει διαφορετικές τιμές περιεκτικότητας στο αντιβιοτικό (ερυθρομυκίνη 0.016-256μg/mL, Biodisk, Sweden) και επωάζεται στους 37°C, παρουσία 5% v/v CO₂ για 24ώρες (Jorgensen J. H. and Turnidge J. D. 2007).

Ο χαρακτηρισμός του στελέχους ως ευαίσθητο ή ανθεκτικό γίνεται με την ανάγνωση της τιμής περιεκτικότητας στο αντιβιοτικό στο σημείο που σταματάει η ζώνη αναστολής της ανάπτυξης του στελέχους. Για τιμές $\geq 1\mu\text{g}$ το στέλεχος χαρακτηρίζεται ανθεκτικό, ενώ για τιμές $\leq 1\mu\text{g}$ το στέλεχος χαρακτηρίζεται ευαίσθητο.

2.2.3.2 Μέθοδος διάχυσης δίσκων (Kirby-Bauer)

Παρασκευάζεται εναιώρημα από 24ωρο καλλιέργημα του στελέχους, σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 5mL διαλύματος P.B.S. (Phosphate Buffer Saline) 0.01M (Sigma P3813, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Το εναιώρημα πρέπει να έχει θολερότητα ίση με 0,5 της κλίμακας McFarland. Εμποτίζεται σ' αυτό βαμβακοφόρος στυλεός και επιστρώνεται σε τριβλία Mueller Hinton άγαρ.

Τοποθετείται ο δίσκος με το αντιβιοτικό και επωάζεται στους 37°C, παρουσία 5% v/v CO₂ για 24ώρες (Jorgensen J. H. and Turnidge 2007).

Ο χαρακτηρισμός ενός στελέχους ως ευαίσθητο ή ανθεκτικό γίνεται με τη μέτρηση της διαμέτρου της ζώνης αναστολής της ανάπτυξης του στελέχους. Για την ερυθρομυκίνη (δίσκοι περιεκτικότητας σε αντιβιοτικό 15μg), για να χαρακτηριστεί ένα στέλεχος ανθεκτικό, πρέπει η ζώνη αναστολής της ανάπτυξης να έχει διάμετρο $\leq 13\text{mm}$, ενώ για να χαρακτηριστεί ευαίσθητο πρέπει η ζώνη αναστολής της ανάπτυξης να έχει διάμετρο $\geq 18\text{mm}$.

Παρασκευή θρεπτικού υλικού Mueller-Hinton άγαρ

1. 38gr θρεπτικού υλικού (Mueller Hinton agar, OXOID CM 337, Hampshire, England) διαλύονται σε 1L απιονισμένου νερού και αναδεύονται υπό θέρμανση μέχρι βρασμού.
2. Το υλικό αποστειρώνεται στους 121 °C για 15min.
3. Στους 55 °C, προστίθενται 50mL απινιδωμένου αίματος αλόγου.
4. Το υλικό αναδεύεται και μοιράζεται στα τριβλία.

2.2.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ (DNA)

2.2.4.1 Μέθοδος απομόνωσης γενετικού υλικού από βακτηριακό στέλεχος

Για την απομόνωση DNA από στέλεχος παρασκευάζεται εναιώρημα από 24ωρο καλλιέργημα σε κωνικό σωληνάριο τύπου erpendorf που περιέχει 200μL διαλύματος Tris (10mM Tris base, 10mM Tris-HCl, pH 7.3)*. Αναδεύεται ισχυρά (vortex) και θερμαίνεται σε υδατόλουτρο στους 100°C για 10min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14000 στροφές για 12min. Το υπερκείμενο μεταγγίζεται σε νέο κωνικό σωληνάριο τύπου erpendorf και το ίζημα απορρίπτεται. Το DNA διατηρείται στους -20°C.

*Παρασκευή διαλύματος Tris (10mM Tris base, 10mM Tris-HCl, pH 7.3)

Σε 500mL απιονισμένο νερό διαλύονται 0.635gr Tris-HCl (TR04251000, Scharlau, Sentmenat, Spain) και 0.118gr Tris base (TR04251000, Scharlau, Sentmenat, Spain) και αναδεύονται. Ελέγχεται το pH και αν χρειαστεί ρυθμίζεται ώστε να είναι 7.3 σε 25°C. Τέλος, το διάλυμα φιλτράρεται υπό στείρες συνθήκες.

2.2.4.2 Μέθοδος απομόνωσης γενετικού υλικού από ολικό αίμα

Η απομόνωση του DNA από το ολικό αίμα γίνεται με το kit της Nucleospin® Blood QuickPure (Macherey-Nagel, Duren, Germany) σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας. Η μέθοδος δεν είναι ειδική για το βακτηριακό DNA, συνεπώς στα προϊόντα της απομόνωσης περιλαμβάνεται και το γενετικό υλικό των κυττάρων του αίματος.

Αναλυτικότερα, σε ένα κωνικό σωληνάριο τύπου erpendorf προστίθενται 25μL διαλύματος πρωτεΐνάσης K, 200μL αίματος (και τα δύο δείγματα πρέπει να είναι σε θερμοκρασία δωματίου) και 200μL από το διάλυμα BQ1 (διάλυμα υψηλής περιεκτικότητας σε αποδιατακτικά ιόντα). Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση για 10''-15''(vortex) και επώαση στους 70°C για 10min. Κατά τη διάρκεια της επώασης, επέρχεται λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και το χρώμα του διαλύματος αλλάζει από κόκκινο σε καφέ. Ακολούθως, προστίθενται 200μL αιθυλικής αλκοόλης (100%) και αναδεύονται ισχυρά. Το δείγμα μεταφέρεται στην ειδική στήλη πυριτίου, που έχει την ικανότητα αντιστρεπτής πρόσδεσης του DNA και φυγοκεντρείται στις 14000 στροφές για 1min. Η στήλη τοποθετείται σε ένα νέο σωληνάριο συλλογής όγκου 2mL, προστίθενται 200μL από το διάλυμα BQ2 και φυγοκεντρούνται ξανά στις

14000 στροφές για 1min. Στη συνέχεια, το έκπλυμα απορρίπτεται και η στήλη επανατοποθετείται στο σωληνάριο συλλογής, προστίθενται 350μL BQ2 στη στήλη και φυγοκεντρώνται ξανά στις 14000 στροφές για 3min.

Σε αυτή τη φάση, το διάλυμα BQ2 λειτουργεί σα διάλυμα έκλουσης των άχρηστων συστατικών της κυτταρικής λύσης, ενώ το DNA παραμένει προσδεμένο στη στήλη πυριτίου. Επειδή η διαδικασία της πρόσδεσης είναι αναστρέψιμη και ειδική για τα νουκλεϊκά οξέα, το καθαρό γενωμικό DNA εκλούεται κάτω από κατάλληλες συνθήκες σε ελαφρά αλκαλικό περιβάλλον.

Για το λόγο αυτό, στο τελευταίο στάδιο της διαδικασίας της απομόνωσης, η στήλη τοποθετείται σε ένα νέο κωνικό σωληνάριο τύπου erpendorf και προστίθενται 90μL προθερμασμένο στους 70°C διάλυμα BE. Επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1min και φυγοκεντρείται στις 14000 στροφές για 1min. Μετά τη φυγοκέντρωση, στο διάλυμα έκλουσης, περιλαμβάνεται διαλυμένο το γενετικό υλικό, προϊόν της απομόνωσης. Το DNA διατηρείται στους -20°C.

2.2.4.3 Μέθοδος απομόνωσης γενετικού υλικού από ENY και πλευριτικό υγρό

Η απομόνωση γενετικού υλικού από ENY και πλευριτικό υγρό βασίζεται στο πρωτόκολλο της δημοσίευσης των Zambardi *et al.* (1995). Η μέθοδος δεν είναι ειδική για την απομόνωση βακτηριακού γενετικού υλικού, επομένως το προϊόν της απομόνωσης περιλαμβάνει γενετικό υλικό από κύτταρα που πιθανόν βρίσκονται στο βιολογικό υλικό.

Σύμφωνα με την παραπάνω μεθοδολογία, σε ένα κωνικό σωληνάριο τύπου erpendorf μεταγγίζεται ποσότητα βιολογικού υλικού ίση με 500-1000μL φυγοκεντρείται στις 4000 στροφές για 10min. Ακολούθως, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα κρατείται. Στο ίζημα (περίπου 150μL) προστίθενται 650μL αποστειρωμένου-απεσταγμένου H₂O και 150μL διαλύματος Chellex/Tween 20* (διάλυμα αποδιατακτικό-απορρυπαντικό) και επωάζονται στους 100°C για 30min. Με την ταυτόχρονη δράση της υψηλής θερμοκρασίας και του απορρυπαντικού διαλύματος Chellex/Tween 20 επιτυγχάνεται λύση των κυττάρων.

Τέλος, το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 10000 στροφές για 8min. Τα προϊόντα της κυτταρικής λύσης περιέχονται στο ίζημα που απορρίπτεται, ενώ ποσότητα ίση με 200μL του υπερκειμένου, που περιλαμβάνει διαλυμένο το γενετικό υλικό,

μεταγίγεται σε νέο κωνικό σωληνάριο τύπου erpendorf. Το DNA διατηρείται στους -20°C .

*Παρασκευή διαλύματος Chellex/Tween 20

1. Σε 70ml απιονισμένο νερό προστίθενται 15gr Chellex (Sigma C 7901, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), 0.1gr SDS (SD00100050, Scharlau, Sentmenat, Spain), 1ml Tween 20 (S26049, Merck-Schuchardt, Germany), 1ml Igepal (Sigma I 3021, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).
2. Ο όγκος συμπληρώνεται ως τα 100mL με απιονισμένο νερό.
3. Το διάλυμα αποστειρώνεται στους 121°C για 15min.

2.2.4.4 Μέθοδος απομόνωσης γενετικού υλικού από αιμοκαλλιέργεια

Η απομόνωση του γενετικού υλικού από αιμοκαλλιέργεια γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο της δημοσίευσης Shrestha *et al.*, 2002.

Αναλυτικότερα, 500μL υλικού προερχόμενο από την αιμοκαλλιέργεια φυγοκεντρώνται σε ταχύτητα 3000 στροφών για 2min. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και στη συνέχεια το ίζημα φυγοκεντρείται ξανά στις 11000 στροφές για 5min. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και στο ίζημα προστίθενται 200μL ρυθμιστικού διαλύματος για τη λύση των κυττάρων*. Το διάλυμα αναδεύεται, θερμαίνεται στους 100°C για 10min και φυγοκεντρείται στις 3000 στροφές.

Τέλος, αφαιρούνται 170μL από το υπερκείμενο που περιέχει διαλυμένο το γενετικό υλικό. Το DNA διατηρείται στους -20°C .

*Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος για τη λύση των κυττάρων (lysis buffer)

Για την παρασκευή του παραπάνω ρυθμιστικού διαλύματος, παρασκευάζονται αρχικά δύο ρυθμιστικά διαλύματα: Tris-base (ρυθμιστικό διάλυμα A) και Tris-HCl (ρυθμιστικό διάλυμα B) 20mM.

Για το ρυθμιστικό διάλυμα A:

1. Διαλύονται 1.211gr Tris-base (TR04251000, Scharlau, Sentmenat, Spain) σε 10mL απιονισμένο νερό
2. 1mL του παραπάνω διαλύματος αραιώνεται σε 49mL νερού

Για το ρυθμιστικό διάλυμα B:

1. Διαλύονται 1.576gr Tris-HCl (TR04251000, Scharlau, Sentmenat, Spain) σε 10mL απιονισμένο νερό
2. 1mL του παραπάνω διαλύματος αραιώνεται σε 49mL νερού

Στη συνέχεια, αναμιγνύονται 30mL από το ρυθμιστικό διάλυμα A και 20mL από το ρυθμιστικό διάλυμα B και ο όγκος συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό ως τα 100mL. Προστίθεται ποσότητα ίση με 20mL διαλύματος Tris-base 10mM (10mL από το ρυθμιστικό διάλυμα A και 10mL απιονισμένο νερό). Σε 98.5mL του διαλύματος που παρασκευάστηκε, προστίθενται 1mL Triton X100 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), 0.5mL Tween 20 (S26049, Merck-Schuchardt, Germany) και 0.037gr EDTA (Sigma E5134, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) και αναδεύονται ισχυρά.

2.2.4.5 Μέθοδος απομόνωσης γενετικού υλικού από πτύελα, BAL και βρογχικές εκκρίσεις

Η απομόνωση γενετικού υλικού από πτύελα, BAL και βρογχικές εκκρίσεις βασίζεται στο πρωτόκολλο απομόνωσης για ιστούς όπως περιγράφεται στο QIAmp DNA mini kit της QIAGEN (QIAGEN, Hilden, Germany) με μερικές αλλαγές στα πρώτα στάδια επεξεργασίας σύμφωνα με τη δημοσίευση των Stralin *et al.*, 2005.

Σε ένα νέο κωνικό σωληνάριο τύπου erpendorf τοποθετούνται 200μL δείγματος και φυγοκεντρώνται στις 8000 στροφές για 10min. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθενται στο ίζημα 180μL διαλύματος ATL και 20μL πρωτεϊνάσης K, που αναδεύονται ισχυρά και επωάζονται στους 56°C για 1h. Στη συνέχεια, προστίθενται 200μL διαλύματος AL, αναδεύονται και επωάζονται στους 70°C για 10min. Προστίθενται 200μL αιθανόλης 100% και το δείγμα μεταγγίζεται στη στήλη. Ύστερα από μια πρώτη φυγοκέντρωση στις 8000 στροφές για 10min και αλλαγή του σωληναρίου συλλογής, ακολουθούν διαδοχικά πλύσεις με τα διαλύματα AW1 (500μL) και AW2 (500μL). (Όλα τα παραπάνω είναι διαλύματα αλάτων που συμβάλλουν στη λύση των κυττάρων). Την προσθήκη του διαλύματος AW1 ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 8000 στροφές για 1min και του διαλύματος AW2 στις 14000 στροφές για 4min. Τα διαλύματα και οι φυγοκεντρήσεις βοηθούν στην απομάκρυνση των άχρηστων συστατικών της κυτταρικής λύσης, ενώ το γενετικό υλικό παραμένει προσδεμένο στη στήλη.

Τέλος, για την έκλουση του γενετικού υλικού από τη στήλη, η στήλη τοποθετείται σε ένα νέο κωνικό σωληνάριο τύπου erpendorf και προστίθενται 200μL από το διάλυμα AE. Το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5min και

φυγοκεντρείται στις 8000 στροφές για 1min. Στο διάλυμα έκλουσης περιλαμβάνεται διαλυμένο το γενετικό υλικό που συντηρείται στους -20°C .

2.2.5 ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΙ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ (PRIMERS)- ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

2.2.5.1 Επιλογή και σχεδιασμός εκκινητικών μορίων

Όλα τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν στις τεχνικές πολλαπλής PCR που περιγράφονται παρακάτω, είτε επιλέχθηκαν από δημοσιευμένες εργασίες, είτε τροποποιήθηκαν βάσει αυτών που αναφέρονται σε δημοσιευμένες εργασίες, είτε σχεδιάστηκαν εκ νέου. Σε όλες τις περιπτώσεις η επιλογή των εκκινητικών μορίων είχε στόχο:

- τη μοναδικότητα των περιοχών των γονιδίων που θα ενισχύσουν στους προς ανίχνευση μικροοργανισμούς
- οι αντίστοιχες αντιδράσεις να πραγματοποιούνται σε όσο το δυνατόν πλησιέστερη θερμοκρασία υβριδισμού (annealing temperature, T_a), δηλαδή τα επιλεγμένα εκκινητικά μόρια να έχουν κοντινά σημεία τήξης (T_m)
- τα τελικά προϊόντα να διαφέρουν σε μέγεθος τόσο ώστε να είναι δυνατός ο διαχωρισμός τους κατά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ως αποτέλεσμα πολλαπλής PCR.

2.2.5.2 Έλεγχος εκκινητικών μορίων- *in silico* PCR

Όλα τα εκκινητικά μόρια πριν χρησιμοποιηθούν εργαστηριακά ελέγχθηκαν με το πρόγραμμα BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) για τη συγγένεια προς τα γονίδια-στόχους, για τυχόν μεταξύ τους υβριδισμό ή υβριδισμό σε ανθρώπινο γενωμικό υλικό.

Επιπλέον, εφαρμόστηκε *in silico* PCR ξεχωριστά για κάθε τεχνική με το λογισμικό FastPCR (www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr.htm). Στην *in silico* PCR, οι αλληλουχίες των γονιδίων των μικροοργανισμών στα οποία στοχεύουν τα εκκινητικά μόρια, καθώς και οι αλληλουχίες ολόκληρων των γενωμάτων των μικροοργανισμών,

οι οποίες ελήφθησαν από τη διεθνή τράπεζα αναζήτησης (GenBank), έπαιξαν το ρόλο που θα έπαιζε το γενετικό υλικό *in vitro*. Σύμφωνα με την εφαρμογή του λογισμικού για την *in silico* PCR, δόθηκαν ταυτόχρονα οι αλληλουχίες αυτές καθώς και τα ζεύγη εκκινητικών μορίων και ζητήθηκε το αποτέλεσμα όσον αφορούσε την παραγωγή προϊόντων από υβριδισμό των εκκινητικών μορίων στις δοθείσες αλληλουχίες, όπως ακριβώς θα συνέβαινε εργαστηριακά με την παραγωγή προϊόντων κατά την πραγματοποίηση της πολλαπλής PCR. Έτσι, η *in silico* PCR μπορεί να προβλέψει μέχρι ένα σημείο την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων από μη ειδικό υβριδισμό των εκκινητικών μορίων.

Για τα ζεύγη εκκινητικών μορίων που επιλέχθηκαν τελικά για την κάθε τεχνική, η *in silico* PCR έδωσε τα αναμενόμενα προϊόντα συγκεκριμένου μοριακού βάρους για τα αντίστοιχα γονίδια, χωρίς την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων.

2.2.5.3 Ανάπτυξη τεχνικών πολλαπλής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (multiplex PCR)

Για την ανάπτυξη κάθε μίας από τις πολλαπλές τεχνικές PCR ακολουθήθηκε η εξής πορεία (Henegariu *et al.* 1997, Elnifro *et al.* 2000):

- 1) Ανάπτυξη μεμονωμένων τεχνικών PCR για κάθε ένα από τους υπό εξέταση μικροοργανισμούς έτσι ώστε να βρεθούν κοινές συνθήκες λειτουργίας.
- 2) Συνδυασμός των μεμονωμένων τεχνικών σε μία πολλαπλή- Προσαρμογή συνθηκών.
- 3) Δοκιμή της ειδικότητας των εκκινητικών μορίων με την εφαρμογή της τεχνικής στα ταυτοποιημένα με κλασικές μεθόδους βακτηριακά στελέχη.
- 4) Εφαρμογή της τεχνικής απευθείας σε κλινικά δείγματα- Προσαρμογή συνθηκών.
- 5) Υπολογισμός ευαισθησίας και ειδικότητας της πολλαπλής τεχνικής.

2.2.6 ΠΟΛΛΑΠΛΗ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ΚΑΙ *Streptococcus spp.*

2.2.6.1 Υλικά

2.2.6.1.1 Εκκινητικά μόρια

Όλα τα εκκινητικά μόρια που δοκιμάστηκαν στην τεχνική, οι αλληλουχίες τους και τα χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4. Αλληλουχίες και χαρακτηριστικά των εκκινητικών μορίων που δοκιμάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στην τεχνική της πολλαπλής PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των *H. influenzae*, *S. aureus*, *P.aeruginosa*, *Streptococcus spp.*

Primer	Αλληλουχία 5'-3'	Γονίδιο	Tm (°C)	Μέγεθος προϊόντων (bp)
Str1	GTA CAG TTG CTT CAG GAC GTA TC	<i>tuf</i>	55	197
Str2	ACG TTC GAT TTC ATC ACG TTG	<i>tuf</i>	54	
PAL 1	ATG GAA ATG CTG AAA TTC GGC	<i>oprL</i>	54	504
PAL 2	CTT CTT CAG CTC GAC GCG ACG	<i>oprL</i>	60	
Psae-L	GCGATCACCACCTTCTACTT	<i>oprL</i>	54	418
Psae-R	CAACGCCGTCATACACAG	<i>oprL</i>	54	
Flu-F	GAA TAC AAA AAT GCT ATG	<i>lic-1</i>	41	150
Flu-R	TGA AAT ACT TCC TCA GGC	<i>lic-1</i>	49	
Hin L	TTCGCCTTGCTATTATTTC	<i>lic-1</i>	51	538
Hin R	AAAACGACTGCCTAATCCTG	<i>lic-1</i>	53	
F1	AGACAACAGCCCTTATGCTG	<i>hel</i>	55	545
R1	CCCAAGCTTGTACTIONGTCATCT	<i>hel</i>	55	
nuc 1	GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT	<i>nuc</i>	55	279
nuc 2	AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC	<i>nuc</i>	60	

2.2.6.1.2 Αντιδραστήρια PCR

Στον πίνακα 5 παρουσιάζονται όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάπτυξη της τεχνικής, καθώς και τα στοιχεία του θερμοκυκλοποιητή.

Πίνακας 5. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην τεχνική της πολλαπλής PCR και θερμοκός κυκλοποιητής.

Θερμικός κυκλοποιητής	Apollo ATC 201 (NyxTechnic)
Εκκινητικά μόρια	VBC (Hamburg, Germany)
dNTPs	ABgene (Epsom, UK)
Taq polymerase	ABgene (Epsom, UK)
Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης (buffer)	
MgCl₂	
Hot start Taq polymerase DyNAzyme II Hot start	Finnzymes (Finland)
DyNAzyme II buffer	

2.2.6.1.3 Θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες

Κάθε εφαρμογή της τεχνικής συμπεριλάμβανε θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ποσότητα 5ng φωτομετρημένου γενετικού υλικού από κάθε βακτήριο-στόχο (*P.aeruginosa*, *H.influenzae*, *S. aureus*, *S. pyogenes*) που απομονώθηκαν από 24ωρη καθαρή καλλιέργεια του μικροοργανισμού. Στις εφαρμογές της πολλαπλής τεχνικής το θετικό μάρτυρα αποτελούσε μίγμα από ποσότητα 5ng από το γενετικό υλικό κάθε μικροοργανισμού.

Σαν αρνητικός μάρτυρας, για τον έλεγχο επιμολύνσεων ή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε στείρο δις απεσταγμένο νερό (water for injection, B/BRAUN, BIOSEP A.E.).

2.2.6.2 Πειραματικά στάδια ανάπτυξης της τεχνικής

1. ΣΤΑΔΙΟ ΠΡΩΤΟ: Επιλογή εκκινητικών μορίων- Ανάπτυξη συνθηκών μεμονωμένων τεχνικών

Σύμφωνα με τις προϋποθέσεις που περιγράφονται στην παράγραφο 2.2.5.1, τα ζεύγη εκκινητικών μορίων που επιλέχθηκαν αρχικά για την mPCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των *H. influenzae*, *P.aeruginosa*, *S. aureus* και *Streptococcus* spp. ήταν τα εξής:

- **nuc1/nuc2** για το γονίδιο *nuc* το οποίο κωδικοποιεί μια νουκλεάση χαρακτηριστική για το μικροοργανισμό *S. aureus* (Zhang K. *et al.* 2004)
- **PAL1/PAL2** για το γονίδιο *oprL* το οποίο κωδικοποιεί μια λιποπρωτεΐνη χαρακτηριστική της εξωτερικής μεμβράνης του μικροοργανισμού *P. aeruginosa* (De Vos *et al.* 1997)
- **Flu-F/Flu-R** για το οπερόνιο *lic-1* που παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του πολυσακχαρίτη του *H. influenzae* (Balganesh *et al.* 2000)
- **Str1/Str2** για τις αλληλουχίες *tuf* που κωδικοποιούν τον παράγοντα επιμήκυνσης Tu και είναι συντηρημένες στο γένος των στρεπτοκόκκων (Picard F. *et al.* 2004).

Το πρόγραμμα στο οποίο εφαρμόστηκαν αρχικά οι τέσσερις μεμονωμένες αντιδράσεις PCR με τα παραπάνω εκκινητικά μόρια και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων ανά αντίδραση παρουσιάζονται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6. Συνθήκες της κάθε μεμονωμένης αντίδρασης PCR για την αρχική δοκιμή των εκκινητικών μορίων (Πρόγραμμα 1).

Πρόγραμμα 1	Συνθήκες	PCR mix
Αρχικό δοκιμαστικό πρόγραμμα μεμονωμένων τεχνικών PCR με primers PAL 1/2, nuc 1/2, Str1/2, Flu F/R	96°C 5min 96°C για 1min 55°C για 1min 40 κύκλοι 72°C για 1min 72°C για 10min	Τελικός όγκος: 50μL 0,1μM κάθε primer 0,8mM dNTPs 1U Taq 1x buffer 2,5mM MgCl ₂ 5ng DNA template

Οι συνθήκες του παραπάνω προγράμματος επιλέχθηκαν από τις δημοσιεύσεις των De Vos *et al.* 1997, Zhang *et al.* 2004 και Picard F. *et al.* 2004 απ' όπου επιλέχθηκαν και τα εκκινητικά μόρια.

Τα μη ικανοποιητικά αποτελέσματα του παραπάνω αρχικού προγράμματος οδήγησαν στην τροποποίηση των συνθηκών (αύξηση/μείωση της θερμοκρασίας υβριδισμού, αύξηση χρόνων υβριδισμού και αποδιάταξης) και των συγκεντρώσεων των αντιδραστηρίων (αύξηση συγκέντρωσης εκκινητικών μορίων). Παρά όλα αυτά δεν κατέστη δυνατός ο συνδυασμός των τεσσάρων αντιδράσεων υπό κοινές συνθήκες για την ανάπτυξη μιας τετραπλής τεχνικής.

Για το λόγο αυτό δημιουργήθηκε ένα νέο πρόγραμμα και σχεδιάστηκαν νέα εκκινητικά μόρια για τους *P.aeruginosa* και *H.influenzae*. Τα νέα εκκινητικά μόρια - **HinL/HinR** για τον *H. influenzae* και **PsaeL/PsaeR** για την *P. aeruginosa* - σχεδιάστηκαν στα ίδια γονίδια (*lic-1* και *oprL* αντίστοιχα) και στις ζητούμενες προδιαγραφές όσον αφορά τα Tm και το μέγεθος των προϊόντων, με τη βοήθεια του προγράμματος Primer 3 Input primer design (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3> <http://www.cgi>).

Το νέο πρόγραμμα και οι συνθήκες της αντίδρασης παρουσιάζονται στον πίνακα 7.

Πίνακας 7. Συνθήκες της κάθε μεμονωμένης αντίδρασης PCR όπως διαμορφώθηκαν με τα νέα εκκινητικά μόρια (Πρόγραμμα 2).

Πρόγραμμα 2	Συνθήκες	PCR mix
Πρόγραμμα μεμονωμένων τεχνικών PCR με primers PsaeL/R, nuc 1/2, Str1/2, Hin L/R	95°C 10min	Τελικός όγκος: 50μL 0,4μM κάθε primer 0,8mM dNTPs 1U Hot start Taq 1x buffer 5ng DNA template
	95°C για 1min	
	57°C για 1min 8 κύκλοι	
	72°C για 2min	
	95°C για 25sec	
	55°C για 40sec 30 κύκλοι	
	72°C για 1:20min	
	72°C για 5min	

Το νέο πρόγραμμα (πρόγραμμα 2) βασίστηκε στη λογική της step down PCR (εφαρμογή δύο θερμοκρασιών υβριδισμού). Επιπλέον, έγινε αλλαγή του ενζύμου της πολυμεράσης και χρησιμοποιήθηκε Hot start Taq polymerase (DyNAzyme II Hot

start, Finnzymes, Finland) στο PCR mix. Η πολυμεράση Hot start Taq λόγω της ενεργοποίησής της μετά από τα 10 πρώτα λεπτά της αρχικής αποδιάταξης μειώνει την πιθανότητα σχηματισμού μη ειδικών προϊόντων εξ αιτίας λανθασμένου υβριδισμού των εκκινητικών μορίων κατά την προετοιμασία του δείγματος και πριν την έναρξη της αντίδρασης.

2. ΣΤΑΔΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ: Συνδυασμός των μεμονωμένων τεχνικών σε μία πολλαπλή τεχνική- Προσαρμογή συνθηκών.

Στο στάδιο αυτό, έγινε η πρώτη δοκιμή της πολλαπλής τεχνικής. Αρχικά, ετοιμάστηκε PCR mix που περιείχε ίσες συγκεντρώσεις από τα τέσσερα ζεύγη εκκινητικών μορίων (0,4μM από κάθε εκκινητικό μόριο) και τις συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων που περιγράφονται στον πίνακα 7 και εφαρμόστηκε στο πρόγραμμα 2.

Τα αποτελέσματα του παραπάνω προγράμματος ήταν μη ικανοποιητικά και οδήγησαν στις εξής διαδοχικές τροποποιήσεις: μείωση της θερμοκρασίας υβριδισμού κατά δύο βαθμούς και στα δύο στάδια, αύξηση του συνολικού αριθμού των κύκλων σε 40, αύξηση του χρόνου επέκτασης στα 2min και μείωση της θερμοκρασίας στο στάδιο της επέκτασης στους 68°C για καλύτερη απόδοση του ενζύμου, αυξομειώσεις στις συγκεντρώσεις των εκκινητικών μορίων, αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου και των dNTPs. Το πρόγραμμα και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων όπως διαμορφώθηκαν τελικά παρουσιάζονται στον πίνακα 8.

Πίνακας 8. Συνθήκες της πολλαπλής αντίδρασης PCR (Πρόγραμμα 3).

Πρόγραμμα 3	Συνθήκες	PCR mix
Πρόγραμμα τεχνικής πολλαπλής PCR με primers PsaeL/R, nuc 1/2, Str1/2, Hin L/R	95°C 10min	Τελικός όγκος: 50μL
	95°C για 1min	0,1μM PsaeL/R
	55°C για 1min	0,2μM Hin L/R
	68°C για 2min	0,2μM Str 1/2
	95°C για 25sec	0,8μM nuc 1/2
	53°C για 40sec	1mM dNTPs
68°C για 2min	32 κύκλοι	2U Hot start Taq
68°C για 5min		1x buffer
		5ng each DNA template

3. ΣΤΑΔΙΟ ΤΡΙΤΟ: Εφαρμογή της τεχνικής σε βακτηριακά στελέχη

Η παραπάνω τεχνική εφαρμόστηκε στα 210 βακτηριακά στελέχη που είχαν ταυτοποιηθεί με κλασικές μεθόδους (παράγραφος 2.1.1, πίνακας 1). Το στάδιο αυτό κρίθηκε εξαιρετικά σημαντικό και απαραίτητο, προκειμένου να υπολογισθεί και πειραματικά η ειδικότητα των εκκινητικών μορίων.

Η χαμηλή ειδικότητα του ζεύγους των εκκινητικών μορίων για τον *H. influenzae* (HinL/HinR) οδήγησε στο σχεδιασμό ενός νέου ζεύγους εκκινητικών μορίων. Το νέο ζεύγος εκκινητικών μορίων (**F1/R1**) σχεδιάστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Primer 3 Input primer design σε ένα άλλο γονίδιο, το γονίδιο *hel*. Το γονίδιο *hel* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη P4 της εξωτερικής μεμβράνης του *H. influenzae*, σύμφωνα με τη δημοσίευση των Yadav *et al.* 2003, είναι κατάλληλο για την ταυτοποίηση του μικροοργανισμού.

Το νέο ζεύγος εκκινητικών μορίων αντικατέστησε το παλιό στο πρόγραμμα 3, χωρίς περαιτέρω τροποποιήσεις.

4. ΣΤΑΔΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ: Εφαρμογή της τεχνικής απευθείας σε κλινικά δείγματα- Προσαρμογή συνθηκών.

Το πρόγραμμα 3 (πίνακας 8) εφαρμόστηκε απευθείας σε δείγματα αίματος και ENY. Επειδή τα αποτελέσματα για τα δείγματα του αίματος κυρίως, λόγω της παρουσίας του ανθρώπινου γενωμικού υλικού δεν ήταν ικανοποιητικά, ακολούθησαν διαδοχικά οι εξής αλλαγές: κλιμακωτή αύξηση της θερμοκρασίας υβριδισμού και στα δύο στάδια της step down PCR από τη θερμοκρασία των 55°C έως και τους 63°C, μείωση του συνολικού αριθμού των κύκλων της αντίδρασης από 40 σε 36, μείωση των χρόνων αποδιάταξης και υβριδισμού στο πρώτο στάδιο της αντίδρασης, αλλαγές στις συγκεντρώσεις των εκκινητικών μορίων, αλλαγές στη συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος της πολυμεράσης (buffer).

Όλες οι παραπάνω αλλαγές πραγματοποιήθηκαν με στόχο την καλύτερη απόδοση και ταυτόχρονα ευαισθησία της αντίδρασης στα κλινικά δείγματα και κυρίως σε αυτά που περιείχαν μεγάλες ποσότητες ανθρώπινου γενωμικού υλικού.

Οι συνθήκες της αντίδρασης όπως διαμορφώθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 9.

Πίνακας 9. Συνθήκες της πολλαπλής αντίδρασης PCR όπως διαμορφώθηκαν μετά την εφαρμογή της σε κλινικά δείγματα (Πρόγραμμα 4).

Πρόγραμμα 4	Συνθήκες	PCR mix
Πρόγραμμα τεχνικής πολλαπλής PCR με primers PsaeL/R, nuc 1/2, Str1/2, F1/R1	95°C 10min	Τελικός όγκος: 50μL
	95°C για 25sec	0,2μM PsaeL/R
	60°C για 20sec 10 κύκλοι	0,5μM F1/R1
	68°C για 2min	0,2μM Str 1/2
	95°C για 25sec	0,8μM nuc 1/2
	58°C για 10sec 26 κύκλοι	1mM dNTPs
68°C για 2min	2U Hot start Taq	
68°C για 5min	1.4x buffer	
		5μL each DNA template

Εφόσον η απόδοση της αντίδρασης κρίθηκε ικανοποιητική με την εφαρμογή των παραπάνω συνθηκών, στόχος ήταν η εφαρμογή της πλέον σε μια πληθώρα κλινικών δειγμάτων. Για το λόγο αυτό, κρίθηκε αναγκαία η μείωση του τελικού όγκου της αντίδρασης στα 25μL, συνεπώς και η μείωση της ποσότητας των αντιδραστηρίων. Η αλλαγή αυτή επηρέασε σημαντικά την απόδοση της αντίδρασης στα κλινικά δείγματα και μη ειδικά προϊόντα εμφανίστηκαν ξανά.

Συνεπώς, ακολούθησαν περαιτέρω τροποποιήσεις στις συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων (αυξομειώσεις στις συγκεντρώσεις των εκκινητών, μείωση της συγκέντρωσης του ενζύμου) αλλά και στις συνθήκες του προγράμματος 4 (αύξηση της θερμοκρασίας υβριδισμού κατά ένα βαθμό και στα δύο στάδια, μείωση του χρόνου υβριδισμού στο πρώτο στάδιο της αντίδρασης, μείωση του χρόνου επέκτασης κατά 30'' και στα δύο στάδια της αντίδρασης) οι οποίες και διαμόρφωσαν το τελικό πρόγραμμα εφαρμογής της τεχνικής όπως παρουσιάζεται παρακάτω (πίνακας 10).

Πίνακας 10. Τελικό πρόγραμμα και συνθήκες της πολλαπλής αντίδρασης PCR (Πρόγραμμα 5).

Πρόγραμμα 5	Συνθήκες	PCR mix
Πρόγραμμα τεχνικής πολλαπλής PCR με primers PsaeL/R, nuc 1/2, Str1/2, F1/R1	95°C 10min	Τελικός όγκος: 25μL
	95°C για 25sec	0,4μM PsaeL/R
	61°C για 10sec 10 κύκλοι	0,7μM F1/R1
	68°C για 1:30min	0,3μM Str 1/2
	95°C για 25sec	0,3μM nuc 1/2
	59°C για 10sec 26 κύκλοι	1mM dNTPs
68°C για 1:30min	1,5U Hot start Taq	
68°C για 5min	1.4x buffer	
		5μL each DNA template

5. ΣΤΑΔΙΟ ΠΕΜΠΤΟ: Υπολογισμός ευαισθησίας

Για τον υπολογισμό της ευαισθησίας ανίχνευσης γενετικού υλικού, παρασκευάστηκαν διαδοχικές αραιώσεις (ποσότητας 5ng, 0.5ng, 0.05ng, 0.005ng) γενετικού υλικού που είχε απομονωθεί από 24ωρη καθαρή καλλιέργεια του κάθε βακτηρίου-στόχου. Το γενετικό υλικό που απομονώθηκε από την καλλιέργεια, φωτομετρήθηκε στα 260nm (μήκος κύματος απορρόφησης δίκλωνου DNA) ώστε να υπολογιστεί ο όγκος του νερού που χρειαζόταν για να αραιωθεί στα 5ng/μl. Το αραιωμένο γενετικό υλικό φωτομετρήθηκε ξανά για να υπολογιστεί ακριβώς η συγκέντρωσή του και πραγματοποιήθηκαν διαδοχικά 1/10 αραιώσεις αυτού ως και την ποσότητα των 0,005ng/μl (5pg).

Επιπλέον, έγινε υπολογισμός της ευαισθησίας ανίχνευσης βακτηριακού γενετικού υλικού παρουσία ανθρώπινου γενωμικού με την εξής διαδικασία: Σε 199μL αίματος που αποκτήθηκε από υγιές άτομο προστέθηκε 1μL καθαρού βακτηριακού γενετικού υλικού περιεκτικότητας 5ng/μl και 0,5ng/μl από τους μικροοργανισμούς *H.influenzae* και *Streptococcus* spp.. Σύμφωνα με τα στοιχεία του κατασκευαστή, στο kit που χρησιμοποιείται για την απομόνωση γενετικού υλικού από το αίμα (Nucleospin® Blood QuickPure, Macherey-Nagel) η μέθοδος έχει απόδοση 90-100%. Συμπερασματικά, 4,5-5ng (και 0,45-0,5ng αντίστοιχα) βακτηριακού γενετικού υλικού περιέχονταν στο διάλυμα έκλουσης (90μL), δηλαδή 0,045-0,05ng/μL (και 0,0045-

0,005ng/μL αντίστοιχα). Όγκοι 1μL και 10μL από κάθε διάλυμα έκλουσης χρησιμοποιήθηκαν στην PCR σα DNA στόχος προκειμένου να διαπιστωθεί το όριο ανίχνευσης του βακτηριακού γενετικού υλικού.

2.2.6.3 Εφαρμογή σε κλινικά δείγματα

Η τεχνική εφαρμόστηκε συνολικά σε 1196 κλινικά δείγματα προερχόμενα από: ασθενείς με μηνιγγίτιδα ή/και βακτηριαμία (n=829) και ασθενείς με λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος (n=367).

Τα δείγματα των ασθενών με μηνιγγίτιδα ή/και βακτηριαμία ήταν αρνητικά ως προς τους μικροοργανισμούς *N.meningitidis*, *S.pneumoniae*, *H.influenzae b* καθότι είχαν ελεγχθεί αρχικά με την πολλαπλή PCR, ειδική για την ανίχνευση των τεσσάρων αυτών βακτηρίων που πραγματοποιείται στο Κέντρο Αναφοράς (Tzanakaki *et al.* 2005).

2.2.6.4 Ειδικότητα και ευαισθησία

Μετά την εφαρμογή της τεχνικής σε κλινικά δείγματα, υπολογίστηκε η ευαισθησία και η ειδικότητά της, καθώς και η αρνητική και θετική αξία πρόβλεψης (positive and negative predicted value, PPV, NPV) βάσει των ταυτοποιημένων με καλλιέργειες δειγμάτων. Ο υπολογισμός έγινε με τη χρήση του λογισμικού 2-way Contingency Table Analysis (<http://statpages.org/ctab2x2.html>).

Η ευαισθησία υπολογίστηκε βάσει του ποσοστού των επιβεβαιωμένων με καλλιέργειες θετικών -για κάποιο από τους υπό εξέταση μικροοργανισμούς- δειγμάτων που ήταν θετικά και στην PCR (a/c1, πίνακας 11).

Η ειδικότητα υπολογίστηκε βάσει του ποσοστού των επιβεβαιωμένων με καλλιέργειες δειγμάτων -για άλλον εκτός από τους υπό εξέταση μικροοργανισμούς- που ήταν αρνητικά στην PCR (d/c2, πίνακας 11).

Η θετική αξία πρόβλεψης υπολογίστηκε βάσει του ποσοστού των επιβεβαιωμένων με καλλιέργειες θετικών -για κάποιο από τους υπό εξέταση μικροοργανισμούς- δειγμάτων που ήταν θετικά και στην PCR, επί του συνόλου των θετικών στην PCR δειγμάτων (a/r1, πίνακας 11).

Η αρνητική αξία πρόβλεψης υπολογίστηκε βάσει του ποσοστού των επιβεβαιωμένων με καλλιέργειες θετικών δειγμάτων -για άλλον εκτός από τους υπό

εξέταση μικροοργανισμούς- που ήταν αρνητικά στην PCR, επί του συνόλου των αρνητικών στην PCR δειγμάτων (d/r2, πίνακας 11).

Σύντομα, οι αναλογίες όπως εμφανίζονται στο λογισμικό 2-way Contingency Table Analysis παρουσιάζονται στον πίνακα 11.

Πίνακας 11. Βάσει του παρακάτω πίνακα που εμφανίζεται στο λογισμικό 2-way Contingency Table Analysis υπολογίστηκαν η ευαισθησία και η ειδικότητα της τεχνικής.

	Θετικά στην καλλιέργεια για κάποιον από τους υπό εξέταση μικροοργανισμούς	Θετικά στην καλλιέργεια για κάποιον άλλο μικροοργανισμό	ΣΥΝΟΛΟ
PCR ΘΕΤΙΚΑ	a	b	r1
PCR ΑΡΝΗΤΙΚΑ	c	d	r2
ΣΥΝΟΛΟ	c1	c2	t

ευαισθησία: $a/c1$, ειδικότητα: $d/c2$, θετική αξία πρόβλεψης: $a/r1$, αρνητική αξία πρόβλεψης: $d/r2$.

2.2.6.5 Ανάγνωση αποτελεσμάτων

Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση.

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (w/v) σε διάλυμα TBE 1X*, παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου και αναγνώστηκαν κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία.

*Παρασκευή διαλύματος TBE 5X

Σε 2L νερό προστίθενται 108gr Tris base (TR04251000, Scharlau, Sentmenat, Spain), 7,4gr EDTA (Sigma E5134, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) και 55gr βορικό οξύ (AC 05771000, Scharlau, Sentmenat, Spain) και αναδεύονται ισχυρά.

Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται διάλυμα TBE 1X.

2.2.7 ΠΟΛΛΑΠΛΗ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ *Streptococcus pyogenes* (GROUP A *Streptococcus*) ΚΑΙ *Streptococcus agalactiae* (GROUP B *Streptococcus*)

2.2.7.1 Υλικά

2.2.7.1.1 Εκκινητικά μόρια

Αναλυτικά τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν στην τεχνική, οι αλληλουχίες τους και τα χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται στον πίνακα 12.

Πίνακας 12. Αλληλουχίες και χαρακτηριστικά των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν στην τεχνική της πολλαπλής PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των *S.pyogenes* και *S. agalactiae*.

Primer	Αλληλουχία 5'-3'	Γονίδιο	Tm (°C)	Μέγεθος προϊόντων (bp)
Spy F	ACTCTGGATGATTTGTACCG	<i>spy 1258</i>	52	314
Spy R	TCAGTGGTTTCTTGATAGCC	<i>spy 1258</i>	52	
CFBS	ATG ATG TAT CTA TCT GGA ACT CT	<i>cfb</i>	50	259
CFBA	CGC AAT GAA GTC TTT AAT TTT TC	<i>cfb</i>	49	

2.2.7.1.2 Αντιδραστήρια PCR

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάπτυξη της τεχνικής, καθώς και ο θερμικός κυκλοποιητής είναι ίδια με αυτά που αναφέρονται στον πίνακα 5 της παραγράφου 2.2.6.1.2.

2.2.7.1.3 Θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες

Κάθε εφαρμογή της τεχνικής συμπεριλάμβανε θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε σε κάθε περίπτωση ποσότητα 5ng/μl φωτομετρημένου γενετικού υλικού από κάθε βακτήριο-στόχο (*S. agalactiae*, *S. pyogenes*) που απομονώθηκε από 24ωρη καθαρή καλλιέργεια του μικροοργανισμού.

Στη διπλή PCR σα θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μίγμα γενετικού υλικού ποσότητας 5ng από κάθε μικροοργανισμό.

Σαν αρνητικός μάρτυρας, για τον έλεγχο επιμολύνσεων ή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε στείρο δις απεσταγμένο νερό (water for injection, B/BRAUN, ΒΙΟΣΕΡ Α.Ε.).

2.2.7.2 Πειραματικά στάδια ανάπτυξης της τεχνικής

1. ΣΤΑΔΙΟ ΠΡΩΤΟ: Επιλογή εκκινητικών μορίων- Ανάπτυξη συνθηκών μεμονωμένων τεχνικών

Για την ανάπτυξη της τεχνικής της διπλής PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των μικροοργανισμών *S. pyogenes* και *S. agalactiae* τα εκκινητικά μόρια είτε τροποποιήθηκαν βάσει αυτών που βρέθηκαν σε δημοσιευμένες εργασίες, είτε σχεδιάστηκαν εκ νέου.

Όσον αφορά το μικροοργανισμό *S. pyogenes*, σύμφωνα με τη δημοσίευση των Liu *et al.* 2005, το γονίδιο *spy1258* κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα του μικροοργανισμού και η αλληλουχία του είναι μοναδική στο γένωμά του ώστε να επιτρέπει την ταυτοποίηση του μικροοργανισμού. Βάσει αυτών των πληροφοριών, σχεδιάστηκε ένα νέο ζεύγος εκκινητικών μορίων (**SpyF/SpyR**) μέσα στην περιοχή του γονιδίου αυτού με τη βοήθεια του προγράμματος Primer 3 Input primer design.

Για το μικροοργανισμό *S. agalactiae*, τα εκκινητικά μόρια σχεδιάστηκαν βάσει αυτών που προτείνονται στη δημοσίευση των Kong *et al.* 2005 (**CFBA/CFBS**), με μόνη τροποποίηση την αφαίρεση μερικών βάσεων από το 3' άκρο του CFBS.

Οι συνθήκες των μεμονωμένων τεχνικών που εφαρμόστηκαν αρχικά για κάθε μικροοργανισμό παρουσιάζονται στον πίνακα 13. Το πρόγραμμα δοκιμάστηκε σε θερμοκρασίες υβριδισμού που κυμαίνονταν από 49-52°C ενώ οι υπόλοιπες συνθήκες της PCR παρέμειναν σταθερές.

Πίνακας 13. Αρχικό πρόγραμμα εφαρμογής μεμονωμένων τεχνικών για την ανάπτυξη της διπλής PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των *S.pyogenes*, *S. agalactiae* (Πρόγραμμα 1).

Πρόγραμμα 1	Συνθήκες	PCR mix
Αρχικό δοκιμαστικό πρόγραμμα μεμονωμένων τεχνικών PCR με primers SpyF/R, CFBA/CFBS	95°C 10min 95°C για 30sec 49-52°C για 30sec 35 κύκλοι 68°C για 40sec 68°C για 5min	Τελικός όγκος: 25μL 0,4μM κάθε primer 0,8mM dNTPs 1U Hot start Taq 1x buffer 2,5mM MgCl ₂ 5ng DNA template

2. ΣΤΑΔΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ: Συνδυασμός των μεμονωμένων τεχνικών σε μία πολλαπλή τεχνική- Προσαρμογή συνθηκών.

Για την ανάπτυξη της πολλαπλής τεχνικής δοκιμάστηκαν αρχικά ίσες συγκεντρώσεις εκκινητικών μορίων (0,4μM από κάθε εκκινητικό μόριο) από τα δύο ζεύγη στις συνθήκες του πίνακα 9. Τα μη ικανοποιητικά αποτελέσματα των συνθηκών αυτών οδήγησαν σε αυξομειώσεις των συγκεντρώσεων των εκκινητών, προκειμένου η απόδοση της αντίδρασης να είναι η ίδια και για τα δύο προϊόντα. Στο στάδιο αυτό, δεν απαιτήθηκαν περαιτέρω αλλαγές. Το πρόγραμμα 2, όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 14 αναφέρεται σε διπλή PCR για τους δύο μικροοργανισμούς στις ίδιες συνθήκες με αυτές του πίνακα 13 και μόνη αλλαγή τις συγκεντρώσεις των εκκινητικών μορίων στο PCR mix.

Πίνακας 14. Αρχικό πρόγραμμα εφαρμογής διπλής PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των *S.pyogenes*, *S.agalactiae* (Πρόγραμμα 2).

Πρόγραμμα 2	Συνθήκες	PCR mix
Αρχικό πρόγραμμα διπλής τεχνικής PCR με primers SpyF/R, CFBA/CFBS	95°C 10min	Τελικός όγκος: 25μL
	95°C για 30sec	0,1μM SpyF/R
	49°C για 30sec 35 κύκλοι	0,8μM CFBA/CFBS
	68°C για 40sec	0,8mM dNTPs
	68°C για 5min	1U Hot start Taq 1x buffer 2,5mM MgCl ₂ 5ng each DNA template

3. ΣΤΑΔΙΟ ΤΡΙΤΟ: Εφαρμογή της τεχνικής σε βακτηριακά στελέχη

Το παραπάνω πρόγραμμα (πρόγραμμα 2) εφαρμόστηκε στα 210 βακτηριακά στελέχη που είχαν ταυτοποιηθεί με κλασικές μεθόδους (παράγραφος 2.2.1, πίνακας 1).

4. ΣΤΑΔΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ: Εφαρμογή της τεχνικής απευθείας σε κλινικά δείγματα- Προσαρμογή συνθηκών.

Το πρόγραμμα 2 εφαρμόστηκε απευθείας σε δείγματα αίματος και ENY. Τα αποτελέσματα της εφαρμογής του προγράμματος αυτού στα δείγματα του αίματος δεν ήταν ικανοποιητικά. Η παραγωγή μη ειδικών προϊόντων στα δείγματα αίματος αποδόθηκε στην ύπαρξη μεγάλης ποσότητας γενωμικού υλικού στα δείγματα αυτά.

Στις δοκιμές που ακολούθησαν, εφαρμόστηκαν διαδοχικές αυξήσεις της θερμοκρασίας υβριδισμού από 50-60°C, με σκοπό την εξάλειψη των μη ειδικών προϊόντων, ενώ αλλαγές έγιναν και στους χρόνους του προγράμματος. Επιπλέον, απαιτήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος της πολυμεράσης στο PCR mix. Εκτός από την εξάλειψη των μη ειδικών προϊόντων, στόχος ήταν παράλληλα να μη μειωθεί η ευαισθησία της τεχνικής.

Στον πίνακα 15 παρουσιάζεται το τελικό πρόγραμμα εφαρμογής της τεχνικής της διπλής PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των *S.pyogenes* και *S.agalactiae* όπως διαμορφώθηκε σύμφωνα με τις αλλαγές που αναφέρθηκαν παραπάνω. Το τελικό πρόγραμμα βασίστηκε στη step-down PCR εφόσον εφαρμόστηκαν δύο θερμοκρασίες υβριδισμού.

Πίνακας 15. Τελικό πρόγραμμα εφαρμογής της διπλής PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των *S.pyogenes*, *S. agalactiae* (Πρόγραμμα 3).

Πρόγραμμα 3	Συνθήκες	PCR mix
Πρόγραμμα τεχνικής διπλής PCR με primers SpyF/R, CFBA/CFBS	95°C 10min	Τελικός όγκος: 25μL
	95°C για 20sec	0,1μM SpyF/R
	58°C για 20sec 10 κύκλοι	0,8μM CFBA/CFBS
	68°C για 40sec	0,8mM dNTPs
	95°C για 20sec	1U Hot start Taq
	56°C για 20sec 25 κύκλοι	1.4x buffer
68°C για 40sec	3,5mM MgCl ₂	
68°C για 5min	5μL each DNA template	

5. ΣΤΑΔΙΟ ΠΕΜΠΤΟ: Υπολογισμός ευαισθησίας

Για τον υπολογισμό της ευαισθησίας ανίχνευσης γενετικού υλικού, παρασκευάστηκαν διαδοχικές αραιώσεις (ποσοτήτων 5ng, 0.5ng, 0.05ng, 0.005ng) γενετικού υλικού που είχε απομονωθεί από 24ωρη καθαρή καλλιέργεια από κάθε βακτήριο-στόχο.

2.2.7.3 Εφαρμογή σε κλινικά δείγματα

Η τεχνική εφαρμόστηκε σε όσα από τα δείγματα ήταν θετικά για *Streptococcus* spp. σύμφωνα με την πολλαπλή PCR για τους μικροοργανισμούς *H.influenzae*, *S. aureus*, *P.aeruginosa*, *Streptococcus* spp., είτε προέρχονταν από ασθενείς με μηνιγγίτιδα ή βακτηριαμία είτε από ασθενείς με λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος.

Επιπλέον, προκειμένου να υπολογιστεί η ειδικότητα της τεχνικής όσον αφορά την εφαρμογή της σε κλινικά δείγματα, η τεχνική εφαρμόστηκε και στα 45 συνολικά δείγματα που είχαν ταυτοποιηθεί θετικά με τη μέθοδο των καλλιέργειών για κάποιον άλλο εκτός από τους εξεταζόμενους μικροοργανισμό (26 δείγματα της ομάδας II της παραγράφου 2.1.2.1 και 19 δείγματα της ομάδας II της παραγράφου 2.1.2.2)

2.2.7.4 Ειδικότητα και ευαισθησία

Μετά την εφαρμογή της τεχνικής σε κλινικά δείγματα, υπολογίστηκε η ευαισθησία και η ειδικότητά της, καθώς και η αρνητική και θετική αξία πρόβλεψης (positive and negative predicted value) βάσει των ταυτοποιημένων με καλλιέργειες δειγμάτων. Ο υπολογισμός έγινε με τη χρήση του λογισμικού 2-way Contingency Table Analysis (<http://statpages.org/ctab2x2.html>) όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.6.4.

2.2.7.5 Ανάγνωση αποτελεσμάτων

Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων έγινε με ηλεκτροφόρηση.

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2.5% (w/v) σε διάλυμα TBE 1X, παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου και αναγνώστηκαν κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία.

2.2.8 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Σε όσα από τα δείγματα του αναπνευστικού ήταν θετικά για *Streptococcus* spp. και αρνητικά στη διπλή PCR, καθώς και σε όσα ήταν θετικά για *H.influenzae* σύμφωνα με την προηγούμενη τετραπλή τεχνική, εφαρμόστηκε η τριπλή PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των *H. influenzae type b*, *S. pneumoniae*, *N.meningitidis* (Tzanakaki *et al.* 2005).

Η ανάπτυξη της συγκεκριμένης τεχνικής δεν αποτελεί μέρος της παρούσας διατριβής, παρά μόνο η εφαρμογή της στη συγκεκριμένη κατηγορία δειγμάτων. Στους πίνακες που ακολουθούν (πίνακες 16 και 17) παρουσιάζονται οι συνθήκες της αντίδρασης και τα αντιδραστήρια της PCR.

Πίνακας 16. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην τεχνική της πολλαπλής PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae type b* και θερμικός κυκλοποιητής (Tzanakaki *et al.* 2005).

Θερμικός κυκλοποιητής	Robocycler Gradient 96 Cycler (Stratagene, La Jolla, CA, USA)
0.6 μM of each primer	Sigma-Aldrich, (Seezle, Germany)
200μM dNTPs	ABgene (Epsom, UK)
1U Taq polymerase	ABgene (Epsom, UK)
1x buffer	
3mM MgCl ₂	
20 μL	DNA template
50μL	Τελικός όγκος

Πίνακας 17. Συνθήκες της τεχνικής της πολλαπλής PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae type b* (Tzanakaki *et al.* 2005).

Συνθήκες
95°C 5min
95°C για 25sec
57°C για 40sec 35 κύκλοι
72°C για 1min
72°C για 5min

2.2.9 ΠΟΛΛΑΠΛΗ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΙΣ ΜΑΚΡΟΛΙΔΕΣ-ΛΙΝΚΟΣΑΜΙΔΕΣ-ΣΤΡΕΠΤΟΓΡΑΜΜΙΝΗ Β ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΗ ΣΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ - ΣΥΓΧΩΝΕΥΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ *S.pyogenes* ΚΑΙ *S.agalactiae*.

2.2.9.1 Υλικά

2.2.9.1.1 Εκκινητικά μόρια

Οι αλληλουχίες των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάπτυξη της τριπλής PCR για την ανίχνευση γονιδίων αντοχής σε μακρολίδες-λινκοσαμίδες-στρεπτογραμμίνη Β, οι τροποποιήσεις τους και τα χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 18.

Πίνακας 18. Αλληλουχίες και χαρακτηριστικά των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν στην τεχνική της πολλαπλής PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση γονιδίων αντοχής σε μακρολίδες-λινκοσαμίδες-στρεπτιγραμμίνη Β.

Primer	Αλληλουχία 5'-3'	Γονίδιο	Tm (°C)	Μέγεθος προϊόντων (bp)
mefS	GGC AGG GCA AGC AGT ATC	<i>mef</i>	56	360
mefA	CTG TTC TTC TGG TAC TAA AAG TGG	<i>mef</i>	53	
ermtrS	TCA GGA AAA GGA CAT TTT ACC	<i>ermA/TR</i>	50	459
ermtrA	ATA CTT TTT GTA GTC CTT CTT	<i>ermA/TR</i>	47	
ermbS	TGG TTT TTG AAA GCC ATG	<i>ermB</i>	49	211
ermbA	GGA ACA TCT GTG GTA TGG	<i>ermB</i>	50	

2.2.9.1.2 Αντιδραστήρια PCR

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάπτυξη της τεχνικής, καθώς και ο θερμικός κυκλοποιητής είναι ίδια με αυτά που αναφέρονται στον πίνακα 5 της παραγράφου 2.2.6.1.2.

2.2.9.1.3 Θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες

Κάθε εφαρμογή της τεχνικής συμπεριλάμβανε θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά ποσότητα 5ng φωτομετρημένου γενετικού υλικού από κάθε βακτήριο που περιείχε το γονίδιο-στόχο, που απομονώθηκαν από 24ωρη καθαρή καλλιέργεια του μικροοργανισμού. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε γενετικό υλικό από δύο στελέχη *S. pneumoniae* καθένα από τα οποία περιείχε τα γονίδια *mef* και *ermB*, ένα στέλεχος *S. pyogenes* που περιείχε και το γονίδιο *ermTR* και ένα στέλεχος *S. agalactiae*.

Σαν αρνητικός μάρτυρας, για τον έλεγχο επιμολύνσεων ή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε δις απεσταγμένο νερό.

2.2.9.2 Πειραματικά στάδια ανάπτυξης της τεχνικής

Η παρούσα τεχνική αναπτύχθηκε αρχικά σαν τριπλή PCR για την ανίχνευση τριών γονιδίων που προσδίδουν αντοχή στις μακρολίδες-λινκοσαμίδες-στρεπτογραμμίνη Β και έπειτα συγχωνεύθηκε με τη διπλή PCR για την ανίχνευση των *S.pyogenes* και *S.agalactiae* σε πενταπλή PCR.

1. ΣΤΑΔΙΟ ΠΡΩΤΟ: Επιλογή εκκινητικών μορίων- Ανάπτυξη συνθηκών μεμονωμένων τεχνικών

Για την ανάπτυξη της τεχνικής της PCR για την ανίχνευση γονιδίων που προσδίδουν αντοχή στις μακρολίδες-λινκοσαμίδες-στρεπτογραμμίνη Β σε στρεπτόκοκκους, επιλέχθηκαν εκκινητικά μόρια από δημοσιευμένες εργασίες.

Τα εκκινητικά μόρια για τα γονίδια *mefA/E* (*mefS/mefA*) επιλέχθηκαν από τη δημοσίευση των Zeng *et al.* 2006. Από την ίδια δημοσίευση επιλέχθηκαν και τα εκκινητικά μόρια για το γονίδιο *ermB* (*ermbS/ermbA*), από τα οποία αφαιρέθηκαν μερικά νουκλεοτίδια από το 3' άκρο. Τα εκκινητικά μόρια για τα γονίδια *ermA/TR* (*ermatrA/ermatrS*) επιλέχθηκαν από τη δημοσίευση των Royart *et al.* 2003.

Κατά την πρώτη δοκιμή οι μεμονωμένες PCR εφαρμόστηκαν στο πρόγραμμα της διπλής PCR όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 19.

Πίνακας 19. Αρχικό πρόγραμμα εφαρμογής μεμονωμένων τεχνικών για την ανάπτυξη της τριπλής PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση γονιδίων που προσδίδουν αντοχή σε μακρολίδες-λινκοσαμίδες-στρεπτογραμμίνη Β (Πρόγραμμα 1).

Πρόγραμμα 1	Συνθήκες	PCR mix
	95°C 10min	Τελικός όγκος: 25μL
Πρόγραμμα δοκιμής μεμονωμένων PCR με primers <i>mefA/S</i> , <i>ermatrA/S</i> , <i>ermbA/S</i>	95°C για 20sec 58°C για 20sec 10 κύκλοι 68°C για 40sec 95°C για 20sec 56°C για 20sec 10 κύκλοι 68°C για 40sec 68°C για 5min	0,4μM each primer 0,8mM dNTPs 1U Hot start Taq 1x buffer 2,5mM MgCl ₂ 5ng DNA template

2. ΣΤΑΔΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ: Συνδυασμός των μεμονωμένων τεχνικών σε πολλαπλή τεχνική- Συγχώνευση με διπλή PCR για την ανίχνευση των *S.pyogenes* και *S.agalactiae*- Προσαρμογή συνθηκών.

Για την ανάπτυξη της τριπλής PCR εφαρμόστηκε αρχικά μίγμα ίσων συγκεντρώσεων εκκινητικών μορίων (0,4μM από κάθε εκκινητικό μόριο) στο πρόγραμμα 1. Τα μη ικανοποιητικά αποτελέσματα του προγράμματος αυτού οδήγησαν σε αλλαγές στις συγκεντρώσεις των εκκινητικών μορίων, στη συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος της πολυμεράσης και των dNTPs και τελικά στις θερμοκρασίες και τους χρόνους του προγράμματος. Το πρόγραμμα και οι συνθήκες όπως διαμορφώθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 20.

Πίνακας 20. Πρόγραμμα της τριπλής PCR για την ανίχνευση γονιδίων ανοχής στις μακρολίδες- λινκοσαμίδες-στρεπτογραμμίνη Β (Πρόγραμμα 2).

Πρόγραμμα 2	Συνθήκες	PCR mix
Πρόγραμμα τριπλής PCR με primers <i>mefA/S</i> , <i>ermatrA/S</i> , <i>ermbA/S</i>	95°C 10min	Τελικός όγκος: 25μL
	95°C για 20sec	0,05μM <i>mefA/S</i>
	58°C για 15sec 15 κύκλοι	0,6μM <i>ermatrA/S</i>
	68°C για 40sec	0,8μM <i>ermbA/S</i>
	95°C για 20sec	1mM dNTPs
	57°C για 15sec 20 κύκλοι	1U Hot start Taq
68°C για 40sec	1.4x buffer	
68°C για 5min	3,5mM MgCl ₂	
		5ng DNA template

Σε αυτό το στάδιο, έγινε η συγχώνευση των δύο τεχνικών σε μία πενταπλή με την προσθήκη στο PCR mix των εκκινητικών μορίων *SpyF/R* και *CFBA/S*. Οι τροποποιήσεις στις συγκεντρώσεις των υπόλοιπων αντιδραστηρίων διαμόρφωσαν τις τελικές συνθήκες του προγράμματος όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 21.

Πίνακας 21. Τελικό πρόγραμμα της πενταπλής PCR για την ανίχνευση γονιδίων αντοχής στις μακρολίδες-λινκοσαμίδες-στρεπτογραμμίνη B και των *S.pyogenes* και *S.agalactiae* (Πρόγραμμα 3).

Πρόγραμμα 3	Συνθήκες	PCR mix
Πρόγραμμα πενταπλής PCR με primers mefA/S, ermAtrA/S, ermB/S, SpyF/R, CFBA/S	95°C 10min	Τελικός όγκος: 25μL
	95°C για 20sec	0,05μM mefA/S
	58°C για 15sec 15 κύκλοι	0,6μM ermAtrA/S
	68°C για 40sec	1μM ermB/S
	95°C για 20sec	0,1μM SpyF/R
	57°C για 15sec 20 κύκλοι	0,8μM CFBA/S
	68°C για 40sec	1mM dNTPs
	68°C για 5min	1,5U Hot start Taq
		1.4x buffer
		3,5mM MgCl ₂
		5ng each DNA template

3. ΣΤΑΔΙΟ ΤΡΙΤΟ: Εφαρμογή της τεχνικής σε βακτηριακά στελέχη

Το πρόγραμμα 3 όπως διαμορφώθηκε τελικά εφαρμόστηκε στα 279 στελέχη στρεπτοκόκκων του πίνακα 2.

Η ευαισθησία στην ερυθρομυκίνη για 173 από τα παραπάνω στελέχη είχε προηγουμένως μετρηθεί με την κλασική μέθοδο της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (MIC, E-test). Για τα στελέχη *S.pyogenes* ελέγχθηκε η επαγόμενη αντοχή στην κλινταμυκίνη με τη μέθοδο του D-test.

4. ΣΤΑΔΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ: Εφαρμογή της τεχνικής απευθείας σε κλινικά δείγματα- Προσαρμογή συνθηκών.

Το πρόγραμμα 3 εφαρμόστηκε μόνο σε όσα από τα δείγματα ωτικών υγρών, βρογχικών εκκρίσεων και BAL ήταν θετικά για *Streptococcus* spp. ή *S. pneumoniae* ή *S.pyogenes* και κανέναν άλλο Gram θετικό κόκκο (π.χ. *S.aureus* ή *Enterococcus*) είτε στις καλλιέργειες, είτε στην PCR. Η τεχνική εφαρμόστηκε στις συγκεκριμένες κατηγορίες δειγμάτων καθώς αυτά προέρχονταν από ασθενείς με λοιμώξεις για τη θεραπεία των οποίων χορηγούνται οι μακρολίδες. Στα εξεταζόμενα δείγματα περιλήφθηκαν και αυτά στα οποία εκτός από κάποιον στρεπτόκοκκο είχε ανιχνευθεί

και κάποιος άλλος από τους εξεταζόμενους Gram αρνητικός μικροοργανισμός (π.χ. *N. meningitidis*, *P.aeruginosa*, *H.influenzae*).

Στο στάδιο αυτό δε χρειάστηκαν περαιτέρω μετατροπές του προγράμματος της πενταπλής τεχνικής.

5. ΣΤΑΔΙΟ ΠΕΜΠΤΟ: Υπολογισμός ευαισθησίας της πολλαπλής τεχνικής

Για τον υπολογισμό της ευαισθησίας ανίχνευσης γενετικού υλικού της τεχνικής, παρασκευάστηκαν διαδοχικές αραιώσεις (ποσότητες 5ng, 0.5ng, 0.05ng, 0.005ng) γενετικού υλικού που είχε απομονωθεί από 24ωρη καθαρή καλλιέργεια από κάθε βακτήριο που περιείχε κάποιο γονίδιο-στόχο.

2.2.9.3 Εφαρμογή σε κλινικά δείγματα

Η τεχνική εφαρμόστηκε συνολικά σε 166 δείγματα (ωτικά εκκρίματα n=120, BAL n= 42, βρογχικές εκκρίσεις n=4) του αναπνευστικού συστήματος που ήταν θετικά μόνο για *Streptococcus* spp. ή *S. pneumoniae* ή *S.pyogenes* και για κανέναν άλλο Gram θετικό κόκκο και σε όλα τα στελέχη στρεπτοκόκκων.

Η εφαρμογή της τεχνικής σε δείγματα ασθενών με μηνιγγίτιδα δε θεωρήθηκε χρήσιμη, εφόσον οι μακρολίδες δε διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και δεν αποτελούν φάρμακο επιλογής για τη λοίμωξη.

2.2.9.4 Ειδικότητα

Ο υπολογισμός της ειδικότητας της τεχνικής βασίστηκε στη σύγκριση των αποτελεσμάτων της με αυτά της κλασικής μεθόδου υπολογισμού της αντοχής με E-test στα στελέχη.

2.2.9.5 Ανάγνωση αποτελεσμάτων

Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων έγινε με ηλεκτροφόρηση.

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 3% (w/v) σε διάλυμα TBE 1X, παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου και αναγνώστη κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

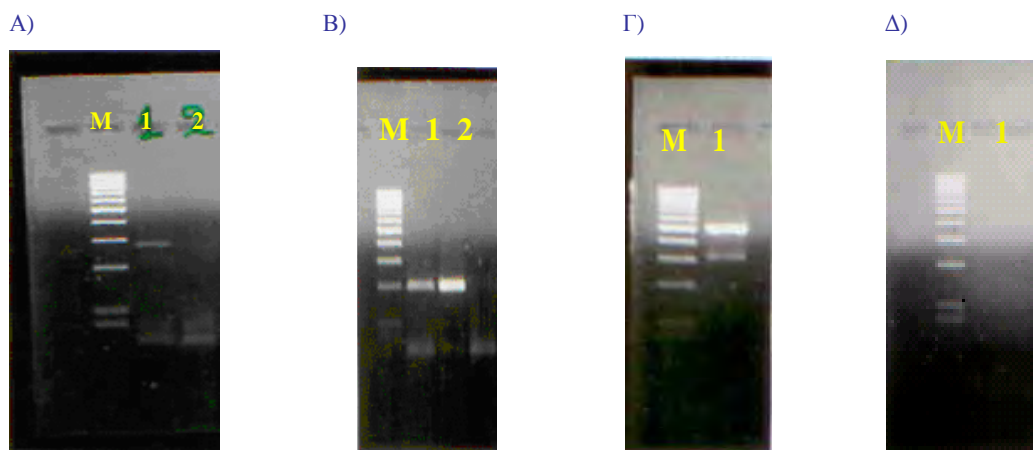
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ3.1 ΠΟΛΛΑΠΛΗ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ *H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* και
Streptococcus spp.

3.1.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. ΣΤΑΔΙΟ ΠΡΩΤΟ: Επιλογή εκκινητικών μορίων- Ανάπτυξη συνθηκών
μεμονωμένων τεχνικών

Το αρχικό πρόγραμμα δοκιμής των μεμονωμένων τεχνικών (πρόγραμμα 1, πίνακας 6) με τα εκκινητικά μόρια Str1/2 (Picard F. *et al.* 2004), nuc 1/2 (Zhang K. *et al.* 2004), Flu F/R (Balganesh *et al.* 2000), PAL 1/2 (De Vos *et al.* 1997), έδωσε τα αναμενόμενα προϊόντα μεγέθους 279bp και 197bp μόνο στις αντιδράσεις για τους μικροοργανισμούς *S. aureus* και *Streptococcus* spp. αντίστοιχα (εικόνα 18Α, διαδρομή 1 και 18Β, διαδρομές 1 και 2).

Εικόνα 18. Αποτελέσματα της πρώτης δοκιμής των μεμονωμένων τεχνικών για τους α) *S.aureus* β) *Streptococcus* spp. γ) *P. aeruginosa* δ) *H.influenzae*.



M: Μάρτυρας μοριακού βάρους (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder. Fermentas)

Για το μικροοργανισμό *P.aeruginosa*, εκτός από το επιθυμητό προϊόν μεγέθους 504bp έδωσε και ένα επιπλέον μη ειδικό προϊόν μεγέθους ~300bp (εικόνα 18Γ, διαδρομή 1), ενώ κανένα προϊόν δεν παρατηρήθηκε για τον *H. influenzae* (εικόνα 18Δ, διαδρομή 1).

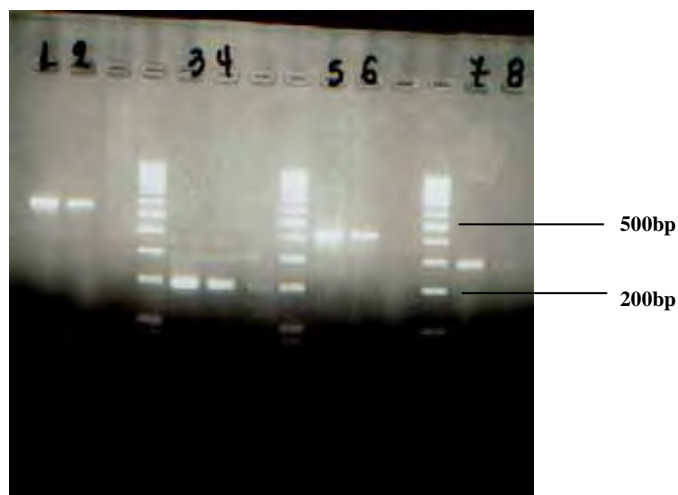
Όπως αναφέρθηκε και στην ανάπτυξη της μεθοδολογίας, οι τροποποιήσεις που δοκιμάστηκαν σε αυτό το αρχικό πρόγραμμα δεν επέφεραν το επιθυμητό αποτέλεσμα, δηλαδή τη δυνατότητα λειτουργίας τεσσάρων αντιδράσεων κάτω από τις ίδιες συνθήκες.

Συνεπώς, σχεδιάστηκαν δύο νέα ζεύγη εκκινητικών μορίων, HinL/HinR για τον *H. influenzae* και PsaeL/PsaeR για την *P. aeruginosa*, ενώ παράλληλα δημιουργήθηκαν νέες συνθήκες για τις μεμονωμένες αντιδράσεις, βασισμένες στη λογική της step down PCR (εφαρμογή δύο θερμοκρασιών υβριδισμού), έγινε αλλαγή του ενζύμου της πολυμεράσης σε Hot start Taq polymerase και αυξήθηκε η συγκέντρωση των εκκινητικών μορίων στο PCR mix (πρόγραμμα 2, πίνακας 7, κεφάλαιο 2).

Με το πρόγραμμα 2 και τις συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων όπως περιγράφονται στον πίνακα 7 προέκυψαν θετικά αποτελέσματα και στις τέσσερις μεμονωμένες αντιδράσεις. Επιπλέον, με το παραπάνω πρόγραμμα και οι τέσσερις αντιδράσεις έδωσαν προϊόντα όταν δοκιμάστηκαν με διαδοχικές αραιώσεις βακτηριακού γενετικού υλικού ποσότητας από 5ng ως και 50pg.

Στην εικόνα 19 παρατηρούνται τα αποτελέσματα εφαρμογής του προγράμματος 2 στις τέσσερις μεμονωμένες αντιδράσεις για καθέναν από τους μικροοργανισμούς: για τον *H. influenzae* προέκυψε το αναμενόμενο προϊόν μεγέθους 538bp για ποσότητα βακτηριακού γενετικού υλικού ίση με 5ng (διαδρομή 1) και 50pg (διαδρομή 2), για τους *Streptococcus* spp. προέκυψε το αναμενόμενο προϊόν μεγέθους 197bp για ποσότητα βακτηριακού γενετικού υλικού ίση με 5ng (διαδρομή 3) και 50pg (διαδρομή 4), για την *P.aeruginosa* προέκυψε το αναμενόμενο προϊόν μεγέθους 418bp για ποσότητα βακτηριακού γενετικού υλικού ίση με 5ng (διαδρομή 5) και 50pg (διαδρομή 6) και για το *S.aureus* προέκυψε το αναμενόμενο προϊόν μεγέθους 279bp για ποσότητα βακτηριακού γενετικού υλικού ίση με 5ng (διαδρομή 7) και 50pg (διαδρομή 8).

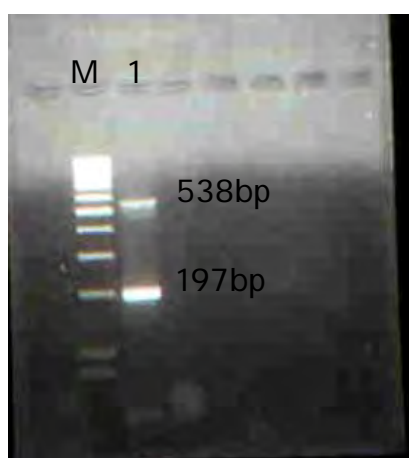
Εικόνα 19. Αποτελέσματα συνθηκών του προγράμματος 2 (πίνακας 7, κεφάλαιο 2).



2. ΣΤΑΔΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ: Συνδυασμός των μεμονωμένων τεχνικών σε μία πολλαπλή τεχνική- Προσαρμογή συνθηκών.

Στην εικόνα 20 παρατηρούνται τα αποτελέσματα της πρώτης εφαρμογής του μίγματος που περιείχε ίσες συγκεντρώσεις των τεσσάρων ζευγών εκκινητικών μορίων για τη multiplex PCR με το πρόγραμμα 2. Στη διαδρομή 1, παρατηρούνται δύο μόνο από τα αναμενόμενα προϊόντα για τους μικροοργανισμούς *H. influenzae* (538bp) και *Streptococcus* spp. (197bp), ενώ απουσιάζουν τα ενδιάμεσα προϊόντα για τους μικροοργανισμούς *P. aeruginosa* (418bp) και *S. aureus* (279bp).

Εικόνα 20. Αποτελέσματα της πρώτης εφαρμογής του μίγματος με ίσες συγκεντρώσεις εκκινητικών μορίων.

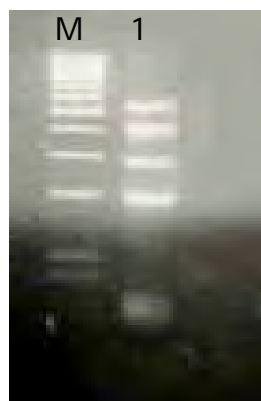


M: Μάρτυρας μοριακού βάρους (100bp ladder)

Τα μη ικανοποιητικά αποτελέσματα αυτής της πρώτης δοκιμής της πολλαπλής PCR οδήγησαν σε μια σειρά διαδοχικών αλλαγών στο πρόγραμμα των συνθηκών -όπως μείωση της θερμοκρασίας υβριδισμού κατά δύο βαθμούς και στα δύο στάδια, αύξηση του συνολικού αριθμού κύκλων της αντίδρασης σε 40, αύξηση του χρόνου επέκτασης στα 2min και μείωση της θερμοκρασίας στο στάδιο της επέκτασης στους 68°C-, καθώς και στις συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων -αυξομειώσεις στις συγκεντρώσεις των εκκινητικών μορίων, αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου και των dNTPs.

Οι παραπάνω τροποποιήσεις (πρόγραμμα 3, όπως καταγράφονται και στον πίνακα 8, κεφάλαιο 2) είχαν τελικά ως αποτέλεσμα την παραγωγή τεσσάρων προϊόντων από ένα PCR mix. Στη διαδρομή 1 της εικόνας 21, παρατηρούνται τα αποτελέσματα εφαρμογής του προγράμματος 3 της πολλαπλής PCR, όπου τα τέσσερα προϊόντα εμφανίζονται σχεδόν με την ίδια ένταση. Η παρουσία του κάθε προϊόντος φαίνεται να μην επηρεάζει την παρουσία του άλλου και δεν παράγονται μη ειδικά προϊόντα .

Εικόνα 21. Αποτελέσματα εφαρμογής του προγράμματος 3 (πίνακας 8, κεφάλαιο 2) στην τετραπλή PCR.



M: Μάρτυρας μοριακού βάρους (100bp ladder)

3. ΣΤΑΔΙΟ ΤΡΙΤΟ: Εφαρμογή της τεχνικής σε βακτηριακά στελέχη

Κατά την εφαρμογή της τεχνικής στα βακτηριακά στελέχη του πίνακα 1 (κεφάλαιο 2) ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο της PCR: 60 στελέχη *S. aureus*, 27 στελέχη *Streptococcus* spp., 64 στελέχη *P. aeruginosa* τα οποία είχαν ταυτοποιηθεί με τις κλασικές μεθόδους. Αντίθετα, για το μικροοργανισμό *H. influenzae*, ταυτοποιήθηκαν με την PCR μόνο 11 από τα 20 στελέχη τα οποία είχαν θετική καλλιέργεια.

Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητικών μορίων F1/R1, που είχε σχεδιαστεί εκ νέου (κεφάλαιο 2, παράγραφος 2.2.6.2) για τον *H. influenzae*, το οποίο προσαρμόστηκε στο πρόγραμμα 3 χωρίς περαιτέρω τροποποιήσεις. Σαν αποτέλεσμα, το νέο ζεύγος εκκινητών ανίχνευσε επιτυχώς τα 19 από τα 20 στελέχη *H. influenzae*, ενώ δεν επηρέασε την παραγωγή των υπόλοιπων προϊόντων. Τα αποτελέσματα εφαρμογής της πολλαπλής PCR ύστερα από την αλλαγή του ζεύγους εκκινητών για τον *H. influenzae* παρουσιάζονται στον πίνακα 22.

Πίνακας 22. Αποτελέσματα εφαρμογής σε βακτηριακά στελέχη του προγράμματος 3 της τετραπλής PCR με το νέο ζεύγος εκκινητών για τον *H. influenzae*.

Στέλεχη	Αριθμός στελεχών	PCR θετικά	PCR αρνητικά
<i>Haemophilus influenzae</i>	20	19	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	60	60	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	10	10	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	10	10	-
<i>Streptococcus spp.</i>	7	7	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	64	64	-

Η παραπάνω τεχνική εφαρμόστηκε επιπλέον σε άλλα 39 βακτηριακά στελέχη που ανήκαν σε άλλα γένη ή είδη, όπως είχαν ταυτοποιηθεί με τις κλασικές μεθόδους (πίνακας 1). Η PCR ήταν αρνητική για όλα αυτά τα βακτηριακά στελέχη, όπως παρουσιάζεται και στον πίνακα 23.

Τα αποτελέσματα εφαρμογής της πολλαπλής τεχνικής στα βακτηριακά στελέχη σε αυτό το στάδιο, επιβεβαιώνουν την ειδικότητα των εκκινητικών μορίων για το γενωμικό υλικό των μικροοργανισμών που επιλέχθηκαν.

Στην εικόνα 22, με τα αποτελέσματα εφαρμογής του προγράμματος 3 της πολλαπλής PCR σε βακτηριακά στελέχη, δεν παρατηρούνται προϊόντα στις διαδρομές 1 και 3 για τα στελέχη *E.coli*, ενώ τα αναμενόμενου μεγέθους προϊόντα παράγονται στις διαδρομές 2 και 4 για τα στελέχη *S.aureus*, στις διαδρομές 5 και 6 για τα στελέχη *P.aeruginosa*, στη διαδρομή 7 για το στέλεχος *S.agalactiae* και στις διαδρομές 8-10 για τα στελέχη *S. pyogenes*. Η διαδρομή 11, στην οποία δεν παρατηρείται προϊόν αντιστοιχεί στον αρνητικό μάρτυρα.

Πίνακας 23. Αποτελέσματα εφαρμογής του προγράμματος 3 της τετραπλής PCR σε βακτηριακά στελέχη που ανήκαν σε άλλα γένη ή είδη.

Στέλεχη	Αριθμός στελεχών	PCR θετικά	PCR αρνητικά
<i>Neisseria meningitidis</i>	5	-	5
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	7	-	7
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7	-	7
<i>Staphylococcus auricularis</i>	1	-	1
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	2	-	2
<i>Enterococcus spp.</i>	2	-	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	-	3
<i>Echerichia coli</i>	2	-	2
<i>Gardnerella vaginalis</i>	2	-	2
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	-	1
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	1	-	1
<i>Salmonella spp.</i>	1	-	1
<i>Proteus spp.</i>	1	-	1
<i>Citrobacter spp.</i>	1	-	1
<i>Acinetobacter spp.</i>	3	-	3

Εικόνα 22. Αποτελέσματα εφαρμογής του προγράμματος 3 σε βακτηριακά στελέχη.



M: Μάρτυρας μοριακού βάρους (100bp ladder)

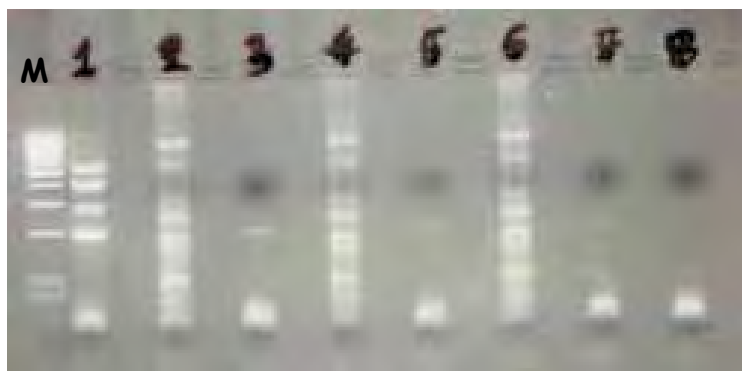
C: Θετικός μάρτυρας

4. ΣΤΑΔΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ: Εφαρμογή της τεχνικής απευθείας σε κλινικά δείγματα- Προσαρμογή συνθηκών.

Το πρόγραμμα 3 (πίνακας 8, κεφάλαιο 2) με τους νέους εκκινητές F1/R1 για τον *H.influenzae* εφαρμόστηκε σε κλινικά δείγματα αίματος και ENY. Όπως φαίνεται

στην εικόνα 23, στις διαδρομές 2, 4 και 6 που αντιστοιχούν σε δείγματα αίματος, παρατηρούνται πολλαπλά μη ειδικά προϊόντα, ενώ στις διαδρομές 3, 5 και 7 που αντιστοιχούν σε δείγματα ENY παρατηρείται μόνο το θετικό προϊόν. Η διαδρομή 1 αντιστοιχεί στο θετικό μάρτυρα, ενώ η διαδρομή 8, στην οποία δεν παρατηρείται προϊόν αντιστοιχεί στον αρνητικό μάρτυρα.

Εικόνα 23. Αποτελέσματα της εφαρμογής του προγράμματος 3 σε κλινικά δείγματα αίματος και ENY.



M: Μάρτυρας μοριακού βάρους (100bp ladder)

Το πρόβλημα με τα μη ειδικά προϊόντα στα δείγματα αίματος αποδόθηκε στην παρουσία μεγάλης ποσότητας γενωμικού υλικού (ανθρώπινο γενωμικό υλικό) σε αυτά και σε λάθος υβριδισμό των εκκινητικών μορίων λόγω επιλογής λανθασμένων συνθηκών. Για το λόγο αυτό, θεωρήθηκε απαραίτητη η δημιουργία πιο «αυστηρών» συνθηκών, ειδικά στους πρώτους κύκλους της αντίδρασης που επιτεύχθηκε με την άνοδο της θερμοκρασίας υβριδισμού και στα δύο στάδια της αντίδρασης διαδοχικά από τους 55 ως τους 63°C.

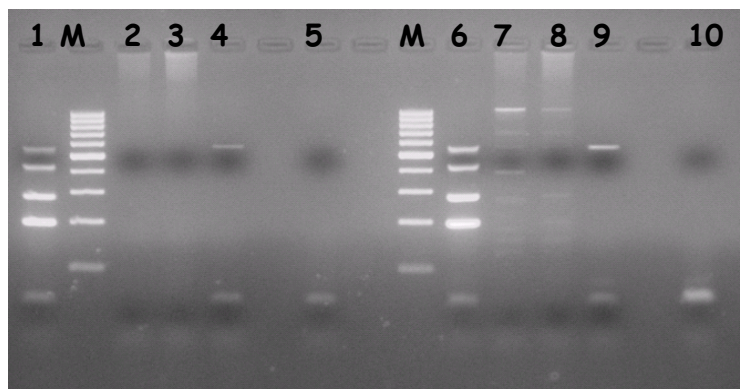
Η άνοδος της θερμοκρασίας υβριδισμού, επηρέασε σημαντικά την ευαισθησία της αντίδρασης, ειδικά για τα μεγαλύτερα σε μέγεθος προϊόντα. Για το λόγο αυτό έγινε προσπάθεια δημιουργίας ενός προγράμματος θερμοκρασιών με συνθήκες τέτοιες που να μην επηρεάζεται η ευαισθησία των προϊόντων και παράλληλα να μην παράγονται μη ειδικά προϊόντα. Οι αλλαγές στη θερμοκρασία υβριδισμού συνδυάστηκαν με άλλες μετατροπές του προγράμματος (μείωση του συνολικού αριθμού των κύκλων της αντίδρασης από 40 σε 36, μείωση των χρόνων αποδιάταξης και υβριδισμού στο πρώτο στάδιο της αντίδρασης) και των συγκεντρώσεων των αντιδραστηρίων (αλλαγές στις συγκεντρώσεις των εκκινητικών μορίων, αλλαγές στη συγκέντρωση

του ρυθμιστικού διαλύματος της πολυμεράσης (buffer) και συνεπώς στη συγκέντρωση του $MgCl_2$) (πρόγραμμα 4, πίνακας 9, κεφάλαιο 2).

Τα αποτελέσματα των παραπάνω τροποποιήσεων κρίθηκαν ικανοποιητικά, εφόσον εμποδίστηκε η παραγωγή μη ειδικών προϊόντων στα κλινικά δείγματα αίματος και ταυτόχρονα η ευαισθησία ανίχνευσης γενετικού υλικού παρέμεινε στα ίδια επίπεδα.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 24, μία από τις σημαντικότερες τροποποιήσεις με αποτελεσματικότητα στην εξαφάνιση των μη ειδικών προϊόντων ήταν η αλλαγή της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος της πολυμεράσης (buffer). Η αλλαγή της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος στο PCR mix από 1x (διαδρομές 6-10) σε 1.4x (διαδρομές 1-5) και συνεπώς της συγκέντρωσης του $MgCl_2$ από 2.5mM σε 3.5mM, είχε θετική επίδραση ιδιαίτερα στα αποτελέσματα των κλινικών δειγμάτων. Στις διαδρομές 7 και 8 που αντιστοιχούν σε δείγματα αίματος που δοκιμάστηκαν σε PCR mix με συγκέντρωση buffer 1x και $MgCl_2$ 2.5mM παρατηρούνται πολλαπλά μη ειδικά προϊόντα, τα οποία δεν εμφανίζονται στις διαδρομές 2 και 3 που αντιστοιχούν στα ίδια δείγματα αίματος σε PCR mix με συγκέντρωση buffer 1.4x και $MgCl_2$ 3.5mM. Επιπλέον, το προϊόν γενετικού υλικού του *H.influenzae*, ποσότητας ίση με 5pg εμφανίζεται μεν με πιο αυξημένη απόδοση στη διαδρομή 9, που αντιστοιχεί σε PCR mix με συγκέντρωση buffer 1x και $MgCl_2$ 2.5mM, η απόδοσή του όμως παραμένει ικανοποιητική στη διαδρομή 4 που αντιστοιχεί σε PCR mix με συγκέντρωση buffer 1.4x και $MgCl_2$ 3.5mM. Οι διαδρομές 1 και 6 αντιστοιχούν στους θετικούς μάρτυρες και οι διαδρομές 5 και 10, στις οποίες δεν παρατηρούνται προϊόντα, αντιστοιχούν σε αρνητικούς μάρτυρες.

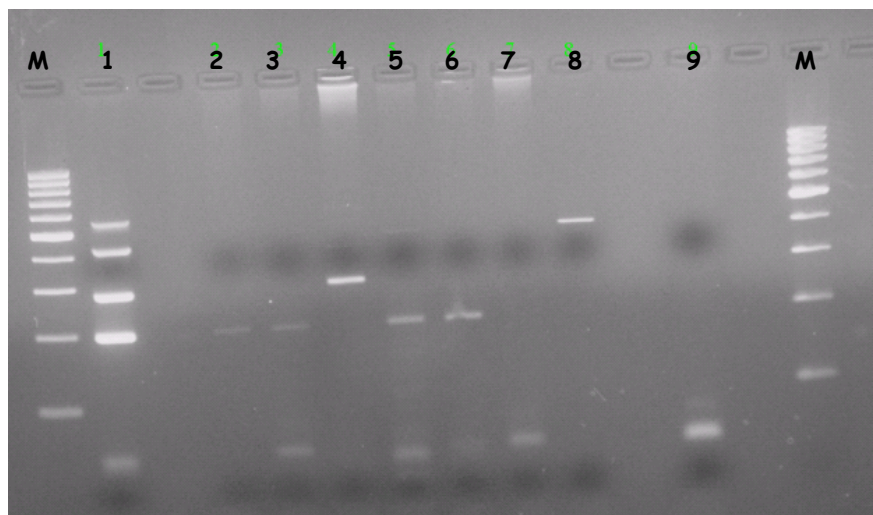
Εικόνα 24. Αποτελέσματα της αλλαγής συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος της πολυμεράσης και του $MgCl_2$.



M: Μάρτυρας μοριακού βάρους (100bp ladder)

Η εφαρμογή του προγράμματος του πίνακα 9 επαληθεύτηκε σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων αίματος. Στην εικόνα 25, δεν παρατηρούνται μη ειδικά προϊόντα στα δείγματα αίματος, παρά μόνο ειδικά προϊόντα σε κάποια αυτά. Στις διαδρομές 2, 3, 5, 6 παρατηρούνται θετικά προϊόντα σε δείγματα αίματος θετικά για *Streptococcus* spp., αντίστοιχα στη διαδρομή 4 παρατηρείται θετικό προϊόν για δείγμα θετικό για *S. aureus*. Η διαδρομή 7, στην οποία δεν παρατηρείται κανένα προϊόν αντιστοιχεί σε δείγμα αίματος αρνητικό και η διαδρομή 9 στον αρνητικό μάρτυρα. Τέλος, η διαδρομή 1 αντιστοιχεί στο θετικό μάρτυρα και η διαδρομή 8 στο προϊόν γενετικού υλικού *P.aeruginosa* ποσότητας ίση με 50pg.

Εικόνα 25. Αποτελέσματα εφαρμογής του προγράμματος 4 (πίνακας 9, κεφάλαιο 2) σε κλινικά δείγματα αίματος.



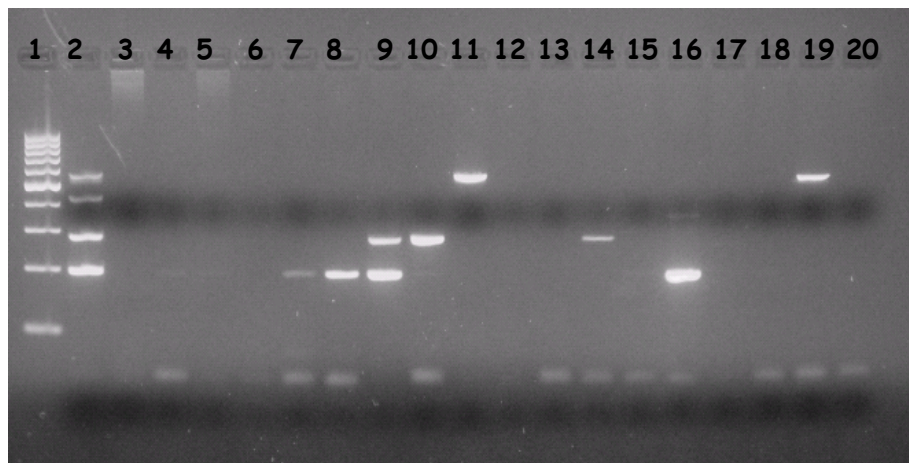
M: Μάρτυρας μοριακού βάρους (100bp ladder)

Τα ικανοποιητικά αποτελέσματα των δειγμάτων αίματος οδήγησαν στην εφαρμογή του προγράμματος 4 του πίνακα 9 και στα υπόλοιπα κλινικά δείγματα.

Στην εικόνα 26 φαίνονται τα αποτελέσματα της εφαρμογής του προγράμματος 4 του πίνακα 9 σε κλινικά δείγματα αίματος αρνητικά (διαδρομές 3 και 5), σε δείγματα ENY αρνητικά (διαδρομές 4 και 6), σε δείγματα ωτικών εκκρινμάτων θετικά για *Streptococcus* spp. (διαδρομές 7, 8 και 16), για *S. aureus* (διαδρομές 10 και 14), για *H. influenzae* (διαδρομές 11 και 19), σε δείγματα ωτικών εκκρινμάτων αρνητικά (διαδρομές 12, 13, 15, 17, και 18) και σε ένα δείγμα ωτικού υγρού θετικό για *Streptococcus* spp. και *S. aureus* (διαδρομή 9). Οι διαδρομές 2 και 20 αντιστοιχούν

στο θετικό και στον αρνητικό μάρτυρα και η διαδρομή 1 στο μάρτυρα μοριακού βάρους (100bp ladder).

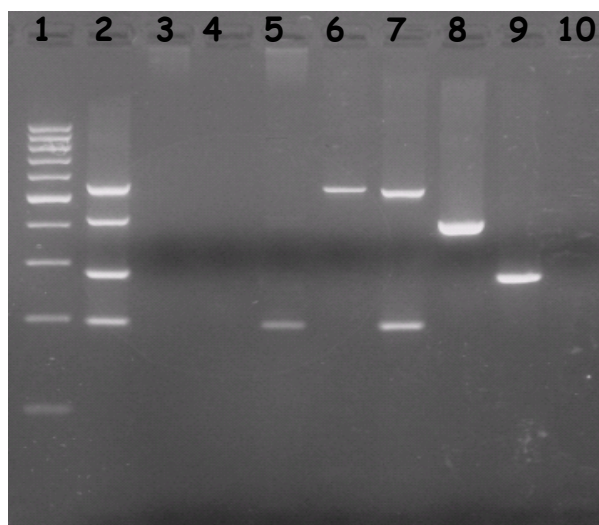
Εικόνα 26. Αποτελέσματα εφαρμογής του προγράμματος 4 (πίνακας 9, κεφάλαιο 2) σε κλινικά δείγματα αίματος, ENY και ωτικών εκκρινμάτων.



Για την εφαρμογή της τεχνικής σε μεγάλο αριθμό κλινικών δειγμάτων θεωρήθηκε αναγκαία η μείωση του συνολικού όγκου της αντίδρασης στα 25μL, με σκοπό τη μείωση του συνολικού κόστους. Η αλλαγή αυτή επηρέασε σημαντικά την αντίδραση με την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων. Οι αλλαγές που ακολούθησαν, όσον αφορά το πρόγραμμα (αύξηση της θερμοκρασίας υβριδισμού κατά ένα βαθμό και στα δύο στάδια, μείωση του χρόνου υβριδισμού στο πρώτο στάδιο της αντίδρασης, μείωση του χρόνου επέκτασης κατά 30'' και στα δύο στάδια της αντίδρασης) και τις συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων (αυξομειώσεις στις συγκεντρώσεις των εκκινητών, μείωση της συγκέντρωσης του ενζύμου) κατέληξαν στη δημιουργία του τελικού προγράμματος εφαρμογής της τεχνικής (πρόγραμμα 5) όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 10 του κεφαλαίου 2.

Στην εικόνα 27 παρουσιάζονται κάποια από τα αποτελέσματα της εφαρμογής του τελικού προγράμματος της τεχνικής σε κλινικά δείγματα αίματος, ένα αρνητικό και ένα θετικό για *Streptococcus* spp. (διαδρομές 3 και 5 αντίστοιχα), ENY, ένα αρνητικό και ένα θετικό για *H.influenzae* (διαδρομές 4 και 6 αντίστοιχα), δείγματα ωτικών εκκρινμάτων, ένα θετικό για *H. influenzae* και *Streptococcus* spp. (διαδρομή 7) και ένα θετικό για *S.aureus* (διαδρομή 9) και βρογχικών εκκρίσεων θετικό για *P. aeruginosa* (διαδρομή 8). Στις διαδρομές 2 και 10, φαίνονται ο θετικός και αρνητικός μάρτυρας αντίστοιχα, ενώ στη διαδρομή 1 φαίνεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους (100bp ladder).

Εικόνα 27. Αποτελέσματα εφαρμογής του τελικού προγράμματος της τετραπλής τεχνικής (πίνακας 10, κεφάλαιο 2) σε κλινικά δείγματα.



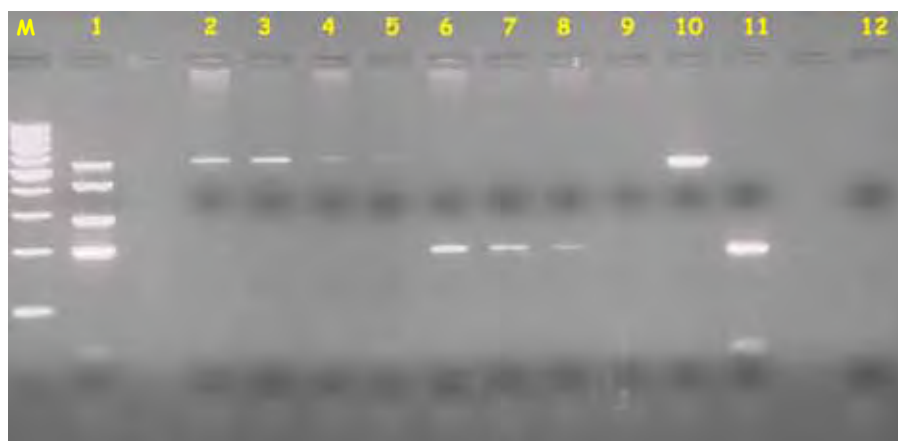
5. ΣΤΑΔΙΟ ΠΕΜΠΤΟ: Υπολογισμός ειδικότητας και ευαισθησίας της πολλαπλής PCR.

Στόχος των όποιων τροποποιήσεων έγιναν κατά τη διάρκεια ανάπτυξης της τεχνικής, ήταν η διατήρηση της ευαισθησίας της, δηλαδή η δυνατότητα ανίχνευσης χαμηλών συγκεντρώσεων γενετικού υλικού. Οι διαδοχικές αραιώσεις της ποσότητας του γενετικού υλικού από 5ng -5pg που παρασκευάστηκαν από καθαρό καλλιέργημα καθενός από τους τέσσερις μικροοργανισμούς όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.6.2, δοκιμάστηκαν στην τεχνική της πολλαπλής PCR. Στην πολλαπλή PCR, και οι τέσσερις μικροοργανισμοί έδωσαν προϊόν ως και την ποσότητα των 5pg.

Από τα δείγματα αίματος που ελήφθησαν από υγιές άτομο και μολύνθηκαν με γενετικό υλικό από τους μικροοργανισμούς *Streptococcus* spp. και *H.influenzae*, απομονώθηκε γενετικό υλικό περιεκτικότητας 0,05ng/μL και 0,005ng/μL σε βακτηριακό γενετικό υλικό από κάθε μικροοργανισμό, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.6.2. Τα αποτελέσματα της δοκιμής όγκων 1μL και 10μL από καθένα από τα δείγματα στην τεχνική της πολλαπλής PCR φαίνονται στην εικόνα 28. Στις διαδρομές 2 και 3 φαίνονται τα αποτελέσματα της δοκιμής 10μL και 1μL αντίστοιχα από το δείγμα αίματος περιεκτικότητας 0,05ng/μL γενετικού υλικού *H.influenzae*, ενώ στις διαδρομές 4 και 5 φαίνονται τα αποτελέσματα της δοκιμής 10μL και 1μL αντίστοιχα από το δείγμα αίματος περιεκτικότητας 0,005ng/μL γενετικού υλικού *H.influenzae*. Στις διαδρομές 6 και 7 φαίνονται τα αποτελέσματα της δοκιμής 10μL

και 1μL αντίστοιχα από το δείγμα αίματος περιεκτικότητας 0,05ng/μL γενετικού υλικού *Streptococcus* spp. και στις διαδρομές 8 και 9 φαίνονται τα αποτελέσματα της δοκιμής 10μL και 1μL αντίστοιχα από το δείγμα αίματος περιεκτικότητας 0,005ng/μL γενετικού υλικού *Streptococcus* spp. Στη διαδρομή 9 το βακτηριακό γενετικό υλικό φαίνεται πολύ αχνά. Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε πως η ευαισθησία της αντίδρασης είναι υψηλή, καθώς ανιχνεύονται μέχρι και 0,005ng βακτηριακού γενετικού υλικού ανά μL γενετικού υλικού που χρησιμοποιείται στην PCR. Επιπλέον, η δοκιμή αυτή καθόρισε και την ποσότητα του γενετικού υλικού που προστίθεται στο PCR mix. Εφόσον η ποσότητα των 0,005ng/μL ανιχνεύεται είτε δοκιμαστούν 10μL, είτε 1μL γενετικού υλικού στην PCR, θεωρήθηκε αρκετή η ποσότητα των 5μL γενετικού υλικού από κάθε κλινικό δείγμα στο PCR mix. Στις διαδρομές 10 και 11 φαίνονται τα αποτελέσματα εφαρμογής ποσότητας 0,5ng γενετικού υλικού στελέχους *H.influenzae* και *Streptococcus* spp. αντίστοιχα. Στις διαδρομές 1 και 12 φαίνονται ο θετικός και αρνητικός μάρτυρας αντίστοιχα.

Εικόνα 28. Αποτελέσματα υπολογισμού της ευαισθησίας ανίχνευσης της πολλαπλής τεχνικής με δοκιμή σε κλινικά δείγματα αίματος που περιέχουν μετρημένη ποσότητα βακτηριακού γενετικού υλικού.



M: Μάρτυρας μοριακού βάρους (100bp ladder)

3.1.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

3.1.2.1 Κλινικά δείγματα ασθενών με βακτηριακή μηνιγγίτιδα ή βακτηριαιμία

Από τα 439 περιστατικά βακτηριακής μηνιγγίτιδας/βακτηριαιμίας που εξετάστηκαν, τα 151 (περίπου 35%) επιβεβαιώθηκαν ως θετικά για κάποιον από τους τέσσερις προς ανίχνευση μικροοργανισμούς με τη μέθοδο της πολλαπλής PCR. Στον πίνακα 24 παρουσιάζεται ανά έτος ο αριθμός των επιβεβαιωμένων με την τεχνική της πολλαπλής PCR περιστατικών βακτηριακής μηνιγγίτιδας/βακτηριαιμίας και ο αριθμός των πιθανών περιστατικών βακτηριακής μηνιγγίτιδας/βακτηριαιμίας.

Πίνακας 24. Αριθμός των πιθανών και επιβεβαιωμένων περιστατικών βακτηριακής μηνιγγίτιδας/βακτηριαιμίας ανά έτος.

ΕΤΟΣ	ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ/ΣΗΨΑΙΜΙΑΣ		
	ΠΙΘΑΝΑ (PCR αρνητικά)	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΜΕΝΑ (PCR θετικά)	ΣΥΝΟΛΟ
2003	19 (86,37%)	3 (13,67%)	22
2004	36 (81,82%)	8 (18,18%)	44
2005	57 (89,06%)	7 (10,94%)	64
2006	33 (53,23%)	29 (46,77%)	62
2007	90 (73,17%)	33 (26,83%)	123
2008	42 (47,73%)	46 (52,27%)	88
2009	11 (30,56%)	25 (69,44%)	36
ΣΥΝΟΛΟ	288 (65,6%)	151 (34,4%)	439

Από τα 151 επιβεβαιωμένα θετικά περιστατικά βακτηριακής μηνιγγίτιδας/βακτηριαιμίας, 123 ταυτοποιήθηκαν θετικά για *Streptococcus* spp., 8 ταυτοποιήθηκαν θετικά για *S.aureus*, 11 ταυτοποιήθηκαν θετικά για *H.influenzae* και 9 ταυτοποιήθηκαν θετικά για *P.aeruginosa*. Στον πίνακα 25 παρουσιάζεται αναλυτικά ο αριθμός των θετικών περιστατικών ανά μικροοργανισμό και έτος.

Πίνακας 25. Αριθμός των θετικών περιστατικών βακτηριακής μηνιγγίτιδας ή/και βακτηριαμίας ανά μικροοργανισμό και έτος.

ΕΤΟΣ	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>S.aureus</i>	<i>H.influenzae</i>	<i>P.aeruginosa</i>	ΣΥΝΟΛΟ
2003	3	-	-	-	3
2004	8	-	-	-	8
2005	5	1	1		7
2006	26	1	1	1	29
2007	25	2	3	3	33
2008	35	3	4	4	46
2009	21	1	2	1	25
ΣΥΝΟΛΟ	123	8	11	9	151

Τα 151 θετικά περιστατικά βακτηριακής μηνιγγίτιδας/βακτηριαμίας περιελάμβαναν και τα 20 περιστατικά που αντιστοιχούσαν σε δείγματα που είχαν επιβεβαιωθεί θετικά με τη μέθοδο των καλλιεργειών (ομάδα δειγμάτων I, παράγραφος 2.1.2.1), ενώ τα υπόλοιπα 131 περιστατικά αντιστοιχούσαν σε δείγματα που ήταν αρνητικά με τη μέθοδο των καλλιεργειών (ομάδα δειγμάτων III, παράγραφος 2.1.2.1).

Αντίστοιχα, στα 288 αρνητικά περιστατικά περιλαμβάνονταν τα 20 περιστατικά με δείγματα που επιβεβαιώθηκαν θετικά ως προς την καλλιέργεια για κάποιον άλλο, εκτός από τους εξεταζόμενους μικροοργανισμό (ομάδα δειγμάτων II, παράγραφος 2.1.2.1). Επιπλέον, η πολλαπλή PCR ήταν αρνητική για τα 245 κλινικά δείγματα που αντιστοιχούσαν στα 170 περιστατικά ιογενούς μηνιγγίτιδας (πίνακας 26).

Πίνακας 26. Αποτελέσματα της πολλαπλής PCR στα περιστατικά ιογενούς μηνιγγίτιδας.

ΕΤΟΣ	ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΑ ΙΟΓΕΝΟΥΣ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ	(PCR αρνητικά)
2003	-	-
2004	-	-
2005	-	-
2006	-	-
2007	17	17
2008	104	104
2009	49	49
ΣΥΝΟΛΟ	170	170

Συνολικά, τα αποτελέσματα της PCR ανά ομάδα δειγμάτων όπως χωρίζονται στην παράγραφο 2.1.2.1 παρουσιάζονται στον πίνακα 27.

Πίνακας 27. Αποτελέσματα της PCR ανά ομάδα δειγμάτων .

Ομάδες δειγμάτων (αριθμός περιστατικών)	PCR θετικά	PCR αρνητικά	ΣΥΝΟΛΟ
I) Δείγματα πιβεβαιωμένα θετικά με καλλιέργεια (20)	20	-	20
II) Δείγματα επιβεβαιωμένα θετικά με την καλλιέργεια για άλλο βακτήριο (20)	-	20	20
III) Δείγματα με αρνητική καλλιέργεια (399)	131	268	399
IV) Δείγματα από περιστατικά ιογενούς μηνιγγίτιδας (170)	-	170	170
ΣΥΝΟΛΟ (609)	151	458	609

3.1.2.2 Κλινικά δείγματα ασθενών με λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος

Από τα 367 δείγματα ασθενών με λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος που δοκιμάστηκαν, 306 συνολικά (83,4%) επιβεβαιώθηκαν θετικά με τη μέθοδο της πολλαπλής PCR. Σε 93 από αυτά ανιχνεύθηκαν περισσότεροι από ένας μικροοργανισμοί. Από τα υπόλοιπα 213 θετικά δείγματα, 154 ταυτοποιήθηκαν θετικά για *Streptococcus* spp., 15 ταυτοποιήθηκαν θετικά για *S. aureus*, 24 ταυτοποιήθηκαν θετικά για *H. influenzae* και 20 ταυτοποιήθηκαν θετικά για *P.aeruginosa*. Στους δύο πίνακες που ακολουθούν, παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα της PCR ανά μικροοργανισμό που ανιχνεύθηκε και ανά κατηγορία δείγματος για τα παιδιά (πίνακας 28) και τους ενήλικες (πίνακας 29).

Πίνακας 28. Αποτελέσματα της πολλαπλής PCR ανά μικροοργανισμό που ανιχνεύθηκε και ανά δείγμα για τα δείγματα που προέρχονταν από παιδιά.

Μικροοργανισμός που ανιχνεύθηκε	ΠΑΙΔΙΑ n=283			ΣΥΝΟΛΟ
	BAL	ΩΥ	ΠΥ	
	n=30	n=237	n=16	
<i>Strep</i> spp.	3	100	16	119
<i>S.aureus</i>	-	14	-	14
<i>H.influenzae</i>	3	19	-	22
<i>P.aeruginosa</i>	-	12	-	12
<i>H.inf/Strep</i>	16	16	-	32
<i>H.inf/Pseud</i>	-	4	-	4
<i>H.inf/Pseud/Strep</i>	1	1	-	2
<i>Pseud/Staph</i>	1	3	-	4
<i>Pseud/Strep</i>	-	3	-	3
<i>Pseud/Staph/Strep</i>	-	4	-	4
<i>Staph/Strep</i>	-	17	-	17
ΑΡΝΗΤΙΚΑ	6	44	-	50
ΣΥΝΟΛΟ	30	237	16	283

Όπου BAL=βρογχοκυψελιδικά εκπλύματα, ΩΥ=ωτικό υγρό, ΠΥ=πλευριτικό υγρό

Πίνακας 29. Αποτελέσματα της πολλαπλής PCR ανά μικροοργανισμό που ανιχνεύθηκε και ανά δείγμα για τα δείγματα που προέρχονταν από τους ενήλικες.

Μικροοργανισμός που ανιχνεύθηκε	ΕΝΗΛΙΚΕΣ n=84				ΣΥΝΟΛΟ
	BAL	ΠΤ	ΠΥ	ΒΕ	
	n=42	n=18	n=13	n=11	
<i>Strep spp.</i>	16	6	10	3	35
<i>S.aureus</i>	-	-	1	-	1
<i>H.influenzae</i>	1	-	1	-	2
<i>P.aeruginosa</i>	3	-	-	5	8
<i>H.inf/Strep</i>	5	7	-	1	13
<i>H.inf/Pseud/Strep</i>	-	1	-	-	1
<i>Pseud/Staph</i>	-	1	-	1	2
<i>Pseud/Strep</i>	2	1	-	-	3
<i>Pseud/Staph/Strep</i>	1	-	-	-	1
<i>Staph/Strep</i>	6	1	-	-	7
ΑΡΝΗΤΙΚΑ	8	1	1	1	11
ΣΥΝΟΛΟ	42	18	13	11	84

Όπου BAL=βρογχοκυψελιδικά εκπλύματα, ΠΥ=πλευριτικό υγρό, ΠΤ=πτύελα και ΒΕ=βρογχικές εκκρίσεις.

Στα 306 συνολικά θετικά δείγματα, περιλαμβάνονται και τα 148 από τα 151 δείγματα που είχαν επιβεβαιωθεί ως θετικά με τη μέθοδο των καλλιιεργειών (δείγματα ομάδας I, παράγραφος 2.1.2.2). Επιπλέον, σε 19 από αυτά τα δείγματα, η PCR ανίχνευσε και έναν ακόμη από τους προς εξέταση μικροοργανισμούς που δεν είχε ανιχνευθεί στην καλλιέργεια. Τα 3 θετικά με τη μέθοδο των καλλιιεργειών δείγματα που δεν ανιχνεύθηκαν με την PCR ταυτοποιήθηκαν ως *H.influenzae*.

Αντίθετα, η PCR ήταν αρνητική για τα δείγματα που ήταν θετικά στην καλλιέργεια μόνο για κάποιον άλλο, εκτός από τους εξεταζόμενους μικροοργανισμό (δείγματα ομάδας II, παράγραφος 2.1.2.2). Τα αποτελέσματα της PCR ανά ομάδα δειγμάτων όπως χωρίζονται στην παράγραφο 2.1.2.2 παρουσιάζονται στον πίνακα 30.

Πίνακας 30. Αποτελέσματα της PCR ανά ομάδα δειγμάτων.

Ομάδες δειγμάτων (αριθμός δειγμάτων)	PCR θετικά	PCR αρνητικά	ΣΥΝΟΛΟ
I) Δείγματα επιβεβαιωμένα θετικά με καλλιέργεια (151)	148	3	151
II) Δείγματα επιβεβαιωμένα θετικά με καλλιέργεια για άλλο βακτήριο (19)	-	19	19
III) Δείγματα με αρνητική καλλιέργεια (197)	158	39	197
ΣΥΝΟΛΟ (367)	306	61	367

3.1.3 ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ

Η ειδικότητα και η ευαισθησία της τεχνικής υπολογίσθηκαν βάσει των ταυτοποιημένων με καλλιέργειες δειγμάτων (δείγματα ομάδων I και II) με χρήση του λογισμικού 2-way Contingency Table Analysis (<http://statpages.org/ctab2x2.html>) όπως περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο (κεφάλαιο 2) στον πίνακα 11.

Με βάση τα στοιχεία από τους πίνακες 27 και 30 προέκυψε ο πίνακας 31, τα στοιχεία του οποίου χρησιμοποιήθηκαν στο λογισμικό, με όρια εμπιστοσύνης 95%. Η ευαισθησία της πολλαπλής τεχνικής υπολογίστηκε στο 98,2% αφού ταυτοποιήθηκαν θετικά με την πολλαπλή PCR 168 από τα 171 περιστατικά που αντιστοιχούσαν σε θετικά ως προς την καλλιέργεια κλινικά δείγματα (20 από την ομάδα I του πίνακα 27 και 148 από την ομάδα I του πίνακα 30). Η ειδικότητα της πολλαπλής τεχνικής υπολογίστηκε στο 100% αφού όλα τα θετικά ως προς την καλλιέργεια κλινικά δείγματα για κάποιον άλλο μικροοργανισμό ήταν αρνητικά στην πολλαπλή PCR (20 από την ομάδα II του πίνακα 27 και 19 από την ομάδα II του πίνακα 30). Επιπλέον, υπολογίσθηκαν η θετική και αρνητική αξία πρόβλεψης (positive and negative predicted value, PPV, NPV) 100% (168 στα 168 περιστατικά) και 92,9% (39 στα 42 περιστατικά) αντίστοιχα (πίνακας 31).

Πίνακας 31. Αποτελέσματα της PCR που χρησιμοποιήθηκαν στο λογισμικό 2-way Contingency Table Analysis.

	Αριθμός περιστατικών που αντιστοιχούν σε δείγματα επιβεβαιωμένα θετικά με καλλιέργεια για κάποιον από τους υπό εξέταση μικροοργανισμούς	Αριθμός περιστατικών που αντιστοιχούν σε δείγματα επιβεβαιωμένα θετικά με καλλιέργεια για κάποιον άλλο μικροοργανισμό	ΣΥΝΟΛΟ
PCR ΘΕΤΙΚΑ	168	-	168
PCR ΑΡΝΗΤΙΚΑ	3	39	42
ΣΥΝΟΛΟ	171	39	210

3.2 ΠΟΛΛΑΠΛΗ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ *Streptococcus pyogenes* (Group A *Streptococcus*) ΚΑΙ *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus*)

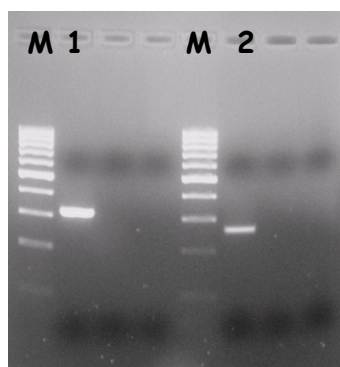
3.2.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΤΑΔΙΩΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. ΣΤΑΔΙΟ ΠΡΩΤΟ: Επιλογή εκκινητικών μορίων - Ανάπτυξη συνθηκών μεμονωμένων τεχνικών

Το αρχικό πρόγραμμα για τις μεμονωμένες αντιδράσεις PCR (πρόγραμμα 1) όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 13 (κεφάλαιο 2) εφαρμόστηκε σε θερμοκρασίες υβριδισμού από 49-52°C. Στις εικόνες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα εφαρμογής του προγράμματος με τις δύο ακραίες θερμοκρασίες υβριδισμού που εφαρμόστηκαν.

Στην εικόνα 29 φαίνονται τα αποτελέσματα εφαρμογής του προγράμματος με θερμοκρασία υβριδισμού 52°C για το μικροοργανισμό *S.pyogenes* σε ποσότητα γενετικού υλικού 5ng (διαδρομή 1, προϊόν 314bp) και για το μικροοργανισμό *S. agalactiae* σε ποσότητα γενετικού υλικού 5ng (διαδρομή 2, προϊόν 259bp).

Εικόνα 29. Αποτελέσματα εφαρμογής του προγράμματος 1 (πίνακας 13, κεφ. 2) σε θερμοκρασία υβριδισμού 52°C για τους *S. pyogenes* (διαδρομή 1, προϊόν 314bp) και *S. agalactiae* (διαδρομή 2, προϊόν 259bp).

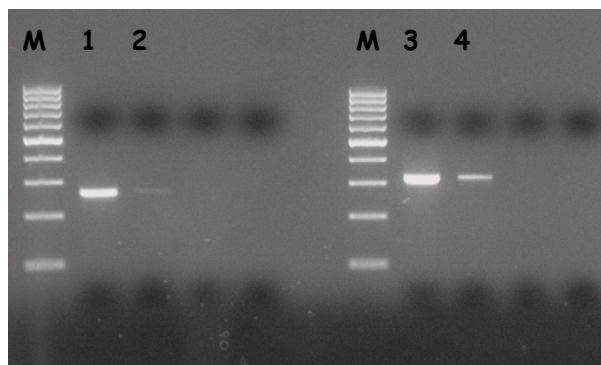


M: Μάρτυρας μοριακού βάρους (100bp ladder)

Στην εικόνα 30 φαίνονται τα αποτελέσματα εφαρμογής του προγράμματος 1 με θερμοκρασία υβριδισμού 49°C για το μικροοργανισμό *S.pyogenes* σε ποσότητες

γενετικού υλικού 5ng και 5pg (διαδρομές 3 και 4 αντίστοιχα) και για το μικροοργανισμό *S. agalactiae* σε ποσότητες γενετικού υλικού 5ng και 5pg (διαδρομές 1 και 2 αντίστοιχα).

Εικόνα 30. Αποτελέσματα εφαρμογής του προγράμματος 1 (πίνακας 13, κεφ. 2) σε θερμοκρασία υβριδισμού 49°C για το *S. agalactiae* και το *S. pyogenes*.



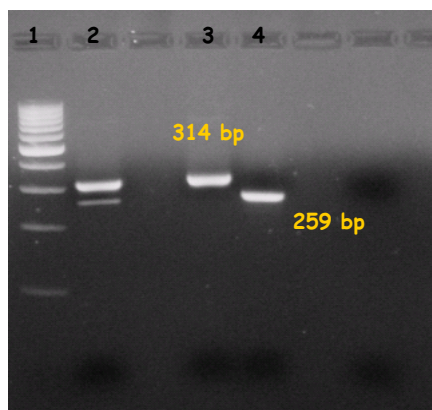
M: Μάρτυρας μοριακού βάρους (100bp ladder)

Όπως φαίνεται και στις παραπάνω εικόνες, η απόδοση της αντίδρασης για τις ίδιες συγκεντρώσεις γενετικού υλικού είναι πολύ καλύτερη σε θερμοκρασία υβριδισμού 49°C από ότι στους 52°C ειδικά για το *S. agalactiae*. Επιπλέον, στη θερμοκρασία αυτή ανιχνεύονται χαμηλές ποσότητες γενετικού υλικού ως και 5pg και για τους δύο μικροοργανισμούς. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε αυτή η θερμοκρασία για να εφαρμοσθεί το πρόγραμμα 1 στο επόμενο στάδιο.

2. ΣΤΑΔΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ: Συνδυασμός των μεμονωμένων αντιδράσεων σε μία πολλαπλή τεχνική- Προσαρμογή συνθηκών.

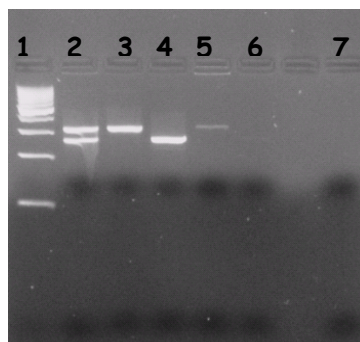
Στην πρώτη εφαρμογή του στη διπλή PCR, το πρόγραμμα 1 με θερμοκρασία υβριδισμού 49°C, δεν είχε την ίδια απόδοση για τους δύο μικροοργανισμούς (εικόνα 31). Όπως φαίνεται στη διαδρομή 2 της εικόνας 31, το προϊόν του *S. agalactiae* (259bp) ανιχνεύεται με χαμηλότερη ένταση από το προϊόν του *S. pyogenes* (314bp) στη διπλή PCR, παρόλο που στην ποσότητα των 5ng καθένα από τους μικροοργανισμούς ανιχνεύεται με την ίδια περίπου ένταση (διαδρομές 3 και 4). Στη διαδρομή 1 φαίνεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους (100bp ladder).

Εικόνα 31. Αποτελέσματα εφαρμογής του προγράμματος 1 (πίνακας 13, κεφάλαιο 2) σε θερμοκρασία υβριδισμού 49°C για τη διπλή PCR.



Για το λόγο αυτό, έγινε αύξηση της συγκέντρωσης των εκκινητών για το *S.agalactiae* που είχε τη μικρότερη απόδοση και παράλληλα μείωση της συγκέντρωσης των εκκινητών για το *S.pyogenes*. Έτσι, διαμορφώθηκαν οι συνθήκες για το πρόγραμμα 2, όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 14, κεφάλαιο 2. Με αυτές τις συνθήκες, η απόδοση της αντίδρασης ήταν ικανοποιητική και για τους δύο μικροοργανισμούς και τα προϊόντα παρουσιάζονται σχεδόν με την ίδια ένταση, όπως φαίνεται και στη *διαδρομή 2* της εικόνας 32. Παράλληλα, σε αυτό το στάδιο ελέγχθηκε και η ευαισθησία της αντίδρασης με τη δοκιμή αραιώσεων της ποσότητας του γενετικού υλικού από τα 5ng (*διαδρομές 3 και 4*, εικόνα 32) ως και τα 5pg (*διαδρομές 5 και 6*, εικόνα 32), ποσότητα ανιχνεύσιμη και για τους δύο μικροοργανισμούς (Στη *διαδρομή 6* η θετική ζώνη για την ανίχνευση 5pg του μικροοργανισμού *S.agalactiae* φαίνεται πολύ αχνά). Στη στήλη 1 φαίνεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους (100bp ladder) και στη στήλη 7 ο αρνητικός μάρτυρας.

Εικόνα 32. Αποτελέσματα εφαρμογής του προγράμματος 2 (πίνακας 14, κεφ.άλαιο 2) για τη διπλή PCR.



3. ΣΤΑΔΙΟ ΤΡΙΤΟ: Εφαρμογή της τεχνικής σε βακτηριακά στελέχη

Στο στάδιο αυτό ελέγχθηκε η ειδικότητα των εκκινητικών μορίων. Η τεχνική εφαρμόστηκε στα 210 ταυτοποιημένα με κλασικές μεθόδους βακτηριακά στελέχη του πίνακα 1 (κεφάλαιο 2). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες 32 και 33.

Πίνακας 32. Αποτελέσματα εφαρμογής της διπλής PCR σε βακτηριακά στελέχη στρεπτοκόκκων.

Στέλεχη	Αριθμός στελεχών	PCR θετικά	PCR αρνητικά
<i>Streptococcus pyogenes</i>	10	10	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	10	10	-
<i>Streptococcus spp.</i>	7	-	7
ΣΥΝΟΛΟ	27	20	7

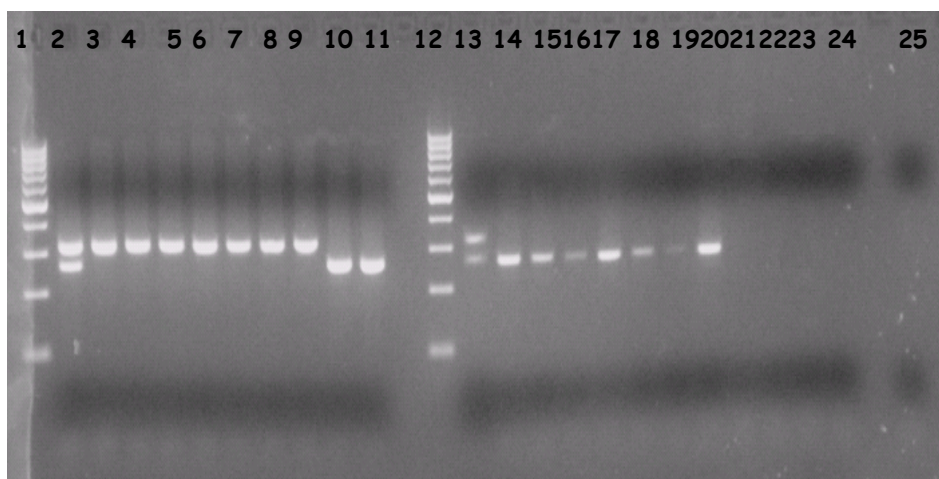
Πίνακας 33. Αποτελέσματα εφαρμογής της διπλής PCR σε στελέχη που ανήκουν σε άλλα γένη βακτηρίων.

Στέλεχη	Αριθμός στελεχών	PCR θετικά	PCR αρνητικά
<i>Haemophilus influenzae</i>	20	-	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	60	-	60
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	64	-	64
<i>Neisseria meningitidis</i>	5	-	5
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	7	-	7
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7	-	7
<i>Staphylococcus auricularis</i>	1	-	1
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	2	-	2
<i>Enterococcus spp.</i>	2	-	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	-	3
<i>Echerichia coli</i>	2	-	2
<i>Gardnerella vaginalis</i>	2	-	2
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	-	1
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	1	-	1
<i>Salmonella spp.</i>	1	-	1
<i>Proteus spp.</i>	1	-	1
<i>Citrobacter spp.</i>	1	-	1
<i>Acinetobacter spp.</i>	3	-	3
ΣΥΝΟΛΟ	183	-	183

Με τη νέα διπλή PCR ταυτοποιήθηκαν 10 στελέχη *S.agalactiae* και 10 στελέχη *S.pyogenes*- που ομοίως είχαν ταυτοποιηθεί και στην καλλιέργεια, ενώ δεν έδωσαν κανένα προϊόν τα βακτηριακά στελέχη που ανήκαν σε άλλα είδη του γένους *Streptococcus* (πίνακας 31). Επιπλέον, η διπλή PCR ήταν αρνητική για τα υπόλοιπα 183 βακτηριακά στελέχη που ανήκαν σε άλλα γένη βακτηρίων (πίνακας 33).

Στην εικόνα 33 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της εφαρμογής της τεχνικής στα βακτηριακά στελέχη *S.pyogenes* (διαδρομές 3-9) και *S.agalactiae* (διαδρομές 10-11 και 14-20) που έδωσαν θετικά προϊόντα, καθώς και σε στελέχη στρεπτοκόκκων που ανήκαν σε άλλα είδη και ήταν αρνητικά στη διπλή PCR (διαδρομές 21-24). Στις διαδρομές 1 και 12 φαίνεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους (100bp ladder), στις διαδρομές 2 και 13 ο θετικός μάρτυρας για τη διπλή PCR και στη διαδρομή 25 ο αρνητικός μάρτυρας.

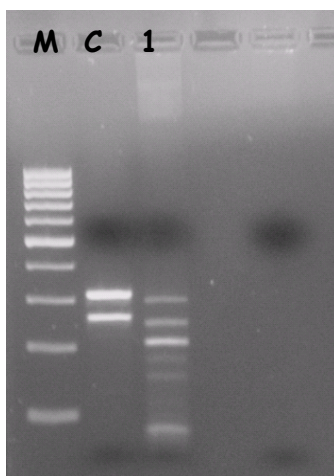
Εικόνα 33.Αποτελέσματα της εφαρμογής της διπλής PCR σε βακτηριακά στελέχη στρεπτοκόκκων.



4. ΣΤΑΔΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ: Εφαρμογή της τεχνικής απευθείας σε κλινικά δείγματα- Προσαρμογή συνθηκών.

Το πρόγραμμα 2 εφαρμόστηκε απευθείας σε κλινικά δείγματα αίματος και ENY. Η παρουσία μεγάλης ποσότητας ανθρώπινου γενετικού υλικού επηρέασε σημαντικά την αντίδραση στα δείγματα αίματος που δοκιμάστηκαν, με αποτέλεσμα την παραγωγή πολλαπλών μη ειδικών προϊόντων, όπως φαίνεται και στη διαδρομή 1 της εικόνας 34.

Εικόνα 34. Αποτελέσματα της δοκιμής του προγράμματος 2 της διπλής PCR απευθείας σε δείγματα αίματος.



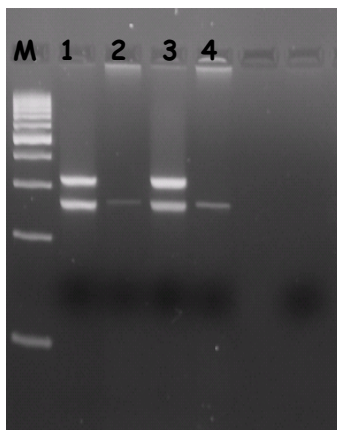
M: Μάρτυρας μοριακού βάρους (100bp ladder)

C: Θετικός μάρτυρας

Για το λόγο αυτό, όποιες μετατροπές ακολούθησαν, όπως περιγράφονται στην παράγραφο 2.2.7.2 (σημαντική αύξηση της θερμοκρασίας υβριδισμού στους 58-56°C αντίστοιχα στα δύο στάδια της αντίδρασης, μείωση των χρόνων αποδιάταξης και υβριδισμού, αύξηση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος της πολυμεράσης και συνεπώς της συγκέντρωσης του $MgCl_2$) είχαν στόχο τη δημιουργία πιο «αυστηρών» συνθηκών, χωρίς να μειωθεί η ευαισθησία της αντίδρασης.

Οι παραπάνω μετατροπές που οδήγησαν τελικά στη δημιουργία του προγράμματος 3 (πίνακας 15, κεφάλαιο 2), επέφεραν τα επιθυμητά αποτελέσματα στην απόδοση της διπλής τεχνικής, δηλαδή την εξαφάνιση των μη ειδικών προϊόντων χωρίς να επηρεαστεί σημαντικά η απόδοση των ειδικών προϊόντων. Σε αυτό έπαιξε σημαντικό ρόλο η αύξηση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος της πολυμεράσης. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 35, η απόδοση της τεχνικής είναι καλύτερη για το θετικό μάρτυρα και το θετικό δείγμα αίματος σε PCR mix με συγκέντρωση ρυθμιστικού διαλύματος πολυμεράσης 1.4x (διαδρομές 3 και 4 αντίστοιχα), από ότι για το θετικό μάρτυρα και το ίδιο δείγμα αίματος σε PCR mix με συγκέντρωση buffer 1x (διαδρομές 1 και 2 αντίστοιχα). Το δείγμα αίματος που χρησιμοποιήθηκε είναι θετικό για το μικροοργανισμό *S. agalactiae*.

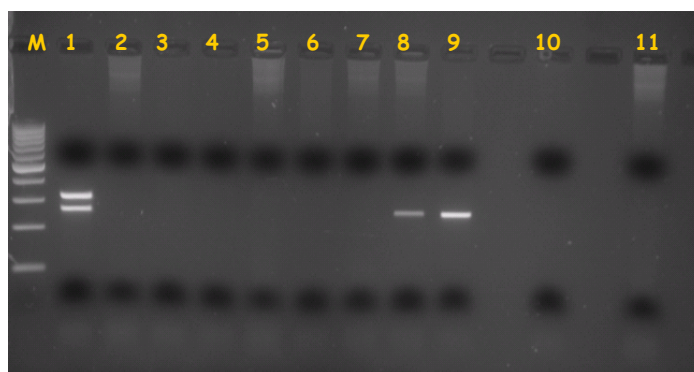
Εικόνα 35. Επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος της πολυμεράσης στο PCR mix.



M: Μάρτυρας μοριακού βάρους (100bp ladder)

Το πρόγραμμα 3 (πίνακας 15, κεφάλαιο 2), επαληθεύτηκε σε δείγματα αίματος και ENY. Στην εικόνα 36, δεν παρατηρούνται μη ειδικά προϊόντα στα αρνητικά δείγματα αίματος (διαδρομές 2, 5-7 και 11) και ENY (διαδρομές 3 και 4), ενώ στα θετικά δείγματα αίματος (θετικά για το μικροοργανισμό *S.agalactiae*) τα προϊόντα εμφανίζονται με ικανοποιητική απόδοση (διαδρομές 8 και 9). Στις διαδρομές 1 και 10 φαίνονται ο θετικός και ο αρνητικός μάρτυρας.

Εικόνα 36. Αποτελέσματα εφαρμογής της διπλής τεχνικής σε δείγματα αίματος και ENY αρνητικά και θετικά για *S. agalactiae*.

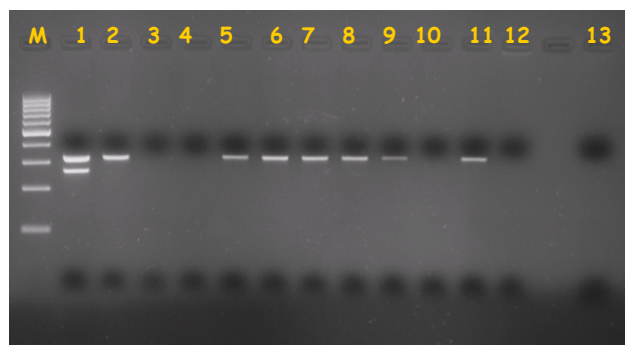


M: Μάρτυρας μοριακού βάρους (100bp ladder)

Επιπλέον, το πρόγραμμα 3 εφαρμόστηκε σε δείγματα ωτικών εκκρινμάτων με εξίσου ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά τα θετικά αλλά και τα αρνητικά δείγματα. Στην εικόνα 37, οι διαδρομές 2, 5-9 και 11 αντιστοιχούν σε δείγματα ωτικών εκκρινμάτων θετικά για *S.pyogenes* και οι διαδρομές 3, 4, 10 και 12 σε δείγματα

ωτικών εκκριμάτων αρνητικά. Οι διαδρομές 1 και 13 αντιστοιχούν στο θετικό και στον αρνητικό μάρτυρα.

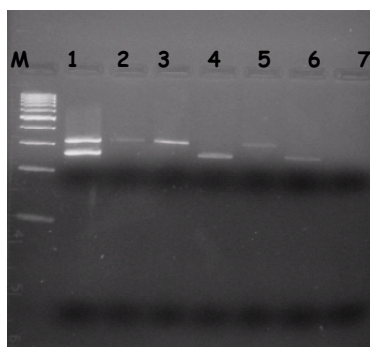
Εικόνα 37. Αποτελέσματα εφαρμογής της διπλής τεχνικής σε δείγματα ωτικών εκκριμάτων αρνητικά και θετικά για *S. pyogenes*.



5. ΣΤΑΔΙΟ ΠΕΜΠΤΟ: Υπολογισμός ευαισθησίας της πολλαπλής τεχνικής.

Οι διαδοχικές αραιώσεις της ποσότητας του γενετικού υλικού από 5ng -5pg που παρασκευάστηκαν από καθαρή καλλιέργεια κάθε μικροοργανισμού όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.6.2, δοκιμάστηκαν στην τεχνική της διπλής PCR. Στη διπλή PCR, και οι δύο μικροοργανισμοί έδωσαν προϊόν ως και την ποσότητα των 5pg, όπως φαίνεται και στην εικόνα 38 στις διαδρομές 5 και 6 για το *S.pyogenes* και το *S.agalactiae* αντίστοιχα. Στις διαδρομές 2 και 3 φαίνονται τα αποτελέσματα εφαρμογής ποσότητας ίση με 50pg για το *S.pyogenes* και στη διαδρομή 4 τα αποτελέσματα εφαρμογής ποσότητας ίση με 50pg για το *S.agalactiae*. Στις διαδρομές 1 και 7 φαίνονται ο θετικός και ο αρνητικός μάρτυρας.

Εικόνα 38. Αποτελέσματα δοκιμής ευαισθησίας της διπλής τεχνικής σε χαμηλές συγκεντρώσεις γενετικού υλικού.



M: Μάρτυρας μοριακού βάρους (100bp ladder)

3.2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

3.2.2.1 Κλινικά δείγματα ασθενών με βακτηριακή μηνιγγίτιδα ή βακτηριαμία

Η τεχνική της διπλής PCR για την ταυτοποίηση των *S. pyogenes* και *S. agalactiae* εφαρμόστηκε στα 140 δείγματα που αντιστοιχούσαν στα 123 επιβεβαιωμένα θετικά για *Streptococcus* spp. περιστατικά βακτηριακής μηνιγγίτιδας/βακτηριαμίας.

Από τα 123 επιβεβαιωμένα θετικά για *Streptococcus* spp. περιστατικά μηνιγγίτιδας/βακτηριαμίας, 4 ταυτοποιήθηκαν θετικά για *S.pyogenes* και 8 ταυτοποιήθηκαν θετικά για *S. agalactiae*. Από αυτά, ένα είχε ταυτοποιηθεί θετικό για *S. pyogenes* και 2 για *S. agalactiae* και με τις καλλιέργειες. Όλα τα δείγματα τα οποία ήταν θετικά ως προς την καλλιέργεια, ήταν επίσης θετικά και με την παρούσα διπλή PCR.

Από τα υπόλοιπα θετικά για *Streptococcus* spp. δείγματα, που ήταν αρνητικά στη διπλή PCR (αντιστοιχούσαν σε 111 περιστατικά) δύο είχαν ταυτοποιηθεί θετικά αντίστοιχα για *Streptococcus sanguis* και *Streptococcus salivarius* με τις κλασικές μεθόδους.

Επιπλέον, η τεχνική της διπλής PCR για την ταυτοποίηση των *S. pyogenes* και *S. agalactiae* εφαρμόστηκε στα 26 δείγματα (20 περιστατικά) που είχαν ταυτοποιηθεί με τις συμβατικές μεθόδους θετικά για κάποιον άλλο εκτός από τους εξεταζόμενους μικροοργανισμό (δείγματα ομάδας II, παράγραφος 2.1.2.1). Η διπλή PCR ήταν αρνητική και για τα 26 δείγματα.

Συνοπτικά, η τεχνική εφαρμόστηκε σε δείγματα ασθενών με μηνιγγίτιδα ή/και βακτηριαμία που αντιστοιχούσαν συνολικά σε 143 περιστατικά. Από αυτά, 12 συνολικά αντιστοιχούσαν σε δείγματα που ταυτοποιήθηκαν θετικά με τη διπλή PCR για κάποιον από τους μικροοργανισμούς *S.pyogenes* ή *S.agalactiae*, ανάμεσά τους 3 είχαν επιβεβαιωθεί θετικά και με τη μέθοδο των καλλιεργειών. Από τα 131 περιστατικά που αντιστοιχούσαν σε αρνητικά δείγματα, 22 είχαν επιβεβαιωθεί θετικά στην καλλιέργεια για κάποιον άλλο εκτός από τους εξεταζόμενους μικροοργανισμό, ανάμεσά τους 2 θετικά για *S.sanguis* και *S.salivarius*. Τα αποτελέσματα της τεχνικής, ανάλογα με τις ομάδες δειγμάτων παρουσιάζονται στον πίνακα 34.

Πίνακας 34. Αποτελέσματα της διπλής PCR ανά ομάδα δειγμάτων.

Ομάδες δειγμάτων (αριθμός περιστατικών)	PCR θετικά	PCR αρνητικά	ΣΥΝΟΛΟ
I) Δείγματα επιβεβαιωμένα θετικά με καλλιέργεια (3)	3	-	3
II) Δείγματα επιβεβαιωμένα θετικά με την καλλιέργεια για άλλο βακτήριο (22)	-	22	22
III) Δείγματα με αρνητική καλλιέργεια (118)	9	109	118
ΣΥΝΟΛΟ (159)	12	131	143

3.2.2.2 Κλινικά δείγματα ασθενών με λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος

Σύμφωνα με τα στοιχεία από τους πίνακες 28 και 29, συνολικά 237 δείγματα [237= 177 από τον πίνακα 28 και 60 από τον πίνακα 29] που προέρχονταν από ασθενείς με λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος επιβεβαιώθηκαν θετικά για *Streptococcus spp.* Σε αυτά περιλαμβάνονται και τα δείγματα στα οποία ο στρεπτόκοκκος ανιχνεύθηκε μαζί με κάποιον άλλο μικροοργανισμό.

Από αυτά, 47 ταυτοποιήθηκαν θετικά για *S. pyogenes* με την τεχνική της διπλής PCR. Δεκαοχτώ (18) από τα θετικά δείγματα είχαν ταυτοποιηθεί θετικά για *S. pyogenes* και με τη μέθοδο των καλλιέργειών, ενώ δεν υπήρχαν δείγματα επιβεβαιωμένα θετικά στην καλλιέργεια και αρνητικά στην PCR.

Επιπλέον, η τεχνική εφαρμόστηκε στα 19 δείγματα που είχαν ταυτοποιηθεί θετικά με τη μέθοδο των καλλιέργειών για κάποιον άλλο εκτός από τους εξεταζόμενους μικροοργανισμό (δείγματα ομάδας II παράγραφος 2.1.2.2). Η PCR ήταν αρνητική και για τα 19 δείγματα.

Συνοπτικά, η διπλή PCR εφαρμόστηκε συνολικά σε 256 δείγματα που προέρχονταν από ασθενείς με λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος. Από αυτά, 47 ταυτοποιήθηκαν θετικά με την τεχνική, ανάμεσά τους και 18 που είχαν ταυτοποιηθεί θετικά με την καλλιέργεια. Τα υπόλοιπα 209 δείγματα που ταυτοποιήθηκαν αρνητικά με την παρούσα τεχνική, περιελάμβαναν τα 19 δείγματα που είχαν ταυτοποιηθεί θετικά στην καλλιέργεια για κάποιον άλλο, εκτός από τους εξεταζόμενους μικροοργανισμό. Τα αποτελέσματα ανά ομάδες δειγμάτων παρουσιάζονται στον πίνακα 35.

Πίνακας 35. Αποτελέσματα της διπλής PCR ανά ομάδα δειγμάτων.

Ομάδες δειγμάτων (αριθμός δειγμάτων)	PCR θετικά	PCR αρνητικά	ΣΥΝΟΛΟ
I) Δείγματα επιβεβαιωμένα θετικά με καλλιέργεια (18)	18	-	18
II) Δείγματα επιβεβαιωμένα θετικά με την καλλιέργεια για άλλο βακτήριο (19)	-	19	19
III) Δείγματα με αρνητική καλλιέργεια (219)	29	190	219
ΣΥΝΟΛΟ (256)	47	209	256

3.2.3 ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ

Η ειδικότητα και η ευαισθησία της τεχνικής υπολογίσθηκαν βάσει των ταυτοποιημένων με καλλιέργειες δειγμάτων (δείγματα ομάδων I και II) με χρήση του λογισμικού 2-way Contingency Table Analysis (<http://statpages.org/ctab2x2.html>) όπως περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο (κεφάλαιο 2) στον πίνακα 11.

Συνοψίζοντας τα στοιχεία που αναφέρονται παραπάνω στις παραγράφους 3.2.2.1 και 3.2.2.2, είχαμε συνολικά 21 περιστατικά που αντιστοιχούσαν σε δείγματα θετικά στην καλλιέργεια και στην PCR και 41 περιστατικά που αντιστοιχούσαν σε δείγματα θετικά στις καλλιέργειες για άλλον μικροοργανισμό και ήταν αρνητικά στην PCR. Επιπλέον, δεν υπήρξε κανένα δείγμα θετικό στις καλλιέργειες που να έδωσε αρνητικό αποτέλεσμα στην PCR. Συνεπώς, με όρια εμπιστοσύνης 95%, η ευαισθησία και η ειδικότητα της πολλαπλής τεχνικής υπολογίστηκαν στο 100%. Επιπλέον, υπολογίστηκαν η θετική και αρνητική αξία πρόβλεψης (positive and negative predicted value, PPV, NPV) 100%. Τα στοιχεία που χρησιμοποιήθηκαν στο λογισμικό παρουσιάζονται στον πίνακα 36.

Πίνακας 36. Αποτελέσματα της PCR που χρησιμοποιήθηκαν στο λογισμικό 2-way Contingency Table Analysis.

	Αριθμός περιστατικών που αντιστοιχούν σε δείγματα επιβεβαιωμένα θετικά με καλλιέργεια για κάποιον από τους υπό εξέταση μικροοργανισμούς	Αριθμός περιστατικών που αντιστοιχούν σε δείγματα επιβεβαιωμένα θετικά με καλλιέργεια για κάποιον άλλο μικροοργανισμό	ΣΥΝΟΛΟ
PCR ΘΕΤΙΚΑ	21	-	21
PCR ΑΡΝΗΤΙΚΑ	-	41	41
ΣΥΝΟΛΟ	21	41	62

3.2.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.2.8, για την περαιτέρω ταυτοποίηση των δειγμάτων του αναπνευστικού συστήματος, σε όσα από τα δείγματα ήταν θετικά για *Streptococcus* spp. και αρνητικά στη διπλή PCR, καθώς και σε όσα ήταν θετικά για *H. influenzae* σύμφωνα με την τετραπλή PCR, εφαρμόστηκε η τριπλή PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των *H. influenzae type b*, *S. pneumoniae* και *N.meningitidis*.

Συνεπώς, ταυτοποιήθηκαν όσα από τα *Streptococcus* spp. θετικά δείγματα ήταν *S.pneumoniae*, καθώς και όσα από τα *H.influenzae* θετικά δείγματα ήταν τύπου β. Αναλυτικά, τα αποτελέσματα των τεχνικών PCR για τα δείγματα του αναπνευστικού συστήματος όπως διαμορφώθηκαν τελικά παρουσιάζονται στους πίνακες 37 και 38 για τα παιδιά και τους ενήλικες.

Πίνακας 37. Αποτελέσματα των τεχνικών PCR για τα δείγματα του αναπνευστικού συστήματος ανά μικροοργανισμό που ανιχνεύθηκε για τα δείγματα των παιδιών.

	Παιδιά n=283			ΣΥΝΟΛΟ
	BAL n=30	ΩΥ n=23 7	ΠΥ n=16	
Sp	1	55	12	68
Strep spp.	2	14	1	17
S.aureus	-	14	-	14
H.influenzae	3	18	-	21
GAS	-	30	3	33
P.aeruginosa	-	12	-	12
ΑΡΝΗΤΙΚΑ	6	41	-	47
H.inf/GAS	-	3	-	3
H.inf Nm	-	1	-	1
H.inf Sp/Strep/Pseud*	9/ 7/- **	1/ 8/2	-	27
H.inf Strep Nm/ Pseud	-	2/1	-	3
H.inf Sp Staph	1	-	-	1
Nm	-	3	-	3
Pseud Staph/ Strep/ Hib	1	3/3/2	-	9
Pseud Staph Strep	-	4	-	4
Sp Hib/Nm	-	2/1	-	3
Staph Strep/GAS/Sp	-	10/ 6/1	-	17
ΣΥΝΟΛΟ	30	237	16	283

Όπου BAL=βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, ΩΥ=ωτικό υγρό, ΠΥ=πλευριτικό υγρό, GAS=Group A *Strep*

*H.inf Sp/Strep/Pseud= ανιχνεύθηκε H.inf και Sp ή H.inf και Strep spp. ή H.inf και Pseud

** 9/7/- = ανιχνεύθηκαν σε αντίστοιχο αριθμό δειγμάτων: 9 H.inf και Sp, 7 H.inf και Strep spp., 0 H.inf και Pseud

Πίνακας 38. Αποτελέσματα των τεχνικών PCR για τα δείγματα του αναπνευστικού συστήματος ανά μικροοργανισμό που ανιχνεύθηκε για τα δείγματα των ενηλίκων.

	Ενήλικες n=84				ΣΥΝΟΛΟ
	BAL n=42	ΠΤ n=18	ΠΥ n=13	ΒΕ n=11	
Sp	8	2	5	3	18
Strep spp.	8	4	-	-	12
S.aureus	-	-	1	-	1
H.influenzae	1	-	1	-	2
GAS	-	-	5	-	5
P.aeruginosa	3	-	-	4	7
ΑΡΝΗΤΙΚΑ	8	1	1	1	11
H.inf Sp	1	-	-	1	2
H.inf Strep	2	1	-	-	3
H.inf Strep/Sp Nm	-	1/2	-	-	3
Hib Strep	-	1	-	-	1
Sp Hib Nm	-	1	-	-	1
Pseud Hib Strep	-	1	-	-	1
Pseud Staph/ Strep	-/1	1/1	-	1	4
Pseud Staph Strep	1	-	-	-	1
Pseud Sp/ Nm	1/-	-	-	-/1	2
Sp Hib/ Staph	2/-	1/1	-	-	4
Staph Strep	6	-	-	-	6
ΣΥΝΟΛΟ	42	18	13	11	84

Όπου BAL=βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, ΠΥ=πλευριτικό υγρό, ΠΤ=πτύελα και ΒΕ=βρογχικές εκκρίσεις, GAS=Group A Strep .

3.3 ΠΟΛΛΑΠΛΗ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΙΣ ΜΑΚΡΟΛΙΔΕΣ–ΛΙΝΚΟΣΑΜΙΔΕΣ-ΣΤΡΕΠΤΟΓΡΑΜΜΙΝΗ Β ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΗ ΣΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ- ΣΥΓΧΩΝΕΥΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ *S.pyogenes* ΚΑΙ *S.agalactiae*

3.3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΩΝ E-test ΚΑΙ D-test

Από τα 279 στελέχη στρεπτοκόκκων του πίνακα 2 (κεφάλαιο 2), 173 (*S. pneumoniae* n=48, *S. pyogenes* n=115, *S. agalactiae* n=10) εξετάστηκαν ως προς την αντοχή τους στην ερυθρομυκίνη (βασικός εκπρόσωπος των 14μερών μακρολιδών) με τη μέθοδο του E-test, με ταινίες διαβάθμισης συγκέντρωσης για την ερυθρομυκίνη. Επιπλέον, τα ανθεκτικά στελέχη *S. pyogenes* εξετάστηκαν με τη μέθοδο του D-test για την επαγόμενη αντοχή στην κλινταμυκίνη.

Με τη μέθοδο του E-test, τα στελέχη χαρακτηρίστηκαν σαν ανθεκτικά (resistant, R) για τιμές MIC >1, ευαίσθητα (sensitive, S) για τιμές MIC <0,5 και ενδιάμεσης αντοχής (intermediate, I) για τιμές MIC ≤1 και ≥0,5 σύμφωνα με το CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (πίνακας 38).

Με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων για την επαγόμενη αντοχή στην κλινταμυκίνη (D-test), 43 από τα ανθεκτικά στελέχη χαρακτηρίστηκαν σαν iMLS_B. Παρουσίασαν δηλαδή αντοχή στην κλινταμυκίνη, ύστερα από την επαγωγή με την ερυθρομυκίνη (πίνακας 39).

Πίνακας 39.Αποτελέσματα μεθόδων E-test και D-test.

	Χαρακτηρισμός σύμφωνα με το E-test
Sp n= 48	R n=19
	I n= 2
	S n=27
GAS n=115	R n=106*
	S n=9
GBS n=10	R n=1
	I n=1
	S n=8

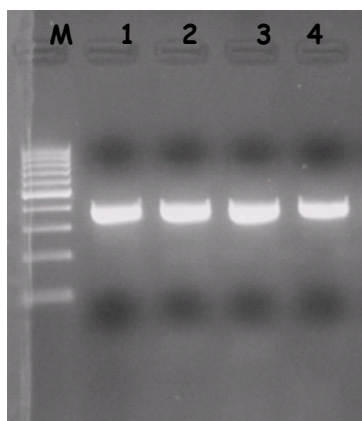
* 43 από αυτά τα στελέχη παρουσίασαν επαγόμενη αντοχή στην κλινταμυκίνη

3.3.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. ΣΤΑΔΙΟ ΠΡΩΤΟ: Επιλογή εκκινήσιμων μορίων - Ανάπτυξη συνθηκών μεμονωμένων τεχνικών.

Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 2.2.9.2 του κεφαλαίου 2, η πρώτη εφαρμογή της PCR σε στελέχη στρεπτοκόκκων ανθεκτικά στις μακρολίδες έγινε με μεμονωμένες τεχνικές στο πρόγραμμα της διπλής PCR όπως παρουσιάζεται και στον πίνακα 19 (πρόγραμμα 1). Το πρόγραμμα αυτό έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα και για τα τρία εξεταζόμενα γονίδια σε τρεις διαφορετικούς μικροοργανισμούς ανθεκτικούς στην ερυθρομυκίνη. Στις διαδρομές 1,2,3 και 4 της εικόνας 39 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της εφαρμογής του προγράμματος της διπλής PCR για το γονίδιο *mef* (προϊόν PCR, 360bp) σε στέλεχη *S. pneumoniae* ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη.

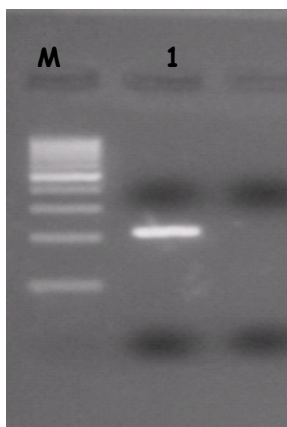
Εικόνα 39. Αποτελέσματα της εφαρμογής του προγράμματος της διπλής PCR σε στέλεχη *S.pneumoniae* ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη, στα οποία ανιχνεύθηκε το γονίδιο *mef* (προϊόν 360bp).



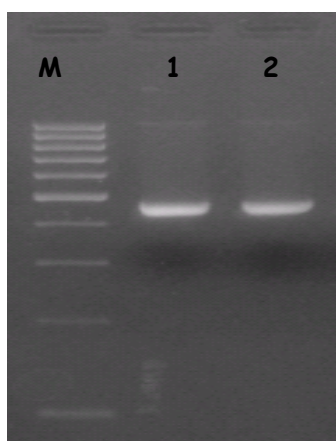
M: Μάρτυρας μοριακού βάρους (100bp ladder)

Αντίστοιχα, στη διαδρομή 1 της εικόνας 40 και στις διαδρομές 1 και 2 της εικόνας 41 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της εφαρμογής του προγράμματος της διπλής PCR για τα γονίδια *ermB* (προϊόν PCR, 211bp) και *ermTR* (προϊόν PCR, 459bp) σε στέλεχη *S.pyogenes* ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη.

Εικόνα 40. Αποτελέσματα της εφαρμογής του προγράμματος της διπλής PCR σε στελέχη *S. pyogenes* ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη, στα οποία ανιχνεύθηκε το γονίδιο *ermB* (προϊόν 211bp).



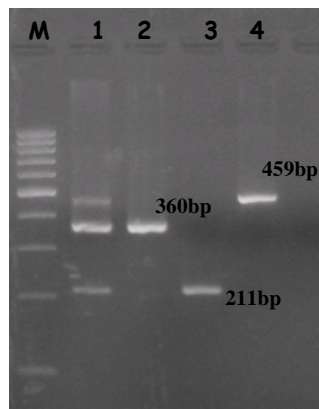
Εικόνα 41. Αποτελέσματα της εφαρμογής του προγράμματος της διπλής PCR σε στελέχη *S. pyogenes* ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη στα οποία ανιχνεύθηκε το γονίδιο *ermTR* (προϊόν 459bp).



2. ΣΤΑΔΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ: Συνδυασμός των μεμονωμένων τεχνικών σε μία πολλαπλή τεχνική- Συγχώνευση με διπλή PCR για την ανίχνευση των *S.pyogenes* και *S.agalactiae*- Προσαρμογή συνθηκών.

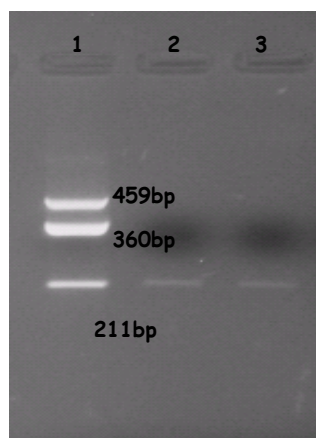
Σε αυτό το στάδιο έγινε εφαρμογή στο πρόγραμμα 1 με PCR mix που περιείχε ίσες ποσότητες εκκινητικών μορίων και DNA από κάθε μικροοργανισμό που περιείχε κάποιο από τα γονίδια-στόχο. Η απόδοση της αντίδρασης δεν ήταν η ίδια και για τα τρία γονίδια στο θετικό μάρτυρα (διαδρομή 1, εικόνα 42). Το γονίδιο *mef* (360bp) εμφανίζει ζώνη προϊόντος με πολύ μεγαλύτερη ένταση από τα γονίδια *ermB* (211bp) και *ermTR* (459bp).

Εικόνα 42. Αποτελέσματα της εφαρμογής του προγράμματος 1 (πίνακας 19, κεφάλαιο 2) σε PCR mix με ίσες ποσότητες εκκινητικών μορίων και γενετικού υλικού.



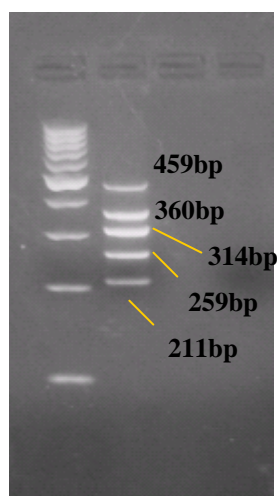
Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν οι αλλαγές που περιγράφονται στην παράγραφο 2.2.9.2 του κεφαλαίου 2 (αλλαγές στις συγκεντρώσεις των εκκινητών, στη συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος της πολυμεράσης και των dNTPs, στις θερμοκρασίες και στους χρόνους του προγράμματος) που είχαν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία του προγράμματος 2 του πίνακα 20 (κεφάλαιο 2). Στις νέες συνθήκες, η τριπλή PCR έδωσε καλύτερα αποτελέσματα. Όπως φαίνεται και στη *διαδρομή 1* της εικόνας 43, η απόδοση της αντίδρασης στις ζώνες προϊόντων που εμφανίζονται είναι περίπου η ίδια για τα τρία γονίδια-στόχους, ενώ ανιχνεύεται γενετικό υλικό ως και την ποσότητα των 5pg (αχνά προϊόντα 211bp, *διαδρομές 2 και 3*).

Εικόνα 43. Αποτελέσματα της τριπλής τεχνικής PCR με τις συνθήκες του πίνακα 20 (κεφάλαιο 2).



Σε αυτό το στάδιο, έγινε η συγχώνευση δύο τεχνικών PCR σε μία πενταπλή με την προσθήκη στο PCR mix των εκκινητών *SpyF/R* και *CFBA/S* που χρησιμοποιήθηκαν στη διπλή PCR για την ταυτοποίηση των στρεπτοκόκκων ομάδας A και B. Οι συνθήκες του προγράμματος δεν τροποποιήθηκαν, έγιναν μόνο κάποιες αλλαγές στις συγκεντρώσεις των εκκινητών και του ενζύμου (πίνακας 21, κεφάλαιο 2). Η πενταπλή πλέον τεχνική έχει τη δυνατότητα ταυτοποίησης των στρεπτοκόκκων ομάδας A και B και την ανίχνευση τριών γονιδίων που προσδίδουν αντοχή στις μακρολίδες-λινκοσαμίδες-στρεπτογραμμίνη B. Τα αποτελέσματα του προγράμματος και των συγκεντρώσεων όπως διαμορφώθηκαν για την πενταπλή τεχνική παρουσιάζονται στην εικόνα 44. Στη διαδρομή 1 της εικόνας 44 όπου φαίνεται ο θετικός μάρτυρας για την πενταπλή τεχνική, η αντίδραση δίνει ζώνες και για τα πέντε γονίδια: *ermTR* (προϊόν 459bp), *mef* (προϊόν 360bp), *ermB* (προϊόν 211bp) για την αντοχή στις μακρολίδες-λινκοσαμίδες-στρεπτογραμμίνη B και *spy1258* (προϊόν 314bp) και *cfb* (προϊόν 259bp) για την ανίχνευση των *S.pyogenes* και *S.agalactiae*.

Εικόνα 44. Αποτελέσματα εφαρμογής του προγράμματος 3 (πίνακας 21) για την πενταπλή τεχνική.

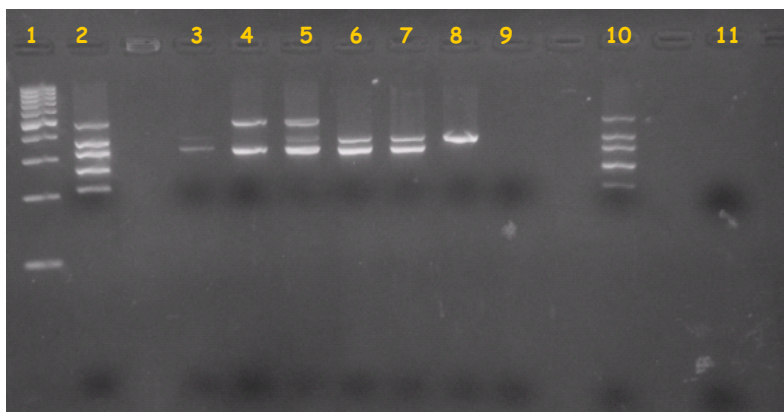


3. ΣΤΑΔΙΟ ΤΡΙΤΟ: Εφαρμογή της τεχνικής σε βακτηριακά στελέχη.

Η παραπάνω τεχνική εφαρμόστηκε στα 279 στελέχη στρεπτοκόκκων του πίνακα 2 (κεφάλαιο 2). Η εικόνα 45 παρουσιάζει τα αποτελέσματα εφαρμογής της τεχνικής στα βακτηριακά στελέχη. Στις διαδρομές 3-7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα εφαρμογής της τεχνικής σε στελέχη *S.pyogenes*, που δίνουν όλα το θετικό προϊόν

μεγέθους 314bp που ταυτοποιεί το μικροοργανισμό και στα οποία ανιχνεύονται επιπλέον τα γονίδια αντοχής στην ερυθρομυκίνη *mef* ή/και *ermTR*. Στις διαδρομές 8 και 9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα εφαρμογής της τεχνικής σε στελέχη *S.pneumoniae*, ένα ανθεκτικό στην ερυθρομυκίνη, στο οποίο ανιχνεύεται το γονίδιο *mef* (διαδρομή 8) και ένα ευαίσθητο, στο οποίο δεν ανιχνεύεται κανένα γονίδιο αντοχής (διαδρομή 9). Στις διαδρομές 2 και 10 φαίνεται ο θετικός μάρτυρας.

Εικόνα 45. Αποτελέσματα εφαρμογής της πενταπλής τεχνικής σε βακτηριακά στελέχη.



M: Μάρτυρας μοριακού βάρους (100bp ladder)

Τα αποτελέσματα εφαρμογής της τεχνικής στα βακτηριακά στελέχη παρουσιάζονται αναλυτικά στους πίνακες 40 και 41. Στον πίνακα 40 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μόνο για τα γονίδια ταυτοποίησης των στρεπτοκόκκων ομάδας A και B, ενώ στον πίνακα 41 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τα γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά.

Πίνακας 40. Αποτελέσματα εφαρμογής της πενταπλής PCR για τα γονίδια ταυτοποίησης των στρεπτοκόκκων ομάδας A (*S. pyogenes*) και B (*S. agalactiae*).

	Γονίδια	Στέλεχη			
		<i>S.pneumoniae</i> (147)	<i>S. pyogenes</i> (115)	<i>S. agalactiae</i> (10)	<i>Strep spp.</i> (7)
PCR θετικά	<i>Spy1258</i> (GroupA)	-	113	-	-
	<i>cfb</i> (GroupB)	-	-	10	-
PCR αρνητικά		147	2	-	7

Πίνακας 41. Αποτελέσματα εφαρμογής της πενταπλής PCR για τα γονίδια που προσδίδουν αντοχή σε μακρολίδες-λινκοσαμίδες-στρεπτογραμμίνη Β σε βακτηριακά στελέχη.

	Γονίδια	Στέλεχη			
		<i>S.pneumoniae</i> (147)	<i>S. pyogenes</i> (115)	<i>S. agalactiae</i> (10)	Strep spp. (7)
Ανιχνεύθηκε γονίδιο αντοχής	<i>mef</i>	32	24	-	-
	<i>ermB</i>	25	6	1	-
	<i>ermTR</i>	-	59	-	-
	<i>mef/ermB</i>	5	2	-	-
	<i>mef, ermTR</i>	-	2	-	-
Δεν ανιχνεύθηκε γονίδιο αντοχής		85	22	9	7

4. ΣΤΑΔΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ: Εφαρμογή της τεχνικής απευθείας σε κλινικά δείγματα

Στο στάδιο αυτό δεν έγιναν περαιτέρω μετατροπές του προγράμματος συνθηκών της πενταπλής τεχνικής. Το πρόγραμμα της πενταπλής τεχνικής όπως είχε διαμορφωθεί εφαρμόστηκε στα δείγματα ωτικών εκκρινμάτων, βρογχικών εκκρίσεων και BAL, δείγματα προερχόμενα από ασθενείς με λοιμώξεις για τη θεραπεία των οποίων χορηγούνται οι μακρολίδες.

5. ΣΤΑΔΙΟ ΠΕΜΠΤΟ: Υπολογισμός ευαισθησίας της πολλαπλής τεχνικής

Οι διαδοχικές αραιώσεις γενετικού υλικού ποσοτήτων 5ng -5pg που παρασκευάστηκαν από καθαρό καλλιέργημα κάθε μικροοργανισμού όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.6.2 δοκιμάστηκαν στην τεχνική της πενταπλής PCR. Στην πενταπλή PCR ανιχνεύεται γενετικό υλικό ως και την ποσότητα των 5pg από κάθε γονίδιο.

3.3.3 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Το πρόγραμμα 3 εφαρμόστηκε μόνο σε όσα από τα δείγματα ωτικών εκκρινμάτων, βρογχικών εκκρίσεων και BAL ήταν θετικά για *Streptococcus* spp. ή *S. pneumoniae* ή *S.pyogenes* και κανέναν άλλο Gram θετικό κόκκο (π.χ. *S.aureus* ή *Enterococcus*) είτε στις καλλιέργειες, είτε στην PCR. Στα εξεταζόμενα δείγματα περιλήφθηκαν και αυτά στα οποία εκτός από κάποιον στρεπτόκοκκο είχε ανιχνευθεί και κάποιος άλλος από τους εξεταζόμενους Gram αρνητικός μικροοργανισμός (π.χ. *N.meningitidis*, *P.aeruginosa*, *H.influenzae*).

Συνοψίζοντας τα στοιχεία από τους πίνακες 37 και 38 για την πλήρη ταυτοποίηση των δειγμάτων που προέρχονται από το αναπνευστικό σύστημα, στον πίνακα 42 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα δείγματα στα οποία ανιχνεύθηκε στρεπτόκοκκος είτε μόνος του, είτε μαζί με κάποιον Gram αρνητικό μικροοργανισμό με τις προηγούμενες τεχνικές PCR και στα οποία εφαρμόστηκε η τεχνική της πενταπλής PCR.

Πίνακας 42. Δείγματα θετικά για *Streptococcus* spp., *S. pyogenes* και *S. pneumoniae* στα οποία εφαρμόστηκε η πενταπλή τεχνική.

	ΠΑΙΔΙΑ n=139		ΕΝΗΛΙΚΕΣ n=27		ΣΥΝΟΛΟ
	BAL n=19	ΩΥ n=120	BAL n=23	BE n=4	
Sp	10	59	12	4	85
Strep spp.	9	28	11	-	48
GAS	-	33	-	-	33
ΣΥΝΟΛΟ	19	120	23	4	166

Στους πίνακες 43 και 44 που ακολουθούν παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα εφαρμογής της πενταπλής τεχνικής για τα δείγματα που προέρχονται από παιδιά και ενήλικες αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στους πίνακες αυτούς αναφέρονται μόνο στα γονίδια αντοχής για τις μακρολίδες και όχι στα γονίδια για την ταυτοποίηση στρεπτοκόκκων ομάδας A και B. Όσον αφορά τα γονίδια ταυτοποίησης στρεπτοκόκκων, και τα 33 δείγματα που είχαν ταυτοποιηθεί σε *S.pyogenes*, έδωσαν θετικό αποτέλεσμα για το αντίστοιχο γονίδιο και στην πενταπλή τεχνική.

Πίνακας 43. Αποτελέσματα εφαρμογής της πενταπλής τεχνικής σε δείγματα του αναπνευστικού συστήματος προερχόμενα από παιδιά (n=139).

		mef	ermB	ermTR	mef/ermB	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
BAL n=19	Sp n=10	-	3	-	-	7
	Strep spp. n=9	-	8	-	-	1
ΩΥ n=120	Sp n=59	2	5	1	1	50
	Strep spp. n=28	1	4	-	-	23
	GAS n=33	-	3	2	-	28

Πίνακας 44. Αποτελέσματα εφαρμογής της πενταπλής τεχνικής σε δείγματα του αναπνευστικού συστήματος προερχόμενα από ενήλικες (n=27).

		mef	ermB	ermTR	mef/ermB	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
BAL n=23	Sp n=12	-	9	-	1	2
	Strep spp. n=11	1	9	1	-	-
BE n=4	Sp n=4	-	3	-	1	-

3.3.4 ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Σύμφωνα με τα στοιχεία του πίνακα 45 που ακολουθεί, από τα 126 συνολικά ανθεκτικά στελέχη σύμφωνα με τη μέθοδο του E-test, γονίδια αντοχής ανιχνεύθηκαν στα 109 (~87%), ενώ από τα 44 συνολικά ευαίσθητα στελέχη σύμφωνα με τη μέθοδο του E-test αρνητικά στην τεχνική της PCR ήταν τα 43 στελέχη.

Πίνακας 45. Σύγκριση αποτελεσμάτων E-test και PCR.

	Χαρακτηρισμός σύμφωνα με το E-test	Αποτελέσματα PCR					
		mef	ermB	ermTR	mef/ermB	mef/ermTR	neg
Sp n= 48	R n=19	11	4	-	1	-	3
	I n= 2	-	1	-	-	-	1
	S n=27	-	1	-	-	-	26
GAS n=115	R n=106	24	7	59	2	2	12
	S n=9	-	-	-	-	-	9
GBS n=10	R n=1	-	1	-	-	-	-
	I n=1	-	-	-	-	-	1
	S n=8	-	-	-	-	-	8

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΠΟΛΛΑΠΛΗ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ *H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* και *Streptococcus spp.*

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν αρχικά η ανάπτυξη μιας ευαίσθητης, ταχείας και ακριβούς τεχνικής πολλαπλής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (mPCR) για την ταυτόχρονη ανίχνευση των μικροοργανισμών *H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Streptococcus spp.*, που θα μπορούσε να εφαρμοσθεί σε βιολογικά υλικά ασθενών με μηνιγγίτιδα ή/και βακτηριαιμία.

Στην Ελλάδα, πολλαπλή αντίδραση πολυμεράσης για την ανίχνευση μικροοργανισμών σε βιολογικά υλικά ασθενών με μηνιγγίτιδα ή/και βακτηριαιμία πραγματοποιείται στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας (ΕΚΑΜ) της Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας (ΕΣΔΥ), για τους τρεις κύριους μικροοργανισμούς που αποτελούν παγκοσμίως τα συχνότερα αίτια της λοίμωξης, *H. influenzae type b* (Hib), *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* καθώς και έναν ακόμα που προστέθηκε πρόσφατα, τη *Listeria monocytogenes*. Σύμφωνα με τα στοιχεία της τετραετίας 2000-2004 του ΕΚΑΜ, περίπου το 65% των περιπτώσεων βακτηριακής μηνιγγίτιδας στην Ελλάδα οφείλεται σε αυτούς τους μικροοργανισμούς, ενώ το υπόλοιπο 35% οφείλεται σε άλλα γένη ή είδη βακτηρίων.

Το υψηλό ποσοστό των περιστατικών βακτηριακής μηνιγγίτιδας που δεν ταυτοποιούνταν ως προς τον παθογόνο παράγοντα, σε συνδυασμό με την αυξημένη πιθανότητα εμπλοκής των *H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Streptococcus spp.* στην πρόκληση της λοίμωξης, κυρίως λόγω της συχνότητας εμφάνισής τους σε λοιμώξεις ιστών παρακαείμενων στο ΚΝΣ, δημιούργησε την ανάγκη για την ανάπτυξη μιας πολλαπλής τεχνικής PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευσή τους.

Βιβλιογραφικά, η ανίχνευση των παραπάνω μικροοργανισμών σε βιολογικά υλικά ασθενών με μηνιγγίτιδα ή/και βακτηριαιμία αναφέρεται μόνο σε μεμονωμένες τεχνικές PCR ή σε τεχνικές broad-range PCR που στοχεύει στην ανίχνευση του 16S rRNA των μικροοργανισμών. Δεν αναφέρεται όμως πουθενά η ανάπτυξη τεχνικής για

την ταυτόχρονη ανίχνευσή τους απευθείας σε βιολογικά υλικά ασθενών με μηνιγγίτιδα ή/και βακτηριαμία, με εκκινητικά μόρια που υβριδίζονται σε γονίδια ειδικά για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών.

Επιπλέον, η εφαρμογή της broad-range PCR για την ταυτοποίηση βακτηριακών παθογόνων φαίνεται να παρεμποδίζεται από διάφορα προβλήματα (Schuurman *et al.*, 2004) με πιο σημαντικό το πρόβλημα των επιμολύνσεων που μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα (Böttger 1990, Corless *et al.* 2000, Rand *et al.* 1990). Ταυτόχρονα, η αναγκαιότητα συνδυασμού της με άλλες τεχνικές (αλληλούχηση, πέψη με περιοριστικά ένζυμα, SSCP) τις περισσότερες φορές, προκειμένου να γίνει η ανάγνωση των αποτελεσμάτων, όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 1, τη μετατρέπουν σε ιδιαίτερα χρονοβόρα τεχνική.

Για το λόγο αυτό, για την ανάπτυξη της παρούσας τεχνικής επιλέχθηκαν εξ αρχής γονίδια-στόχοι, η ανίχνευση των οποίων χαρακτηρίζει τους μικροοργανισμούς και κατάλληλα εκκινητικά μόρια, έτσι ώστε το μέγεθος των παραγόμενων προϊόντων να επιτρέπει το διαχωρισμό τους σε πήκτωμα αγαρόζης και η ανάγνωση των αποτελεσμάτων της PCR να γίνεται άμεσα με ηλεκτροφόρηση.

Πειραματικά στάδια ανάπτυξης της τεχνικής

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της τετραπλής τεχνικής και την εφαρμογή της απευθείας σε κλινικά δείγματα παρουσιάστηκαν πολλά προβλήματα στα διάφορα πειραματικά στάδια, τα οποία τελικά ξεπεράστηκαν κατά την εξέλιξη της μεθοδολογίας.

Η πρώτη δυσκολία στην ανάπτυξη της παραπάνω τεχνικής ήταν ο συνδυασμός τεσσάρων μεμονωμένων αντιδράσεων κάτω από τις ίδιες συνθήκες με τα εκκινητικά μόρια που επιλέχθηκαν από τις δημοσιευμένες εργασίες. Το πρόβλημα αυτό παρουσιάζεται συνήθως στην ανάπτυξη πολλαπλών τεχνικών αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και οφείλεται στο γεγονός ότι τα διάφορα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιούνται στην τεχνική, έχουν διαφορετικά σημεία τήξης, συνεπώς, δύσκολα συνδυάζεται άμεσα ο υβριδισμός όλων των εκκινητικών μορίων στην ίδια θερμοκρασία με την ίδια απόδοση. Για το λόγο αυτό χρειάστηκε να σχεδιαστούν νέα εκκινητικά μόρια για τους μικροοργανισμούς *P.aeruginosa* και *H.influenzae* στα ίδια γονίδια.

Η δεύτερη δυσκολία ήταν στο σχεδιασμό εκκινητικών μορίων και ιδιαίτερα για τον *H.influenzae*. Το ζεύγος εκκινητικών μορίων HinL/R που σχεδιάστηκε εκ νέου σε περιοχή του γονιδίου *lic-1*, που είχε επιλεγεί εξ αρχής από τη δημοσίευση των

Balganesh *et al.*, 2000 για την ταυτοποίηση του μικροοργανισμού εμφάνισε χαμηλή ειδικότητα και ανίχνευσε μόνο 11 από τα 20 στελέχη *H.influenzae* στα οποία δοκιμάστηκε. Το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητικών μορίων θεωρήθηκε ακατάλληλο λόγω της χαμηλής ειδικότητάς του. Το σχεδιασμό ειδικών εκκινητικών μορίων για τον *H.influenzae* στο συγκεκριμένο γονίδιο δυσχέραινε πολύ το γεγονός ότι δεν υπήρχαν αρκετές αλληλουχίες από διαφορετικά στελέχη του μικροοργανισμού καταχωρημένες στη γονιδιακή τράπεζα (GenBank), προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι τα εκκινητικά μόρια υβριδίζονται σε διαφορετικά στελέχη του μικροοργανισμού πριν δοκιμαστούν πειραματικά.

Τελικά, η επιλογή ενός άλλου γονιδίου του *H.influenzae*, του γονιδίου *hel* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη P4 της εξωτερικής μεμβράνης του μικροοργανισμού βοήθησε στο σχεδιασμό ενός τρίτου ζεύγους εκκινητικών μορίων (F1/R1). Η επιλογή σχεδιασμού των νέων εκκινητών στο γονίδιο *hel* θεωρήθηκε καταλληλότερη για την ταυτοποίησή του μικροοργανισμού σύμφωνα με τη δημοσίευση των Yadav *et al.*, 2003. Το νέο ζεύγος εκκινητικών μορίων εμφάνισε μεγαλύτερη ειδικότητα για την ανίχνευση του μικροοργανισμού σε σχέση με τα προηγούμενα, αφού έδωσε το αναμενόμενο προϊόν για 19 από τα 20 ταυτοποιημένα στελέχη στα οποία δοκιμάστηκε.

Το νέο ζεύγος εκκινητικών μορίων προσαρμόστηκε στην ίδια θερμοκρασία υβριδισμού με τα υπόλοιπα τρία ζεύγη εκκινητικών μορίων και ενσωματώθηκε στην πολλαπλή τεχνική. Στην εύρεση κοινών συνθηκών και για τα τέσσερα ζεύγη εκκινητικών μορίων, σημαντικό ρόλο έπαιξε η μεθοδολογία της stepdown PCR, η οποία βασίζεται στην εφαρμογή δύο θερμοκρασιών υβριδισμού και χωρίζει την αντίδραση σε δύο στάδια με διαφορετικό αριθμό κύκλων.

Η μεθοδολογία της stepdown PCR συνέβαλε επίσης σημαντικά στην ειδικότητα, ευαισθησία και τελική απόδοση της αντίδρασης. Η θερμοκρασία υβριδισμού στους 61°C που επιλέχθηκε για τους 10 πρώτους κύκλους της αντίδρασης είναι πολύ υψηλή σε σχέση με τις θερμοκρασίες τήξης (T_m) των περισσότερων εκκινητικών μορίων. Έτσι, εξασφαλίστηκαν πολύ «αυστηρές» συνθήκες στους πρώτους κύκλους της αντίδρασης που επέτρεψαν πολύ ειδική σύνδεση των εκκινητικών μορίων στις επιθυμητές περιοχές, με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα παραγωγής μη ειδικών προϊόντων από λάθος υβριδισμό των εκκινητικών μορίων. Στους υπόλοιπους 25 κύκλους κατά τους οποίους εφαρμόστηκε θερμοκρασία υβριδισμού 59°C

επέτρεψε ευκολότερα τη σύνδεση των εκκινητικών μορίων στα γονίδια –στόχους και αύξησε την τελική απόδοση της αντίδρασης.

Επιπλέον, στην απόδοση της αντίδρασης σημαντικό ρόλο έπαιξε και η επιλογή του ενζύμου της Hot start πολυμεράσης. Η Hot start πολυμεράση παραμένει ανενεργή και ενεργοποιείται μόνο κατόπιν επώασης στους 94°C για 10 λεπτά. Έτσι, η ενεργοποίηση του ενζύμου πραγματοποιείται μετά το πέρας του χρόνου της αρχικής αποδιάταξης του προγράμματος, εμποδίζοντας έτσι την παραγωγή προϊόντων από λάθος υβριδισμό των εκκινητικών μορίων κατά την έναρξη του προγράμματος ή την προετοιμασία του μίγματος.

Σημαντική δε, ήταν η εφαρμογή της μεθοδολογίας της stepdown PCR και η χρήση του ενζύμου της Hot start πολυμεράσης στα δείγματα του αίματος όπου εμφανίζονταν μη ειδικά προϊόντα. Στις πρώτες εφαρμογές της πολλαπλής τεχνικής σε δείγματα αίματος παράγονταν πολλαπλά μη ειδικά προϊόντα από λάθος υβριδισμό των εκκινητικών μορίων. Τα δείγματα του αίματος περιέχουν μεγάλη ποσότητα ανθρώπινου γενετικού υλικού και αναλογικά πολύ μικρότερη ποσότητα βακτηριακού γενετικού υλικού. Συνεπώς, ευνοείται ο υβριδισμός των εκκινητικών μορίων έστω και μη απόλυτα συμβατός, στο άφθονο ανθρώπινο γενετικό υλικό και χρειάζεται σταδιακή βελτιστοποίηση της αντίδρασης, για να επιτευχθούν οι απόλυτα σωστές συνθήκες για το σωστό υβριδισμό των εκκινητικών μορίων. Με την εφαρμογή της stepdown PCR και τη χρήση του ενζύμου της Hot start πολυμεράσης επιτεύχθηκε η εξαφάνιση των μη ειδικών προϊόντων στα δείγματα του αίματος.

Η παρουσία μεγάλης ποσότητας ανθρώπινου γενετικού υλικού στα δείγματα αίματος επηρεάζει επίσης σημαντικά το όριο ανίχνευσης του γενετικού υλικού μειώνοντας την ευαισθησία της αντίδρασης. Για να επιβεβαιωθεί η ευαισθησία ανίχνευσης γενετικού υλικού της τεχνικής στα δείγματα αίματος πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος δειγμάτων αίματος που ελήφθησαν από υγιές άτομο και μολύνθηκαν με μικροποσότητες γενετικού υλικού από κάποιον από τους εξεταζόμενους μικροοργανισμούς, όπως παρουσιάστηκε παραπάνω στο κεφάλαιο 2.

Η εφαρμογή της PCR σε δείγματα ολικού αίματος θεωρείται δύσκολη για έναν ακόμη λόγο: κάποια από τα συστατικά του αίματος, ιδιαίτερα μετά τη διαδικασία απομόνωσης γενετικού υλικού λειτουργούν σαν αναστολείς της αντίδρασης. Στην παρούσα μεθοδολογία, το kit Nucleospin® Blood QuickPure της Macherey-Nagel (Duren, Germany) που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του γενετικού υλικού, θεωρήθηκε το πλέον κατάλληλο εμπορικό προϊόν για την απομόνωση γενετικού

υλικού από ολικό αίμα χωρίς αναστολές. Οι στήλες πυριτίου που χρησιμοποιούνται δεσμεύουν αντιστρεπτά το γενετικό υλικό (ανθρώπινο και βακτηριακό), ενώ τα προϊόντα της κυτταρικής λύσης περνούν από τη στήλη και δε δεσμεύονται, συγκεντρώνονται στο σωληνάριο συλλογής για να απορριφθούν. Στη συνέχεια, το γενετικό υλικό αποδεσμεύεται από τη στήλη με την προσθήκη κατάλληλου διαλύματος.

Ιδιαίτερο και σημαντικό ρόλο για τη σταδιακή βελτιστοποίηση της αντίδρασης έπαιξαν και οι τροποποιήσεις στις συγκεντρώσεις των υπόλοιπων αντιδραστηρίων (κυρίως η αλλαγή της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος της πολυμεράσης) (εικόνα 24 κεφάλαιο 3) προκειμένου να βρεθούν τελικά οι βέλτιστες συνθήκες για την πολλαπλή αντίδραση και παράλληλα να μη μειωθεί η ευαισθησία της.

Τέλος, οι συνεχείς δοκιμές μικρών ποσοτήτων γενετικού υλικού κατά τη διάρκεια ανάπτυξής της, οδήγησαν στη δημιουργία μιας ευαίσθητης τεχνικής με χαμηλό όριο ανίχνευσης (5pg), απαραίτητο χαρακτηριστικό προκειμένου η τεχνική να χρησιμοποιηθεί για διαγνωστικό σκοπό.

Συμπερασματικά, η ανάπτυξη μιας τετραπλής τεχνικής PCR αποτελεί μια επίπονη και ιδιαίτερος χρονοβόρα διαδικασία από την επιλογή των εκκινητικών μορίων ως τη βελτιστοποίηση των συνθηκών. Το επίπεδο δυσκολίας αυξάνεται σημαντικά όταν στόχος είναι η απευθείας εφαρμογή της τεχνικής σε κλινικά δείγματα και η χρήση της για διαγνωστικούς λόγους.

Η ανάπτυξη της παρούσας μεθοδολογίας και η εφαρμογή της σε κλινικά δείγματα δημοσιεύθηκαν στο περιοδικό *Molecular Microbiology and Infectious Diseases* (Xirogianni *et al.* 2009), ενώ η τεχνική εφαρμόζεται από το 2007 στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας για την ανίχνευση των τεσσάρων εξεταζόμενων μικροοργανισμών σε δείγματα ασθενών με συμπτώματα ύποπτης, πιθανής ή επιβεβαιωμένης βακτηριακής μηνιγγίτιδας.

Εφαρμογή σε κλινικά δείγματα ασθενών με μηνιγγίτιδα/βακτηραιμία

Η παραπάνω τετραπλή τεχνική εφαρμόστηκε σε κλινικά δείγματα που εστάλησαν στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας από το 2003 ως το 2009 και αντιστοιχούσαν σε 439 περιστατικά βακτηριακής μηνιγγίτιδας ή/και βακτηραιμίας. Από αυτά, τα 151 επιβεβαιώθηκαν θετικά με τη συγκεκριμένη τεχνική PCR, ανιχνεύθηκε δηλαδή σε αυτά ένας από τους τέσσερις εξεταζόμενους μικροοργανισμούς (*H.influenzae*, *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *Streptococcus* spp.).

Τα δείγματα αυτά είχαν αρχικά εξετασθεί με την τεχνική PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των μικροοργανισμών *N.meningitidis*, *H.influenzae type b*, *S.pneumoniae*, *L.monocytogenes*.

Με την τεχνική που αναπτύχθηκε, ένα μεγάλο ποσοστό των μη ταυτοποιηθέντων περιστατικών βακτηριακής μηνιγγίτιδας, ταυτοποιήθηκαν ως προς τον παθογόνο μικροοργανισμό που προκάλεσε τη λοίμωξη. Αναλυτικότερα, ενώ τα ποσοστά θετικών περιστατικών εμφανίζονται χαμηλά στην αρχή –περίπου 11% το 2005 ως και 18% το 2004- αυξάνονται σταδιακά από το 2007 και μετά, για να φτάσουν περίπου το 70% μέχρι τα μέσα του 2009 (πίνακας 24, κεφάλαιο 3) έως ότου καταγράφηκαν τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία.

Η εφαρμογή της τεχνικής σε κλινικά δείγματα άρχισε περίπου στα μέσα του 2007 και στο γεγονός αυτό οφείλονται τα χαμηλά ποσοστά θετικών δειγμάτων των ετών 2003-2005. Τα δείγματα αυτά είχαν υποστεί μακρόχρονη συντήρηση και πιθανόν αλλαγές στη θερμοκρασία (διαδοχικά πάγωμα-ξεπάγωμα) ή μηχανικές βλάβες του γενετικού υλικού (ισχυρή ανάδευση μετά από κάθε ξεπάγωμα) έως ότου δοκιμαστούν στην πολλαπλή τεχνική, με αποτέλεσμα να μειώνεται σημαντικά η ικανότητα ανίχνευσης. Επιπλέον, είναι πολύ πιο μικρός ο αριθμός των δειγμάτων που εξετάστηκαν έως και το 2006, αναλογικά με τον αριθμό των δειγμάτων που εξετάστηκαν από το 2007 και μετά, οπότε η τεχνική άρχισε να εφαρμόζεται σε καθημερινή βάση, άμεσα μετά την αποστολή των δειγμάτων και την απομόνωση του γενετικού υλικού.

Τα ποσοστά θετικών επιβεβαιωμένων δειγμάτων αντικατοπτρίζουν την αναγκαιότητα ύπαρξης της τεχνικής σαν διαγνωστικό εργαλείο. Ταυτόχρονα, προσφέρουν νέα επιδημιολογικά δεδομένα για τις νόσους με τις οποίες σχετίζονται, ιδιαίτερα όσον αφορά τα δείγματα που έδωσαν αρνητικά αποτελέσματα με τις κλασικές μεθόδους. Η παρούσα τεχνική έδωσε θετικά αποτελέσματα για 131 περιστατικά βακτηριακής μηνιγγίτιδας ή/και βακτηραιμίας, των οποίων τα δείγματα ήταν αρνητικά με τη μέθοδο των καλλιιεργειών (πίνακας 27, κεφάλαιο 3). Τα δείγματα αυτά καταγράφονταν ως αρνητικά και τα αντίστοιχα περιστατικά ως βακτηριακή μηνιγγίτιδα από άγνωστο παθογόνο ως το 2007.

Με βάση τα στοιχεία από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 25 του κεφαλαίου 3, στη συντριπτική πλειοψηφία (περίπου 82%) των θετικών περιστατικών (123/151) η λοίμωξη οφείλονταν σε βακτήρια του γένους *Streptococcus* αναδεικνύοντας ότι εκτός από τον πνευμονιόκοκκο και άλλοι στρεπτόκοκκοι

ευθύνονται για την πρόκληση μηνιγγίτιδας και βακτηριαμίας σε σημαντικό ποσοστό (τα δείγματα που δοκιμάστηκαν στην τεχνική ήταν αρνητικά για πνευμονιόκοκκο). Επίσης, αξιοσημείωτο είναι το ποσοστό εμφάνισης του *H.influenzae* (7%, 11/151), καθώς κανένα από αυτά τα περιστατικά δεν ανήκει στο συχνά εμφανιζόμενο πριν την εισαγωγή του εμβολίου τύπο β. Τέλος, σημαντικό είναι και το ποσοστό εμφάνισης του μικροοργανισμού *P.aeruginosa* (6%) σε 9 από τα 151 περιστατικά, κυρίως επειδή εμπλέκεται στην πρόκληση των λοιμώξεων ως νοσοκομειακό παθογόνο σε ανοσοκατεσταλμένους, διασωληνομένους ή σε μετεγχειρητικό στάδιο ασθενείς.

Εφαρμογή σε κλινικά δείγματα ασθενών με λοίμωξη του αναπνευστικού συστήματος

Τα ικανοποιητικά αποτελέσματα από την εφαρμογή της τετραπλής PCR σε δείγματα αίματος και ENY για την ανίχνευση και ταυτοποίηση μικροοργανισμών σε περιστατικά μηνιγγίτιδας και βακτηριαμίας οδήγησαν στην εφαρμογή της τεχνικής και σε δείγματα που προέρχονταν από το αναπνευστικό σύστημα.

Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 1.4.2.4 (κεφάλαιο 1) σχετικά με την PCR στη διάγνωση λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος, η αξιολόγηση των δειγμάτων του αναπνευστικού συστήματος –εκτός από τα πλευριτικά υγρά που λαμβάνονται από στείρα θέση- αποτελεί δύσκολη υπόθεση κυρίως λόγω της φορείας του ρινοφάρυγγα. Από την άλλη πλευρά, η συγκεκριμένη τεχνική PCR αν και ανιχνεύει όπως και οι καλλιέργειες περισσότερους από έναν μικροοργανισμούς σε ένα δείγμα, φαίνεται να υπερτερεί των καλλιιεργειών σε θέμα ταχύτητας, ευαισθησίας και ακρίβειας, εφόσον άμεσα από τη λήψη του δείγματος ταυτοποιεί τους μικροοργανισμούς που ανιχνεύονται σε αυτό και μάλιστα «αποκαλύπτει» μικροοργανισμούς που αλληλεπικαλύπτονται στην καλλιέργεια και απαιτούν σειρά διαδοχικών ανακαλλιιεργειών και επεξεργασίας για να ταυτοποιηθούν.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στους πίνακες 28 και 29 του κεφαλαίου 3 από τα 367 δείγματα που προέρχονταν από το αναπνευστικό σύστημα και στα οποία εφαρμόστηκε η τεχνική, στα 93 ανιχνεύθηκαν περισσότεροι από ένας μικροοργανισμοί. Στην πλειοψηφία των υπόλοιπων θετικών δειγμάτων (213) ανιχνεύθηκε *Streptococcus* spp. (154 στα 213), και σε πολύ μικρότερα ποσοστά με σειρά ανίχνευσης οι *H. influenzae*, *S.aureus* και *P.aeruginosa*. Σημαντικός είναι επίσης ο αριθμός των δειγμάτων (258) με αρνητική καλλιέργεια που έδωσαν θετικό αποτέλεσμα στην PCR, ενώ 3 δείγματα που ήταν θετικά στην καλλιέργεια για *H. influenzae* έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα στην PCR.

Το υψηλό ποσοστό ανίχνευσης των *Streptococcus* spp. στη συγκεκριμένη κατηγορία δειγμάτων ήταν αναμενόμενο, εφόσον σε αυτό περιλαμβάνονται ο πνευμονιόκοκκος, ο πυογόνος στρεπτόκοκκος και άλλοι στρεπτόκοκκοι που αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του ρινοφάρυγγα. Για το λόγο αυτό δεν μπορεί να γίνει περαιτέρω αξιολόγηση των αποτελεσμάτων προς το παρόν, αν δε διακριθούν ανάμεσά τους τουλάχιστον οι πνευμονιόκοκκοι και οι πυογόνοι στρεπτόκοκκοι που αποτελούν δύο βασικούς υπαίτιους των λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος.

Επιπλέον, η αξιολόγηση των δειγμάτων με την παρούσα τεχνική θα ήταν περισσότερο χρήσιμη και ενδιαφέρουσα αν η τεχνική εξελισσόταν σε real-time PCR ώστε να γίνεται ταυτόχρονα και ποσοτική αξιολόγηση, καθώς οι εξεταζόμενοι μικροοργανισμοί αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του ρινοφάρυγγα. Συνεπώς, η εφαρμογή της παρούσας τεχνικής δεν μπορεί να έχει άμεσα διαγνωστική αξία για τις νόσους του αναπνευστικού συστήματος –εκτός και αν εξετάζεται δείγμα πλευριτικού υγρού- και τα αποτελέσματά της θα πρέπει να αξιολογούνται με προσοχή από τους ειδικούς κλινικούς ιατρούς, λαμβάνοντας υπόψη το εξεταζόμενο υλικό, την ηλικία του ασθενούς και το ιστορικό του.

Ειδικότητα και ευαισθησία

Η ειδικότητα και ευαισθησία της τεχνικής υπολογίστηκαν σε υψηλά επίπεδα (98,2% και 100% αντίστοιχα) όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.1.3. Η μείωση της ευαισθησίας στο 98,2% οφείλεται στο γεγονός ότι τρία από τα δείγματα του αναπνευστικού συστήματος που ήταν θετικά στην καλλιέργεια για το μικροοργανισμό *H.influenzae* ήταν αρνητικά στην PCR. Τα αποτελέσματα αυτά προφανώς οφείλονται σε μη απόλυτη ειδικότητα των εκκινητικών μορίων παρά στην ευαισθησία της τεχνικής. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι παρουσιάστηκε ιδιαίτερη δυσκολία στο σχεδιασμό εκκινητικών μορίων απόλυτα ειδικών για τον *H.influenzae*, όπως αναφέρθηκε πρωτύτερα, καθώς και ότι η τεχνική της PCR ανίχνευσε 19 από τα 20 ταυτοποιημένα στελέχη *H.influenzae* στα οποία δοκιμάστηκε αρχικά.

Ταυτόχρονα, η υπόθεση για αυξημένη ευαισθησία και ειδικότητα της τεχνικής κάτω από το όριο ανίχνευσης της καλλιέργειας, στηρίζεται από το γεγονός ότι η τεχνική ανίχνευσε και ταυτοποίησε επιτυχώς όλα τα υπόλοιπα θετικά στην καλλιέργεια δείγματα και επιπλέον δείγματα που αντιστοιχούσαν σε κλινικά επιβεβαιωμένα θετικά περιστατικά με αρνητική καλλιέργεια, προφανώς λόγω μικρού βακτηριακού φορτίου, είτε λόγω ανυπαρξίας ζώντος μικροοργανισμού.

ΠΟΛΛΑΠΛΗ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ *Streptococcus pyogenes* (GROUP A *Streptococcus*) ΚΑΙ *Streptococcus agalactiae* (GROUP B *Streptococcus*)

Τα υψηλά ποσοστά ανίχνευσης στρεπτοκόκκων στα δείγματα ασθενών με μηνιγγίτιδα και βακτηριαμία, αλλά και στα δείγματα που προέρχονταν από το αναπνευστικό σύστημα και ιδιαίτερα αυτά που είχαν αρνητική καλλιέργεια, οδήγησαν στη δημιουργία μιας διπλής τεχνικής PCR για τη διάκριση ανάμεσά τους των *S.pyogenes* και *S.agalactiae*, δεδομένου ότι ο *S.pyogenes* αποτελεί έναν από τους βασικούς αποίκους του ρινοφάρυγγα και σχετίζεται άμεσα με την πρόκληση λοιμώξεων στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα, ενώ ο *S.agalactiae* αποτελεί το κυριότερο αίτιο θανατηφόρου μηνιγγίτιδας στα νεογνά.

Πειραματικά στάδια ανάπτυξης της τεχνικής

Τα εκκινητικά μόρια για τον *S.agalactiae* που επιλέχθηκαν από δημοσιευμένη εργασία ήταν πολύ μεγάλα σε μήκος (27 και 23 νουκλεοτίδια) και υβριδίζονταν στο 3' άκρο. Γι' αυτό αφαιρέθηκαν 4 νουκλεοτίδια από το 3' άκρο του CFBS. Η τροποποίηση αυτή βοήθησε σημαντικά στη μεγαλύτερη απόδοση προϊόντος και στο συνδυασμό με τα εκκινητικά μόρια που σχεδιάστηκαν εκ νέου για τον *S.pyogenes*. Τα εκκινητικά μόρια για τον *S.pyogenes* σχεδιάστηκαν εξ ολοκλήρου με τη βοήθεια του προγράμματος Primer 3 Input primer design στο γονίδιο *Spy1258*, του οποίου η αλληλουχία ήταν μοναδική στο συγκεκριμένο μικροοργανισμό σύμφωνα με τη δημοσίευση των Liu et al. 2005. Τα δύο ζεύγη εκκινητικών μορίων συνδυάστηκαν ώστε να δίνουν αποτελέσματα στην ίδια θερμοκρασία υβριδισμού. Η εμπειρία που αποκτήθηκε κατά την ανάπτυξη της τετραπλής PCR χρησιμοποιήθηκε για πιο γρήγορη προσαρμογή του προγράμματος στην τεχνολογία της Hot start stepdown PCR με τις κατάλληλες τροποποιήσεις στις συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων και την απευθείας εφαρμογή της τεχνικής σε κλινικά δείγματα αίματος χωρίς την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων .

Εφαρμογή σε κλινικά δείγματα

Η τεχνική εφαρμόστηκε σε όσα από τα δείγματα ήταν θετικά για *Streptococcus* spp. σύμφωνα με την πολλαπλή PCR για τους μικροοργανισμούς *H.influenzae*, *S. aureus*, *P.aeruginosa*, *Streptococcus* spp., είτε προέρχονταν από ασθενείς με μηνιγγίτιδα ή βακτηριαμία, είτε από ασθενείς με λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος.

Αν και από τα 123 θετικά για *Streptococcus* spp. περιστατικά μηνιγγίτιδας/βακτηριαμίας μόνο 12 ταυτοποιήθηκαν θετικά για τους εξεταζόμενους

μικροοργανισμούς (4 θετικά για *S.pyogenes*, 8 θετικά για *S.agalactiae*), αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι όλα τα θετικά για *S.agalactiae* περιστατικά συνέβησαν σε νεογνά και επιπλέον, ότι μόνο τα 2 από αυτά είχαν θετική καλλιέργεια. Η άμεση ταυτοποίηση του *S.agalactiae* σε δείγματα αίματος και ENY που προέρχονται από νεογνά είναι πολύ σημαντική, καθώς η λοίμωξη παρουσιάζει υψηλά ποσοστά θνησιμότητας.

Όσον αφορά τα δείγματα του αναπνευστικού συστήματος, αξιοσημείωτο είναι το ποσοστό εμφάνισης του *S.pyogenes* στα δείγματα πλευριτικών υγρών παιδιών και ενηλίκων (~19% και 42% επί των θετικών δειγμάτων αντίστοιχα) που τον καθιστούν δεύτερο αίτιο για την πρόκληση πνευμονίας μετά τον πνευμονιόκοκκο. Αξιοσημείωτο είναι επίσης το ποσοστό εμφάνισης του *S.pyogenes* στα δείγματα ωτικών εκκρινμάτων των παιδιών (20% επί των θετικών δειγμάτων) επιβεβαιώνοντας εκτός από την υψηλή πιθανότητα φορέας και τα υψηλά ποσοστά εμπλοκής στην πρόκληση μέσης ωτίτιδας.

Το πιο σημαντικό από όλα όμως μετά την εφαρμογή της τεχνικής σε κλινικά δείγματα, δεν είναι τόσο τα ποσοστά εμφάνισης των εξεταζόμενων μικροοργανισμών, καθώς ο αριθμός των εξετασθέντων δειγμάτων είναι πολύ μικρός για περαιτέρω συμπεράσματα, αλλά η επιβεβαίωση της ειδικότητας και ευαισθησίας της τεχνικής πέρα από τα βακτηριακά στελέχη, καθώς η διπλή PCR ανίχνευσε με επιτυχία 100% όσα από τα δείγματα είχαν θετική καλλιέργεια.

Ταυτοποίηση δειγμάτων αναπνευστικού συστήματος

Για την καλύτερη δυνατή αξιολόγηση των δειγμάτων που προέρχονταν από το αναπνευστικό σύστημα εφαρμόστηκε μια ακόμα τεχνική PCR στα δείγματα που ήταν θετικά για *Streptococcus* spp. και *H.influenzae* για την ταυτοποίηση των πνευμονιοκόκκων και του *H.influenzae* τύπου β. Η ανάπτυξη της συγκεκριμένης τεχνικής δεν αποτελεί μέρος της παρούσας διατριβής, όμως εφαρμόζεται στο Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας για την ανίχνευση μικροοργανισμών σε κλινικά δείγματα.

Στους πίνακες 37 και 38 του κεφαλαίου 3 παρουσιάστηκαν τα αποτελέσματα που προέκυψαν τελικά ύστερα από την εφαρμογή και των τριών τεχνικών στα δείγματα που προέρχονταν από το αναπνευστικό σύστημα παιδιών και ενηλίκων.

Όπως παρατηρείται, οι στρεπτόκοκκοι αποτελούν τα κύρια αίτια πρόκλησης πνευμονίας σε παιδιά και ενήλικες με ποσοστά 100% (ανιχνεύθηκαν σε 16 από τα 16 δείγματα πλευριτικών υγρών) και 83% (ανιχνεύθηκαν σε 10 από τα 12 θετικά δείγματα πλευριτικών υγρών) αντίστοιχα σε σύνολο θετικών δειγμάτων πλευριτικών υγρών. Και στις δύο ηλικιακές ομάδες σε μεγαλύτερο ποσοστό ανιχνεύθηκε ο

πνευμονιόκοκκος (75% στα παιδιά, 41,6% στους ενήλικες) και ακολουθεί σε συχνότητα ο πυογόνος στρεπτόκοκκος, GAS (18,75% στα παιδιά και στο ίδιο περίπου ποσοστό με τον πνευμονιόκοκκο στους ενήλικες). Η PCR βρίσκει διαγνωστική αξία στα δείγματα πλευριτικών υγρών, καθώς αυτά προέρχονται από στείρα θέση σε φυσιολογική κατάσταση και η ανίχνευση μικροοργανισμού σε αυτά υποδηλώνει λοίμωξη. Η διαγνωστική αξία της τεχνικής αυξάνεται σημαντικά αν υπολογίσουμε επίσης ότι η PCR έδωσε θετικό αποτέλεσμα για 27 από τα 29 συνολικά δείγματα που ήταν αρνητικά στις καλλιέργειες. Τα επιδημιολογικά στοιχεία της μελέτης για να αξιολογηθούν απαιτούν εφαρμογή σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων.

Στα δείγματα πτυέλων που προέρχονται από ενήλικες το μεγαλύτερο ποσοστό ανίχνευσης (περίπου 41%) ανήκει στους *Streptococcus* spp. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα αποδόθηκαν τις περισσότερες φορές ως φυσιολογική χλωρίδα, καθώς αντιστοιχούσαν σε δείγματα στις καλλιέργειες των οποίων αναπτύχθηκαν ως πρασινίζοντες στρεπτόκοκκοι όπως χαρακτηρίζονται και αποδόθηκαν στον αποικισμό της ανώτερης αναπνευστικής οδού. Σχεδόν όλοι οι μικροοργανισμοί, εκτός από τον πυογόνο στρεπτόκοκκο ανιχνεύθηκαν στα δείγματα των πτυέλων με μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης και πάλι του πνευμονιόκοκκου. Όπως προαναφέρθηκε, η συμβατική PCR δεν μπορεί σε καμία περίπτωση να αξιολογήσει άμεσα τα αποτελέσματα δειγμάτων πτυέλων. Τα δείγματα αυτά πρέπει να εξετάζονται κατά περίπτωση και ανάλογα με το ιστορικό του ασθενούς και το τελικό αποτέλεσμα να αξιολογείται από τον κλινικό γιατρό.

Ίσως τα βρογχοκυψελιδικά εκπλύματα (BAL) μπορούν να αξιολογηθούν καλύτερα με μια μέθοδο PCR, εφόσον προέρχονται από το κατώτερο αναπνευστικό σύστημα και δεν επηρεάζονται από τη φυσιολογική χλωρίδα, γεγονός που ενισχύεται σημαντικά από πρόσφατες δημοσιεύσεις για τη διάγνωση της πνευμονίας (Stralin *et al.* 2006, Marekovic *et al.* 2007). Όπως παρατηρείται, στα δείγματα BAL παιδιών και ενηλίκων ανιχνεύεται σε σημαντικά υψηλά ποσοστά και πάλι ο πνευμονιόκοκκος (35,3% και 45,8% αντίστοιχα), ενώ ενδιαφέρον προκαλεί η ανίχνευση του *H.influenzae* στο υψηλότερο ποσοστό ~80% στα δείγματα των παιδιών σε σχέση με τον ανύπαρκτο *H.influenzae* τύπου β για τον οποίο εμβολιάζεται ο πληθυσμός και συνεπώς η μελέτη της επιδημιολογίας του μικροοργανισμού.

Η αναγκαιότητα της μικροβιολογικής εξέτασης των δειγμάτων ωτικών εκκρινμάτων αμφισβητείται είτε με PCR, είτε με κλασικές μεθόδους. Παρά όλα αυτά, όπου κρίνεται αναγκαία η καλλιέργεια κρίνεται ακόμα πιο χρήσιμη η PCR. Τα

αποτελέσματα που προέκυψαν από την τετραπλή PCR δύσκολα αναλύονται ομαδικά, καθώς σε αρκετά δείγματα ανιχνεύθηκαν περισσότεροι από ένας μικροοργανισμοί. Παρ' όλα αυτά και εδώ οι στρεπτόκοκκοι ανιχνεύονται σε μεγαλύτερο ποσοστό. Η PCR φαίνεται να υπερτερεί και σε αυτή την κατηγορία δειγμάτων όσον αφορά την ταχύτητα, την ακρίβεια και την ευαισθησία, αφού σε αρκετά δείγματα «αποκάλυψε» μικροοργανισμούς που αλληλεπικαλύπτονταν στην καλλιέργεια. Αυτό συνέβη κυρίως για τον πνευμονιόκοκκο όπου στην καλλιέργεια δύσκολα ξεχωρίζει από τους άλλους πρασινίζοντες (α-αιμολυτικούς) στρεπτόκοκκους. Γενικά, τα αποτελέσματα της PCR έδωσαν μια πιο λεπτομερή και ακριβή εικόνα σχετικά με τους μικροοργανισμούς που περιέχονται σε ένα δείγμα, στοιχεία που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επιδημιολογία της μέσης ωτίτιδας και άλλων ασθενειών που μπορεί να προκληθούν εξελικτικά από αυτή, όπως η μηνιγγίτιδα.

Συμπερασματικά, από τα αποτελέσματα της παρούσας τεχνικής, αν και σε μικρό σχετικά αριθμό δειγμάτων, προκύπτει ότι οι στρεπτόκοκκοι και ιδιαίτερα ο πνευμονιόκοκκος έχουν τον πρώτο λόγο στις λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος. Τα αποτελέσματα της παραπάνω τεχνικής μπορούν να αξιολογηθούν καλύτερα και να αποτελέσουν χρήσιμο εργαλείο όχι μόνο για ερευνητικούς σκοπούς αλλά και για τη μοριακή διάγνωση στη ρουτίνα ενός μικροβιολογικού εργαστηρίου, αν συνδυαστούν παράλληλα με μια ακόμα μοριακή τεχνική που στοχεύει στην ανίχνευση κάποιων ακόμα μικροοργανισμών που ανιχνεύθηκαν σε υψηλά ποσοστά με καλλιέργειες όπως αυτοί που ανήκουν στα γένη *Acinetobacter*, *Klebsiella* και *Moraxella*.

ΠΟΛΛΑΠΛΗ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΙΣ ΜΑΚΡΟΛΙΔΕΣ – ΛΙΝΚΟΣΑΜΙΔΕΣ - ΣΤΡΕΠΤΟΓΡΑΜΜΙΝΗ Β, ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΗ ΣΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ- ΣΥΓΧΩΝΕΥΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ *S.pyogenes* ΚΑΙ *S.agalactiae*

Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο της εισαγωγής, οι μακρολίδες-λινκοσαμίδες-στρεπτογραμμίνες Β ανήκουν στην ίδια κατηγορία αντιβιοτικών (MLS_B αντιβιοτικά) με κοινούς μηχανισμούς δράσης και αντοχής και χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος που προκαλούνται από Gram θετικούς κόκκους, κατά κύριο λόγο στρεπτόκοκκους. Τα τελευταία χρόνια, η εμφάνιση ολοένα και περισσότερων ανθεκτικών στελεχών οδήγησε στην ανάγκη για πιο επιτακτικό έλεγχο της αντοχής.

Στην παρούσα διατριβή επιχειρήθηκε η ανάπτυξη μιας τεχνικής PCR για την ανίχνευση γονιδίων που προσδίδουν αντοχή στα MLS_B αντιβιοτικά και η συγχώνευσή της με την τεχνική PCR για την ανίχνευση των *S.pyogenes* και *S.agalactiae*, σε μία πενταπλή PCR με στόχο την απευθείας εφαρμογή σε κλινικά δείγματα που προέρχονται από το αναπνευστικό σύστημα.

Πειραματικά στάδια ανάπτυξης της τεχνικής

Τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των γονιδίων που προσδίδουν αντοχή στα MLS_B αντιβιοτικά επιλέχθηκαν από δημοσιευμένες εργασίες και είχαν ήδη δοκιμαστεί σε ανθεκτικά στελέχη. Η επιλογή εξ αρχής του προγράμματος της διπλής PCR βοήθησε στην πραγματοποίηση της συγχώνευσης των δύο τεχνικών και οι μοναδικές αλλαγές που θεωρήθηκαν αναγκαίες ήταν οι αλλαγές στις συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων. Τέλος, η εφαρμογή σε κλινικά δείγματα δεν επέφερε σημαντικές αλλαγές στην τεχνική, εφόσον τα δείγματα στα οποία εφαρμόστηκε (κλινικά δείγματα που προέρχονται από το αναπνευστικό σύστημα) δεν περιέχουν ποσότητες ανθρώπινου γενετικού υλικού ικανές να επηρεάσουν σημαντικά την αντίδραση.

Εφαρμογή σε βακτηριακά στελέχη

Η πενταπλή τεχνική εφαρμόστηκε σε 279 στελέχη στρεπτοκόκκων (πίνακας 2, κεφάλαιο 2). Συνοπτικά, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν επιβεβαιώθηκε για μια ακόμα φορά η υψηλή ειδικότητα των εκκινητικών μορίων για τους *S. pyogenes* και *S. agalactiae*, αφού ταυτοποίησαν επιτυχώς το 98,3% (113/115)

και το 100% (10/10) των στελεχών αντίστοιχα (πίνακας 39, κεφάλαιο 3), ενώ δεν έδωσαν προϊόντα για τα υπόλοιπα 154 στελέχη στρεπτοκόκκων που ανήκουν σε άλλα είδη.

Όσον αφορά τα γονίδια που προσδίδουν αντοχή στα αντιβιοτικά, η PCR ανίχνευσε ένα από αυτά στο 42,2% των στελεχών *S. pneumoniae* (62 από τα 147, πίνακας 41, κεφάλαιο 3). Ανάμεσά τους, το γονίδιο *mef* ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 60% στα στελέχη *S. pneumoniae* (σε 37 από τα 62 στελέχη που έδωσαν θετικό αποτέλεσμα για κάποιο από τα γονίδια αντοχής), ενώ το γονίδιο *ermB* σε λιγότερα από τα μισά θετικά (48%) για κάποιο γονίδιο αντοχής στελέχη (30 από τα 62 στελέχη). Σε κανένα στέλεχος *S. pneumoniae* δεν ανιχνεύθηκε το γονίδιο *ermTR*. Αντίθετα, το γονίδιο *ermTR* ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 65,6% στα στελέχη *S.pyogenes* (σε 61 από τα 93 στελέχη που έδωσαν θετικό αποτέλεσμα για κάποιο από τα γονίδια αντοχής), όπου το γονίδιο *mef* ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 30,1% (28 από τα 93 στελέχη). Το γονίδιο *ermB* ανιχνεύθηκε στο πολύ χαμηλό αναλογικά ποσοστό 8,6% (8 από τα 93 στελέχη). Συνολικά, στο 80,9% (93 από τα 115) των στελεχών *S.pyogenes* ανιχνεύθηκε κάποιο από τα γονίδια αντοχής. Τέλος, το γονίδιο *ermB* ανιχνεύθηκε στο ένα και μοναδικό στέλεχος *S.agalactiae* που έδωσε θετικό αποτέλεσμα για τα γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά. Το αποτέλεσμα αυτό δεν μπορεί να αξιολογηθεί, εφόσον υπάρχει ένα μόνο θετικό στέλεχος.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δεν μπορούν να αξιολογηθούν απόλυτα μεμονωμένα, ούτε να επιβεβαιώσουν την ειδικότητα και ευαισθησία της τεχνικής αν δε συγκριθούν με τα αποτελέσματα των δοκιμασιών αντοχής σε μακρολίδες και κλινταμυκίνη με τις κλασικές δοκιμασίες αντοχής. Για το λόγο αυτό, εξετάστηκαν τυχαία 173 από τα παραπάνω στελέχη για την αντοχή τους στην ερυθρομυκίνη (βασικός εκπρόσωπος των 14μερών μακρολιδών) με τη μέθοδο του E-test και όσα ανθεκτικά ανάμεσά τους στελέχη *S.pyogenes* με τη μέθοδο του D-test για την επαγωγίμη αντοχή στην κλινταμυκίνη.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις 2 τεχνικές όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 45, κεφάλαιο 3: Από τα 48 συνολικά στελέχη *S. pneumoniae*, τα 19 χαρακτηρίστηκαν ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη σύμφωνα με το E-test και η PCR ανίχνευσε κάποιο από τα γονίδια αντοχής στα 16 (84%) με αναλογία 75% και 30% για τα γονίδια *mef* και *ermB* αντίστοιχα, ενώ σε ένα ακόμα στέλεχος που χαρακτηρίστηκε ενδιάμεσης αντοχής με το E-test ανιχνεύθηκε το γονίδιο *ermB*. Το γονίδιο *ermB* ανιχνεύθηκε επίσης σε ένα από τα στελέχη που

χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητα με το E-test, ενώ όλα τα υπόλοιπα στελέχη που χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητα με το E-test δεν έδωσαν θετικό αποτέλεσμα για κανένα από τα γονίδια. Αξιοσημείωτο είναι ότι σε 3 από τα 19 (16%) στελέχη *S. pneumoniae* που χαρακτηρίστηκαν ανθεκτικά με το E-test δεν ανιχνεύθηκε κανένα γονίδιο αντοχής.

Κανένα γονίδιο αντοχής δεν ανιχνεύθηκε επίσης σε 12 από τα 106 (11,3%) στελέχη *S. pyogenes* που χαρακτηρίστηκαν ανθεκτικά με το E-test, ενώ στα υπόλοιπα 94 ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό 29,8%, 9,57% και 64,9% αντίστοιχα τα γονίδια *mef*, *ermB* και *ermTR*. Επιπλέον, το γονίδιο *ermTR* ανιχνεύθηκε στα 40 από τα 43 (93%) στελέχη που χαρακτηρίστηκαν ότι φέρουν το φαινότυπο που επάγει την αντοχή στην κλινταμυκίνη σύμφωνα με το D-test. Σε κανένα από τα στελέχη που χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητα με το E-test δεν ανιχνεύθηκε κάποιο από τα γονίδια αντοχής.

Συμπερασματικά, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της πενταπλής PCR με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη σύγκριση της μεθόδου με τις κλασικές μεθόδους ανίχνευσης της αντοχής, παρατηρούμε ότι τα ποσοστά ανίχνευσης των γονιδίων αντοχής ανά μικροοργανισμό κινούνται αναλογικά στο ίδιο επίπεδο: στη συντριπτική πλειοψηφία των ανθεκτικών στελεχών *S. pneumoniae* ανιχνεύεται το γονίδιο *mef*, ενώ σε πολύ μικρότερο ποσοστό αυτών ανιχνεύεται το γονίδιο *ermB*. Ομοίως, για τα ανθεκτικά στελέχη *S. pyogenes*, στη συντριπτική τους πλειοψηφία ανιχνεύεται το γονίδιο *ermTR*, ακολουθεί το γονίδιο *mef* και σε μικρότερο ποσοστό το *ermB*. Η ανίχνευση δε, του γονιδίου *ermTR* σχετίζεται άμεσα με την εκδήλωση του φαινοτύπου επαγωγίμης αντοχής στην κλινταμυκίνη. Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν αναλογικά και με αυτά που αναφέρονται από τους Farrell 2004 και Azavedo *et al.* 2001 και συζητήθηκαν στο κεφάλαιο της εισαγωγής, συνεπώς η τεχνική PCR που αναπτύχθηκε παρουσίασε υψηλό επίπεδο ευαισθησίας σχετικά με την ανίχνευση και ταυτοποίηση των γονιδίων που προσδίδουν αντοχή στα MLS_B αντιβιοτικά.

Όσον αφορά την ειδικότητα και αξιοπιστία της τεχνικής ως μεθόδου, τα αποτελέσματά της συγκρίθηκαν συνολικά με αυτά των κλασικών μεθόδων. Οι δύο μέθοδοι συμφώνησαν κατά 87% περίπου στο χαρακτηρισμό των βακτηριακών στελεχών ως ευαίσθητα, εφόσον γονίδια αντοχής με την πενταπλή PCR ανιχνεύθηκαν στα 109 από τα 126 συνολικά στελέχη που χαρακτηρίστηκαν ανθεκτικά με το E-test. Παρ' όλα αυτά, τα συγκεκριμένα αποτελέσματα δεν επηρεάζουν την αξιοπιστία της

μεθόδου, εφόσον η αντοχή στα MLS_B αντιβιοτικά οφείλεται σε ένα ποσοστό των μικροοργανισμών σε άλλους μηχανισμούς που δε σχετίζονται με τα συγκεκριμένα γονίδια (π.χ. ιδιοσύστατη μετάλλαξη στο rRNA της ριβοσωμικής υπομονάδας που εμποδίζει την πρόσδεση του αντιβιοτικού). Πιθανόν λοιπόν σε όσα από τα στελέχη χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικά με το E-test και δεν ανιχνεύθηκε κάποιο από τα γονίδια αντοχής με την PCR, ο φαινότυπος αντοχής να οφείλεται σε κάποιον άλλο μηχανισμό εκτός από αυτούς που σχετίζονται με τα γονίδια.

Από όλα τα παραπάνω συμπεραίνουμε πως η παρούσα πενταπλή τεχνική PCR, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των στρεπτοκόκκων *S.pyogenes* και *S.galactiae* και για το χαρακτηρισμό της αντοχής τους στα MLS_B αντιβιοτικά εφόσον ανιχνευθεί κάποιο από τα γονίδια αντοχής, χωρίς τη μεσολάβηση κλασικών μεθόδων. Ανάλογα δε με το γονίδιο που ανιχνεύεται εκφράζεται κι ένας διαφορετικός φαινότυπος και μηχανισμός αντοχής: το γονίδιο *mef* κωδικοποιεί την έκφραση μιας αντλίας και τα στελέχη είναι ανθεκτικά μόνο στις 14μερείς και 15μερείς μακρολίδες (ερυθρομυκίνη, κλαριθρομυκίνη, αζιθρομυκίνη) (Clancy *et al.* 1996), ενώ τα γονίδια *erm* κωδικοποιούν την παραγωγή μεθυλασών που μεθυλιώνουν το rRNA και δεν επιτρέπουν την πρόσδεση του αντιβιοτικού, συνεπώς τα στελέχη είναι ανθεκτικά σε όλα τα MLS_B αντιβιοτικά. Μάλιστα, το γονίδιο *ermTR* σχετίζεται σε υψηλό ποσοστό με το φαινότυπο της επαγωγίμης αντοχής στις λινκοσαμίνες. Επομένως, τα αποτελέσματα της παρούσας τεχνικής, μπορούν να χρησιμοποιηθούν επίσης για την παρακολούθηση της απόκτησης και λειτουργίας των μηχανισμών αντοχής των στρεπτοκόκκων στα MLS_B αντιβιοτικά και πιθανόν για μια περαιτέρω μελέτη, συσχέτιση και χαρακτηρισμό των στελεχών. Σε περίπτωση όμως που δεν ανιχνευθεί κάποιο από τα γονίδια αντοχής, τότε τα στελέχη θα πρέπει οπωσδήποτε να εξετάζονται και με τη μέθοδο του E-test, μήπως είναι ανθεκτικά λόγω ύπαρξης κάποιου άλλου μηχανισμού αντοχής.

Εφαρμογή σε κλινικά δείγματα

Μετά τα ικανοποιητικά αποτελέσματα εφαρμογής της πενταπλής τεχνικής στα βακτηριακά στελέχη έγινε προσπάθεια για την απευθείας εφαρμογή της σε κλινικά δείγματα στα οποία είχαν ανιχνευθεί στρεπτόκοκκοι. Η μέθοδος δεν εφαρμόστηκε σε δείγματα ENY, καθώς οι μακρολίδες δε διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και δε χρησιμοποιούνται στη θεραπεία της μηνιγγίτιδας, ούτε σε δείγματα αίματος, καθώς για τη θεραπεία βακτηριαιμίας από στρεπτόκοκκους χρησιμοποιούνται

συνήθως πενικιλίνες. Για τους παραπάνω λόγους, η τεχνική εφαρμόστηκε μόνο σε δείγματα που προέρχονταν από το αναπνευστικό σύστημα.

Όπως αναφέρθηκε και πρωτύτερα, από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις πρώτες PCR, καθώς επίσης και από τις καλλιέργειες, για τα δείγματα που προέρχονται από το αναπνευστικό σύστημα, είναι δυνατόν να περιέχουν περισσότερους από έναν Gram θετικούς κόκκους (Group A *Streptococcus*, *Streptococcus* spp., *S.pneumoniae*, *S.aureus*, *Enterococcus* spp.). Συνεπώς, είναι αδύνατο να αξιολογηθούν άμεσα με την πενταπλή τεχνική PCR, γιατί ένα θετικό αποτέλεσμα για κάποιο γονίδιο αντοχής μπορεί να προέρχεται από οποιονδήποτε μικροοργανισμό.

Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκαν 166 δείγματα που προέρχονταν από το αναπνευστικό σύστημα και ήταν θετικά για Group A *Streptococcus*, *Streptococcus* spp. ή *S.pneumoniae* και για κανέναν άλλο Gram θετικό κόκκο είτε στις καλλιέργειες, είτε στην PCR. Από αυτά τα δείγματα, 33 που είχαν ταυτοποιηθεί ως Group A *Streptococcus*, ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς και με την πενταπλή τεχνική.

Όσον αφορά τα γονίδια αντοχής στα MLS_B αντιβιοτικά, στα 11 από τα 19 (~58%) δείγματα BAL των παιδιών ανιχνεύθηκε γονίδιο αντοχής και μάλιστα το *ermB*, ενώ μόνο στο 16% (19 από 120) των δειγμάτων ωτικών εκκριμάτων. Αντίστοιχα, στα δείγματα ενηλίκων, γονίδιο αντοχής ανιχνεύθηκε στο 91,3% δειγμάτων BAL (21 από τα 23 δείγματα που εξετάστηκαν) και στο 100% (4 στα 4) των δειγμάτων βρογχικών εκκρίσεων. Προφανώς, η αντοχή των στελεχών σχετίζεται άμεσα με την ηλικία των ασθενών και πιθανόν τη χορήγηση μακρολιδών πρωτύτερα στους ενήλικες, όμως τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης θα ήταν πιο ακριβή και ενδιαφέροντα ύστερα από την εξέταση μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων και τη συλλογή σχετικών πληροφοριών από το ιστορικό των ασθενών.

Η εφαρμογή της πενταπλής τεχνικής απευθείας σε δείγματα που προέρχονταν από το αναπνευστικό σύστημα στην παρούσα εργασία αποτελεί μια πρώτη προσέγγιση, δοκιμή και αξιολόγηση της ανίχνευσης γονιδίων αντοχής και του χαρακτηρισμού ανθεκτικών στελεχών χωρίς τη μεσολάβηση κλασικών μεθόδων καλλιέργειας και E-test. Διαπιστώθηκε ότι αυτό είναι αδύνατο, τουλάχιστον όσον αφορά τα δείγματα που προέρχονται από το αναπνευστικό σύστημα όπου συνυπάρχουν περισσότεροι από ένας μικροοργανισμοί. Επιπλέον, όπως αναλύθηκε στην παράγραφο 4.3.2 το γεγονός ότι το αρνητικό αποτέλεσμα δε συνδέεται απαραίτητα με ευαίσθητο στέλεχος, είναι άλλος ένας ανασταλτικός παράγοντας. Συνεπώς, η εφαρμογή της πενταπλής τεχνικής

απευθείας σε κλινικά δείγματα που προέρχονται από το αναπνευστικό σύστημα δεν μπορεί να εφαρμοστεί, παρά μόνο σε περιπτώσεις προσεκτικά επιλεγμένων δειγμάτων, των οποίων η επιλογή δεν παρακάμπτει την καλλιέργεια και αυτό μόνο για μελέτες σχετικά με τα ποσοστά εμφάνισης των γονιδίων αντοχής και τους μηχανισμούς δράσης.

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διατριβή παρουσιάστηκε η ανάπτυξη τριών πολλαπλών τεχνικών PCR με στόχο την απευθείας εφαρμογή σε κλινικά δείγματα για την ανίχνευση και ταυτοποίηση μικροοργανισμών και τη χρήση τους ως διαγνωστικές τεχνικές στο μικροβιολογικό εργαστήριο.

Από τα πειραματικά στάδια ανάπτυξης των τεχνικών όπως αναλύθηκαν, συμπεραίνουμε πως η ανάπτυξη μιας πολλαπλής τεχνικής PCR μπορεί να γίνει ιδιαίτερα επίπονη και χρονοβόρα, ανάλογα με το λόγο για τον οποίο θα χρησιμοποιηθεί και τα κλινικά δείγματα στα οποία θα εφαρμοστεί. Η ανάπτυξή της σαφώς βοηθείται ιδιαίτερα από την ολοένα αυξανόμενη τεχνολογία και εφαρμογή εναλλακτικής μεθοδολογίας και συνεπώς τα αποτελέσματά της αποδεικνύονται πιο αξιόπιστα.

Για το λόγο αυτό, σε επίπεδο μοριακής διάγνωσης στα πλαίσια της Μικροβιολογίας, η PCR αξιολογείται πλέον σαν μια ειδική και ευαίσθητη μέθοδο που είναι ικανή να ανιχνεύσει την ύπαρξη μικροοργανισμών ακόμα και σε παθολογικά υλικά με πολύ χαμηλό μικροβιακό φορτίο. Όπως αποδείχθηκε και στην ανάπτυξη και εφαρμογή της τετραπλής PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των μικροοργανισμών *H.influenzae*, *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *Streptococcus* spp., η μοριακή μέθοδος υπερτερεί σημαντικά των κλασικών καλλιιεργειών σε ταχύτητα, ειδικότητα και ευαισθησία. Ειδικά η εφαρμογή της σε υλικά στείρα σε φυσιολογική κατάσταση, όπως το ΕΝΥ, το αίμα και το πλευριτικό υγρό, την καθιστούν χρήσιμο εργαλείο κυρίως για την ταχύτερη επιβεβαίωση και αντιμετώπιση σοβαρότατων νόσων όπως η πνευμονία, η μηνιγγίτιδα και η βακτηριαιμία. Επιπλέον, προσθέτει σημαντικά επιδημιολογικά στοιχεία για την παρακολούθηση και εξέλιξη αυτών των κρουσμάτων.

Από την άλλη πλευρά, δεν μπορούμε να πούμε ακόμα ότι η PCR είναι μια μέθοδος απόλυτα εφαρμόσιμη σε όλες τις περιπτώσεις μοριακής διάγνωσης που μπορεί να αντικαταστήσει αναμφισβήτητα τις κλασικές μεθόδους. Αυτό αποδείχθηκε εν μέρει στην εφαρμογή της παραπάνω τετραπλής τεχνικής στα δείγματα που προέρχονταν

από το αναπνευστικό σύστημα και πολύ περισσότερο στην εφαρμογή της πενταπλής τεχνικής PCR για την ανίχνευση γονιδίων που προσδίδουν αντοχή στα MLS_B αντιβιοτικά.

Συμπερασματικά λοιπόν, μέσα από τις τρεις τεχνικές που αναπτύχθηκαν στην παρούσα διατριβή αποκαλύπτονται τα «δυνατά» και τα «αδύνατα» σημεία της PCR ως διαγνωστικής μεθόδου στον τομέα της Μικροβιολογίας, τα οποία μας οδηγούν σε μια πολύ προσεκτική και κατά περίπτωση χρήση της μεθοδολογίας ώστε να εκμεταλλευόμαστε πλήρως μόνο όσα θετικά έχει να δώσει στον τομέα της διαγνωστικής.

ABSTRACT**DEVELOPMENT OF METHODOLOGY FOR THE MOLECULAR DETECTION AND IDENTIFICATION OF BACTERIA AND THE APPLICATION ON PATIENTS' CLINICAL SAMPLES****Athanasia Xirogianni****University of Thessaly, Department of Biochemistry & Biotechnology**

The present thesis describes the development of three multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) assays and evaluates their accuracy as molecular techniques in comparison to classical techniques, as well as, their application on clinical samples.

The first part presents the development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and identification of *H.influenzae*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *Streptococcus* spp. The developed multiplex PCR assay is of high specificity and sensitivity and can be applied directly on patients' clinical samples, such as cerebrospinal fluid, whole blood and pleural fluid. In addition, it proved to be a useful diagnostic tool for the early confirmation of severe infectious diseases such as meningitis, septicaemia and pneumonia. In contrast, it was found that for the evaluation of respiratory tract infections, the clinical samples obtained (bronchoalveolar lavage, sputa, ear fluid) need thorough sampling by the clinician because the presence of the microorganisms from the normal flora will confuse the diagnosis by the molecular techniques.

The second part presents the development of a multiplex PCR for the simultaneous identification of *S.pyogenes* and *S.agalactiae*. This PCR was applied to all clinical samples positive for *Streptococcus* spp. The assay showed 100% sensitivity and specificity in comparison to culture methods and revealed *S. pyogenes* was the second microorganism responsible for causing respiratory tract infections, following *S.pneumoniae*.

Respiratory tract infections are usually treated, apart from penicillin, with macrolides-lincosamides-streptogramins B, known as MLS_B antibiotics. The third multiplex PCR assay which is presented was developed for the detection of genes responsible for MLS_B antibiotic resistance. This assay was combined with the multiplex PCR for the identification of *S. pyogenes* and *S. agalactiae* in one multiplex

PCR assay. The new multiplex PCR assay proved to be highly sensitive and specific for the identification of *S. pyogenes* and *S. agalactiae*, as well as, for their resistance in MLS_B antibiotics.

Overall, the PCR assays described are simple and easily implemented methods that can be applied on a wide range of clinical samples. Their high specificity and sensitivity proved them as useful diagnostic tools, especially wherever emergent identification is needed for treatment.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Κρεμαστινού-Κουρέα Τ., Τζανακάκη Τ., Βελεγράκη Α. Η μηνιγγιτιδοκοκκική νόσος. Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγιτίδας. Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας;1996.

Σιουμάλα Μ., Τζανακάκη Τ., Κεσανόπουλος Κ., Λεβειδιώτου-Στεφάνου Σ., Κουρέα-Κρεμαστινού Τ. Ταυτόχρονη ανίχνευση εννέα κύριων οροτύπων *Streptococcus pneumoniae* σε βιολογικά υλικά με τη μέθοδο της stepdown multiplex PCR. Δελτίον Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας, 2007;52 (3): 173-179.

AlaAldeen. Neisseria and Moraxella. In: Medical Microbiology. 17th Edition. Elsevier;2007 σε επιμέλεια Α. Τσακρή. Ιατρική Μικροβιολογία. 1^η Ελληνική έκδοση. Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδη;2010, σελ. 313-324.

Arpin C., Daube H., Tessier F., Quentin C. Presence of *mefA* and *mefE* genes in *Streptococcus agalactiae*. Antimicrob. Agents. Chemother. 1999;43: 944-946.

Azavedo JCS, McGavin M., Duncan C., Low DE, McGeer A. Prevalence and mechanisms of macrolide resistance in invasive and noninvasive Group B *Streptococcus* isolates in Ontario. Antimicrob Agents Chem. 2001;45: 3504-3508.

Baldwin DR and Macfarlane JT. Community-acquired Pneumonia. In :Infectious Diseases. Eds Cohen J, Powderly W, 2th ed.Elsevier; 2004, p. 369-380.

Balganesh M., Lalitha MK, Nathaniel R. Rapid diagnosis of acute pyogenic meningitis by a combined PCR dot-blot assay. Mol Cell Probes 2000;14: 61-69.

Bannerman T. L. and Peacock S. J. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci In: Manual of Clinical Microbiology, Eds: Murray P. R., Baron E. J., Jorgesen J. H., Pfaller M. A., Tenover F. C., Tenover F. C., 9th edition. ASM Press, Washington D. C.; 2007, p.390-410. .

multiplex PCR based on two outer membrane lipoprotein genes *oprI* and *oprL*. Journal of Clinical Microbiology 1997;35 (6):1295-1299.

Drakopoulou Z., Kesanopoulos K., Sioumala M., Tambaki A., Kremastinou J., Tzanakaki G. Simultaneous single-tube PCR-based assay for the direct identification of the five most common meningococcal serogroups from clinical samples. FEMS Immunol Med Microbiol 2008;53: 178-182.

Elnifro EM., Ashshi AM., Cooper RJ., Klapper PE. Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology. Clin Microbiol Rev 2000;13 (4): 559-570.

Farell JD., Jenkins SG. Distribution across the USA of macrolide resistance and macrolide resistance mechanisms among *Streptococcus pneumoniae* isolates collected from patients with respiratory tract infections: PROTEKT US 2001-1002. J Antimicrob Chem 2004;54: S1, 17-22.

Farley MM. Group B Streptococcal disease in nonpregnant adults. Clin Infect Dis 2001;33: 556-561.

Garcia-Rodriguez JA, Martinez MJF. Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. J Antimicrob Chemother 2002;50: S2, 59-73.

Gladstone RA, Jefferies JM, Faust SN, Clarke SC. Continued control of pneumococcal disease in the UK-the impact of vaccination. J Med Microbiol. 2010 (Epub ahead of print).

Hall L.M. Application of molecular typing to the epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Pathol 1998;51: 270-4.

Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. Biotechniques 1997;23: 504-511.

Henrichsen J. Six newly recognised types of *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol 1995;33: 2759-2762.

Kilian M. *Streptococcus* and *Enterococcus* In: Medical Microbiology. 17th Edition. Elsevier;2007 σε επιμέλεια Α. Τσακρή. Ιατρική Μικροβιολογία. 1^η Ελληνική έκδοση. Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδη;2010, σελ.224-243.

Kilian M. *Haemophilus* In: Manual of Clinical Microbiology, Eds:Murray P. R., Baron E. J., Jorgesen J. H., Pfaller M. A., Tenover F. C., Tenover F. C., 9th edition. ASM Press, Washington D. C.; 2007,p.636-648.

Kwang S. K. Acute bacterial meningitis in infants and children. Lancet Infec Dis 2010; 10:32-42.

Koedel U, Scheld W, Pfister H. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. Lancet Infect Dis 2002;2:721-736.

Kong F., Ma L., Gwendolyn L.G. Simultaneous detection and serotype identification of *Streptococcus agalactiae* using multiplex PCR and reverse line blot hybridization. J Med Microbiol 2005;54: 1133-1138.

Ladhani S., Slack M. P. E., Heath P. T., von Gottberg A., Chandra M., Ramsay M. E. Invasive *Haemophilus influenzae* disease, Europe, 1996-2006. Emerg Inf Dis. 2010;16:455-463.

Laguna del-Estal P., Garcia-Montero P., Agud-Fernandez M., Lopez-Cano Gomez M., Castaneda-Pastor A., Garcia-Zubiri C. Bacterial meningitis due to gram-negative bacilli in adults. Rev Neurol 2010;50(8):458-62.

Leclercq R., Courvalin P. Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*, Antimicrob. Agents Chemother. 2002;46: 2727-2734.

Leclercq R., Courvalin P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics by target modification, Antimicrob. Agents Chemother 1991;35: 1267-1272.

Lexau CA, Lynfield R, Danila R. *et al.* Changing epidemiology of invasive pneumococcal disease among older adults in the era of pediatric pneumococcal conjugate vaccine. *Jama* 2005;294: 2043-2051.

Liu D, Hollingshead S, Swiatlo E, Lawrence ML, Austin FW. Rapid identification of *Streptococcus pyogenes* with PCR primers from a putative transcriptional regulator gene. *Res Microbiol* 2005;156(4):564-7.

Lu JJ, Perng CL, Lee SY, Wan CC. Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 2000;38:2076-2080.

Lynch JP. and Zhamel GG. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology and risk factors, evolution of antimicrobial resistance, and impact of vaccines. *Curr Opin Pulm Med.* 2010;16 (3):217-25.

Lynn AW. Sepsis. In :*Infectious Diseases*. Eds Cohen J, Powderly W, 2th ed.Elsevier; 2004, p. 613-627,

Marekovic I., Plecko V., Boras Z., Pavlovic L., Budimir A., Bosnjak Z. *et al.*, Evaluation of PCR in bronchoalveolar lavage specimens for diagnosis of pneumococcal pneumonia, 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, Spain, 19-22 April 2008.

Mishal J., Embon A., Darawshe A., Kidon M., Magen E. Community acquired acute bacterial meningitis in children and adults: An 11-year survey in a community hospital in Israel. *Eur J Int Med* 2008;19:421-426.

Murdoch DR, Anderson TP, Beynon KA, Chua A. *et al.* Evaluation of a PCR assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* in respiratory and nonrespiratory samples from adults with community-acquired pneumonia. *J Clin Microbiol* 2003;41: 63-66.

Olcen P, Lantz PG, Backman A, Radstrom P. Rapid diagnosis of bacterial meningitis by a seminested PCR strategy, *Scand J Infect Dis* 1995;27(5):537-9.

- Palomares C., Torres MJ, Torres A., Aznar J., Palomares J. Rapid detection and identification of *Staphylococcus aureus* from blood culture specimens using real time fluorescence PCR. *Diagn Microbiol Infec Dis* 2003;45: 183-189.
- Pandit L, Kumar S, Karunasagar I, Karunasagar I. Diagnosis of partially treated culture-negative bacterial meningitis using 16S rRNA universal primers and restriction endonuclease digestion. *J Med Microbiol*. 2005;54(Pt 6):539-42.
- Park I. H., Pritchard D. G., Cartee R., Brandao A., Brandileone M. C., Nahm M. H. Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2007;4: 1225-33.
- Pavlovcinova G., Jakubikova J., Hromadkova P., Mohammed E Severe acute otitis media in children. *Bratis Lek Listy* 2008;109:204-209.
- Pedersen M., Benfield TL, Skinhoej P., Jensen AG. Haematogenous *Staphylococcus aureus* meningitis: A 10-year nationwide study of 96 consecutive cases. *BMC Infec Dis* 2006;6: 49.
- Peltola H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13: 302-317.
- Pelton SI. Otitis, Sinusitis and related Conditions. In :Infectious Diseases. Eds Cohen J, Powderly W, 2th ed.Elsevier; 2004, p. 349-358.
- Picard F., Ke D., Boudreau D., Boissinot M., Huletsky A., Richard D., Ouellette M., Roy P. H., Bergeron M. G. Use of *tuf* sequences for genus-specific PCR detection and phylogenetic analysis of 28 streptococcal species. *J Clin Microbiol* 2004;42 (8):3686-3695.

Spellerberg B. and Brandt C, *Streptococcus* In: Manual of Clinical Microbiology, Eds: Murray P. R., Baron E. J., Jorgesen J. H., Pfaller M. A., Tenover F. C., Tenover F. C., 9th edition. ASM Press, Washington D. C.; 2007, p.412-428.

Strålin K, Bäckman A, Holmberg H, Fredlund H, Olcén P. Design of a multiplex PCR for *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* to be used on sputum samples. *APMIS*. 2005;113(2), 99-111.

Stralin K., Korsgaard J., Olcen P. Evaluation of a multiplex PCR for bacterial pathogens applied to bronchoalveolar lavage. *Eur Respir J* 2006;28: 568-575.

Swenson J. M., Patel J. B., Jorgensen J. H., Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance In: Manual of Clinical Microbiology, Eds: Murray P. R., Baron E. J., Jorgesen J. H., Pfaller M. A., Tenover F. C., Tenover F. C., 9th edition. ASM Press, Washington D. C.; 2007, p.1173-1192.

Tait-Kamradt A., Clancy J., Cronan M., Dib-Hajj F., Wondrack L., Yuan W, Sutcliffe J. *mefE* is necessary for the erythromycin resistant M phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*1997;41: 2251-2255.

Tsai JC, Teng LJ. Direct detection of bacterial pathogens in brain abscesses by PCR amplification and sequencing of partial 16S ribosomal deoxyribonucleic acid fragments. *Neurosurgery* 2004;55(5):1154-62.

Turenne CY, Witwicki E, Hoban DJ, Karlowsky JA, Kabani AM. Rapid identification of bacteria from positive blood cultures by fluorescence-based PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 2000;38:513-520.

Tzanakaki G, Tsolia M, Vlachou V, Theodoridou M, Pangalis A, Foustoukou M, Karpathios T, Blackwell CC, Kremastinou J. Evaluation of non-culture diagnosis of invasive meningococcal disease by polymerase chain reaction (PCR). *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003;39:31-36.

Zeng X., Kong F., Wang H., Darbar A., Gilbert G. L. Simultaneous detection of nine antibiotic resistance-related genes in *Streptococcus agalactiae* using multiplex PCR and reverse line blot hybridization assay. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006;50: 204-209.

Zambardi G., Druetta A., Roure C., Fouque B., Girardo P., Chypre C., Marchand J., Freney J., Fleurette J. Rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infections by an ELISA-like detection of polymerase chain reaction products. *Mol Cell Probes* 1995;9: 91-99.

Zhang K., Sparling J., Chow B. L., Elsayed S., Hussain Z., Church D. L., Gregson D. B., Louie T., Conly J. M.. New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology* 2004.;42 (11):4947-4955.

Zhang Y., Isaacman D., Wadowsky R., Rydquist-White J., Christopher Post J., Ehrlich G. Detection of *Streptococcus pneumoniae* in whole blood by PCR. *J Clin Microbiol*, 1995;33 (3): 596-601.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Xirogianni A., Tzanakaki G., Karagianni E., Markoulatos P., Kourea-Kremastinou J., 2009. Development of a single-tube PCR assay for the simultaneous detection of *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* spp. directly in clinical samples. *Diagn Microbiol Infec Dis*, **63(2):121-6**.
2. Xirogianni A., Tzanakaki G., Sioumala M., Makri A., Argyropoulou A., Tsolia M., Barbouni A., Voyiatzi A., Paniara O., Markoulatos P., Kourea-Kremastinou J. Evaluation of direct application of multiplex PCR assays in clinical samples from respiratory tract infections, *Journal of Medical Microbiology* (submitted)
3. Tzanakaki G., Xirogianni A., Kesanopoulos K., Levidiotou S., Markoulatos P., Kremastinou J. Evaluation of two single-tube multiplex PCR assays applied directly in clinical samples for the simultaneous detection and identification of microorganisms causing bacterial meningitis in Greece, *Clinical Microbiology and Infection* (submitted)