



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ:

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΑΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ
ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (multiplex PCR) ΓΙΑ ΤΗ
ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΟΡΟΤΥΠΩΝ ΤΟΥ
*Haemophilus influenzae***

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΒΑΣΙΛΑΡΑΚΗ ΒΑΣΙΛΕΙΑ-ΒΑΣΩ**

A.M: 209011

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: Α. ΚΑΡΑΓΚΟΥΝΗ-ΚΥΡΤΣΟΥ

ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΤΖ. ΤΖΑΝΑΚΑΚΗ

ΑΘΗΝΑ, 2012

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας 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 Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών του τμήματος Βιολογίας, από το 2009 ως το 2011.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κα Αμαλία Καραγκούνη-Κύρτσου και επιβλέπουσα της διπλωματικής εργασίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την ανάληψη του θέματος έως και την ολοκλήρωση του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Νικόλαο Χατζηνικολάου και τον Καθηγητή κ. Γεώργιο Διαλλινά για το ενδιαφέρον 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 την Καθηγήτρια Τζωρτζίνα Τζανακάκη, Επιστημονική Υπεύθυνη του ΕΚΑΜ, για τη στενή επιτήρηση, στήριξη και καθοδήγηση καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας, καθώς και τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις της.

Ευχαριστώ όλο το προσωπικό και τους συνεργάτες του ΕΚΑΜ για τη συνεργασία, και προπάντων τους συναδέλφους Δρ. Κωνσταντίνο Κεσανόπουλο, Δρ. Αθανασία Ξηρογιάννη, η εμπειρία των οποίων αποδείχθηκε πολύτιμος σύμβουλος. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα, τις Ιατρούς Μικροβιολόγους, Δρ. Αναστασία Πάγκαλη (Δ/τρια Μικ/κού Εργ. Νοσ. Παίδων «Αγ. Σοφία») για την αποστολή στελεχών που αποτέλεσαν μέρος του υλικού της εργασίας και Δρ. Αλίκη Βογιατζή (Δ/τρια Μικ/κού Εργαστηρίου Νοσ. Παίδων Πεντέλης) για τη συλλογή, αποστολή και αξιολόγηση μέρους των κλινικών δειγμάτων που αποτέλεσαν υλικό της διπλωματικής εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	- 3 -
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	- 3 -
1.1 <i>Haemophilus influenzae</i>	- 3 -
1.1.1 Ιστορική αναδρομή.....	- 3 -
1.1.2 Μικροβιολογία του μικροοργανισμού <i>Haemophilus influenzae</i>	- 4 -
1.1.3 Ταξινόμηση του <i>Haemophilus influenzae</i>	- 8 -
1.1.3.1 Ορότυποι του <i>Haemophilus influenzae</i>	- 8 -
1.3.2 Βιότυποι του <i>Haemophilus influenzae</i>	- 8 -
1.4 Παθογένεια του <i>Haemophilus influenzae</i>	- 9 -
1.5 Φορεία του <i>Haemophilus influenzae</i>	- 12 -
1.6 Τρόποι μετάδοσης και παράγοντες που επηρεάζουν την μετάδοση των διεισδυτικών νόσων που προκαλούνται από τον <i>Haemophilus influenzae</i>	- 14 -
1.8 Διάγνωση των νόσων που προκαλούνται από τον <i>Haemophilus influenzae</i>	- 17 -

1.8.2 PCR (Polymerase Chain Reaction, Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης).....	19 -
1.8.2.1 Πολλαπλή Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Multiplex PCR).....	20 -
1.8.2.3 Αρχή της Μεθόδου του Ενζύμου Υψηλής Πιστότητας Πολυμεράσης (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase).....	21 -
1.8.3 Σύγκριση κλασικών και μοριακών μεθόδων τυποποίησης του <i>Haemophilus influenzae</i>.....	22 -
1.8.4 Άλλες μέθοδοι τυποποίησης του <i>Haemophilus influenzae</i>.....	22 -
1.9 Θεραπεία της διεισδυτικής νόσου που προκαλείται από <i>Haemophilus influenzae</i>.....	23 -
α) Πολυσακχαριδικά εμβόλια.....	24 -
1.11 Επιδημιολογικά στοιχεία του <i>Haemophilus influenzae</i>.....	26 -
1.11.1 Επιδημιολογικά δεδομένα της Ελλάδας.....	29 -
1.12 Στόχος της εργασίας.....	30 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	32 -
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	32 -
2.1 ΥΛΙΚΑ.....	32 -

2.1.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ	
ΣΤΕΛΕΧΗ.....	- 32 -
2) Πρότυπα στελέχη αναφοράς (reference strains).....	- 32 -
2.1.1.2 Στελέχη τα οποία απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα.....	- 32 -
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	34 -
2.2.1 Καλλιέργεια βακτηριακών στελεχών.....	- 34 -
2.2.2 Συντήρηση βακτηριακών στελεχών.....	- 34 -
2.2.3 Ταυτοποίηση στελεχών <i>H. influenzae</i>.....	- 35 -
2.2.5 Μέθοδοι απομόνωσης DNA.....	- 37 -
α) Απομόνωση γενετικού υλικού (DNA) από βακτηριακό στέλεχος.....	- 37 -
β) Απομόνωση γενετικού υλικού από ολικό αίμα και πλευριτικό υγρό.....	- 37 -
γ) Απομόνωση γενετικού υλικού από εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY).....	- 38 -
δ) Μέθοδος απομόνωσης γενετικού υλικού από βρογχοκυψελιδικά εκπλύματα (BAL).....	- 39 -

2.2.6 Εμβολιασμός κλινικών δειγμάτων (δείγματα αίματος) με εναιώρημα στελεχών <i>Haemophilus influenzae</i> οροτύπου a, d και e.....	40 -
2.2.7 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.....	41 -
2.2.7.5 Αντιδραστήρια.....	43 -
2.2.7.5.1 Phusion High Fidelity DNA Polymerase.....	44 -
2.2.7.6 Πειραματικά στάδια ανάπτυξης της τεχνικής.....	44 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	52 -
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	52 -
3.1 ΟΡΟΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗ.....	52 -
3.2 ΠΟΛΛΑΠΛΗ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΠΕΝΤΕ ΟΡΟΤΥΠΩΝ ΤΟΥ <i>H. influenzae</i>	53 -
3.2.1 Πειραματικά στάδια ανάπτυξης της τεχνικής.....	53 -
3.2.3 Κλινικά δείγματα <i>Haemophilus influenzae</i>	63 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	65 -
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	65 -
ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	70 -

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....- 71 -

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....- 71 -

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Haemophilus influenzae

1.1.1 Ιστορική αναδρομή

Ο Γερμανός μικροβιολόγος Koch ήταν ο πρώτος που παρατήρησε βακτήρια του γένους *Haemophilus* σε οφθαλμικά επιχρίσματα ασθενών με επιπεφυκίτιδα το 1883. Η πρώτη ωστόσο περιγραφή και καλλιέργεια του βακτηρίου έγινε απ' τον Pfeiffer το 1892, ο οποίος απομόνωσε το βακτήριο από πτύελα ασθενών με γρίπη κατά την διάρκεια της πρώτης πανδημίας γρίπης (1892-1893) προτείνοντάς το ως αιτιολογικό της και δίνοντάς του το όνομα *Bacillus influenzae*. Το 1920 δόθηκε στο βακτήριο αυτό η ονομασία *Haemophilus influenzae* απ' τον Winslow και το 1933 διαπιστώθηκε ότι αιτιολογικός παράγοντας της γρίπης είναι ιός και ότι ο μικροοργανισμός είναι αίτιο δευτερογενούς λοίμωξης. Το όνομα του είδους του βακτηρίου αντικατοπτρίζει την απόλυτη ανάγκη του μικροοργανισμού για αίμη (αιμόφιλος, heme, haemophilus = blood-loving) (Taubenberger *et al*, 2008).

Στη δεκαετία του 30 η Margaret Pittman ανακάλυψε ότι ο μικροοργανισμός *H. influenzae* απομονώθηκε σε δύο μορφές, με κάψα και χωρίς κάψα, αναγνωρίζοντας έξι τύπους με κάψα (ορότυποι **a** έως **f**). Όταν ο μικροοργανισμός αναπτύχθηκε σε καθαρό θρεπτικό υλικό, οι αποικίες εμφάνισαν δύο ξεχωριστές μορφολογίες, ημιδιαφανείς ή ιριδίζουσες όταν παρατηρήθηκαν με πλάγιο φως. Τα αδρά και ημιδιαφανή στελέχη δεν είχαν κάψα, δεν αντιδρούσαν με τα αντισώματα που ήταν ειδικά για τους τύπους κάψας **a**, **b**, **c**, **d**, **e**, **f** και ονομάζονταν μη τυποποιήσιμα (Non-Typeable *H. influenzae*, NTHi) (Pittman, 1931). Το 1972 αναγνωρίστηκε η προστατευτική ιδιότητα των αντισωμάτων έναντι της κάψας στην εμφάνιση λοιμώξεων, ενώ η πρώτη δοκιμή πολυσακχαριδικού εμβολίου έναντι του *H. influenzae* έγινε στη Φιλανδία το 1974. Δώδεκα χρόνια μετά, το 1986, άρχισαν οι πρώτες δοκιμές του συζευγμένου εμβολίου (Jordens *et al*, 1995).

1.1.2 Μικροβιολογία του μικροοργανισμού *Haemophilus influenzae*



Εικόνα 1.1. Ηλεκτρονική

μικροσκοπία σάρωσης του *H.*

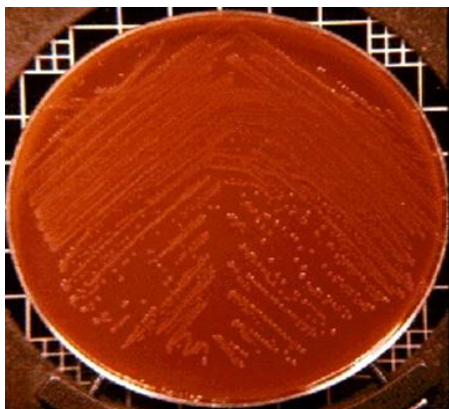
(www.ciriscience.org/ph_138-

Pneumonia Haemophilus influenzae Copyright

Dennis Kunkel Microscopy)

Ο μικροοργανισμός *Haemophilus influenzae* είναι Gram (-) κοκκοβακτήριο. Είναι αερόβιο και δυνητικά αναερόβιο βακτήριο, το οποίο ανήκει στην οικογένεια των *Pasteurellaceae*. Ο ρινοφάρυγγας του ανθρώπου είναι ο μοναδικός οικολογικός θώκος του με εξαίρεση το γυναικείο γεννητικό σωλήνα που περιστασιακά μπορεί να αποικιστεί από αυτό. Ο *H. influenzae* (αιμόφιλος) δεν ανευρίσκεται στο περιβάλλον ελεύθερα, δεν αποικίζει ούτε μολύνει άλλα είδη ζώων.

Εμφανίζει μεγάλη ποικιλομορφία στην μορφολογία του. Ο μικροοργανισμός μπορεί να παρουσιάσει δύο ειδών σχήματα: κυκλικό, κοκκοειδές (cocco-) και ραβδοειδές (bacill-). Ο αιμόφιλος μπορεί να εμφανιστεί και με τις δύο μορφολογίες κατά τη διάρκεια της ζωής του όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.1 (Ulanova *et al*, 2009).



Εικόνα 1.2. Καλλιέργεια *H. influenzae* σε σοκολατόχρωμο άγαρ.

(<http://bmtjournal.blogspot.gr/2007/12/particulars-of-patient-name-tong-wei.html>)

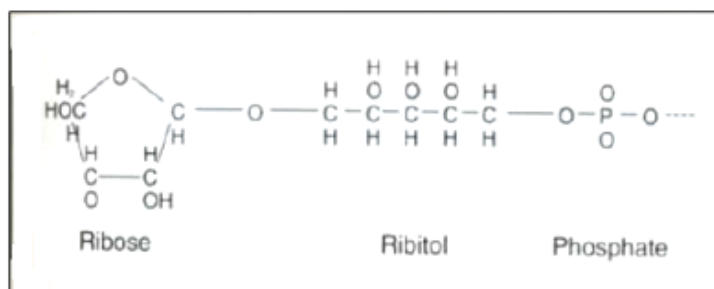
Στην καλλιέργεια, ο μικροοργανισμός παρουσιάζει αυξημένες απαιτήσεις για την ανάπτυξή του και απαιτεί συγκεκριμένους παράγοντες, τους αυξητικούς παράγοντες X και V (νικοτιναμιδικό δινουκλεοτίδιο της αδερίνης, NAD⁺) που περιλαμβάνονται στο αίμα. Το NAD⁺ απελευθερώνεται σε αιματούχο υπόστρωμα καλλιέργειας από τα ερυθρά αιμοσφαίρια, ενώ ο παράγοντας X δεν απελευθερώνεται παρά μόνο αν επέλθει λύση των ερυθροκυττάρων (Ulanova *et al*,

Για το λόγο αυτό, τα βακτήρια αυτού του γένους, καλλιεργούνται και αναπτύσσονται σε σοκολατόχρωμο άγαρ (περιέχει ερυθροκύτταρα που έχουν υποστεί λύση) και όχι σε αιματούχο (περιέχει φυσιολογικά ερυθροκύτταρα) (Εικόνα 1.2). Τα στελέχη

αναπτύσσονται σε ατμόσφαιρα 5 % CO₂ σε βέλτιστη θερμοκρασία 33°C – 37 °C (Ulanova *et al*, 2009).

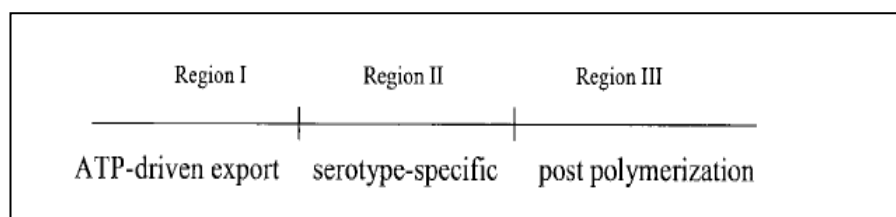
Τα στελέχη διακρίνονται σε αυτά που φέρουν κάψα και σε αυτά που δεν φέρουν. Τα στελέχη με κάψα εκφράζουν καθεμιά από τις έξι χημικά και αντιγονικά διακριτές πολυσακχαριδικές κάψες που χαρακτηρίζονται με τους λατινικούς χαρακτήρες από **a** έως **f** (Ulanova *et al*, 2009).

Συγκεκριμένα, η κάψα των στελεχών τύπου **b** αποτελούνταν από πολυμερή ριβόζης και 5-φωσφορικής ριμπιτόλης (PRP polyribosyl ribitolphosphate). Η πολυσακχαριδική αυτή κάψα ήταν καλά χαρακτηρισμένη σε μοριακό επίπεδο, με τη ριβόζη που ήταν συνδεδεμένη με έναν εστερικό δεσμό με τη ριμπιτόλη και μια αλκοόλη που ήταν συνδεδεμένη με μια φωσφορική ομάδα (Εικόνα 1.3). Η συγκεκριμένη δομή ήταν μοναδική, διότι στους υπόλοιπους οροτύπους (**a**, **c**, **d**, **e** και **f**) του *H. influenzae* η κάψα αποτελούνταν από εξόζες και όχι από πεντόζες (Ulanova *et al*, 2009).



Εικόνα 1.3. Δομή των επαναλαμβανόμενων μονάδων της πολυσακχαριδικής κάψας του αιμοφίλου τύπου **b** (Ulanova *et al*, 2009).

Όλα τα στελέχη που είχαν κάψα περιείχαν τον γενετικό τόπο ο οποίος ονομάζονταν *cap*, ένα τμήμα 18 kb το οποίο ήταν υπεύθυνο για την ειδικότητα των οροτύπων εκατέρωθεν του οποίου βρίσκονταν οι περιοχές της κάψας. Ο γονιδιακός τόπος της κάψας αποτελούνταν από τρεις περιοχές (I, II, III) (Εικόνα 1.4). Οι περιοχές I και III ήταν κοινές σε όλα τα στελέχη του αιμοφίλου με κάψα.

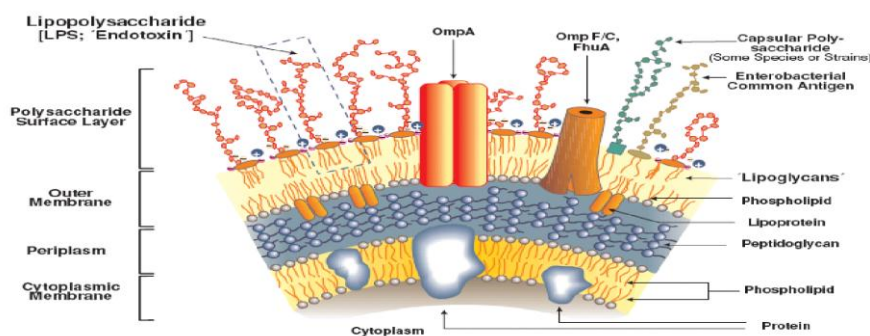


Εικόνα 1.4. Οργάνωση του γονιδιακού τόπου *cap* του *H. influenzae* (Satola *et al*, 2003).

Η περιοχή II περιείχε γονίδια ειδικά για τον ορότυπο. Όλα τα τυποποιήσιμα στελέχη παρουσίασαν 100% ομοιότητα στις περιοχές I και III αλλά διέφεραν στην περιοχή II. Οι περιοχές I και III περιελάμβαναν γονίδια που κωδικοποιούσαν πρωτεΐνες υπεύθυνες για τον πολυμερισμό και την απομάκρυνση της κάψας αντίστοιχα (Nelson *et al*, 2010).

Ο λιποπολυσακχαρίτης (Lipopolysaccharide, LPS) του αιμοφίλου αποτελούνταν από τα εξής μέρη: το υδρόφοβο λιπίδιο A με το οποίο προσδενόταν στην εξωτερική μεμβράνη και τον πολυσακχαριδικό πυρήνα (core polysaccharide). Ο πυρήνας του πολυσακχαρίτη βρισκόταν στην επιφάνεια του βακτηριακού κυττάρου. Το λιπίδιο A ονομαζόταν και ενδοτοξίνη, το οποίο βρισκόταν στην εξωτερική μεμβράνη του κυττάρου και ήταν υπεύθυνο για την τοξικότητα του βακτηρίου (Wang and Quihn, 2010) (Εικόνα 1.5).

Ο λιποπολυσακχαρίτης της εξωτερικής μεμβράνης του *H. influenzae* διέφερε από τους λιποπολυσακχαρίτες των άλλων Gram αρνητικών βακτηρίων επειδή αποτελούνταν από σημαντικά βραχύτερες πλάγιες ολιγοσακχαριδικές αλυσίδες. Η δομή του λιπιδίου δεν περιελάμβανε το αντιγόνο Όμικρον (O-antigen). Αντίθετα, ο λιποπολυσακχαρίτης ενσωμάτωσε μικρές ολιγοσακχαριδικές πλευρικές αλυσίδες σε τρεις συντηρημένες επτόζες για το λόγο αυτό ονομαζόταν λιποολιγοσακχαρίτης (lipooligosaccharide LOS) (Wang and Quihn, 2010). Παρατηρήθηκε αντιγονική ετερογένεια στο LOS η οποία οφειλόταν στις διαφορές στο λιπίδιο A, στον πολυσακχαρίτη του πυρήνα και στις βραχείες ολιγοσακχαριδικές αλυσίδες (Gilsdorf, 1998).



Εικόνα 1.5 Κυτταρικό τοίχωμα του *Haemophilus influenzae* (Wang and Quihn, 2010).

Πολλές πρωτεΐνες επιφανείας του *H. influenzae* είχαν αναγνωριστεί χωρίς ωστόσο, να ήταν γνωστός ο ρόλος πολλών από αυτών. Πολλά στελέχη *H. influenzae* κυρίως με κάψα αλλά και χωρίς κάψα έφεραν ινίδια (pilli) τα οποία εκτείνονταν σε μήκος 450 nm. Τα ινίδια του αιμοφίλου (pili) αποτελούσαν τις πρωτεΐνες προσκόλλησης (adhesins) στα επιθηλιακά κύτταρα. Τα ινίδια έπαιζαν σημαντικό ρόλο στα πρώτα στάδια της μόλυνσης.

Είχε παρατηρηθεί ότι τα στελέχη του αιμοφίλου χωρίς ινίδια δεν είχαν την ικανότητα να αποικούν τον ρινοφάρυγγα με την ίδια ευκολία (δέσμευση στην μυκίνη) που τον αποικούν τα στελέχη τα οποία είχαν τις πρωτεΐνες προσκόλλησης (Ronander, 2008). Ήταν φανερός ο ρόλος τους στην προσκόλληση των μικροβίων στα επιθηλιακά κύτταρα του ανωτέρω αναπνευστικού του ανθρώπου (Geme, 2000).

Πειραματικές μελέτες σε στελέχη *H. influenzae* που δεν είχαν κάψα ούτε ινίδια έδειξαν ότι διατηρούν την ικανότητα αποτελεσματικής προσκόλλησης σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα με την ύπαρξη άλλων πρωτεϊνών προσκόλλησης, όπως HMWI/HMW2, Hia και Har. Επιπλέον, η αιμοκίνη (haemocin) ήταν μια μικρή θερμοσταθερή πρωτεΐνη η οποία αναστέλλει την ανάπτυξη των στελεχών του αιμοφίλου όλων των οροτύπων εκτός από του **b** καθώς και των μη τυποποιήσιμων στελεχών. Αντίθετα, η OapA (opacity-associated protein) ήταν μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη μεγέθους 47kDa με την οποία επιτεύχθηκε η προσκόλληση στα επιθηλιακά κύτταρα και ήταν απαραίτητη για την φαρυγγική φορεία. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εντοπίστηκε στον τυποποιήσιμο και μη τυποποιήσιμο αιμόφιλο (Geme, 2000, Geme, 2002).

Άλλες σημαντικές πρωτεΐνες επιφανείας του *H. influenzae* ήταν οι πρωτεΐνες P2 και P5 που επηρέασαν την προσκόλληση των μικροβίων στον ρινοφαρυγγικό βλεννογόνο και χαρακτηρίστηκαν από έντονη αντιγονική ποικιλομορφία από στέλεχος σε στέλεχος (Geme, 2002) σε αντίθεση με την P6 που θεωρούνταν η πλέον σταθερή μεταξύ των στελεχών καθιστώντας την σημαντική υποψήφια για μελλοντική παραγωγή εμβολίου έναντι του NonTypeable *H.influenzae* (NT *H.influenzae*) (Berenson *et al*, 2005). Επίσης, η πρωτεΐνη D της εξωτερικής μεμβράνης διευκόλυνε την προσκόλληση και την είσοδο του μικροβίου στον αναπνευστικό βλεννογόνο (Marrs *et al*, 2001). Επιπλέον, ο *H. influenzae* παρήγαγε την εξωκυττάρια ενδοπεπτιδάση IgA1 που διασπούσε την IgA1, την κύρια ανοσοσφαιρίνη που παραγόταν στον αναπνευστικό βλεννογόνο (Marrs *et al*, 2001).

Ο ολιγοσακχαρίτης LOS εμπλεκόταν με πολλαπλούς τρόπους στη λοιμογόνο ικανότητα του μικροβίου (Wang and Quihn, 2010). Η δομή του LOS επηρέασε την ικανότητα προσκόλλησης και διείσδυσης του βακτηρίου στα κύτταρα (Wang and Quihn, 2010), το οποίο αποτέλεσε ισχυρό ερέθισμα για την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών απ' τα μακροφάγα. Ο *H. influenzae* εξέφραζε υδατανθρακικές δομές όμοιες του ξενιστή [περιλαμβανομένων phosphorylcholine (ChoP), N-acetyl-lactosamine, paragloboside και sialoparagloboside] στον ολιγοσακχαρίτη LOS, η έκφραση των οποίων μπορούσε να διευκολύνει την αποφυγή της άμυνας ή την ενεργοποίηση υποδοχέων ξενιστού, ως μέσο μοριακής μίμησης (Swords *et al*, 2001).

1.1.3 Ταξινόμηση του *Haemophilus influenzae*

1.1.3.1 Ορότυποι του *Haemophilus influenzae*

Ο *H. influenzae* διακρίθηκε σε στελέχη με κάψα και σε στελέχη χωρίς κάψα. Τα στελέχη με κάψα αντιδρούσαν με τον αντιορό που χρησιμοποιείται για την τυποποίηση (typing antisera), ενώ τα στελέχη χωρίς κάψα δεν αντιδρούσαν με αυτό και, συνεπώς, αναφέρονταν ως μη τυποποιήσιμα στελέχη (*nontypeable H. influenzae*, *NTH. influenzae*) (Ulanova *et al*, 2009). Η έννοια του ορότυπου αναφερόταν στην πολυσακχαριδική κάψα που φέρει ο μικροοργανισμός, ο οποίος σύμφωνα με αυτήν ταξινομήθηκε σε έξι οροτύπους που χαρακτηρίζονται με τους λατινικούς χαρακτήρες από **a** έως **f**. Η έκφραση κάψας ήταν σχετικά ασταθής και απώλεια της έκφρασής της συνέβαινε εξαιτίας απώλειας του γενετικού υλικού που απαιτήθηκε για τη σύνθεσή της. Τα περισσότερα μη τυποποιήσιμα στελέχη *NTHi* διέθεταν μοναδικά πρότυπα εξωτερικής μεμβράνης συγκρινόμενα με τα τυποποιήσιμα στελέχη και φυλογενετικά διέφεραν από αυτά. (Gilsdorf, 1998). Τα στελέχη *NTHi* και *Hib* αντιπροσώπευαν διαφορετικούς πληθυσμούς στελεχών. Οι αποικίες τους ήταν διαφορετικές στην καλλιέργεια, είχαν διαφορετικές κλινικές εκδηλώσεις και διέφεραν γενετικά μεταξύ τους. Τα στελέχη *Hib* ήταν κλωνικός πληθυσμός ενώ τα *NTHi* εμφάνισαν εκτεταμένη γενετική ποικιλομορφία (Murphy *et al*, 2009).

Η ύπαρξη κάψας είχε σχετιστεί με τη λοιμογόνο ιδιότητα του *Haemophilus influenzae* προσφέροντας πλεονέκτημα επιβίωσης των μικροβίων στο αίμα ευνοώντας στην πρόκληση διεισδυτικής λοίμωξης και στην αποφυγή λυτικής δράσης του συμπληρώματος (Jin *et al*, 2007, Kelly *et al*, 2004). Επιπλέον, ευνόησε την επιβίωσή του κατά τη μετάδοση από άτομο σε άτομο και στον αποικισμό του ρινοφάρυγγα (Kelly *et al*, 2004). Η λοιμογόνος ιδιότητα του *Hib* ενδεχομένως σχετίστηκε και μ' άλλες ιδιότητες εκτός της κάψας ενώ πολλά χαρακτηριστικά λοιμογονικότητας ήταν κοινά στα διάφορα στελέχη με κάψα (Kelly *et al*, 2004). Έκφραση νέου τύπου κάψας από στέλεχος άλλου τύπου κάψας δεν είχε παρατηρηθεί στην φύση, ούτε είχε περιγραφεί έκφραση κάψας από στελέχη *H. influenzae* φυλογενετικά μη τυποποιήσιμα που να μετατράπηκαν με DNA στέλεχους με κάψα (Gilsdorf, 1998).

1.3.2 Βιότυποι του *Haemophilus influenzae*

Τα στελέχη *H. influenzae* χωρίστηκαν σε οκτώ βιότυπους (biotypes) (από το I έως το VIII). Η έννοια του βιοτύπου αναφερόταν σε μια ομάδα οργανισμών, οι οποίοι είχαν τον

ίδιο συγκεκριμένο γενότυπο και χαρακτηρίστηκε βάσει τριών βιοχημικών αντιδράσεων, την παραγωγή ινδόλης, ουρεάσης και αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης. Οι βιότυποι του *H. influenzae* εμφανίσαν μια συσχέτιση με την πηγή της απομόνωσης. Έτσι, από την αναπνευστική οδό, το μέσο ους και τις οφθαλμικές λοιμώξεις απομονώθηκαν στελέχη βιοτύπων II και III, ενώ ο βιότυπος IV συνδέθηκε με μολύνσεις του γεννητικού συστήματος (πίνακας 1.1) (Hogail *et al*, 2004).

Πίνακας 1.1. Οι βιότυποι του αιμοφίλου συσχετίζονται με την πηγή της μόλυνσης (Hogail *et al*, 2004).

Βιότυπος	Λοιμώξεις	Ινδόλη	Ουρεάση	Αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης
I	Σηψαιμία, μηνιγγίτιδα	+	+	+
II	Βακτηριαίμια, λοιμώξεις οφθαλμών, ωτών και κατώτερης αναπνευστικής οδού	+	+	-
III	Λοιμώξεις οφθαλμών και αναπνευστικής οδού	-	+	-
IV	Λοιμώξεις ωτών, αναπνευστικής και γεννητικής οδού	-	+	+
V	Λοιμώξεις ωτών και κατώτερης αναπνευστικής οδού	+	-	+
VI	Λοιμώξεις άνω αναπνευστικής οδού	-	-	+
VII	Λοιμώξεις άνω αναπνευστικής οδού	+	-	+
VIII	Λοιμώξεις άνω αναπνευστικής οδού	-	-	-

Η πλειονότητα των στελεχών του αιμοφίλου που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα συνήθως άνηκαν στους βιότυπους I, II, ή III, ενώ τα στελέχη τύπου b άνηκαν στον βιότυπο I. Τα στελέχη που απομονώθηκαν από την αναπνευστική οδό άνηκαν κυρίως στους βιότυπους I, II, ή III, ενώ περίπου 20% των μη τυποποιήσιμων στελεχών που απομονώθηκαν από ουρογεννητικές μολύνσεις ήταν βιότυπου IV (Marrs *et al*, 2001).

1.4 Παθογένεια του *Haemophilus influenzae*

Η παθογένεια της διεισδυτικής λοίμωξης με *H. influenzae b* ξεκίνησε με τον αποικισμό του ρινοφάρυγγα. Ομοίως, και η παθογένεια της βακτηριακής μέσης ωτίτιδας από NT *H. influenzae* ξεκίνησε με τον ρινοφαρυγγικό αποικισμό (οπότε το βακτήριο δια της ευσταχιανής σάλπιγγας μετανάστευσε στο μέσο ους) (Myrphy *et al*, 2009). Ο NT *H. influenzae* είχε αναπτύξει πολλούς μηχανισμούς που διευκόλυναν την επιβίωσή του στον άνθρωπο – ξενιστή, όπως μόρια προσκόλλησης στο επιθήλιο, έκκριση πρωτεασών,

σχηματισμό μικροαποικιών, αντιγονικό drift και σχηματισμό βιομεμβρανών (King *et al*, 2008). Μελέτες έδειξαν ότι η προσκόλληση στα επιθηλιακά κύτταρα ξεκινά με προφλεγμονώδη απάντηση μέσω διαφόρων οδών, πυροδοτώντας με τον τρόπο αυτό τον σχηματισμό μικροθηλών στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού και οδηγώντας σε εγκαλπισμό των *H.influenzae*. Οι αρχικοί υποδοχείς φαινόταν ότι ήταν τύπου Toll (TLR2 και TLR4) και ο υποδοχέας του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAFR – platelet – activating factor receptor) (Ronander, 2008). Η ενεργοποίηση του υποδοχέα PAF ήταν πιο αποτελεσματικός τρόπος ενδοκυττάριας διείσδυσης των βακτηρίων απ' τη μακροπινοκύτωση όπως φάνηκε με χημική δοκιμή μέτρησης βιώσιμων ενδοκυττάριαων βακτηρίων (Swords *et al*, 2001). Πρόσθετες πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι η διείσδυση *H. influenzae* ενδοκυτταρίως είχε σχέση με αύξηση του κυτταροπλασματικού ασβέστιου Ca^{++} , ενώ εμποδίστηκε όταν δεσμεύτηκε το κυτταροπλασματικό ασβέστιο Ca^{++} ή άδειασαν οι αποθήκες ασβεστίου Ca^{++} του κυτταροπλάσματος (Geme, 2002). Πιθανή τρίτη οδός διείσδυσης αποτέλεσε η μέσω υποδοχέων β-γλυκάνης (Geme, 2002). Συνεπώς αν και ο *NT H. influenzae* θεωρούνταν κλασσικό εξωκυττάριο βακτήριο που προσκολλήθηκε στο επιθήλιο του βλεννογόνου του ανώτερου αναπνευστικού, το βακτήριο εντοπίστηκε επίσης ενδοκυττάρια σε κύτταρα του αναπνευστικού σωλήνα του ανθρώπου (επιθηλιακά κύτταρα και μακροφάγα), στο μεσοκυττάριο διάστημα (Murphy *et al*, 2009). Η ενδοκυττάρια παραμονή του *H. influenzae* τον προστάτευσε από τη δράση αντισωμάτων και των αντιβιοτικών παραγόντων και παρείχε μέσο αποφυγής της απομάκρυνσης από τον αναπνευστικό σωλήνα. Αντίθετα έγινε αντιληπτό ότι η πρόσληψη βακτηρίων από τα επιθηλιακά κύτταρα ήταν τμήμα της εσωτερικής άμυνας του ξενιστή (Swords *et al*, 2001).

Τα μακροφάγα κύτταρα έπαιξαν σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση και στη φαγοκυττάρωση του *H. influenzae*. Πρωταρχικός παράγοντας ενεργοποίησης της ανοσολογικής αντίδρασης των μακροφάγων ήταν ο λιποπολυσακχαρίτης (LOS). Επίσης, η πρωτεΐνη επιφανείας P6 θεωρούνταν ισχυρό και ειδικό ερέθισμα παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών απ' τα μακροφάγα, ειδικά IL-10, TNF-a και IL-8. Η παραγωγή TNF-a έδωσε την δυνατότητα στρατολόγησης υποπληθυσμών των T κυττάρων, ενώ η IL-10 μπορούσε να ρυθμίσει περαιτέρω τις ενέργειες των T κυττάρων περιλαμβανομένης της παρουσίας αντιγόνων στα Th1 κύτταρα. Επίσης η πρωτεΐνη P6 ήταν ανοσορρυθμιστής της αύξησης του αριθμού των λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα. Η παραγωγή IL-8 προσέφερε ακόμα τη δυνατότητα στρατολόγησης ουδετεροφίλων στην περιοχή της φλεγμονής (Berenson *et al*, 2005).

Αιτία για τη σπανιότητα των συστηματικών λοιμώξεων με *H. influenzae* ήταν η αποτελεσματική εξουδετέρωσή τους με αντισώματα και συμπλήρωμα. Για να διευκολύνει την αποφυγή της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή, ο *H. influenzae* είχε αναπτύξει αρκετούς μηχανισμούς, με τους οποίους προκλήθηκαν αλλαγές σε αντιγόνα επιφάνειας, δημιουργήθηκαν νέοι επίτοποι που δεν αναγνωρίστηκαν από ειδικά αντισώματα έναντι του αρχικού στελέχους (Gilsdorf, 1998). Αυτοί οι μηχανισμοί ήταν οι σημειακές μεταλλάξεις γονιδίων, η γονιδιακή ενίσχυση (gene amplification), η ποικιλία φάσης (phase variation), η οριζόντια μετακίνηση γονιδίων και ο ομόλογος ανασυνδυασμός (Gilsdorf, 1998). Μελέτη στελεχών *H. influenzae* που απομονώθηκαν από το μέσο ους παιδιών με οξεία μέση ωτίτιδα και από το φάρυγγα υγιών παιδιών έδειξε μεγάλη ποικιλομορφία γονιδίων που κωδικοποιούσαν χαρακτηριστικά παθογονικότητας, το οποίο έδειξε ότι συγκεκριμένοι παράγοντες μπορούσαν να βελτιώσουν την προσαρμογή του μικροβίου σε συγκεκριμένους οικολογικούς θώκους, ενώ σε άλλες περιοχές οι παράγοντες αυτοί μπορεί να απωλεστούν χωρίς συνέπειες στην ικανότητα επιβίωσης του μικροοργανισμού (Gilsdorf *et al*, 2004).

Ως προς την παραγωγή βιομεμβρανών (biofilm) από τον *H. influenzae* οι σύγχρονες μελέτες δεν καταλήγουν σε σαφή συμπεράσματα. Τα βακτήρια στις βιομεμβράνες είναι ανθεκτικά στους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή και στα αντιβιοτικά. Η λοίμωξη με τη μορφή των βιομεμβρανών συχνά συνδέεται με αρνητικές καλλιέργειες παρόλη την παρουσία βιώσιμων βακτηρίων (Murphy *et al*, 2009). Πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν την εκδοχή της έκφρασης ειδικού φαινοτύπου παραγωγής βιομεμβρανών ως ξεχωριστού μέρους του κύκλου ζωής του βακτηρίου. Υποστηρίζεται ότι οι προσκολλημένες αποικίες του *NTH. influenzae* που αποτελούνται από ζώντα και νεκρά βακτήρια είναι αποτέλεσμα μη προγραμματισμένης διαδικασίας που περιλαμβάνει συνάθροιση βακτηρίου σε μορφή κύστεων όπου περιλαμβάνονται τα βακτηριακά συστατικά της μεμβράνης (LPS και πρωτεΐνες), απελευθέρωση DNA από την λύση των κυττάρων και συσσώρευση επιζήμιων ουσιών λόγω της φλεγμονής (Webster *et al*, 2006). Οι βιομεμβράνες αποτελούνται από πολλαπλά μόρια / μακρομόρια, κυρίως εξωπολυσακχαρίτες αλλά και άλλα συστατικά όπως πρωτεΐνες και DNA (Hall-Stoodley *et al*, 2009). Ωστόσο τα σύγχρονα δεδομένα για τον σχηματισμό βιομεμβρανών *in vivo* δεν έχουν καταλήξει σε σαφή συμπεράσματα καθώς ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η ύπαρξη βιομεμβρανών είναι υπόθεση και όχι πραγματικότητα (Moxon *et al*, 2008).

1.5 Φορεία του *Haemophilus influenzae*

Ο οικολογικός θώκος του *H. influenzae* είναι το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα του ανθρώπου. Η φορεία (carriage) του *Haemophilus influenzae* είναι ο αποικισμός του μικροοργανισμού στον ρινοφάρυγγα του ξενιστή και ορίζεται ως η παρουσία βιώσιμων πληθυσμών του μικροοργανισμού *Haemophilus influenzae* στο φαρυγγικό βλεννογόνο του ξενιστή (Barbour *et al*, 1996). Ο αποικισμός του ρινοφάρυγγα με *NTH. influenzae* συνέβαινε από τα πρώτα έτη ζωής. Η συχνότητα αποικισμού αυξήθηκε απ' την βρεφική ηλικία (20% περίπου τον πρώτο χρόνο ζωής) ως την έναρξη της παιδικής ηλικίας (>50% σε παιδιά 5-6 ετών) και παρέμενε υψηλή στους ενήλικες (Geme, 2000). Η πορεία του αποικισμού είναι μια δυναμική διαδικασία που αφορά στην εγκατάσταση ενός στελέχους για βραχύ χρονικό διάστημα, στην επακόλουθη απώλεια αυτού και στην απόκτηση νέου στελέχους (Dabernat *et al*, 2003). Ο ρινοφάρυγγας του ανθρώπου μπορούσε να θεωρηθεί ως το μέρος όπου συνέβαιναν συχνές ανταλλαγές γενετικού υλικού συνέπεια του οποίου τα βακτήρια αποκτούσαν νέες ιδιότητες ως προς την ανθεκτικότητά και την παθογονικότητά τους (Sulikowska *et al*, 2004). Η συχνότητα που ένας φορέας μπορούσε να αποικιστεί με *NTHi* είχε σχετιστεί άμεσα με τη συχνότητα μέσης ωτίτιδας από *H. influenzae* καθώς επίσης ο πληθυσμός του μικροοργανισμού φάνηκε ότι ήταν ιδιαίτερα σημαντικός για την πιθανότητα εξέλιξης σε μέση ωτίτιδα (Geme, 2000).

Σε πληθυσμό παιδιών προσχολικής ηλικίας στο Ηνωμένο Βασίλειο πριν την εισαγωγή του εμβολίου *Hib* τα ποσοστά φορείας *Hib* ήταν 8-12%. Μελέτη σε παιδιά προσχολικής ηλικίας πλήρως εμβολιασμένα έδειξε ότι η φορεία *Hib* κυμάνθηκε από 1 έως 3% (Kelly *et al*, 2004). Στην προ-εμβολίου εποχή ο *Hib* απομονώθηκε από τον ρινοφάρυγγα υγιών βρεφών και παιδιών σε ποσοστό 0,5-3% αλλά δεν ήταν τόσο συχνό στους ενήλικες. Η συχνότητα φορείας *H. influenzae* στην Ευρώπη και στην Β. Αμερική ποικίλλει από 11,7% έως 95% μεταξύ παιδιών προσχολικής ή σχολικής ηλικίας (Hashida *et al*, 2008). Παράγοντες που ευνοούν την φορεία είναι το κάπνισμα, η πλημμελής υγιεινή χεριών των ενηλίκων και των παιδιών και ο συγχρωτισμός. Η αυξημένη επίσης συχνότητα χρήσης αντιβιοτικών σε παιδιά προσχολικής ηλικίας οδηγεί σε αύξηση της επιλεκτικής πίεσης για ανάπτυξη ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων που αποικίζουν τον ρινοφάρυγγα των παιδιών αυτών (Barbosa-Cesnik *et al*, 2008). Σημαντικό ρόλο επίσης παίζει η ηλικία, η εποχή, ο συγχρωτισμός, η θεραπεία με αντιβιοτικά, η νοσηρότητα από οξείες λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού και ο τρόπος βρεφικής σίτισης (Hashida *et al*, 2008).

Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στα ποσοστά φορείας ανάμεσα στα δύο φύλα (Wang *et al*, 2008). Οι μελέτες ωστόσο ως προς την εποχιακή κατανομή της φορείας *H. influenzae* ήταν αντικρουόμενες. Σε κάποιες μελέτες παρατηρήθηκαν δύο εποχιακές

κατανομές με πρώτη κορυφή τους μήνες από Σεπτέμβριο έως Δεκέμβριο και δεύτερη τους μήνες από Μάρτιο έως Μάιο (Dabernat *et al*, 2003).

Σ' άλλες μελέτες δεν υπήρχε διαφορά μεταξύ της εποχιακής κατανομής, ενώ μελέτες έδειξαν σημαντικά υψηλότερη συχνότητα φορέας τους χειμερινούς μήνες από το καλοκαίρι (Hashida *et al*, 2008). Η εποχιακή κατανομή της φορέας με υψηλότερα ποσοστά αποικισμού την άνοιξη παρατηρήθηκε σε παιδιά σε παιδικούς σταθμούς σε μελέτη στην Πολωνία (Sulikowska *et al*, 2004).

Η χρήση του συζευγμένου εμβολίου έναντι του *H. influenzae b* είχε οδηγήσει σε μείωση της ρινοφαρυγγικής φορέας πιθανώς εξαιτίας της ανοσολογικής αντίδρασης σε τοπικό επίπεδο βλεννογόνων και σε πρόκληση συλλογικής ανοσίας (Zhang *et al*, 2004). Μελέτη στη Γαλλία από τρεις διαφορετικές περιοχές σε παιδιά ηλικίας 3-36 μηνών παιδικών σταθμών έδειξε ότι η μέση συχνότητα φορέας *H. influenzae* ανήλθε σε ποσοστό 40,9% σε σύνολο 1683 παιδιών. Σε ένα μεγάλο ποσοστό των παιδιών αυτών (98%) είχε χορηγηθεί μία δόση συζευγμένου εμβολίου *Hib* και κατά συνέπεια δεν ανευρέθηκε κανένα στέλεχος τύπου **b** μεταξύ των απομονωθέντων στελεχών, ενώ χαμηλή ήταν η φορεία άλλων non-b στελεχών με κάψα (0,4% και 0,6% για τους οροτύπους **f** και **e** αντίστοιχα) (Dabernat *et al*, 2003). Αντίθετα, σε μελέτη που διεξήχθη στο Άμστερνταμ της Ολλανδίας σε 535 υγιή παιδιά ηλικίας 3-36 μηνών όπου τα μισά παρακολουθούσαν παιδικούς σταθμούς και τα άλλα μισά δεν παρακολουθούσαν, έδειξε ότι στην ομάδα των παιδιών που πήγαιναν σε παιδικούς σταθμούς η φορεία ρινοφαρυγγικών παθογόνων (*H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis*) ήταν 2-4 φορές υψηλότερη συγκριτικά με τη δεύτερη ομάδα. Στην ίδια μελέτη σε ποσοστό 37% των παιδιών που παρακολουθούσαν παιδικό σταθμό απομονώθηκε *H. influenzae* σε σύγκριση με το 11% των παιδιών της δεύτερης ομάδας. Η οροτυποποίηση στα απομονωθέντα στελέχη έδειξε ότι 4 στελέχη ήταν *H. influenzae* τύπου **b** στα παιδιά της πρώτης ομάδας ενώ ένα μόνο στέλεχος τύπου **b** απομονώθηκε σε παιδί της δεύτερης ομάδας. Στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε η δυναμική του αποικισμού με *H. influenzae* με μεγάλη αλλαγή των στελεχών – σχεδόν το 50% (47 στα 90) των παιδιών δεν ήταν φορείς μετά από 4 εβδομάδες, ενώ τα υπόλοιπα 43 παιδιά διατήρησαν τη φορεία, μόνο στα 3 βρέθηκε το ίδιο στέλεχος μετά από 4 εβδομάδες. Ο αποικισμός λοιπόν, με *H. influenzae* φαίνεται ότι είναι δυναμική διαδικασία με συχνή μετάδοση στελεχών με κοινά γονοτυπικά χαρακτηριστικά μεταξύ των παιδιών στον ίδιο παιδικό σταθμό (Peerbooms *et al*, 2002).

1.6 Τρόποι μετάδοσης και παράγοντες που επηρεάζουν την μετάδοση των διεισδυτικών νόσων που προκαλούνται από τον *Haemophilus influenzae*

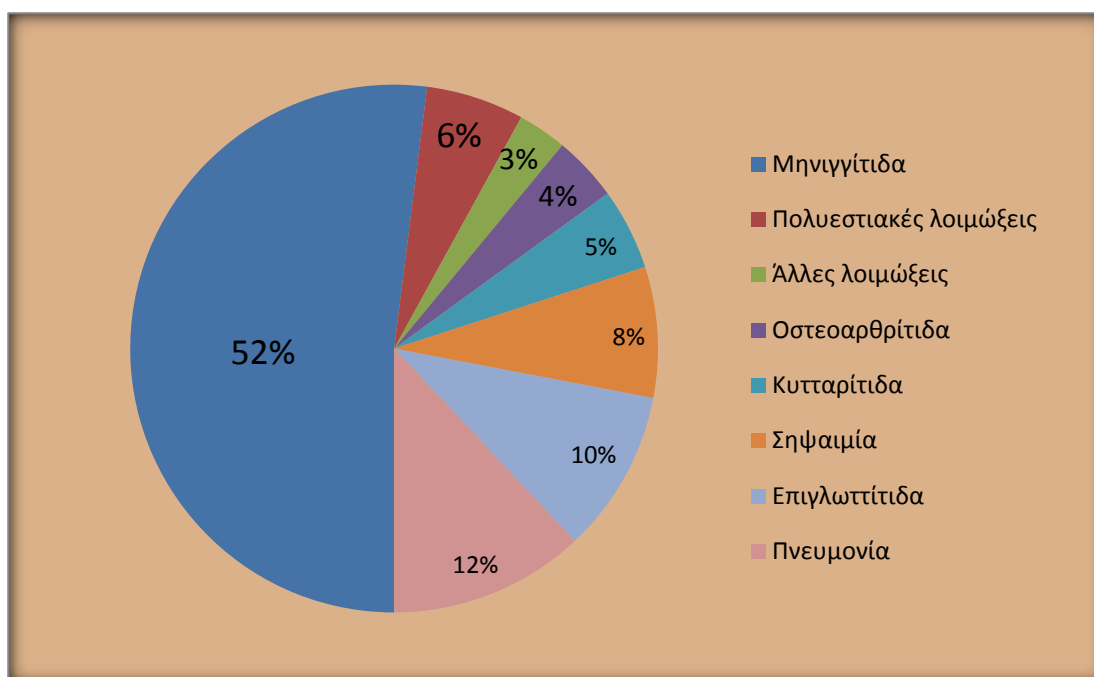
Η μετάδοση γίνεται από άτομο σε άτομο αερογενώς, με σταγονίδια ή με άμεση επαφή με μολυσματικές εκκρίσεις. Δευτεροπαθής *Hib* λοίμωξη ορίστηκε ως η λοίμωξη που συνέβαινε μεταξύ της 1^{ης} έως 60^{ης} ημέρας μετά την επαφή με πάσχον παιδί και αφορά σε ποσοστό λιγότερο του 5% των περιπτώσεων διεισδυτικής νόσου. Μεταξύ των επαφών στο οικογενειακό περιβάλλον είχε αναφερθεί κίνδυνος δευτεροπαθούς λοίμωξης σε ποσοστό 0,3% μέσα στον πρώτο μήνα μετά την έναρξη του πρώτου κρούσματος ο οποίος ήταν 600 φορές υψηλότερος του κινδύνου στο γενικό πληθυσμό. Η μολυσματικότητα (μεταδοτικότητα) του *Hib* γενικά θεωρείται περιορισμένη (Farjo *et al*, 2004).

Ο βαθμός στον οποίο ένα συγκεκριμένο στέλεχος *H. influenzae* κυκλοφορεί σ' ένα παιδικό σταθμό, δηλαδή «μοιράζεται» μεταξύ των παιδιών – φορέων, αλλά και η ετερογένεια των στελεχών μεταξύ των παιδικών σταθμών σε μια γεωγραφική περιοχή δεν είναι επαρκώς χαρακτηρισμένα. Μελέτη που αξιολόγησε τον βαθμό μετάδοσης στελεχών *H. influenzae* μεταξύ των παιδιών έδειξε ότι ποσοστό 23% των γονοτύπων *H. influenzae* μοιράστηκε ανάμεσα σε δύο ή 4 παιδιά στον ίδιο παιδικό σταθμό. Η συχνότητα κοινών στελεχών μεταξύ των παιδιών στον ίδιο παιδικό σταθμό πιθανώς έχει συσχετιστεί με τον βαθμό υγιεινής που εφαρμόζεται, τη στενή επαφή μεταξύ των παιδιών και την παρουσία συμπεριφορών που ευνοούν τη μετάδοση, όπως το φτάρνισμα και ο βήχας, τα οποία ποικίλουν ανάλογα με την εποχή (Farjo *et al*, 2004).

Στους παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνονται παράγοντες έκθεσης και παράγοντες του ξενιστή. Στους παράγοντες έκθεσης περιλαμβάνονται ο συγχρωτισμός στο σπίτι, η ύπαρξη πολλών μελών στην οικογένεια, η παρακολούθηση παιδικού σταθμού, το χαμηλό κοινωνικοοικονομικό και μορφωτικό επίπεδο γονέων, η παρουσία αδελφών σχολικής ηλικίας. Στους παράγοντες του ξενιστή περιλαμβάνονται η φυλή, η εθνικότητα (μεγαλύτερος ο κίνδυνος σε αμερικανο-αφρικανούς, ισπανούς, ιθαγενείς αμερικάνους – ωστόσο ο παράγοντας αυτός συγχέεται με κοινωνικοοικονομικές διαφορές), χρόνιες καταστάσεις (π.χ. δρεπανοκυτταρική αναιμία, σύνδρομο ανεπάρκειας αντισωμάτων, κακοήθειες ιδίως στην φάση χημειοθεραπείας) και πιθανώς το φύλο (κίνδυνος υψηλότερος στους άρρενες). Στους προστατευτικούς παράγοντες περιλαμβάνεται ο μητρικός θηλασμός και η παθητική ανοσία που προσφέρουν τα μητρικά αντισώματα τους πρώτους έξι μήνες ζωής (CDC).

1.7 Λοιμώξεις που προκαλούνται από τον *Haemophilus influenzae*

Σύμφωνα με δεδομένα του WHO το 2005 ο *Hib* ήταν υπεύθυνος για $3 \cdot 10^6$ σοβαρές λοιμώξεις σε παγκόσμιο επίπεδο και $386 \cdot 10^3$ θανάτους κυρίως από πνευμονία και μηνιγγίτιδα που αφορούσαν κυρίως παιδιά μικρότερα των 5 ετών, ιδιαίτερα μεταξύ 4-18 μηνών (WHO, 2005). Οι διεισδυτικές λοιμώξεις από *Hib* είναι πνευμονία, βακτηραιμία/σηψαιμία, μηνιγγίτιδα, επιγλωττίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα, κυτταρίτιδα, μέση ωτίτιδα, πυώδης περικαρδίτιδα και άλλες λιγότερο συχνές λοιμώξεις όπως ενδοκαρδίτιδα και οστεομυελίτιδα (CDC, 2008) (Εικόνα 1.6).



Εικόνα 1.6 Ποσοστά λοιμώξεων (εκτός από μη βακτηριαμική πνευμονία) από *Hib* παγκοσμίως, δεδομένα από 3931 ασθενείς σε 21 μελέτες σε διάφορες χώρες του κόσμου (Peltola, 2000).

Η λοίμωξη από στελέχη *Hib* στην προ-εμβολίου εποχή είχε ως κύρια κλινική εκδήλωση την **μηνιγγίτιδα** αποτελώντας το 60-70% των διεισδυτικών λοιμώξεων (Rathore *et al*, 2010). Χαρακτηριστικά της μηνιγγίτιδας είναι ο πυρετός, το μειωμένο επίπεδο συνείδησης και αυχενική δυσκαμψία, τα οποία παρατηρούνται και σε μηνιγγίτιδες από άλλα μικρόβια. Τα συμπτώματα της μηνιγγίτιδας στα βρέφη μπορεί να συνίστανται μόνο σε πυρετό, ευερεθιστότητα, ανησυχία και άρνηση λήψης τροφής. Στο μεγαλύτερο παιδί η νόσος εκδηλώνεται με πυρετό, κεφαλαλγία, ευερεθιστότητα, ναυτία, έμετο, ανορεξία,

αυχενική δυσκαμψία, λήθαργο και μερικές φορές φωτοφοβία. Επίσης είναι δυνατόν να παρατηρηθούν σπασμοί και κώμα (Rathore *et al*, 2010).

Η **σηπτική αρθρίτιδα** εκδηλώνεται με την τυπική εικόνα λοίμωξης, δηλαδή ερυθρότητα, θερμότητα, διόγκωση και ευαισθησία της προσβεβλημένης άρθρωσης. Αντικειμενικά διαπιστώνεται αρθρική συλλογή και ελάττωση του εύρους των κινήσεων. Η έναρξη μπορεί να είναι αιφνίδια, με επηρεασμένη γενική κατάσταση του ασθενούς που μπορεί να εμφανίζει πυρετό και ρίγος, οπότε τα συμπτώματα εκδηλώνονται μόνο στην κίνηση της άρθρωσης. Στην προ-εμβολίου εποχή, ο Hib ήταν η κύρια αιτία της σηπτικής αρθρίτιδας σε παιδιά ηλικίας μικρότερα των 2 ετών ενώ αποτελούσε την δεύτερη κύρια αιτία της βακτηριαιμίας μετά τον *Streptococcus pneumoniae* (Rathore *et al*, 2010).

Η μικροβιακή **πνευμονία** συνοδεύεται από βήχα, υψηλό πυρετό και δύσπνοια. Η πνευμονία που προκαλείται από τον Hib αποτελεί το ένα τρίτο των καταγεγραμμένων περιπτώσεων της βακτηριακής πνευμονίας στην προ-εμβολίου εποχή (Rathore *et al*, 2010). Βέβαια, στην μετά-εμβολίου εποχή, ο ορότυπος **f** ήταν υπεύθυνος για την εμφάνιση της πνευμονίας, σηψαιμίας, αλλά και της σηπτικής αρθρίτιδας (McGuinn and Kanaparthi, 2008). Ο αιμόφιλος οροτύπου **e** (Hie) είναι ένα ευκαιριακό παθογόνο που προκαλεί τις περισσότερες μολύνσεις σε ασθενείς με αναπνευστικές παθήσεις και παθήσεις του ήπατος ή με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα (Campos *et al*, 2003).

Η **επιγλωττίτιδα** χαρακτηρίζεται από υψηλό πυρετό, αναπνευστική δυσχέρεια, ραγδαία εξέλιξη, δυσφαγία, πολυδιψία, τοξικότητα και αφωνία. Οι ασθενείς συνήθως αισθάνονται ότι αναπνέουν ευκολότερα σε καθεστηκία θέση με τον κορμό ευθύ και σχεδόν πάντα παρουσιάζουν σιελόρροια λόγω της δυσφαγίας. Η οξεία επιγλωττίτιδα αποτελεί πραγματικά επείγουσα παιδιατρική κατάσταση, διότι η φλεγμαίνουσα αεροφόρος οδός είναι δυνατόν αιφνιδίως να αποφραχθεί τελείως και να αποβεί θανατηφόρα (Nelson, 1996). Η λοίμωξη αυτή είναι ίσως η πιο δραματική και γρήγορα αναπτυσσόμενη (Rathore *et al*, 2010).

Οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου που οφείλονται στον αιμόφιλο οροτύπου **a** (Hia) είναι παρόμοιες με εκείνες που οφείλονταν στον Hib στην προ εμβολίου εποχή. Η μηνιγγίτιδα είναι η πιο κοινή λοίμωξη και ακολουθεί η πνευμονία (Bruce *et al*, 2008).

Η **οξεία μέση ωτίτιδα** εκδηλώνεται με πυρετό, ευερεθιστότητα και ωταλγία. Η νόσος εμφανίζεται 1 έως 7 ημέρες μετά από οξεία ρινοφαρυγγίτιδα. Είναι επίσης δυνατόν να παρατηρηθούν έμετοι, διαρροϊκές κενώσεις, ίλιγγος, εμβοές και ωτόρροια, διάτρηση του τυμπανικού υμένα, η οποία συνήθως συνοδεύεται από απότομη ύφεση του πόνου. Η οξεία μέση ωτίτιδα μπορεί να συνδυάζεται με σύστοιχη επιπεφυκίτιδα, οπότε σε αυτήν την

περίπτωση συνήθως το παθογόνο αίτιο είναι στελέχη NTHi. Περίπου το 1/3 των περιπτώσεων οξείας μέσης ωτίτιδας οφείλονταν σε NTHi αποτελώντας το δεύτερο μετά το *S. pneumoniae* αίτιο της νόσου, ενώ το NTHi αποτέλεσε το πιο συχνό αίτιο υποτροπιάζουσας μέσης ωτίτιδας (Murphy *et al*, 2009, Fargo *et al*, 2004). Στις ΗΠΑ από το 2000 και μετά, όπου τα περισσότερα βρέφη εμβολιάστηκαν με το 7δύναμο αντιπνευμονοκοκκικό εμβόλιο, παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού των περιπτώσεων οξείας μέσης ωτίτιδας που οφείλεται σε NTHi. Αυτό πιθανώς ήταν συνέπεια της μείωσης της ρινοφαρυγγικής φορέας από στελέχη πνευμονιόκοκκου που υπήρχαν στο εμβόλιο και η «αντικατάσταση» τους από άλλα στελέχη πνευμονιόκοκκου, NTHi και *M. catarrhalis* (Murphy *et al*, 2009).

Η οξεία βακτηριακή επιπεφυκίτιδα αποτελεί συχνή φλεγμονή του επιπεφυκότα. Η λοίμωξη αρχίζει με αίσθημα ξένου σώματος, και ακολουθεί δακρύρροια, φωτοφοβία και άφθονες βλεννοπυώδεις εκκρίσεις, η οποία διαρκεί το πολύ 15 ημέρες και συνήθως αυτοιάται. Τα στελέχη NTHi είναι το συχνότερο αίτιο βακτηριακής επιπεφυκίτιδας στα παιδιά, και είναι συνήθως οξεία, ενώ αναφέρεται και υποξεία επιπεφυκίτιδα και κερατίτιδα (Murphy *et al*, 2009).

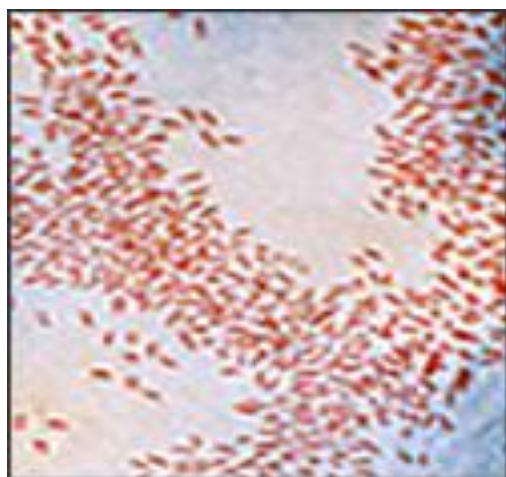
Επιπλέον, ο *H. influenzae* αποικίζει τον κόλπο υγιών γυναικών και μερικές φορές είναι υπεύθυνος για σαλπινγίτιδα, ωθηκοσαλπινγικά αποστήματα ή άλλες λοιμώξεις του γυναικείου γεννητικού σωλήνα. Επίσης αναφέρονται περιγεννητικές λοιμώξεις της μητέρας, του νεογνού ή και των δύο με ή χωρίς βακτηριαιμία με παρουσία θολού, δύσσομου αμνιακού υγρού. Ακόμα και όταν τέτοιες γυναικολογικές ή περιγεννητικές λοιμώξεις είναι συνέπεια βακτηριαιμίας, ο συχνότερος μικροοργανισμός είναι ο NTHi (Turk, 1984).

1.8 Διάγνωση των νόσων που προκαλούνται από τον *Haemophilus influenzae*

Ως διεισδυτική νόσος από *H. influenzae* αναφέρθηκε οποιοδήποτε από τα εξής κλινικά σύνδρομα: μηνιγγίτιδα, βακτηριαιμία, επιγλωττίτιδα ή πνευμονία. Εργαστηριακό κριτήριο για την διάγνωση θεωρείται η απομόνωση του *H. influenzae* από περιοχή φυσιολογικά στείρα μικροβίων (π.χ. αίμα ή ENY ή λιγότερο συχνά αρθρικό ή πλευριτικό υγρό). Ο εργαστηριακός έλεγχος ολοκληρώνεται με την ταυτοποίηση και τυποποίηση του μικροοργανισμού (Kilian 2007).

1.8.1 Κλασικές μέθοδοι ταυτοποίησης και τυποποίησης του *H. influenzae*

Η ταυτοποίηση του *H.influenzae* βασίστηκε συνήθως στη μικροσκοπική εξέταση με χρώση Gram (Εικόνα 1.7), στην απαίτηση του μικροοργανισμού για παράγοντες του αίματος -που απελευθερώθηκαν μόνο με τη λύση των ερυθροκυττάρων- προκειμένου να αναπτυχθεί και σε μια σειρά βιοχημικών αντιδράσεων που βασίστηκαν στη ζύμωση σακχάρων και κυκλοφορούν σε έτοιμα εμπορικά τεστ από διάφορες εταιρείες (Kilian 2007).



Εικόνα 1.7. Χρώση Gram του *Haemophilus influenzae* (From the Public Health Image Library, <http://phil.cdc.gov/phil/home.asp>)

Με βάση μια σειρά βιοχημικών αντιδράσεων ο μικροοργανισμός τυποποιήθηκε περαιτέρω σε οχτώ βιότυπους (Kilian, 2007). Οι τρεις βιοχημικές αντιδράσεις ήταν η παραγωγή ινδόλης, ουρεάσης, αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης.

Τέλος, με τη συμβατική μέθοδο της οροσυγκόλλησης (slide agglutination serotyping, SAST) στην οποία χρησιμοποιήθηκαν έξι οροί ανοσοσυγκόλλησης (a-f), ειδικοί για κάθε έναν από τους έξι οροτύπους, τυποποιήθηκαν τα στελέχη που έφεραν κάψα (Maaroufi *et al*, 2007). Η έννοια της οροσυγκόλλησης έγκειται στην ικανότητα της συγκεκριμένης τεχνικής να ανιχνεύει τα αντιγόνα της πολυσακχαριδικής κάψας του αιμοφίλου (Εικόνα 1.5). Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιεί αντισώματα-ορούς ανοσοσυγκόλλησης τα οποία είναι ειδικά για τα πολυσακχαριδικά αντιγόνα. Με αυτόν τον τρόπο τα συγκεκριμένα αντισώματα-οροί αναμειγνύονται με το βακτηριακό ελαιώδη του μικροοργανισμού, ο οποίος έχει απομονωθεί από τον ασθενή. Σε περίπτωση που το αντίσωμα-ορός ανιχνεύσει το αντιγόνο και συνδεθούν κατάλληλα,

αναπτύσσεται μια αντίδραση οροσυγκόλλησης, η οποία είναι ορατή με γυμνό οφθαλμό (Ajello *et al*, 1987).

Παρότι η οροσυγκόλληση είναι μια απλή και ταχεία μέθοδος, δεν είναι αξιόπιστη εξαιτίας της χαμηλής ευαισθησίας και ειδικότητας (LaClaire *et al*, 2003). Συχνά παρατηρούνται διασταυρούμενες αντιδράσεις ενώ το αποτέλεσμα επηρεάζεται από τεχνικές πρακτικές ή ακόμα και την ποιότητα του ορού ανοσοσυγκόλλησης (Maaroufi *et al*, 2007).

Η ανίχνευση αντιγόνου μπορεί να χρησιμοποιηθεί βοηθητικά της καλλιέργειας, ιδίως στην διάγνωση λοίμωξης από *H. influenzae* σε ασθενείς που έχουν λάβει αντιβιοτικά προ της λήψης δειγμάτων για καλλιέργεια (Maaroufi *et al*, 2007).

1.8.2 PCR (Polymerase Chain Reaction, Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)

Η τυποποίηση με PCR υπερβαίνει τα προβλήματα των μεθόδων που αναφέρθηκαν αποτελώντας ταχεία και αξιόπιστη μέθοδο τυποποίησης στελεχών. Η ενίσχυση γονιδίων που εμπλέκονται στην έκφραση κάψας έχει ανοίξει νέες οδούς στην ταχεία, ειδική και με υψηλή ευαισθησία ανίχνευση *H. influenzae* (Maaroufi *et al*, 2007), όπου εκκινητές που έχουν σχεδιαστεί για το γονίδιο *bexA* (απαραίτητο για την έκφραση κάψας) χρησιμοποιούνται για διάκριση στελεχών με κάψα από στελέχη χωρίς κάψα.

Σύμφωνα με στοιχεία από παλαιότερες δημοσιευμένες εργασίες, μεμονωμένες τεχνικές PCR είχαν αναπτυχθεί για την ανίχνευση του τυποποιήσιμου και μη τυποποιήσιμου *H.influenzae*. Αρχικά, σχεδιάστηκαν εκκινητικά μόρια που στόχευσαν σε μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδίου *bexA*, το οποίο ήταν απαραίτητο για την έκφραση της κάψας του μικροοργανισμού. Με αυτό τον τρόπο έγινε η διάκριση μεταξύ των στελεχών που έφεραν κάψα και των στελεχών που δεν έφεραν (Falla *et al*, 1994, LaClaire *et al*, 2003). Στη συνέχεια σχεδιάστηκαν εκκινητικά μόρια τα οποία στόχευσαν σε συγκεκριμένα τμήματα της περιοχής II του γονιδιακού τόπου *cap* για κάθε ορότυπο, η οποία ήταν υπεύθυνη για τον προσδιορισμό του οροτύπου (Falla *et al*, 1994, LaClaire *et al*, 2003). Σε μια άλλη μελέτη, εφαρμόστηκαν δυο διπλές και τρεις μεμονωμένες PCR. Αρχικά, με την πρώτη PCR επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη του γονιδίου *ompP2* και η ύπαρξη του γονιδίου *bexA*. Η ύπαρξη του γονιδίου *ompP2* επιβεβαίωσε το είδος του *Haemophilus influenzae* και η ανίχνευση του γονιδίου *bexA* επιβεβαίωσε την ύπαρξη κάψας. Στη συνέχεια, έγινε διάκριση μεταξύ των οροτύπων του αιμοφίλου με μια διπλή PCR, η οποία στόχευσε σε συγκεκριμένα τμήματα της περιοχής II του γονιδιακού τόπου *cap* των

οροτύπων **a** και **f** και τρεις μεμονωμένες PCR, καθεμία από τις οποίες στόχευσε σε συγκεκριμένα τμήματα της περιοχής II του γονιδιακού τόπου *cap* των οροτύπων **c**, **d** και **e** (Maaroufi *et al*, 2007). Τέλος, τα τελευταία χρόνια εφαρμόζεται μια πολλαπλή τεχνική PCR για την ανίχνευση τεσσάρων μικροοργανισμών σε βιολογικά υλικά ασθενών με μηνιγγίτιδα ή/και βακτηραιμία στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας (ΕΚΑΜ) της Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας (ΕΣΔΥ), οι οποίοι είναι οι εξής: *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus species*. Με τη συγκεκριμένη τεχνική η ανίχνευση του *Haemophilus influenzae* γίνεται με ταχύ και ειδικό τρόπο (Xirogianni *et al*, 2009).

1.8.2.1 Πολλαπλή Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Multiplex PCR)

Η εφαρμογή μεθόδων πολλαπλής PCR στη Μικροβιολογία έχει πολύ μεγάλη σημασία καθώς παρέχουν τη δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης δύο ή περισσότερων μικροοργανισμών σε ένα κλινικό δείγμα με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, καθώς και την δυνατότητα ανίχνευσης όλων των τύπων ενός μικροοργανισμού σε ένα βιολογικό υλικό (Henegariu *et al*, 1997).

Σύμφωνα με σχετικές δημοσιεύσεις, ήταν 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 είχε γίνει μετά τη χορήγηση του αντιβιοτικού, οπότε ο πληθυσμός των βακτηρίων σε αυτά είχε μειωθεί σημαντικά.

Τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν στην πολλαπλή PCR έπρεπε να είχαν παραπλήσιο αριθμό βάσεων G/C, να μην παρουσιάζαν συμπληρωματικότητα στο 3' ή 5' άκρο τους ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός διμερών και η απόστασή τους να ήταν μεγαλύτερη των 100 βάσεων ώστε να επιτρεπόταν ο σχηματισμός του νέου κλώνου DNA. Ακόμα, το περιεχόμενό τους σε GC έπρεπε να κυμαινόταν από 30 μέχρι 60% και να αποτελούνταν από 20 ζεύγη βάσεων και παραπάνω. Τα εκκινητικά μόρια έπρεπε επίσης να είχαν παραπλήσια θερμοκρασία αποδιατάξεως ή τήξεως (T_m) (Edwards and Gibbs, 1994).

Η πολλαπλή αντίδραση PCR διαθέτει πολλά πλεονεκτήματα για την διάγνωση αναπνευστικών λοιμώξεων που προκαλούνται από διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς όπως είναι ο *Haemophilus influenzae* (Pozzetto *et al*, 2010). Η συγκεκριμένη αντίδραση έχει την δυνατότητα να εξοικονομεί χρόνο, κόπο και χρήματα.

Επιπλέον, εκτός από το γεγονός ότι μπορεί να ενισχύει δύο η περισσότερους γονιδιακούς τόπους καθώς και πολλές και διαφορετικές περιοχές ενός γονιδιακού τόπου, διατηρεί τις ίδιες συνθήκες αντίδρασης ταυτόχρονα για πολλούς στόχους-DNA με αποτέλεσμα να αυξάνεται η απόδοσή της (Edwards and Gibbs, 1994).

Παρόλα αυτά, 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 (Edwards and Gibbs, 1994).

Για τους παραπάνω λόγους, η πολλαπλή αντίδραση PCR αποτελεί πλέον σημαντικό εργαλείο στη διάγνωση νόσων που σχετίζονται με μικροβιακές λοιμώξεις, όπως η μηνιγγίτιδα, η σηψαιμία και η πνευμονία. Η ταχεία και ακριβής ανίχνευση και περαιτέρω τυποποίηση των μικροοργανισμών, οι οποίοι ανιχνεύονται σε παθολογικά υλικά ασθενών, όπως αίμα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY), ωτικά εκπλύματα και βρογχοκυψελιδικά εκπλύματα (BronchoAlveolar Lavage, BAL), παίζουν σημαντικό ρόλο στη θεραπεία και την επιδημιολογική επιτήρηση (Tzanakaki *et al*, 2003).

1.8.2.3 Αρχή της Μεθόδου του Ενζύμου Υψηλής Πιστότητας Πολυμεράσης (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase)

Η Phusion DNA πολυμεράση είναι ένα υψηλής πιστότητας ένζυμο και είχε την δυνατότητα να προσφέρει εξαιρετικά υψηλές επιδόσεις σε όλες τις εφαρμογές της PCR. Παράγει μεγάλα τμήματα DNA με μεγάλη ακρίβεια και ταχύτητα, οι οποίες δεν θα μπορούσαν να επιτευχθούν με τη χρήση κοινής πολυμεράσης. Η υπερβολικά μεγάλη πιστότητά της την καθιστά εξαιρετική επιλογή για κλωνοποίηση. Η πιθανότητα λάθους της πολυμεράσης είναι $4,4 \times 10^{-7}$, η οποία είναι 50 φορές μικρότερη από την πιθανότητα λάθους της *Thermus aquaticus* DNA πολυμεράσης και 6 φορές μικρότερη από εκείνη της *Pyrococcus* DNA πολυμεράσης.

Η Phusion DNA πολυμεράση έχει τις εξής ιδιότητες:

- προσθέτει νουκλεοτίδια για τον σχηματισμό της νέας αλυσίδας με κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$ (δράση πολυμερισμού)
- διασπά νουκλεοτίδια με κατεύθυνση $3' \rightarrow 5'$ (δράση εξωνουκλεάσης). Με τη συγκεκριμένη ιδιότητα επιτυγχάνεται η τοποθέτηση της σωστής, σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας, βάσης στην νέα αλυσίδα από την πολυμεράση
- παράγει τυφλά άκρα στα ενισχυμένα προϊόντα

- ενισχύει μεγάλα τμήματα DNA όπως τμήματα γενωμικού DNA μεγέθους 7,5 kb και τμήματα DNA μεγέθους 20 kb, τα οποία χρησιμοποιούνται στις δοκιμές ελέγχου ποιότητας.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η Phusion DNA πολυμεράση είναι το τελευταίο συστατικό που προστίθεται στη PCR διότι λόγω της δράσης της εξωνουκλεάσης που έχει μπορεί να διασπάσει τα εκκινητικά μόρια που βρίσκονται στη PCR (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, Finnzymes, Manual).

1.8.3 Σύγκριση κλασικών και μοριακών μεθόδων τυποποίησης του *Haemophilus influenzae*

Μελέτη που συνέκρινε αποτελέσματα τυποποίησης στελεχών *H. influenzae* με τις μεθόδους οροσυγκόλλησης (*slide agglutination serotyping* -SAST) και τη μέθοδο PCR έδειξε ασυμφωνία αποτελεσμάτων. Η χαμηλή ευαισθησία και ειδικότητα της SAST είχε σαν αποτέλεσμα το χαμηλό ποσοστό τυποποίησης στελεχών **b**. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι στη μετά-εμβολίου εποχή οι περιπτώσεις που τυποποιούνται ως *Hib* ενδεχομένως είναι λιγότερες, δηλαδή υπερεκτιμάται το φορτίο των λοιμώξεων από *Hib* (La Claire *et al*, 2003).

Αντίθετα, η PCR είναι μέθοδος υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας (Luong *et al*, 2004). Η ακριβής τυποποίηση είναι σημαντική για την επιτήρηση της διεισδυτικής νόσου από *H. influenzae* στην μετά-εμβολίου *Hib* εποχή (Tsang, 2008, β). Η ορολογική τυποποίηση στελεχών με SAS δεν εφαρμόζεται πλέον ιδιαίτερα σε στελέχη *H. influenzae* που απομονώνονται από εμβολιασθέντα παιδιά (Maaroufi *et al*, 2007).

1.8.4 Άλλες μέθοδοι τυποποίησης του *Haemophilus influenzae*

Τυποποίηση για επιδημιολογικούς σκοπούς γίνεται με τις εξής μεθόδους: ηλεκτροφόρηση παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου (*pulsed field gel electrophoresis*, PFGE), προσδιορισμός της αλληλουχίας του γενετικού τόπου (*multilocus sequence typing*, MLST), 16S-rRNA gene sequence typing (Lancellotti *et al*, 2008). Η μέθοδος MLST παρέχει πληροφορίες όχι μόνο για τον τύπο αλλά και επιπρόσθετα για το φαινόμενο αλλαγής κάψας (*capsular switching*) μεταξύ των στελεχών *H. influenzae* (Tsang, 2008 β).

Ακολουθεί έλεγχος αντιμικροβιακής ευαισθησίας. Τα στελέχη *b*⁻ δεν είναι δυνατόν να διακριθούν από τα *NTHi* στελέχη με τις παραδοσιακές τεχνικές οροτυπίας αλλά διακρίνονται με γονοτυποποίηση καψιδίου (*capsular genotyping* PUO38). Η

γονοτυποποίηση καψιδίου (*capsular genotyping*) έχει αποδειχθεί χρήσιμη στο χαρακτηρισμό στελεχών *H. influenzae*, ωστόσο οι απαιτήσεις για extraction DNA, southern blotting και υβριδισμό περιορίσαν τη χρήση της σε κέντρα αναφοράς (Falla *et al*, 1994). Βιοχημικές μέθοδοι όπως ανάλυση πρωτεϊνών εξωτερικής μεμβράνης, των πολυσακχαριτών, ηλεκτροφόρηση ενζύμων του κυτταροπλάσματος (*multilocus enzyme electrophoresis*) και αρκετές βιομοριακές τεχνικές, όπως DNA restriction fragment length polymorphisms (RFLP), random amplification polymorphic DNA (RAPD), amplification and enzyme restriction του γονιδίου rRNA είχαν χρησιμοποιηθεί σε επιδημιολογικές μελέτες και μελέτες παθογένειας του *H. influenzae* (Lancellotti *et al*, 2008).

1.9 Θεραπεία της διεισδυτικής νόσου που προκαλείται από *Haemophilus influenzae*

Η διεισδυτική νόσος από στελέχη *Hib* απαιτεί εισαγωγή στο νοσοκομείο και ενδοφλέβια φαρμακευτική αγωγή, ενώ για τις εντοπισμένες λοιμώξεις η από του στόματος εμπειρική αντιμικροβιακή αγωγή. Για τις διεισδυτικές λοιμώξεις απαιτείται άμεση έναρξη αντιμικροβιακής θεραπείας με 3^{ης} γενιάς κεφαλοσπορίνη ή χλωραμφαινικόλη σε συνδυασμό με αμπικιλίνη. Η διάρκεια θεραπείας είναι 10 ημέρες.

Χημειοπροφύλαξη σε άτομα του στενού οικογενειακού περιβάλλοντος ατόμου με διεισδυτική νόσο *Hib* δε συστήνεται. Ο κίνδυνος διεισδυτικής νόσου *Hib* στα παιδιά που ήρθαν σε επαφή στον παιδικό σταθμό με ασθενή με διεισδυτική νόσο *Hib* θεωρείται μικρότερος απ' τον κίνδυνο ευαίσθητου ατόμου στο οικογενειακό περιβάλλον (Soriano *et al*, 2004).

Τα περισσότερα στελέχη του αιμοφίλου είναι ευαίσθητα σε πολλά αντιβιοτικά όπως στην αμπικιλίνη (ampicillin), κεφαλοσπορίνες (cephalosporins), σουλφοναμίδες (sulfonamides), τετρακυκλίνη (tetracycline) και μακρολίδες (macrolides). Η αντοχή του *H. influenzae* στην αμπικιλίνη κυμαίνεται από 5-50 %. Ο μηχανισμός αντοχής οφείλεται στην παρουσία του ενζύμου της β-λακταμάσης (plasmid-encoded). Επίσης σημειώνεται η αντοχή στην χλωραμφαινικόλη, την τετρακυκλίνη και τις σουλφοναμίδες, ενώ η αντοχή στην αμοξικιλίνη είναι συνήθως χρωμοσωμική, λόγω σημειακών μεταλλάξεων. Η συγκεκριμένη αντοχή είναι μικρή και μπορεί να συνυπάρξει με την πλασμιδιακή. Εξαιτίας της διάδοσης των συζευγμένων πλασμιδίων, μεγάλο ποσοστό των στελεχών εμφανίζουν αντοχή στην αμπικιλίνη, την πενικιλίνη, την χλωραμφαινικόλη και την τετρακυκλίνη. Όλα τα στελέχη που απομονώνονται από διεισδυτικές λοιμώξεις υποβάλλονται σε έλεγχο

ευαισθησίας στα αντιβιοτικά για την επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής (Rathore *et al*, 2010).

1.10 Εμβόλια – Ανοσία

α) Πολυσακχαριδικά εμβόλια

Ο τύπος b της πολυσακχαριδικής κάψας του *H. influenzae* που περιείχε την πρωτεΐνη PRP (Polyribosyl ribitol phosphate) ήτα κύριος παράγοντας λοιμογονικότητας και τα αντισώματα που διεγείρει ήταν προστατευτικά έναντι της διεισδυτικής νόσου. Το πρώτο πολυσακχαριδικό εμβόλιο έναντι του *Hib* περιείχε μόνο καθαρή πρωτεΐνη PRP. Τα πολυσακχαριδικά εμβόλια είχαν την ιδιότητα ενεργοποίησης B λεμφοκυττάρων ανεξάρτητα της ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων, η οποία είχε πτωχή ή μηδενική ανοσογονικότητα σε βρέφη και παιδιά μικρότερα των δύο ετών που αποτέλεσαν τον πληθυσμό υψηλού κινδύνου. Επιπλέον απέτυχαν να προκαλέσουν ανοσολογική μνήμη ανεξάρτητα της ηλικίας που χορηγήθηκαν (Booy *et al*, 1997). Το πολυσακχαριδικό αντιγόνο είχε αντιγονικότητα μεγαλύτερη του 90% στις ηλικίες άνω των 18 μηνών (Heath *et al*, 2002). Αντίθετα, είχε πτωχή ανοσολογική απάντηση στα παιδιά ηλικίας κάτω των 2 ετών (Kelly *et al*, 2004).

β) Συζευγμένα εμβόλια

Με την τεχνολογία των συζευγμένων εμβολίων με την οποία το πολυσακχαριδικό αντιγόνο συζεύχθηκε χημικά με πρωτεΐνη – φορέα, η ανοσολογική απάντηση θεωρήθηκε εξαρτώμενη από T λεμφοκύτταρα και η ανοσογονικότητα του εμβολίου θεωρήθηκε ικανοποιητική στα βρέφη κάτω των 2 ετών. Διάφορες πρωτεΐνες – φορείς είχαν χρησιμοποιηθεί περιλαμβανομένης του τοξοειδούς του τετάνου (PRP-T), της διφθεριτικής τοξίνης (PRP-D), της τροποποιημένης διφθεριτικής τοξίνης (CRM127) (PRP – Hb OC) και της πρωτεΐνης της εξωτερικής μεμβράνης *N. meningitidis* (PRP-OMP). Τα συζευγμένα εμβόλια διέφεραν στο μήκος του πολυσακχαριδικού αντιγόνου, στην πρωτεΐνη φορέα και στη μέθοδο σύζευξής τους (Kelly *et al*, 2004). Τα εμβόλια με διαφορετικές πρωτεΐνες – φορείς διέφεραν στην ανοσογονικότητά τους και στην παραγωγή αντισωμάτων διαφορετικού βαθμού συγγένειας (*avidity*) (Zhang *et al*, 2004). Η πρωτεΐνη PRP-D ήταν λιγότερο ανοσογονική σε παιδιά μικρότερα των 18 μηνών συγκριτικά μ' άλλα συζευγμένα εμβόλια και δεν κυκλοφορεί πλέον στην αγορά (WHO,

2006). Η ανοσογονικότητα του συζευγμένου εμβολίου *Hib* με πρωτεΐνες- φορείς του PRP, το τοξοειδές του τετάνου και της διφθερίτιδας ως προς τη διεισδυτική νόσο που προκαλούνταν από *Hib* στην παιδική ηλικία είχε αποδειχθεί με πολλές δοκιμές στη Φιλανδία, ΗΠΑ, Αφρική και Ηνωμένο Βασίλειο, που υπολογίστηκε σε 90-100% για έως και ένα χρόνο μετά τον εμβολιασμό. Η επιλογή του εμβολίου, ο αριθμός των δόσεων, η ηλικία χορήγησης και η τοπική επιδημιολογική εικόνα της διεισδυτικής νόσου *Hib* ήταν σημαντικοί καθοριστές της αποτελεσματικότητας. Το PRP-D συζευγμένο εμβόλιο που στην Φιλανδία ήταν αποτελεσματικό δεν αποδείχτηκε προστατευτικό σε πληθυσμό στην Αλάσκα με υψηλά ποσοστά νόσου τον πρώτο χρόνο ζωής (Kelly *et al*, 2004).

Λίγα εμβόλια στην ιστορία είχαν προκαλέσει τέτοια δραματική πτώση στην επίπτωση της νόσου σε τόσο σύντομο χρονικό διάστημα (Peltola, 2000). Η λοίμωξη από *Hib* είχε μειωθεί δραματικά εξαιτίας του εκτεταμένου εμβολιασμού βρεφών και μικρών παιδιών με το συζευγμένο εμβόλιο. Από επιδημιολογικά δεδομένα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, 89 χώρες παγκοσμίως είχαν περιλάβει στο εθνικό πρόγραμμα εμβολιασμού τους το εμβόλιο του *Hib* στα βρέφη. Σύμφωνα με στοιχεία, στις αναπτυγμένες χώρες το 92% του γενικού πληθυσμού είχε εμβολιαστεί ενώ στις αναπτυσσόμενες χώρες η μέση κάλυψη εμβολίων κυμάνθηκε από 8% - 42% με τις χώρες της Αφρικής και της Ασίας να έχουν τα χαμηλότερα ποσοστά εμβολιαστικής κάλυψης έναντι του εμβολίου (Morris *et al*, 2008, (WHO, 2005) (Εικόνα 1.7).

Αποτέλεσμα της εισαγωγής του συζευγμένου εμβολίου σε περισσότερες από 90 χώρες στον κόσμο στο τακτικό εμβολιαστικό πρόγραμμα των παιδιών, ήταν η εξάλειψη της διεισδυτικής νόσου *Hib* σε πολλές ανεπτυγμένες χώρες, ενώ είχε μειωθεί δραματικά σε ορισμένες χώρες του αναπτυσσόμενου κόσμου. Από τα επιδημιολογικά στοιχεία που είχαν προκύψει από την Ευρώπη και τις ΗΠΑ παρατηρήθηκε μείωση σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80% κυρίως στη μηνιγγίτιδα (Nacimento – Carvahlo *et al*, 2006).



Εικόνα 1.8. Χώρες που έχουν περιλάβει το εμβόλιο έναντι του *H. influenzae* type b κατά τα έτη 1997 και 2008.

(Πηγή: Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας).

Η διάρκεια της προστασίας μετά τη συμπλήρωση του κύριου εμβολιαστικού σχήματος του *Hib* δεν είχε επαρκώς καθοριστεί και πιθανώς ποικίλλει ανάλογα με παράγοντες, όπως ηλικία εμβολιασμού, εθνικότητα, ανοσολογική επάρκεια και η φυσική ενίσχυση της

άμυνας (*natural boosting*) του οργανισμού. Στις περισσότερες περιπτώσεις ο εμβολιασμός ήταν προστατευτικός στις ηλικίες όπου υπάρχει υψηλότερη ευαισθησία στη διεισδυτική νόσο *Hib* (WHO, 2006).

1.11 Επιδημιολογικά στοιχεία του *Haemophilus influenzae*

Η επιδημιολογία της διεισδυτικής νόσου *Hib* είχε αλλάξει δραματικά την τελευταία εικοσαετία εξαιτίας της εκτεταμένης χρήσης των συζευγμένων εμβολίων. Πριν την εισαγωγή του εμβολίου, οι περισσότερες διεισδυτικές νόσοι οφείλονταν στον *Hib*. Στις Ηνωμένες πολιτείες, το 93-96% όλων των διεισδυτικών λοιμώξεων ήταν τύπου **b**. Και στις δύο χώρες ο *Hib* ήταν η πιο συνηθισμένη αιτία μηνιγγίτιδας στα παιδιά, ειδικά στους πρώτους 3-18 μήνες της ηλικίας τους καθώς και στις ηλικίες έως 5 ετών (MacNeil *et al*, 2011). Στην Αμερική, πριν την εισαγωγή του εμβολίου, ο αριθμός των κρουσμάτων *Hib* ήταν περίπου 300 κρούσματα ανά 100,000 παιδιά, ενώ στο Ηνωμένο Βασίλειο, ήταν 17 ανά 100,000 παιδιά. Αντίθετα, τα κρούσματα σε ενήλικες ήταν 0,85 περιπτώσεις ανά 100,000 ετησίως (Ulanova *et al*, 2009).

Στη μετά-εμβολίου εποχή ήταν αναγκαία και σημαντική η εργαστηριακή επιτήρηση των κρουσμάτων από *H. influenzae* τόσο του **b** όσο και των άλλων οροτύπων. Η πληροφορία αυτή ήταν σημαντική προκειμένου: α) να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα του εμβολίου και β) να εκτιμηθούν αλλαγές στην επιδημιολογία των διεισδυτικών λοιμώξεων ως συνέπεια άλλων οροτύπων ή στελεχών *NTHi*, λόγω του ότι θεωρητικά άλλοι ορότυποι *H. influenzae* ή *NT H. influenzae* μπορούσαν να καλύψουν το κενό της οικολογικής φωλιάς του *Hib* (Campos, 2000).

Το 1999 με τη δημιουργία του EU-IBIS (European Union – Invasive Bacterial Infectious Surveillance Net work), 29 και πλέον χώρες παρείχαν δεδομένα εθνικής επιτήρησης για διεισδυτική νόσο *H. influenzae* (οριζόμενα ως απομόνωση *H. influenzae* από φυσιολογικά στείρα περιοχή) και τα Εργαστήρια Αναφοράς της Ευρώπης συμμετείχαν ενεργά στην παραπάνω επιτήρηση. Από το 2000 έως 2004, αναφέρθηκαν 4626 περιπτώσεις *H. influenzae* σε μέσο πληθυσμό 167 εκατομμυρίων ατόμων (Πίνακας 1.2). Από τα 3688 (80%) στελέχη στα οποία έγινε οροτυποποίηση ποσοστό 38% ήταν τύπου **b**, το 29% ήταν *NTH. influenzae* και το 9% ήταν στελέχη άλλων οροτύπων. Ο ορότυπος **f** ευθυνόταν για τις περισσότερες περιπτώσεις (74%). Αν και η επίπτωση *Hib* αυξήθηκε μεταξύ 2000 και 2002 – κυρίως ως συνέπεια αύξησης κρουσμάτων στην Ολλανδία και στο Ηνωμένο

Βασίλειο – προτού μειωθούν ξανά το 2003, δεν υπήρχε ένδειξη αύξησης άλλων οροτύπων ανά χώρα. Στις ΗΠΑ κατά την ανάλυση τριών ξεχωριστών συστημάτων επιτήρησης που κάλυπταν πληθυσμό 10-13 εκατομμυρίων μεταξύ 1987 και 1995 δεν παρατηρήθηκε αύξηση στην επίπτωση από άλλους οροτύπους εκτός **b** μετά την εισαγωγή του εμβολίου. Ο μαζικός εμβολιασμός δεν είχε μειώσει μόνο την επίπτωση της διεισδυτικής νόσου *Hib* αλλά είχε, επίσης, μειώσει τη ρινοφαρυγγική φορεία μεταξύ των εμβολιασθέντων οδηγώντας σε έμμεση προστασία χωρίς ένδειξη αντικατάστασης με άλλους οροτύπους *H. influenzae* (Ladhani *et al*, 2008) στα στελέχη που απομονώθηκαν από φορείς.

Αντίστοιχες μειώσεις στην επίπτωση παρατηρήθηκαν στον Καναδά και στις ΗΠΑ, όπου ο *Hib* ήταν υπεύθυνος για ένα μικρό ποσοστό διεισδυτικής νόσου ακόμα και στα παιδιά μικρότερα των πέντε ετών. Αντίθετα, ο *NTH. influenzae* αποτέλεσε την κύρια αιτία στις περισσότερες περιπτώσεις (Tsang *et al*, 2008), παρόλο που ο αριθμός των κρουσμάτων ήταν χαμηλός (Tsang *et al*, 2008). Επιπλέον, από τα επιδημιολογικά δεδομένα άνω των 11 ετών δεν είχε παρατηρηθεί αύξηση της νόσου τόσο από τον ορότυπο **b** όσο και από τους άλλους οροτύπους (Kelly *et al*, 2004).

Ενδεικτικά, σε μια μελέτη σε παιδιά, μόνο ένα στέλεχος οροτύπου **f** απομονώθηκε σε 413 στελέχη ενώ 2,5 % των στελεχών που απομονώθηκαν από ενήλικες ήταν οροτύπου **f**, 47,5 % ήταν μη τυποποιήσιμα και τα υπόλοιπα (50 %) ήταν οροτύπου **b**. Η επίπτωση της νόσου που οφειλόταν σε *NTHi* στελέχη σε παιδιά κάτω των 10 ετών είναι 0,5 ανά 100,000, ενώ στους ενήλικες υπολογίστηκε σε 0,81 ανά 100,000 (Ulanova *et al*, 2009).

Παρόλο που οι διεισδυτικές λοιμώξεις που οφείλονταν σε στελέχη non-**b** και σε *NTHi* δεν είχαν φτάσει τα επίπεδα της νόσου *Hib* στην προ-εμβολίου εποχή, η επίπτωση φάνηκε να αυξάνεται τα τελευταία χρόνια με την αλλαγή στην ηλικιακή ομάδα των ασθενών (ενήλικες και υπερήλικες, άνω των 65 ετών) (Devarajan, 2012).

Όταν η Margaret Pittman (Pittman, 1931) περιέγραψε τους έξι οροτύπους του αιμόφιλου, παρατήρησε ότι ένα μικρό ποσοστό της νόσου προκαλείται από στελέχη οροτύπων **a** και **f** (*Hia*, *Hif*), καθώς επίσης ότι ήταν ανθεκτικά στη βακτηριακή λύση σε σχέση με τους υπόλοιπους οροτύπους (*Hic*, *Hid*, *Hie*) (Devarajan, 2012). Παρόλο που ο ορότυπος **f** εμφανίστηκε με μεγάλη συχνότητα, οι ασθενείς είχαν διαφορετική κλινική εικόνα από εκείνους που νόσησαν από τον ορότυπο **b**. Οι περισσότεροι ασθενείς ήταν ενήλικες σε αντίθεση με τον *Hib* που προσέβαλλε κυρίως τα βρέφη και τα παιδιά (Ulanova *et al*, 2009).

Επιπλέον, τα περισσότερα κρούσματα από *Haemophilus influenzae*, προκλήθηκαν από τα μη τυποποιήσιμα στελέχη, γεγονός που επιβεβαιώθηκε από μελέτες σύμφωνα με τις

οποίες η επίπτωση του Hib κατά την τετραετία 2000-2004 ήταν 1.11, 1.34, 2.27, 2.14 ανά 100.000 κατοίκους, ενώ η επίπτωση του NTHi κατά την ίδια περίοδο είναι 2.33, 2.52, 1.99, 2.65 και 2.33 ανά 100.000 κατοίκους (Ulanova *et al*, 2009). Από τους υπόλοιπους οροτύπους, οι ορότυποι **e** και **a** φάνηκε να προκαλούν διεισδυτική νόσο, σε αντίθεση με τους οροτύπους **c** και **d** που εκδήλωσαν σπάνια λοιμώξεις λόγω της μη τοξικότητάς τους (Ladhani *et al*, 2010).

Πίνακας 1.2. Δεδομένα ενεργητικής επιτήρησης της διεισδυτικής νόσου και των οροτύπων του *H. influenzae* στην Ευρώπη (Ladhani *et al*, 2010).

Έτος	Hib	Υπόλοιποι ορότυποι						NTHi	Άγνωστα	Σύνολο
		Σύνολο	Ορότυπος a	Ορότυπος c	Ορότυπος d	Ορότυπος e	Ορότυπος f			
2000	1,11 (173)	0,31 (49)	0,03 (5)	0,01 (2)	0,01 (2)	0,04 (7)	0,22 (34)	2,33 (364)	1,15 (180)	4,90 (766)
2001	1,34 (210)	0,47 (74)	0,02 (3)	0 (0)	0 (0)	0,08 (13)	0,37 (58)	2,52 (395)	1,22 (191)	5,54 (870)
2002	2,27 (376)	0,39 (64)	0,01 (1)	0,01 (1)	0 (0)	0,08 (13)	0,30 (49)	1,99 (330)	1,55 (257)	6,20 (1027)
2003	2,14 (380)	0,44 (78)	0 (0)	0,01 (2)	0,01 (1)	0,11 (20)	0,31 (55)	2,65 (470)	0,88 (156)	6,11 (1084)
2004	1,50 (268)	0,40 (72)	0,01 (2)	0,01 (1)	0,01 (2)	0,08 (15)	0,29 (52)	2,13 (380)	0,89 (159)	4,92 (879)
Σύνολο	1,69 (1407)	0,40 (337)	0,01 (11)	0,01 (5)	0,01 (5)	0,08 (68)	0,30 (248)	2,32 (1939)	1,13 (943)	5,54 (4626)
Επίπτωση του οροτύπου ανά 1.000.000 κρούσματα /Επίπτωση της νόσου που προκαλείται από <i>H. inf</i> και ορότυποι στην μετά εμβολίου εποχή										

Επομένως, είναι σημαντική και αναγκαία η επιτήρηση της νόσου κατά τη μετα-εμβολίου εποχή για τυχόν αλλαγή οροτύπων (Tsang *et al*, 2008). Τα φαινόμενα αντικατάστασης της πολυσακχαριδικής κάψας (capsule switching και capsule replacement) που έχουν αναφερθεί για το *S. pneumoniae*, θεωρητικά μπορεί να παρατηρηθούν και στον *H. influenzae* (Tsang, 2007). Ωστόσο σε αντίθεση με την περίπτωση του συζευγμένου εμβολίου κατά του πνευμονιοκόκκου δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία που να αποδεικνύουν την αντικατάσταση του οροτύπου **b** με άλλους οροτύπους *H. influenzae* εξαιτίας του εμβολίου (Ladhani *et al*, 2008).

1.11.1 Επιδημιολογικά δεδομένα της Ελλάδας

Παρά το γεγονός ότι το εμβόλιο στην Ελλάδα εισήχθη το 1994, η επιδημιολογική επιτήρηση της διεισδυτικής νόσου από στελέχη *H. influenzae* στην Ελλάδα ξεκίνησε από το 1997 για τα τύπου **b** ενώ για τα στελέχη non **b** από το 2004. Μέχρι το 1997 οι πληροφορίες που υπήρχαν για τη νόσο προέρχονταν από μεμονωμένες μελέτες. Μέχρι το 1997 η μέθοδος τυποποίησης ήταν η οροσυγκόλληση (slide agglutination test), ενώ τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται κυρίως η τεχνική PCR (Tsolia *et al*, 1998) Πλέον τα δεδομένα της επιδημιολογικής επιτήρησης συλλέγονται, καταγράφονται και επεξεργάζονται στο Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας. Από τη μελέτη των δεδομένων από τα δηλωθέντα κρούσματα μηνιγγίτιδας από στελέχη *H. influenzae* παρατηρήθηκε αυξομείωση του αριθμού των δηλωθέντων κρουσμάτων στα 13 χρόνια της επιδημιολογικής επιτήρησης. Ο μεγαλύτερος αριθμός κρουσμάτων καταγράφηκε το 2004, δηλαδή 8 κρούσματα από στελέχη *Hib* (επίπτωση 0,07 ανά 100.000 κατοίκους), ενώ το 1996 δεν καταγράφηκε κανένα κρούσμα από τα αντίστοιχα στελέχη (Πίνακας 1.3).

Πίνακας 1.3. Δηλωθέντα κρούσματα μηνιγγίτιδας από *H. influenzae* τύπου **b** στο χρονικό διάστημα των ετών 1995- 2009.

ΕΤΟΣ	Κρούσματα/Επίπτωση (ανά 100.000 πληθυσμό)
1995	2(0,01)
1996	0
1997	1(0,009)
1998	5(0,04)
1999	2(0,01)
2000	6(0,05)
2001	5(0,04)
2002	4(0,03)
2003	6(0,05)
2004	8(0,07)
2005	3(0,02)
2006	3(0,02)
2007	6(0,05)
2008	1(0,01)
2009	7(0,06)

Πηγή: Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας ΕΣΔΥ

www.nsph.gr/files/001_Dimosias_Dioikitikis_Ygieinis/EKAM/Apologismos_EKAM-2010.pdf

1.12 Στόχος της εργασίας

Συνοψίζοντας όσα αναφέρθηκαν, η βακτηριακή μηνιγγίτιδα αποτελεί σοβαρή λοίμωξη του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος του εγκεφάλου με σοβαρές ακόμα και μοιραίες επιπτώσεις στα προσβαλλόμενα άτομα και ιδιαίτερα στα βρέφη. Ως κύρια αιτία της λοίμωξης φαίνονται οι μικροοργανισμοί *Neisseria meningitidis* (Nm), *Haemophilus influenzae* (*H. inf*) και *Streptococcus pneumoniae* (*Sp*) (Peltola *et al*, 2004).

Την τελευταία εικοσαετία, η εισαγωγή του συζευγμένου εμβολίου για τον Hib οδήγησε στη μείωση των κρουσμάτων από τον συγκεκριμένο ορότυπο, όχι όμως από τους άλλους οροτύπους. Ταυτόχρονα, τελευταία στην Ευρώπη, παρατηρείται αύξηση των λοιμώξεων από άλλους ορότυπους, όπως για παράδειγμα στην Ιταλία (μηνιγγίτιδα από *H. influenzae* τύπου **e**), στην Δανία (13 περιπτώσεις μηνιγγίτιδας από *H. influenzae* τύπου **f**), ενώ στην Ελλάδα, σύμφωνα με το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας το οποίο διαθέτει επιδημιολογικά στοιχεία από τη συστηματική καταγραφή των περιστατικών μηνιγγίτιδας, έχουν καταγραφεί από το 2006 περιστατικά μηνιγγίτιδας στα οποία απομονώνεται *H. influenzae* non type **b**. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στην πιθανή αλλαγή των οροτύπων που προκαλούν διεισδυτικές λοιμώξεις. Επιπλέον, η εισαγωγή του εμβολίου οδήγησε στη μείωση της ρινοφαρυγγικής φορέας.

Είναι σημαντική και αναγκαία η περαιτέρω τυποποίηση του *H. influenzae* για την πληρέστερη καταγραφή και παρακολούθηση των κρουσμάτων μηνιγγίτιδας, καθώς επίσης και άλλων λοιμώξεων *H. influenzae* όπως ωτίτιδες και λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος με σκοπό τη μελέτη της επιδημιολογίας του μικροοργανισμού.

Οι συμβατικές μέθοδοι όπως η μέθοδος της οροσυγκόλλησης (slide agglutination) παρότι είναι απλή και ταχεία, δεν είναι αξιόπιστη λόγω της χαμηλής ευαισθησίας και της ειδικότητάς της (Maarroufi *et al*, 2007).

Σε αντίθεση με τις συμβατικές μεθόδους, η εφαρμογή της PCR με την ενίσχυση των γονιδίων που εμπλέκονται στην έκφραση της κάψας έχει ανοίξει νέες οδούς στην ταχεία, ειδική και με υψηλή ευαισθησία ανίχνευση του *H. influenzae* (Maarroufi *et al*, 2007). Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας αξιόπιστης, ευαίσθητης, ειδικής, ταχείας και χαμηλού κόστους τεχνικής πολλαπλής αντίδρασης πολυμεράσης (multiplex PCR), για την ταυτόχρονη ανίχνευση των οροτύπων **a**, **c**, **d**, **e** και **f** του *H. influenzae* και η απ' ευθείας εφαρμογή της σε κλινικά δείγματα ασθενών με μηνιγγίτιδα ή/και σηψαιμία από *H. influenzae* (αίμα και ENY). Επιπλέον, η τεχνική αυτή αποφασίστηκε να εφαρμοστεί σε κλινικά δείγματα ασθενών από λοιμώξεις του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού συστήματος (ωτικά επιχρίσματα, βρογχοκυψελιδικά εκπλύματα) τα οποία

ήταν θετικά για *H. influenzae*. Με αυτόν τον τρόπο έγινε προσπάθεια να ξεπεραστούν τα προβλήματα που δημιουργούνταν με την εφαρμογή των κλασικών μεθόδων τυποποίησης και ταυτόχρονα να αναπτυχθεί μια αντίδραση multiplex PCR, η οποία θα ανιχνεύει ταυτόχρονα τους 5 οροτύπους του μικροοργανισμού, χωρίς να χρειάζεται η εφαρμογή μεμονωμένης αντίδρασης PCR για κάθε ορότυπο ξεχωριστά, όπως γινόταν μέχρι τώρα. Επιπλέον, δόθηκε η δυνατότητα ανίχνευσης και περαιτέρω τυποποίησης του υπό διερεύνηση μικροοργανισμού με ακρίβεια και ταχύτητα, γεγονός που ενισχύει την πιο στενή παρακολούθηση των κρουσμάτων της διεισδυτικής νόσου και άλλων λοιμώξεων από *H. influenzae*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ****2.1 ΥΛΙΚΑ****2.1.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ****2) Πρότυπα στελέχη αναφοράς (reference strains)**

Η ανάπτυξη της πενταπλής PCR έγινε χρησιμοποιώντας πρότυπα στελέχη *Haemophilus influenzae* για τους οροτύπους **a**, **c**, **d**, **e** και **f**, ως θετικοί μάρτυρες και οροτύπου **b** ως αρνητικός μάρτυρας. Τα πρότυπα στελέχη, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1, απεστάλησαν από το Εργαστήριο Αναπνευστικών και Συστηματικών Λοιμώξεων (Respiratory and Systemic Infection Laboratory, Health Protection Agency Centre for Infections, London, UK) και είναι στελέχη της American Culture Collection.

Πίνακας 2.1 Πρότυπα στελέχη αναφοράς *H. influenzae*

Όνομα στελέχους	Κωδικός στελέχους	Ορότυπος
<i>Haemophilus influenzae</i> οροτύπου a ATCC 9006	HA 60	a
<i>Haemophilus influenzae</i> οροτύπου b ATCC 10211	HA 61	b
<i>Haemophilus influenzae</i> οροτύπου c ATCC 9007	HA 62	c
<i>Haemophilus influenzae</i> οροτύπου d ATCC 9008	HA 63	d
<i>Haemophilus influenzae</i> οροτύπου e ATCC 8142	HA 64	e
<i>Haemophilus influenzae</i> οροτύπου f ATCC9833	HA 65	f

2.1.1.2 Στελέχη τα οποία απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα

Κατά την ανάπτυξη της αντίδρασης mPCR, εξετάσθηκαν 61 στελέχη τα οποία ήταν θετικά για *H.influenzae* (50 είχαν απομονωθεί από ισάριθμους ασθενείς με μηνιγγίτιδα, σηψαιμία ή λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος και είχαν σταλεί στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας (Ε.Κ.Α.Μ) από περιφερειακά νοσοκομεία της χώρας τη χρονική περίοδο 2006-2010, ενώ τα υπόλοιπα 11 ήταν πρότυπα στελέχη ελέγχου (Quality Control, QA) που στάλθηκαν κατά τους τακτικούς ελέγχους το 2009 και 2011 (United Kingdom National external Quality Assessment Schemes) στους οποίους συμμετέχει το ΕΚΑΜ.

2.1.2 ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Συνολικά, μελετήθηκαν 82 κλινικά δείγματα ασθενών με μηνιγγίτιδα ή/και σηψαιμία καθώς επίσης με λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος. Όλα τα δείγματα απεστάλησαν στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας (Ε.Κ.Α.Μ) από νοσοκομεία της χώρας τη χρονική περίοδο 2006-2012. Τα δείγματα αυτά χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες:

α) 63 δείγματα [αίμα (n=6), εγκεφαλονωτιαίο υγρό (n=8), ωτικά υγρά (n=27), βρογχοκυψελιδικά εκπλύματα (n=22)] στα οποία αρχικά ανιχνεύθηκε ο μικροοργανισμός *H. influenzae*, με την εφαρμογή της multiplex PCR (Xirogianni *et al*, 2009) για την ανίχνευση των μικροοργανισμών: *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp*.

Επιπλέον, τα δείγματα ήταν αρνητικά στην αντίδραση multiplex PCR για την ανίχνευση των *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* type b *Listeria monocytogenes* (Tzanakaki *et al*. 2005)

β) 19 δείγματα [αίμα (n=11), εγκεφαλονωτιαίο υγρό (n=7), πλευριτικό υγρό (n=1)] στα οποία δεν ανιχνεύθηκε ο μικροοργανισμός *Haemophilus influenzae*, σύμφωνα με την αντίδραση mPCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp* (Xirogianni *et al*, 2009).

Τα δείγματα αυτά αποτέλεσαν τους αρνητικούς μάρτυρες για την ανάπτυξη της αντίδρασης multiplex PCR, η οποία θα ανιχνεύει τους πέντε οροτύπους του *H.influenzae*.

Όλα τα παραπάνω δείγματα ήταν αρνητικά ως προς την καλλιέργεια.

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Καλλιέργεια βακτηριακών στελεχών

Η καλλιέργεια όλων των βακτηριακών στελεχών έγινε σε σοκολατόχρωμο άγαρ και ακολούθησε επώση στους 37 °C σε περιβάλλον 5-10 % CO₂ για 24 ώρες.

Τα πρότυπα στελέχη αναφοράς εστάλησαν σε λυοφιλοποιημένη μορφή. Για την ανασύστασή τους, προστέθηκε 1mL θρεπτικού ζωμού (Nutrient Broth, OXOID CM0001, Hampshire, England) σε στείρες συνθήκες και κατόπιν το εναιώρημα επιστρώθηκε σε σοκολατόχρωμο άγαρ.

Παρασκευή σοκολατόχρωμου άγαρ:

1. Ζυγίστηκαν 39 g θρεπτικού υλικού Columbia agar (OXOID CM0331, Hampshire, England) και διαλύθηκαν σε 1L απιονισμένου νερού
2. Το υλικό θερμάνθηκε με συνεχή ανάδευση μέχρι βρασμού
3. Το υλικό αποστειρώθηκε στους 121 °C για 15 λεπτά
4. Αμέσως μετά το τέλος της αποστείρωσης, προστέθηκε αίμα αλόγου (DHB100, E and O Laboratories, Burnhouse, Bonnybridge, Scotland) σε αναλογία 5 % του υλικού. Λόγω της υψηλής θερμοκρασίας του υλικού μετά την αποστείρωση τα ερυθρά αιμοσφαίρια διασπάστηκαν.
5. Το υλικό αναδεύτηκε καλά και μοιράστηκε στα τρυβλία

Παρασκευή θρεπτικού ζωμού

1. Ζυγίστηκαν 13g θρεπτικού υλικού Nutrient broth (OXOID CM0001, Hampshire, England) και διαλύθηκαν σε 1L απιονισμένου νερού
2. Το υλικό αναδεύτηκε και
3. Αποστειρώθηκε στους 121 °C για 15 λεπτά

2.2.2 Συντήρηση βακτηριακών στελεχών

Από τις 24 ώρες καλλιέργειες, έγινε εναιώρημα σε θρεπτικό ζωμό συντήρησης Brain Heart infusion broth (CM0225, Oxoid, United Kingdom). Το υλικό φυλάχτηκε στους -70 °C.

Παρασκευή θρεπτικού ζωμού συντήρησης βακτηριακών στελεχών (Brain Heart Infusion broth)

1. Ζυγίστηκαν 9,25 g θρεπτικού υλικού (Brain Heart Infusion Broth, Oxoid CM 225, UK) και διαλύθηκαν σε 250 mL απεσταγμένου νερού
2. Το υλικό θερμάνθηκε υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να γίνει διαυγές
3. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C για 15 min και
4. Μοιράστηκε σε μικρότερο όγκο των 80 mL και προστέθηκαν 20 mL γλυκερίνης
5. Μετά την προσθήκη της γλυκερίνης, ακολούθησε μοίρασμα 1 mL σε cryovials και έπειτα τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 37 °C για έλεγχο τυχόν επιμολύνσεων
6. Το υλικό διατηρήθηκε στους + 4 °C

2.2.3 Ταυτοποίηση στελεχών *H. influenzae*

Η ταυτοποίηση των στελεχών *H. influenzae* που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα (n=61) έγινε με τον έλεγχο βιοχημικών δοκιμών που βασίζονται στην μικροβιακή διάσπαση σακχάρων (Rapid NH System, Remel, USA) (Πίνακας 2.2).

Πίνακας 2.2 Συστατικά της μεθόδου ταυτοποίησης των στελεχών του *Haemophilus influenzae* (Rapid NH System)

Τμήματα πλάκας (panel)	Κωδικός	Συστατικά	Ποσότητα
Πριν την προσθήκη αντιδραστηρίων:			
1	PRO	Proline ρ-nitroanilide	0,1 %
2	GGT	γ-Glutamyl ρ- nitroanilide	0,12 %
3	ONPG	Σ-Nitrophenyl, β,D-galactoside	0,25 %
4	GLU	Glucose	2,0 %
5	SUC	Sucrose	2,0 %
6	EST	Fatty Acid Ester	0,5 %
7	RES	Resazurin	0,1 %
8	PO ₄	ρ-Nitrophenyl phosphate	0,1 %
9	ORN	Ornithine	0,8 %
10	URE	Urea	0,36 %
Μετά την προσθήκη αντιδραστηρίων:			
8	NO ₂	Nitrite	1,2 %
9	NO ₃	Nitrate	0,3 %
10	IND	Tryptophane	0,16 %

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ήταν οι εξής:

1. Προετοιμασία εναιωρήματος:

Με τη χρήση μικροβιολογικού κρίκου παρασκευάστηκε εναιώρημα βαθμού θολερότητας 3 σύμφωνα με την κλίμακα της McFarland από 24ωρη καλλιέργεια του μικροοργανισμού.

2. Το εναιώρημα τοποθετήθηκε στην πλάκα βιοχημικών δοκιμασιών (Rapid™ NH panels)

3. Ακολούθησε επώαση της πλάκας Rapid™ NH για 4 ώρες σε θερμοκρασία 35-37 °C

4. Έγινε υπολογισμός της πλάκας Rapid™ NH:

Βαθμολογήθηκαν όλα τα τμήματα της πλάκας ανάλογα με την αλλαγή χρώματος, όπως υποδεικνύεται από τον παρασκευαστή. Προστέθηκαν επιπλέον αντιδραστήρια (RapID Nitrate A, RapID Nitrate B, RapID Spot Indole) στα τρία τελευταία τμήματα (8, 9 και 10) του panel. Τέλος, τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά την προσθήκη των αντιδραστηρίων εισήχθησαν σε ένα ειδικό λογισμικό (Rapid™ Code Compendium, ERIC) από όπου υπολογίστηκε αυτόματα το αποτέλεσμα ταυτοποίησης του μικροοργανισμού.

2.2.4 Τυποποίηση οροτύπων των στελεχών του *H. influenzae* (Slide Agglutination Test)

Η μέθοδος της οροσυγκόλλησης εφαρμόστηκε στα πρότυπα στελέχη αναφοράς (θετικοί μάρτυρες) και σε όλα τα στελέχη *H. influenzae* (n= 61).

Οι οροί ανοσοσυγκόλλησης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρείας Remel, RapID™ NH System, USA (Πίνακας 2.2).

Μέθοδος:

1. Τοποθετήθηκε μια σταγόνα φυσιολογικού ορού σε αντικειμενοφόρο πλάκα

2. Έγινε εναιώρημα από 24ωρη καλλιέργεια

3. Προστέθηκε 1 σταγόνα ορού των αντίστοιχων οροτύπων (a, b, c, d, e και f)

4. Η πλάκα ανακινήθηκε προσεκτικά και παρατηρήθηκε η ύπαρξη συγκόλλησης

5. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για όλους τους ορούς ανοσοσυγκόλλησης μέχρι την εύρεση θετικού αποτελέσματος

6. Καταγράφηκε σαν θετικό αποτέλεσμα οροτύπου για όποιο στέλεχος είχε δώσει θετικό αποτέλεσμα συγκόλλησης με τον συγκεκριμένο ορό. Σε περίπτωση που το στέλεχος δεν είχε αντιδράσει με κάποιο από τους ορούς, το στέλεχος καταγράφηκε ως μη τυποποιήσιμο (nontypeable, NT).

2.2.5 Μέθοδοι απομόνωσης DNA

α) Απομόνωση γενετικού υλικού (DNA) από βακτηριακό στέλεχος

1. Παρασκευάστηκε εναιώρημα από 24ωρη καλλιέργεια του στελέχους σε 200 μL απεσταγμένο νερό και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση
2. Θερμάνθηκε στους 100 °C για 10 λεπτά
3. Φυγοκεντρήθηκε στις 14.000 στροφές (rpm) για 12 λεπτά
4. Μετά τη φυγοκέντρωση συλλέχθηκε 170 μL από το υπερκείμενο, που τοποθετήθηκαν σε ένα νέο σωληνάριο
5. Το ίζημα απορρίφθηκε
6. Το γενετικό υλικό φυλάχτηκε στους -20 °C

β) Απομόνωση γενετικού υλικού από ολικό αίμα και πλευριτικό υγρό

Η απομόνωση του DNA από το ολικό αίμα και πλευριτικό υγρό έγινε με το kit της Nucleospin® Blood QuickPure (Macherey-Nagel, Duren, Germany), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

Αναλυτικότερα, σε ένα κωνικό σωληνάριο τύπου eppendorf:

1. Προστέθηκε 25 μL διαλύματος πρωτεϊνάσης K, 200 μL αίματος (και τα δύο δείγματα πρέπει να είναι σε θερμοκρασία δωματίου) και 200 μL από το διάλυμα BQ1 (διάλυμα υψηλής περιεκτικότητας σε αποδιατακτικά ιόντα).
2. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση για 10''-15'' (vortex) και επώαση στους 70 °C για 10 min. Κατά τη διάρκεια της επώασης, επήλθε λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και το χρώμα του διαλύματος άλλαξε από ερυθρό σε καφέ.
3. Ακολούθως, προστέθηκε 200 μL αιθυλικής αλκοόλης (100 %) και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση
4. Το δείγμα μεταφέρθηκε στην ειδική στήλη πυριτίου, που είχε την ικανότητα αντιστρεπτής πρόσδεσης του DNA και φυγοκεντρήθηκε στις 14000 στροφές για 1 min.

5. Η στήλη τοποθετήθηκε σε ένα νέο σωληνάριο συλλογής όγκου 2 mL, όπου προστέθηκαν 200 μ L από το διάλυμα BQ2 και φυγοκεντρήθηκαν ξανά στις 14000 στροφές για 1 min.

6. Στη συνέχεια, το έκπλυμα απορρίφθηκε και η στήλη επανατοποθετήθηκε στο σωληνάριο συλλογής. Προστέθηκαν 350 μ L BQ2 στη στήλη και η φυγοκέντρωση επαναλήφθηκε στις 14.000 στροφές για 3 min.

Σε αυτή τη φάση, το διάλυμα BQ2 λειτούργησε σα διάλυμα έκλουσης των άχρηστων συστατικών της κυτταρικής λύσης, ενώ το DNA παρέμεινε προσδεδεμένο στη στήλη πυριτίου.

7. Επειδή η διαδικασία της πρόσδεσης ήταν 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 τοποθετήθηκε σε ένα νέο κωνικό σωληνάριο τύπου erppendorf και προστέθηκε 90 μ L προθερμασμένο στους 70 °C διάλυμα BE (αλκαλικό διάλυμα έκλουσης). Επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min και φυγοκεντρήθηκε στις 14000 στροφές για 1 min. Μετά τη φυγοκέντρωση, στο διάλυμα έκλουσης, περιλήφθηκε διαλυμένο το γενετικό υλικό, προϊόν της απομόνωσης.

8. Το DNA διατηρήθηκε στους -20 °C.

γ) Απομόνωση γενετικού υλικού από εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY)

Η απομόνωση γενετικού υλικού από ENY βασίστηκε στο πρωτόκολλο της εργασίας των Zambardi *et al.* (1995).

Σύμφωνα με την παραπάνω μεθοδολογία:

1. Σε ένα κωνικό σωληνάριο τύπου erppendorf μεταγγίστηκε ποσότητα βιολογικού υλικού ίση με 500-1000 μ L και φυγοκεντρήθηκε στις 4000 στροφές για 10 min.

2. Ακολούθως, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα κρατήθηκε.

3. Στο ίζημα (περίπου 150 μ L) προστέθηκαν 650 μ L αποστειρωμένου-απεσταγμένου H₂O και 150 μ L διαλύματος Chellex/Tween -20* (διάλυμα αποδιατακτικό-απορρυπαντικό) και ακολούθησε βρασμός για 30 min. Με την ταυτόχρονη δράση της υψηλής θερμοκρασίας και του απορρυπαντικού διαλύματος Chellex/Tween 20 επιτεύχθηκε λύση των κυττάρων.

4. Τέλος, το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 10.000 στροφές για 8min.
5. Τα προϊόντα της κυτταρικής λύσης περιέχονται στο ίζημα που απορρίφθηκε, ενώ ποσότητα ίση με 200 μL του υπερκειμένου, που περιελάμβανε διαλυμένο το γενετικό υλικό, μεταγγίστηκε σε νέο κωνικό σωληνάριο τύπου erppendorf.
6. Το DNA διατηρήθηκε στους -20°C .

***Παρασκευή διαλύματος Chellex/Tween 20**

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

δ) Μέθοδος απομόνωσης γενετικού υλικού από βρογχοκυψελιδικά εκπλύματα (BAL)

Η απομόνωση γενετικού υλικού από BAL βασίστηκε στο πρωτόκολλο απομόνωσης γενετικού υλικού από ιστούς όπως περιγράφεται στο εγχειρίδιο χρήσης του 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.

1. Σε ένα νέο κωνικό σωληνάριο τύπου erppendorf τοποθετήθηκαν 200 μL δείγματος και φυγοκεντρήθηκαν στις 8.000 στροφές για 10 min.
2. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και προστέθηκε στο ίζημα 180 μL διαλύματος ATL και 20 μL πρωτεΐνης K, που αναδεύτηκαν ισχυρά και επώαστηκαν στους 56°C για 1h.3. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 200 μL διαλύματος AL, αναδεύτηκαν και επώαστηκαν στους 70°C για 10 min.
4. Προστέθηκαν 200 μL αιθανόλης 100 % και το δείγμα μεταγγίστηκε στη στήλη. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 8.000 στροφές για 10 min και αλλαγή του σωληναρίου συλλογής

5. Ακολούθησαν διαδοχικά πλύσεις με τα διαλύματα AW1 (500 μ L) και AW2 (500 μ L), τα οποία ήταν διαλύματα αλάτων που συνέβαλλαν στη λύση των κυττάρων. Μετά την προσθήκη του διαλύματος AW1 ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 8.000 στροφές για 1 min καθώς επίσης και του διαλύματος AW2 στις 14.000 στροφές για 4 min. Τα διαλύματα και οι φυγοκεντρήσεις βοήθησαν στην απομάκρυνση των άχρηστων συστατικών της κυτταρικής λύσης, ενώ το γενετικό υλικό παρέμεινε προσδεδεμένο στη στήλη
6. Τέλος, για την έκλουση του γενετικού υλικού από τη στήλη, η στήλη τοποθετήθηκε σε ένα νέο κωνικό σωληνάριο τύπου erpendorf και προστεθηκαν 200 μ L από το διάλυμα ΑΕ. Το δείγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5min και φυγοκεντρήθηκε στις 8.000 στροφές για 1 min.
7. Το γενετικό υλικό περιεχόταν στο διάλυμα εκλουσης, το οποίο συντηρήθηκε στους -20 °C.

2.2.6 Εμβολιασμός κλινικών δειγμάτων (δείγματα αίματος) με εναιώρημα στελεχών *Haemophilus influenzae* οροτύπου a, d και e

Στόχος του εμβολιασμού ήταν η δημιουργία κλινικών δειγμάτων στα οποία ανιχνεύθηκε ο *Haemophilus influenzae* οροτύπων **a**, **d** και **e** σε τελική συγκέντρωση ίση με 1 ng/ μ L και 0,001 ng/ μ L. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος αρνητικά για μικροοργανισμούς και βακτηριακά εναιωρήματα των πρότυπων στελεχών.

Τα πρότυπα στελέχη του αιμοφίλου οροτύπων **a** (HA 20), **d** (HA 22) και **e** (HA 23) καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία με σοκολατόχρωμο άγαρ και επώαστηκαν σε κλίβανο παρουσία 5% CO₂ σε θερμοκρασία 37 °C για 24 ώρες. Ακολούθως, παρασκευάστηκε βακτηριακό εναιώρημα σε PBS (Phosphate Buffer Saline) εις διπλούν τελικού όγκου 400 μ L. 100 μ L βακτηριακού εναιωρήματος χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση γενετικού υλικού (DNA), σύμφωνα με το πρωτόκολλο απομόνωσης γενετικού υλικού από βακτηριακό στέλεχος, το οποίο στη συνέχεια φωτομετρήθηκε. Αντίστοιχα, άλλα 100 μ L από το βακτηριακό εναιώρημα φωτομετρήθηκαν σε Οπτική Πυκνότητα OD₆₀₀.

Στη συνέχεια, υπολογίστηκε ο λόγος της OD₆₀₀ προς την ποσότητα του γενετικού υλικού που φωτομετρήθηκε για να διαπιστωθεί ότι είναι σταθερός (γεγονός που συνεπάγεται ότι

η ποσότητα του γενετικού υλικού που απομονώθηκε είναι ανάλογη με την πυκνότητα του βακτηριακού εναιωρήματος).

Συνεπώς, υπολογίστηκαν οι όγκοι του βακτηριακού εναιωρήματος που έπρεπε να προστεθούν στα κλινικά δείγματα (αίμα) ώστε η συγκέντρωση του DNA του αιμοφίλου οροτύπων **d** και **e** -να είναι 1 ng/μL και 0,001 ng/μL. Μετά την προσθήκη του βακτηριακού εναιωρήματος ακολούθησε η απομόνωση ολικού DNA από τα κλινικά δείγματα.

2.2.7 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης

Όλα τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν στην τεχνική της πολλαπλής PCR που περιγράφεται παρακάτω, είτε επιλέχθηκαν από δημοσιευμένες εργασίες, είτε τροποποιήθηκαν βάσει αυτών που αναφέρονταν σε δημοσιευμένες εργασίες. Σε όλες τις περιπτώσεις η επιλογή των εκκινητικών μορίων είχε σαν στόχο:

- τη μοναδικότητα των περιοχών των γονιδίων που θα ενισχύσουν τον προς ανίχνευση μικροοργανισμό
- 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 αгарόζης ως αποτέλεσμα πολλαπλής PCR.

Όλα τα εκκινητικά μόρια πριν χρησιμοποιηθούν *in vitro* ελέγχθηκαν με το πρόγραμμα BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) στην Παγκόσμια Γονιδιακή Τράπεζα (GeneBank) για τη συγγένεια προς τα γονίδια-στόχους ή για υβριδισμό σε ανθρώπινο γενωμικό υλικό. Επιπλέον, ελέγχθηκαν με το λογισμικό FastPCR (<http://primerdigital.com/fastpcr.html>) και πραγματοποιήθηκε *in silico* PCR.

Η ανάπτυξη της πολλαπλής τεχνικής PCR ακολουθήθηκαν τα παρακάτω στάδια (Henegariu *et al.* 1997, Elnifro *et al.* 2000):

- 1) Ανάπτυξη μεμονωμένων PCR για κάθε ένα από τα ζεύγη εκκινητικών μορίων έτσι ώστε να βρεθούν κοινές συνθήκες λειτουργίας και να ελεγχθεί η λειτουργικότητά τους.
- 2) Συνδυασμός των μεμονωμένων PCR σε μία πολλαπλή- PCR (mPCR) -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 PCR.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών για όλους τους οροτύπους του αιμοφίλου παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.3.

Πίνακας 2.3 Εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Εκκινητές	Ορότυπος	Αλληλουχία	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Θερμοκρασία αποδιάταξης (Tm)	References
haf ha2	a	5'- ATCTTACAACCTTAGCGAATAC-3' 5'- GAATATGACCTGATCTTCTG-3'	1180	47,25 54,14	Maaroufi <i>et al</i> , 2007 Falla <i>et al</i> , 1994
hc2 hc3	c	5'- CAGAGGCAAGCTATTAGTGA-3' 5'- TGGCAGCGTAAATATCCTAA-3'	200	57,83 60,21	Falla <i>et al</i> , 1994
hd1 hd2	d	5'- TGATGACCGATACAACCTGT-3' 5'- TCCACTCTTCAAACCATCT-3'	150	60,98 59,26	Falla <i>et al</i> , 1994
TTL63 TTL64	e	5'- GAGCAATTCCATCGTAGTAAC-3' 5'- TTCTTCATATCCTCGCAATTG-3'	592	58,31 61,99	Lam <i>et al</i> , 2010
hf1 hf2	f	5'- GCTACTATCAAGTCCAAATC-3' 5'- CGCAATTATGGAAGAAAGCT-3'	456	53,52 61,73	Falla <i>et al</i> , 1994

Οι εκκινητές για τον ορότυπο **e** πλαισιώνουν ένα τμήμα 592 bp του *esc4*, ένα γονίδιο απαραίτητο για την σύνθεση της κάψας του οροτύπου **e** (Lam *et al*, 2011). Η περιοχή II του γονιδιακού τόπου *cap* για τον ορότυπο **f** περιλαμβάνει τρία γονίδια, *fc1*, *fc2*, *fc3*, τα οποία ακόμα δεν έχουν χαρακτηριστεί. Επιπλέον, περιλαμβάνει τρία ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (*orf1*, *orf2*, *orf3*) (Satola *et al*, 2003, b). Οι εκκινητές του οροτύπου **f** ενισχύουν ένα τμήμα 456 bp, το οποίο βρίσκεται στο *orf 3* (Satola *et al*, 2003). Οι εκκινητές για τον ορότυπο **c** πλαισιώνουν ένα τμήμα 200 bp του *ccs2*, ένα γονίδιο απαραίτητο για τη σύνθεση της κάψας του οροτύπου **c**. Ενώ, οι εκκινητές για τον ορότυπο **d** υβριδίζονται στα άκρα ενός τμήματος 150 bp του γονιδίου *dcs3*, απαραίτητου για την σύνθεση της κάψας οροτύπου **d** (Lam *et al*, 2010). Αντίθετα, η περιοχή II του γονιδιακού τόπου *cap* για τον ορότυπο **a** περιλαμβάνει τέσσερα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (*acs1*, *acs2*, *acs3*, *acs4*). Οι εκκινητές του οροτύπου **a** στοχεύουν στα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης *acs2* και *acs3* (Follens *et al*, 1999) και ενισχύουν μια περιοχή 1180bp.

Για τον ορότυπο **a** αφαιρέθηκαν έξι νουκλεοτίδια (GCAACC) από το 5' άκρο του εκκινητή *haf*, όπως δημοσιεύθηκε από τους Maaroufi *et al* (2007). Ενώ, η αλληλουχία του εκκινητή *ha2* επιλέχθηκε αυτούσια από τη δημοσίευση των Falla *et al*, 1994.

Η θερμοκρασία αποδιάταξης (*T_m*) για τον κάθε εκκινητή υπολογίστηκε με τη βοήθεια της εφαρμογής που διαθέτει η ιστοσελίδα της Finnzymes (*T_m* calculator), η οποία είναι η εταιρεία παραγωγής της πολυμεράσης (Phusion Taq Polymerase) που χρησιμοποιήθηκε (http://www.finnzymes.fi/tm_determination.html).

2.2.7.5 Αντιδραστήρια

1. Ένζυμο θερμοανθεκτικής πολυμεράσης 2 U/μL (Phusion Taq Polymerase, Finnzymes, Finland)
2. Ρυθμιστικό διάλυμα 5x (PCR buffer GC) (παρέχεται μαζί με το ένζυμο της Taq πολυμεράσης, Finnzymes, Finland)
3. Μίγμα τεσσάρων δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) συγκέντρωσης 5 mM το καθένα (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Abgene, United Kingdom)
4. Primers (VBC, Austria)

5. Water for injection (Biocer, Greece)

2.2.7.5.1 Phusion High Fidelity DNA Polymerase

Εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης αλάτων στο ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης, η Phusion DNA πολυμεράση λειτούργησε καλύτερα σε αυξημένες τιμές θερμοκρασίας αποδιάταξης και υβριδισμού. Μαζί με το ένζυμο υπήρχαν δύο ρυθμιστικά διαλύματα (buffers), τα οποία ήταν τα 5x Phusion HF Buffer και 5x Phusion GC Buffer. Η πιθανότητα λάθους της πολυμεράσης στο GC Buffer ($9,5 \times 10^{-7}$) ήταν κατά πολύ μικρότερη από εκείνη με το HF Buffer ($4,4 \times 10^{-7}$). Επιπλέον, το GC Buffer είχε τη δυνατότητα να βελτιώσει την απόδοση της πολυμεράσης σε πολύ μεγάλα και δύσκολα τμήματα DNA, όπως ήταν τα τμήματα DNA πλούσια σε GC. Η συγκέντρωση των ιόντων Mg^{2+} ήταν πολύ σημαντική διότι η πολυμεράση ήταν ένα ένζυμο που εξαρτάται από το μαγνήσιο. Εξαιρετικά υψηλή συγκέντρωση Mg^{2+} σταθεροποίησε την δίκλωνη αλυσίδα του DNA και εμπόδισε την αποδιάταξη ολόκληρου του μορίου. Επιπλέον, μπόρεσε να σταθεροποιήσει τα εκκινητικά μόρια (primers) σε λανθασμένες θέσεις της αλυσίδας του DNA και να μειώσει με αυτόν τον τρόπο την ειδικότητα της τεχνικής. Αντιστρόφως, εξαιρετικά χαμηλή συγκέντρωση Mg^{2+} οδήγησε σε χαμηλή απόδοση προϊόντος. Η βέλτιστη συγκέντρωση Mg^{2+} βασίστηκε στην συγκέντρωση των νουκλεοτιδίων (dNTPs), στη σύνθεση του ρυθμιστικού διαλύματος, και το DNA (template) (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, Finnzymes, Manual).

Η αποδιάταξη πραγματοποιήθηκε στους 98 °C. Εξαιτίας της υψηλής θερμοσταθερότητας του ενζύμου, μπόρεσε να εφαρμοσθεί ακόμα υψηλότερη θερμοκρασία αποδιάταξης. Η πολυμεράση είχε την ικανότητα να σταθεροποιεί τον υβριδισμό των εκκινητικών μορίων με το DNA (template). Η θερμοκρασία υβριδισμού συνυπολογίστηκε με το T_m (θερμοκρασία στην οποία η δίκλωνη αλυσίδα του DNA είχε ξεδιπλωθεί) του κάθε εκκινητικού μορίου. Το στάδιο της επιμήκυνσης πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 72 °C (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, Finnzymes, Manual).

2.2.7.6 Πειραματικά στάδια ανάπτυξης της τεχνικής**Πειραματικό στάδιο 1: Δοκιμή μεμονωμένων PCR για κάθε ορότυπο**

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν **μεμονωμένες PCR** για κάθε ορότυπο οι οποίες τελικά εφαρμόστηκαν στο ίδιο πρόγραμμα με τις ίδιες συνθήκες. Ως θετικός μάρτυρας σε κάθε

PCR χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος αναφοράς του αντίστοιχου οροτύπου. Με αυτόν τρόπο έγινε δοκιμή της λειτουργικότητας όλων των ζευγών των εκκινητών. Το πρόγραμμα στο οποίο εφαρμόστηκαν οι μεμονωμένες PCR καθώς και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν ανά αντίδραση παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.4.

2.4 Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή και συγκεντρώσεις για τις μεμονωμένες PCR.

Θερμοκρασία	Διάρκεια Σταδίου	Στάδια της τεχνικής	Κύκλοι	PCR mix
98 °C	30 sec	Αρχική Αποδιάταξη	1	Τελικός όγκος: 25 μL Όγκος DNA-στόχου: 5 μL 0,4 μM κάθε primer 0,8 mM dNTPs 0,5 U Taq 1x buffer 5 ng DNA template
98 °C	5 sec	Αποδιάταξη	30	
55 °C	10 sec	Υβριδισμός		
72 °C	30 sec	Επιμήκυνση		
72 °C	2 min	Τελική επιμήκυνση	1	

Πειραματικό στάδιο 2: Συγχώνευση σε πενταπλή PCR

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η συγχώνευση των μεμονομένων PCR σε μια **τριπλή** (για τους ορότυπους **a**, **c** και **d**) και μια **διπλή** (για τους ορότυπους **e** και **f**) PCR. Κατά τη διάρκεια των δοκιμών δημιουργήθηκε ένα νέο πρόγραμμα το οποίο αποτελείται από δύο διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού (60 °C στους πρώτους 15 κύκλους και 57 °C στους υπόλοιπους 15 κύκλους της αντίδρασης), όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.5. Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων παρέμειναν σταθερές σε αυτές των μεμονομένων PCR.

Πίνακας 2.5 Πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή καθώς και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων για την τριπλή και τη διπλή PCR.

Θερμοκρασία	Διάρκεια Σταδίου	Στάδια της τεχνικής	Κύκλοι	PCR mix
98 °C	30 sec	Αρχική Αποδιάταξη	1	Τελικός όγκος: 25 μL Όγκος DNA-στόχου: 5 μL 0,4 μM κάθε primer 0,8 mM dNTPs 0,5 U Taq 1x buffer 5 ng each DNA template
98 °C	5 sec	Αποδιάταξη	15	
60 °C	10 sec	Υβριδισμός		
72 °C	30 sec	Επιμήκυνση		
98 °C	5 sec	Αποδιάταξη	15	
57 °C	10 sec	Υβριδισμός		
72 °C	30 sec	Επιμήκυνση		
72 °C	2 min	Τελική Επιμήκυνση	1	

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η συγχώνευση των δύο παραπάνω PCR σε μία **πενταπλή** PCR, για την ταυτόχρονη ανίχνευση και των 5 οροτύπων (**a**, **c**, **d**, **e** και **f**) υπό το ίδιο πρόγραμμα και συνθήκες (Πίνακας 2.5).

Στις δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα πρότυπα στελέχη σε συγκέντρωση γενετικού υλικού 5 ng/ μ L.

Πειραματικό στάδιο 3: Τροποποίηση προγράμματος και συνθηκών πενταπλής PCR

Στο παρόν στάδιο πραγματοποιήθηκε σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης των εκκινητών για τον ορότυπο **a** από 0,4 μ M σε 0,8 μ M, ενώ παράλληλα μειώθηκε η συγκέντρωση των εκκινητών για τον ορότυπο **e**, ξεκινώντας από 0,4 μ M, 0,3 μ M, 0,2 μ M και 0,1 μ M. Η καταληκτική συγκέντρωση ήταν 0,1 μ M.

Επιπλέον, έγιναν αλλαγές στο πρόγραμμα εκτέλεσης της τεχνικής: σταδιακή αύξηση του χρόνου υβριδισμού από 10 sec σε 20 sec και του χρόνου επιμήκυνσης από 30 sec στα 55 sec και αύξηση του αριθμού των κύκλων από 15 σε 18 και τελικά σε 20 στο δεύτερο επίπεδο της PCR με τη χαμηλότερη θερμοκρασία υβριδισμού. Οι δοκιμές έγιναν αρχικά στα πρότυπα στελέχη συγκέντρωσης 5 ng/ μ L και των πέντε οροτύπων (**a**, **c**, **d**, **e** και **f**) και ακολούθως, έγινε εφαρμογή απευθείας σε κλινικά δείγματα, αρνητικά για *Haemophilus influenzae*. Οι συνθήκες και το πρόγραμμα όπως διαμορφώθηκαν τελικά παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.6.

Πίνακας 2.6 Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή και συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων μετά την τροποποίηση της πενταπλής PCR.

Θερμοκρασία θερμοκυκλοποιητή	Διάρκεια Σταδίου	Στάδια της τεχνικής	Κύκλοι	PCR mix
98 °C	30 sec	Αρχική Αποδιάταξη	1	Τελικός όγκος: 25 μL
98 °C	5 sec	Αποδιάταξη	15	Όγκος DNA στόχου: 5 μL 0,4 μM primer c, d, f 0,8 μM primer a 0,1 μM primer e 0,8 mM dNTPs 0,5 U Taq 1x buffer
60 °C	20 sec	Υβριδισμός		
72 °C	55 sec	Επιμήκυνση		
98 °C	5 sec	Αποδιάταξη	20	
57 °C	10 sec	Υβριδισμός		
72 °C	55 sec	Επιμήκυνση		
72 °C	2 min	Τελική Επιμήκυνση	1	5 ng each DNA template

Πειραματικό στάδιο 4: Εφαρμογή σε κλινικά δείγματα

Στο παρόν στάδιο πραγματοποιήθηκε δοκιμή κλινικών δειγμάτων θετικών και αρνητικών για *H.influenzae* στο διαμορφωμένο πρόγραμμα (Πίνακας 2.6) για να ελεγχθεί η ειδικότητα της πενταπλής τεχνικής. Για τον έλεγχο της ευαισθησίας χρησιμοποιήθηκε DNA προτύπων στελεχών *H. influenzae* οροτύπου a και d στις χαμηλές συγκεντρώσεις 5 pg/ μ L και 1 pg/ μ L.

Πειραματικό στάδιο 5: Βελτιστοποίηση συνθηκών και προγράμματος

Η εφαρμογή των κλινικών δειγμάτων στην πενταπλή PCR δημιούργησε την ανάγκη για περαιτέρω αλλαγές στις συνθήκες και στο πρόγραμμα εφαρμογής της τεχνικής. Οι αλλαγές πραγματοποιήθηκαν σταδιακά και διαδοχικά, με σκοπό την ενίσχυση του σήματος των προϊόντων και ταυτόχρονα τη διατήρηση της ευαισθησίας της τεχνικής και περιελάμβαναν:

- την αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου της πολυμεράσης (από 0,5 U ως και 0,9 U) και του ρυθμιστικού διαλύματος αυτής (1x ως και 1,4x),

- την αύξηση της συγκέντρωσης των dNTPs (0,8mM ως και 1mM) και
- των εκκινητών του ορότυπου a (0,8 μ M ως και 1 μ M)
- μείωση χρόνου υβριδισμού (από 20' σε 10')
- μείωση αριθμού κύκλων στο δεύτερο επίπεδο θερμοκρασιών (από 20 σε 15)
- μείωση χρόνου επιμήκυνσης (από 55' σε 50') στο πρώτο επίπεδο θερμοκρασιών)

Το πρόγραμμα και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων όπως βελτιστοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.7.

Πίνακας 2.7 Βελτιστοποίηση συνθηκών και προγράμματος του θερμοκυκλοποιητή

Θερμοκρασία θερμοκυκλοποιητή	Διάρκεια Σταδίου	Στάδια της τεχνικής	Κύκλοι	PCR mix
98 °C	30 sec	Αρχική Αποδιάταξη	1	Τελικός όγκος: 25 μ L
98 °C	5 sec	Αποδιάταξη	15	Όγκος DNA στόχου: 5 μ L 0,2 μ M primers c,d,f 0,1 μ M για τον primer e
60 °C	10 sec	Υβριδισμός		
72 °C	50 sec	Επιμήκυνση		
98 °C	5 sec	Αποδιάταξη	15	1 μ M για primer a 1 mM dNTPs 0,9 U Taq 1,1x buffer
57 °C	10 sec	Υβριδισμός		
72 °C	55 sec	Επιμήκυνση		
72 °C	2 min	Τελική Επιμήκυνση	1	5 ng each DNA template

Πειραματικό στάδιο 6: Εφαρμογή της πενταπλής PCR στα κλινικά δείγματα τα οποία είχαν «εμβολιαστεί» με βακτηριακό εναιώρημα αιμοφίλων οροτύπων a, d και e

Η δοκιμή αυτή έγινε κάτω από όμοιες συνθήκες με αυτές του προηγούμενου σταδίου (Πίνακας 2.7) και οδήγησε στη μείωση του όγκου του DNA- στόχου ανά αντίδραση από 5 μ L σε 3 μ L και τελικά σε 1 μ L.

Επιπλέον, μειώθηκε η συγκέντρωση των εκκινητών για τον ορότυπο a από 1 μM σε 0,8 μM και τελικά σε 0,5 μM , η συγκέντρωση των δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) από 1 mM σε 0,8 mM και της πολυμεράσης (0,7 U/ανά αντίδραση). Η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος αυξήθηκε από 1,1x σε 1,3x (Πίνακας 2.8).

Τέλος, σημαντικές αλλαγές έγιναν στο πρόγραμμα εκτέλεσης της τεχνικής, με την προσθήκη επιπλέον σταδίων (επίπεδα θερμοκρασίας υβριδισμού): 62 °C θερμοκρασία υβριδισμού στους πρώτους 10 κύκλους, 60 °C θερμοκρασία υβριδισμού στους επόμενους 10 κύκλους, 59 °C θερμοκρασία υβριδισμού για άλλους 10 κύκλους και 57 °C θερμοκρασία υβριδισμού για τους τελευταίους 5 κύκλους. Το τελικό πρόγραμμα εφαρμογής της τεχνικής και οι συνθήκες της αντίδρασης, μετά από όλες αυτές τις τροποποιήσεις, παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.8

Πίνακας 2.8. Βελτιστοποίηση συνθηκών και προγράμματος του θερμοκυκλοποιητή ύστερα από την εφαρμογή των «εμβολιασμένων» κλινικών δειγμάτων.

Θερμοκρασία θερμοκυκλοποιητή	Διάρκεια Σταδίου	Στάδια της τεχνικής	Κύκλοι	PCR mix
98 °C	30 sec	Αρχική Αποδιάταξη	1	Τελικός όγκος: 25 μL Όγκος DNA στόχου:1 μL 0,2 μM για primers c , d, f 0,1 μM για primer e 0,5 μM για primer a 1 mM dNTPs 0,7 U Taq 1,3x buffer 1 ng each DNA template
98 °C	5 sec	Αποδιάταξη	10	
62 °C	10 sec	Υβριδισμός		
72 °C	50 sec	Επιμήκυνση		
98 °C	5 sec	Αποδιάταξη	10	
60 °C	10 sec	Υβριδισμός		
72 °C	55 sec	Επιμήκυνση		
98 °C	5 sec	Αποδιάταξη	10	
59 °C	10 sec	Υβριδισμός		
72 °C	55 sec	Επιμήκυνση		
98 °C	5 sec	Αποδιάταξη	5	
57 °C	10 sec	Υβριδισμός		
72 °C	55 sec	Επιμήκυνση		
72 °C	2 min	Τελική Επιμήκυνση	1	

Πειραματικό στάδιο 7: Έλεγχος ευαισθησίας

Ο έλεγχος της ευαισθησίας της τεχνικής έγινε χρησιμοποιώντας τα πρότυπα στελέχη και των πέντε οροτύπων σε συγκέντρωση γενετικού υλικού 1 pg/μL, στο πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή όπως διαμορφώθηκε (Πίνακας 2.8).

Πειραματικό στάδιο 8: Δοκιμή των κλινικών δειγμάτων και των στελεχών *Haemophilus influenzae* στο τελικό πρόγραμμα της πενταπλής PCR

Στο τελευταίο στάδιο όλα τα κλινικά δείγματα (n=82) και όλα τα στελέχη *H. influenzae* που είχαν απομονωθεί από κλινικά δείγματα εφαρμόστηκαν στο τελικό πρόγραμμα.

2.2.7.7 Θετικός και αρνητικός μάρτυρας

Σε όλες τις δοκιμές χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας δις απεσταγμένο νερό (water for injection, Biocer, Greece). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μίγμα DNA από στελέχη *H. influenzae* οροτύπων a, c, d, e, f σε συγκέντρωση 1 ng/μL ανά αντίδραση.

2.2.8 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR

2.2.8.1 Αντιδραστήρια

1. Αγαρόζη (HT-Biotechnology, U.K)
2. Μάρτυρας μοριακού βάρους (GeneRuler™ 100 bp DNA ladder, Fermentas, Canada)
3. Ρυθμιστικό διάλυμα TEB 10X (Tris-Boric Acid-EDTA, Biorad, U.K)
4. Gel Red (6X Gel loading dye, Biotium, USA)

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

2.2.8.2 Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος TEB 1x:

Η αρχική πυκνότητα του ρυθμιστικού διαλύματος TEB ήταν 10x το οποίο αραιώθηκε σε 1x ως εξής: σε 9 L απεσταγμένο H₂O προστίθενται 1 L TEB πυκνότητας 10x.

2.2.8.3 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

Ο διαχωρισμός των προϊόντων της συγκεκριμένης PCR έγινε χρησιμοποιώντας πήκτωμα αγαρόζης πυκνότητας 2 %. Για την παρασκευή πηκτώματος 2 % ζυγίζεται 2 g αγαρόζης τα οποία διαλύονται σε 100 mL TEB. Το μείγμα της αγαρόζης θερμάνθηκε, ενώ αναδεύτηκε κατά τακτά χρονικά διαστήματα. Όταν η αγαρόζη απέκτησε θερμοκρασία ανεκτή στο γυμνό χέρι μεταφέρθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης για να στερεοποιηθεί.

2.2.8.4 Ενοφθαλμισμός πηκτώματος αγαρόζης

Το προϊόν της PCR αναμίχθηκε με 4 μ L από το διάλυμα της φθορίζουσας χρωστικής (loading buffer) και ενοφθαλμίστηκε ποσότητα ίση με 20 μ L στο αντίστοιχο φρεάτιο του πηκτώματος. Επίσης, ενοφθαλμίστηκε ποσότητα ίση με 4 μ L ladder.

2.2.8.5 Συνθήκες ηλεκτροφόρησης

Το πήκτωμα όγκου 100 mL ηλεκτροφορήθηκε στα 110 V για 50 min.

2.2.8.6 Ανάγνωση αποτελεσμάτων

Τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν για 50 min στα 110 V, σε gel αγαρόζης 2 % και σε διάλυμα TBE 1x (Biorad, UK). Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους (Ladder, GeneRulerTM 100 bp DNA ladder, Fermentas, Canada), ο οποίος ηλεκτροφορήθηκε συγχρόνως με τα προϊόντα της mPCR. Η χρώση των προϊόντων έγινε με 6X Gel Red (6X Gel loading dye, Biotium, USA). Τα αποτελέσματα οπτικοποιήθηκαν με τη βοήθεια UV ακτινοβολίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ****3.1 ΟΡΟΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗ**

Στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της τεχνικής της οροσυγκόλλησης (§ 2.2.4) για τα στελέχη που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα και τα στελέχη του ποιοτικού ελέγχου. Σύμφωνα με την τεχνική της οροσυγκόλλησης, από τα 50 στελέχη που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα, τα 47 χαρακτηρίστηκαν ως μη τυποποιήσιμα (NTHi), 2 χαρακτηρίστηκαν ως ορότυπος **f** και 1 ως ορότυπος **e**. Επιπλέον, από τα 11 στελέχη ποιοτικού ελέγχου, τα 8 χαρακτηρίστηκαν ως μη τυποποιήσιμα (NTHi), 1 ως ορότυπος **a**, 1 ως ορότυπος **e** και 1 ως ορότυπος **f**.

Πίνακας 3.1 Αποτελέσματα οροσυγκόλλησης των στελεχών *Haemophilus influenzae*

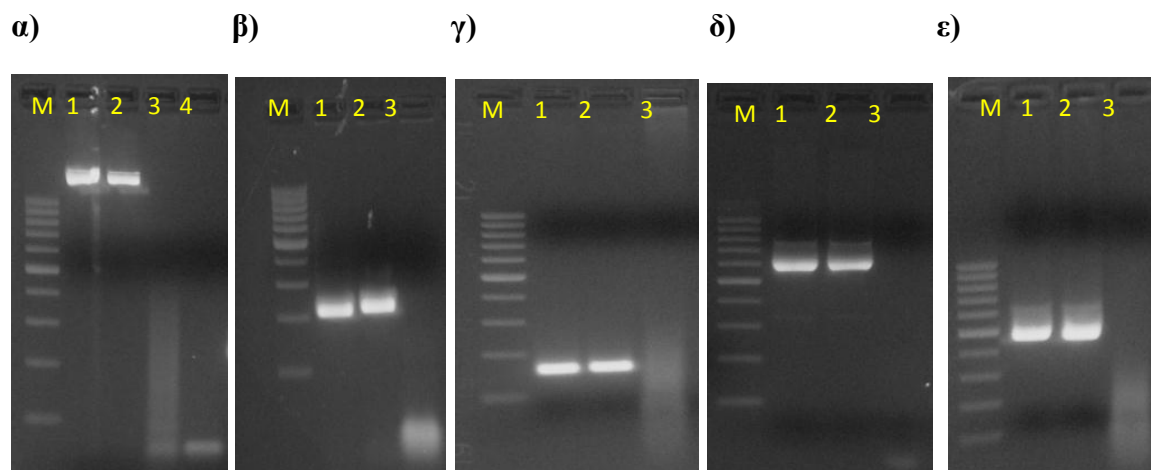
Agglutination Serotype	Στελέχη (από κλινικά δείγματα n=50)	Στελέχη ποιοτικού ελέγχου (n=11)
NT	47	8
a	0	1
c	0	0
d	0	0
e	1	1
f	2	1

3.2 ΠΟΛΛΑΠΛΗ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΠΕΝΤΕ ΟΡΟΤΥΠΩΝ ΤΟΥ *H. influenzae*

3.2.1 Πειραματικά στάδια ανάπτυξης της τεχνικής

Πειραματικό στάδιο 1: Δοκιμή μεμονωμένων PCR για κάθε ορότυπο

Το αρχικό πρόγραμμα δοκιμής των μεμονωμένων τεχνικών (Πίνακας 2.4) με τα εκκινητικά μόρια haf, ha2 για τον ορότυπο **a**, hc2/3 για τον ορότυπο **c**, hd1/2 για τον ορότυπο **d**, hf1/2 για τον ορότυπο **f** και TTL63/64 για τον ορότυπο **e**, έδωσε τα αναμενόμενα προϊόντα μεγέθους 1180bp, 200bp, 150bp, 592bp, 456bp για τους ορότυπους **a**, **c**, **d**, **f** και **e** αντίστοιχα (Εικόνα 3.1). Η κάθε φωτογραφία απεικονίζει το αντίστοιχο προϊόν για τον κάθε ορότυπο. Σε όλες τις φωτογραφίες, στη διαδρομή M απεικονίζεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, Fermentas), στη διαδρομή 1 και 2 παρουσιάζεται το προϊόν από το αντίστοιχο στέλεχος αναφοράς του αιμοφίλου συγκέντρωσης 5 ng/μL και στις διαδρομές 3 και 4 ο αρνητικός μάρτυρας (απιονισμένο H₂O).



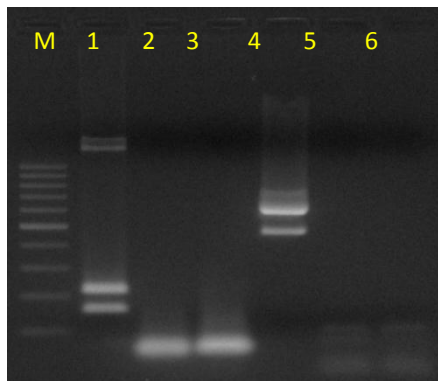
M: Μάρτυρας μοριακού βάρους (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder. Fermentas)

Εικόνα 3.1 Αποτελέσματα της πρώτης δοκιμής των μεμονωμένων τεχνικών για α) ορότυπο **a**, β) ορότυπο **c**, γ) ορότυπο **d**, δ) ορότυπο **e** και ε) ορότυπο **f**.

Πειραματικό στάδιο 2: Συγχώνευση σε πενταπλή PCR

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η συγχώνευση των μεμονωμένων PCR σε δύο. Στην Εικόνα 3.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα συγχώνευσης των μεμονωμένων τεχνικών σε μια τριπλή (για τους ορότυπους **a**, **c** και **d**) και σε μια διπλή PCR (για τους ορότυπους **e** και **f**) στο πρόγραμμα και τις συνθήκες του Πίνακα 2.5. Στη διαδρομή M απεικονίζεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους, και στις διαδρομές 1 και 4 τα αποτελέσματα εφαρμογής των

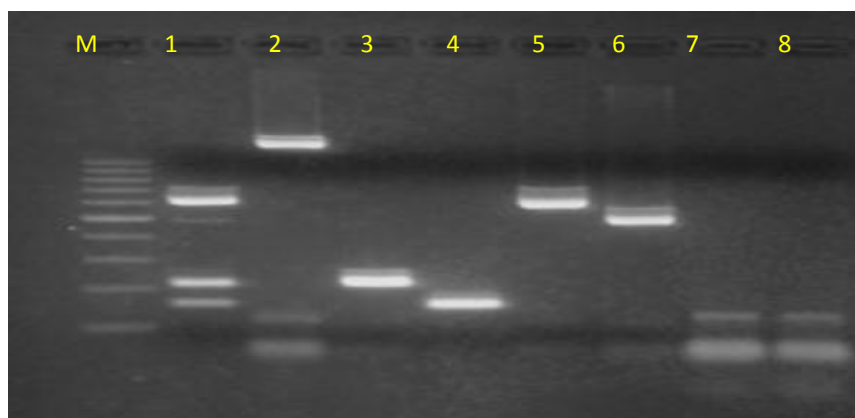
τεχνικών στους θετικούς μάρτυρες (πρότυπα στελέχη). Οι διαδρομές 2, 3, 5, 6 αντιστοιχούν στους αρνητικούς μάρτυρες (νερό).



Εικόνα 3.2 Αποτελέσματα της συγχώνευσης σε διπλή και τριπλή PCR. M: Μάρτυρας μοριακού βάρους (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, Fermentas)

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η συγχώνευση των δύο τεχνικών σε μία πενταπλή PCR στο ίδιο πρόγραμμα και συνθήκες (Εικόνα 3.3). Στο στάδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε μόνο γενετικό υλικό συγκέντρωσης 5 ng/μL που απομονώθηκε από τα πρότυπα στελέχη αναφοράς του αιμοφίλου οροτύπων **a**, **c**, **d**, **f** και **e**.

Στην Εικόνα 3.3, η διαδρομή 1 αντιστοιχεί στο θετικό μάρτυρα της πενταπλής PCR (μίγμα γενετικού υλικού των 5 προτύπων στελεχών) και οι διαδρομές 2, 3, 4, 5 και 6 αντιστοιχούν στα αποτελέσματα εφαρμογής μεμονωμένου του γενετικού υλικού κάθε πρότυπου στελέχους στην πενταπλή PCR, αντίστοιχα για τους ορότυπους **a**, **c**, **d**, **e** και **f**. Οι διαδρομές 7 και 8 αντιστοιχούν στον αρνητικό μάρτυρα (απιονισμένο H₂O).



Εικόνα 3.3 Αποτελέσματα της πρώτης δοκιμής της πενταπλής PCR στα πρότυπα στελέχη στις συνθήκες του πίνακα 2.5.

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

Με τις συνθήκες που εφαρμόστηκαν στην πρώτη δοκιμή της πενταπλής PCR ο ορότυπος **a** δεν παρουσιάστηκε στον θετικό μάρτυρα (διαδρομή 1, Εικόνα 3.3). Αντίθετα, το προϊόν

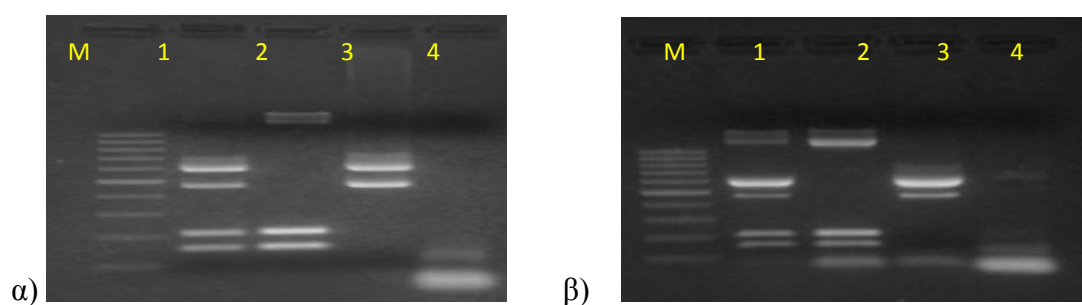
MB 1100 bp που αντιστοιχεί στον ορότυπο **a** εμφανίστηκε στην διαδρομή 2 (μεμονωμένο γενετικό υλικό πρότυπου στελέχους οροτύπου **a**).

Το γεγονός αυτό, οφείλεται προφανώς στον ανταγωνισμό των εκκινητών των πέντε οροτύπων, όπως συμβαίνει στις τεχνικές πολλαπλής PCR, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η ενίσχυση του προϊόντος του οροτύπου **a**, το οποίο έχει το μεγαλύτερο μοριακό βάρος σε σχέση με τα προϊόντα των υπόλοιπων οροτύπων. Για το λόγο αυτό, κρίθηκε αναγκαία η τροποποίηση των συνθηκών και του προγράμματος της πενταπλής PCR, όπως παρουσιάζεται στο επόμενο στάδιο.

Πειραματικό στάδιο 3: Τροποποίηση προγράμματος και συνθηκών πενταπλής PCR

Οι τροποποιήσεις του προγράμματος και των συνθηκών της πενταπλής PCR σε αυτό το στάδιο είχαν στόχο την απόκτηση ικανοποιητικών αποτελεσμάτων στο θετικό μάρτυρα (ίση απόδοση προϊόντων και των πέντε οροτύπων) ώστε να ξεπεραστούν τα προβλήματα ανταγωνισμού μεταξύ των εκκινητών, όπως εμφανίστηκαν στις πρώτες δοκιμές. Οι αλλαγές που πραγματοποιήθηκαν σταδιακά (αύξηση της συγκέντρωσης των εκκινητών για τον ορότυπο **a** και μείωση της συγκέντρωσης των εκκινητών των άλλων οροτύπων, αύξηση του χρόνου υβριδισμού και επιμήκυνσης και του αριθμού των κύκλων) διαμόρφωσαν το πρόγραμμα του Πίνακα 2.6.

Τα αποτελέσματα εφαρμογής παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.4 (α και β). Στην Εικόνα 3.4 (α) τα αποτελέσματα αφορούν μόνο τις αλλαγές που έγιναν σε επίπεδο προγράμματος (χρόνοι και αριθμός κύκλων), ενώ στην Εικόνα 3.4 (β) τα αποτελέσματα αφορούν τις αλλαγές που έγιναν στις συγκεντρώσεις των εκκινητικών μορίων.



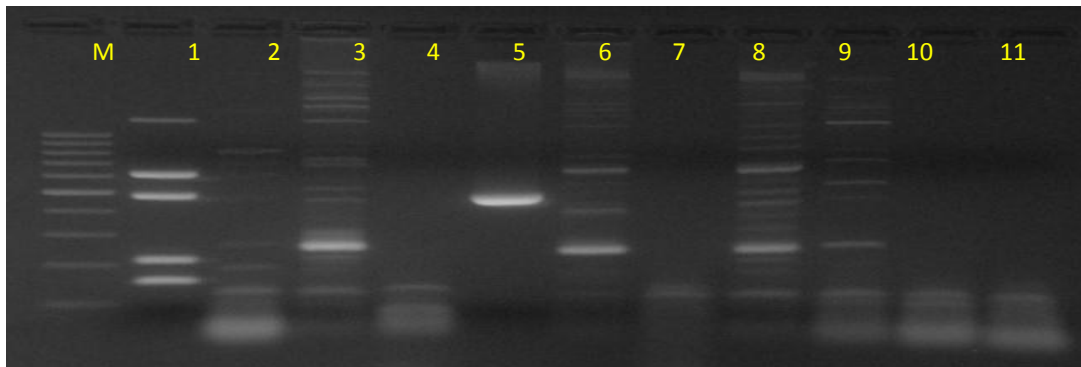
Εικόνα 3.4 Αποτελέσματα πενταπλής PCR ύστερα από α) αύξηση του αριθμού κύκλων και των χρόνων υβριδισμού και επιμήκυνσης β) αλλαγές στις συγκεντρώσεις των εκκινητών. M: Μάρτυρας μοριακού βάρους, 1: θετικός μάρτυρας πενταπλής PCR, 2: μίγμα γενετικού υλικού οροτύπων **a,c,d**, 3: μίγμα γενετικού υλικού οροτύπων **e** και **f**, 4: αρνητικός μάρτυρας. M: Μάρτυρας μοριακού βάρους (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder. Fermentas)

Οι παραπάνω τροποποιήσεις έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα ως προς τον αρχικό στόχο του παρόντος σταδίου (ικανοποιητική απόδοση των προϊόντων των πέντε οροτύπων), όπως φαίνεται και στη διαδρομή 1 της Εικόνας 3.4β.

Πειραματικό στάδιο 4: Εφαρμογή σε κλινικά δείγματα

Προκειμένου να επιτευχθεί ο απώτερος στόχος δημιουργίας της τεχνικής (εφαρμογή της πολλαπλής τεχνικής απευθείας σε κλινικά δείγματα με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα), στο στάδιο αυτό, δοκιμάστηκαν για πρώτη φορά κλινικά δείγματα θετικά για *H. influenzae* καθώς και γενετικό υλικό από τα στελέχη που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα και τα πρότυπα στελέχη αιμοφίλου στις χαμηλές συγκεντρώσεις 5 και 1 pg/mL στο διαμορφωμένο πρόγραμμα.

Στην Εικόνα 3.5, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αυτής της εφαρμογής, όπου οι διαδρομές 2, 3, 6, 8, 9 αντιστοιχούν σε κλινικά δείγματα και στις οποίες εμφανίζονται πολλαπλά μη ειδικά προϊόντα. Στις διαδρομές 4,5 και 7 εμφανίζονται τα αποτελέσματα εφαρμογής σε στελέχη που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα. Το στέλεχος στη διαδρομή 5 έδωσε θετικό αποτέλεσμα για τον ορότυπο **f**, ενώ τα στελέχη στις διαδρομές 4 και 7 ήταν αρνητικά για όλους τους ορότυπους.

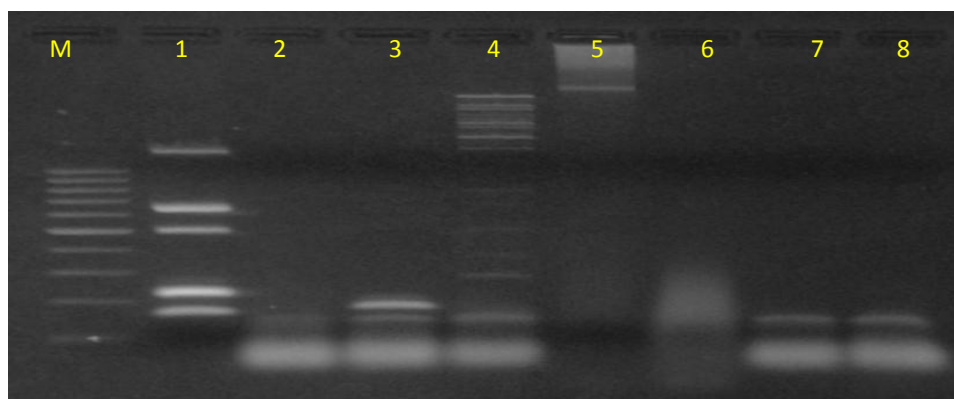


Εικόνα 3.5. Αποτελέσματα πολλαπλής PCR μετά την δοκιμή κλινικών δειγμάτων θετικά ως προς *H. influenzae* καθώς και στελεχών *H. influenzae*. M: Μάρτυρας μοριακού βάρους, 1: θετικός μάρτυρας, 2, 3, 6, 8, 9: κλινικά δείγματα, 4, 5, 7: κλινικά στελέχη, 10, 11: αρνητικοί μάρτυρες (απιονισμένο H₂O).

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

Στην Εικόνα 3.6, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα εφαρμογής στα πρότυπα στελέχη αιμοφίλου στη χαμηλή συγκέντρωση 1 pg/mL (διαδρομές 2 και 3, αντίστοιχα για τους

ορότυπους **a** και **d**). Ενώ για τον ορότυπο **d** η τεχνική έδωσε προϊόν, για τον ορότυπο **a** δεν παρατηρήθηκε προϊόν υπό αυτές τις συνθήκες. Στις διαδρομές 4 και 5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της εφαρμογής σε κλινικά δείγματα και στη διαδρομή 6 τα αποτελέσματα της εφαρμογής σε στέλεχος *H. influenzae*. Το κλινικό δείγμα που αντιστοιχεί στη διαδρομή 4 έχει πολλαπλά μη ειδικά προϊόντα, όπως τα δείγματα στις διαδρομές 2, 3, 6, 8, 9 της Εικόνας 3.5, ενώ το κλινικό δείγμα που αντιστοιχεί στη διαδρομή 5 δεν έδωσε κανένα προϊόν πιθανόν λόγω αναστολής (απεικόνιση θολής διαδρομής σε όλο το φάσμα του ηλεκτροφορητικού του προτύπου).



Εικόνα 3.6. Αποτελέσματα πολλαπλής PCR μετά τη δοκιμή σε στέλεχη αιμοφίλου οροτύπου **a** και **d** συγκέντρωσης 1 pg/μL και κλινικών δειγμάτων. M: Μάρτυρας μοριακού βάρους, 1: θετικός μάρτυρας, 2: στέλεχος αιμοφίλου οροτύπου **a** συγκέντρωσης 1 pg/μL 3: στέλεχος αιμοφίλου οροτύπου **d** συγκέντρωσης 1pg/μL, 4, 5: κλινικά δείγματα, 6: κλινικό στέλεχος, 7,8: αρνητικοί μάρτυρες (απιονισμένο H₂O).

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

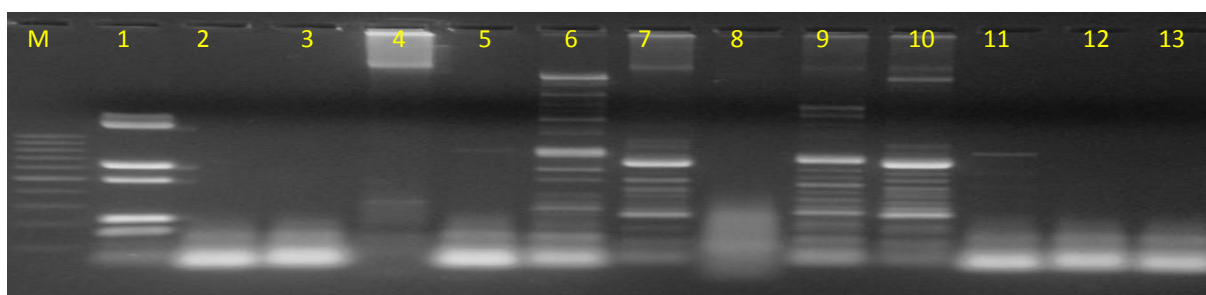
Από τα παραπάνω δεδομένα κρίθηκε αναγκαία η βελτιστοποίηση του προγράμματος και των συνθηκών της πενταπλής PCR προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή ευαισθησία και ειδικότητα.

Πειραματικό στάδιο 5: Βελτιστοποίηση συνθηκών προγράμματος

Η βελτιστοποίηση μιας πολλαπλής PCR προκειμένου να είναι απόλυτα ειδική ως προς τα προϊόντα στα οποία στοχεύει και μόνο και παράλληλα ιδιαίτερα ευαίσθητη ώστε να μπορεί να εντοπίζει και να δίνει προϊόντα από γενετικό υλικό πολύ χαμηλής συγκέντρωσης —όπως για παράδειγμα είναι το βακτηριακό γενετικό υλικό που εντοπίζεται

σε ένα κλινικό δείγμα ύστερα από λοίμωξη- αποτελεί μια ιδιαίτερα χρονοβόρα διαδικασία και δύσκολη. Στο στάδιο αυτό, πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές διαδοχικές αλλαγές στο πρόγραμμα και στις συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της πενταπλής τεχνικής, όπως αναφέρθηκαν αναλυτικά στην αντίστοιχη παράγραφο του κεφαλαίου 2.

Στις πιο σημαντικές από αυτές σημειώθηκε η αύξηση των συγκεντρώσεων κάποιων αντιδραστηρίων (αύξηση της πολυμεράσης, αύξηση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος αυτής). Οι συγκεκριμένες τροποποιήσεις είχαν σημαντική επιρροή στα κλινικά δείγματα (αύξησαν την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων), όπως φαίνεται και στις διαδρομές 4, 5, 6, 7, 9, 10 και 11 της Εικόνας 3.7, ενώ παράλληλα δεν επέφεραν τα επιθυμητά αποτελέσματα όσον αφορά την ευαισθησία της τεχνικής, όπως φαίνεται στις διαδρομές 2 και 3 της Εικόνας 3.7, όπου δεν εμφανίστηκαν τα προϊόντα που αντιστοιχούν στα πρότυπα στελέχη αιμοφίλου οροτύπων a και d σε συγκέντρωση 1 pg/μL.

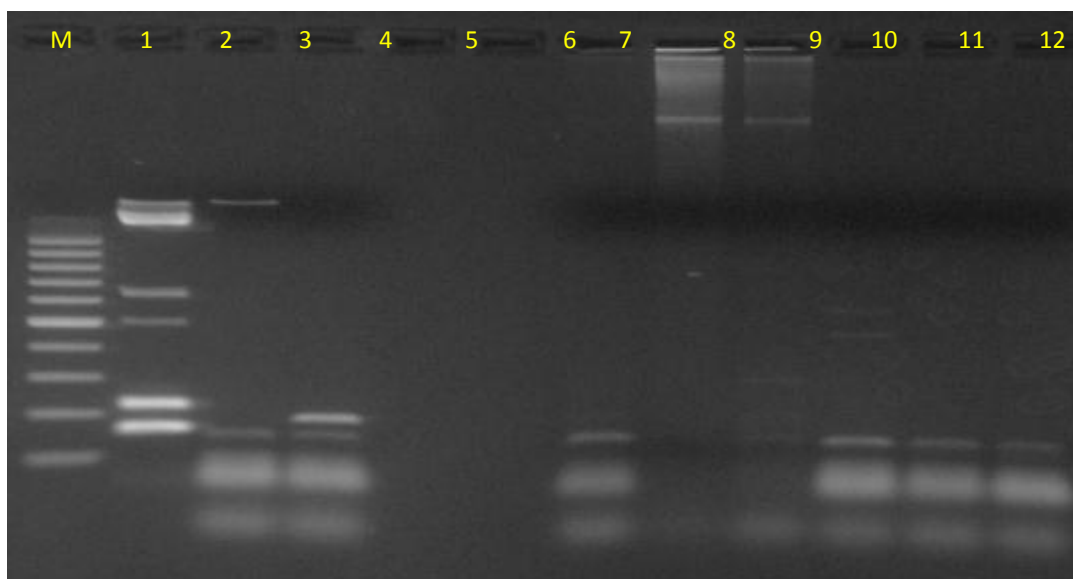


Εικόνα 3.7. Αποτελέσματα πενταπλής PCR μετά από την αύξηση της συγκέντρωσης της πολυμεράσης σε συγκέντρωση ρυθμιστικού διαλύματος 1,1x. M: Μάρτυρας μοριακού βάρους, 1: θετικός μάρτυρας, 2,3: στελέχη οροτύπων a και d σε συγκέντρωση 1 pg/μL, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11: κλινικά δείγματα, 8: στέλεχος αιμοφίλου, 12, 13: οι αρνητικοί μάρτυρες. M: Μάρτυρας μοριακού βάρους (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, Fermentas)

Στις τροποποιήσεις που ακολούθησαν έγιναν ακόμη κάποιες αλλαγές στις συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων (αύξηση της συγκέντρωσης των dNTPs, αύξηση της συγκέντρωσης των εκκινητών οροτύπου a) προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή ευαισθησία της τεχνικής. Παράλληλα όμως έγιναν δοκιμές προκειμένου να αυξηθεί η ειδικότητα της τεχνικής και να μειωθεί ως και να αποφευχθεί εντελώς η παραγωγή μη ειδικών προϊόντων. Οι δοκιμές αυτές περιελάμβαναν κυρίως τροποποιήσεις στο πρόγραμμα εφαρμογής της τεχνικής και μάλιστα χρειάστηκε να αναιρεθούν κάποιες από τις τροποποιήσεις που έγιναν σε προηγούμενα στάδια (μείωση χρόνου υβριδισμού, μείωση αριθμού κύκλων, μείωση του χρόνου επιμήκυνσης).

Ο συνδυασμός όλων αυτών των τροποποιήσεων οδήγησαν στη δημιουργία του προγράμματος και συνθηκών του Πίνακα 2.7. Τα αποτελέσματα εφαρμογής αυτού, ήταν

πολύ ικανοποιητικά σε επίπεδα ευαισθησίας και ειδικότητας, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.8. Στη διαδρομή 1, που αντιστοιχεί στο θετικό μάρτυρα, η PCR φαίνεται να έχει την ίδια απόδοση και για τους πέντε ορότυπους. Στις διαδρομές 2 και 3 παρουσιάζονται τα προϊόντα που εμφανίζονται με την εφαρμογή γενετικού υλικού από τα πρότυπα στελέχη αιμοφίλου οροτύπων **a** και **d** σε συγκέντρωση 1 pg/μL. Στις διαδρομές 6, 7, 8, 9 και 10 απεικονίζονται κλινικά δείγματα τα οποία δεν εμφανίζουν μη ειδικά προϊόντα.



Εικόνα 3.8 Αποτελέσματα πενταπλής PCR μετά από τη βελτιστοποίηση του προγράμματος (πίνακας 2.7). M: Μάρτυρας μοριακού βάρους, 1: θετικός μάρτυρας, 2,3: στελέχη οροτύπων **a** και **d** σε συγκέντρωση 5 pg/μL, 6, 7, 8, 9, 10: κλινικά δείγματα, 11: οι αρνητικός μάρτυρας.

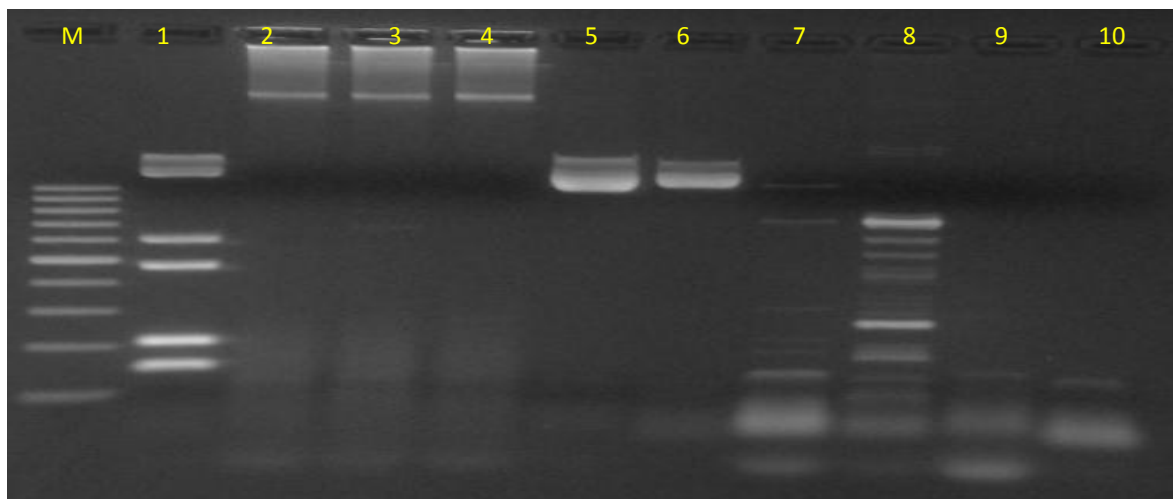
M: Μάρτυρας μοριακού βάρους (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, Fermentas)

Πειραματικό στάδιο 6: Εφαρμογή στην πενταπλή PCR των κλινικών δειγμάτων που είχαν «εμβολιαστεί» με βακτηριακό εναιώρημα αιμοφίλων οροτύπων **a**, **d** και **e**

Στα κλινικά δείγματα που αποτέλεσαν υλικό της τεχνικής μας, δεν περιλαμβάνονταν δείγματα θετικά ως προς την καλλιέργεια για τον *H. influenzae* (θετικά για *H. influenzae* μόνο με PCR) που να είχαν ταυτοποιηθεί και για τον ορότυπο με τις κλασικές τεχνικές. Τα συγκεκριμένα δείγματα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο της ειδικότητας και ευαισθησίας της τεχνικής. Για το λόγο αυτό, δημιουργήθηκαν τα κλινικά δείγματα αίματος στα οποία προστέθηκαν βακτηριακό εναιώρημα που θα δώσει γενετικό

υλικό γνωστής συγκέντρωσης για τους ορότυπους **a**, **d** και **e**, τα οποία δοκιμάστηκαν σε αυτό το στάδιο (Εικόνα 3.9).

Η διαδρομή 1 απεικονίζει τον θετικό μάρτυρα. Η διαδρομή 2 αντιστοιχεί σε κλινικό δείγμα αίματος αρνητικό για μικροοργανισμούς, το οποίο δεν είχε «εμβολιαστεί» με βακτηριακό εναιώρημα. Οι διαδρομές 3 και 4 αντιστοιχούν σε κλινικά δείγματα που είναι «εμβολιασμένα» με βακτηριακό εναιώρημα οροτύπου **a** σε συγκεντρώσεις 1 ng/μL και 0,001 ng/μL αντίστοιχα. Οι διαδρομές 5 και 6 αντιστοιχούν σε δείγματα γενετικού υλικού που απομονώθηκαν από το πρότυπο στέλεχος αιμοφίλου οροτύπου **a** σε συγκεντρώσεις 5 ng/μL και 5 pg/μL αντίστοιχα. Οι διαδρομές 7 και 8 αντιστοιχούν σε κλινικά δείγματα αρνητικά για *H. influenzae*. Τέλος, οι διαδρομές 9 και 10 αντιστοιχούν σε αρνητικούς μάρτυρες (απιονισμένο H₂O).

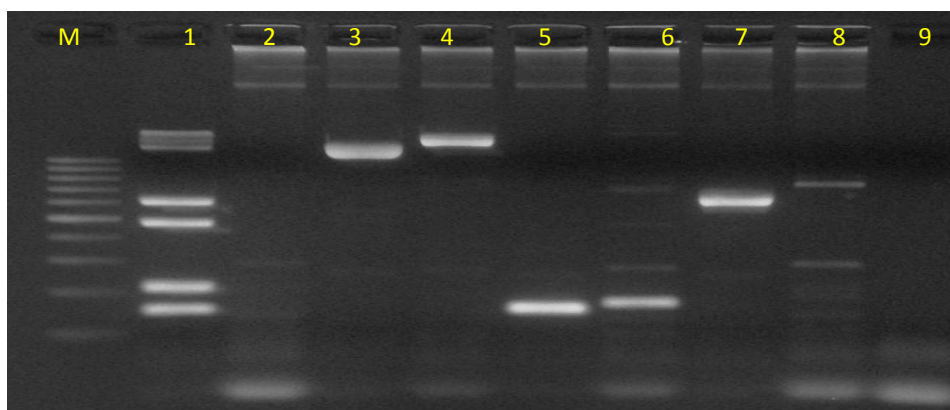


Εικόνα 3.9 Αποτελέσματα mPCR με δοκιμή σε κλινικά δείγματα αίματος που περιέχουν γνωστή ποσότητα βακτηριακού υλικού αιμοφίλου οροτύπου **a**. M: Μάρτυρας μοριακού βάρους (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, Fermentas)

Τα εμβολιασμένα δείγματα δεν εμφάνισαν τα προϊόντα του οροτύπου **a**. Τα δείγματα αυτά, όταν δοκιμάστηκαν στις mPCR που εφαρμόζονται στο Ε.Κ.Α.Μ. επιβεβαίωσαν την ύπαρξη DNA *H. influenzae* στο δείγμα. Από τον συνδυασμό των παραπάνω αποτελεσμάτων, παρατηρήθηκε η δημιουργία αναστολής στα δείγματα όταν εφαρμόστηκαν στην πενταπλή τεχνική για την ανίχνευση οροτύπων του *H. influenzae* που οφειλόταν πιθανόν στην ποσότητα του γενετικού υλικού που προστέθηκε στην αντίδραση.

Στις δοκιμές που ακολούθησαν, μειώθηκε σταδιακά ο όγκος του DNA – στόχου από 5 μL σε 3 μL και τελικά σε 1 μL ανά αντίδραση όγκου 25 μL. Οι δοκιμές

πραγματοποιήθηκαν με τα «εμβολιασμένα» δείγματα αίματος (spiked blood), καθώς και μερικά αρνητικά δείγματα. Με τη μείωση του όγκου του DNA – στόχου εμφανίστηκαν τα αναμενόμενα προϊόντα όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.10. Στις διαδρομές 3 και 4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τα «εμβολιασμένα» με βακτηριακό εναιώρημα αιμοφίλου οροτύπου **a** συγκέντρωσης 1 και 10 pg/μL δείγματα αίματος αντίστοιχα, ενώ στις διαδρομές 5, 6, 7 και 8 παρουσιάζονται τα αντίστοιχα αποτελέσματα για τα δείγματα οροτύπων **d** και **e**.



Εικόνα 3.10. Αποτελέσματα mPCR με δοκιμή σε κλινικά δείγματα αίματος που περιέχουν γνωστή ποσότητα βακτηριακού υλικού αιμοφίλου οροτύπων **a** (διαδρομές 3 και 4), **d** (διαδρομές 5 και 6) και **e** (διαδρομές 7 και 8) μετά την μείωση του όγκου του DNA – στόχου. 2: κλινικό δείγμα

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

Παράλληλα, έγιναν κάποιες ακόμα μικρές τροποποιήσεις προκειμένου να απαλειφθεί η παρουσία μη ειδικών προϊόντων που εμφανίζονταν σε κάποια κλινικά δείγματα. Για το λόγο αυτό, μειώθηκε η συγκέντρωση των εκκινητών για τον ορότυπο **a**, η συγκέντρωση των δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) και της πολυμεράσης ανά αντίδραση, ενώ η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος αυξήθηκε από 1,1x σε 1,3x.

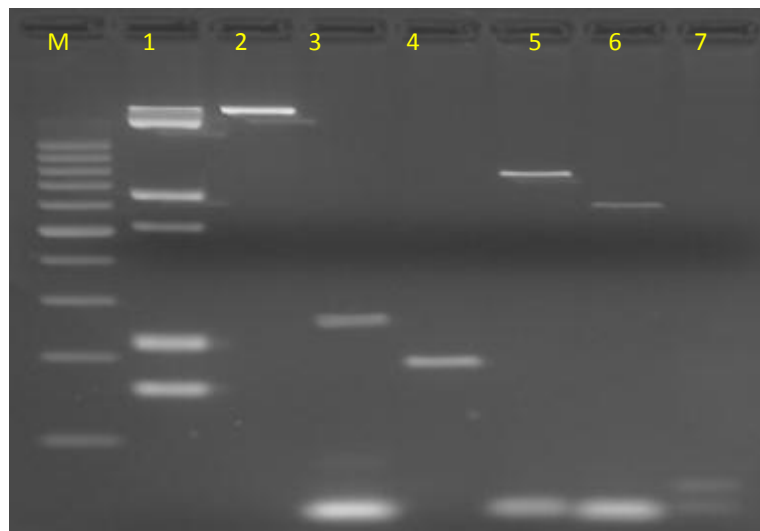
Τέλος, σημαντικές αλλαγές έγιναν στο πρόγραμμα εκτέλεσης της τεχνικής, με την προσθήκη επιπλέον σταδίων (επίπεδα θερμοκρασίας υβριδισμού): 62 °C θερμοκρασία υβριδισμού στους πρώτους 10 κύκλους, 60°C θερμοκρασία υβριδισμού στους επόμενους 10 κύκλους, 59 °C θερμοκρασία υβριδισμού για άλλους 10 κύκλους και 57 °C θερμοκρασία υβριδισμού για τους τελευταίους 5 κύκλους (Πίνακας 2.8).

Η προσθήκη δύο επιπλέον επιπέδων θερμοκρασίας αναμένονταν να αυξήσει την ειδικότητα της τεχνικής, επιτρέποντας την πιο ειδική σύνδεση των εκκινητικών μορίων ως

προς τα DNA-στόχους και μειώνοντας σημαντικά την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων από τα κλινικά δείγματα που δεν είχαν απαλειφθεί με τις μέχρι τώρα τροποποιήσεις. Τα αποτελέσματα εφαρμογής της τεχνικής σε κλινικό δείγμα αίματος αρνητικό παρουσιάζονται στη διαδρομή 2 της Εικόνας 3.10, όπου δεν παρατηρούνται πλέον μη ειδικά προϊόντα.

Πειραματικό στάδιο 7: Έλεγχος ευαισθησίας

Στην Εικόνα 3.11 απεικονίζονται τα αποτελέσματα εφαρμογής του τελικού προγράμματος της τεχνικής όπως διαμορφώθηκε, σε γενετικό υλικό συγκέντρωσης 1 pg/μL για κάθε πρότυπο στέλεχος (ορότυπος **a** στη διαδρομή 2, ορότυπος **c** στη διαδρομή 3, ορότυπος **d** στη διαδρομή 4, ορότυπος **e** στη διαδρομή 5 και ορότυπος **f** στη διαδρομή 6). Με τη δοκιμή γενετικού υλικού χαμηλής συγκέντρωσης για κάθε ορότυπο ελέγχθηκε και η ευαισθησία της αντίδρασης, η οποία ανέρχεται στο 1 pg/μL, εφόσον είχαμε παραγωγή θετικών ειδικών προϊόντων για όλους τους ορότυπους.



Εικόνα 3.11. Αποτελέσματα ελέγχου ευαισθησίας mPCR με δοκιμή των DNA των πρότυπων στελεχών του αιμοφίλου και των πέντε οροτύπων (a, c, d, e και f) σε συγκέντρωση 1pg/μL M: Μάρτυρας μοριακού βάρους (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder. Fermentas)

Πειραματικό στάδιο 8: Δοκιμή των κλινικών δειγμάτων και των στελεχών *H. influenzae* στο τελικό πρόγραμμα της πενταπλής PCR

Στο τελευταίο στάδιο δοκιμάστηκαν όλα τα κλινικά δείγματα και όλα τα στελέχη *H. influenzae* στην mPCR μετά τη σταθεροποίηση του προγράμματος του θερμοκυκλοποιητή.

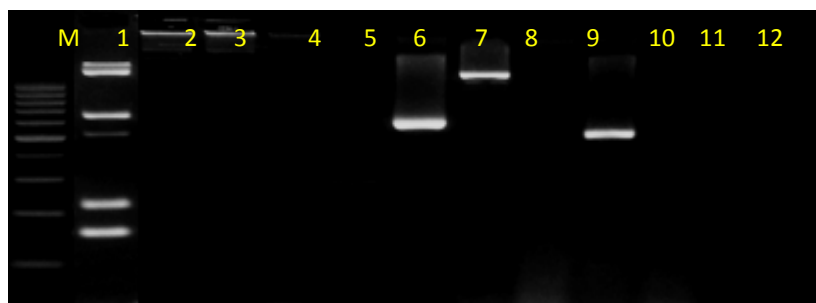
3.2.2 Στελέχη *Haemophilus influenzae*

Τα αποτελέσματα από τη δοκιμή των στελεχών του *H. influenzae* στην πενταπλή PCR παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2 Αποτελέσματα πενταπλής PCR με την δοκιμή των στελεχών του αιμοφίλου.

Πολλαπλή PCR	Στελέχη (από κλινικά δείγματα n=50)	Στελέχη ποιοτικού ελέγχου (n=11)
NT	47	8
a	0	1
c	0	-
d	0	-
e	1	1
f	2	1

Στην Εικόνα 3.12, στις διαδρομές 6, 7 και 9 απεικονίζονται τα αποτελέσματα από τα στελέχη ελέγχου ποιότητας (quality control, QA) οροτύπων **e**, **a** και **f** αντίστοιχα. Η διαδρομή 1 απεικονίζει τον θετικό μάρτυρα (control). Στις διαδρομές 11 και 12 παρουσιάζονται οι αρνητικοί μάρτυρες, ενώ στις διαδρομές 2, 3, 4, 5, 8 και 10 απεικονίζονται στελέχη αιμοφίλου που δεν εμφάνισαν κανένα προϊόν.



Εικόνα 3.12. Αποτελέσματα της mPCR στη δοκιμή των στελεχών ελέγχου ποιότητας (quality control, QA). M: Μάρτυρας μοριακού βάρους (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder. Fermentas)

3.2.3 Κλινικά δείγματα *Haemophilus influenzae*

Τα αποτελέσματα εφαρμογής των κλινικών δειγμάτων στην πενταπλή τεχνική συνοψίζονται στον Πίνακα 3.3.

Πίνακας 3.3 Αποτελέσματα πενταπλής PCR μετά τη δοκιμή κλινικών δειγμάτων.

Κλινικά δείγματα		PCR-1 (<i>H.influenzae</i> θετικά)	PCR-2 (Θετικά ως προς τον ορότυπο)
α)	αίμα (n=6)	6/6	0/6
	ENY (n=8)	8/8	0/8
	ωτικά υγρά (n=27)	27/27	0/27
	BAL (n=22)	22/22	0/22
β)	αίμα (n=11)	11/11	0/11
	ENY (n=7)	7/7	0/7
	πλευριτικό υγρό (n=1)	1/1	0/1

PCR-1: Αναφέρεται στην PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των *H.influenzae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus spp.* που εφαρμόζεται στο EKAM

PCR-2: Αναφέρεται στην PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των 5 οροτύπων του *H. influenzae*

Όλα τα κλινικά δείγματα που εφαρμόστηκαν στην πενταπλή PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των 5 οροτύπων του *Haemophilus influenzae* ήταν αρνητικά ως προς τους ορότυπους είτε ήταν θετικά στην PCR για *Haemophilus influenzae* (κατηγορία α) είτε ήταν αρνητικά (κατηγορία β).

Τα αρνητικά δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της ειδικότητας της τεχνικής (όπως περιγράφηκε στα στάδια ανάπτυξής της). Το γεγονός ότι κανένα από τα *Haemophilus influenzae* θετικά δείγματα δεν ήταν θετικό για κάποιον ορότυπο, σημαίνει ότι τα συγκεκριμένα στελέχη που προκάλεσαν τις λοιμώξεις ήταν μη τυποποιήσιμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο μικροοργανισμός *H. influenzae* αποτελεί έναν από τους βασικούς αποικιστές του ρινοφάρυγγα και ταυτόχρονα ένα από τα κύρια παθογόνα-αίτια της βακτηριακής μηνιγγίτιδας. Πολύ συχνά ενοχοποιείται και για άλλες λοιμώξεις όπως, πνευμονία, βακτηριακιά/σηψαιμία, επιγλωττίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα, κυτταρίτιδα, μέση ωτίτιδα, πυώδης περικαρδίτιδα και άλλες λιγότερο συχνές, όπως ενδοκαρδίτιδα και οστεομυελίτιδα (CDC, 2008). Διακρίνονται έξι διαφορετικοί ορότυποι του μικροοργανισμού (**a**, **b**, **c**, **d**, **e**, **f**) στα στελέχη με κάψα, ενώ υπάρχουν και μη τυποποιήσιμα στελέχη του μικροοργανισμού χωρίς κάψα (NTHi).

Από τα μέσα της δεκαετίας του 1990, η εισαγωγή του συζευγμένου εμβολίου για τον αιμόφιλο τύπου **b** (Hib) που ήταν υπεύθυνος για το μεγαλύτερο ποσοστό πρόκλησης μοιραίων λοιμώξεων σε διάφορες χώρες (Ulanova *et al*, 2009), οδήγησε σε μείωση της ρινοφαρυγγικής φορείας και σε επακόλουθη πρόκληση συλλογικής ανοσίας. Όμως, η μείωση αφορά μόνο στα στελέχη Hib και όχι στα άλλου τύπου στελέχη *H. influenzae*, τυποποιήσιμα και μη τυποποιήσιμα (Zhang *et al*, 2004).

Ταυτόχρονα, οι λοιμώξεις από στελέχη που δεν είναι τύπου **b** φαίνεται να αυξάνονται τελευταία στην Ευρώπη και στην Αμερική. Σχετικές δημοσιεύσεις, αναφέρουν περιστατικά στην Ιταλία-μηνιγγίτιδα από *H. influenzae* type **e** (Cerquetti *et al*, 2003)- και στην Δανία -13 περιπτώσεις μηνιγγίτιδας από *H. influenzae* type **f** (Bruun *et al*, 2004), ενώ στον Καναδά, κατά το χρονικό διάστημα 2000-2005, παρατηρήθηκε ότι το 69% των διεισδυτικών λοιμώξεων από *H. influenzae* οφειλόταν σε στελέχη που δεν ήταν ορότυπου **b** (non **b**), με τον ορότυπο **a** να αποτελεί το συνηθέστερο ορότυπο υπεύθυνο για τις μισές σχεδόν περιπτώσεις (Bruce *et al*, 2008).

Στην Ελλάδα, το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας (Ε.Κ.Α.Μ) διαθέτει επιδημιολογικά στοιχεία από τη συστηματική καταγραφή των περιστατικών μηνιγγίτιδας και σηψαιμίας που οφείλονται σε στελέχη *H. influenzae* εκτός από τον ορότυπο **b**, από το 2006. Αν και οι αριθμοί των περιστατικών είναι μικροί, εντούτοις παρατηρείται αύξηση του αριθμού των περιστατικών μηνιγγίτιδας/σηψαιμίας που οφείλονται σε *H. influenzae* non **b**. Ιδιαίτερα, κατά το έτος 2009 όπου καταγράφηκαν για πρώτη χρονιά κρούσματα μηνιγγίτιδας/σηψαιμίας που οφείλονται σε *H.*

influenzae που **b**, υπερτερούν αριθμητικά των κρουσμάτων που οφείλονται σε στελέχη Hib. Αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στην ενδεχόμενη αλλαγή οροτύπων που προκαλούν διεισδυτικές λοιμώξεις (capsule switching). Παράλληλα, παρατηρήθηκε αυξομείωση των κρουσμάτων διεισδυτικής νόσου που οφείλονται σε στελέχη *H. influenzae* τύπου **b** με τα περισσότερα κρούσματα να καταγράφονται κατά το έτος 2004 (8 κρούσματα) και τα λιγότερα (1 κρούσμα) τα έτη 1997 και 2008.

Από τα παραπάνω δεδομένα τόσο σε Εθνικό όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο κρίθηκε αναγκαίος ο χαρακτηρισμός των οροτύπων του μικροοργανισμού (οροτυποποίηση), προκειμένου να γίνεται η πληρέστερη επιτήρηση της εξέλιξης της επιδημιολογίας του μικροοργανισμού *H. influenzae*.

Συμβατικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται ως σήμερα για την οροτυποποίηση, όπως η μέθοδος της οροσυγκόλλησης (slide agglutination) παρότι είναι απλή και ταχεία, δεν είναι αξιόπιστη εξαιτίας τόσο της χαμηλής ευαισθησίας και ειδικότητας της, όσο της υποκειμενικότητας στην ανάγνωση των αποτελεσμάτων. Συχνά δε, μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η παραγωγή διασταυρούμενων αντιδράσεων, ενώ το αποτέλεσμα επηρεάζεται από τεχνικές πρακτικές ή ακόμα και την ποιότητα του αντιορού. Συνεπώς, η ορολογική τυποποίηση στελεχών με οροσυγκόλληση δε συστήνεται πλέον (Maaroufi *et al*, 2007).

Αντίθετα, η εφαρμογή μεθόδων της Μοριακής Βιολογίας (όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, PCR) με την ενίσχυση των γονιδίων που εμπλέκονται στην έκφραση της κάψας έχει ανοίξει νέες οδούς στην ταχεία, ειδική και υψηλής ευαισθησίας ανίχνευση του *H. influenzae* ξεπερνώντας τα παραπάνω προβλήματα και προσφέροντας αντικειμενική ερμηνεία αποτελεσμάτων (Maaroufi *et al*, 2007).

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη μιας αξιόπιστης, ευαίσθητης, ειδικής, ταχείας και χαμηλού κόστους τεχνικής πολλαπλής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (multiplex PCR) για την ταυτόχρονη ανίχνευση των πέντε οροτύπων του αιμοφίλου (**a**, **c**, **d**, **e**, **f**) σε μία και μόνο αντίδραση, καθώς και η εφαρμογή αυτής της τεχνικής απευθείας σε κλινικά δείγματα ασθενών. Παρόμοιες τεχνικές είχαν αναπτυχθεί και στο παρελθόν, αναφέρονται όμως σε μεμονωμένες τεχνικές PCR ανίχνευσης οροτύπων του *H. influenzae*, ενώ δεν είχαν εφαρμογή απευθείας σε κλινικά δείγματα (Fallal *et al*, 1994, La Claire *et al*, 2003, Maaroufi *et al*, 2007, Ishiwada *et al*, 2004, Lam *et al*, 2011). Η πολλαπλή PCR, η ανάπτυξη της οποίας αποτέλεσε αντικείμενο της παρούσας εργασίας, στοχεύει στην απευθείας

εφαρμογή στα κλινικά δείγματα με σκοπό την ανίχνευση κρουσμάτων όταν η καλλιέργεια είναι αρνητική λόγω χαμηλού μικροβιακού φορτίου ή της χορήγησης αντιβιοτικών πριν από την λήψη του δείγματος.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάπτυξη της τεχνικής στοχεύουν στην περιοχή II του γονιδιακού τόπου *cap*, η οποία περιλαμβάνει γονίδια απαραίτητα για τη σύνθεση της πολυσακχαριδικής κάψας διαφορετικά για κάθε ορότυπο. Οι αλληλουχίες των εκκινητών επιλέχθηκαν από προηγούμενες δημοσιευμένες εργασίες, όπως παρουσιάζονται στον αντίστοιχο πίνακα του κεφαλαίου 2, σύμφωνα με τα κριτήρια για το συνδυασμό τους σε πρωτόκολλο πολλαπλής PCR (αλληλουχία, θερμοκρασία υβριδισμού, μέγεθος παραγόμενου προϊόντος, ώστε να είναι δυνατός ο διαχωρισμός με ηλεκτροφόρηση). Δεν υπήρξε η δυνατότητα σχεδιασμού νέων εκκινητών διότι δεν έχει αλληλουχηθεί πλήρως η περιοχή II του γονιδιακού τόπου *cap* για κάθε ορότυπο και δεν έχουν καταχωρηθεί οι αλληλουχίες αρκετών στελεχών αιμοφίλου όλων των οροτύπων στην παγκόσμια γονιδιακή τράπεζα (GenBank), από όπου θα μπορούσαν να αντληθούν σχετικές πληροφορίες.

Η ανάπτυξη της πολλαπλής τεχνικής αποδείχθηκε μια χρονοβόρα διαδικασία με πολλά στάδια εξέλιξης και δοκιμών, προκειμένου να οδηγήσει στη δημιουργία μιας ειδικής για την ανίχνευση των 5 οροτύπων του *H. influenzae* τεχνικής και ταυτόχρονα ευαίσθητης, σε επίπεδα ανίχνευσης γενετικού υλικού χαμηλής συγκέντρωσης στα κλινικά δείγματα.

Όσον αφορά στα βακτηριακά στελέχη, τα αποτελέσματα των δύο τεχνικών με τις οποίες εξετάστηκαν παρατίθενται στους Πίνακες 3.1 και 3.2. Εκ του αποτελέσματος και των δύο τεχνικών φαίνεται να υπάρχει συμφωνία στο χαρακτηρισμό για τον ορότυπο ανάμεσα στις δύο τεχνικές. Όμως, κατά την εκτέλεση της αναλυτικής διαδικασίας, η τεχνική της οροσυγκόλλησης αποδείχθηκε χρονοβόρα, (χρειάζεται 24ωρο καλλιέργημα) καθώς επίσης χρειάστηκαν πολλαπλές επαναλήψεις ώστε να επιβεβαιωθεί η εγκυρότητα του αποτελέσματος. Σε αντίθεση, η τεχνική της PCR δεν χρειάστηκε περισσότερες από μία εφαρμογές κάθε στελέχους προκειμένου να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα.

Η **ειδικότητα** της τεχνικής που αναπτύχθηκε ελέγχθηκε αρχικά μεταξύ των προτύπων στελεχών, όπου δεν προέκυψαν διασταυρούμενες αντιδράσεις. Στη συνέχεια, η τεχνική δοκιμάστηκε σε κλινικά δείγματα (αίμα και ENY), τα οποία ήταν αρνητικά ως προς τον *H. influenzae*. Τα κλινικά δείγματα, περιέχουν μεγάλες

ποσότητες ανθρώπινου γενετικού υλικού το οποίο μπορεί να δώσει μη ειδικά προϊόντα σε συνδυασμό με τα πολλαπλά ζεύγη εκκινητών σε μια αντίδραση πολλαπλής PCR. Για το λόγο αυτό, μεγάλο μέρος των τροποποιήσεων κατά την ανάπτυξη της τεχνικής έγινε με σκοπό τον περιορισμό των μη ειδικών προϊόντων από λάθος υβριδισμό των εκκινητών και τη βελτιστοποίηση των συνθηκών ως προς αυτή την κατεύθυνση. Σε αυτό βοήθησε και η δημιουργία προγράμματος με διάφορα επίπεδα θερμοκρασιών υβριδισμού, το οποίο βασίστηκε στην αρχή λειτουργίας της touch-down PCR (Korbie and Mattick, 2008). Για το λόγο αυτό εφαρμόστηκε υψηλή θερμοκρασία υβριδισμού στους πρώτους κύκλους της αντίδρασης με σκοπό να εξασφαλίζεται ο εξειδικευμένος υβριδισμός των εκκινητικών μορίων αποκλειστικά και μόνο στα γονίδια-στόχους (αύξηση ειδικότητας) και χαμηλότερη θερμοκρασία υβριδισμού στα επόμενα στάδια, η οποία εξασφαλίζει την παραγωγή προϊόντων σε υψηλή απόδοση (αύξηση ευαισθησίας). Τέλος, η ειδικότητα της τεχνικής ελέγχθηκε δοκιμάζοντας τα στελέχη ελέγχου ποιότητας (quality control), τα οποία είναι στελέχη αιμοφίλου όλων των οροτύπων και μη τυποποιήσιμα στελέχη, που εστάλησαν στο Ε.Κ.Α.Μ ως άγνωστα δείγματα στα πλαίσια διενέργειας ποιοτικού ελέγχου. Τα αποτελέσματα της πενταπλής PCR που αναπτύχθηκε συμφωνούσαν απόλυτα με τα αποτελέσματα των υπόλοιπων εργαστηρίων, γεγονός που επιβεβαιώνει την ειδικότητα της τεχνικής που αναπτύχθηκε ως προς τους αντίστοιχους ορότυπους.

Η **ευαισθησία** της τεχνικής ελέγχθηκε δοκιμάζοντας DNA από τα 5 πρότυπα στελέχη του αιμοφίλου σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (1 pg/μL), κλινικά δείγματα τα οποία ήταν θετικά ως προς τον αιμόφιλο καθώς και κλινικά δείγματα αίματος «εμβολιασμένα» με μετρημένη ποσότητα βακτηριακού εναιωρήματος (1 ng/μL, 1 pg/μL). Τα κλινικά δείγματα, θετικά στην αντίδραση PCR για το *H. influenzae* που αποτέλεσαν υλικό της μελέτης, δεν περιλάμβαναν θετικά και ως προς την καλλιέργεια δείγματα, ώστε να υπάρχει διασταύρωση των αποτελεσμάτων ως προς τον ορότυπο από το απομονωμένο στέλεχος. Έτσι, στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια προσομοίωσης αρνητικών δειγμάτων αίματος, με δείγματα που προέρχονται από ασθενείς με λοιμώξεις, «εμβολιάζοντας» τα αρνητικά δείγματα με συγκεκριμένη ποσότητα βακτηριακού εναιωρήματος που θα δώσει γνωστή ποσότητα γενετικού υλικού χαμηλής συγκέντρωσης. Τα «εμβολιασμένα» δείγματα διαχειρίστηκαν όπως κάθε διαγνωστικό δείγμα, έτσι ώστε μετά από τη διαδικασία της απομόνωσης του γενετικού υλικού να περιέχουν, εκτός από το ανθρώπινο γενωμικό

υλικό, γενετικό υλικό αιμοφίλου σε συγκεντρώσεις 1 ng/μL και 1 pg/μL. Το γεγονός, ότι η PCR ανίχνευσε το γενετικό υλικό του μικροοργανισμού σε αυτές τις χαμηλές συγκεντρώσεις, ενισχύει σημαντικά τα επίπεδα ανίχνευσης της τεχνικής.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα, η πενταπλή τεχνική που αναπτύχθηκε για την ταυτόχρονη ανίχνευση των πέντε οροτύπων (a, c, d, e, f) του *H. influenzae* αποτελεί μια ειδική και ευαίσθητη μεθοδολογία, ικανή να εφαρμοστεί απευθείας σε κλινικά δείγματα χαμηλής συγκέντρωσης βακτηριακού γενετικού υλικού. Η αδυναμία σχεδιασμού εκκινητικών μορίων και η έλλειψη κλινικών δειγμάτων θετικών για τον *H. influenzae*, θα μπορούσαν να αποτελούν μειονεκτήματα για τον έλεγχο της ειδικότητας και ευαισθησίας της νέας τεχνικής, τα οποία όμως έγινε προσπάθεια να ξεπεραστούν με τη χρήση των «εμβολιασμένων» δειγμάτων. Σύμφωνα με τα δεδομένα πολλών δημοσιευμένων εργασιών, τα περισσότερα δείγματα ωτικών υγρών και βρογχοκυψελιδικών εκπλυμάτων είναι θετικά για τον μη τυποποιήσιμο *H. influenzae* (NT *H. influenzae*), (Berrens *et al*, 2007- Schutter *et al*, 2010), γεγονός που παρατηρήθηκε και στα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης (Πίνακας 3.3). Η ορθότητα των μέχρι τώρα αποτελεσμάτων ενισχύεται σημαντικά μέσω της αξιολόγησης των άγνωστων δειγμάτων και της σύγκρισης με τα αποτελέσματα άλλων εργαστηρίων που ασχολούνται με την οροτυποποίηση του μικροοργανισμού, από τη διενέργεια των ετήσιων ποιοτικών ελέγχων, όπου η συγκεκριμένη τεχνική απέδειξε ειδικότητα και ευαισθησία 100%.

Η εφαρμογή της παρούσας τεχνικής έχει καθιερωθεί στην καθημερινή ρουτίνα για την οροτυποποίηση δειγμάτων θετικών για *H. influenzae*. Η δυνατότητα εφαρμογής της παρούσας τεχνικής απευθείας σε βιολογικά υλικά ασθενών αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο ανίχνευσης και περαιτέρω τυποποίησης του *H. influenzae*, ακόμα και σε δείγματα από όπου δεν κατέστη δυνατή η απομόνωση στελέχους. Επιπλέον, ενισχύει την πληρέστερη καταγραφή και την παρακολούθηση των κρουσμάτων μηνιγγίτιδας και άλλων λοιμώξεων από *H. influenzae* που δεν είναι type b, ιδιαίτερα στη μετα-εμβολίου εποχή.

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

A) Ανάπτυξη ευαίσθητης πολλαπλής αντίδρασης PCR (κατώτατο όριο συγκέντρωσης γενετικού υλικού του μικροοργανισμού που ανιχνεύεται 1 pg/ μ L)

B) Ανάπτυξη ειδικής πολλαπλής αντίδρασης PCR (ειδικότητα 100%)

Γ) Απευθείας εφαρμογή της πολλαπλής αντίδρασης PCR σε κλινικά δείγματα ασθενών με χαμηλή συγκέντρωση βακτηριακού γενετικού υλικού

Δ) Η ορθότητα των αποτελεσμάτων εξασφαλίστηκε:

- με την αξιολόγηση των άγνωστων δειγμάτων
- με τη σύγκριση αποτελεσμάτων άλλων εργαστηρίων
- με βιβλιογραφικές αναφορές

Ε) Τα περισσότερα δείγματα ωτικών υγρών και βρογχοκυψελιδικών εκπλυμάτων ήταν θετικά για τον μη τυποποιήσιμο *H. influenzae*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ajello G. W., Bolan G. A., Hayes P. S., Lehmann D., Montgomery J., Feeley J. C., Perlino C. A., Broome C. V., 1987, **Commercial latex agglutination tests for detection of *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae* antigens in patients with bacteremic pneumonia**, J. Clin. Microbiol. Vol(25): 1388-1391
2. Al. Hogail, Sahar Ahmed, (2004), **Profiling of *Haemophilus influenzae* isolates in King Saud University hospitals over few months period**, Doctoral Thesis (PhD), Department of Clinical Laboratory Sciences, King Saud University
3. Barbour L. Marina, Phil D., 1996, **Conjugate Vaccines and the Carriage of *Haemophilus influenzae* Type b**, Emerging Infectious Diseases Vol (2):176-182
4. Barbroza-Cesnik C., Farjo R. S., Patel M., Gilsdorf J., McCoy S. I., Pettigrew M.M., Marrs C. and Foxman B, (2006), **Predictors for *Haemophilus influenzae* Colonization, Antibiotic Resistance and for Sharing an Identical Isolate Among Children Attending 16 Licensed Day-Care Centers in Michigan**, The Pediatric Infectious Disease Journal. Vol (25): 219-223
5. Berenson C. S., Murphy T. F., Wrona C. T. and Sethi S., (2005), **Outer membrane Protein P6 of Nontypeable *Haemophilus influenzae* Is A Potent and Selective Inducer of Human Macrophage Proinflammatory Cytokines**, Infection and Immunity. Vol (73): 2728-2735
6. Berrens Z., Carl F. Marrs, Melinda M. Pettigrew, Sara A. Sandstedt, Mayuri Patel, Janet R. Gisdorf, (2007), **Genetic diversity of Paired Middle-Ear and Pharyngeal Nontypeable *Haemophilus influenzae* Isolates from Children with Acute Otitis Media**, Journal of Clinical Microbiology. Vol (45): 3764-3767
7. Booy R. and Kroll J. S., (1997), **Is *Haemophilus influenzae* finished?**, Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Vol(40): 149-153
8. Bruce M. G., Deeks S. L., Zulz T., (2008), **Epidemiology of *Haemophilus influenzae* Serotype a, north American Arctic, 2000-2005**, Emerging Infectious Diseases. Vol (14):48-55

9. Bruun B., Gahrn-Hansen b., Westh H. And Kilian M., (2004), **Clonal relationship of recent invasive *Haemophilus influenzae* serotype f isolates from Denmark and the United States**, Journal of Medical Microbiology. Vol (53) :1161-1165
10. Campos J., (2000), ***Haemophilus influenzae*: from the post-vaccination era to antibiotic resistance**, Clinical Microbiology and Infection. Vol (7): 287-290
11. Campos J., Roman Federico, Maria-Perez Vazquez, Jesus Oteo, Belen Aracil, Emilia Cercenado and Spanish Study Group for *Haemophilus influenzae* Type E, (2003), **Infections Due to *Haemophilus influenzae* Serotype E: Microbiological, Clinical and Epidemiological Features**, Clin Infect Dis. Vol (37): 841-845
12. Cerquetti M., Ciofi degli Atti m. L., Cardines R., Salmaso S., Renna G., Mastrantonio P. and the Hi Study Group, (2003), **Invasive Type e *Haemophilus influenzae* Disease in Italy**, Emerging Infectious Diseases. Vol (9):258-261
13. Cherian T., Lalitha MK., Manoharan A., Thomas K., Yolken RH., Steinhoff MC., 1998, **PCR-enzyme immunoassay for detection of *S. pneumoniae* DNA in cerebrospinal fluid samples from patients with culture-negative meningitis**, J Clin Microbiol. Vol (36): 3605-3608.
14. Dabernat H., Plisson-Saune M., Delmas C, (2003), ***Haemophilus influenzae* carriage in Children Attending French Day Care Centers: a Molecular Epidemiological Study**, Journal of Clinical Microbiology. Vol (41): 664-1672
15. Dominic F. Kelly, E. Richard Moxon, Andrew J. Pollard, (2004), ***Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines**, Immunology. Vol (2): 163-174
16. Edwards MC and RA Gibbs, (1994), **Multiplex PCR: advantages, development and applications**, Genome Research. Vol (3): 65-75
17. Elnifro EM., Ashshi AM., Cooper RJ., Klapper PE., (2000), **Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology**, Clin Microbiol Rev. Vol (13):559-570
18. Falla T.J, Crook D.W.M, L.N Brophy, D.Maskell, J.S Croll and E.R Moxon, (1994), **PCR for Capsular Typing of *Haemophilus influenzae***, Journal of Clinical Microbiology. Vol (32): 2382-2386

19. Farjo R. S., Foxman B., Patel M. J., (2004), **Diversity and Sharing of *Haemophilus influenzae* strains colonizing healthy children attending day-care centers**, Journal of Pediatric Infectious Diseases. Vol (23):41-6
20. Follens A., Maria Veiga-Da-Cunha, Rita Merckx, Emile Van Schaftingen, Johan Van Eldere, (1999), **acs 1 *Haemophilus influenzae* Type a Capsulation Locus Region II Encodes a Bifunctional Ribulose 5-Phosphate Reductase-CDP-Ribitol Pyrophosphorylase**, Journal of Bacteriology. Vol (181): 2001-2007
21. Gilsdorf J. R., Marrs C. F. and Foxman B, (2004), ***Haemophilus influenzae*: Genetic Variability and Natural Selection To Identify Virulence Factors**, Infection and immunity. (Vol) 72: 2457-2461
22. Gilsdorf J., (1998), **Antigenic Diversity and Gene Polymorphisms in *Haemophilus influenzae***, Infection immunity. Vol (11): 5053-5059
23. Geme J. W. St., III, (2000), **The pathogenesis of nontypeable *Haemophilus influenzae* otitis media**, Vaccine. Vol (19): 41-S50
24. Geme J. W. St, III, (2002), **Molecular and cellular determinants of non-typeable *Haemophilus influenzae* adherence and invasion**, Cellular Microbiology. Vol (4):191-200
25. Hall-Stoodley L., Stoodley Paul, 2009, **Evolving concepts in biofilm infections**, Cellular Microbiology Vol (11): 1034-1043
26. Hashida K., Shiomori T., Hohchi N., Muratani T., Mori T., Udaka T. and Suzuki H., (2008), **Nasopharyngeal *Haemophilus influenzae* Carriage in Japanese Children Attending Day-Care Centers**, Jouranal of Clinical Microbiology. Vol (46): 876-881
27. Heath P. T., and McVernon, (2002), **The Uk Hib vaccine experience**, Arch Dis Child. Vol (86):396-399
28. Henegariu O., N.A Heerema, S.R Dlouhy, G.H Vance, P.H Vogt, (1997), **Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol**, Biotechniques. Vol (23): 504-511

29. Ishiwada N., Cao L. D., Kohno Y., (2004), **PCR-based capsular serotype determination of *Haemophilus influenzae* strains recovered from Japanese paediatric patients with invasive infection**, Clinical Microbiology and Infection. Vol (10): 895-898
30. Iris de S., Elke de Wachter, Francoise Crokaert, Jan Verhaegen, Oriane Soetens, Dennis Pierard, Anne Malfroot, (2010), **Microbiology Of Bronchoalveolar Lavage Fluid in Children With Acute Nonresponding or Recurrent Community-Acquired Pneumonia: Indetification of Nontypeable *Haemophilus influenzae* as a Major Pathogen**, Clinical Infectious Diseases. Vol(52): 1437-1444
31. Jin Z., Sandra Romero-Steiner, George M. Carlone, John B. Robbins, Rachel Shneerson, (2007), ***Haemophilus influenzae* type a infection and its prevention**, Infection immunity. Vol (75): 2650-2654
32. Jordens J. Z., Slack M., (1995), ***Haemophilus influenzae*: Then and Now**, Journal of Clin Microbiol Infect Dis. Vol (14): 935-948
33. King P. T., Ngui J, Gunawardena D., Holmes P W, Farmer M. W., Holdsworth S. R., (2008), **Systemic humoral immunity to non-typeable *Haemophilus influenzae***, Clinical Exp Immunology. Vol (3): 376-384
34. Kilian M., (2007), ***Haemophilus In: Manual of Clinical Microbiology***, Eds:Murray P. R., Baron E. J., Jorgesen J. H., Pfaller M. A., Tenover F. C., Tenover K. C., 9th edition. ASM Press, Washington D. C., p.636-648.
35. Ladhani S., Ramsay M. E., Chandra M. and Slack M. P. for EU-IBIS, (2008), **No evidence for *Haemophilus influenzae* serotype replacement in Europe after introduction of the Hib conjugate vaccine**, Lancet Infectious Diseases. Vol (8): 275-276
36. Korbie DJ and Mattick JS, (2008), **Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification**, Nature Protocols. Vol(3):1452-1456
37. Lam T., Johannes Elias, Matthias Frosch, Ulrich Vogel and Heike Claus, (2011), **New Diagnostic PCR for *Haemophilus influenzae* serotype e based on the cap locus of strain ATCC8142**, International Journal of Medical Microbiology Vol (2): 176-179
38. Lam T., Heike Claus, Matthias Frosch, Ulrich Vogel, (2010), **Sequence analysis of serotype-specific synthesis regions II of *Haemophilus influenzae* serotypes c and d:**

evidence for common ancestry of capsule synthesis in *Pasteurellaceae* and *Neisseria meningitidis*, Research in Microbiology. Vol (162): 483-487

39. Lancellotti M., De Pace F., Stehling E. G., Villares M. C. B., Brocchi M. and De Silveira W. D., (2008), **Ribotyping, Biotyping and Capsular Typing of *Haemophilus influenzae* Strains Isolated from Patients in Campinas, Southeast Brazil**, Brazilian Journal of infectious diseases. Vol (12):430-437
40. Leslye LaClaire L., Maria Lucia, C. Tondella, David S. Beall, Corie Noble, Pratima L. Raghunathan, Nancy E. Rosenstein, and the Active Bacterial Core Surveillance Team Members, (2003), **Identification of *Haemophilus influenzae* by Standard Slide agglutination Serotyping and PCR-Based Capsule Typing**, Clinical Microbiology Vol. (41): 393-396
41. Luong D. C., Ishiwada N., Takeda n. and Kohno Y, (2004), **Serotypes of *Haemophilus influenzae* Strains Isolated from Pediatric Patients with Respiratory Tract Infections**, Journal of Experimental Medicine. Vol (202): 245-254
42. MacNeil JR., Cohn AC., Farley M., Mair R., Baumbach J., Benneti N., Gershman K., Harrison LH., Lynfield R., Petit S., Reingold A., Schaffner W., Thomas A., Coronado F., Zell ER., Mayer LW., Clark TA., Messonnier NE., (2011), **Current Epidemiology and trends in invasive *Haemophilus influenzae* disease –United States 1989-2008**, Clinical Infectious Diseases. Vol (12): 1230-1236
43. Maaroufi Y., Jean-Marc De Bruyne, Corine Heymans and Francoise Crokaert, (2007), **Real-Time PCR for Determining Capsular Serotypes of *Haemophilus influenzae***, Journal of Clinical Microbiology. Vol (45): 2305-2308
44. Marrs Carl F., Graham P. Krasan, Kirk W. McCrea, Daniel L. Clemans, and Janet R. Gilsdorf, (2001), ***Haemophilus influenzae*-Human specific bacteria**, Frontiers Bioscience. Vol (6): 41-60
45. McGuinn, Marcella MD Kanaparthi, Kalyana MD, (2008), ***Haemophilus influenzae* Serotype f Septic Arthritis, Meningitis and Bacteremia, in a Healthy Adult: An Emerging Pathogen**, Infectious Diseases in Clinical Practice. Vol (16): 264-265

46. Murphy T., Howard Faden, Lauren O. Bakaletz, Jennelle M. Kyd, Arne Forsgren, Jose Campos, Muntaz Virji, Stephen I. Pelton, (2009), **Nontypeable *Haemophilus influenzae* as a Pathogen in Children**, Journal of Pediatric Infectious Diseases. Vol (28): 43-48
47. Moxon E. R., Sweetman W. A., Deadman M.E., Ferguson D. J. P. and Hood D. W., (2008), ***Haemophilus influenzae* biofilms: hypothesis or fact?**, Trends in Microbiology. Vol (16): 95-100
48. Nascimento-Carvalho C. M., Sgambatti de Andrade A.L.S., (2006), ***Haemophilus influenzae* type b vaccination: long-term protection**, Jornal de Pediatria. Vol(82): 109-S114
49. Nelson Lee N., Smith Arnold Lee, (2010), **Determination of capsulation status in *H. influenzae* by multiplex PCR**, Diagnosis Microbial Infect Dis. Vol (3): 235-240
50. Nelson Kliegman R., (1996), and Behrman R. E., Βασική Παιδιατρική. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας
51. Pandit L., Kumar S, Karunasagar I, Karunasagar I., 2005, **Diagnosis of partially treated culture-negative bacterial meningitis using 16S rRNA universal primers and restriction endonuclease digestion**, J Med Microbiol. Ωολ(54): 539-42.
52. Peerbooms P. G. H., Engelen M. N., Stokman A. J., (2002), **Nasopharyngeal Carriage of Potential Bacterial pathogens Related today Care Attendance, with Special Reference to the molecular epidemiology of *Haemophilus influenzae***, Journal of Clinical Microbiology. Vol (40): 2832-2836
53. Peltola H., (2000), **Worldwide *Haemophilus influenzae* Type b Disease at the Beginning of the 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**, Clinical Microbiology Reviews. Vol (13): 302-317
54. Peltola H., Eva Salo, Harri Saxen, (2004), **Incidence of *Haemophilus influenzae* type b meningitis during 18 years of vaccine use: observational study using routine hospital data**, Journal of Medicine Biotechnology. Vol (330): 18-19
55. Pozzetto B., Grattard Florence, Pillet Silvie, 2010, **Multiplex PCR theranostics of severe respiratory infections**, Expert Rev Anti Infect Ther Vol (3):251-253

56. Pfeiffer R., (1892), **Provisional communication on the cause of influenza**, Deutsche medicinische Wochenschrift Vol (18): 28.
57. Pittman M., (1931), **Variation and Type Specificity in the Bacterial Species *Haemophilus influenzae***, Journal of Experimental Medicine. Vol (53): 471-492
58. Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, Finnzymes, Manual
59. Ronander E., (2008), ***Haemophilus influenzae* adhesins and the innate immune system**, Doctoral Thesis (PhD), Medical Microbiology, University of Sweden
60. Satola S., Patricia L.Schirmer and Monica M. Farley, (2003), **Complete Sequence of the cap Locus of *Haemophilus influenzae* Serotype b and Nonencapsulated b Capsule – Negative Variants**, Infection and Immunity. Vol (71):3639-3644
61. Satola S., Patricia L. Schirmer and Monica M. Farley, (2003), **Genetic Analysis of the Capsule Locus of *Haemophilus influenzae* Serotype f**, Infection and Immunity. Vol (12): 7202-7207 (b)
62. Soriano F., Granizo J., Coronel P., Gimeno M., Rodenas E., Gracia M., Roblas-Fernandez R., Esteban J., Gadea I., (2004), **Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae* and *Moraxella catarrhalis* isolated from adult patients with respiratory tract infections in four Southern European countries: The ARISE project**, International Journal of Antimicrobial Agents. Vol (23): 295-298
63. Stralin K., Backman A., Holmberg H., Fredlund H., Olcen P., (2005), **Design of a multiplex PCR for *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydophila pneumoniae* to be used on sputum samples**, APMIS. Vol(113): 99-111
64. Sulikowska A., Grzesiowski P., Sadowy E., Fiett J. and Hryniewicz, (2004), **Characteristics of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* Isolated from the Nasopharynges of Asymptomatic Children and Molecular analysis of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* Strain Replacement in the Nasopharynx**, Journal of Clinical Microbiology. Vol (42): 3942-3949
65. Swords E., Margaret R. Ketterer, Jianqiang Shao, Colleen A. Campbell, Jeffrey N. Weiser, Michael A. Apicella, (2001), **Binding of the non-typeable *Haemophilus influenzae***

- lipooligosaccharide to the PAF receptor initiates host cell signaling**, Cellular Microbiology Vol. (3): 525-536
66. Taubenberger J., David M. Morens, (2008), **Discovery and characterization of the 1918 pandemic influenza virus in historical context**, Antivir Ther. Vol (12): 581-591
67. Tsang R., (2007), **Capsule switching and capsule replacement in vaccine-preventable bacterial diseases**, Lancet Infectious Diseases. Vol (7): 569-570
68. Tsang R., (2008), **Changing epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* disease**, Lancet Infectious Diseases. Vol (8): 737
69. Tsang R. S. W., (2008), **Serotyping and Population Genetics of Invasive *Haemophilus influenzae***, Journal of Clinical Microbiology. Vol (46): 1159 (b)
70. Tsolia M. N., (1998), Theodoridou M. N., Mostrou G., **Epidemiology of Invasive *Haemophilus influenzae* Type b infections among Children in Greece before the Introduction of Immunization**, Scand Journal Infectious Diseases. Vol (30):165-168
71. Tzanakaki G, Tsolia M, Vlachou V, Theodoridou M, Pangalis A, Foustoukou M, Karpathios T, Blackwell CC, Kremastinou J., 2003, **Evaluation of non-culture diagnosis of invasive meningococcal disease by polymerase chain reaction (PCR)**, FEMS Immunol Med Microbiol. Vol (39): 31-36
72. Tzanakaki G, M. Tsopanomichalou, K. Kesanopoulos, R. Matzourani, M. Sioumala, A. Tabaki and J. Kremastinou, (2005), **Simultaneous single-tube PCR assay for the detection of *Neisseria meningitis*, *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae***, Clinical Microbiology and Infection. Vol (11):386-390
73. Turk D. C., (1984), **The pathogenicity of the *Haemophilus influenzae***, Journal of Medical Microbiology. Vol (18): 1-16
74. Ulanova M., Raymond S.W Tsang, (2009), **Invasive *Haemophilus influenzae* disease: changing epidemiology and host-parasite interactions in the 21st century**, Infection, Genetics and Evolution. Vol(4): 594-605
75. Wang S., Lo W., Chou C., Chen Y., Tsai S., Chu M., Wang C., (2008), **Low rate of nasopharyngeal carriage and high rate of ampicillin resistance for *Haemophilus***

- influenzae* among healthy children younger than 5 years old in northern Twaiwan,** Journal of Microbiol Immunol Infect. 2008;41:32-40
76. Wang X., Peter Quinn, (2010), **Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification,** Progress in Lipid Research. Vol (49): 97-107
77. Webster P., Siva Wu, Gomez Gerardo, Apicella Michael, Andrew G. Plaut, Joseph Geme W. St. III, 2006, **Distribution of Bacterial Proteins in Biofilms Formed by Non-Typeable *Haemophilus influenzae*,** Journal of Histochemistry and Cytochemistry Vol(54): 829-842
78. Xirogianni Athanasia, Georgina tzanakaki, Eleni Karagianni, Panayiotis Markoulatos, Jenny-Kourea Kremastinou, (2008), **Development of a single- tube polymerase chain reaction assay for the simultaneous detection of *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus spp* directly in clinical samples,** Diagnostic Microbioloy and Infectious Diseases. Vol (63):121-126
79. Zambardi G., Druetta A., Roure C., Fouque B., Girardo P., Chypre C., Marchand J., Freney J., Fleurette J., (1995), **Rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infections by an ELISA-like detection of polymerase chain reaction products,** Mol Cell Probes. Vol (9): 91-99
80. Zhang Q., Finn A, (2004), **Mucosal immunology of vaccines against pathogenic nasopharyngeal bacteria,** Journal of Clin Pathol. Vol (57):1015-1021

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΔΙΕΥΘΥΝΣΕΙΣ

- www.esdy.gr
www.nsph.gr/files/001_Dimosias_Dioikitikis_Ygieinis/EKAM/Apologismos_EKAM-2010.pdf
- **CDC (Center for Disease and Prevention):**
<http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/hib.pdf>
- **CDC, 2008:** http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/haeminfluserob_t.htm
- **WHO, 2005:** <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs294/en/index.html>
- **WHO, 2006:** <http://www.who.int/wer>. No. 47, 2006, 81, pp 445-452
- **Mobben H. Rathore, 2010:** <http://emedicine.medscape.com/article/964317-overview>
- **Vidya R. Devarajan, 2012:** <http://emedicine.medscape.com/article/218271-overview>
- http://www.ciriscience.org/ph_138-Pneumonia_Haemophilus_influenzae_Copyright_Dennis_Kunkel_Microscopy
- <http://bmtjournal.blogspot.gr/2007/12/particulars-of-patient-name-tong-wei.html>