

Αθανασία Χ. Ξηρογιάννη

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

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 βακτηριαμία, 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 βακτηριαμία 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..