



**Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής**  
Σχολή Δημόσιας Υγείας  
Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών στη Δημόσια Υγεία

2<sup>η</sup> Ειδίκευση : «**Λοιμώδη Νοσήματα- Εργαστηριακή Δημόσια Υγεία**»

Ακαδημαϊκό Έτος: 2022-2024

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

**«Ταυτοποίηση ως προς το είδος θετικών για *Streptococcus* spp. βιολογικών δειγμάτων σε ασθενείς με μηνιγγίτιδα, με τη μέθοδο της αλληλούχισης»**

Καραμαλής Κωνσταντίνος

AM: mdy22099

**Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:** Τζανακάκη Γεωργία (Τζωρτζίνα), Καθηγήτρια  
Μικροβιολογίας της Δημόσιας Υγείας

**Αθήνα, Σεπτέμβριος 2024**



**University of West Attica**  
School of Public Health  
Department of Public Health Policy

Postgraduate ProGram in Public Health (MSc)

2<sup>nd</sup> Specialization: «**Infectious Diseases- Public Health Laboratories**»

Academic Year: 2022-2024

Master Thesis:

« **Identification of *Streptococcus* spp. in positive biological samples from patients with meningitis, using the sequencing method** »

Constantinos Karamalis

mdy22099

Supervisor: Tzanakaki Georgia (Georgina), Professor of Public Health  
Microbiology

**Athens, September 2024**



**Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής**  
Σχολή Δημόσιας Υγείας  
Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών στη Δημόσια Υγεία

2<sup>η</sup> Ειδίκευση : «**Λοιμώδη Νοσήματα- Εργαστηριακή Δημόσια Υγεία**»

Ακαδημαϊκό Έτος: 2022-2024

**«Ταυτοποίηση ως προς το είδος θετικών για *Streptococcus* spp. βιολογικών δειγμάτων σε ασθενείς με μηνιγγίτιδα, με τη μέθοδο της αλληλούχισης»**

**Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής συμπεριλαμβανομένου και του Επιβλέποντα**

Η μεταπτυχιακή διπλωματική εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

<b>A/A</b>	<b>ΟΝΟΜΑ ΕΠΩΝΥΜΟ</b>	<b>ΒΑΘΜΙΔΑ/ ΙΔΙΟΤΗΤΑ</b>	<b>ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ</b>
1	Τζανακάκη Γεωργία (Τζωρτζίνα)	Καθηγήτρια	
2	Ξηρογιάννη Αθανασία	ΕΔΙΠ	
3	Πατσουλά Ελένη	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια	

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος **Κωνσταντίνος Καραμαλής** του **Αθανασίου**, με αριθμό μητρώου **mdy22099** φοιτητής του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών στη Δημόσια Υγεία του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας της Σχολής Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

\*Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου μέχρι ..... και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή.

Ο Δηλών

Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα



**\* Εάν κάποιος επιθυμεί απαγόρευση πρόσβασης στην εργασία για χρονικό διάστημα 6-12 μηνών (embargo), θα πρέπει να υπογράψει ψηφιακά ο/η Επιβλέπων/ουσα Καθηγητής/τρια, για να γνωστοποιεί ότι είναι ενημερωμένος/η και συναινεί. Οι λόγοι χρονικού αποκλεισμού πρόσβασης περιγράφονται αναλυτικά στις πολιτικές του Ι.Α. (σελ. 6).**

Copyright ©, Κωνσταντίνος Καραμαλής, 2024

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των απαιτήσεων του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών στη Δημόσια Υγεία του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας της Σχολής Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Η έγκρισή της δεν υποδηλώνει απαραίτητως και την αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας.

Βεβαιώνω ότι η παρούσα Διπλωματική Εργασία είναι αποτέλεσμα προσωπικής μου εργασίας και δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής. Στις δημοσιευμένες ή μη δημοσιευμένες πηγές που αναφέρω έχω χρησιμοποιήσει εισαγωγικά όπου απαιτείται και έχω παραθέσει τις πηγές τους στο σχετικό τμήμα της βιβλιογραφίας.

Υπογραφή

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Καρολαίνω Β', written over a horizontal line.

## Περίληψη

**Εισαγωγή.** Οι περισσότερες λοιμώξεις από στρεπτόκοκκο στον άνθρωπο οφείλονται στη μετάδοσή του μέσω της άμεσης επαφής με ένα μολυσμένο άτομο και συγκεκριμένα με την έκκριση μολυσμένων σταγονιδίων. Ορισμένοι στρεπτόκοκκοι, που δεν είναι πνευμονιόκοκκοι αλλά ούτε *S. pyogenes* (GAS) και *S. agalactiae* (GBS), προκαλούν μηνιγγίτιδα και αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως α- αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι, οι οποίοι, αποικίζουν τη στοματική κοιλότητα, όπως για παράδειγμα ο *S. mitis*. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν στρεπτόκοκκοι, όπως ο *S. suis*, οι οποίοι αποικίζουν τους χοίρους και μεταδίδονται μέσω αυτών αλλά και από την κατανάλωση των παράγωγων προϊόντων χοιρινού κρέατος.

**Σκοπός και στόχοι.** Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανάπτυξη τεχνικής για την ταυτοποίηση ως προς το είδος θετικών για *Streptococcus spp.* απευθείας σε βιολογικά δείγματα ασθενών με μηνιγγίτιδα/ σηψαιμία, τα οποία δεν έχουν ταυτοποιηθεί ως *S. pneumoniae* ή ως *S. agalactiae* (group B) ή *S. pyogenes* (group A). Επιπλέον, η παρούσα εργασία σκοπεύει στη συλλογή πληροφορίας σχετικά με άλλους στρεπτόκοκκους οι οποίοι προκαλούν μηνιγγίτιδα/ σηψαιμία αλλά και στην παρακολούθηση των κρουσμάτων πριν, κατά τη διάρκεια αλλά και μετά την πανδημία της νόσου COVID- 19.

**Υλικό και μέθοδος.** Αποτέλεσαν δείγματα DNA θετικά για *Streptococcus spp.* από ασθενείς με μηνιγγίτιδα/ σηψαιμία τα οποία δεν είχαν ταυτοποιηθεί ως *S. pneumoniae*, *S. agalactiae* (B) και *S. pyogenes* (A). Εφαρμόστηκε η μέθοδος της PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *tuf* απευθείας στα κλινικά δείγματα και αλληλούχιση του προϊόντος. Τέλος, έγινε επεξεργασία των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης καθώς και σύγκριση τους με αλληλουχίες αναφοράς με το BLAST.

**Αποτελέσματα.** Χρησιμοποιώντας το γονίδιο *tuf* για την ταυτοποίηση των στρεπτόκοκκων, βρέθηκε ότι μέχρι στιγμής το μεγαλύτερο ποσοστό στρεπτόκοκκων που έχουν προκαλέσει μηνιγγίτιδα αλλά και σηψαιμία είναι στρεπτόκοκκοι που ανήκουν στην ομάδα των *S. mitis*. Ειδικότερα, τα αποτελέσματα της αλληλούχισης έδειξαν ότι η πλειονότητα των δειγμάτων σχετίζονταν με τα είδη των *S. mitis/pseudopneumoniae* και *S. salivarius*.

**Συμπεράσματα.** Το συγκεκριμένο γονίδιο αποτελεί τον κατάλληλο μοριακό δείκτη για τις φυλογενετικές αναλύσεις και την περαιτέρω ταυτοποίηση των στρεπτόκοκκων απευθείας σε κλινικά δείγματα καθώς εμφανίζει ισχυρότερη διακριτική ισχύ συγκριτικά με τα υπόλοιπα γονίδια. Η παρούσα μεθοδολογία αποκάλυψε πληροφορία σχετικά με τα είδη άλλων στρεπτόκοκκων, ιδιαίτερα σε κλινικά δείγματα με αρνητική καλλιέργεια

**Λέξεις κλειδιά:** στρεπτόκοκκοι, μηνιγγίτιδα, σηψαιμία, αλληλούχιση, λοιμώξεις

## Abstract

**Introduction.** Most human streptococcal infections are caused by transmission of *Streptococcus* spp. through direct contact with an infected person and specifically through infected secretion droplets. Some streptococci, which are not *S. pneumoniae*, neither (*S. pyogenes*) nor GBS (*S. agalactiae*), cause meningitis and are described as  $\alpha$ -haemolytic streptococci, such as *S. mitis*, colonize the oral cavity. Moreover, some streptococci such as *S. suis*, colonize pigs and are transmitted through direct contact with them as well as from the consumption of their derived products.

**Aim.** This study aims to the development of a technique for the identification of *Streptococcus* spp. directly in biological samples from patients who had meningitis/septicemia, and have not been identified as *S. pneumoniae* or as *S. agalactiae* (group B) or *S. pyogenes* (group A). In addition, the present study aims to collect information about other streptococci that cause meningitis/septicemia and to monitor the cases trendline before, during and after the COVID- 19 pandemic.

**Material and methods.** Positive for *Streptococcus* spp. DNA samples from patients with meningitis/septicemia that had not been identified as *S. pneumoniae*, *S. agalactiae* (B) and *S. pyogenes* (A). The PCR method was applied to amplify the *tuf* gene directly in the clinical samples and sequence the product. Finally, the sequencing results were processed and compared in BLAST with reference sequences.

**Results.** With the use of the *tuf* gene in the identification of *Streptococcus* spp., it was found that the largest percentage of streptococci that have caused meningitis and septicemia, are *Streptococci* spp. belonging to the *S. mitis* group. In particular, the sequencing results showed that the majority of the samples were related to the species of *S. mitis/pseudopneumoniae* and *S. salivarius*.

**Conclusions.** This specific gene is the appropriate molecular marker for phylogenetic analyses and for the further identification of streptococci directly in clinical samples due to its stronger discriminatory power compared to the other genes. The present methodology revealed information about the species of other streptococci group, especially in the absence of bacterial strains.

**Keywords:** *Streptococcus* spp.; meningitis; septicemia; sequencing; infections



## Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα να αποδώσω τις ευχαριστίες μου σε όλους όσους συνέβαλλαν στην εκπόνησή της. Καταρχήν, οφείλω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη ΔΕΠ, ΕΔΙΠ, ΕΤΕΠ του ΠΜΣ: «Δημόσια Υγεία», για τις γνώσεις και τα εφόδια που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια της φοίτησης μου.

Ειδικότερα, θα ήθελα να αποδώσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην καθηγήτρια μου, επιβλέπουσα της μεταπτυχιακής διπλωματικής μου εργασίας και επιστημονική υπεύθυνη του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Μηνιγγίτιδας (ΕΚΑΜ), καθηγήτρια Μικροβιολογίας Δημόσιας Υγείας Τζωρτζίνα Τζανακάκη, αρχικά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε εξ αρχής αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα και εν συνεχεία, για τις συμβουλές και τις υποδείξεις που μου παρείχε κατά τη διάρκεια της εκπόνησής της ΜΔΕ.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Αθανασία Ξηρογιάννη για την πολύτιμη βοήθειά της στο κομμάτι της εργαστηριακή έρευνας, καθώς επίσης και όλο το υπόλοιπο προσωπικό του ΕΚΑΜ, για αυτή την υπέροχη συνεργασία.

Τέλος, δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για τη συμπαράσταση και τη στήριξή τους, καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## Περιεχόμενα

Κατάλογος γραφημάτων .....	12
Κατάλογος πινάκων.....	13
Κατάλογος εικόνων .....	15
Πρόλογος.....	19
Εισαγωγή.....	21
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	23
1. Μηνιγγίτιδα.....	24
1.1. Οξεία βακτηριακή μηνιγγίτιδα .....	25
1.1.1. Συμπτώματα βακτηριακής μηνιγγίτιδας .....	26
1.1.2. Διάγνωση βακτηριακής μηνιγγίτιδας .....	26
1.2. Αίτια ιογενούς μηνιγγίτιδας .....	29
1.2.1. Διάγνωση ιογενούς μηνιγγίτιδας .....	30
1.3. Κλινική εικόνα μηνιγγίτιδας .....	31
1.3.1. Βακτηριακή μηνιγγίτιδα .....	31
1.3.2. Ιογενής μηνιγγίτιδα.....	32
1.4. Θεραπευτικές προσεγγίσεις .....	32
1.4.1. Βακτηριακή μηνιγγίτιδα .....	33
1.4.2. Ιογενής μηνιγγίτιδα.....	35
2. Στρεπτόκοκκοι.....	36
2.1. Γενικά .....	36
2.2. Ταξινόμηση .....	37
2.2.1. <i>Pyogenic Streptococci Group</i> .....	40
2.2.2. <i>Bovis Streptococci Group</i> .....	40
2.2.3. <i>Mitis Streptococci Group</i> .....	41
2.2.4. <i>Anginosus Streptococci Group</i> .....	44
2.2.5. <i>Mutans Streptococci Group</i> .....	45
2.2.6. <i>Salivarius Streptococci Group</i> .....	45
2.2.7. <i>Other streptococci group</i> και <i>Suis Streptococci Group</i> .....	46
2.3. Μοριακοί μηχανισμοί των <i>Streptococcus spp.</i> .....	47
2.4. Μετάδοση.....	50
2.5. Παθογένεση.....	51
2.5.1. Στρεπτοκοκκικές λοιμώξεις .....	55
2.5.2. Στρεπτοκοκκική μηνιγγίτιδα .....	57
3. Λακτόκοκκοι.....	59

3.1.	Γενικά .....	59
3.2.	Μετάδοση.....	62
4.	Μοριακές τεχνικές.....	63
4.1.	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	63
4.1.1.	Παραλλαγές της PCR .....	66
4.2.	Αλληλούχιση (Sequencing).....	67
4.2.1.	Αλληλούχιση επόμενης γενιάς- Next Generation Sequencing (NGS).....	70
4.3.	Γονίδια που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των <i>Streptococcus</i> spp. .	71
4.3.1.	Γονίδια <i>16s rRNA</i> , <i>sodA</i> και <i>rpoB</i> .....	71
4.3.2.	Γονίδιο <i>tuf</i> .....	72
5.	Επιδημιολογία .....	75
6.	Σκοπός.....	78
B.	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	79
7.	Υλικό και μέθοδοι .....	80
7.1.	Δείγματα.....	80
7.2.	Αντίδραση Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης PCR .....	80
7.2.1.	Επιλογή εκκινητικών μορίων.....	80
7.2.2.	Υλικό.....	81
7.2.3.	Πειραματικά στάδια ανάπτυξης της PCR .....	82
7.3.	Πρωτόκολλο καθαρισμού δειγμάτων για αλληλούχιση .....	86
7.4.	Αλληλούχιση .....	86
8.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	88
8.1.	Πειραματικό στάδιο ανάπτυξης τεχνικής.....	89
8.2.	Αποτελέσματα εφαρμογής της τεχνικής απευθείας σε κλινικά δείγματα ασθενών με μηνιγγίτιδα/ σηψαιμία .....	95
8.3.	Αποτελέσματα της τεχνικής στην ταυτοποίηση των δειγμάτων .....	98
9.	Συζήτηση .....	107
10.	Συμπεράσματα .....	111
	Βιβλιογραφία.....	113

## Κατάλογος γραφημάτων

Γράφημα 1: Σύνολο θετικών σε PCR δειγμάτων για <i>S. agalactiae</i> (GBS), <i>S. pyogenes</i> (GAS) και <i>NT- Streptococcus spp.</i> ....	76
Γράφημα 2: Ρυθμός επίπτωσης στρεπτόκοκκων ομάδας A (GAS), ομάδας B (GBS) και μη ταυτοποιημένων ( <i>NT- Streptococcus spp.</i> ) στην Ελλάδα (2015-2023) .....	76
Γράφημα 3: Αριθμός κρουσμάτων και ρυθμός επίπτωσης των <i>NT- Streptococcus spp.</i> στην Ελλάδα (2015-2023).....	77
Γράφημα 4: Κρούσματα μηνιγγίτιδας/ σηψαιμίας από <i>NT- Streptococcus spp.</i> κατά το χρονικό διάστημα 2015- 2023.....	100
Γράφημα 5: Συνολική ηλικιακή κατανομή κρουσμάτων .....	103
Γράφημα 6: <i>Streptococcus spp.</i> που προκάλεσαν μηνιγγίτιδα/ σηψαιμία, σε παιδιά ηλικίας 0-4 (2015-2023) .....	103
Γράφημα 7: <i>Streptococcus spp.</i> που προκάλεσαν μηνιγγίτιδα/ σηψαιμία, σε άτομα ηλικίας > 60 ετών (2015-2023) .....	104
Γράφημα 8: Σύγκριση ηλικίας και κυριότερων <i>Streptococcus spp.</i> σε ασθενείς με μηνιγγίτιδα .....	105
Γράφημα 9: Σύγκριση ηλικίας και κυριότερων <i>Streptococcus spp.</i> σε ασθενείς με σηψαιμία.....	106

## Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1: Κυριότερα αίτια οξείας βακτηριακής μηνιγγίτιδας ανά ηλικιακή ομάδα. .....	25
Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά εγκεφαλονωτιαίου υγρού σε λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος βακτηριακής αιτιολογίας .....	29
Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά εγκεφαλονωτιαίου υγρού σε λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος ιογενούς αιτιολογίας .....	30
Πίνακας 4: Κλίμακα της Γλασκώβης.....	31
Πίνακας 5: Αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση της βακτηριακής μηνιγγίτιδας στην κοινότητα .....	35
Πίνακας 6: Ταξινόμηση στρεπτόκοκκων ανά γένος και είδος .....	39
Πίνακας 7: Αιμολυσίνες: είδος τοξινών των <i>Streptococcus spp</i> .....	52
Πίνακας 8: Ολιγονουκλεοτίδια εκκινητών ( <i>primers</i> ) για την ενίσχυση των αντίστοιχων γονιδίων. ....	71
Πίνακας 9: Συνολικός αριθμός κλινικών δειγμάτων ( <i>PCR (+)</i> ) και στελεχών, θετικά για <i>Streptococcus spp.</i> , από ασθενείς με μηνιγγίτιδα/ σηψαιμία .....	75
Πίνακας 10: : Αλληλουχίες και χαρακτηριστικά του εκκινητικού μορίου ( <i>primer</i> ) <i>tuf</i> .....	81
Πίνακας 11: Αντιδραστήρια και θερμοκυκλοποιητής που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη της τεχνικής .....	81
Πίνακας 12: Συνθήκες της κάθε μεμονωμένης αντίδρασης <i>PCR</i> (1η δοκιμή).....	82
Πίνακας 13: Συνθήκες της κάθε μεμονωμένης αντίδρασης <i>PCR</i> μετά την τροποποίηση των αντιδραστηρίων (2η δοκιμή). ....	83

Πίνακας 14: Συνθήκες της κάθε μεμονωμένης αντίδρασης PCR μετά την αύξηση της θερμοκρασίας αποδιάταξης και της επιμήκυνσης (3η δοκιμή).....	83
Πίνακας 15: Συνθήκες της κάθε μεμονωμένης αντίδρασης PCR μετά την αύξηση της θερμοκρασίας αποδιάταξης (4η δοκιμή) .....	84
Πίνακας 16: Συνθήκες της κάθε μεμονωμένης αντίδρασης PCR μετά την αύξηση της θερμοκρασίας επιμήκυνσης (5η δοκιμή).....	84
Πίνακας 17: Συνθήκες της κάθε μεμονωμένης αντίδρασης touchdown PCR μετά την τροποποίηση των συνθηκών (6η δοκιμή) .....	85
Πίνακας 18: Σύνολο NT- <i>Streptococcus spp.</i> και <i>Lactococcus spp.</i> που προκάλεσαν μηνιγγίτιδα (2015-2023) .....	99
Πίνακας 19: Σύνολο NT- <i>Streptococcus spp.</i> και <i>Lactococcus spp.</i> που προκάλεσαν σηψαιμία (2015-2023).....	99
Πίνακας 20: Ομαδοποίηση στρεπτόκοκκων και λακτόκοκκων που προκάλεσαν μηνιγγίτιδα κατά Lancefield .....	101
Πίνακας 21: Ομαδοποίηση στρεπτόκοκκων και λακτόκοκκων που προκάλεσαν σηψαιμία κατά Lancefield.....	101
Πίνακας 22: Δημογραφικά δεδομένα ασθενών με μηνιγγίτιδα και σηψαιμία. ....	102

## Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1: Σύγκριση υγειούς και προσβεβλημένης (μηνιγγίτιδα) λεπτής μήνιγγας του εγκεφάλου. ....	25
Εικόνα 2: Διαφορές στη δομή του κυτταρικού τοιχώματος και κυτταρικής μεμβράνης Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων. ....	27
Εικόνα 3: Τεχνική της χρώσης Gram .....	28
Εικόνα 4: Δοκιμασία Kernig (A) και Brudzinski (B). ....	32
Εικόνα 5: Ταξινόμηση στρεπτόκοκκων .....	36
Εικόνα 6: Απεικόνιση του κυτταρικού τοιχώματος των στρεπτόκοκκων. ....	37
Εικόνα 7: Είδη αιμόλυσης.....	38
Εικόνα 8: Μηχανισμοί μεταφοράς γονιδίων μεταξύ των βακτηρίων. ....	48
Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας των TCSs.....	54
Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση της πορείας των στρεπτοκοκκικών λοιμώξεων .....	56
Εικόνα 11: Ταξινόμηση λακτόκοκκων .....	59
Εικόνα 12: Φυλογενετική ανάλυση <i>Streptococcus spp.</i> με τη χρήση του γονιδίου <i>tuf</i> . ....	61
Εικόνα 13: Τα 3 στάδια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).....	65
Εικόνα 14: Σύγκριση ενός διδεοξυριβονουκελοτιδίου με ένα δεοξυριβονουκλεοτίδιο. ....	67
Εικόνα 15: Διαδικασία της μεθόδου αλληλούχισης τερματισμού ( <i>sanger sequencing</i> ) .....	69

<i>Εικόνα 16: Διακριτική ισχύς μεταξύ του 16srRNA και του γονιδίου tuf. ....</i>	<i>74</i>
<i>Εικόνα 17: Αποτελέσματα πρώτης δοκιμής της τεχνικής. ....</i>	<i>89</i>
<i>Εικόνα 18: Αποτελέσματα από τη δεύτερη δοκιμή της τεχνικής ....</i>	<i>90</i>
<i>Εικόνα 19: Αποτελέσματα από την τρίτη δοκιμή της PCR. ....</i>	<i>91</i>
<i>Εικόνα 20: Αποτελέσματα από την τέταρτη δοκιμή της τεχνικής.....</i>	<i>92</i>
<i>Εικόνα 21: Αποτελέσματα πέμπτης δοκιμής.....</i>	<i>92</i>
<i>Εικόνα 22: Αποτελέσματα των προϊόντων μετά την εφαρμογή της touchdown-PCR. ....</i>	<i>93</i>
<i>Εικόνα 23: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης δειγμάτων PCR, μετά από καθαρισμό. ....</i>	<i>94</i>
<i>Εικόνα 24: Αποτέλεσμα αλληλούχισης (χρωματογράφημα) των 2 κλώνων του γονιδίου tuf σε κλινικό δείγμα. ....</i>	<i>95</i>
<i>Εικόνα 25: Επεξεργασία της αλληλουχίας των χρωματογραφημάτων με το λογισμικό CLUSTALW. ....</i>	<i>96</i>
<i>Εικόνα 26: Αποτελέσματα αναζήτησης της νεοσυντιθέμενης αλληλουχίας στη βάση BLAST. ....</i>	<i>97</i>



## Πίνακας συντομογραφιών

<b>VGS</b>	πρασινίζοντες στρεπτόκοκκοι
<b>GAS</b>	Group A στρεπτόκοκκοι
<b>GBS</b>	Group B στρεπτόκοκκοι
<b>GCS</b>	Group C στρεπτόκοκκοι
<b>GDS</b>	Group D στρεπτόκοκκοι
<b>GES</b>	Group E στρεπτόκοκκοι
<b>GFS</b>	Group F στρεπτόκοκκοι
<b>GGs</b>	Group G στρεπτόκοκκοι
<b>SAG</b>	Στρεπτόκοκκοι της ομάδας anginosus
<b>MGE</b>	Κινητά γενετικά στοιχεία
<b>Tn</b>	Τρανσποζόνια
<b>IS</b>	Αλληλουχίες εισδοχής
<b>HGT</b>	Οριζόντια μεταφορά γονιδίου
<b>CDC</b>	Centers for Disease Control and Prevention
<b>ECDC</b>	European Centre for Disease Prevention and Control
<b>PCV</b>	Πολυσακχαριδικά εμβόλια
<b>NT</b>	Non- typable
<b>NGS</b>	Next Generation Sequencing
<b>WGS</b>	Whole Genome Sequencing
<b>ENY (csf)</b>	Εγκεφαλονωτιαίο υγρό
<b>pus</b>	πύον
<b>TNF</b>	Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων
<b>TCSs</b>	two-component regulatory system
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (Αντίδραση Αλυσιδωτής Πολυμεράσης)
<b>mPCR</b>	multiplex PCR
<b>tdPCR</b>	Touchdown-PCR
<b>dNTPs</b>	Deoxynucleotide Triphosphates (Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοσίδια)
<b>ddNTPs</b>	Dideoxynucleotide Triphosphates (Τριφωσφορικά διδεοξυνουκλεοσίδια)

**WNV**

West Nile Virus (ιός Δυτικού Νείλου)

## Πρόλογος

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε κατά την θερινή περίοδο του Ακαδημαϊκού Έτους 2023 - 2024, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Δημόσιας Υγείας του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας της Σχολής Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

Η μηνιγγίτιδα είναι μια σοβαρή νόσος του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), κατά την οποία παρατηρείται φλεγμονή των λεπτών μηνίγγων του εγκεφάλου. Η συγκεκριμένη νόσος μπορεί να εκδηλωθεί με 2 τύπους, είτε με τη μορφή της μηνιγγίτιδας είτε με τη μορφή σηψαιμίας. Οι κύριοι αιτιολογικοί παράγοντες οι οποίοι μπορούν να προκαλέσουν μηνιγγίτιδα είναι τα βακτήρια και οι ιοί.

Στην περίπτωση της βακτηριακής μηνιγγίτιδας, η οποία είναι και η πιο συχνή, τα παθογόνα βακτήρια τα οποία ευθύνονται στο μεγαλύτερο ποσοστό, είναι η *Neisseria meningitidis*, ο *Streptococcus pneumoniae* και ο *Haemophilus influenzae* type b. Παρόλα αυτά, ο *S. pneumoniae* δεν αποτελεί το μοναδικό στρεπτόκοκκο που μπορεί να προκαλέσει μηνιγγίτιδα, στρεπτόκοκκοι όπως ο *Streptococcus pyogenes* και ο *Streptococcus agalactiae* προκαλούν εξίσου σοβαρής μορφής μηνιγγίτιδα σε ένα αρκετά υψηλό ποσοστό. Ωστόσο, ομάδα των στρεπτόκοκκων, πλην του πνευμονιόκοκκου και στρεπτόκοκκων ομάδας A (*S. pyogenes*) και ομάδας B (*S. agalactiae*), παρουσιάζει ένα ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία έχουν σημειωθεί κρούσματα μηνιγγίτιδας από αυτούς. Η πλειοψηφία από αυτούς, αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι, όπως για παράδειγμα ο *Streptococcus mitis*, ο οποίος αποικίζει τη στοματική κοιλότητα.

Για την ακριβή ταυτοποίηση/ τυποποίηση των στρεπτόκοκκων χρειάζονται μοριακά εργαλεία όπως είναι η PCR, η αλληλούχιση (sequencing) και η παράλληλη σύγκριση των αποτελεσμάτων με αλληλουχίες αναφοράς σε βάσεις δεδομένων. Οι μοριακές μέθοδοι βασιζόμενες στις παραπάνω τεχνικές έχουν υψηλή ευαισθησία και επιτρέπουν τον εντοπισμό στρεπτόκοκκων σε κλινικά δείγματα. Ειδικότερα, κατά τη σύγκριση των αποτελεσμάτων ταυτοποίησης βάσει διαφορετικών γονιδίων, όπως για παράδειγμα το *tuf*, το 16s *rRNA*, το *recA*, το

*sodA*, το *rpoB*, το *dnaK*, το *ddl* αλλά και το *gdh*, φάνηκε πως το γονίδιο *tuf* αποτελεί τον κατάλληλο μοριακό δείκτη για φυλογενετικές αναλύσεις και ταυτοποίηση ειδών σε κλινικά δείγματα λόγω της ισχυρότερης διακριτικής ισχύος που διαθέτει συγκριτικά με τα υπόλοιπα γονίδια.

Έως σήμερα, στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας έχουν ταυτοποιηθεί κρούσματα μηνιγγίτιδας από *Streptococcus* spp. χωρίς όμως να έχει γίνει περαιτέρω ταυτοποίηση του είδους του στρεπτόκοκκου. Οι στρεπτόκοκκοι αυτοί δεν ανήκουν στα είδη *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* (group A) και *S. agalactiae* (group B) σύμφωνα με τις τεχνικές που εφαρμόζονται στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας. Αυτό ήταν και το έναυσμα της παρούσας μελέτης, η οποία θα εστιάσει στην ταυτοποίηση ως προς το είδος, θετικών για *Streptococcus* spp. βιολογικών δειγμάτων σε ασθενείς με μηνιγγίτιδα, με τη μέθοδο της αλληλούχισης. Η ταυτοποίηση των στρεπτόκοκκων αλλά και η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, θα δώσουν πληροφορίες, οι οποίες θα ενισχύσουν τις υφιστάμενες γνώσεις σχετικά με τους στρεπτόκοκκους, τη μετάδοσή τους και τη μηνιγγίτιδα και θα συνδράμουν στη βελτίωση της επιδημιολογικής διερεύνησης.

## Εισαγωγή

Η επιτήρηση της μηνιγγίτιδας στην Ελλάδα πραγματοποιείται συνολικά ως προς το είδος των παθογόνων που την προκαλούν, περιλαμβάνοντας τα βακτήρια (οξεία μηνιγγίτιδα) και τους ιούς (ιογενής ή άσηπτη μηνιγγίτιδα). Τα συνηθέστερα βακτήρια που προκαλούν μηνιγγίτιδα σε ποσοστό 70- 80% είναι η *N. meningitidis*, ο *S. pneumoniae* και ο *H. influenzae* τύπου β (Hib). Επιπρόσθετα, 20% της βακτηριακής μηνιγγίτιδας προκαλείται από *Streptococcus spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* και *Listeria monocytogenes*. Σύμφωνα με τα τελευταία δεδομένα του Εθνικού Οργανισμού Δημόσιας Υγείας, η μηνιγγίτιδα στην Ελλάδα από το 2019 και μετά παρουσίασε πτωτική τάση λόγω των μέτρων που είχαν ληφθεί για την αποφυγή μετάδοσης του ιού SARS- CoV- 2, ενώ το 2023 παρατηρήθηκαν επίπεδα προ- πανδημίας σχετικά με τον αριθμό των κρουσμάτων (1).

Συγκεκριμένα, η στρεπτοκοκκική μηνιγγίτιδα αποτελεί μια σοβαρή νόσο του κεντρικού νευρικού συστήματος, η οποία προκαλείται από βακτήρια του είδους *Streptococcus spp.* (2). Τα πιο γνωστά είδη στρεπτόκοκκων που προκαλούν μηνιγγίτιδα είναι πλέον του *S. pneumoniae*, ο *S. agalactiae* (Group B Streptococcus) και ο *S. pyogenes* (Group A Streptococcus). Ωστόσο υπάρχουν και άλλοι β- αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι που προκαλούν μηνιγγίτιδα, οι οποίοι ανήκουν στην ομάδα των Viridans Group Streptococci (VGS). Στην ομάδα αυτή, περιλαμβάνεται ένας μεγάλος αριθμός στρεπτόκοκκων, μερικοί εκ των οποίων είναι ο *Streptococcus mitis*, ο *Streptococcus salivarius* και ο *Streptococcus bovis* (3).

Σύμφωνα με τα δεδομένα του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Μηνιγγίτιδας, υπήρχαν δείγματα, θετικά σε PCR για *Streptococcus spp.* σε ποσοστό 67%, τα οποία δεν είχαν ταυτοποιηθεί ως *S. agalactiae* (GBS) και ως *S. pyogenes* (GAS) με το πρωτόκολλο της multiplex PCR, το οποίο στοχεύει στην ταυτόχρονη ταυτοποίηση των μικροοργανισμών *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.* και *Pseudomonas aeruginosa* (4). Παράλληλα, παρατηρήθηκε πως η επίπτωση αυτών των μη ταυτοποιημένων στρεπτόκοκκων (NT) ήταν σε

υψηλά επίπεδα, σε σχέση με τα πιο γνωστά *Streptococcus* spp. που σχετίζονται με μηνιγγιτιδα και σηψαιμία.

Δεδομένου του γεγονότος ότι, η ταυτοποίηση των στρεπτόκοκκων αποτελεί μια πρόκληση με την εφαρμογή συμβατικών μεθόδων ταυτοποίησης, καθώς αρκετοί στρεπτόκοκκοι μπορούν να ανήκουν ταυτόχρονα σε διαφορετικές ομάδες κατά *Lancefield*, με βάση της ύπαρξης ή μη του συγκεκριμένου αντιγόνου. Επιπλέον, λόγω του φαινομένου της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων μεταξύ κοντινών ειδών στρεπτόκοκκων, ενδεχομένως να συμβάλλει στη δημιουργία «νέων φαινοτύπων» των βακτηρίων σε θρεπτικά υλικά, όπως έχει παρατηρηθεί μεταξύ των μικροοργανισμών *S. pneumoniae* και *S. mitis* (5,6). Ωστόσο, η ανάπτυξη και η εφαρμογή μοριακών τεχνικών για την ακριβή ταυτοποίησή τους, φαίνεται να ανταπεξέρχεται της συγκεκριμένης πρόκλησης. Συγκεκριμένα, έχει μελετηθεί η αποτελεσματικότητα βασικών γονιδίων των στρεπτόκοκκων για το διαχωρισμό τους από συγγενικά είδη και γένη βακτηρίων, όπως για παράδειγμα ο διαχωρισμός *Streptococcus* spp. από βακτήρια του είδους *Enterococcus* spp., και *Staphylococcus* spp. απευθείας σε βιολογικά δείγματα απουσίας καλλιέργειας (5,7,8).

Συνεπώς, η ακριβής ταυτοποίηση των στρεπτόκοκκων έχει μεγάλη σημασία για διάγνωση αλλά κυρίως και τη δημόσια υγεία. Η ανάπτυξη μοριακών τεχνικών, οι οποίες θα μπορούν να ταυτοποιούν με υψηλή διακριτική ικανότητα τα διαφορετικά είδη των στρεπτόκοκκων μεταξύ τους, θα προσφέρουν πληροφορίες, οι οποίες θα συμβάλλουν αρκετά στην κατανόηση της βιολογίας των στρεπτόκοκκων, του τρόπου μετάδοσης τους καθώς και τη σχέση τους με τον ξενιστή (host- pathogen relationship) και την πρόκληση λοιμώξεων (5,9).

## **A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

---

## 1. Μηνιγγίτιδα

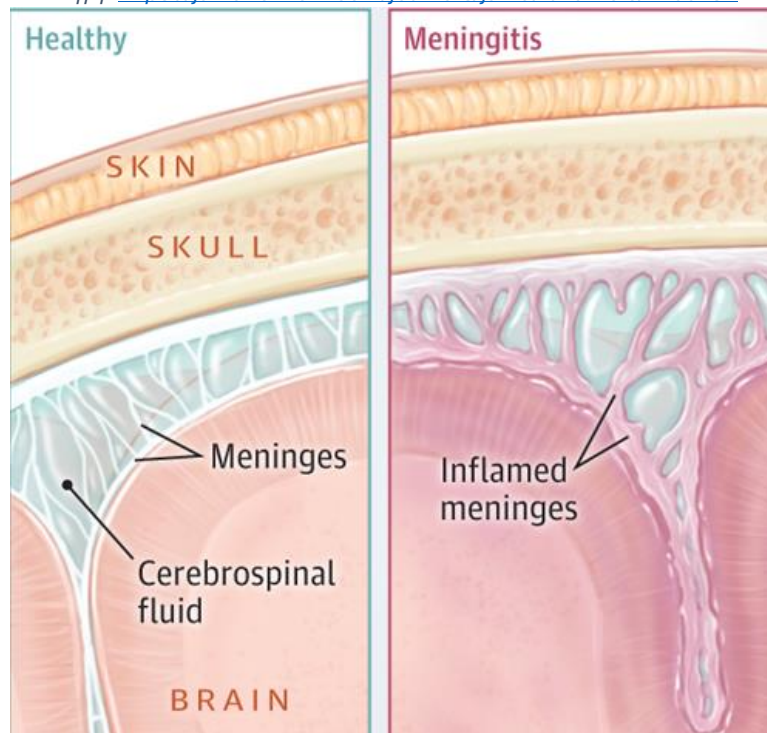
Η μηνιγγίτιδα είναι μια σοβαρή νόσος του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) με υψηλό βαθμό μεταδοτικότητας και θνησιμότητας, κατά την οποία παρατηρείται φλεγμονή των λεπτών μηνίγγων του εγκεφάλου. Η συγκεκριμένη νόσος μπορεί να εμφανιστεί με 2 τύπους είτε με τη μορφή της μηνιγγίτιδας είτε με τη μορφή σηψαιμίας (10). Η μετάδοση της νόσου γίνεται με άμεση επαφή, καθώς οι περισσότεροι μικροοργανισμοί που προκαλούν μηνιγγίτιδα αποικίζουν τη ρινοφαρυγγική κοιλότητα (11). Σύμφωνα με το CDC, τα αίτια που προκαλούν μηνιγγίτιδα είναι κυρίως μικροοργανισμοί και συγκεκριμένα βακτήρια, ιοί, παράσιτα, μύκητες και αμοιβάδες (10). Το 2011 δημοσιεύθηκε άρθρο, στο οποίο γινόταν αναφορά του όρου «νεοπλασματική μηνιγγίτιδα», όπου τα καρκινικά κύτταρα μέσω του κυκλοφορικού συστήματος, εισέρχονται στον υπαραχνοειδή χώρο, προκαλώντας μηνιγγίτιδα (12). Ωστόσο, οι πιο συχνές μορφές της νόσου είναι εκείνες της βακτηριακής και της ιογενούς αιτιολογίας. Μια περαιτέρω κατηγοριοποίηση της μηνιγγίτιδας είναι η οξεία βακτηριακή μηνιγγίτιδα, η οποία οφείλεται σε βακτήρια και σε ιογενή ή άσηπτη μηνιγγίτιδα, η οποία οφείλεται σε ιούς (10).

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας επισημαίνει πως παρά την πληθώρα των μικροοργανισμών που μπορούν να προκαλέσουν τη νόσο, όπως για παράδειγμα τα βακτήρια, οι ιοί, τα παράσιτα και οι μύκητες, τα περισσότερα κρούσματα παγκοσμίως είναι βακτηριακής μηνιγγίτιδας (11). Στην **Εικόνα 1** φαίνεται η διαφορά μεταξύ της λεπτής μήνιγγας ενός υγιούς ανθρώπου (δεξιά) και η λεπτή μήνιγγα από έναν ασθενή με μηνιγγίτιδα (αριστερή).



**Εικόνα 1: Σύγκριση υγιούς και προσβεβλημένης (μηνιγγίτιδα) λεπτής μήνιγγας του εγκεφάλου.**

Πηγή: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2799151>



### 1.1. Οξεία βακτηριακή μηνιγγίτιδα

Στην περίπτωση της βακτηριακής μηνιγγίτιδας οι κυριότεροι μικροοργανισμοί που ευθύνονται για την πρόκληση της νόσου είναι η *Neisseria meningitidis* προσβάλλοντας κυρίως παιδιά και ενήλικες, ο *Haemophilus influenzae* type B, ο οποίος προκαλεί μηνιγγίτιδα σε παιδιά ηλικίας κάτω των 5 ετών και ο *Streptococcus pneumoniae*, προκαλώντας μηνιγγίτιδα τόσο σε νεογνά, όσο σε παιδιά και σε ενήλικες (11). Ωστόσο, υπάρχουν βακτήρια όπως ο *Streptococcus pyogenes*, ο *Streptococcus agalactiae*, βακτήρια του είδους *Staphylococcus* spp., η *Listeria monocytogenes* και η *Escherichia coli*, τα προκαλούν μηνιγγίτιδα αλλά σε μικρότερη συχνότητα (13,14). Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1), ομαδοποιούνται οι κυριότεροι μικροβιολογικοί παράγοντες που προκαλούν μηνιγγίτιδα ανά ηλικιακή ομάδα.

**Πίνακας 1: Κυριότερα αίτια οξείας βακτηριακής μηνιγγίτιδας ανά ηλικιακή ομάδα.**

Πηγή: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30273239/>

Νεογνά	Βρέφη- νήπια- παιδιά	Ενήλικες
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> type B	<i>Listeria monocytogenes</i>

### **1.1.1. Συμπτώματα βακτηριακής μηνιγγίτιδας**

Σύμφωνα με το CDC, τα συμπτώματα της νόσου περιλαμβάνουν πυρετό, κεφαλαλγία, αυχενική δυσκαμψία, ναυτία, τάσεις για εμετό και ευαισθησία στο φως (13). Ιδιαίτερη σημασία πρέπει να δίνεται στις εγκυμονούσες διότι αρκετά συμπτώματα της μηνιγγίτιδας είναι όμοια με εκείνα της εγκυμοσύνης, όπως για παράδειγμα η ναυτία ή ο πονοκέφαλος. Επίσης, αναφέρεται στη βιβλιογραφία ότι αρκετές γυναίκες διστάζουν να υποβληθούν σε εξετάσεις, όπως είναι η παρακέντηση καθώς φοβούνται για την ακεραιότητα του εμβρύου (15). Στα νεογνά, η διάγνωση των συμπτωμάτων μπορεί να είναι δύσκολη, ωστόσο υπάρχουν κάποια σημάδια τα οποία μπορεί να υποδηλώσουν την ύπαρξη της νόσου. Τέτοια συμπτώματα είναι μια «μη- φυσιολογική» διόγκωση στο μαλακό σημείο της κεφαλής του μωρού ή η έλλειψη αντανακλαστικών (13).

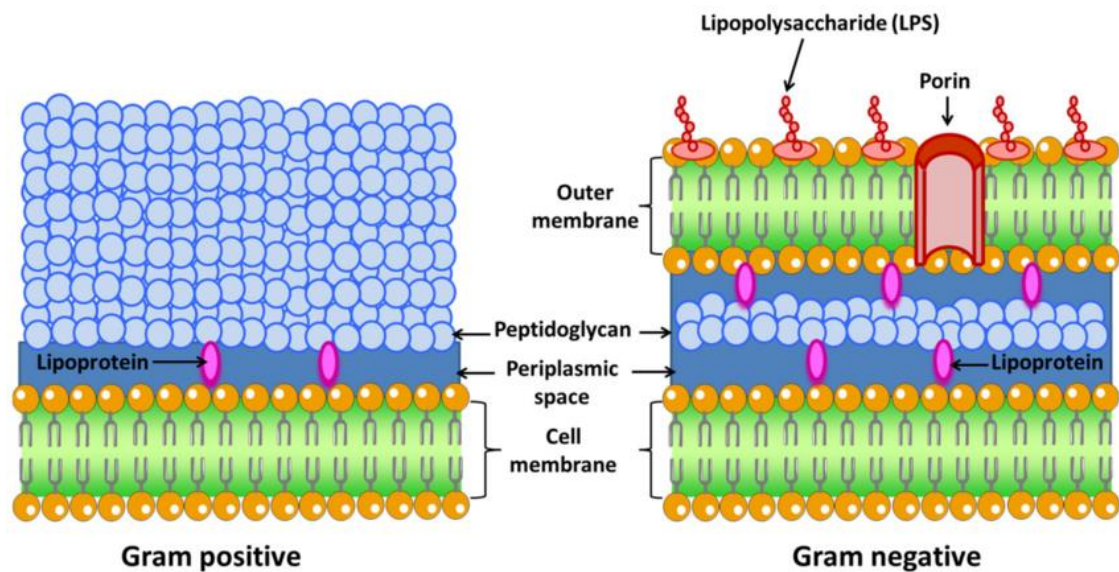
### **1.1.2. Διάγνωση βακτηριακής μηνιγγίτιδας**

#### *1.1.2.1. Μικροβιολογική διάγνωση βακτηριακής μηνιγγίτιδας*

Μια βασική ταξινόμηση των βακτηρίων είναι σε Gram θετικά (+) και Gram αρνητικά (-), η οποία βασίζεται στη διαπερατότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων καθώς και των μεμβρανών τους, έπειτα από την εφαρμογή της τεχνικής της χρώσης Gram. Ο μηχανισμός της χρώσης Gram βασίζεται κυρίως στη δομή των βακτηρίων, καθώς τα Gram (+) βακτήρια διαθέτουν ένα παχύ κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο αποτελείται από έναν πολυσακχαρίτη, την πεπτιδογλυκάνη. Οι εν λόγω πολυσακχαρίτες, ενώνονται μεταξύ τους με αλυσίδες πεπτιδίων και δημιουργούν ένα άκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα (16,17). Αντίθετα, τα Gram (-) βακτήρια έχουν ένα λεπτότερο στρώμα πεπτιδογλυκάνης σε σχέση με τα Gram (+), ωστόσο έχουν μια πρόσθετη εξωτερική μεμβράνη, η οποία περιέχει λιποπολυσακχαρίτες, τα οποία διαχωρίζονται από το κυτταρικό τοίχωμα μέσω του περιπλασμικού χώρου (Εικόνα 2) (16). Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του τοιχώματος των Gram (-) βακτηρίων, είναι η λοιμογόνος δράση του, στην οποία οφείλεται η πρόκληση ασθενειών (18).

**Εικόνα 2: Διαφορές στη δομή του κυτταρικού τοιχώματος και κυτταρικής μεμβράνης Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων.**

Πηγή: [https://www.researchgate.net/publication/357901900\\_Bacteria-Assisted\\_Transport\\_of\\_Nanomaterials\\_to\\_Improve\\_Drug\\_Delivery\\_in\\_Cancer\\_Therapy](https://www.researchgate.net/publication/357901900_Bacteria-Assisted_Transport_of_Nanomaterials_to_Improve_Drug_Delivery_in_Cancer_Therapy)



### 1) Χρώση Gram

Η διαδικασία της χρώσης Gram αποτελείται από 4 στάδια. Αρχικά, εφαρμόζεται η χρωστική crystal violet σε μονιμοποιημένο με θέρμανση βακτηριακό δείγμα, όπου τα ιόντα της χρωστικής διεισδύουν στο κυτταρικό τοίχωμα και την κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων. Ως αποτέλεσμα της παραπάνω χρωστικής είναι, τα θετικά ιόντα (κατιόντα) να αλληλοεπιδράσουν με τα αρνητικά φορτισμένα στοιχεία του τοιχώματος των βακτηριακών κυττάρων και να σημανθεί μωβ το κυτταρικό τοίχωμα (Εικόνα 3A) (16).

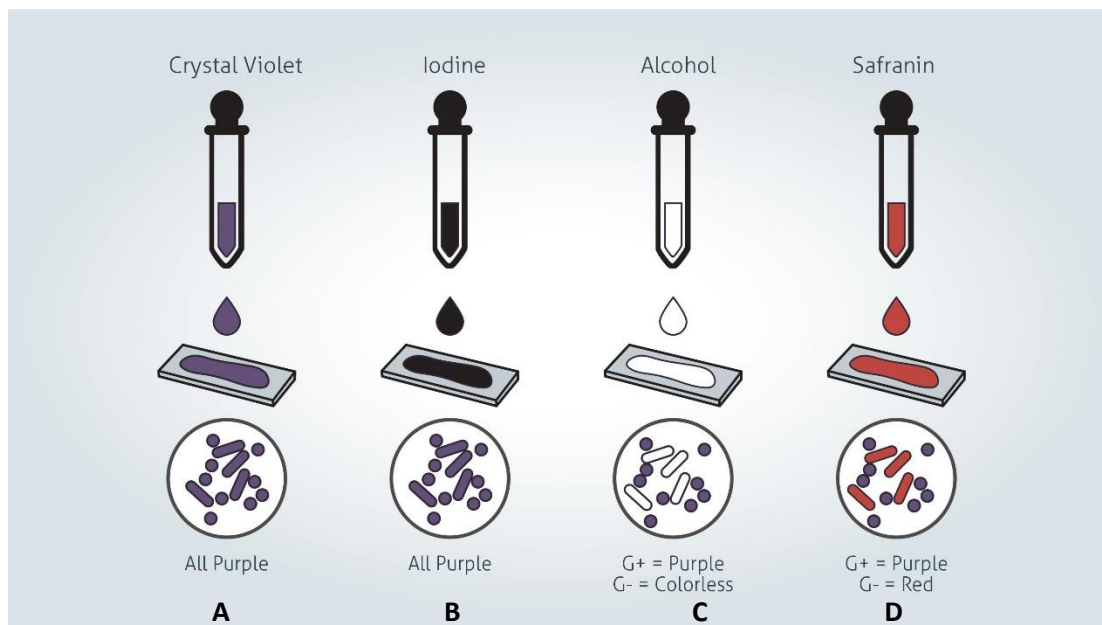
Στη συνέχεια, προστίθεται διάλυμα ιωδίου, το οποίο δημιουργεί ένα σύμπλεγμα με τη χρώση crystal violet, εξυπηρετώντας στη δέσμευσή της (Εικόνα 3B). Επιπλέον, ακολουθεί αποχρωματισμός του παρασκευάσματος με διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης. Η αλκοόλη έχει τη δυνατότητα καταστροφής της εξωτερικής μεμβράνης των Gram (-) βακτηρίων, αφήνοντάς τα βακτήρια άχρωμα (Εικόνα 3C) (16).

Τέλος, προκειμένου να γίνουν ορατά στο μικροσκόπιο τα Gram (-) βακτήρια, πρέπει να σημανθούν με μια θετικά φορτισμένη χρωστική, τη σαφρανίνη. Η σαφρανίνη, χρωματίζει ροζ μόνο τα Gram (-) βακτηριακά κύτταρα, καθώς στην περίπτωση των

Gram (+) το ροζ χρώμα επικαλύπτεται από το μωβ της χρωστικής crystal violet (Εικόνα 3D) (16).

### Εικόνα 3: Τεχνική της χρώσης Gram

Πηγή: <https://www.technologynetworks.com/immunology/articles/Gram-positive-vs-Gram-negative-323007>



#### 1.1.2.2. Βιοχημική διάγνωση βακτηριακής μηνιγγίτιδας

Η διάγνωση της βακτηριακής μηνιγγίτιδας σε βιοχημικό επίπεδο περιλαμβάνει την αξιολόγηση των χαρακτηριστικών του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ΕΝΥ) ως προς την όψη, τον τύπο και τον αριθμό των κυττάρων, καθώς επίσης και τα επίπεδα της γλυκόζης και της πρωτεΐνης (Πίνακας 2)(19).

Συγκεκριμένα, κατά την αξιολόγηση του ΕΝΥ σε περιπτώσεις βακτηριακής μηνιγγίτιδας έχει βρεθεί ότι, η όψη του είναι θολή ενώ παράλληλα παρατηρείται ένας μεγάλος αριθμός πολυμορφοπύρηνων κυττάρων. Αντίθετα, τα χαρακτηριστικά ενός δείγματος ΕΝΥ, ενός υγιούς ατόμου χαρακτηρίζονται από μια διαυγή όψη, και με λιγότερα από 25 κύτταρα/  $\mu\text{L}$  (20,21).

**Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά εγκεφαλονωτιαίου υγρού σε λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος βακτηριακής αιτιολογίας**

Όψη ENY	Χαρακτηριστικά ENY	Φυσιολογικές τιμές/ ηλικιακή ομάδα	
		Ενήλικες και παιδιά	Βρέφη
	Θολή	Διαυγής	
Τύπος κυττάρων	Πολυμορφοπύρρηνα		
Αριθμός κυττάρων	> 1000	< 5 $\mu$ L	< 25 $\mu$ L
Γλυκόζη	< 45 mg/ dl	47- 75 mg/ dl	
Πρωτεΐνη	50- 200 mg/ dl	< 50 mg/ dl	< 150 mg/ dl

## 1.2. Αίτια ιογενούς μηνιγγίτιδας

Αρκετοί ιοί ευθύνονται για την πρόκληση της άσηπτης μηνιγγίτιδας, μεταξύ των οποίων είναι ιοί των οικογενειών *Picornaviridae*, *Herpesviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviruses*, *Arenaviridae* καθώς και των αρμποϊών (22–24). Ειδικότερα, οι ιοί της οικογένειας των *Picornaviridae* περιλαμβάνουν τους εντεροϊούς και τους παρεχοϊούς (Human parechovirus- HPeV). Οι εντεροϊοί (EVs) μεταδίδονται αερογενώς, μέσω της κοπρανοστοματικής οδού και με κάθετη μετάδοση από τη μητέρα στο έμβρυο. Η λοίμωξη του ΚΝΣ γίνεται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος από τη μόλυνση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα πιο γνωστά είδη εντεροϊών, τα οποία προκαλούν μηνιγγίτιδα είναι ο *Coxsackievirus B* και ο *Enterovirus D68* (EV-D68). Οι παρεχοϊοί (HPeV) μεταδίδονται εξίσου αερογενώς προκαλώντας λοιμώξεις του αναπνευστικού αλλά μπορεί και να προκαλέσουν νευρολογικές διαταραχές, όπως μηνιγγίτιδα, σε παιδιά με το πιο γνωστό εμπλεκόμενο τύπο HPeV-3 (22).

Οι ιοί της οικογένειας *Herpesviridae* με κυριότερους τύπους τους HSV-1 και 2, VZV (varicella- zoster virus) και EBV (Epstein- Barr virus) έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν μηνιγγίτιδα δημιουργώντας παράλληλα βλάβες στου νευρώνες (22,24). Επιπρόσθετα, οι ιοί της γρίπης που ανήκουν στην οικογένεια των *Orthomyxoviridae* συχνά προκαλούν πνευμονία, μπορούν ακόμη να προκαλέσουν μια πληθώρα νοσημάτων όπως για παράδειγμα μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα, μηνιγγοεγκεφαλίτιδα και μυελίτιδα (24). Έχει βρεθεί πως τα οξέα των επιθηλιακών κυττάρων του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού συστήματος

στα οποία προσδένεται ο ιός, εντοπίζονται και στο φλοιό του εγκεφάλου όπως και στο στέλεχος (22).

Ένας ακόμα ιός που προκαλεί μηνιγγίτιδα είναι ο *Lymphocytic Choriomeningitis Virus* (LCMV), ο οποίος ανήκει στην οικογένεια των *Arenaviridae* και μεταδίδεται κυρίως μέσω των τρωκτικών (24). Συγκεκριμένα, στο CDC αναφέρεται ότι το δάγμα του κοινού μυ (*Mus musculus*) που εντοπίζεται στις οικίες, μπορεί να μεταδώσει τον ιό. Αξίζει να αναφερθεί ότι, ο LCMV έχει απομονωθεί και από άλλα είδη τρωκτικών, κατοικίδιων και μη, τα οποία έχουν μολυνθεί είτε από το περιβάλλον που διαβίωναν είτε από τα καταστήματα κατοικίδιων ζώων (25). Τέλος, διάφοροι ιοί που μεταδίδονται με αρθρόποδα (αρμποιόι) έχουν συσχετιστεί με λοιμώξεις του ΚΝΣ καθώς και με την πρόκληση μηνιγγίτιδας, όπως είναι ο *West Nile Virus* (WNV), *Eastern Equine Encephalitis Virus* και ο *La Crosse Virus* (22,24).

### 1.2.1. Διάγνωση ιογενούς μηνιγγίτιδας

Για τη διάγνωση της ιογενούς μηνιγγίτιδας, αξιολογείται το εγκεφαλονωτιαίο υγρό ως προς τις ίδιες παραμέτρους με την βακτηριακή μηνιγγίτιδα. Ωστόσο, παρατηρείται διαφορά ως προς το είδος των κυττάρων, καθώς στην ιογενή μηνιγγίτιδα παρατηρούνται λεμφοκύτταρα αντί των πολυμορφοπύρηνων, καθώς επίσης και ο αριθμός των κυττάρων είναι αρκετά χαμηλότερος σε σχέση με την βακτηριακή. Επιπλέον, αναφορικά με τα επίπεδα της γλυκόζης και της πρωτεΐνης στο ENY, συνήθως δε σημειώνονται μεγάλες αποκλίσεις από τις φυσιολογικές τιμές, παρά μόνο σε περιπτώσεις μηνιγγίτιδας από εντεροϊό (Πίνακας 3)(26).

**Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά εγκεφαλονωτιαίου υγρού σε λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος ιογενούς αιτιολογίας**

Όψη ENY	Χαρακτηριστικά ENY	Φυσιολογικές τιμές/ ηλικιακή ομάδα	
		Ενήλικες και παιδιά	Βρέφη
Τύπος κυττάρων	Θολή Λεμφοκύτταρα	Διαυγής	-
Αριθμός κυττάρων	< 500	< 5 $\mu$ L	< 25 $\mu$ L
Γλυκόζη	32 -80 mg/dl	47- 75 mg/ dl	
Πρωτεΐνη	40- 3704 mg/dl	< 50 mg/ dl	< 150 mg/ dl

### 1.3. Κλινική εικόνα μηνιγγίτιδας

#### 1.3.1. Βακτηριακή μηνιγγίτιδα

Κατά τα πρώτα στάδια, η κλινική εικόνα του ασθενούς με βακτηριακή μηνιγγίτιδα είναι παρόμοια με την κλινική εικόνα λοίμωξης του ανώτερου αναπνευστικού, ενώ στη συνέχεια επέρχονται εντονότερα χαρακτηριστικά συμπτώματα, όπως για παράδειγμα αυχενική δυσκαμψία, κεφαλαλγία καθώς και ελάττωση του επιπέδου συνείδησης (27). Η αξιολόγηση του επιπέδου συνείδησης γίνεται σύμφωνα με την κλίμακα της Γλασκώβης, σύμφωνα με την οποία ο ασθενής με υψηλότερο σκορ (μέγιστο 15) έχει χαμηλότερη θνητότητα από τον ασθενή με σκορ 3 (Πίνακας 4)(28).

*Πίνακας 4: Κλίμακα της Γλασκώβης*

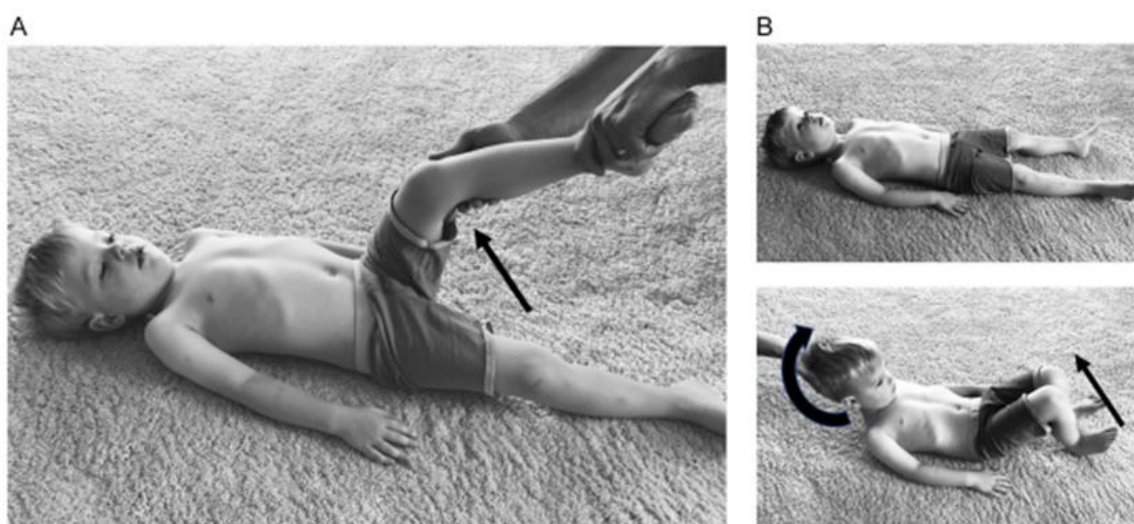
<b>Άνοιγμα ματιών</b>	Αυτόματη	4
	Ανταπόκριση σε λεκτικό σχόλιο	3
	Ανταπόκριση σε επώδυνο ερέθισμα	2
	Ουδεμία αντίδραση	1
<b>Αντίδραση σε προφορική εντολή</b>	Προσανατολισμένη	5
	Συγκεχυμένη	4
	Αδόκιμες λέξεις	3
	Ακατάλληλες λέξεις	2
	Ουδεμία αντίδραση	1
<b>Κινητική αντίδραση</b>	Εκτέλεση εντολών	6
	Εντοπισμός πόνου	5
	Απόσυρση στον πόνο	4
	Κάμψεις στον πόνο	3
	Έκταση στον πόνο	2
	Ουδεμία αντίδραση	1

Για την εξέταση της μηνιγγικής φλεγμονής, συνηθίζεται να χρησιμοποιούνται δυο τεχνικές προκειμένου να επιβεβαιωθεί η αυχενική δυσκαμψία του ασθενούς. Συγκεκριμένα, η εφαρμογή των τεχνικών αυτών, σημείο Brudzinski και σημείο Kernig, έχει ως αποτέλεσμα την αντίσταση του ασθενούς σε δοκιμασίες κάμψης

του αυχένα (Εικόνα 4A) και του γόνατος (Εικόνα 4B) (29,30). Ειδικότερα, με το σημείο Brudzinski διατείνονται οι μήνιγγες κατά την προσπάθεια του ασθενούς να εκτελέσει κάμψη του αυχένα προς το εμπρός, με αποτέλεσμα την έντονη αίσθηση του πόνου κατά τη δοκιμασία (29).

Αντίστοιχα, η δοκιμασία Kernig περιλαμβάνει την κάμψη του γόνατος του ασθενούς σε κλίση 45° γωνία (Εικόνα 4A). Η δοκιμασία αυτή, έχει ως αποτέλεσμα τη διαπίστωση ύπαρξης ενόχλησης- πόνου στην οσφυϊκή περιοχή (30).

**Εικόνα 4: Δοκιμασία Kernig (A) και Brudzinski (B).**



### **1.3.2. Ιογενής μηνιγγίτιδα**

Η κλινική εικόνα της ιογενούς μηνιγγίτιδας διαφοροποιείται από εκείνη της βακτηριακής μηνιγγίτιδας. Συγκεκριμένα, τα συχνότερα κλινικά σημεία ιογενούς μηνιγγίτιδας είναι η σοβαρή κεφαλαλγία, η φωτοφοβία, ο υψηλός πυρετός, η ναυτία και η αυχενική δυσκαμψία (26). Επιπλέον, μελέτες έχουν αναφέρει ως συχνά σημεία της ιογενούς μηνιγγίτιδας τα επιληπτικά επεισόδια, τις ψυχολογικές διακυμάνσεις καθώς επίσης και τα δερματικά εξανθήματα (31,32).

### **1.4. Θεραπευτικές προσεγγίσεις**

Σε περιπτώσεις όπου υπάρχει επιβεβαιωμένο κρούσμα μηνιγγίτιδας, θα πρέπει να ξεκινήσει η χορήγηση αντιμικροβιακής θεραπείας. Ωστόσο, επειδή σε κάποιες περιπτώσεις η αξιολόγηση των συμβατικών μικροβιολογικών δοκιμών δεν



παρέχει άμεσα αποτέλεσμα, κρίνεται σημαντική η έναρξη εμπειρικής θεραπείας σε άτομα με υποψία για μηνιγγίτιδα (33,34).

Το φαρμακευτικό σχήμα για την έναρξη εμπειρικής θεραπείας κατά της μηνιγγίτιδας εξαρτάται από βιολογικούς παράγοντες, όπως η ηλικία και η ανοσολογική κατάσταση του ασθενούς. Συγκεκριμένα, έχουν θεσπιστεί διάφορα εναλλακτικά σχήματα εμπειρικής θεραπείας έχοντας ως κοινή βάση τη χορήγηση αντιφλεγμονωδών όπως η δεξαμεθαζόνη (dexamethasone) και η κεφτριαζόνη (ceftriaxone) (34).

Στην Ευρώπη, προτείνεται η συμπληρωματική χορήγηση του αντιβιοτικού βανκομυκίνη (vancomycine) στο παραπάνω σχήμα, προκειμένου να παρέχει στον ασθενή προστασία έναντι στελεχών πνευμονιοκόκκου, ανθεκτικά στην κεφτριαζόνη και την πενικιλίνη (34,35).

#### **1.4.1. Βακτηριακή μηνιγγίτιδα**

Η αντιμετώπιση της βακτηριακής μηνιγγίτιδας γίνεται με τη χρήση διάφορων αντιμικροβιακών φαρμάκων καθώς και με συνδυασμούς τους. Η επιλογή του φαρμάκου, μαζί με τη δοσολογία και τη διάρκεια της αγωγής καθορίζονται βάσει παραμέτρων. Συγκεκριμένα, οι παράμετροι που λαμβάνονται υπόψη είναι το είδος του βακτηρίου, Gram (+) ή Gram (-) και η ηλικία του ασθενούς σε συνάρτηση με άλλα κλινικά χαρακτηριστικά, τα οποία επηρεάζουν το σχήμα της φαρμακευτικής αγωγής (34).

##### *1.4.1.1. Gram (-) βακτήρια*

Στα Gram (-) βακτήρια, έχει παρατηρηθεί ότι η εξωτερική τους μεμβράνη, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη αντοχής έναντι των αντιμικροβιακών φαρμάκων, όπως είναι οι β- λακτάμες, οι κινολόνες και οι κολιστίνες (36). Συνεπώς, η αντιμετώπισή τους χρήζει ιδιαίτερου σχεδιασμού κατάλληλων φαρμακευτικών σχημάτων, προκειμένου να είναι αποτελεσματικές.

Για παράδειγμα, σε περιπτώσεις μηνιγγίτιδας από *Neisseria meningitidis*, προτού ξεκινήσει φαρμακευτική αγωγή, πρέπει να αξιολογούνται χαρακτηριστικά του εν λόγω μικροοργανισμού, όσον αφορά την αντοχή του σε αντιβιοτικά. Η παραπάνω δοκιμή, πραγματοποιείται με τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής

συγκέντρωσης (MIC- Minimum Inhibitory Concentration, e- test). Το αποτέλεσμα της MIC βοηθά στην επιλογή και στον προσδιορισμό της δόσης χορήγησης των κατάλληλων αντιμικροβιακών φαρμάκων (37).

Ειδικότερα, για τον μηνιγγιτιδόκοκκο λαμβάνεται υπόψη η τιμή της MIC στην πενικιλίνη, προκειμένου να δοθεί το κατάλληλο αντιβιοτικό. Συγκεκριμένα, όταν η MIC για την πενικιλίνη είναι  $<0.1 \mu\text{g/ml}$  τότε χορηγείται αμπικιλίνη ή κεφοταξίμη ή κεφτριαξόνη για 5- 7 ημέρες ενώ σε υψηλότερες τιμές MIC ( $0.1- 1.0 \mu\text{g/ml}$ ) τότε χορηγείται μόνο κεφοταξίμη ή κεφτριαξόνη για 1 εβδομάδα περίπου (35,38).

#### 1.4.1.2. Gram (+) βακτήρια

Σύμφωνα με την πρόσφατη έκθεση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας η οποία αφορά στην ανάπτυξη αντιβιοτικών σχημάτων για την καταπολέμηση βακτηρίων, κατατάσσει τα Gram (+) βακτήρια, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται ο *Streptococcus pneumoniae* αλλά και άλλα είδη στρεπτοκόκκων (*Streptococcus* spp., όπως οι β- αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι ομάδας A και B (GAS και GBS)), στην κατηγορία μεσαίου κινδύνου (39).

Η επιλογή κατάλληλου αντιβιοτικού έναντι του *Streptococcus pneumoniae* αρκετές φορές χρήζει μελέτης, καθώς η αντοχή του πνευμονιοκόκκου στα αντιβιοτικά και ειδικότερα στην πενικιλίνη και στις 3<sup>ης</sup> γενιάς κεφαλοσπορίνες, αυξάνεται με ταχύ ρυθμό (40). Ειδικότερα, σε περιπτώσεις πνευμονοκοκκικής μηνιγγίτιδας, όπου ο πνευμονιόκοκκος που έχει απομονωθεί και παρουσιάζει MIC  $< 0.1 \mu\text{g/mL}$ , προτείνεται η χορήγηση πενικιλίνης ενώ σε τιμές μεγαλύτερες από  $0.1 \mu\text{g/mL}$ , τα κύρια αντιβιοτικά που χορηγούνται είναι η κεφοταξίμη ή η κεφτριαξόνη (Πίνακας 5) (40).

**Πίνακας 5: Αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση της βακτηριακής μηνιγγίτιδας στην κοινότητα**

Πηγή: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X16000203>

Microorganism	Standard treatment	Alternatives	Duration
<i>Streptococcus pneumoniae</i>			
Penicillin susceptible (MIC <0.1 µg/mL)	Penicillin or amoxicillin/ampicillin	Ceftriaxone, cefotaxime, chloramphenicol	10–14 days
Penicillin resistant (MIC >0.1 µg/mL), third-generation cephalosporin susceptible (MIC <2 µg/mL)	Ceftriaxone or cefotaxime	Cefepime, meropenem, moxifloxacin <sup>b</sup>	10–14 days
Cephalosporin resistant (MIC ≥2 µg/mL)	Vancomycin plus rifampicin, or vancomycin plus ceftriaxone or cefotaxime, or rifampicin plus ceftriaxone or cefotaxime <sup>c</sup>	Vancomycin plus moxifloxacin, <sup>b</sup> linezolid	10–14 days
<i>Neisseria meningitidis</i>			
Penicillin susceptible (MIC <0.1 µg/mL)	Penicillin or amoxicillin/ampicillin	Ceftriaxone, cefotaxime, chloramphenicol	7 days
Penicillin resistant (MIC ≥0.1 µg/mL)	Ceftriaxone or cefotaxime	Cefipime, meropenem, ciprofloxacin or chloramphenicol	7 days

Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γεγονός ότι, στρεπτόκοκκοι όπως για παράδειγμα ο *S. mitis*, ο *S. salivarius* και ο *S. oralis* έχουν αναπτύξει αντοχή στις β-λακτάμες, στις λινεζολίδες καθώς επίσης και στις αμινογλυκοσίδες δημιουργώντας δυσκολία στην επιλογή του κατάλληλου αντιβιοτικού. Για το λόγο αυτό, έχει εγκριθεί η χρήση αρκετών αντιβιοτικών για την αντιμετώπιση στρεπτοκοκκικών λοιμώξεων, όπως οι κεφαλοσπορίνες, οι κινολόνες και τα γλυκοπεπτίδια (40).

#### 1.4.2. Ιογενής μηνιγγίτιδα

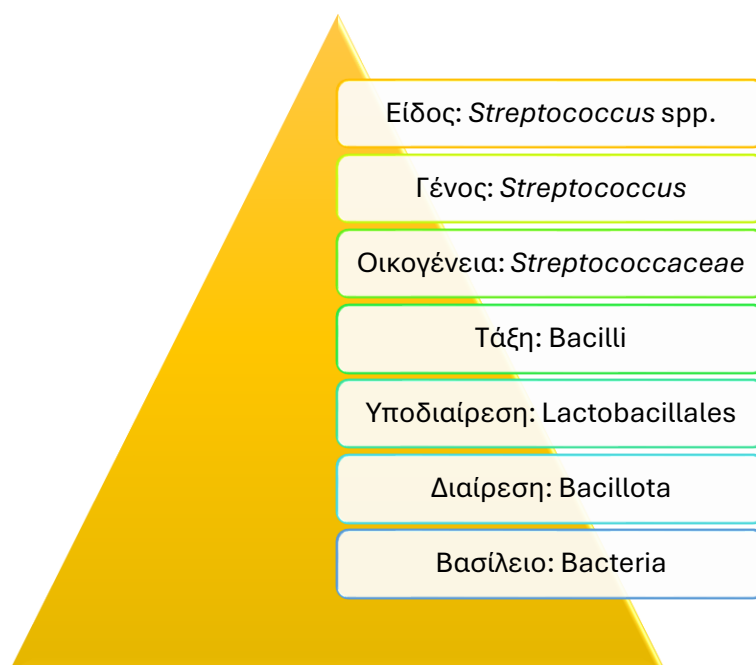
Στην περίπτωση της ιογενούς μηνιγγίτιδας, τα συμπτώματα υποχωρούν σε διάστημα 14 ημερών από την έναρξη των συμπτωμάτων. Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι, η χορήγηση θεραπείας προτείνεται μόνο για προληπτικούς λόγους, προκειμένου να αποφευχθούν περαιτέρω επιπλοκές (33). Σύμφωνα με το CDC, χορήγηση αντιικών φαρμάκων γίνεται μόνο σε συγκεκριμένες περιπτώσεις ιογενούς μηνιγγίτιδας, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση του ερπητοϊού (HSV) (24). Στην περίπτωση αυτή, έχει αποδειχθεί ότι η χορήγηση ακυκλοβίρης (acyclovir) βοηθάει στην καταπολέμηση των συμπτωμάτων της λοίμωξης (34).

## 2. Στρεπτόκοκκοι

### 2.1. Γενικά

Οι στρεπτόκοκκοι αποτελούν την οικογένεια των *Streptococcaceae*, η οποία ανήκει στην τάξη των Lactobacillales του βασιλείου των βακτηρίων (Εικόνα 5)(6,41,42). Τα βακτήρια του είδους *Streptococcus* spp. είναι Gram (+) μικροοργανισμοί με μέγεθος μικρότερο από 2 μm, τα οποία δεν μπορούν να διασπάσουν το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο, δίνοντας αρνητική δοκιμασία καταλάσης (41,43).

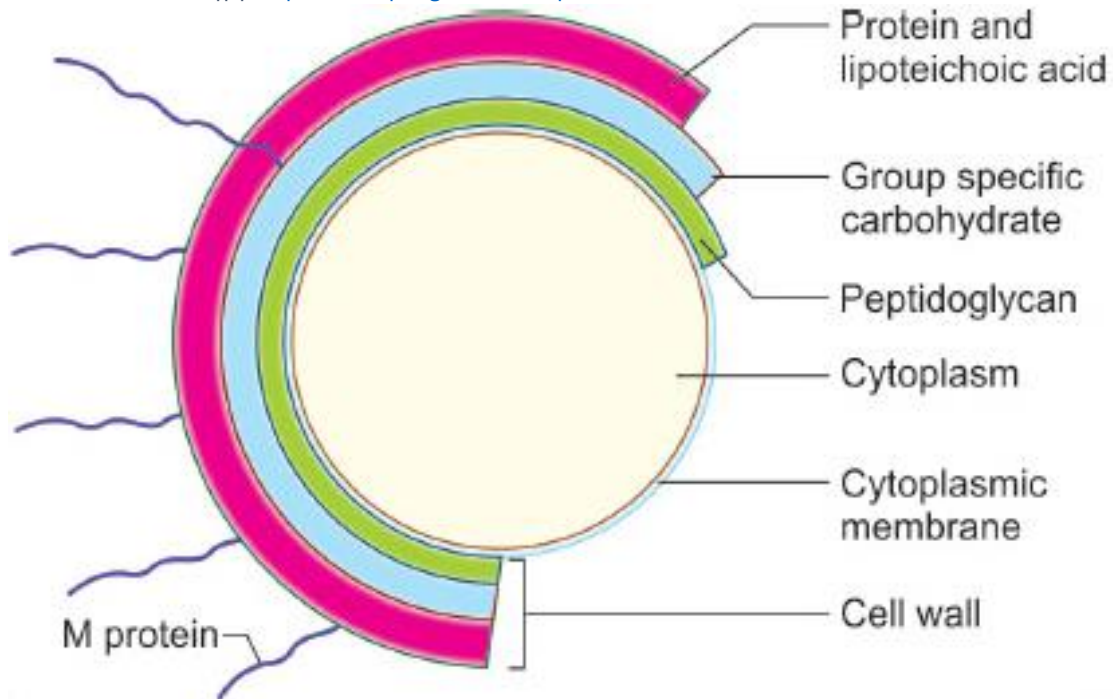
Εικόνα 5: Ταξινόμηση στρεπτόκοκκων



Το κυτταρικό τους τοίχωμα αποτελείται από πεπτιδογλυκάνη με γλυκοζαμίνη και μουρικό οξύ, ενώ προσδεμένοι πάνω σε αυτό εντοπίζονται διάφοροι υδρογονάνθρακες, πρωτεϊνικά αντιγόνα και τειχοϊκό οξύ, συμβάλλοντας στη διαφοροποίηση των ειδών μεταξύ τους, όπως παρουσιάζονται στην Εικόνα 6. Τα περισσότερα είδη στρεπτόκοκκων αναπτύσσονται βέλτιστα σε θερμοκρασία 37°C, ωστόσο είδη όπως ο *S.uberis* παρουσιάζουν ανάπτυξη σε πολύ χαμηλότερες θερμοκρασίες (41).

**Εικόνα 6: Απεικόνιση του κυτταρικού τοιχώματος των στρεπτόκοκκων.**

Πηγή: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-19-3315-8\\_26](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-19-3315-8_26)



Οι στρεπτόκοκκοι αποτελούν μέλη της ομάδας των βακτηρίων της φυσιολογικής χλωρίδας που εντοπίζονται σε διάφορα συστήματα, όπως το γαστρεντερικό, το αναπνευστικό και το ουροποιητικό. Ένα χαρακτηριστικό των κοινών βακτηρίων είναι πως δεν αποτελούν πάντοτε απειλή για την υγεία, αλλά συμμετέχουν στην άμυνα του οργανισμού (44). Παρόλα αυτά, ορισμένοι στρεπτόκοκκοι μπορούν να χαρακτηριστούν ως παθογόνοι, τόσο για τον άνθρωπο, όσο και για τα ζώα εμφανιζόμενοι ολόένα και με μεγαλύτερη συχνότητα. Τα τελευταία χρόνια, έχει παρατηρηθεί μια αύξηση σε κρούσματα από διάφορα είδη στρεπτόκοκκων που σχετίζονται με ιατρικές πράξεις και το ευρύτερο νοσοκομειακό περιβάλλον (45).

## 2.2. Ταξινόμηση

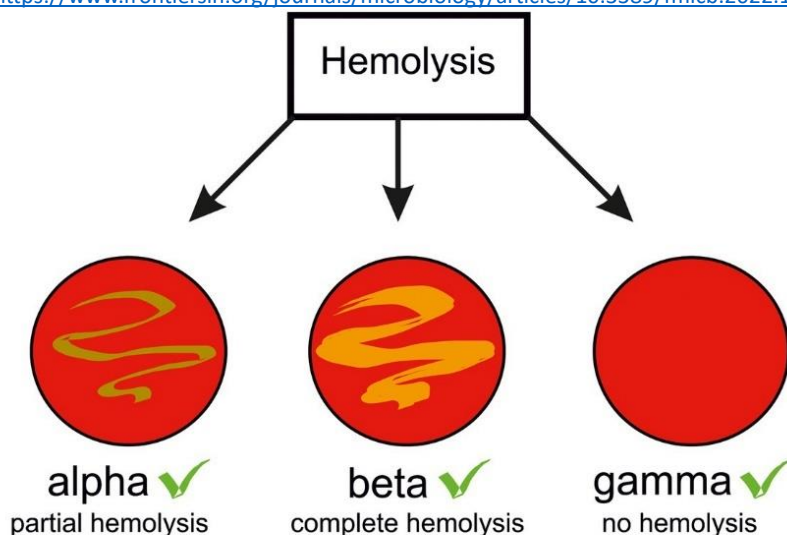
Παλαιότερα το γένος των στρεπτόκοκκων διαχωριζόταν σε 3 γένη, στους εντερόκοκκους (*Enterococcus*), στους λακτόκοκκους (*Lactococcus*) και στους στρεπτόκοκκους (*Streptococcus*). Αργότερα, λόγω ορισμένων αλλαγών στα γένη, αλλά και με την εξέλιξη των μοριακών τεχνικών το γένος των *Streptococcus* spp. διαφοροποιήθηκε από τα υπόλοιπα (46). Ακόμη και σήμερα ο ακριβής διαχωρισμός και η ταξινόμηση των στρεπτόκοκκων παρουσιάζει μια δυσκολία στα μικροβιολογικά εργαστήρια, καθώς χρειάζεται ο προσδιορισμός αρκετών παραμέτρων. Συγκεκριμένα, χρειάζονται να ληφθούν υπόψη τόσο οι αιμολυτικές

τους ιδιότητες, όσο και η ύπαρξη αντιγόνων κατά *Lancefield*, οι διάφορες βιοχημικές αντιδράσεις και η μορφολογία των αποικιών (7,41).

Ο πρώτος διαχωρισμός των στρεπτόκοκκων γίνεται βάσει των αιμολυτικών τους ιδιοτήτων, χωρίζοντάς τους σε α-, β- και γ- αιμολυτικούς. Κατά τη διαδικασία της αιμόλυσης, οι στρεπτόκοκκοι παράγουν υπεροξειδίο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) το οποίο καταστρέφει τα ερυθροκύτταρα και απελευθερώνει την αιμοσφαιρίνη (7). Οι α- αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι, προκαλούν ατελή λύση των ερυθρών κυττάρων και παράγουν μια πράσινη χρωστική, ενώ οι β- αιμολυτικοί προκαλούν την πλήρη διάσπαση των ερυθροκυττάρων παράγοντας λευκή χρωστική. Τέλος, οι γ- αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι δεν προκαλούν αιμόλυση (41).

**Εικόνα 7: Είδη αιμόλυσης.**

Πηγή: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2022.1025136/full>



Η ύπαρξη αντιγόνων κατά *Lancefield* αντικατοπτρίζει την ορολογική ειδικότητα διάφορων ουσιών και άλλων αντιγόνων του κυτταρικού τοιχώματος των β- αιμολυτικών στρεπτόκοκκων (7,47). Συνεπώς, η ταξινόμηση και η ονοματολογία τους στηρίζεται στα εν λόγω αντιγόνα και διαχωρίζονται σε ομάδες (groups) A (GAS), B (GBS), C (GCS), D (GDS), E (GES), F (GFS) και G (GGS) (41). Παρόλο που, η οροτυπία κατά *Lancefield* βοήθησε αρκετά στην ταξινόμηση των διάφορων ειδών, ανακαλύφθηκε ότι ορισμένοι στρεπτόκοκκοι οι οποίοι διέφεραν μεταξύ τους μοιράζονταν κοινά ομαδικά αντιγόνα, γεγονός που δυσκόλεψε περαιτέρω την ταξινόμησή τους αργότερα (6).

Ωστόσο, η εξέλιξη των μοριακών τεχνικών και της αλληλούχισης βασικών γονιδίων των στρεπτοκόκκων έδωσε τη δυνατότητα κατάταξης τους σε 6 μεγάλες ομάδες, οι οποίες παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα και αναφέρονται ως Pyogenic, Mitis, Anginosus, Bovis, Mutans και Salivarius (Πίνακας 6)(48,49). Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως οι στρεπτόκοκκοι που ανήκουν στις ομάδες Mitis, Anginosus, Mutans και Salivarius, συχνά αναφέρονται και ως *viridans streptococci* (VS) λόγω της αιμολυτικής του ιδιότητας να παράγουν πράσινη χρωστική (6).

**Πίνακας 6: Ταξινόμηση στρεπτόκοκκων ανά γένος και είδος**

Πηγή: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118655252.ch28>

<b>Streptococcus spp.</b>					
<b>Pyogenic Group</b>	<b>Bovis Group</b>	<b>Viridans Streptococci (VS)</b>			
		<b>Mitis Group</b>	<b>Anginosus Group</b>	<b>Mutans Group</b>	<b>Salivarius Group</b>
<i>S. agalactiae</i>	<i>S. alactolyticus</i>	<i>S. australis</i>	<i>S. anginosus</i>	<i>S. caballi</i>	<i>S. salivarius</i>
<i>S. canis</i>	<i>S. equinus</i>	<i>S. cristatus</i>	<i>S. constellatus</i>	<i>S. criceti</i>	<i>S. thermophilus</i>
<i>S. castoreus</i>	<i>S. gallolyticus</i>	<i>S. gordonii</i>	subsp.	<i>S. dentapri</i>	<i>S. vestibularis</i>
<i>S. didelphis</i>	subsp. gallolyticus	<i>S. infantis</i>	constellatus	<i>S.</i>	
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	<i>S. gallolyticus</i> subsp.	<i>S. lactarius</i>	<i>S. constellatus</i> subsp.	<i>S. devriesei</i>	
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	macedonicus	<i>S. mitis</i>	pharyngis	<i>S. downei</i>	
<i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i>	<i>S. gallolyticus</i> subsp.	<i>S. oligofermentans</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. ferus</i>	
<i>S. equi</i> subsp. <i>ruminatorum</i>	subsp.	<i>S. oralis</i>	<i>S. troglodytidis</i>	<i>S. macacae</i>	
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	pasteurianus	<i>S. parasanguinis</i>		<i>S. mutans</i>	
<i>S. halichoeri</i>	<i>S. infantarius</i>	<i>S. peroris</i>		<i>S. orisratti</i>	
<i>S. ictaluri</i>	subsp. infantarius	<i>S. pseudopneumoniae</i>		<i>S. orisuis</i>	
<i>S. iniae</i>	<i>S. infantarius</i> subsp. coli	<i>S. pneumoniae</i>		<i>S. rattii</i>	
<i>S. parauberis</i>	<i>S. lutetiensis</i>	<i>S. sanguinis</i>		<i>S. sobrinus</i>	
<i>S. phocae</i>		<i>S. sinensis</i>		<i>S. troglodytae</i>	
<i>S. porcinus</i>		<i>S. tigurinus</i>		<i>S. ursoris</i>	
<i>S. pseudoporcinus</i>					
<i>S. pyogenes</i>					
<i>S. uberis</i>					
<i>S. urinalis</i>					

### **2.2.1. Pyogenic Streptococci Group**

Τα βακτήρια της συγκεκριμένης ομάδας αποτελούν αιτιολογικό παράγοντα αρκετών λοιμώξεων στον άνθρωπο, μεταξύ των οποίων είναι η φαρυγγίτιδα, η πνευμονία, η βακτηριαμία, η σηψαιμία και η μηνιγγίτιδα (6,50). Το πιο διαδεδομένο είδος της συγκεκριμένης οικογένειας είναι ο *Streptococcus pyogenes* (Group A στρεπτόκοκκος (GAS)) (6). Η κοινή πορεία μετάδοσής τους είναι άμεσα από άνθρωπο σε άνθρωπο μέσω της αναπνευστικής οδού, ωστόσο έχουν καταγραφεί επιδημικές εξάρσεις λόγω επιμολυσμένων τροφίμων από χειριστές, οι οποίοι ήταν αποικισμένοι με GAS (51). Ωστόσο, μέλη της συγκεκριμένης ομάδας αποτελούν και άλλοι στρεπτόκοκκοι, οι οποίοι ταξινομούνται κατά *Lancefield* ως Group C (GCS) και Group G (GGS), όπως για παράδειγμα ο *Streptococcus dysgalactiae*.

Οι στρεπτόκοκκοι που ανήκουν στο είδος *S. dysgalactiae* ταξινομούνται περαιτέρω σε *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) (Group C & G) και σε *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (Group C). Ειδικότερα, οι *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* εντοπίζονται κυρίως σε ζώα, αλλά έχουν αναφερθεί και περιστατικά νόσησης ανθρώπων, οι οποίοι είτε βρίσκονταν σε ανοσοκαταστολή είτε είχαν έρθει σε επαφή με μολυσμένα ζώα ή είχαν καταναλώσει παράγωγα προϊόντα μολυσμένων ζώων (52). Συχνότερο αίτιο μόλυνσης από *S. dysgalactiae* στον άνθρωπο, είναι το υποείδος *equisimilis* (SDSE), το οποίο αποικίζει τη ρηνοφαρυγγική κοιλότητα, το δέρμα αλλά και τα γεννητικά όργανα. Η μετάδοση του πραγματοποιείται με την άμεση επαφή του ανθρώπου με σταγονίδια ή με μολυσμένο δέρμα (53,54). Έχει παρατηρηθεί ότι, η παθογονικότητα του SDSE οφείλεται σε μεταφορά γονιδίου της πρωτεΐνης M από τον *S. pyogenes* (GAS), ο οποίος είναι αρκετά παθογόνος για τον άνθρωπο (55).

### **2.2.2. Bovis Streptococci Group**

Οι στρεπτόκοκκοι της ομάδας *Bovis* περιλαμβάνουν είδη τα οποία αποικίζουν το γαστρεντερικό σωλήνα υγιών ανθρώπων αλλά και την περιοχή των γεννητικών οργάνων τόσο των ανθρώπων όσο και των ζώων (56). Σήμερα, οι συγκεκριμένοι στρεπτόκοκκοι έχουν μετανομαστεί από *S. bovis* σε *S. gallolyticus* και διαχωρίζεται σε 3 υποείδη: *gallolyticus*, *macedonicus*, και *pasteurianus* (57).



Στην ομάδα των στρεπτόκοκκων *bovis* (SBG), οι οποίοι σχετίζονται με περιστατικά μηνιγγίτιδας και σηψαιμίας, ανήκουν ο *S. gallolyticus* subsp. *pasterianus* (προηγούμενη ονομασία *S. bovis* biotype II) και ο *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, (προηγούμενη ονομασία *S. bovis* biotype I), διαμορφώνοντας την ομάδα D κατά *Lancefield* (6,58,59). Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου των ανθρώπων καθώς και των ζώων (60).

Ειδικότερα, στον παιδικό πληθυσμό, ως πιο συχνό αίτιο μηνιγγίτιδας από SBG είναι ο *S. gallolyticus* subsp. *pasterianus*, με τη μετάδοσή του να αποδίδεται σε μεταφορά από τη μητέρα στο έμβρυο (ενδομητρική λοίμωξη) ή κατά τη διάρκεια παραμονής του εμβρύου στο νοσοκομείο (61). Παρά το γεγονός ότι, το ποσοστό προσβολής με μηνιγγίτιδα από *S. gallolyticus* είναι αρκετά χαμηλό, έχουν περιγραφεί παράγοντες κινδύνου όπως ενδοκαρδίτιδα και νόσοι του παχέος εντέρου (62).

### **2.2.3. *Mitis Streptococci Group***

Τα είδη των στρεπτόκοκκων που ανήκουν στην ομάδα των *S. mitis* αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος, της στοματικής κοιλότητας καθώς και του ρινοφάρυγγα. Τα πιο γνωστά είδη της ομάδας αυτής είναι ο *S. pneumoniae*, ο *S. mitis* και ο *S. oralis*, ωστόσο σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ένα «νέο- αναδυόμενο» παθογόνο της ίδιας ομάδας στρεπτόκοκκων, *S. pseudopneumoniae*, παρουσιάζει μια ιδιαιτερότητα ως προς την παθογένεια αλλά και την ταυτοποίηση του (6).

Κατά την ταυτοποίηση του *S. pseudopneumoniae* με την εφαρμογή απλών συμβατικών και μοριακών τεχνικών, παρουσιάζεται μια δυσκολία καθώς διαθέτει αρκετές ομοιότητες με τον *S. pneumoniae* και τον *S. mitis* (63). Συγκεκριμένα παρουσιάζεται ως ένα κοντινό φαινοτυπικά αλλά και γενετικά είδος με τον *S. pneumoniae*, τον *S. mitis* και τον *S. oralis* (64), καθώς ορισμένα γονίδια σχετιζόμενα με λοιμογόνους παράγοντες του πνευμονιοκόκκου, έχουν εντοπιστεί στο γονιδίωμα ορισμένων στρεπτόκοκκων που ανήκουν στους *S. mitis*. Το γεγονός αυτό, προκύπτει από την κοινή εξέλιξη των μικροοργανισμών καθώς και από τη

μεταφορά γονιδίων μεταξύ τους (65). Έχει αποδειχθεί ότι, σχεδόν το μισό γονιδίωμα το *S. pneumoniae* είναι όμοιο με του *S. pseudopneumoniae* λόγω της ιδιότητας των βακτηρίων να ανταλλάσσουν γενετικό υλικό μεταξύ τους. Ωστόσο, με τη χρήση του γονιδίου *tuf* ως δείκτη για την ταυτοποίηση των στρεπτόκοκκων, γίνεται εφικτός ο διαχωρισμός του *S. pneumoniae* από τον *S. mitis*, γεγονός που φανερώνει ότι τα συγκεκριμένα είδη έχουν διαφορετική αλληλουχία, καθώς ο *S. mitis* και ο *S. pseudopneumoniae* φαίνεται να έχουν ίδια αλληλουχία και προκειμένου να γίνει περαιτέρω διαχωρισμός μεταξύ των 2 ειδών, γίνεται ενίσχυση του γονιδίου *recA*<sup>1</sup>, το οποίο επιτρέπει το διαχωρισμό εντός των ειδών της ομάδας των *S. mitis* (66).

Έχει αποδειχθεί, ότι η συχνότητα αλλά και η σοβαρότητα της βακτηριαμίας από στρεπτόκοκκους της ομάδας *Mitis*, είναι όμοια με εκείνη που προκαλείται από τους *Streptococcus pyogenes* (GAS) και *Streptococcus agalactiae* (GBS) (67). Η παθογονικότητα των στρεπτόκοκκων οι οποίοι αποικίζουν τη στοματική κοιλότητα, αποδίδεται στο γεγονός της ικανότητας ανταλλαγής γονιδίων. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι ο *S. pneumoniae* έχει τη δυνατότητα ανταλλαγής γονιδίων με «γειτονικούς» στρεπτόκοκκους, ανεξαρτήτως αν ανήκουν στο ίδιο είδος. Επιπλέον, στρεπτόκοκκοι όπως ο *S. mitis* και ο *S. oralis* αποτελούν τα πιο συχνά είδη, στα οποία παρατηρείται το φαινόμενο αυτό (68).

Γενικότερα, οι στρεπτόκοκκοι της στοματικής κοιλότητας, λόγω του εξαιρετικού οικοσυστήματος που δημιουργείται από τα βιοφίλμ (biofilm), αλληλοεπιδρούν με τα υπόλοιπα είδη (5). Συγκεκριμένα, μέσω ενός ρυθμιστικού μηχανισμού που διαθέτουν τα βακτήρια (quorum sensing- QS) ελέγχονται παράγοντες που επηρεάζουν τον αριθμό των βακτηρίων στο σημείο αποικισμού. Για παράδειγμα, η δημιουργία βιοφίλμ από ορισμένα είδη βακτηρίων ευνοεί την παραμονή τους στο σημείο αυτό εν αντιθέσει με τα βακτήρια τα οποία δεν έχουν την ικανότητα δημιουργίας βιοφίλμ (5,69).

Οι λοιμώξεις που παρατηρούνται στην περίπτωση του *S. mitis* αφορούν ενδοκαρδίτιδα, εγκεφαλικά αποστήματα, σηψαιμία, μηνιγγίτιδα καθώς και

---

<sup>1</sup> γονίδιο *recA*: κωδικοποιεί ένζυμο, υπεύθυνο για τον ανασυνδυασμό τμημάτων DNA.

πνευμονία (65). Ένας τρόπος με τον οποίο οι συγκεκριμένοι στρεπτόκοκκοι μπορούν να προκαλέσουν μηνιγγίτιδα φαίνεται να είναι μέσω του στοματορινικού βλεννογόνου όπως συμβαίνει στην περίπτωση της διαρροής εγκεφαλονωτιαίου υγρού από τη σκληρή μήνιγγα (CSF leak) και από εκεί να κατευθύνονται απευθείας στις μήνιγγες (70). Η είσοδος του εγκεφαλονωτιαίου υγρού, δια μέσου των αιματοεγκεφαλικών φραγμών σε κοιλότητες όπου αποικίζουν δυνητικά παθογόνοι μικροοργανισμοί, μπορεί να αποτελέσει μια πιθανή οδό εισόδου μικροοργανισμών στην περιοχή του εγκεφάλου. Στην περίπτωση του *S. mitis*, όπου ένα σημείο αποικισμού είναι η στοματορινική κοιλότητα, μια τέτοια διαρροή θα διευκόλυνε την είσοδό του στον εγκέφαλο.

Οι αναφορές περιστατικών μηνιγγίτιδας από *S. mitis*, σχετίζονται με ασθενείς που είχαν προβεί σε χειρουργικές (νευρολογικές) επεμβάσεις ή νωτιαία αναισθησία (71). Επιπλέον, ένα συνηθισμένο πρόβλημα υγιεινής, το οποίο θα μπορούσε να συσχετιστεί με τη μετάδοση του *S. mitis* και την πρόκληση μηνιγγίτιδας, αφορά στα χαμηλά επίπεδα στοματικής υγιεινής και την ύπαρξη στοματικών νοσημάτων, όπως η τερηδόνα. Συγκεκριμένα, ο *S. mitis* ενοχοποιείται για την καταστροφή του σμάλτου των δοντιών, κυρίως στα παιδιά, προσβάλλοντας το ανώτερο οδοντικό τόξο. Με τον τρόπο ευνοείται η μετακίνηση του στρεπτόκοκκου μέσω των παραρρίνιων κόλπων και η πρόκληση ενδοκρανιακών επιπλοκών (65).

Η μηνιγγίτιδα/ σηψαιμία από *S. mitis* παρατηρείται κυρίως σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς ή σε ασθενείς με υποκείμενα νοσήματα. Παρόλο που πρόκειται για ένα είδος στρεπτόκοκκου, το οποίο αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του ανθρώπου και κατά συνέπεια δε σχετίζεται συχνά με λοιμώξεις, φυλογενετικές μελέτες έδειξαν ότι υπάρχει «στενή» γενετική σχέση με τον *S. pneumoniae*, δηλώνοντας τη δυνητική παθογονικότητά του (65). Από την άλλη πλευρά, οι στρεπτόκοκκοι του είδους *S. oralis* αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του ανθρώπινου στοματορινοφάρυγγα και της στοματικής κοιλότητας (72) και έχουν συσχετιστεί με περιστατικά μηνιγγίτιδας σε ασθενείς που είχαν προβεί σε ιατρικές επεμβάσεις, όπως ραχιαία αναισθησία, χειρουργικές επεμβάσεις του ΚΝΣ, αλλά και οδοντιατρικές πρακτικές καθώς και με τον τρόπο ζωής τους (73). Αναφορικά με τις οδοντιατρικές πρακτικές και τη

στοματική υγιεινή, υπάρχει συσχέτιση λοίμωξης με *S. oralis*, σε περιπτώσεις όπου παρατηρούνταν αιμορραγία των ούλων (73). Επιπρόσθετα ομάδα υψηλού κινδύνου αποτελούν οι ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς ή ασθενείς με υποκείμενα νοσήματα όπως ο σακχαρώδης διαβήτης (72–74).

#### **2.2.4. Anginosus Streptococci Group**

Οι στρεπτόκοκκοι της οικογένειας *anginosus* (SAG) αποτελούν μια πρόκληση στην ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους με βάση τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους, καθώς ενώ κατατάσσονται στους β- αιμολυτικούς στρεπτόκοκκους, έχουν καταγραφεί στελέχη με αντιγόνα κατά *Lancefield* (A, C, F, G) καθώς και στελέχη που δεν παρουσίαζαν το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό (6). Παρόλο που, τα συγκεκριμένα βακτήρια αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του βλεννογόνου, μπορούν να αποικίσουν τόσο το ουροποιητικό σύστημα, όσο και τα γυναικεία γεννητικά όργανα (75,76).

Αναφορικά με την παθογονικότητά τους, υπάρχουν ισχυρισμοί που χαρακτηρίζουν τους συγκεκριμένους στρεπτόκοκκους ως δυνητικά παθογόνους μικροοργανισμούς, καθώς προκαλούν σοβαρές λοιμώξεις σε περιπτώσεις παρουσίας τους, σε άσηπτα περιβάλλοντα, όπως το ENY, εντός του ανθρώπινου οργανισμού (76). Επιπλέον, οι SAG έχουν τη δυνατότητα να προκαλούν πυογενείς λοιμώξεις καθώς και βακτηραιμίες, δημιουργώντας αποστήματα (77). Παρά το γεγονός ότι, οι SAG αποτελούν μέρος της ανθρώπινης χλωρίδας, ανήκουν στους στρεπτόκοκκους που διαθέτουν πολυσακχαριδική κάψα προσδίδοντάς τους αυξημένη λοιμογονικότητα, καθώς η παρουσία της κάψας, προστατεύει τους SAG από ανοσολογικές απαντήσεις του ανοσοποιητικού συστήματος, έχοντας ως αποτέλεσμα την πρόκληση σοβαρών λοιμώξεων (75).

Η βακτηριαμία από SAG προκαλείται σε παιδιά και νεαρούς ενήλικες με υποκείμενα νοσήματα της στοματικής κοιλότητας, όπως για παράδειγμα η περιοδοντίτιδα (76). Ο *S. anginosus* και ο *S. constellatus* έχουν απομονωθεί σε γαστρεντερικές λοιμώξεις ενώ ο *S. intermedius* με λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος (76,77).

### **2.2.5. *Mutans Streptococci Group***

Οι στρεπτόκοκκοι της ομάδας *Mutans* βρίσκονται στα δόντια των ανθρώπων και έχει αποδειχθεί ότι, ο αποικισμός τους ξεκινάει από τις πρώτες μέρες κατά τη διάρκεια ζωής του εμβρύου, καθώς, παράλληλα με την ανάπτυξη του εμβρύου, παρατηρείται και αύξηση του αριθμού των αποικιών στα δόντια (78). Τα στελέχη χαρακτηρίζονται από ετερογένεια και ποικιλομορφία λόγω των διαφορετικών βιοχημικών ιδιοτήτων τους, των διαφορετικών πρωτεϊνών που τις απαρτίζουν (6). Οι συγκεκριμένοι στρεπτόκοκκοι διαφέρουν από τις υπόλοιπες οικογένειες ως προς την ικανότητα τους να σχηματίζουν ανθεκτικότερα βιοφίλμ και ευθύνονται για την πρόκληση της τερηδόνας στα δόντια, ενώ έχουν εντοπιστεί διάφοροι λοιμογόνοι παράγοντες στην κυκλοφορία του αίματος έπειτα από χειρουργική οδοντιατρική επέμβαση (79).

### **2.2.6. *Salivarius Streptococci Group***

Η ομάδα των στρεπτόκοκκων *Salivarius* αποτελείται από 3 είδη, εκ των οποίων τα 2 απαντώνται στη φυσιολογική χλωρίδα του ανθρώπου (*Streptococcus salivarius* και *Streptococcus vestibularis*) και συγκεκριμένα στις εκκρίσεις των σιελογόνων αδένων (6). Το τρίτο είδος (*Streptococcus thermophilus*), δεν είναι παθογόνο και εντοπίζεται σε γαλακτοκομικά προϊόντα (80). Η πρόκληση της λοίμωξης από *Streptococcus salivarius* σχετίζεται με ιατρικές πρακτικές, όπως η επισκληρίδιος αναισθησία και η νωτιαία μυελογραφία, όπου παρατηρήθηκε επιμόλυνση του αποστειρωμένου εξοπλισμού από το χειριστή (81).

Ειδικότερα, ο *Streptococcus salivarius* είναι ένα από τα πρώτα βακτήρια που αποικίζουν το βλεννογόνο, τις πρώτες κιόλας μέρες μετά τη γέννηση. Πρόκειται για έναν τύπο βακτηρίων ο οποίος εντοπίζεται κυρίως στο ανθρώπινο σάλιο και την επιφάνεια της γλώσσας. Παρόλο που συνήθως δεν εμφανίζει παθογονικό χαρακτήρα, υπάρχουν περιπτώσεις όπου προκαλεί λοιμώξεις, οι οποίες οδηγούν σε σηψαιμία και μηνιγγίτιδα (80).

Μηνιγγίτιδα/ σηψαιμία από *S. salivarius* παρατηρείται κυρίως σε άτομα τα οποία είχαν σχέσεις με χειρουργικές επεμβάσεις. Συγκεκριμένα, στη βιβλιογραφία αναφέρονται περιστατικά όπου οι ασθενείς εμφάνισαν μηνιγγίτιδα μετά από επισκληρίδιο αναισθησία ή μυελογραφία (80,82). Επιπλέον, έχουν καταγραφεί

περιστατικά χρόνιας ιγμορίτιδας καθώς και εντερικών νεοπλασιών, τα οποία φαίνεται να ευθύνονται για την πρόκληση μηνιγγίτιδας σε άτομα > 60 ετών (81–83). Τα άτομα σε κίνδυνο για μηνιγγίτιδα από *S. salivarius* ανήκουν κυρίως στην ηλικιακή ομάδα των > 60 ετών, σε ίδια συχνότητα εμφάνισης τόσο στον ανδρικό όσο και στο γυναικείο πληθυσμό (84).

### **2.2.7. Other streptococci group και *Suis Streptococci Group***

Σύμφωνα με τα δεδομένα της φυλογενετικής ανάλυσης του γονιδίου της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας του βακτηρίου (16s rRNA), οι *S. suis*, *S. acidominimus*, *S. minor*, *S. orisratti*, *S. entericus*, *S. hyointestinalis*, *S. hyovaginalis*, *S. gallinaceus* και *S. marimammalium*, ταξινομούνται ξεχωριστά από τις υπόλοιπες ομάδες στρεπτόκοκκων, με τους *S. suis*, *S. acidominimus*, *S. gallinaceus*, *S. minor* και *S. onis* να διαμορφώνουν την ομάδα των *suis streptococci group* (6). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει ο *S. suis*, ο οποίος κυκλοφορεί τόσο στα πτηνά όσο και στους χοίρους, μπορεί να μεταδοθεί και στον άνθρωπο, προκαλώντας μηνιγγίτιδα ή και σηψαιμία (85).

Η μόλυνση με *S. suis* στον άνθρωπο, σχετίζεται κυρίως με επαγγελματική έκθεση στο συγκεκριμένο λοιμογόνο παράγοντα. Τα άτομα τα οποία διατρέχουν υψηλό κίνδυνο μόλυνσης, είναι εκείνα που εμπλέκονται στην εκτροφή χοίρων, οι εργαζόμενοι σε σφαγεία, οι κτηνίατροι καθώς και οι χειριστές κρέατος (86,87). Η είσοδος του παθογόνου παράγοντα γίνεται μέσω των αμυχών του δέρματος και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μπορεί να φτάσει στις μήνιγγες όπου προκαλεί μηνιγγίτιδα. Αξίζει να σημειωθεί πως, ακόμη και η παραμικρή- μη εμφανής πληγή μπορεί να αποτελέσει πύλη εισόδου για τον *S. suis* (57).

Η μηνιγγίτιδα από *S. suis* παρουσιάζει παγκόσμια κατανομή, και ενδημεί σε χώρες της νοτιοανατολικής Ασίας μέσω της κατανάλωσης ωμού ή ατελώς μαγειρεμένου χοιρινού κρέατος (88). Ωστόσο, σε χώρες της ΕΕ έχουν παρατηρηθεί κρούσματα μηνιγγίτιδας από το συγκεκριμένο στρεπτόκοκκο σχετιζόμενα με επαγγελματική έκθεση, όπως για παράδειγμα εργαζόμενοι σε εγκαταστάσεις εκτροφής χοίρων και σφαγεία (87).

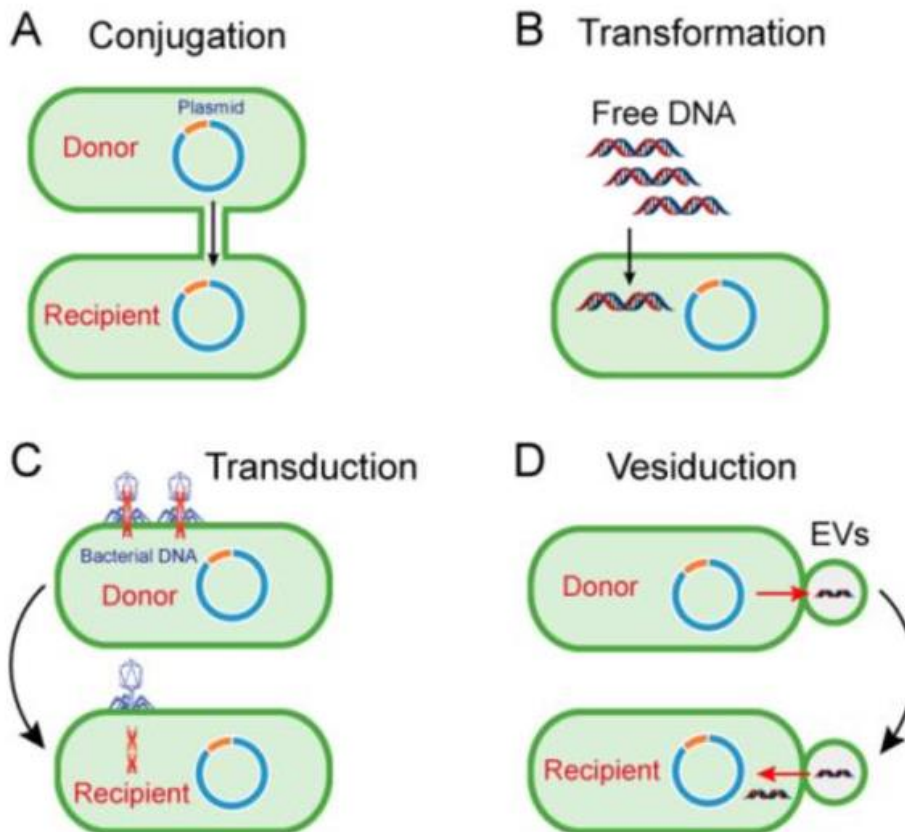
### **2.3. Μοριακοί μηχανισμοί των *Streptococcus spp.***

Ένας μεγάλος αριθμός ειδών στρεπτόκοκκων που σχετίζονται με ξενιστές όπως ο άνθρωπος ή τα ζώα, έχουν τη δυνατότητα μετατροπής από μέρος της φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας, σε παθογόνα μικρόβια, μέσω της απόκτησης κάψας, προκαλώντας λοιμώξεις. Το γεγονός αυτό, μπορεί να αποδοθεί σε φαινόμενα όπως μεταλλάξεις, ανασυνδυασμό του γενετικού τους υλικού αλλά και οριζόντια μεταφορά γονιδίων (HGT) μεταξύ των στρεπτόκοκκων συμβάλλοντας έτσι στην εξέλιξη του γονιδιώματός τους (89,90). Επιπλέον, αυτή η γονιδιακή εξέλιξη επιτρέπει στους μικροοργανισμούς να προσαρμόζονται σε αλλαγές του περιβάλλοντός τους, όπως η απόκριση σε κάποιο αντιβιοτικό ή εμβόλιο, καθώς και στη μεταφορά γονιδίων που σχετίζονται με παράγοντες λοιμογονικότητας (90).

Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι στρεπτόκοκκοι μπορούν να λάβουν «ξένο» γενετικό υλικό και να το ενσωματώσουν στο δικό τους, γίνονται μέσω των γενετικών μηχανισμών μεταφοράς: της μεταμόρφωσης (transformation), της μεταγωγής (transduction) της σύζευξης (conjugation) και της διαρροής (vesiduction) (Εικόνα 8) (91).

**Εικόνα 8: Μηχανισμοί μεταφοράς γονιδίων μεταξύ των βακτηρίων.**

Πηγή: [https://www.researchgate.net/publication/363604396\\_Acquired\\_Antibiotic\\_Resistance](https://www.researchgate.net/publication/363604396_Acquired_Antibiotic_Resistance)



Η διαδικασία της σύζευξης (conjugation) (Εικόνα 8A), αφορά στην άμεση μεταφορά του γενετικού υλικού (πλασμίδια) μεταξύ των στρεπτόκοκκων μέσω μιας «γέφυρας» ανάμεσα στα βακτηριακά κύτταρα, που ονομάζεται sex-pilus. Κατά τη διάρκεια της μεταφοράς, μεταφέρονται πλασμίδια, τα οποία είναι δίκλινα κυκλικά μόρια DNA, πάνω στα οποία εντοπίζονται γονίδια που σχετίζονται με την αντοχή σε αντιβιοτικά καθώς και άλλα γενετικά στοιχεία (89,92). Οι στρεπτόκοκκοι, όπως όλα τα βακτηρία, μπορούν να λάβουν DNA, και κατά συνέπεια γονίδια, που βρίσκονται ελεύθερα στο περιβάλλον τους μέσω της μεταμόρφωσης (transformation) (Εικόνα 8B). Τα θραύσματα γενετικού υλικού που κυκλοφορούν ελεύθερα στο περιβάλλον των μικροοργανισμών, προέρχονται συνήθως από κάποιο άλλο (βακτηριακό) κύτταρο, το οποίο έχει επέλθει από το στάδιο της λύσης. Με τον τρόπο αυτό, ενώ το γενετικό του υλικό παραμένει ελεύθερο στο περιβάλλον, ενσωματώνεται στο DNA κάποιου γειτονικού βακτηρίου (89,91,92).

Ο μηχανισμός της μεταγωγής (transduction) (Εικόνα 8C) αναφέρεται στη μεταφορά διάφορων λοιμογονικών παραγόντων σε βακτηριακά κύτταρα μέσω



συγκεκριμένων ιών οι οποίοι προσβάλλουν βακτηρία, και ονομάζονται βακτηριοφάγοι. Κατά τη, οι μεταγωγή, βακτηριοφάγοι που έχουν λάβει DNA από τα βακτήρια δότες, έχουν την ικανότητα να μολύνουν νέα βακτήρια και εκείνα με τη σειρά τους να ενσωματώνουν το νέο γενετικό υλικό στο γονιδίωμά τους (89). Τέλος, στη βιβλιογραφία παρουσιάζεται ένας ακόμη μηχανισμός HGT, ο οποίος περιγράφεται ως ο μηχανισμός της διαρροής (vesiduction) (Εικόνα 8D). Πρόκειται για ένα μηχανισμό των κυττάρων, ο οποίος περιλαμβάνει εξωκυτταρικά κυστίδια (extracellular vesicles- EVs) με πολλαπλές λειτουργίες. Τα εν λόγω κυστίδια, δημιουργούνται στην εξωτερική κυτταρική μεμβράνη του βακτηρίου και όπως αναφέρεται, μπορεί να περιέχουν διάφορους παράγοντες μεταξύ των οποίων είναι τα ένζυμα, οι τοξίνες και οι παράγοντες παθογονικότητας. Τα κυστίδια αυτά αποκολλώνται από το κύτταρο «δότη» και στη συνέχεια προσκολλώνται σε γειτονικά βακτηριακά κύτταρα (91,93).

Εκτός των ανωτέρω μηχανισμών μεταφοράς γονιδίων, κατά τη μεταφορά συμμετέχουν και τα λεγόμενα μεταθετά γενετικά στοιχεία (transposable elements- MGEs). Τα εν λόγω στοιχεία είναι αλληλουχίες DNA με τη δυνατότητα μεταφοράς εντός του γονιδιώματος, δημιουργώντας μεταλλάξεις καθώς και αλλαγές στο μήκος του γονιδιώματος. Στους στρεπτόκοκκους εντοπίζονται 2 βασικοί τύποι μεταθετών στοιχείων, οι αλληλουχίες εισαγωγής (insertion sequences, IS) και τα τρανσποζόνια (transposons, Tn) (89). Οι IS είναι μικρές αλληλουχίες DNA που κωδικοποιούν την τρανσποζάση, ένα ένζυμο που συμβάλλει βοηθώντας στη μετακίνησή τους εντός του γονιδιώματος, ενώ τα Tn διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταφορά όχι μόνο γονιδίων αντοχής αλλά και δομές που σχετίζονται με μεταβολικές οδούς στα βακτήρια αλλά και με δομές-παράγοντες που μπορούν να δώσουν ένα λοιμογόνο χαρακτήρα σε ένα βακτήριο (89,91).

## 2.4. Μετάδοση

Η μετάδοση των *Streptococcus* spp. στον άνθρωπο πραγματοποιείται με ποικίλους τρόπους, μεταξύ των οποίων είναι και η μετάδοση από τα ζώα στον άνθρωπο (41). Ωστόσο, ο συνηθέστερος τρόπος μετάδοσης είναι από άνθρωπο σε άνθρωπο, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί με αρκετές οδούς. Συγκεκριμένα, για τους στρεπτόκοκκους όπως ο *S. pneumoniae*, η μετάδοση μέσω μολυσμένων σταγονιδίων μεταξύ ενός υγιούς και ενός μολυσμένου ατόμου, πραγματοποιείται με μεγαλύτερη συχνότητα, από ότι μπορεί να συμβεί με κάποια ενδογενή λοίμωξη (41,94).

Επιπλέον, η μετάδοση στρεπτόκοκκου από άνθρωπο σε άνθρωπο έχει παρατηρηθεί και κατά τη διάρκεια της κύησης (neonatal infection) αλλά και αμέσως μετά (postnatal infection) από τη μητέρα ή το προσωπικό του νοσοκομείου στο νεογνό (41). Κατά τη διάρκεια της κύησης, έχει παρατηρηθεί μετάδοση *Streptococcus agalactiae* από τη μητέρα στο έμβρυο ενώ η λοίμωξη με στρεπτόκοκκο μετά τον τοκετό, αναφέρεται ως η συχνότερη αιτία νεογνικών λοιμώξεων. Επιπρόσθετα, ο κίνδυνος και η πιθανότητα μετάδοσης στρεπτόκοκκων από τη μητέρα στο έμβρυο, συνεχίζει να υφίσταται και εκτός του νοσοκομειακού περιβάλλοντος, καθώς έχει γίνει αναφορά στο μικροβίωμα του μητρικού γάλακτος, το οποίο περιέχει ένα μεγάλο αριθμό δυνητικά παθογόνων στρεπτόκοκκων (41,95), καθώς επίσης είναι εξίσου σημαντική η μετάδοση μέσω στοματικών εκκρίσεων κατά τη βρεφική ηλικία, από τη μητέρα στο νεογνό, όπου συνήθως παρατηρείται μετάδοση του *Streptococcus mutans* (41,96).

Τέλος, ένας μεγάλος αριθμός στρεπτόκοκκων που ανήκουν στην ομάδα των *Streptococcus viridans* (Mitis Group, Anginosus Group, Mutans Group, Salivarius Group) μεταδίδεται λόγω ενδογενών λοιμώξεων (41). Οι οποίες, αναφέρονται σε περιπτώσεις λοιμώξεων όπου ο άνθρωπος εκτίθεται σε δυνητικά παθογόνους παράγοντες, οι οποίοι αποτελούν μέρος της φυσιολογικής τους χλωρίδας, όπως για παράδειγμα συμβαίνει με την είσοδο των στρεπτόκοκκων της ομάδας Mitis από τη στοματική κοιλότητα στην κυκλοφορία του αίματος (65).

Αξίζει να αναφερθεί ότι, εκτός της μετάδοσης από άνθρωπο σε άνθρωπο, όπως προαναφέρθηκε έχει μελετηθεί και η συσχέτιση της μετάδοσης από τα ζώα στον άνθρωπο. Συγκεκριμένα, έχουν γίνει αναφορές για διασταυρούμενη μετάδοση (cross- transmission) στρεπτόκοκκων από τον άνθρωπο σε ζώα όπως τα ψάρια, τα βοοειδή και τα χοιρινά (94).

## 2.5. Παθογένεση

Οι στρεπτόκοκκοι συνήθως δεν προκαλούν λοίμωξη, καθώς όπως έχει αναφερθεί αποτελούν μέρος της φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας του δέρματος αλλά και του βλεννογόνου. Ωστόσο, υπάρχουν περιπτώσεις λοιμώξεων, τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα, λόγω της ικανότητάς τους να παράγουν ειδικές τοξίνες αλλά και διάφορων άλλων παθογονικών παραγόντων, όπως για παράδειγμα η απόκτηση κάψας (97,98). Ειδικότερα, οι στρεπτοκοκκικές τοξίνες που παράγονται μπορούν να είναι είτε πρωτεϊνικής φύσεως είτε μη- πρωτεϊνικής, επηρεάζοντας τον αποικισμό, τη μετάδοση αλλά και την παθογένεια τους (98). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, από τις σημαντικότερες τοξίνες που παράγονται από στρεπτόκοκκους είναι οι αιμολυσίνες, οι πρωτεάσες και τα υπεραντιγόνα (98,99).

Αναλυτικότερα, οι μηχανισμοί με τους οποίους οι στρεπτόκοκκοι οδηγούν σε λοίμωξη και συγκεκριμένα σε μηνιγγίτιδα ή σηψαιμία, σχετίζονται με τον τρόπο αποικισμού τους, την ικανότητα να εισέρχονται και να επιβιώνουν στην κυκλοφορία του αίματος ή με την είσοδό τους στον υπαραχνοειδή χώρο. Το συνηθέστερο σημείο αποικισμού των στρεπτόκοκκων είναι οι βλεννογόνοι του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, με τα βακτήρια να εντοπίζονται προσκολλημένα στην επιφάνεια των κυττάρων και να επιβιώνουν από την άμυνα του οργανισμού (ξενιστή) (23). Ένα ακόμη χαρακτηριστικό των αποικιών των στρεπτόκοκκων είναι ο σχηματισμός biofilm, ο οποίος δρα ενισχυτικά στον αποικισμό, με την πρόσδεση των βακτηρίων σε ειδικούς υποδοχείς στα κύτταρα του ξενιστή (100).

Επιπλέον, όπως και ο *S. pneumoniae* έτσι κι οι υπόλοιποι στρεπτόκοκκοι διαθέτουν στο γονιδίωμά τους γονίδια υπεύθυνα για την έκφραση διαφόρων παραγόντων παθογονικότητας, όπως τοξίνες, συγκολλητίνες, ένζυμα καθώς και

γονίδια που κωδικοποιούν το σχηματισμό της κάψας (100). Οι τοξίνες όπως οι αιμολυσίνες (Hly) ή οι πνευμολυσίνες (Ply) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της λοίμωξης. Οι αιμολυσίνες (Hly) σχετίζονται με τη δυνατότητα λύσης των ερυθροκυττάρων (αιμόλυση) από τους στρεπτόκοκκους και διακρίνονται στην οικογένεια των Streptolysin S, των Streptolysin O, στις πνευμολυσίνες (pneumolysin), στις Suilysin, στη β- αιμολυσίνη και τη intermedilysin (98,100). Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα είδη των στρεπτοκόκκων που παράγουν τις αντίστοιχες τοξίνες (Πίνακας 7).

**Πίνακας 7: Αιμολυσίνες: είδος τοξινών των *Streptococcus spp***

Πηγή: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26433203/>

<b>Αιμολυσίνες (Hly)</b>	<b><i>Streptococcus spp.</i></b>
<b>Streptolysin S</b>	<i>S. pyogenes, S. dysgalactiae subs. equisimilis, S. equi, S. iniae, S. canis, S. anginosus, S. constellatus</i>
<b>Streptolysin O</b>	<i>S. pyogenes, S. canis, S. dysgalactiae subs. equisimilis</i>
<b>Pneumolysin</b>	<i>S. pneumoniae</i>
<b>Suilysin</b>	<i>S. suis</i>
<b>β- hemolysin</b>	<i>S. agalactiae</i>
<b>Intermedilysin</b>	<i>S. intermedius</i>

Ακόμη, ο πνευμονιόκοκκος παράγει τα ένζυμα νευραδαμινάσες (NanA, NanB, NanC) και φωσφολιπάση (PLA2), τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην καταστροφή ιστών και στην είσοδο του μικροοργανισμού στην κυκλοφορία του αίματος. Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό του πνευμονιοκόκκου είναι η πολυσακχαριδική του κάψα, η οποία αρχικά παρέχει προστασία στο μικροοργανισμό από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή και επιπρόσθετα συμμετέχει στο σχηματισμό αποικιών (100).

Η είσοδος των στρεπτόκοκκων στην κυκλοφορία του αίματος, πραγματοποιείται είτε διακυτταρικά είτε περικυτταρικά, ενώ παράλληλα με την εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή, επιτυγχάνεται η επιβίωσή τους στο αίμα (23). Αφότου οι στρεπτόκοκκοι εισβάλουν στην κυκλοφορία του αίματος, διάφορες επιφανειακές πρωτεΐνες και συγκολλητίνες βοηθούν τα βακτήρια να

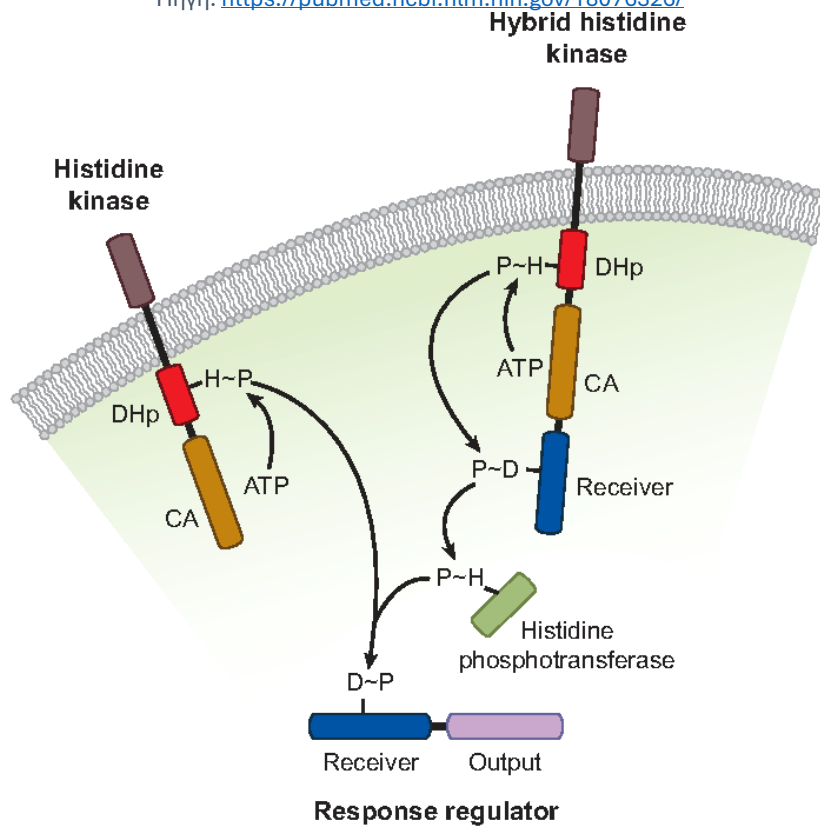
έρθουν σε επαφή με τους υποδοχείς στα κύτταρα του ξενιστή. Επίσης, η παραγωγή ενζύμων και τοξινών πολλές φορές έχουν ως αποτέλεσμα την αλλοίωση των φραγμών των επιθηλιακών και ενδοθηλιακών κυττάρων του ξενιστή, διευκολύνοντας την είσοδο τους στο αίμα. Τέλος, η ικανότητα σχηματισμού βιοφίλμ στο αίμα παρέχει ένα ιδανικό περιβάλλον για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών καθώς και για την επιβίωσή τους από ανοσολογικές αποκρίσεις του ξενιστή ή και από αντιβιώσεις (100). Ο διπλός ρόλος των στρεπτόκοκκων, να δρουν ενίοτε προστατευτικά αλλά και να προκαλούν νόσο, οφείλεται στα TCSs (Two- component regulatory systems<sup>2</sup>) τα οποία ελέγχουν λειτουργίες των βακτηρίων όπως η προσκόλληση ή η είσοδος σε κύτταρα του ξενιστή. Η λειτουργία των συγκεκριμένων ρυθμιστικών συστημάτων στηρίζεται στην αναγνώριση σημάτων και τη φωσφορυλίωση μεταγραφικών παραγόντων από μια κινάση ιστιδίνης (HK), η οποία λειτουργεί ως αισθητήρας (101). Επιπλέον, τα TCSs έχουν τη δυνατότητα ανίχνευσης διαφόρων παραγόντων που εν δυνάμει θα υποβάλουν τους στρεπτόκοκκους σε κατάσταση πίεσης (stress), έχοντας ως αποτέλεσμα την καλύτερη προσαρμοστικότητα τους σε καινούρια περιβάλλοντα (45).

---

<sup>2</sup> **Two- component regulatory systems (TCSs)** : Πρόκειται για μηχανισμούς προσαρμογής και ανταπόκρισης που χρησιμοποιούνται από τα βακτήρια. Οι μηχανισμοί/ συστήματα αποτελούνται από έναν αισθητήρα κινάσης ιστιδίνης (histidine kinase- HK) και έναν ρυθμιστή απόκρισης. Ο ρόλος της HK είναι η ανίχνευση σημάτων ή αλλαγών στο περιβάλλον του μικροοργανισμού, με σκοπό τη μεταφορά της «πληροφορίας» φωσφορυλιώνοντας το ρυθμιστή απόκρισης. Στη συνέχεια, ο ρυθμιστής απόκρισης ελέγχει την έκφραση του κατάλληλου γονιδίου που σχετίζονται με την εν λόγω «πληροφορία» (101).

**Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας των TCSs.**

Πηγή: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18076326/>



Στην **Εικόνα 9** περιγράφεται η λειτουργία του συστήματος ρύθμισης των βακτηριακών λειτουργιών από μια σειρά διαδικασιών. Αρχικά, η ΗΚ εντοπίζει ερεθίσματα στο περιβάλλον του μικροοργανισμού όπως μεταβολή της θερμοκρασίας, του pH, τη διαθεσιμότητα τροφής αλλά και την ύπαρξη άλλων μορίων, μέσω της αυτο-φωσφορυλίωσης της ΗΚ. Έπειτα, η πλέον φωσφορυλιωμένη ΗΚ μεταφέρει μια φωσφορική ομάδα στον ρυθμιστή απόκρισης (RR), επιφέροντας του μια δομική αλλαγή η οποία του επιτρέπει να ελέγχει την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων ή άλλων κυτταρικών λειτουργιών (101). Εντούτοις, οι μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση ή στις λειτουργίες του κυττάρου από τον RR, είναι υπεύθυνες για την προσαρμογή των βακτηρίων σε «νέα» περιβάλλοντα υπό διαφορετικές συνθήκες, καθώς επίσης και για τη ρύθμιση της λοιμογόνου δράσης τους. Η πρόκληση μηνιγγίτιδας από τους στρεπτόκοκκους συμβαίνει, όταν οι στρεπτόκοκκοι μέσω της κυκλοφορίας του αίματος εισέρχονται στον υπαραχνοειδή χώρο, όπου και πολλαπλασιάζονται. Κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, τα μακροφάγα παράγουν προ-φλεγμονώδεις πρωτεΐνες

όπως η TNF- $\alpha$ <sup>3</sup> και σε συνέχεια, τα κοκκιοκύτταρα διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, καθιστώντας τον περισσότερο διαπερατό (23).

### 2.5.1. Στρεπτοκοκκικές λοιμώξεις

Οι στρεπτοκοκκικές λοιμώξεις περιλαμβάνουν ένα μεγάλο φάσμα κλινικών εκδηλώσεων των λοιμώξεων που προκαλούν. Συγκεκριμένα, στρεπτόκοκκοι όπως ο *S. pyogenes* (group A), σχετίζονται με λοιμώξεις του φάρυγγα, με δερματικά εκζέματα αλλά και με βακτηραιμίες. Επιπλέον, έχουν σημειωθεί περιστατικά μέσης ωτίτιδας, ιγμορίτιδας καθώς και ενδοκαρδίτιδας, που οφείλονταν σε λοίμωξη από στρεπτόκοκκο ομάδας A (103). Επιπλέον, οι στρεπτοκοκκικές λοιμώξεις σχετίζονται και με τη μόλυνση του δέρματος και των μαλακών ιστών, όπου συνήθως ενοχοποιούνται οι στρεπτόκοκκοι της ομάδας B, όπως ο *S. agalactiae* (group B) (104).

Τόσο οι στρεπτόκοκκοι της ομάδας A, όσο και της ομάδας B μπορούν να προκαλέσουν και σοβαρότερες λοιμώξεις όπως πνευμονία και μηνιγγίτιδα. Η μηνιγγίτιδα από στρεπτόκοκκο της ομάδας B, είναι λιγότερο συχνή σε ενήλικες και περισσότερο συχνή σε παιδιά (103,104). Παρόλα αυτά, διάφορα είδη στρεπτόκοκκων έχουν την ικανότητα πρόκλησης λοίμωξης στον άνθρωπο. Τα τελευταία χρόνια, οι συγκεκριμένες λοιμώξεις εμφανίζονται ολοένα και με μεγαλύτερη συχνότητα στον πληθυσμό, λόγω της αύξησης του ποσοστού γήρανσης, καθιστώντας έτσι τους μεγαλύτερους ανθρώπους πιο ευάλωτους σε τέτοιου είδους λοιμώξεις (47).

Αρχικά οι πρωτεΐνες M που εκφράζονται στην επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος των στρεπτόκοκκων, όπως για παράδειγμα στον *S. pyogenes*, συνδράμουν στην πρόσδεση των στρεπτόκοκκων στα επιθηλιακά κύτταρα, η οποία πραγματοποιείται σε 2 συγκεκριμένες πρωτεϊνικές δομές, την CD46 και την CD44 (Εικόνα 10a) ενώ παράλληλα εκκρίνονται στρεπτοκοκκικές τοξίνες στην επιφάνεια των κυττάρων, οι οποίες διαταράσσουν τους δεσμούς μεταξύ τους και

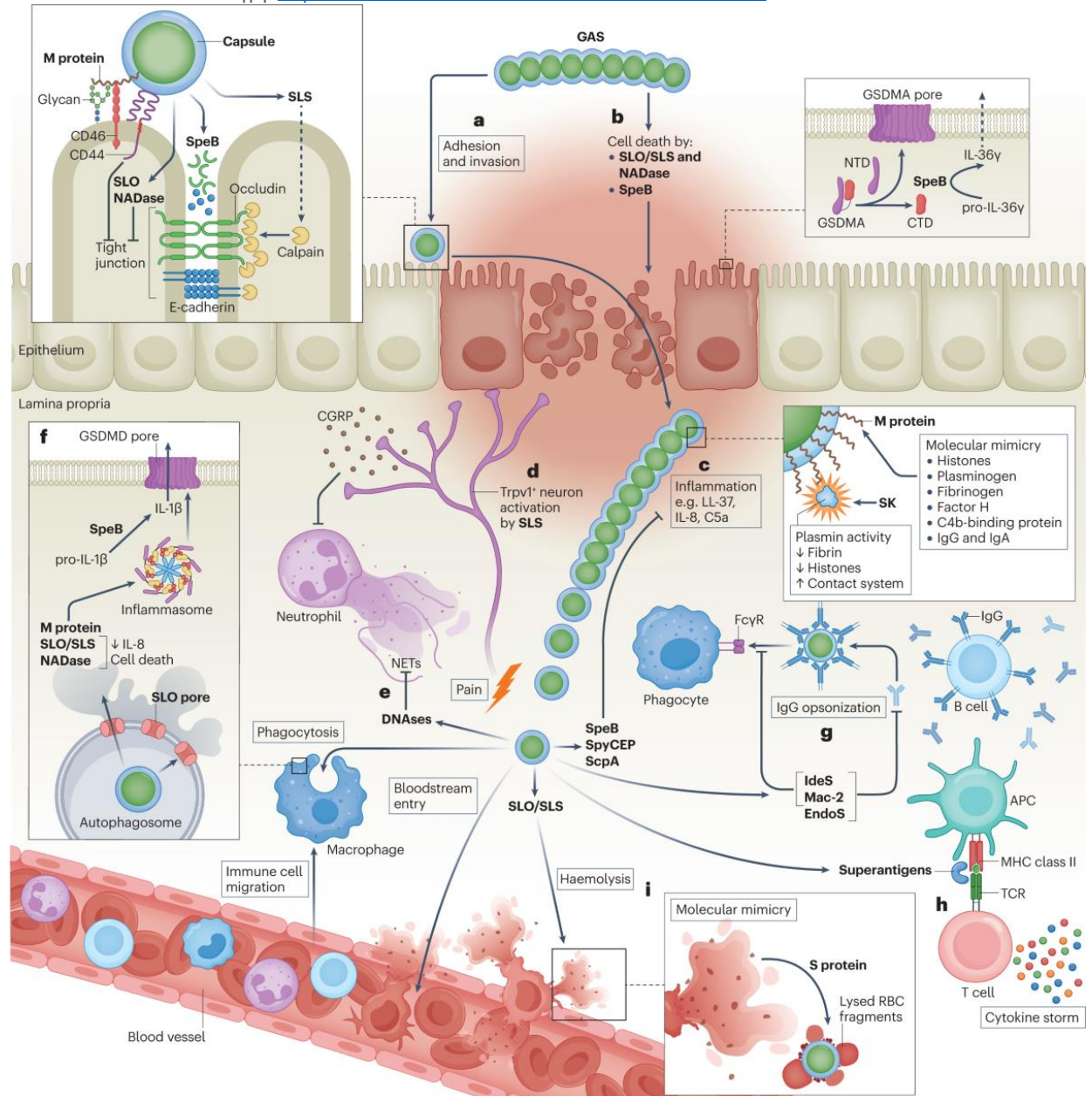
---

<sup>3</sup> **TNF- $\alpha$**  : πρόκειται για μια φλεγμονώδη κυτοκίνη, η οποία παράγεται από τα μακροφάγα κατά τη διάρκεια φλεγμονών και είναι υπεύθυνη για ένα μέρος την ενδοκυτταρικής επικοινωνίας, οδηγώντας στη νέκρωσή τους (102).

επιφέροντας ως αποτέλεσμα την είσοδο του μικροοργανισμού στα επιθηλιακά κύτταρα (103).

**Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση της πορείας των στρεπτοκοκκικών λοιμώξεων**

Πηγή: <https://www.nature.com/articles/s41579-023-00865-7>



Το επόμενο βήμα είναι η περαιτέρω είσοδος του μικροοργανισμού στα κύτταρα (Εικόνα 10b). Αυτό επιτυγχάνεται με τη διαδικασία της καταστροφής των κυττάρων λόγω των τοξινών (SLS, SLO NADase) που παράγονται από τους στρεπτόκοκκους, προκαλώντας φλεγμονή και ενεργοποιώντας παράλληλα τους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή που έχει προσβάλλει. Αξίζει να σημειωθεί ότι, στρεπτόκοκκοι όπως ο *S. pyogenes* έχουν αναπτύξει μηχανισμούς με τους οποίους



προβάλουν αντίσταση στην ανοσολογική απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Συγκεκριμένα, οι εν λόγω μηχανισμοί περιλαμβάνουν την περικάλυψη των στρεπτόκοκκων με γενετικούς παράγοντες του ξενιστή, δυσκολεύοντας έτσι την αναγνώριση από τα φαγοκύτταρα (Εικόνα 10c). Από τη στιγμή που ο στρεπτόκοκκος εισέλθει στον οργανισμό, σηματοδοτείται η παραγωγή της SLS και των δεοξυριβονουκλεασών (DNases) με εξωκυτταρική δράση. Η επίδραση των παραπάνω στους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή, έχουν ως αποτέλεσμα την καταστολή της δράσης των ουδετερόφιλων (Εικόνα 10 d και e) (103).

Τέλος, κατά την είσοδο των στρεπτόκοκκων στο κυκλοφορικό σύστημα, παρατηρείται ότι τα βακτηριακά κύτταρα περιβάλλονται από τμήματα κατεστραμμένων ερυθροκυττάρων, τα οποία έχουν προκύψει από την επίδραση των στρεπτοκοκκικών τοξινών. Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχάνεται η προστασία του βακτηρίου κατά την μεταφορά του μέσω της κυκλοφορίας του αίματος και συνεπώς η επιβίωσή του, έχοντας ως αποτέλεσμα την πρόκληση της λοίμωξης (103).

### **2.5.2. Στρεπτοκοκκική μηνιγγίτιδα**

Η οξεία βακτηριακή μηνιγγίτιδα είναι η πιο σοβαρή μορφή μηνιγγίτιδας, η οποία εμφανίζει πρόσφατα μια πτωτική τάση στις ανεπτυγμένες χώρες (14). Ένα από τα κυριότερα βακτήρια, το οποίο προκαλεί μηνιγγίτιδα είναι ο *S. pneumoniae*, ο οποίος ανήκει στο γένος των *Streptococcus* spp. (105). Οι περισσότερες λοιμώξεις από είδη του γένους των στρεπτόκοκκων στον άνθρωπο οφείλονται στη μετάδοσή του μέσω της άμεσης επαφής με ένα μολυσμένο άτομο και συγκεκριμένα μέσω της αναπνευστικής οδού. Ορισμένοι στρεπτόκοκκοι, οι οποίοι δεν είναι ταυτοποιημένοι ως πνευμονιόκοκκοι αλλά ούτε GAS και GBS, προκαλούν μηνιγγίτιδα και αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως α- αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι, όπως για παράδειγμα ο *S. mitis*, ο οποίος αποικίζει τη στοματική κοιλότητα (41,70). Επιπλέον, αναφέρονται και είδη των β- αιμολυτικών στρεπτόκοκκων της ομάδας C (GCS) και G (GGS) οι οποίοι προκαλούν μηνιγγίτιδα, όπως είναι ο *S. constellatus* subs. *constellatus* και ο *S. dysgalactiae* subs. *equisimilis*, οι οποίοι αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος και

συχνά αποικίζουν το δέρμα, τη στοματική κοιλότητα και τον κόλπο (13,53,106,107).

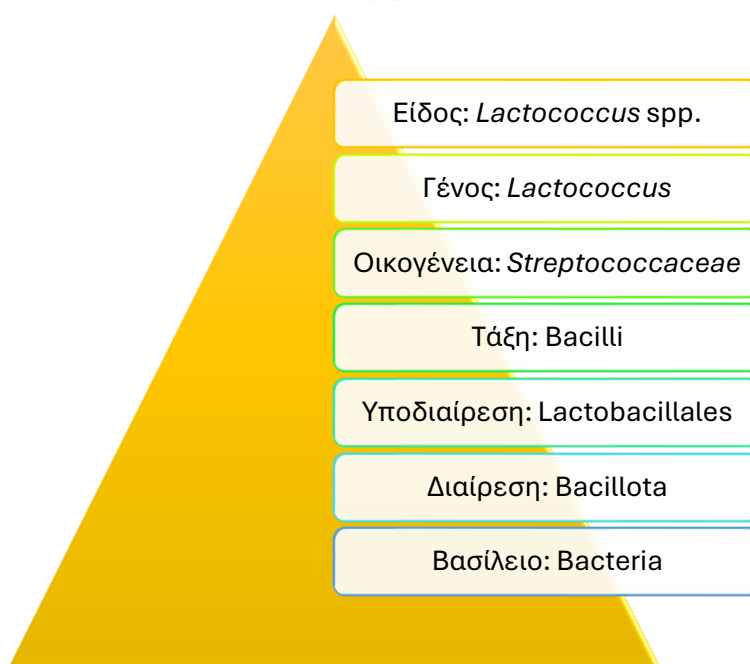
Ιδιαίτερο επιδημιολογικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν περιστατικά μηνιγγίτιδας τα οποία έχουν χαρακτηριστεί ως ζωοανθρωπονόσοι, διότι στελέχη φαίνονται να μεταδίδονται από τα ζώα στον άνθρωπο, οδηγώντας στην εκδήλωση της νόσου, όπως για παράδειγμα ο *S. suis* αλλά και ο *S. intestinalis*, οι οποίοι αποικίζουν τους χοίρους και μεταδίδονται μέσω αυτών αλλά και από την κατανάλωση των παράγωγων προϊόντων τους (108,109). Παρόλο που τα συγκεκριμένα είδη δεν έχουν προκαλέσει επιδημίες ή πανδημίες, αποτελούν σοβαρή απειλή για την ανθρώπινη υγεία (110).

### 3. Λακτόκοκκοι

#### 3.1. Γενικά

Η οικογένεια *Streptococcaceae*, περιλαμβάνει, εκτός από βακτήρια του γένους των στρεπτόκοκκων, βακτήρια του γένους των λακτόκοκκων (41). Στην ομαδοποίηση κατά *Lancefield*, οι στρεπτόκοκκοι της ομάδας N, αποκαλούνταν *Streptococcus lactis* ωστόσο με την πάροδο του χρόνου και την εξέλιξη των ειδών μετονομάστηκαν σε ένα νέο γένος, τους *Lactococcus* spp.. Συγκεκριμένα, πρόκειται για μια ομάδα Gram θετικών βακτηρίων, με αρνητική δοκιμασία καταλάσης, ενώ λόγω του ιδιαίτερου μεταβολισμού τους, οι λακτόκοκκοι παράγουν L- γαλακτικό οξύ (111).

Εικόνα 11: Ταξινόμηση λακτόκοκκων



Τα συγκεκριμένα βακτήρια εντοπίζονται κυρίως σε περιβαλλοντικά υλικά, όπως για παράδειγμα σε τρόφιμα ζωικής προελεύσεως, τρόφιμα που προέρχονται από ζώα (γάλα), καθώς επίσης έχει αναφερθεί και η ύπαρξη *Lactococcus* spp. σε δείγματα λάσπης (112).

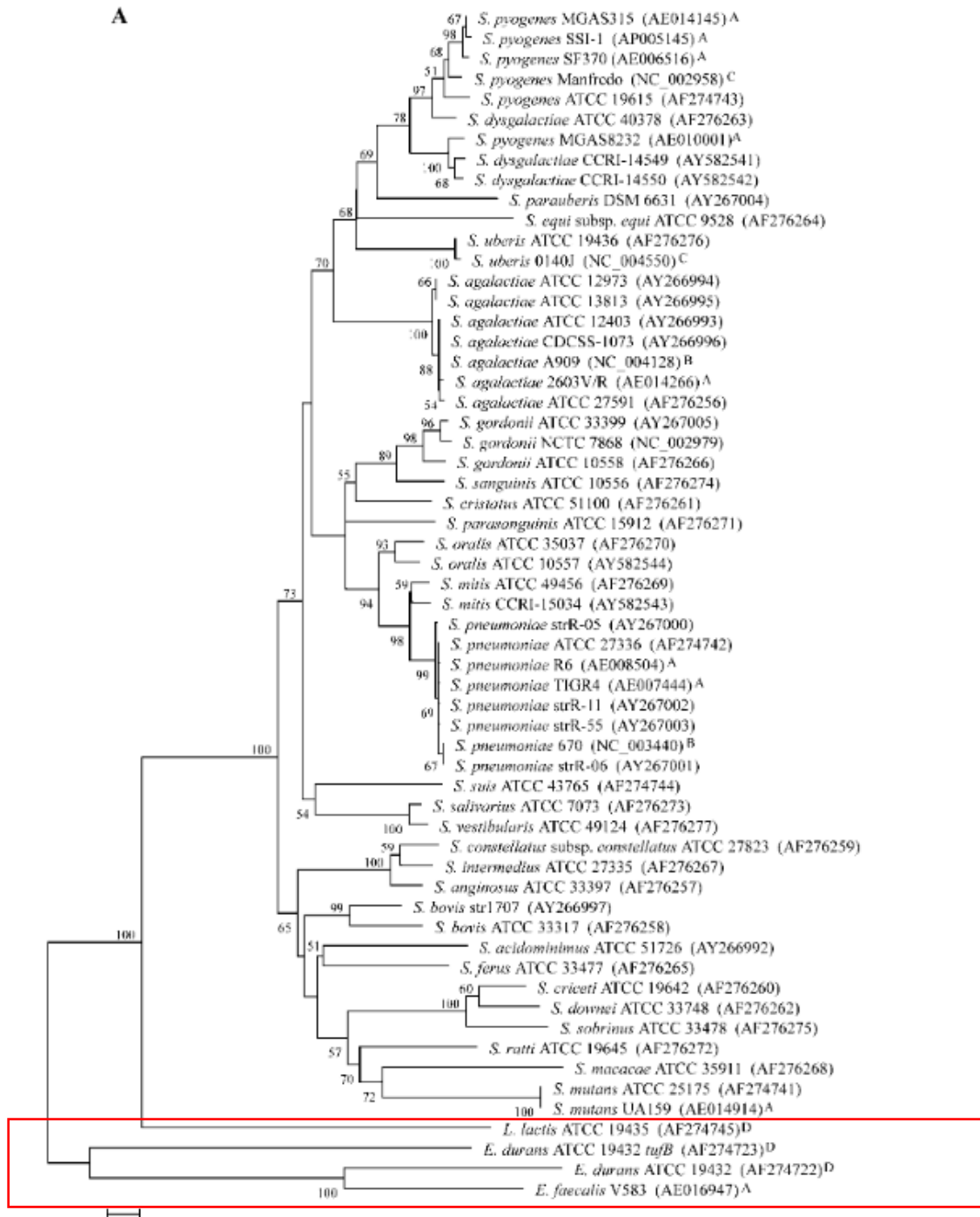
Μέχρι και το 1986, οι λακτόκοκκοι αποτελούσαν είδος των *Streptococcus* spp. (*Streptococcus lactis*), διαμορφώνοντας την ομάδα N κατά *Lancefield*. Πλέον,

αποτελούν ένα διακριτό γένος από εκείνο των στρεπτόκοκκων (112). Το φαινόμενο της εξέλιξης των στρεπτόκοκκων σε λακτόκοκκους, αποδίδεται στον υψηλό ρυθμό μεταφοράς και ανασυνδυασμού γονιδίων, που συμβαίνει σε όλους τους στρεπτόκοκκους (113).

Με τη χρήση του γονιδίου *tuf* για την ταυτοποίηση των στρεπτόκοκκων, από ένα σύνολο μη- στρεπτοκοκκικών βακτηρίων, βρέθηκε γενετικό υλικό *L. Lactis* και *E. durans* έχοντας σχετικά υψηλό ποσοστό ομοιότητας με τους στρεπτόκοκκους (~85%) στη νουκλεοτιδική αλληλουχία. Παρόλα αυτά, τόσο οι στρεπτόκοκκοι, όσο και οι λακτόκοκκοι και οι εντερόκοκκοι διαθέτουν σημεία στο γονιδίωμά τους με μεγάλη ποικιλομορφία, καθιστώντας έτσι εφικτό το σχεδιασμό ειδικά διαμορφωμένων εκκινητών για την πιο ακριβή ταυτοποίησή τους (8). Συγκεκριμένα στην [Εικόνα 12](#) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της φυλογενετικής ανάλυσης του γονιδίου *tuf* στη μελέτη των Picard *et al.* (8). Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι τα βακτήρια του είδους *Lactococcus* spp. με τα βακτήρια του είδους *Streptococcus* spp. προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο (8). Στην παρούσα περίπτωση αυτό υποστηρίζεται από το γεγονός ότι, όπως προαναφέρθηκε, οι πλέον λακτόκοκκοι παλαιότερα ανήκαν στην ομάδα των στρεπτοκόκκων. Ωστόσο, μετά από την μετονομασία της συγκεκριμένης ομάδας, όπως φαίνεται στην [Εικόνα 12](#), στον κοινό πρόγονο των λακτόκοκκων με τους στρεπτόκοκκους υπάρχει η τιμή υποστήριξης (support value) 100 (ή 1), γεγονός που δηλώνει ότι, οι επακόλουθες αλληλουχίες των γονιδίων *tuf*, μεταξύ των 2 διαφορετικών βακτηρίων, παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα καθώς και υψηλή διακριτική ικανότητα από άλλα είδη (8).

Εικόνα 12: Φυλογενετική ανάλυση *Streptococcus spp.* με τη χρήση του γονιδίου *tuf*.

Πηγή: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC497632/>



### 3.2. Μετάδοση

Τα βακτήρια του είδους *Lactococcus lactis* και *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, έχουν ως φυσικούς ξενιστές τα βοοειδή. Ο άνθρωπος μπορεί να μολυνθεί από την κατανάλωση μη παστεριωμένου γάλακτος, καθώς και από γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση (114). Επιπλέον, τα συγκεκριμένα βακτήρια μπορούν να απομονωθούν από βλεννογονοδερματικές επιφάνειες στον άνθρωπο όπως είναι το έντερο προκαλώντας βακτηριαιμίες (115).

Τα βακτήρια του είδους *Lactococcus* spp. είναι γνωστά για τις ευεργετικές τους ιδιότητες στον άνθρωπο, καθώς συμβάλλουν με ποικίλους τρόπους στην καλή λειτουργία και προστασία του οργανισμού. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι η επίδραση στελεχών λακτόκοκκων σχετίζεται όχι μόνο με τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης παχυσαρκίας αλλά και με τη μείωση της αρτηριακής πίεσης. Επιπλέον, τα βακτήρια αυτά σηματοδοτούν την έναρξη του κυτταρικού θανάτου καρκινικών κυττάρων ενώ παράλληλα χρησιμοποιούνται και ως προβιοτικά για την ενίσχυση της μικροβιακής χλωρίδας του ανθρώπινου εντέρου (116).

Ωστόσο, τα συγκεκριμένα βακτήρια φαίνεται να έχουν μια διπλή φύση, καθώς διαθέτουν γονίδια τα οποία τους προσδίδουν παθογονικό χαρακτήρα. Συγκεκριμένα, έχουν εντοπιστεί στο γονιδίωμά τους, αλληλουχίες που κωδικοποιούν γονίδια, όπως το *efaA*, το οποίο σχετίζεται με την ενδοκαρδίτιδα. Επιπρόσθετα, έχει χαρτογραφηθεί το γονίδιο *esp* που κωδικοποιεί πρωτεΐνες της επιφάνειας του βακτηρίου, οι οποίες συμβάλλουν στο σχηματισμό biofilm (116). Παρά τη χαμηλή παθογονικότητά τους, τα συγκεκριμένα βακτήρια χαρακτηρίζονται ως ευκαιριακά παθογόνα και πρέπει να λαμβάνονται υπόψη σε ασθενείς με γαστρεντερικές διαταραχές (116,117).

## 4. Μοριακές τεχνικές

Οι συμβατικές μέθοδοι ταυτοποίησης των στρεπτόκοκκων αποτελούν ένα καθημερινό εργαλείο των μικροβιολογικών εργαστηρίων, οι οποίες βασίζονται κυρίως σε βιοχημικά χαρακτηριστικά των βακτηρίων. Ωστόσο, δεν αποδίδουν πάντοτε αξιόπιστα αποτελέσματα. Για παράδειγμα, αρκετές φορές διαφορετικά είδη στρεπτόκοκκων εμφανίζουν μεταξύ τους πανομοιότυπες βιοχημικές ιδιότητες, λόγω του φαινομένου της μεταφοράς των γονιδίων που συμβαίνει (118). Επιπρόσθετα, αρκετές από τις συμβατικές μεθόδους ταυτοποίησης μικροοργανισμών, απαιτούν αρκετές ώρες και σε μερικές περιπτώσεις έως και ημέρες (5). Ένα επιπλέον διακύβευμα κατά τη χρήση συμβατικών τεχνικών ταυτοποίησης μικροοργανισμών, είναι το χαμηλό μικροβιακό φορτίο που μπορεί να υπάρχει και να παρουσιάζει ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα (119), όπως συμβαίνει με την περίπτωση ασθενών, στους οποίους έχει χορηγηθεί αντιβίωση και κατά συνέπεια, το μικροβιακό φορτίο είναι χαμηλό (120).

Αντίθετα, οι μοριακές τεχνικές και συγκεκριμένα οι τεχνικές οι οποίες βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR-Polymerase Chain Reaction) παρέχουν υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια, ενώ παράλληλα δίνεται η δυνατότητα ταυτόχρονης αξιολόγησης δειγμάτων σε μειωμένο χρόνο ανάλυσης καθώς επίσης ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος της επιμόλυνσης, συγκριτικά με τις υπόλοιπες συμβατικές τεχνικές (119,121). Συνεπώς, η εφαρμογή της PCR συμβάλλει σημαντικά στη διάγνωση λοιμώξεων μειώνοντας το χρόνο διάγνωσης ενώ παράλληλα αυξάνεται η αξιοπιστία τους (7).

### 4.1. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ή αλλιώς Polymerase Chain Reaction (PCR), αναφέρεται στον *in vitro* εκθετικό πολλαπλασιασμό μιας αλληλουχίας γενετικού υλικού. Οι αρχές που διέπουν τη συγκεκριμένη τεχνική αφορούν στη συνεχόμενη επανάληψη 3 διαδοχικών σταδίων. Επιπλέον, με την εφαρμογή της PCR προσφέρεται η δυνατότητα ενίσχυσης συγκεκριμένων αλληλουχιών γενετικού υλικού (γονίδια) με τη χρήση των εκκινητικών μορίων (primers) και της DNA πολυμεράσης.

Τα απαιτούμενα αντιδραστήρια της δοκιμασίας της PCR είναι τα εκκινητικά μόρια (primers), η θερμοάντοχη DNA πολυμεράση, τα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dNTPs), το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) καθώς και το DNA στόχος (DNA template). Τα εκκινητικά μόρια, χρησιμοποιούνται ανά ζεύγη (forward και reverse) στοχεύοντας την «αρχή» και το «τέλος» της επιθυμητής αλληλουχίας DNA, ενισχύοντας ένα συγκεκριμένο κομμάτι της μόνο. Κάθε εκκινητικό μόριο είναι ένα βραχύ τμήμα DNA με μήκος 15 έως και 30 νουκλεοτιδία, όπου η DNA πολυμεράση θα προσδεθεί για να ξεκινήσει την επιμήκυνση. Η λειτουργικότητα των primers εξαρτάται από παράγοντες όπως, το μήκος τους, η θερμοκρασία τήξης (Melting Temperature-T<sub>m</sub>) καθώς και από τη συμπληρωματικότητα με την επιθυμητή αλληλουχία. Το μήκος των εκκινητικών μορίων θα πρέπει να είναι όσο το δυνατό σχετικά μικρό, ενώ προτιμώνται εκκινητικά μόρια με σχετικά υψηλό T<sub>m</sub>, για να μην επηρεάζεται η δράση τους λόγω των υψηλών θερμοκρασιών της PCR στο στάδιο της ενσωμάτωσης τους στο DNA στόχο (122).

Ο ρόλος της θερμοάντοχης DNA πολυμεράσης είναι η επιμήκυνση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας, ωστόσο η ιδιαιτερότητα του εν λόγω ενζύμου είναι ότι αντέχει σε υψηλές θερμοκρασίες συγκριτικά με άλλα ένζυμα, γεγονός που την καθιστά κατάλληλη για αυτές τις δοκιμές. Επιπλέον, χρειάζονται dNTPs, τα οποία παρέχουν νουκλεοτίδια στο ένζυμο της DNA πολυμεράσης καθώς επίσης του παρέχουν την απαραίτητη ενέργεια για την εκτέλεση της PCR. Τέλος, ο ρόλος του buffer στην PCR είναι σημαντικός, καθώς περιέχει χλωριούχο μαγνήσιο, το οποίο βοηθά στην αναγνώριση των νουκλεοτιδίων από την DNA πολυμεράση (122) .

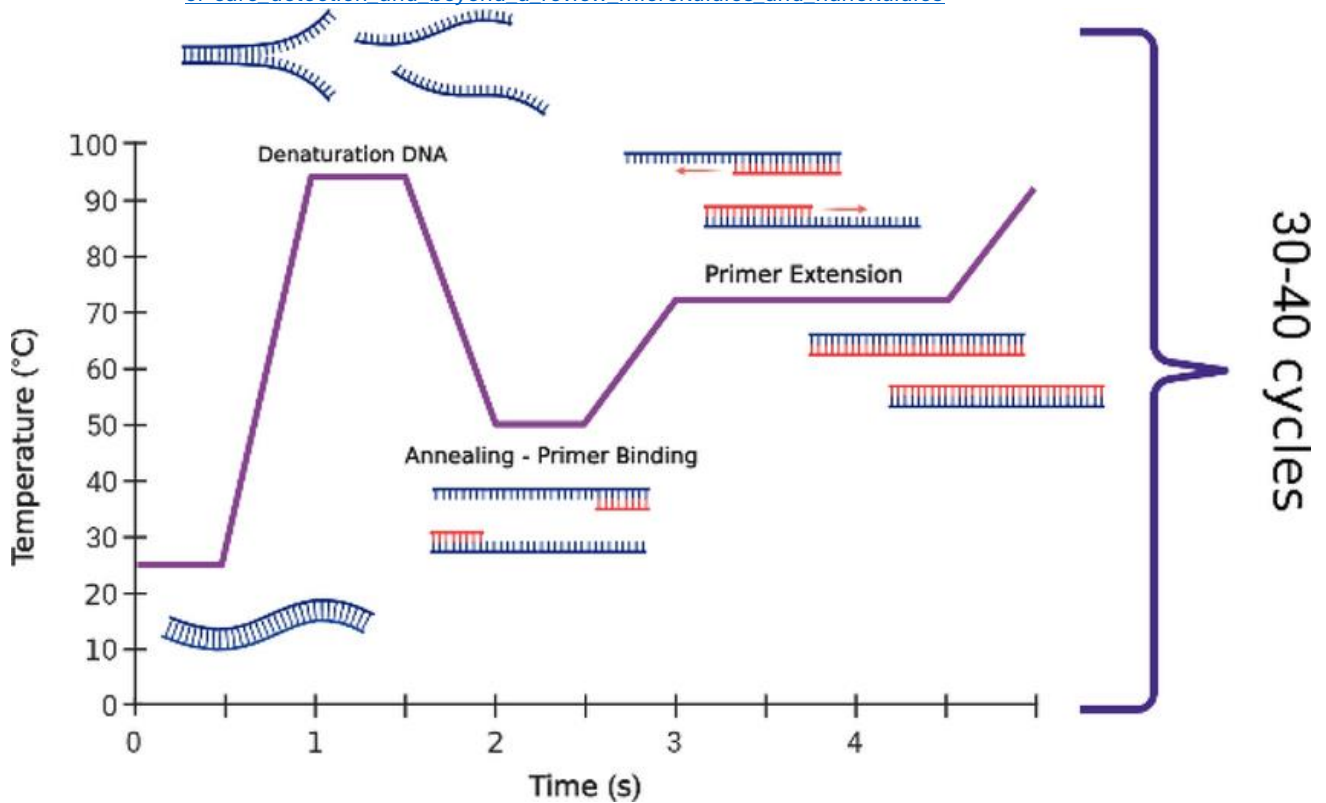
Αναλυτικότερα, η αντίδραση της PCR χωρίζεται σε 3 στάδια, εκ των οποίων το πρώτο είναι η αποδιάταξη της διπλής πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας του DNA σε θερμοκρασία 95°C. Έπειτα, ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας με σκοπό την πρόσδεση των εκκινητικών μορίων στο 3' άκρο και τέλος στην επιμήκυνση του νεοσυντιθέμενου μορίου DNA. Συγκεκριμένα, κατά το στάδιο της αποδιάταξης (denaturation), λόγω των υψηλών θερμοκρασιών σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των αζωτούχων βάσεων στο δίκλωνο μόριο DNA και προκύπτουν 2 μονόκλωνες αλυσίδες. Στη συνέχεια, ειδικά ως προς την επιθυμητή αλληλουχία στόχο κατασκευασμένα εκκινητικά μόρια (primers), ενσωματώνονται (annealing)



στις συγκεκριμένες θέσεις του γονιδίου στόχου, το εν λόγω στάδιο πραγματοποιείται σε χαμηλές θερμοκρασίες, συγκριτικά με την αποδιάταξη, προκειμένου να πραγματοποιηθεί σωστά η ενσωμάτωση των εκκινητικών μορίων. Τέλος, με τη βοήθεια του ενζύμου DNA πολυμεράση, επιτυγχάνεται η επιμήκυνση της νέας αλυσίδας (primer extension), η οποία σχηματίζεται συμπληρωματικά του μητρικού κλώνου (123).

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 13) απεικονίζονται τα στάδια της αντίδρασης της PCR.

**Εικόνα 13: Τα 3 στάδια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).**  
Πηγή: [https://www.researchgate.net/publication/373834786\\_Micro-polymerase\\_chain\\_reaction\\_for\\_point-of-care\\_detection\\_and\\_beyond\\_a\\_review\\_microfluidics\\_and\\_nanofluidics](https://www.researchgate.net/publication/373834786_Micro-polymerase_chain_reaction_for_point-of-care_detection_and_beyond_a_review_microfluidics_and_nanofluidics)



#### **4.1.1. Παραλλαγές της PCR**

##### *4.1.1.1. Multiplex PCR (mPCR)*

Το πρωτόκολλο της multiplex PCR στοχεύει στην ταυτόχρονη ανίχνευση προϊόντων PCR, διαφορετικού μοριακού βάρους, με τη χρήση ενός primer mix σε μια μόνο αντίδραση (124). Σημαντικός παράγοντας σε αυτή την τεχνική είναι ο προσεκτικός σχεδιασμός των εκκινητικών μορίων, καθώς θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη βαρύτητα στις θερμοκρασίες υβριδισμού τους, έτσι ώστε να μη διαχωριστούν κατά την πρόσδεσή τους στο DNA στόχο (4,125).

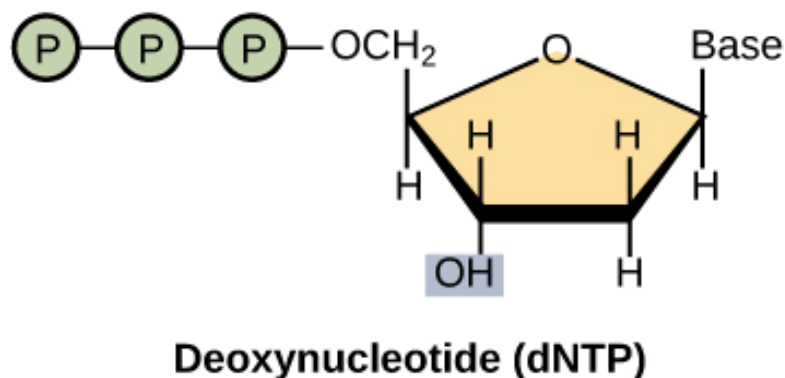
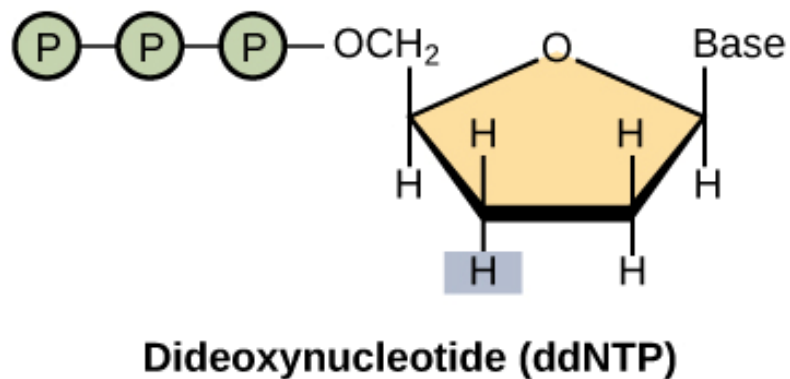
##### *4.1.1.2. Touch-down PCR (TD-PCR)*

Η συγκεκριμένη παραλλαγή της PCR εφαρμόζεται για τη βελτίωση των αποτελεσμάτων της δοκιμής. Συγκεκριμένα, γίνεται ενίσχυση του επιθυμητού γονιδιακού τόπου, αυξάνοντας της θερμοκρασία στα πρώτα στάδια της αντίδρασης (124). Έτσι, με τον τρόπο αυτό, αυξάνεται η ειδικότητα και η ευαισθησία της τεχνικής, καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία της πρόσδεσης των εκκινητικών μορίων στο DNA στόχο κατά 5- 10°C σε σχέση με τη θερμοκρασία τήξης (Tm) τους και έπειτα η θερμοκρασία μειώνεται στους επόμενους κύκλους (126,127). Ουσιαστικά, η εφαρμογή της τεχνικής αυτής επιτρέπει την πρόσδεση των primer σε υψηλότερες θερμοκρασίες, για την αποτροπή σχηματισμού μη-ειδικών προϊόντων (124).

## 4.2. Αλληλούχιση (Sequencing)

Η τεχνική της αλληλούχισης ή αλλιώς sequencing στηρίζεται στην *in vitro* αντιγραφή του DNA στόχου, παρουσία διδεοξυριβονουκλεοτιδίων, τα οποία ευθύνονται για τον πρόωρο τερματισμό της σύνθεσης των αλυσίδων, καθώς η DNA πολυμεράση δεν μπορεί να συνεχίσει την περαιτέρω προσθήκη νουκλεοτιδίων απουσίας του 3'- υδροξυλίου. Όσον αφορά τα διδεοξυριβονουκλεοτίδια (ddNTPs), πρόκειται για νουκλεοτίδια που έχουν υποστεί τροποποίηση στο υδροξύλιο του 3' άνθρακα και αντί αυτού, φέρουν ένα υδρογόνο (128) (Εικόνα 14).

Εικόνα 14: Σύγκριση ενός διδεοξυριβονουκλεοτιδίου με ένα δεοξυριβονουκλεοτίδιο.



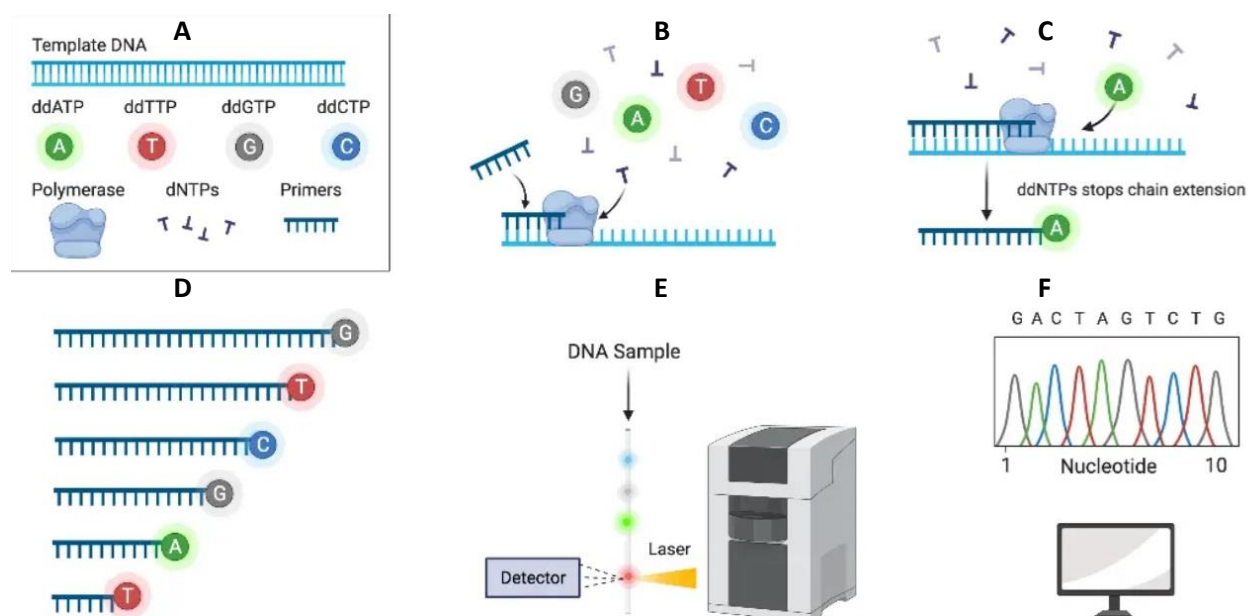
Ειδικότερα, η τεχνική της αλληλούχισης περιλαμβάνει 4 αντιδράσεις αντιγραφής του μορίου DNA, όμοιες με την αντίδραση της PCR, όπου σε κάθε μια από τις 4 αντιδράσεις, προστίθενται κάθε ένα από τα 4 διδεοξυριβονουκλεοτίδια, τα οποία είναι σημασμένα με συγκεκριμένες χρωστικές, προκειμένου να είναι εύκολος ο εντοπισμός τους (128,129).

Αναλυτικότερα, αφού γίνει η διαδικασία της PCR για την ενίσχυση του επιθυμητής αλληλουχίας, το δείγμα οδηγείται προς αλληλούχιση (sequencing). Η *in vitro* διαδικασία του sanger sequencing πραγματοποιείται σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα με μεθοδολογία παρόμοια της PCR, όπου προστίθενται δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) καθώς και διδεοξυριβονουκλεοτίδια (ddNTPs), με τα τελευταία να τερματίζουν την αντίδραση. Συγκεκριμένα, η τεχνική της αλληλούχισης βασίζεται στην περαιτέρω σύνθεση ενός τμήματος DNA, το οποίο είναι συμπληρωματικό ως προς το DNA στόχο (template) που υπάρχει στο δοκιμαστικό σωλήνα. Επομένως, η παραπάνω τεχνική περιλαμβάνει το DNA στόχο, τους κατάλληλα σχεδιασμένους εκκινήτες για την ενίσχυση του γονιδίου, τη DNA πολυμεράση και ένα μείγμα από dNTPs και ddNTPs (Εικόνα 15 A). Στη συνέχεια, τα εκκινήτικά μόρια προσδένονται στις κατάλληλες θέσεις στο γονίδιο και πραγματοποιείται η σύνθεση του νέου κλώνου DNA, με το ένζυμο DNA πολυμεράση να προσθέτει νουκλεοτίδια (dNTPs) βάσει του κανόνα συμπληρωματικότητας των βάσεων (A-T και G-C) (Εικόνα 15 B). Ωστόσο, η επιλογή ενσωμάτωσης ενός dNTP ή ενός ddNTP είναι τυχαία, έτσι κατά την ενσωμάτωση ενός ddNTP τερματίζεται η αντίδραση (Εικόνα 15 C) έχοντας ως αποτέλεσμα τη δημιουργία θραυσμάτων διαφορετικού μεγέθους (Εικόνα 15 D) (128).

Αφότου ολοκληρωθεί η σύνθεση του DNA με τα ddNTPs και δημιουργηθούν τα θραύσματα διαφορετικού μήκους, τα προϊόντα του κάθε δείγματος εισέρχονται σε ένα γυάλινο τριχοειδές και διαχωρίζονται βάση του μεγέθους τους. Στο εν λόγω τριχοειδές, υπάρχει ένας ανιχνευτής φθορισμού, ο οποίος καθορίζει σε ποιο νουκλεοτίδιο (A, T, G ή C) τερματίζεται η κάθε αντίδραση (Εικόνα 15 E), καθώς τα ddNTPs, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, είναι σημασμένα με διαφορετικές χρωστικές (128,129). Συγκεκριμένα, στην (Εικόνα 15 D), παρουσιάζονται τα διδεοξυριβονουκλεοτίδια ανάλογα με τη χρωστική που είναι σημασμένα.

Τέλος, ο ανιχνευτής που βρίσκεται εντός του γυάλινου τριχοειδούς μεταφράζει τις κορυφές, οι οποίες έχουν προκύψει από την ανάγνωση των σημάτων φθορισμού των ddNTPs (χρωματογράφημα), σε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες (Εικόνα 15 F).

**Εικόνα 15: Διαδικασία της μεθόδου αλληλούχισης τερματισμού (sanger sequencing)**



Εφαρμόζοντας μεθόδους αλληλούχισης (sanger sequencing, WGS, NGS), ανάλογα με τις απαιτήσεις των δοκιμών, γίνεται εφικτή η παρακολούθηση των μικροοργανισμών για τον εντοπισμό μηχανισμών αντοχής σε αντιβιοτικά (130). Ακόμη, εκτός από την ταυτοποίηση των βακτηρίων, οι μέθοδοι αλληλούχισης βρίσκουν εφαρμογή και στην περαιτέρω τυποποίηση τους. Για παράδειγμα, στην περίπτωση του *S. pneumoniae*, γίνεται αλληλούχιση του γονιδίου *cps* το οποίο είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση της πολυσακχαριδικής κάψας, δίνοντας πληροφορία σχετικά με την περαιτέρω τυποποίηση του εν λόγω μικροοργανισμού ως προς τον ορότυπο (131).

Η εφαρμογή της μεθόδου της αλληλούχισης έχει συμβάλει αρκετά στην προσπάθεια της ταυτοποίησης των στρεπτόκοκκων. Το γεγονός αυτό, είχε ως αποτέλεσμα σε αρκετές μελέτες για τον προσδιορισμό του είδους των στρεπτόκοκκων, να χρησιμοποιηθούν μέθοδοι αλληλούχισης σε γονίδια του βακτηριακού γονιδιώματος, όπως το *tuf*, το *16s rRNA*, το *recA*, το *sodA*, το *rpoB*,

το *dnaK*, το *ddl*, και το *gdh*, εξετάζοντας τη διακριτική ισχύ μεταξύ των ειδών (7,8,132).

Για την ακριβή ταυτοποίηση/ τυποποίηση των βακτηρίων και συγκεκριμένα των στρεπτόκοκκων χρειάζεται ένας συνδυασμός μοριακών εργαλείων. Για παράδειγμα, χρήση της PCR για την ενίσχυση βασικών γονιδίων των στρεπτόκοκκων, αλληλούχιση (sequencing) των προϊόντων της PCR (8,132) και η παράλληλη σύγκριση των αποτελεσμάτων με αλληλουχίες αναφοράς σε παγκόσμιες βάσεις δεδομένων (GenBank) χρησιμοποιώντας λογισμικά- εργαλεία, όπως το BLAST (Basic Local Alignment Sequence Tool) (7,133).

Οι μοριακές τεχνικές υπερτερούν έναντι των συμβατικών μεθόδων ταυτοποίησης και τυποποίησης των μικροοργανισμών. Σε ένα γενικότερο πλαίσιο, η μέθοδος της αλληλούχισης λειτουργεί συμπληρωματικά σε ένα εργαστήριο διότι επιτρέπει περαιτέρω τυποποίηση των μικροοργανισμών παραπάνω από το επίπεδο του είδους, συμβάλλοντας έτσι και στην επιδημιολογική επιτήρηση τους (9,134).

#### **4.2.1. Αλληλούχιση επόμενης γενιάς- Next Generation Sequencing (NGS)**

Ο πρωταρχικός στόχος της αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) είναι η βελτίωση της μεθόδου Sanger sequencing, σε επίπεδο κόστους καθώς και χρόνου διεξαγωγής της τεχνικής (135,136). Ακόμη, με το NGS προσφέρεται η δυνατότητα αλληλούχισης μεγάλου αριθμών θραυσμάτων γενετικού υλικού με μεγαλύτερη ακρίβεια τεχνικής (135). Συμπερασματικά, οι τεχνικές αλληλούχισης επόμενης γενιάς έχουν ως κοινή αρχή την αλληλούχιση και στοίχιση πολλαπλών θραυσμάτων με εργαλεία βιοπληροφορικής, ενώ διαφέρουν μεταξύ τους στον τρόπο ανάλυσης των νουκλεοτιδίων στους κλώνους του DNA (137).

### 4.3. Γονίδια που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των

#### *Streptococcus* spp.

Οι μοριακές μέθοδοι βασιζόμενες στις παραπάνω τεχνικές έχουν υψηλή ευαισθησία και επιτρέπουν τον εντοπισμό στρεπτόκοκκων σε κλινικά δείγματα (8). Ειδικότερα, κατά τη σύγκριση των αποτελεσμάτων ταυτοποίησης βάσει διαφορετικών γονιδίων (*tuf*, *16s rRNA*, *recA*, *sodA*, *rpoB*, *dnaK*, *ddl*, *gdh*) φαίνεται πως το γονίδιο *tuf* αποτελεί τον κατάλληλο μοριακό δείκτη για φυλογενετικές αναλύσεις και ταυτοποίηση ειδών σε κλινικά δείγματα (7,132) καθώς η αλληλουχία του αποτελεί ισχυρότερο διακριτικό «δείκτη» ανάμεσα στα είδη συγκριτικά με τα υπόλοιπα γονίδια (8,132). Επίσης είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι, η αλληλούχιση του γονιδίου *tuf* μπορεί να βοηθήσει στον εντοπισμό «νέων» ειδών στρεπτόκοκκου (132). Στον παρακάτω πίνακα, συνοψίζονται τα βασικότερα γονίδια που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των στρεπτόκοκκων καθώς και οι αλληλουχίες των εκκινητών τους (Πίνακας 8).

**Πίνακας 8: Ολιγονουκλεοτίδια εκκινητών (primers) για την ενίσχυση των αντίστοιχων γονιδίων.**

Primer (5' → 3')	Γονίδιο	Μήκος σε ζεύγη βάσεων (bp)	Δημοσίευση
Str1: GTACAGTTGCTTCAGGACGTATC Str2: ACGTTCGATTCATC ACGTTG	<i>tuf</i>	198 bp	(8)
16sF : AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 16sR : AAAGGAGGTGATCCAGCC	<i>16s rRNA</i>	250 bp	(7,132)
RStrGseq81 : GAAAWWIATYGARAAAGAITTTGGTAA RStrGseq937 : TTYTCAGAWCCTTGICCAATYTTYTC	<i>recA</i>	150 bp	(7)
D1 : CCITAYICITAYGAYGCIYTIGARCC D2 : ARRTARTAIGCRTGYTCCCAIACRTC	<i>sodA</i>	100 bp	(7,132)
Strepto- F : AARYTIGGMCCTGAAGAAAT Strepto- R : TGIARTTTRTCATCAACCATGTG	<i>rpoB</i>	200 bp	(7)

#### 4.3.1. Γονίδια *16s rRNA*, *sodA* και *rpoB*

Η πολυμεράση του γονιδίου *16S rRNA* (μικρή ριβοσωμική υπομονάδα) εντοπίζεται στο γονιδίωμα όλων των βακτηρίων και αποτελεί ταυτόχρονα μια συντηρημένη και μεταβλητή περιοχή, συνεπώς πρόκειται για περιοχή όπου δε σημειώνονται σημαντικές μεταλλάξεις (7,132,138). Με τη χρήση κατάλληλων εκκινητικών μορίων, γίνεται εφικτή η αναγνώριση των διατηρημένων περιοχών και παράλληλα η ενίσχυση των μεταβλητών περιοχών, προκειμένου να γίνει ταυτοποίηση των

βακτηρίων. Μια επιπλέον χρήση του συγκεκριμένου γονιδίου είναι στην ανίχνευση βακτηριακού γενετικού υλικού σε κλινικά δείγματα ασθενών μετά τη λήψη αντιβιοτικών, βοηθώντας στην ταυτοποίηση βακτηρίων σε δείγματα με χαμηλό βακτηριακό DNA. Ωστόσο, με την αλληλούχιση του συγκεκριμένου γονιδίου καθίσταται εφικτή η ταξινόμηση μόνο σε επίπεδο είδους (138).

Το γονίδιο *groB* κωδικοποιεί τη β' υπομονάδα της RNA πολυμεράσης, αποτελώντας ένα σημαντικό «μοριακό στόχο» για την ταυτοποίηση των βακτηρίων. Παρόλο που η αλληλούχιση του γονιδίου αυτού, έχει αρκετά υψηλή διακριτική ισχύ, ορισμένες αλληλουχίες του είναι σχεδόν πανομοιότυπες σε κάποια είδη στρεπτόκοκκων και εντερόκοκκων, καθιστώντας αδύνατη τη διαφοροποίησή τους βάσει του συγκεκριμένου γονιδίου μόνο (7).

Τέλος, το γονίδιο *sodA* το οποίο κωδικοποιεί το ένζυμο της υπεροξειδικής δισμουτάσης, χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση βακτηρίων. Το ένζυμο της υπεροξειδικής δισμουτάσης συμμετέχει στην άμυνα του κυττάρου από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (oxygen free radicals), οι οποίες προκαλούν βλάβη σε αρκετά κύτταρα. Συγκεκριμένα, καταλύει την αντίδραση μετατροπής ριζών υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ) σε μοριακό οξυγόνο ( $O_2$ ) και υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) (139). Όπως παρατηρείται στα γονίδια *16s rRNA* και *groB*, έτσι και στο *sodA* υπάρχουν κοινές αλληλουχίες μεταξύ στρεπτόκοκκων και εντερόκοκκων, κάνοντας μη αποτελεσματική την ταυτοποίηση/ τυποποίηση με τη χρήση ενός γονιδίου μόνο (7).

#### **4.3.2. Γονίδιο *tuf***

Το γονίδιο *tuf* είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση του παράγοντα μεταγραφής (EF-Tu) των στρεπτόκοκκων και περιέχει τόσο συντηρημένες (conserved) όσο και μη συντηρημένες περιοχές (variable) στο γονιδίωμά του, γεγονός που το καθιστά ιδανικό εργαλείο για τον εντοπισμό αλλά και την ταυτοποίηση στρεπτόκοκκων με μεγάλη ακρίβεια (8,125). Μελέτες έχουν αναφέρει ότι, το στρεπτοκοκκικό γονίδιο *tuf* παρουσιάζει περισσότερες μη- συντηρημένες περιοχές συγκριτικά με άλλα βακτήρια, προσδίδοντας του έτσι την αυξημένη διακριτική ικανότητα (6,8).



Οι λόγοι για τους οποίους θεωρείται ως ένα ιδανικό μοριακό εργαλείο για την ταυτοποίηση στρεπτόκοκκων, έγκειται σε αποτελέσματα προηγούμενων μελετών, όπου κατά την εφαρμογή του έδειξαν πως μπορεί να ξεχωρίσει είδη μεταξύ τους με μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα από ότι το γονίδιο *16s rRNA* (8,132). Για παράδειγμα, η ανάλυση του γονιδιώματος στα είδη των στρεπτόκοκκων *S. mitis*, *S. oralis* και *S. pneumoniae*, έδειξε ότι ενώ βρίσκονται αρκετά κοντά φυλογενετικά, γίνεται εφικτός ο διαχωρισμός τους με την αλληλούχηση του γονιδίου *tuf* (8). Συγκεκριμένα, η ενίσχυση του συγκεκριμένου γονιδίου και κατόπιν η αλληλούχισή του, επιτρέπει την ταυτοποίηση τόσο σε επίπεδο γένους, όσο και σε επίπεδο είδους του μικροοργανισμού (132) παρουσιάζοντας αυξημένη διακριτική ισχύ συγκριτικά με άλλα γονίδια όπως για παράδειγμα το ριβοσωμικό RNA της μικρής υπομονάδας (*16s rRNA*) (8) (Εικόνα 16).

**Εικόνα 16: Διακριτική ισχύς μεταξύ του 16srRNA και του γονιδίου *tuf*.**

Πηγή: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC497632/pdf/1709-03.pdf>

Phenotypic species group	16S rDNA <sup>d</sup>	<i>tuf</i> <sup>h</sup>	
Viridans streptococci	Pyogenes	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. agalactiae</i>
		<i>S. dysgalactiae</i>	
		<i>S. pyogenes</i>	<b><i>S. dysgalactiae</i></b> <i>S. pyogenes</i>
		<i>S. equi</i>	<i>S. equi</i>
		<i>S. uberis</i>	
	Bovis	<i>S. parauberis</i>	<i>S. parauberis</i>
			<b><i>S. uberis</i></b>
	Mutans	<i>S. bovis</i> <sup>c</sup>	<i>S. bovis</i>
		<i>S. criceti</i>	
		<i>S. downei</i>	<b><i>S. criceti</i></b> <i>S. downei</i>
		<i>S. sobrinus</i>	<i>S. sobrinus</i>
		<i>S. ferus</i>	<i>S. macacae</i>
		<i>S. macacae</i>	<b><i>S. mutans</i></b> <b><i>S. ratti</i></b>
		<i>S. ratti</i>	
<i>S. mutans</i>			
Salivarius		<i>S. salivarius</i>	<i>S. salivarius</i>
		<i>S. vestibularis</i>	<i>S. vestibularis</i> <b><i>S. suis</i><sup>d</sup></b>
Anginosus	<i>S. anginosus</i>	<i>S. anginosus</i>	
	<i>S. constellatus</i>	<i>S. constellatus</i>	
	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>	
Mitis	<i>S. cristatus</i>		
	<i>S. gordonii</i>	<i>S. gordonii</i> <b><i>S. sanguinis</i></b> <b><i>S. cristatus</i></b>	
	<i>S. sanguinis</i>		
	<i>S. mitis</i>	<i>S. mitis</i>	
	<i>S. oralis</i>	<i>S. oralis</i>	
	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	
	<i>S. parasanguinis</i>	<i>S. parasanguinis</i>	
	<i>S. acidominimus</i> <sup>d</sup>	<i>S. acidominimus</i> <sup>d</sup> <b><i>S. ferus</i></b>	
	<i>S. bovis</i> <sup>c</sup>		
	<i>S. suis</i> <sup>d</sup>		

Συμπερασματικά, ο φυλογενετικός διαχωρισμός βάσει των γονιδίων 16s *rRNA* και *tuf*, έρχεται σε συμφωνία σε ένα μεγάλο ποσοστό. Ωστόσο, υπάρχουν είδη στρεπτόκοκκων τα οποία δεν ανιχνεύτηκαν με τη χρήση του 16s *rRNA*. Το γεγονός αυτό, φαίνεται να αποδίδεται στους διαφορετικούς ρυθμούς εξέλιξης των βακτηριακών γονιδιωμάτων καθώς επίσης και στην ετερογένεια των οπερονίων της μικρής βακτηριακής ριβοσωμικής υπομονάδας (8) (Εικόνα 16).

## 5. Επιδημιολογία

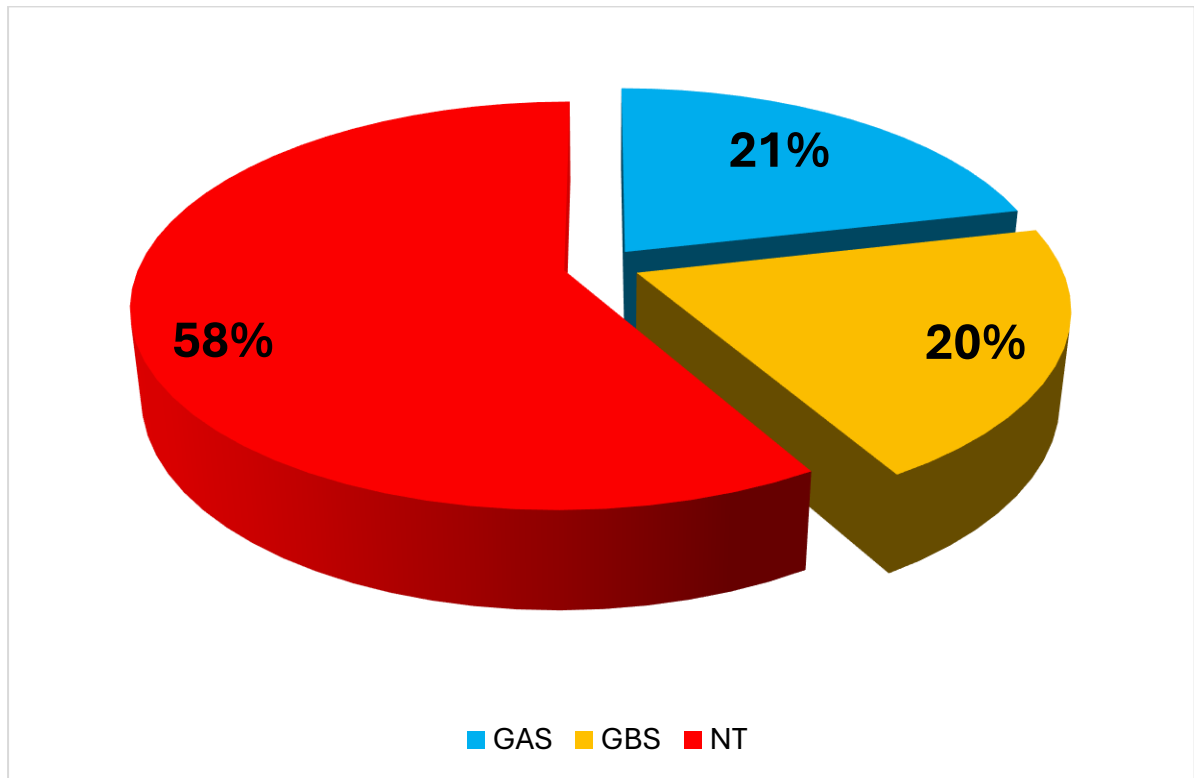
Έως σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί κρούσματα μηνιγγίτιδας από *Streptococcus* spp. χωρίς όμως να έχει γίνει περαιτέρω ταυτοποίηση του είδους του στρεπτόκοκκου, οι οποίοι δεν ανήκουν στα είδη *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* (GAS) και *S. agalactiae* (GBS), με ένα σημαντικό αριθμό βιολογικών δειγμάτων από ασθενείς με μηνιγγίτιδα ή και σηψαιμία, τα οποία ήταν θετικά στην PCR για άλλα είδη στρεπτόκοκκων. Το χρονικό διάστημα μεταξύ του 2015 έως και το 2023, οι στρεπτόκοκκοι που ταυτοποιήθηκαν συνολικά ήταν 166, εκ των οποίων οι 154 ήταν κλινικά δείγματα θετικά σε δοκιμασία PCR (PCR (+)) ενώ τα υπόλοιπα 12 ήταν θετικά και στην καλλιέργεια (καλλιέργεια (+)). Συγκεκριμένα, από τα 154 κλινικά δείγματα, 33 είχαν ταυτοποιηθεί με PCR ως GAS, 31 ως GBS και 90 που παρέμειναν non- tytable (NT). Αντίστοιχα, τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμή του γονιδίου *tuf* ήταν 4 στελέχη με θετική καλλιέργεια για GAS, 4 θετικά για GBS και 4 στελέχη *S. mitis*. (Πίνακας 9)

**Πίνακας 9: Συνολικός αριθμός κλινικών δειγμάτων (PCR (+)) και στελεχών, θετικά για *Streptococcus* spp., από ασθενείς με μηνιγγίτιδα/ σηψαιμία**

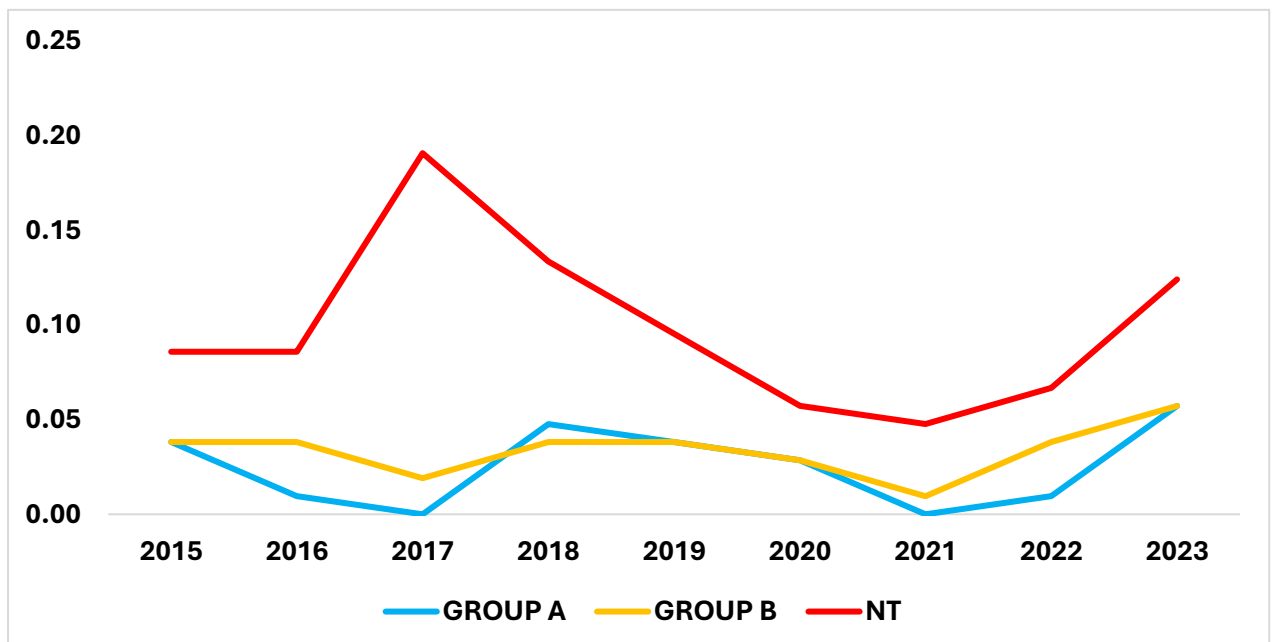
<i>Streptococcus</i> spp.	Καλλιέργεια (+)	PCR (+)	Μηνιγγίτιδα	Σηψαιμία	Σύνολο
<b>GAS</b>	4	33	20	13	37
<b>GBS</b>	4	31	19	12	35
<b>NT</b>	4 ( <i>S. mitis</i> )	90 (58%)	64	26	94
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>12 (7%)</b>	<b>154 (93%)</b>			<b>166</b>

Επί των 93% θετικών σε PCR δειγμάτων για μηνιγγίτιδα/ σηψαιμία, ένα ποσοστό 58% των στρεπτόκοκκων ήταν αρνητικοί ως προς την τυποποίησή τους σε GAS ή GBS και χαρακτηρίστηκαν ως Non- tytable (NT) (Γράφημα 1). Το εν λόγω ποσοστό των NT- *Streptococcus* spp., αντικατοπτρίζει τα υψηλά ποσοστά επίπτωσης κατά το χρονικό διάστημα 2015- 2023 σε σχέση με τους στρεπτόκοκκους GAS και GBS (Γράφημα 2 και Γράφημα 3), διεγείροντας το ενδιαφέρον για την περαιτέρω διερεύνηση τους.

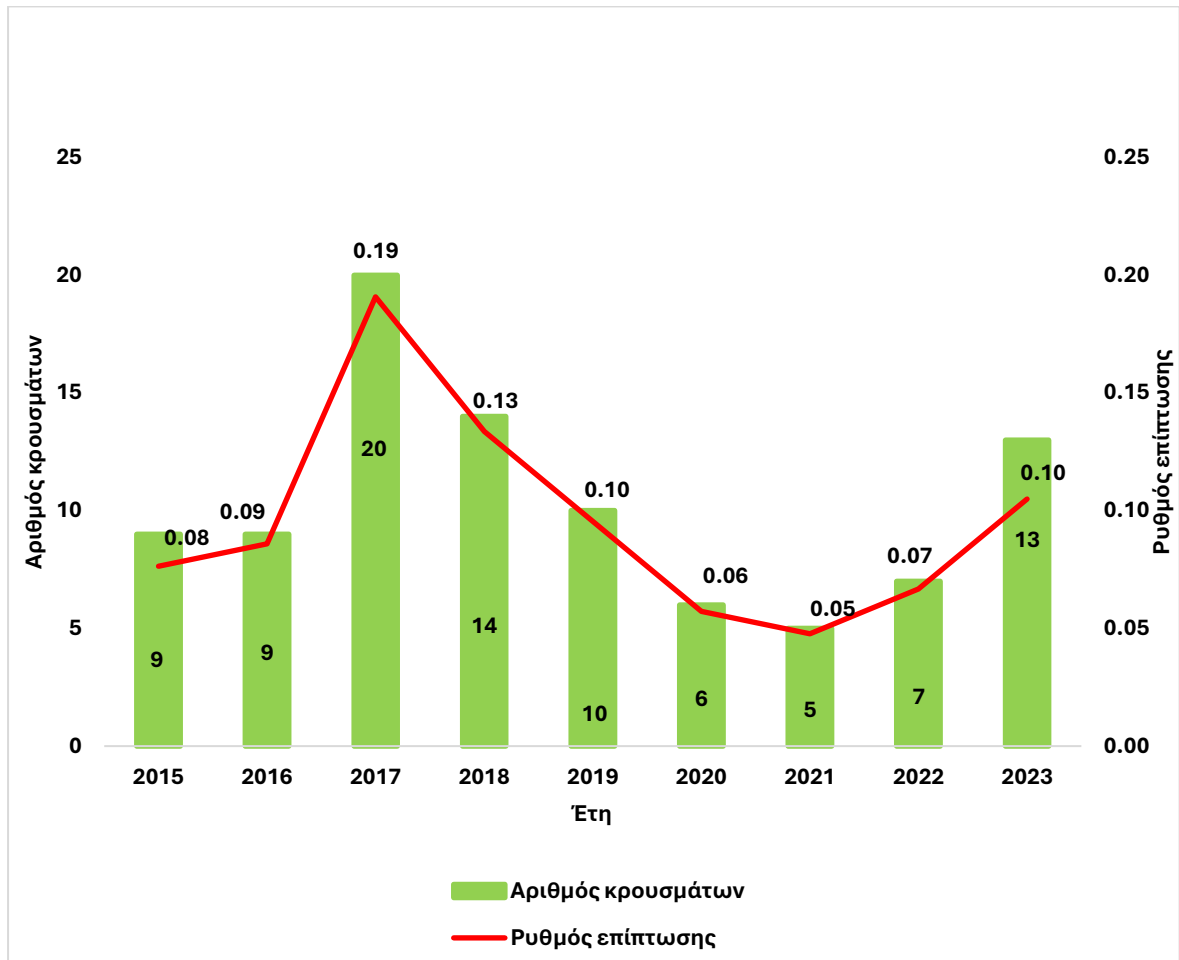
Γράφημα 1: Σύνολο θετικών σε PCR δειγμάτων για *S. agalactiae* (GBS), *S. pyogenes* (GAS) και NT- *Streptococcus spp.*



Γράφημα 2: Ρυθμός επίπτωσης στρεπτόκοκκων ομάδας A (GAS), ομάδας B (GBS) και μη ταυτοποιημένων (NT- *Streptococcus spp.*) στην Ελλάδα (2015-2023)



**Γράφημα 3: Αριθμός κρουσμάτων και ρυθμός επίπτωσης των NT- *Streptococcus* spp. στην Ελλάδα (2015-2023)**



Όπως φαίνεται στα παραπάνω γραφήματα, ο ρυθμός επίπτωσης των NT-*Streptococcus* spp. είναι αρκετά υψηλότερος από το ρυθμό του *S. agalactiae*(GBS) *S. pyogenes* (GAS).

## 6. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανάπτυξη τεχνικής για την ταυτοποίηση ως προς το είδος θετικών σε *Streptococcus spp.* απευθείας σε βιολογικά δείγματα που προκάλεσαν μηνιγγίτιδα και δεν έχουν ταυτοποιηθεί ως πνευμονιόκοκκοι ή ως *Streptococcus agalactiae* (GBS) ή *Streptococcus pyogenes* (GAS). Επιπλέον, γίνεται εφικτή η συλλογή πληροφορίας σχετικά με τους άλλους στρεπτόκοκκους οι οποίοι προκαλούν μηνιγγίτιδα καθώς και η παρακολούθηση των κρουσμάτων πριν, κατά τη διάρκεια αλλά και μετά την πανδημία της νόσου COVID-19. Συνεπώς, η περαιτέρω ταυτοποίηση των NT *Streptococcus spp.* είναι αναγκαία για την πλήρη εικόνα των στρεπτόκοκκων που κυκλοφορούν στη χώρα μας.

## **B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

---

## 7. Υλικό και μέθοδοι

### 7.1. Δείγματα

Συνολικά, για την υλοποίηση της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν 90 δείγματα DNA από εγκεφαλονωτιαίο υγρό (csf = 60), αίμα (bl = 20), αιμοκαλλιέργεια (blc = 4), πύον (pus = 5) καθώς και από υλικό βιοψίας (bps = 1). Από το σύνολο των δειγμάτων, τα  $n_1 = 64$  προέρχονταν από ασθενείς με κλινική εικόνα μηνιγγίτιδας ενώ οι υπόλοιποι ασθενείς  $n_2 = 26$  είχαν κλινική εικόνα σηψαιμίας. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν 12 στελέχη *Streptococcus* spp., τα οποία είχαν ήδη ταυτοποιηθεί ως GAS ( $n_3 = 4$ ), GBS ( $n_4 = 4$ ) αλλά και ως *S. mitis* ( $n_5 = 4$ ) για τον έλεγχο της λειτουργίας του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου.

Τα παραπάνω δείγματα DNA ήταν θετικά για *Streptococcus* spp. από ασθενείς με μηνιγγίτιδα/ σηψαιμία τα οποία, είχαν ταυτοποιηθεί με την multiplex PCR (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) που χρησιμοποιείται στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας (125), και δεν έχουν ταυτοποιηθεί περαιτέρω ως *Streptococcus pneumoniae*, (4) *Streptococcus agalactiae* (group B) και *Streptococcus pyogenes* (group A) (125).

### 7.2. Αντίδραση Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης PCR

#### 7.2.1. Επιλογή εκκινητικών μορίων

Τα εκκινητικά μόρια (primers) που χρησιμοποιήθηκαν στην τεχνική της PCR, τα οποία περιγράφονται παρακάτω, επιλέχθηκαν από δημοσιευμένη εργασία των Picard *et al.* (8).



## 7.2.2. Υλικό

### 7.2.2.1. Εκκινητικά μόρια (primers)

Τα χαρακτηριστικά του εκκινητικού μορίου που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση της PCR περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 10).

**Πίνακας 10: : Αλληλουχίες και χαρακτηριστικά του εκκινητικού μορίου (primer) *tuf*.**

Primer (5' → 3')	Γονίδιο	Μήκος σε ζεύγη βάσεων (bp)	Tm	Δημοσίευση
Str1: GTACAGTTGCTTCAGGACGTATC	<i>tuf</i>	198 bp	55	(8)
Str2: ACGTTCGATTCATC ACGTTG			54	

### 7.2.2.2. Αντιδραστήρια της PCR

Στον πίνακα παρακάτω παρουσιάζονται όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάπτυξη της τεχνικής, καθώς και τα στοιχεία του θερμοκυκλοποιητή (Πίνακας 11).

**Πίνακας 11: Αντιδραστήρια και θερμοκυκλοποιητής που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη της τεχνικής**

Μηχάνημα	
VWR	Doppio Gradient 2 x 48 well Thermocycler, VWR International GmbH, Germany
Αντιδραστήρια	
Εκκινητικά μόρια (primers)	Eurofins Genomics AT GmbH, Vienna, Austria
dNTPs	
Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Phusion DNA Polymerase	

### 7.2.2.3. Επιλογή θετικών και αρνητικών μαρτύρων

Η εφαρμογή της τεχνικής συμπεριλάμβανε τη χρήση θετικού και αρνητικού μάρτυρα για τον έλεγχο σωστής λειτουργίας της αντίδρασης και για τον έλεγχο επιμόλυνσης, αντίστοιχα. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε στέλεχος καλλιέργειας θετικό για *Streptococcus* spp., το οποίο ήταν ταυτοποιημένο ως *S. mitis*, ενώ αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δις- απεσταγμένο νερό.

### 7.2.3. Πειραματικά στάδια ανάπτυξης της PCR

#### Ι) Διαμόρφωση συνθηκών της αντίδρασης

Οι εκκινητές οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα τεχνική, όπως περιγράφονται σε προηγούμενη ενότητα (*Επιλογή εκκινητικών μορίων*), ενώ το πρόγραμμα στο οποίο εφαρμόστηκε αρχικά η αντίδραση της PCR με τα παραπάνω εκκινητικά μόρια και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων ανά αντίδραση παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

*Πίνακας 12: Συνθήκες της κάθε μεμονωμένης αντίδρασης PCR (1η δοκιμή).*

	Συνθήκες	PCR mix/ αντίδραση
<b>1η Δοκιμή</b>	95°C / 30 sec	0,3 μM κάθε primer
	40°C / 5 sec	39 κύκλοι 0,9 mM dNTPs
	72°C / 15 sec	0,5 U Taq 1,1 x buffer 5ng DNA template
		<b>Τελικός όγκος = 20 μl</b>

Τα αποτελέσματα της παραπάνω τεχνικής αξιολογήθηκαν ως μη-ικανοποιητικά, οδηγώντας σε τροποποίηση (αύξηση/ μείωση) των συγκεντρώσεων των αντιδραστηρίων της PCR. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε μείωση στη συγκέντρωση των dNTPs ανά αντίδραση PCR από τα 0.9 mM στα 0.8 mM ενώ παράλληλα μειώθηκε και η συγκέντρωση της DNA πολυμεράσης από 0.5 U σε 0.24 U. Επιπλέον, έγινε αύξηση της συγκέντρωσης των εκκινητών από τα 0.3 μM στα 0.5 μM, καθώς επίσης και της συγκέντρωσης του διαλύματος (buffer) από το 1.1 X στο 1.2 X, διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση του DNA στόχου. Η νέα δοκιμή και οι συνθήκες της αντίδρασης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (*Πίνακας 13*).

**Πίνακας 13: Συνθήκες της κάθε μεμονωμένης αντίδρασης PCR μετά την τροποποίηση των αντιδραστηρίων (2η δοκιμή).**

	Συνθήκες	PCR mix/ αντίδραση
<b>2<sup>η</sup> Δοκιμή</b>	95°C / 30 sec	0,5 μM κάθε primer
	40°C / 5 sec	0,8 mM dNTPs
	72°C / 15 sec	0,24 U Taq
		1,2 x buffer
		5ng DNA template
		<b>Τελικός όγκος = 20 μl</b>

Τα αποτελέσματα της παραπάνω δοκιμής συνέχισαν να είναι μη ικανοποιητικά και οδήγησαν στις σε διαδοχικές τροποποιήσεις, όπως αύξηση της θερμοκρασίας αποδιάταξης στους 96°C για 30 δευτερόλεπτα καθώς και της θερμοκρασίας επιμήκυνσης στους 55°C για 5 δευτερόλεπτα. Η νέα δοκιμή και οι συνθήκες της αντίδρασης παρουσιάζονται στον Πίνακας 14.

**Πίνακας 14: Συνθήκες της κάθε μεμονωμένης αντίδρασης PCR μετά την αύξηση της θερμοκρασίας αποδιάταξης και της επιμήκυνσης (3η δοκιμή)**

	Συνθήκες	PCR mix/ αντίδραση
<b>3<sup>η</sup> Δοκιμή</b>	96°C / 30 sec	0,5 μM κάθε primer
	55°C / 5 sec	0,8 mM dNTPs
	72°C / 15 sec	0,24 U Taq
		1,2 x buffer
		5ng DNA template
		<b>Τελικός όγκος = 20 μl</b>

Το αποτέλεσμα της 3ης δοκιμής έδειξε μια καλύτερη εικόνα, ωστόσο δεν ήταν το επιθυμητό αποτέλεσμα της τεχνικής. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν αλλαγές στις συνθήκες της PCR. Συγκεκριμένα, έγινε αύξηση της θερμοκρασίας αποδιάταξης στους 98°C για 30 δευτερόλεπτα. Στον Πίνακας 15 παρουσιάζονται οι συνθήκες της αντίδρασης μετά τις τροποποιήσεις της θερμοκρασίας.

**Πίνακας 15: Συνθήκες της κάθε μεμονωμένης αντίδρασης PCR μετά την αύξηση της θερμοκρασίας αποδιάταξης (4η δοκιμή)**

	Συνθήκες	PCR mix/ αντίδραση
<b>4<sup>η</sup> Δοκιμή</b>	98°C / 30 sec	0,5 μM κάθε primer
	55°C / 5 sec	0,8 mM dNTPs
	72°C / 15 sec	0,24 U Taq 1,2 x buffer 5ng DNA template
		<b>Τελικός όγκος = 20 μl</b>

Σαν αποτέλεσμα της εφαρμογής της 4<sup>ης</sup> δοκιμής, η αύξηση της θερμοκρασίας, ενίσχυσε τη δράση της DNA πολυμεράσης. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε άλλη μια δοκιμή με στόχο την αύξηση της θερμοκρασίας στο στάδιο της επέκτασης. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι συνθήκες της νέας δοκιμής (Πίνακας 16).

**Πίνακας 16: Συνθήκες της κάθε μεμονωμένης αντίδρασης PCR μετά την αύξηση της θερμοκρασίας επιμήκυνσης (5η δοκιμή)**

	Συνθήκες	PCR mix/ αντίδραση
<b>5<sup>η</sup> Δοκιμή</b>	98°C / 30 sec	0,5 μM κάθε primer
	65°C / 5 sec	0,8 mM dNTPs
	72°C / 15 sec	0,24 U Taq 1,2 x buffer 5ng DNA template
		<b>Τελικός όγκος = 20 μl</b>

Παρά τη βελτίωση των αποτελεσμάτων της τεχνικής, εφαρμόστηκε η τεχνική της touchdown- PCR, όπως περιγράφεται στην ενότητα 4.1.1.2. Η νέα δοκιμή βασίστηκε στη λογική της touchdown PCR, η οποία περιλαμβάνει την εφαρμογή δύο θερμοκρασιών υβριδισμού, όπως περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 17).

**Πίνακας 17: Συνθήκες της κάθε μεμονωμένης αντίδρασης touchdown PCR μετά την τροποποίηση των συνθηκών (6η δοκιμή)**

	Συνθήκες		PCR mix/ αντίδραση
6 <sup>η</sup> Δοκιμή	98°C / 30 sec	1 κύκλος	0,5 μM κάθε primer
	98°C / 5 sec		0,8 mM dNTPs
	65°C / 12 sec	11 κύκλοι	0,24 U Taq
	72°C / 15 sec		1,2 x buffer
	98°C / 5 sec		5ng DNA template
	63°C / 12 sec	27 κύκλοι	<b>Τελικός όγκος = 20 μl</b>
	72°C / 15 sec		
	72°C / 1 min	1 κύκλος	

## II) Εφαρμογή της τεχνικής απευθείας σε κλινικά δείγματα

Η παρούσα τεχνική εφαρμόστηκε συνολικά σε 90 δείγματα ασθενών με μηνιγγίτιδα/ σηψαιμία, τα οποία δεν είχαν ταυτοποιηθεί ως *S. pneumoniae*, με την τεχνική της multiplex PCR, η οποία ανιχνεύει τα βακτήρια *N.meningitidis*, *S.pneumoniae* και *H.influenzae* b (4) και ήταν θετικά για *Streptococcus* spp. βάσει πρωτοκόλλου μιας 2<sup>ης</sup> multiplex PCR που ανιχνεύει τα βακτήρια *Streptococcus* spp., *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa* (125) και αρνητικά προς την τυποποίησή τους για *S. agalactiae* (GBS) και *S. pyogenes* (GAS).

## III) Παρασκευή γέλης αγαρόζης

Για την παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 2% w/v, ζυγίστηκαν 2 gr αγαρόζης (Nippon Genetics, Tokyo, Japan), τα οποία προστέθηκαν σε διάλυμα TEB 1 X (Tris-EDTA- Boric Acid, AppliChem, Barcelona, Spain), όγκου 100 ml. Το παραπάνω διάλυμα θερμαίνεται και ανακατεύεται έως ότου ομογενοποιηθεί.

Τέλος, το ομογενοποιημένο πήκτωμα τοποθετείται σε ειδικά καλούπια, στα οποία τοποθετούνται «χτενάκια» για τη δημιουργία των θέσεων (wells) και αφαιρούνται όταν το πήκτωμα πλέον έχει πήξει.

#### **IV) Απεικόνιση αποτελεσμάτων**

Η απεικόνιση των αποτελεσμάτων της PCR, έγινε με τη χρήση 5  $\mu$ L του προϊόντος της PCR σημασμένα με 1  $\mu$ L GelRed loading buffer (6 $\times$  Gel loading dye, Biotium, Fremont, California, USA) και ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αγαρόζης 2.0% w/v gel (Nippon Genetics, Tokyo, Japan). Κατόπιν, τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης οπτικοποιήθηκαν υπό υπεριώδες φως φθορισμού.

#### **7.3. Πρωτόκολλο καθαρισμού δειγμάτων για αλληλούχιση**

Τα δείγματα μετά τη δοκιμή της PCR καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο καθαρισμού PCR-clean-up protocol, NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up kit (Macherey–Nagel, Düren, Germany) σε τελικό όγκο 20  $\mu$ L (elution). Στη συνέχεια, προκειμένου να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα του καθαρισμού, ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 2% w/v 5  $\mu$ L των προϊόντων που υποβλήθηκαν σε καθαρισμό, σημασμένα με 1  $\mu$ L GelRed loading buffer (6 $\times$  Gel loading dye, Biotium, Fremont, CA, USA) και οπτικοποιήθηκαν με τη χρήση υπεριώδους φωτός φθορισμού. Τέλος, τα καθαρισμένα PCR προϊόντα στάλθηκαν προς αλληλούχιση.

#### **7.4. Αλληλούχιση**

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης είναι με τη μορφή χρωματογραφημάτων, τα οποία επεξεργάζονται με το πρόγραμμα Chromas software (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>, version 2.6.6, Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia, free downloaded). Οι αλληλουχίες νουκλεοτιδίων που προέκυψαν από το δίκλωνο DNA, εισάχθηκαν στο λογισμικό CLUSTALW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>, Bioinformatics tools provided by GenomeNet, Kyoto University Bioinformatics Center, Kyoto, Japan, free online software), όπου και συγκρίθηκαν μεταξύ τους.

Η σύγκριση των αλυσίδων του γονιδίου *tuf* στα κλινικά δείγματα πραγματοποιήθηκε και στους 2 κλώνους, καθώς διαφορετικά εκκινητικά μόρια (primers) εφάπτονταν σε αυτό. Αξίζει να σημειωθεί ότι, οι primers που χρησιμοποιήθηκαν στόχευαν και εφάπτονταν σε διαφορετικά σημεία του γονιδίου. Συγκεκριμένα, το ένα εκκινητικό μόριο προσδενόταν στις 20 πρώτες αλληλουχίες

του γονιδίου εκ των αριστερών ενώ, η δράση του δεύτερου εκκινητικού μορίου ήταν εκ των δεξιών του γονιδίου στόχου. Κατά τη σύγκριση των 2 πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων του εν λόγω γονιδίου, πρόκυπτε τις περισσότερες φορές πλήρης ομοιότητα μεταξύ των 2 αλυσίδων του γονιδίου ενώ μερικές φορές παρατηρήθηκε διαφωνία μεταξύ των αλληλουχιών.

Ο σκοπός της επεξεργασίας με το λογισμικό CLUSTALW, ήταν η σύνθεση μιας αλληλουχίας- τελικό προϊόν (γονίδιο *tuf*) μήκους περίπου 198 bp, από δύο επιμέρους κλώνους μεγέθους 160 bp έκαστος. Το στάδιο της επεξεργασίας των χρωματογραφημάτων περιλάμβανε την αποκοπή των αλληλουχιών που εμφάνιζαν ομοιότητα και στους 2 κλώνους, ενώνοντας τους προς τη δημιουργία μιας νέας, τελικής αλυσίδας, η οποία θα αποτελέσει το γονίδιο *tuf*.

Στην περίπτωση που δεν υπήρχε ομοιότητα μεταξύ των 2 κλώνων, πραγματοποιήθηκε διόρθωση του ενός κλώνου σύμφωνα με τον άλλον. Ειδικότερα, σε χρωματογραφήματα όπου στον έναν κλώνο δεν υπήρχε μια από τις αζωτούχες βάσεις (A, T, G ή C) και υπήρχε κάποιο κενό ή κάποιο άλλο γράμμα, το οποίο υποδήλωνε αβεβαιότητα κατά το «διάβασμα» της αλληλούχισης, έγινε διόρθωση με τον συμπληρωματικό ως προς τη μια αλυσίδα κλώνο, όπου το αποτέλεσμα της αλληλούχισης ήταν εμφανές.

Τέλος, μετά την επεξεργασία/ διόρθωσή τους, οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες εισάγονται στη βάση δεδομένων Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) όπου προκύπτουν τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των στρεπτόκοκκων (133).

## **8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

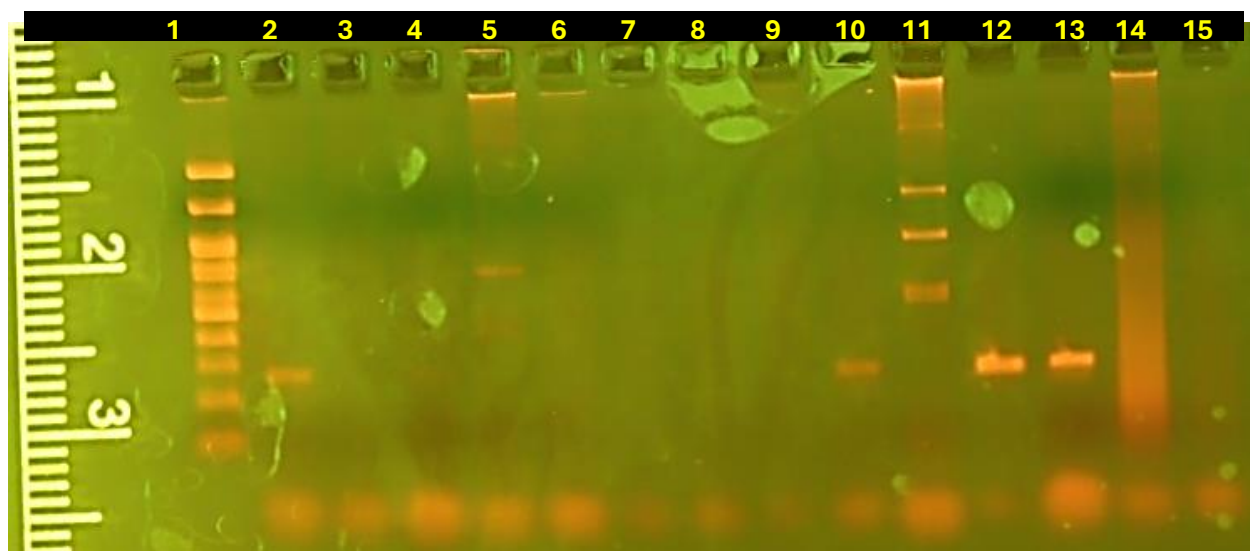
---



## 8.1. Πειραματικό στάδιο ανάπτυξης τεχνικής

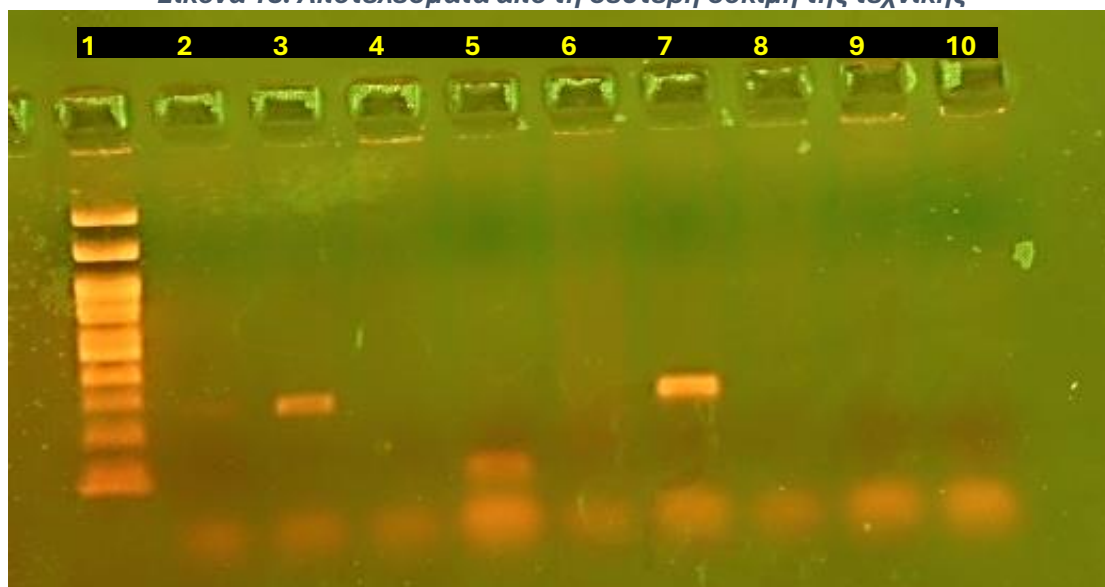
Τα αποτελέσματα της 1<sup>ης</sup> δοκιμής της τεχνικής για την ταυτοποίηση των στρεπτόκοκκων (Πίνακας 12), έδωσε το επιθυμητό αποτέλεσμα προϊόντος 198 bp, ωστόσο το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης, έδειξε πως εκτός από τον θετικό μάρτυρα (διαδρομή 1) και 3 δείγματα (διαδρομές 10, 12, 13), αρκετά από τα προϊόντα της PCR παρουσίαζαν αναστολή (διαδρομές 2 έως 9 και 11 και 14) (Εικόνα 17).

*Εικόνα 17: Αποτελέσματα πρώτης δοκιμής της τεχνικής.*



Όπως αναφέρθηκε στη μεθοδολογία, το αποτέλεσμα της 1<sup>ης</sup> δοκιμής δεν ήταν το επιθυμητό, οπότε εφαρμόστηκαν τροποποιήσεις τόσο στις συνθήκες της PCR, όσο και στις συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων (Πίνακας 13). Συγκεκριμένα, μειώνοντας τη συγκέντρωση της DNA πολυμεράσης στο PCR mix, ελαχιστοποιήθηκαν τα μη-ειδικά προϊόντα (διαδρομή 5). Η εικόνα των αποτελεσμάτων παρουσίασε βελτίωση συγκριτικά με την 1<sup>η</sup> δοκιμή, ωστόσο δεν ήταν ακόμη το επιθυμητό αποτέλεσμα (Εικόνα 18).

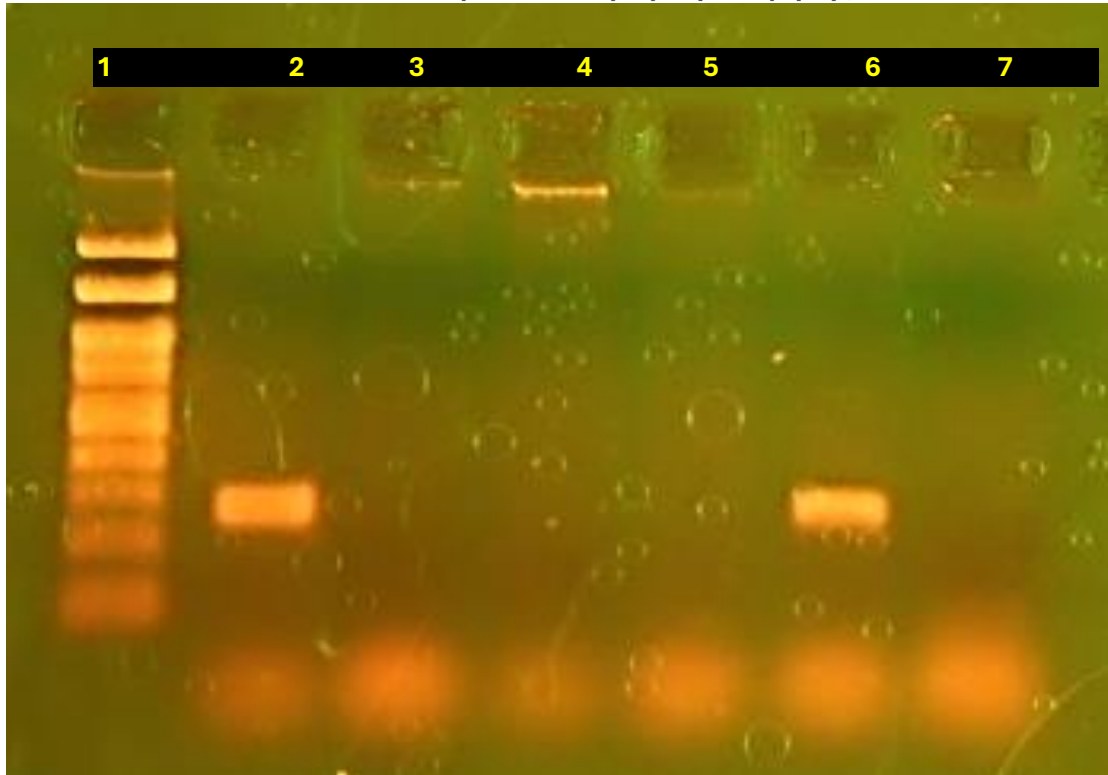
**Εικόνα 18: Αποτελέσματα από τη δεύτερη δοκιμή της τεχνικής**



Για τη βελτιστοποίηση συγκριτικά με την πρώτη δοκιμή, δοκιμάστηκαν επιπλέον τροποποιήσεις των συνθηκών του πρωτοκόλλου, Συγκεκριμένα, διατηρώντας σταθερές τις συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων, τροποποιήθηκαν μόνο οι συνθήκες της αντίδρασης (Πίνακας 14). Ειδικότερα, όπως αναφέρθηκε και στη μεθοδολογία, αυξήθηκε η θερμοκρασία (από 95°C στους 96°C) του σταδίου της αποδιάταξης και του σταδίου της επιμήκυνσης (από τους 40°C στους 55°C).

Τα αποτελέσματα από την τρίτη δοκιμή, έδειξαν αρκετά βελτιωμένη την εικόνα των προϊόντων της PCR, ωστόσο κατά την ανάγνωση των προϊόντων στη γέλη αгарόζης, οι παραπάνω συνθήκες δεν ήταν ευνοϊκές για όλα τα κλινικά δείγματα (διαδρομές 3, 4, 5) (Εικόνα 19).

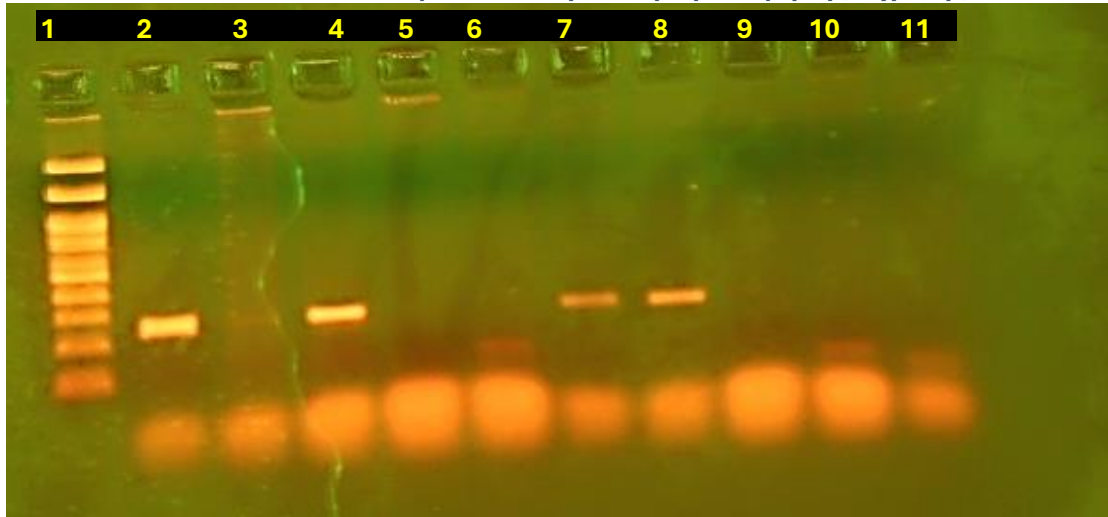
**Εικόνα 19: Αποτελέσματα από την τρίτη δοκιμή της PCR.**



Στα περισσότερα κλινικά δείγματα παρατηρήθηκε αναστολή, παρόλα αυτά, παρατηρήθηκε ενίσχυση των προϊόντων αλλά και του θετικού μάρτυρα. (διαδρομές 2 και 6).

Συνεπώς, προκειμένου να βελτιωθεί το αποτέλεσμα των κλινικών δειγμάτων και για την αποφυγή αναστολών, πραγματοποιήθηκε αύξηση της θερμοκρασίας στο στάδιο της αποδιάταξης (από τους 96°C στους 98°C). Αυτό το οποίο παρατηρήθηκε με την εφαρμογή της 4<sup>ης</sup> δοκιμής (Πίνακας 15), ήταν πως η τροποποίηση επηρέασε θετικά το αποτέλεσμα της PCR, δίνοντας καλύτερο τελικό αποτέλεσμα για τα περισσότερα κλινικά δείγματα (Εικόνα 20).

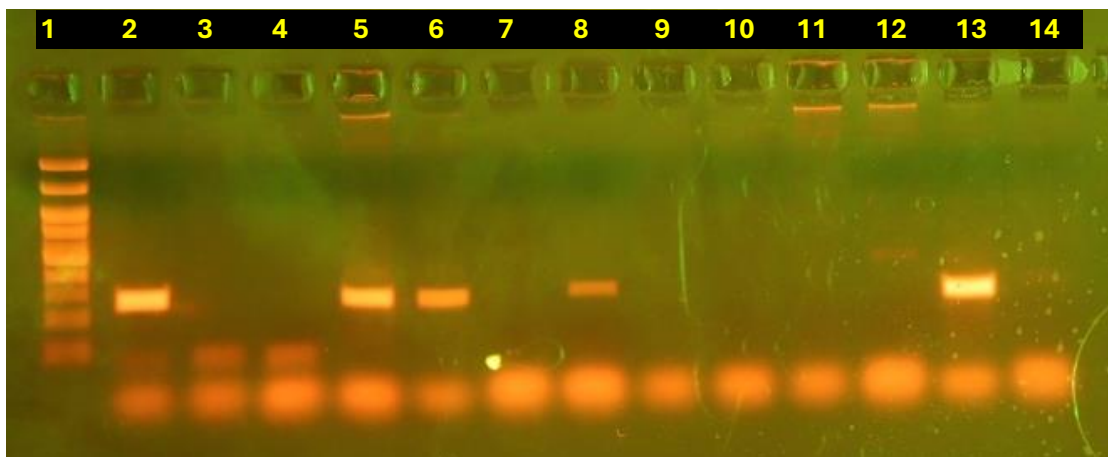
**Εικόνα 20: Αποτελέσματα από την τέταρτη δοκιμή της τεχνικής**



Για την βελτιστοποίηση της τεχνικής, πραγματοποιήθηκε μια περαιτέρω δοκιμή (Πίνακας 16) η οποία περιλάμβανε μια περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας στο στάδιο της αποδιάταξης από τους 95°C στους 98°C καθώς επίσης και της θερμοκρασίας επιμήκυνσης από τους 55°C στους 65°C.

Με την τροποποίηση αυτή, παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση της εικόνας των προϊόντων της PCR, παρόλα αυτά, εξακολούθησε η παρουσία μη ειδικών προϊόντων (διαδρομές 3 και 4) (Εικόνα 21).

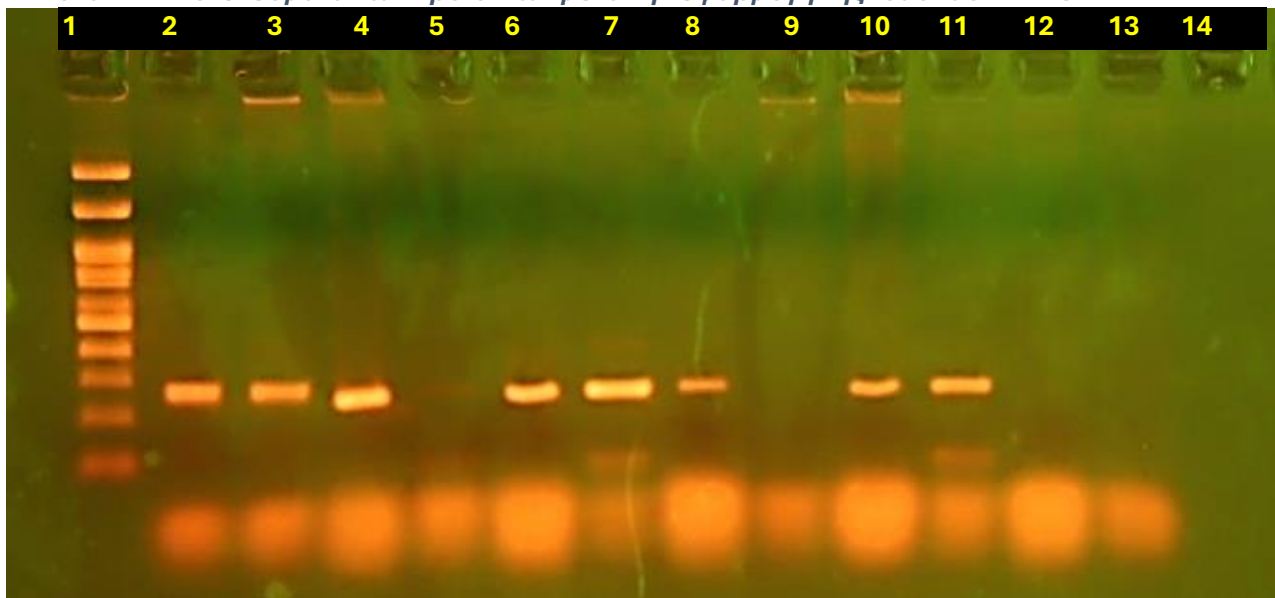
**Εικόνα 21: Αποτελέσματα πέμπτης δοκιμής**



Το επόμενο βήμα ήταν η τεχνική της touchdown- PCR (Πίνακας 17). Με την εν λόγω εφαρμογή, τα αποτελέσματα των προϊόντων της PCR αξιολογήθηκαν ως ικανοποιητικά, καθώς δεν παρατηρήθηκε αναστολή σε κανένα κλινικό δείγμα. Επιπλέον, λόγω της δοκιμασίας του υβριδισμού σε διαφορετικές συνθήκες, τα μη ειδικά προϊόντα μειώθηκαν σε αρκετά υψηλό επίπεδο σε όλα τα δείγματα (Εικόνα

22). Συγκεκριμένα, οι υψηλές θερμοκρασίες στα αρχικά στάδια του υβριδισμού βοήθησαν στην αποφυγή της «μη- ειδικής» προσκόλλησης των εκκινητικών μορίων, ενώ η μείωση της θερμοκρασίας στα επόμενα στάδια ενίσχυσε τον πολλαπλασιασμό του DNA στόχου.

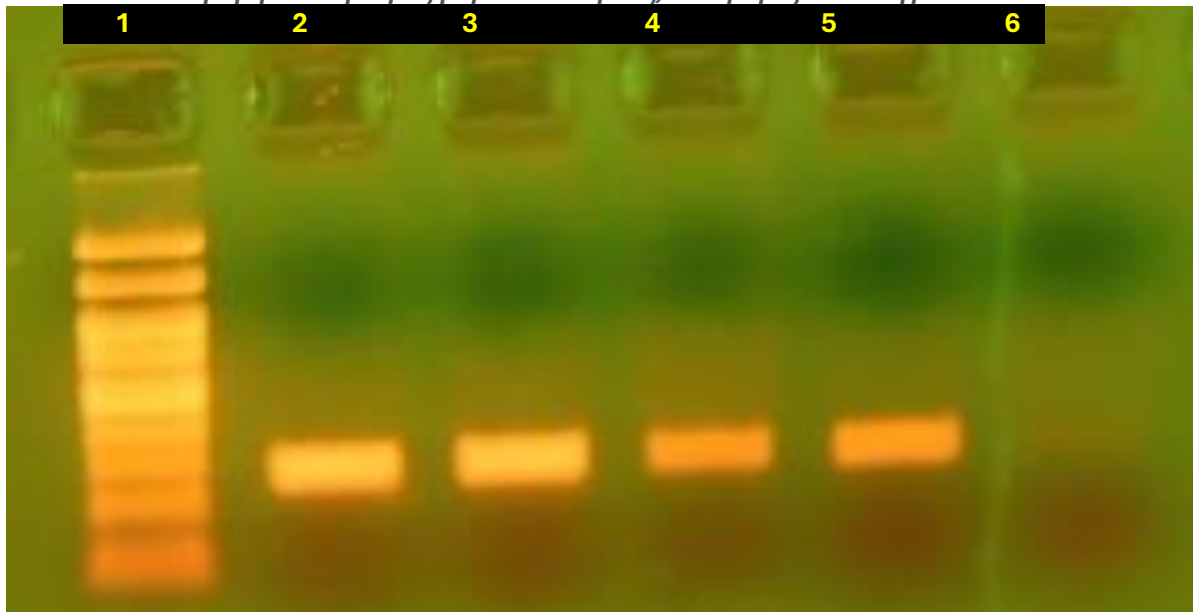
**Εικόνα 22: Αποτελέσματα των προϊόντων μετά την εφαρμογή της touchdown- PCR.**



Αφού αξιολογήθηκαν οι συνθήκες της touchdown- PCR ως κατάλληλες για την ταυτοποίηση των στρεπτόκοκκων απευθείας σε κλινικά δείγματα, ακολούθησε ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR όπως αναφέρεται στην ενότητα 7.3 (*Πρωτόκολλο καθαρισμού δειγμάτων για αλληλούχιση*).

Μετά τον καθαρισμό των δειγμάτων και την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% των καθαρισμένων δειγμάτων, ακολούθησε οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων σε τράπεζα ακτινοβολίας. Στην **Εικόνα 23** απεικονίζεται το αποτέλεσμα της διαδικασίας του καθαρισμού.

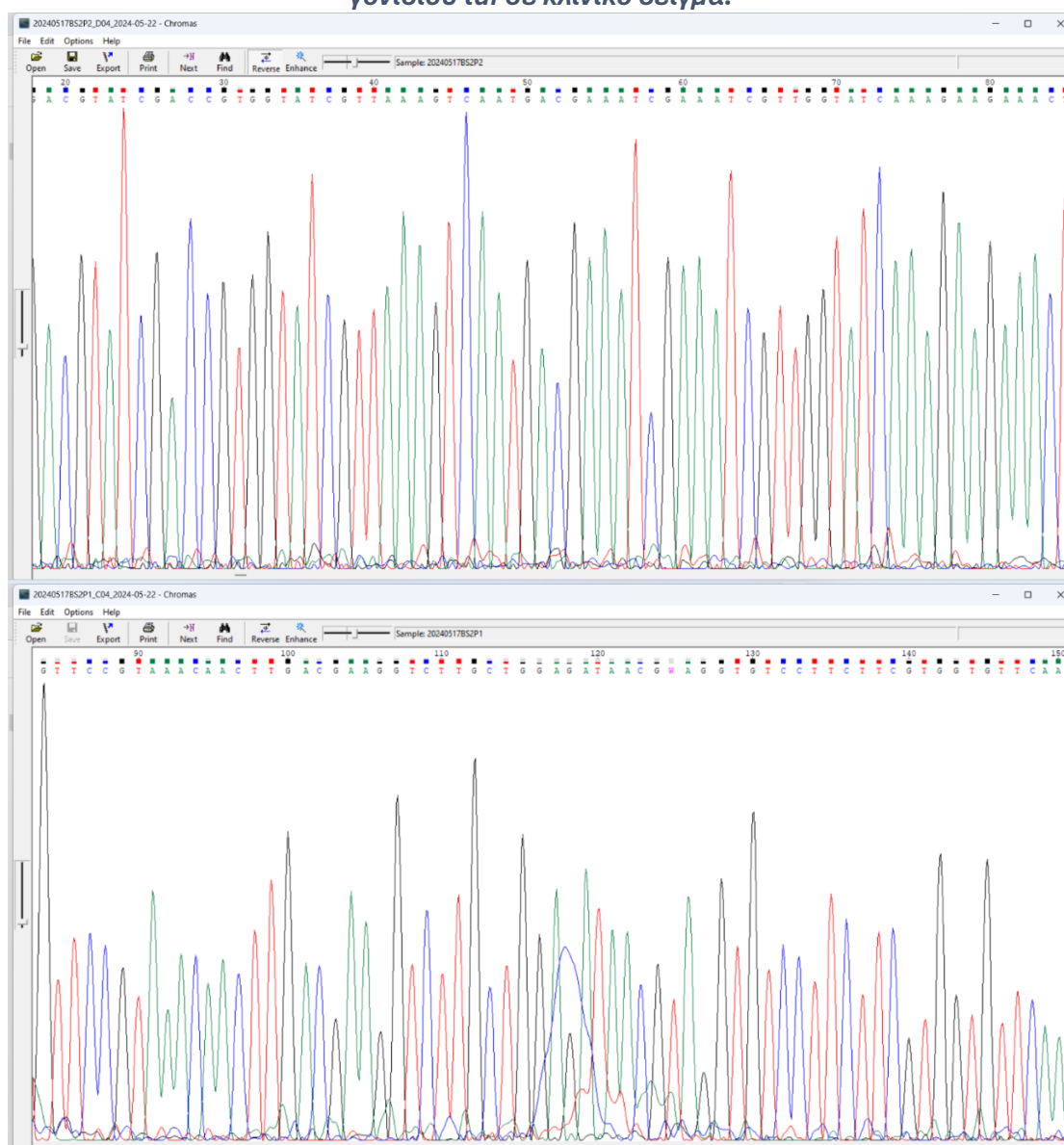
**Εικόνα 23:** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης δειγμάτων PCR, μετά από καθαρισμό.  
Διαδρομή 1: Μάρτυρας μοριακού βάρους, διαδρομές 2-5: δείγματα



## 8.2. Αποτελέσματα εφαρμογής της τεχνικής απευθείας σε κλινικά δείγματα ασθενών με μηνιγγίτιδα/ σηψαιμία

Με τη χρήση των ειδικών εκκινητικών μορίων, δημιουργήθηκαν αντίγραφα (PCR amplicons) μήκους 198bp όπου και εστάλησαν προς αλληλούχιση. Μετά την αλληλούχιση των δυο κλώνων, προέκυψε τελικό ενδιάμεσο προϊόν μεγέθους 153bp, όπου και έγινε περαιτέρω επεξεργασία των χρωματογραφημάτων. Σε κάθε δείγμα, πραγματοποιήθηκαν 2 αντιδράσεις αλληλούχισης, μία ανά κλώνο. Η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων περιλάμβανε τη σύνθεση της μιας ενιαίας αλληλουχίας του γονιδίου *tuf* από τις επιμέρους 2 αλυσίδες (Εικόνα 24).

**Εικόνα 24: Αποτέλεσμα αλληλούχισης (χρωματογράφημα) των 2 κλώνων του γονιδίου *tuf* σε κλινικό δείγμα.**







Εικόνα 26: Αποτελέσματα αναζήτησης της νεοσυντιθέμενης αλληλουχίας με τη χρήση του εργαλείου BLAST.

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
<b>Sequences producing significant alignments</b>								
Download		Select columns	Show	100				
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a> <a href="#">Distance tree of results</a> <a href="#">MSA Viewer</a>								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptococcus mitis strain S022-V3-A4 chromosome, complete genome</a>	<a href="#">Streptococcus mitis</a>	364	364	99%	4e-96	100.00%	2086958	<a href="#">CP047883.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptococcus sp. 116-D4 DNA, complete genome</a>	<a href="#">Streptococcus sp. 1...</a>	364	364	99%	4e-96	100.00%	1943757	<a href="#">AP021887.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptococcus pseudopneumoniae strain p25 translation elongation factor Tu (tuf) gene, partial cds</a>	<a href="#">Streptococcus pseu...</a>	364	364	99%	4e-96	100.00%	770	<a href="#">MK322637.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptococcus mitis strain PL429 translation elongation factor Tu (tuf) gene, partial cds</a>	<a href="#">Streptococcus mitis</a>	364	364	99%	4e-96	100.00%	770	<a href="#">MK322627.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptococcus mitis strain SK637 chromosome, complete genome</a>	<a href="#">Streptococcus mitis</a>	364	364	99%	4e-96	100.00%	1942107	<a href="#">CP028415.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptococcus pneumoniae strain 2245STDY5699475 genome assembly, chromosome: 1</a>	<a href="#">Streptococcus pneu...</a>	364	364	99%	4e-96	100.00%	2107778	<a href="#">LR536831.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptococcus pneumoniae strain 4041STDY6836166 genome assembly, chromosome: 1</a>	<a href="#">Streptococcus pneu...</a>	364	364	99%	4e-96	100.00%	2200529	<a href="#">LS483451.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptococcus sp. SP4011 DNA, complete genome</a>	<a href="#">Streptococcus sp. S...</a>	364	364	99%	4e-96	100.00%	2327012	<a href="#">AP026968.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptococcus mitis strain KCOM 1350 (= ChDC B183), complete genome</a>	<a href="#">Streptococcus mitis</a>	364	364	99%	4e-96	100.00%	1906344	<a href="#">CP012646.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptococcus pseudopneumoniae strain p41 elongation factor Tu (tuf) gene, partial cds</a>	<a href="#">Streptococcus pseu...</a>	364	364	99%	4e-96	100.00%	770	<a href="#">MT560864.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptococcus mitis strain PL431 elongation factor Tu (tuf) gene, partial cds</a>	<a href="#">Streptococcus mitis</a>	364	364	99%	4e-96	100.00%	770	<a href="#">MT560859.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptococcus mitis Nm-65 DNA, complete genome</a>	<a href="#">Streptococcus mitis</a>	364	364	99%	4e-96	100.00%	2085837	<a href="#">AP023349.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptococcus mitis strain Sv_15-43_III elongation factor Tu (tuf) gene, partial cds</a>	<a href="#">Streptococcus mitis</a>	364	364	99%	4e-96	100.00%	426	<a href="#">JN049076.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptococcus mitis strain Sv_28-1 elongation factor Tu (tuf) gene, partial cds</a>	<a href="#">Streptococcus mitis</a>	364	364	99%	4e-96	100.00%	426	<a href="#">JN049109.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptococcus mitis strain Sv_21-19_III-IV elongation factor Tu (tuf) gene, partial cds</a>	<a href="#">Streptococcus mitis</a>	364	364	99%	4e-96	100.00%	426	<a href="#">JN049087.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptococcus mitis strain Sv_15-46_III A elongation factor Tu (tuf) gene, partial cds</a>	<a href="#">Streptococcus mitis</a>	364	364	99%	4e-96	100.00%	426	<a href="#">JN049078.1</a>

26A

Download GenBank Graphics Next Previous Descriptions

**Streptococcus pseudopneumoniae strain p25 translation elongation factor Tu (tuf) gene, partial cds**

Sequence ID: [MK322637.1](#) Length: 770 Number of Matches: 1

Range 1: 299 to 495 GenBank Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
364 bits(197)	4e-96	197/197(100%)	0/197(0%)	Plus/Plus
Query 1	GTACAGTTGCTTCAGGACGTATCGACCGTGGTATCGTTAAAGTCAACGACGAAATCGAAA	60		
Sbjct 299	GTACAGTTGCTTCAGGACGTATCGACCGTGGTATCGTTAAAGTCAACGACGAAATCGAAA	358		
Query 61	TCGTTGGTATCAAAGAAGAACTCAAAAAGCAGTTGTTACTGGTGTGAAATGTTCCGTA	120		
Sbjct 359	TCGTTGGTATCAAAGAAGAACTCAAAAAGCAGTTGTTACTGGTGTGAAATGTTCCGTA	418		
Query 121	AACAAC TTGACGAAGGCTT GCCGGAGATAACGTAGGTGTCCTTCTTCGTGGTGTCAAC	180		
Sbjct 419	AACAAC TTGACGAAGGCTT GCCGGAGATAACGTAGGTGTCCTTCTTCGTGGTGTCAAC	478		
Query 181	GTGATGAAATCGAACGT	197		
Sbjct 479	GTGATGAAATCGAACGT	495		

Download GenBank Graphics Next Previous Descriptions

**Streptococcus mitis strain PL429 translation elongation factor Tu (tuf) gene, partial cds**

Sequence ID: [MK322627.1](#) Length: 770 Number of Matches: 1

Range 1: 299 to 495 GenBank Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
364 bits(197)	4e-96	197/197(100%)	0/197(0%)	Plus/Plus
Query 1	GTACAGTTGCTTCAGGACGTATCGACCGTGGTATCGTTAAAGTCAACGACGAAATCGAAA	60		
Sbjct 299	GTACAGTTGCTTCAGGACGTATCGACCGTGGTATCGTTAAAGTCAACGACGAAATCGAAA	358		
Query 61	TCGTTGGTATCAAAGAAGAACTCAAAAAGCAGTTGTTACTGGTGTGAAATGTTCCGTA	120		
Sbjct 359	TCGTTGGTATCAAAGAAGAACTCAAAAAGCAGTTGTTACTGGTGTGAAATGTTCCGTA	418		
Query 121	AACAAC TTGACGAAGGCTT GCCGGAGATAACGTAGGTGTCCTTCTTCGTGGTGTCAAC	180		
Sbjct 419	AACAAC TTGACGAAGGCTT GCCGGAGATAACGTAGGTGTCCTTCTTCGTGGTGTCAAC	478		
Query 181	GTGATGAAATCGAACGT	197		
Sbjct 479	GTGATGAAATCGAACGT	495		

26B

Στην παραπάνω εικόνα (Εικόνα 26), παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την εισαγωγή της «άγνωστης» αλληλουχίας του βακτηριακού γονιδίου στο εργαλείο BLAST. Ειδικότερα, με την εισαγωγή της αλληλουχίας στη βάση BLAST, τα αποτελέσματα τα οποία προκύπτουν, είναι εκείνα με το μεγαλύτερο ποσοστό ομοιότητας της μη- ταυτοποιημένης αλληλουχίας με ήδη καταχωρημένες αλληλουχίες στη βάση (Εικόνα 26 A),

Στη συνέχεια, επιλέγοντας το αποτέλεσμα με τη μεγαλύτερη ομοιότητα, παρουσιάζονται περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με την αναζήτηση που πραγματοποιήθηκε στη βάση. Συγκεκριμένα, στην Εικόνα 26 B παρουσιάζεται η ακριβής σύγκριση της μη- ταυτοποιημένης αλληλουχίας (Query) με μια ήδη ταυτοποιημένη αλληλουχία στη βάση (Sbjct). Η ομοιότητα των νουκλεοτιδίων μεταξύ των 2 αλληλουχιών συμβολίζεται με μια γραμμή ανάμεσα τους (|), ενώ η απουσία γραμμής συμβολίζει τη διαφορά μεταξύ των 2 αλυσίδων.

### **8.3. Αποτελέσματα της τεχνικής στην ταυτοποίηση των δειγμάτων**

#### **1) Ανάλυση ως προς την κλινική εικόνα των ασθενών**

Από το υποσύνολο των ασθενών με μηνιγγίτιδα, οι στρεπτόκοκκοι οι οποίοι ταυτοποιήθηκαν ανήκουν στις ομάδες των *S. mitis* = 27, *S. salivarius* = 18, *S. pyogenes* = 9, *S. anginosus* = 7, *S. bovis* = 1, και άλλες στρεπτοκοκκικές ομάδες μεταξύ των οποίων και ο *S. suis* = 1, καθώς επίσης και βακτήρια του είδους *Lactococcus* spp. = 1. Αντίστοιχα, στους ασθενείς με σηψαιμία ταυτοποιήθηκαν στρεπτόκοκκοι των ομάδων *S. mitis* = 8, *S. salivarius* = 2, *S. pyogenes* = 9, *S. Anginosus*, και βακτήρια του είδους *Lactococcus* spp. = 3. Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 18 και Πίνακας 19) συνοψίζονται τα αποτελέσματα από την εφαρμογή της συγκεκριμένης τεχνικής, με το σύνολο των NT- *Streptococcus* spp. καθώς και των *Lactococcus* spp. που προκάλεσαν μηνιγγίτιδα και σηψαιμία αντίστοιχα ανά έτος.

**Πίνακας 18: Σύνολο NT- *Streptococcus spp.* και *Lactococcus spp.* που προκάλεσαν μηνιγγίτιδα (2015-2023)**

Είδη στρεπτόκοκκων και άλλων βακτηρίων	Έτη									ΣΥΝΟΛΟ (%)	
	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023		
<i>S. mitis/pseudopneumoniae</i>				5	3	1	1			1	11 (17%)
<i>S. oralis</i>	1	2	4	2		1	1			1	12 (18%)
<i>S. anginosus</i>	1		1								2 (3%)
<i>S. constellatus</i>		1									1 (1%)
<i>S. dysgalactiae</i>	1	1	2	1		1	1			2	9 (14%)
<i>S. gallolyticus subsp. pasterianus</i>			1								1 (1%)
<i>S. intermedius</i>			1				1			2	4 (6%)
<i>S. parasanguinis</i>	2			1							3 (5%)
<i>S. salivarius</i>	2		8	2	5					1	18 (28%)
<i>S. sanguinis</i>				1							1 (1%)
<i>S. suis</i>					1						1 (1%)
<i>L. lactis</i>										1	1 (1%)
										<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>64</b>

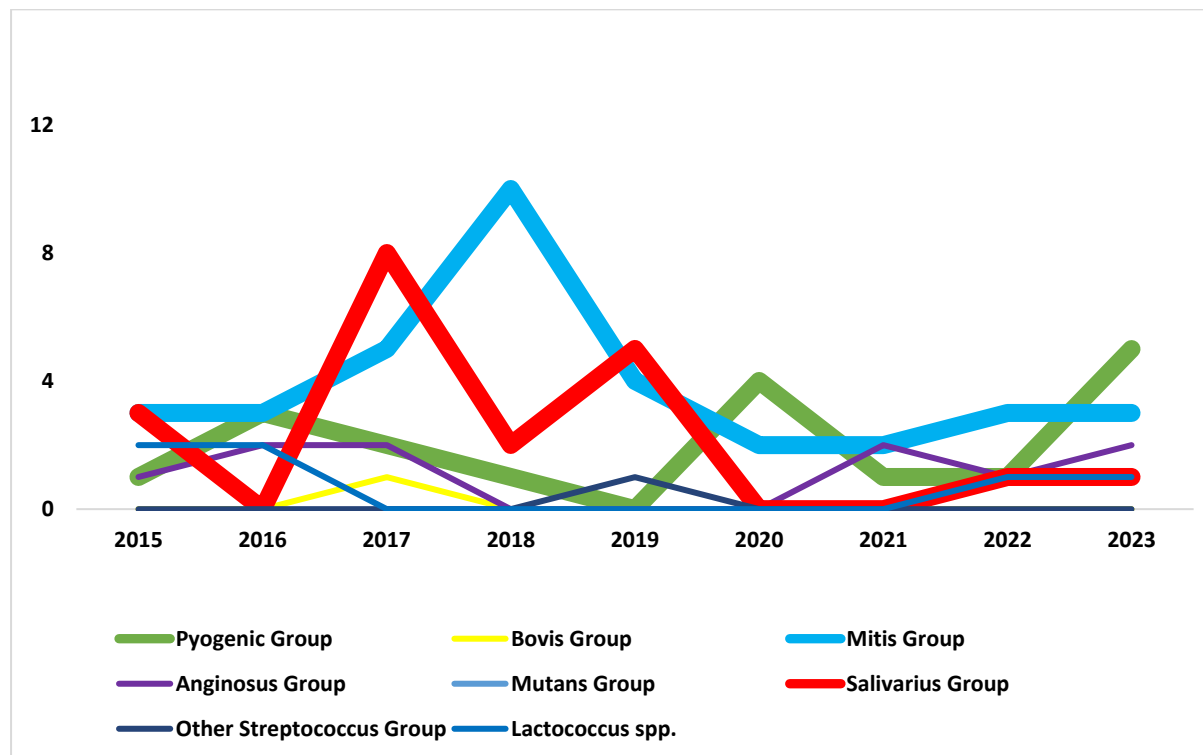
**Πίνακας 19: Σύνολο NT- *Streptococcus spp.* και *Lactococcus spp.* που προκάλεσαν σηψαιμία (2015-2023).**

Είδη στρεπτόκοκκων και άλλων βακτηρίων	Έτη									ΣΥΝΟΛΟ (%)	
	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023		
<i>S. anginosus</i>		2					1	1			4 (15%)
<i>S. dysgalactiae</i>		2				3		1	3		9 (34%)
<i>S. mitis/pseudopneumoniae</i>								1	1		2 (7%)
<i>S. oralis</i>			1	1				2			4 (15%)
<i>S. parasanguinis</i>		1			1						2 (7%)
<i>S. salivarius</i>	1							1			2 (7%)
<i>L. cremoris</i>	1	1									2 (7%)
<i>L. garvieae</i>								1			1 (1%)
										<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>26</b>

Συνεπώς, επί του συνόλου ταυτοποιήθηκαν στρεπτόκοκκοι της ομάδας *S. mitis* σε ποσοστό 30% (27/90) και στρεπτόκοκκοι της ομάδας *S. salivarius* σε ποσοστό 20% (18/90)

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι τα κρούσματα άλλων στρεπτόκοκκων (NT-*Streptococcus* spp.), όπως είναι οι στρεπτόκοκκοι των ομάδων Salivarius, Mitis, Pyogenic επικρατούν έναντι των υπόλοιπων στρεπτόκοκκων. Επιπλέον, παρατηρείται ότι οι στρεπτόκοκκοι της ομάδας Mitis παρουσίασαν μια σημαντική αύξηση κατά το χρονικό διάστημα 2017- 2019 ενώ κατά τη διάρκεια της πανδημίας (2020- 2021) σημειώθηκε μείωση. Ωστόσο, από το 2022 και μετά, παρατηρήθηκε αύξηση της πορείας των κρουσμάτων σε επίπεδα προ- COVID- 19 πανδημίας επίπεδα. Παρόμοια αύξηση των κρουσμάτων, παρατηρήθηκε και στους στρεπτόκοκκους της ομάδας Pyogenic. Συγκεκριμένα, ενώ ήταν σε χαμηλά επίπεδα προ- πανδημίας καθώς και κατά τη διάρκεια της COVID- 19 πανδημίας, από το 2022 και μετά παρουσιάζουν μια σημαντική αύξηση. Αντίθετα, οι στρεπτόκοκκοι της ομάδας Salivarius ενώ ταυτοποιήθηκαν στα 27 από τα 90 δείγματα (20%) κατά την προ- πανδημίας περίοδο προ- πανδημίας, από το 2020 έως και το 2023 παρατηρείται σημαντική μείωση (Γράφημα 4).

**Γράφημα 4: Κρούσματα μηνιγγίτιδας/ σηψαιμίας από NT- *Streptococcus* spp. κατά το χρονικό διάστημα 2015- 2023**



Τέλος, έγινε η κατάταξη των στρεπτόκοκκων σε ομάδες κατά αντιγόνο *Lancefield*, όπως παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 20 και Πίνακας 21).

**Πίνακας 20: Ομαδοποίηση στρεπτόκοκκων και λακτόκοκκων που προκάλεσαν μηνιγγίτιδα κατά *Lancefield***

<b><i>Streptococcus spp.</i></b>	<b><i>Lancefield Group</i></b>	<b>N</b>
<i>S. mitis/pseudopneumoniae</i>	NG, O, K	11 (17%)
<i>S. oralis</i>	NG	12 (18%)
<i>S. parasanguinis</i>	B, C, F, G	2 (3%)
<i>S. salivarius</i>	K	1 (1%)
<i>S. dysgalactiae</i>	C, G	9 (14%)
<i>S. constellatus</i>	F, C, G, A	1 (1%)
<i>S. sanguinis</i>		4 (6%)
<i>S. gallolyticus subsp. pasterianus</i>	D	3 (5%)
<i>S. suis</i>	R, S, T	18 (28%)
<i>S. intermedius</i>	F, C	1 (1%)
<i>L. lactis</i>	-	1 (1%)
<i>S. anginosus</i>	F, C, G, A	1 (1%)
	<b>ΣΥΝΟΛΟ:</b>	<b>64</b>

**Πίνακας 21: Ομαδοποίηση στρεπτόκοκκων και λακτόκοκκων που προκάλεσαν σηψαιμία κατά *Lancefield***

<b><i>Streptococcus spp.</i></b>	<b><i>Lancefield Group</i></b>	<b>N</b>
<i>S. salivarius</i>	K	4 (15%)
<i>L. cremoris</i>	-	9 (34%)
<i>S. dysgalactiae</i>	C, G	2 (7%)
<i>S. anginosus</i>	F, C, G, A	4 (15%)
<i>S. parasanguinis</i>	B, C, F, G	2 (7%)
<i>S. mitis/pseudopneumoniae</i>	NG, O, K	2 (7%)
<i>L. garvieae</i>	-	2 (7%)
<i>S. oralis</i>	NG	1 (1%)
	<b>ΣΥΝΟΛΟ:</b>	<b>26</b>

## II) Ανάλυση αποτελεσμάτων ως προς την ηλικία των ασθενών

Επί του συνόλου των δειγμάτων (N = 90), τα 64 δείγματα προέρχονταν από ασθενείς με μηνιγγίτιδα και τα 26 από ασθενείς με σηψαιμία. Οι ηλικίες των ασθενών παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 22).

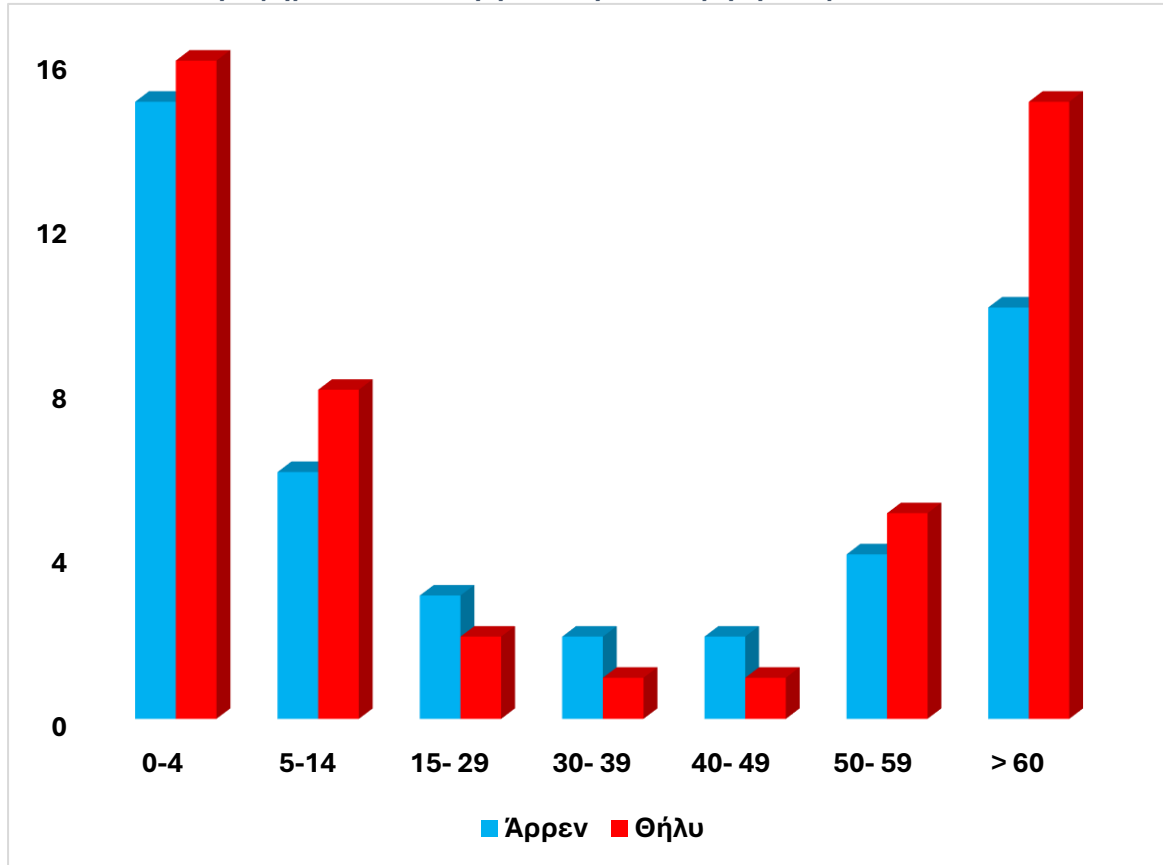
**Πίνακας 22: Δημογραφικά δεδομένα ασθενών με μηνιγγίτιδα και σηψαιμία.**

Φύλο	Ηλικιακές ομάδες							ΣΥΝΟΛΟ
	0-4 ετών	5-14 ετών	15- 29 ετών	30- 39 ετών	40- 49 ετών	50- 59 ετών	> 60 ετών	
<b>Άρρεν</b>	15	6	3	2	2	4	10	<b>42</b>
<b>Θήλυ</b>	16	8	2	1	1	5	15	<b>48</b>
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>31</b>	<b>14</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>9</b>	<b>25</b>	<b>90</b>

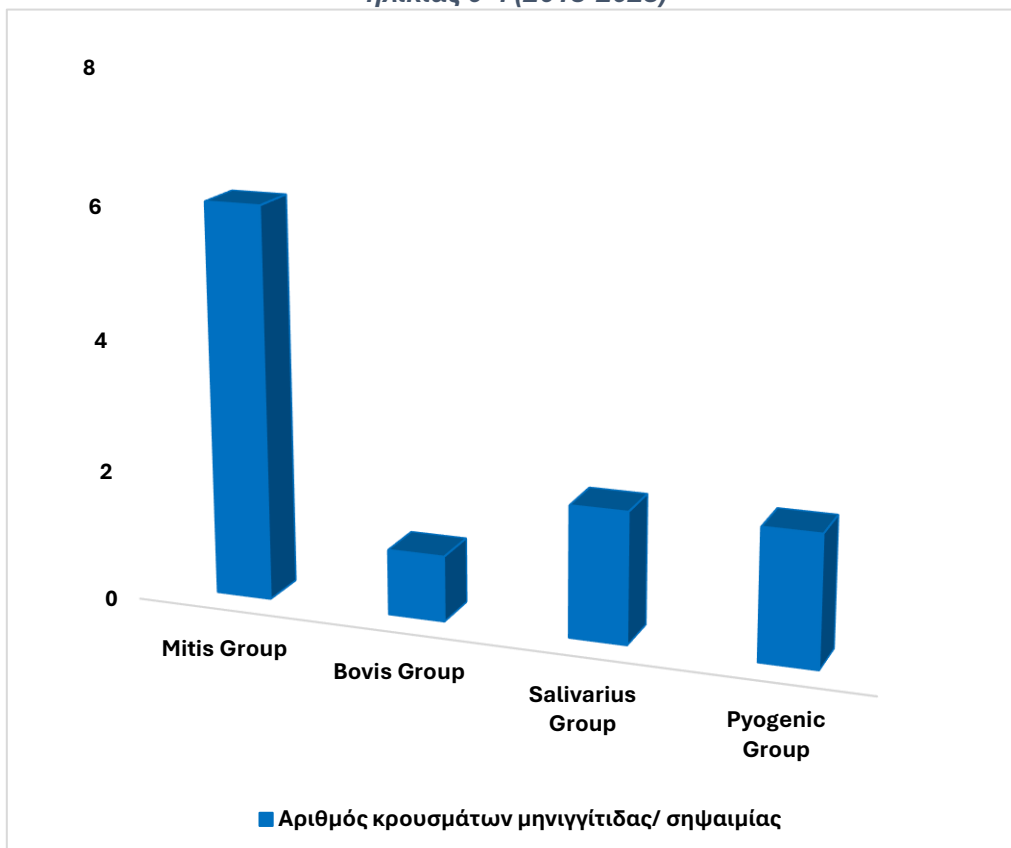
Οι ηλικίες στις οποίες παρατηρούνται τα περισσότερα κρούσματα μηνιγγίτιδας και σηψαιμίας είναι κυρίως σε μικρά παιδιά που ανήκουν στην ηλικιακή ομάδα 0-4 έτη και λιγότερο στην ηλικιακή ομάδα 5- 14 ετών. Αντίστοιχα, ένας υψηλός αριθμός ασθενών άνηκε στην ηλικιακή ομάδα των > 60 ετών. Ενώ σχετικά με την κατανομή ως προς το φύλο, δεν παρουσιάζεται κάποια διαφορά. Τα παραπάνω δεδομένα παρουσιάζονται στο [Γράφημα 5](#).

Τα περισσότερα κρούσματα μηνιγγίτιδας και σηψαιμίας, παρατηρούνται στις ηλικιακές ομάδες 0- 4 ετών και > 60 ετών ([Γράφημα 5](#)). Από την επεξεργασία των δεδομένων της αλληλούχισης προέκυψε ότι, για τα παιδιά της ηλικιακής ομάδας 0- 4 ετών, ταυτοποιήθηκαν στρεπτόκοκκοι των ομάδων Mitis (7), Bovis (1), Salivarius (2) και Pyogenic (2) ([Γράφημα 6](#)). Αντίστοιχα, για τα άτομα της ηλικιακής ομάδας > 60, ταυτοποιήθηκαν είδη στρεπτόκοκκων Mitis (8), Anginosus (2), Salivarius (11) και Pyogenic (2) ([Γράφημα 7](#)).

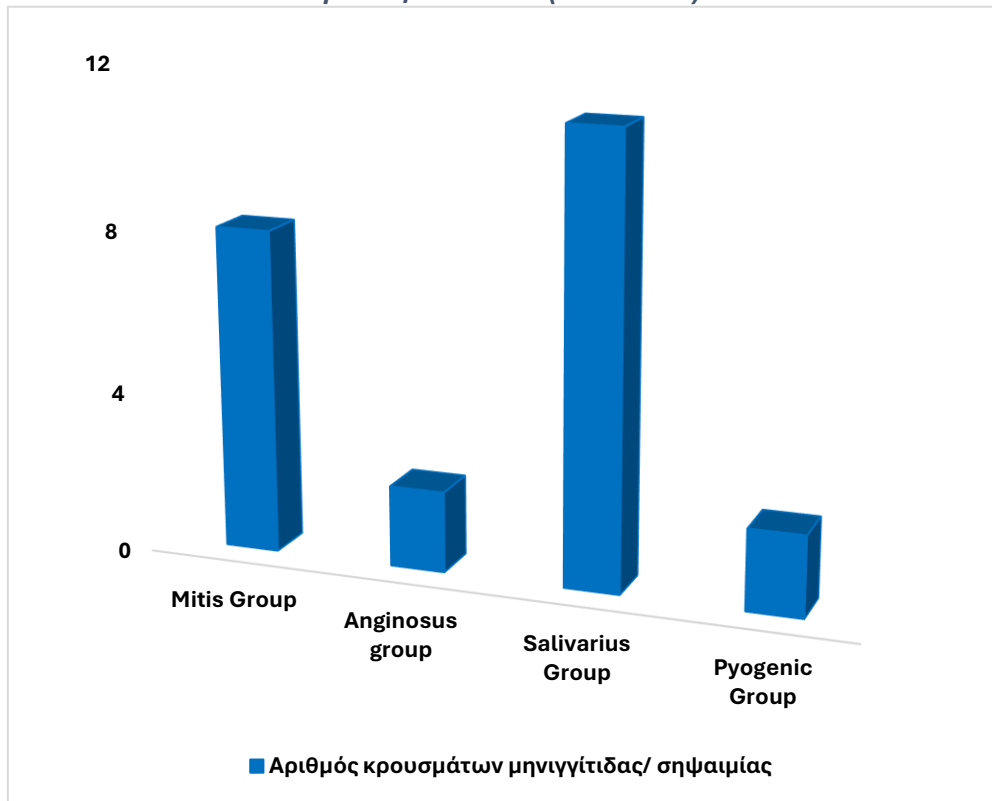
Γράφημα 5: Συνολική ηλικιακή κατανομή κρουσμάτων



Γράφημα 6: Streptococcus spp. που προκάλεσαν μηνιγγίτιδα/ σηψαιμία, σε παιδιά ηλικίας 0-4 (2015-2023)



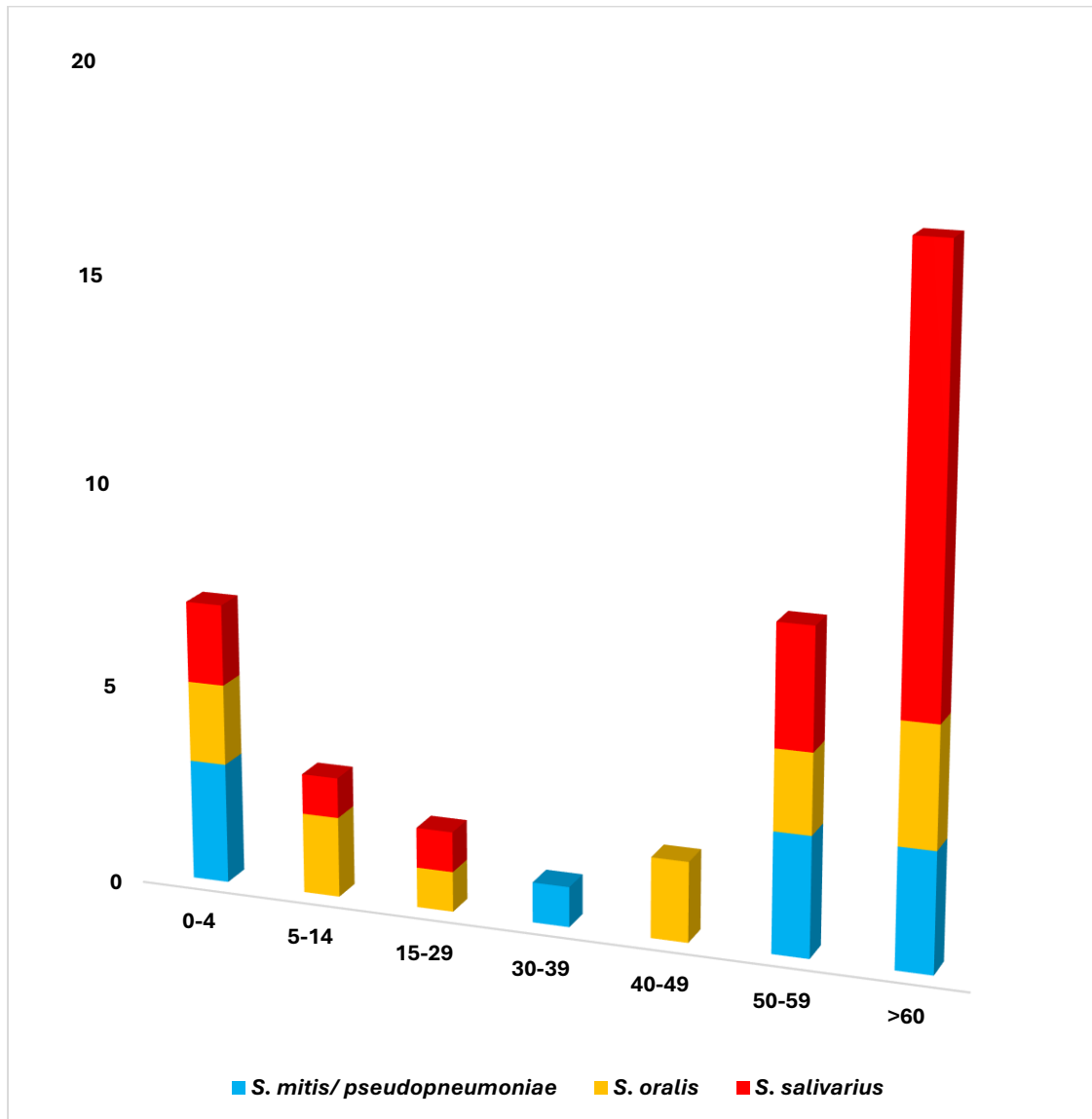
**Γράφημα 7: Streptococcus spp. που προκάλεσαν μηνιγγίτιδα/ σηψαιμία, σε άτομα ηλικίας > 60 ετών (2015-2023)**



Περαιτέρω , αναλύοντας τα δεδομένα σχετικά με τους *Streptococcus* spp. με τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης σε κλινικά δείγματα ασθενών με μηνιγγίτιδα, προέκυψε ότι οι *S. mitis/ pseudopneumoniae*, *S. oralis* και *S. salivarius*, ταυτοποιήθηκαν στο μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων. Επιπλέον, παρατηρείται ότι ως προς την κατανομή τους ανά ηλικία, ο *Streptococcus salivarius* κυριαρχεί στα δείγματα των ασθενών > 60 ετών με επόμενη ηλικιακή ομάδα των > 50 ετών. Στο παρακάτω γράφημα (Γράφημα 8) παρουσιάζονται τα παραπάνω είδη στρεπτόκοκκων συγκριτικά με τις ηλικίες των ασθενών.

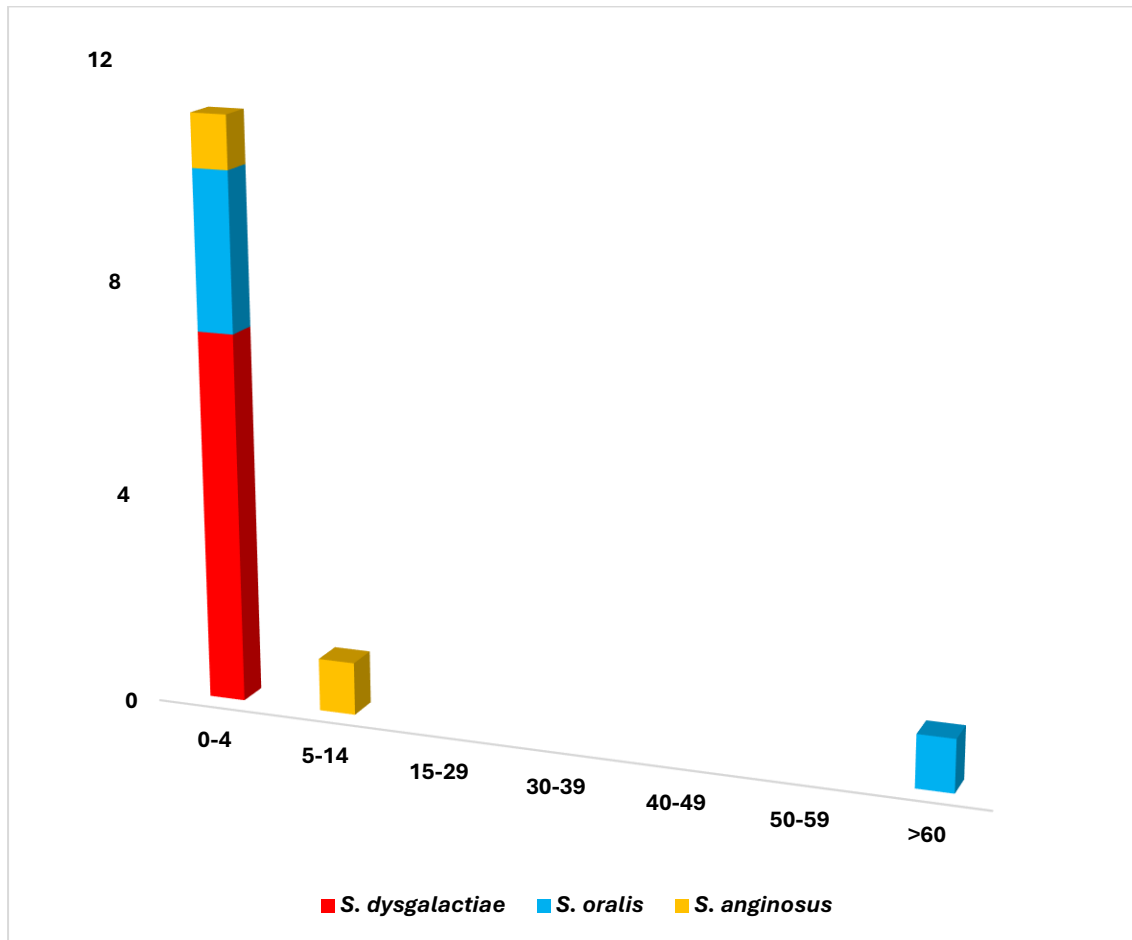


**Γράφημα 8: Σύγκριση ηλικίας και κυριότερων *Streptococcus spp.* σε ασθενείς με μηνιγγίτιδα**



Αντίθετα, στους ασθενείς με σηψαιμία η εικόνα των αποτελεσμάτων της ταυτοποίησης διαφοροποιείται, καθώς με μεγαλύτερη συχνότητα εμφανίζονται οι *S. dysgalactiae*, *S. oralis* και *S. anginosus.*, με τον *S. dysgalactiae* να επικρατεί στην ηλικιακή ομάδα των 0-4 ετών. Στο [Γράφημα 9](#) παρουσιάζονται τα παραπάνω είδη στρεπτόκοκκων αναφορικά με τις ηλικίες των ασθενών.

Γράφημα 9: Σύγκριση ηλικίας και κυριότερων *Streptococcus spp.* σε ασθενείς με σηψαιμία



Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί πως κατά την ταυτοποίηση των κλινικών δειγμάτων, τα οποία είχαν χαρακτηριστεί ως Non-Typable *Streptococcus spp.*, ταυτοποιήθηκαν και βακτήρια του γένους των *Lactococcus*. Συγκεκριμένα, βρέθηκε το είδος *Lactococcus lactis* και ειδικότερα τα υποείδη *lactis*, *cremoris* και *garviae*, σε παιδιά των ηλικιακών ομάδων 0- 4 και 5- 14 ετών.

## 9. Συζήτηση

Η ακριβής ταυτοποίηση των στρεπτόκοκκων κρίνεται σημαντική, καθώς παρέχει ένα μεγάλο αλλά και σημαντικό αριθμό πληροφοριών, σχετικά με τη βιολογία τους και την παθογονικότητά τους. Παρόλο που για την ταυτοποίηση των βακτηρίων, συνηθίζεται να χρησιμοποιούνται συμβατικές τεχνικές, όπως για παράδειγμα βακτηριακές καλλιέργειες και βιοχημικές δοκιμασίες, η ανάπτυξη και η εφαρμογή των μοριακών τεχνικών, επιλύει σημαντικά ζητήματα στην εργαστηριακή πράξη, ειδικότερα όταν πρόκειται για την επιτήρηση παθογόνων μικροοργανισμών, απαιτείται ακριβής ταυτοποίηση του μικροοργανισμού (140).

Στην περίπτωση των στρεπτόκοκκων, η ταυτοποίηση με καλλιέργεια σε συνδυασμό με τις βιοχημικές δοκιμασίες, δεν είναι πάντοτε εφικτή. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση των Mitis Group στρεπτόκοκκων (κυριότερα είδη *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*) ορισμένες από τις βασικές διακριτικές ιδιότητές τους, εμφανίζονται σε περισσότερα από ένα είδη. Για παράδειγμα ενώ οι αποικίες του *S. pneumoniae* εμφανίζουν συνήθως μια βλενώδη εμφάνιση, σε αρκετές περιπτώσεις το χαρακτηριστικό αυτό απουσιάζει. Ο έλεγχος ευαισθησίας του πνευμονιοκόκκου σε αντιβιοτικά, όπως η οπτοχίνη, αποτελεί μια συνηθισμένη δοκιμασία ταυτοποίησης, ωστόσο έχει παρατηρηθεί ευαισθησία στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό και σε είδη *Streptococcus mitis* (5). Συνεπώς, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης με συμβατικές μεθόδους, με τα αποτελέσματα από την εφαρμογή μοριακών μεθόδων, προκύπτει ότι οι μοριακές μέθοδοι υπερτερούν έναντι των συμβατικών μεθόδων σε αρκετά επίπεδα. Με την εφαρμογή της PCR σε συνδυασμό με την τεχνική της αλληλούχισης των προϊόντων, επιτυγχάνονται υψηλότερα ποσοστά ειδικότητας και ευαισθησίας κατά την ταυτοποίηση, ενώ μειώνεται σημαντικά ο χρόνος διεξαγωγής των αποτελεσμάτων (141).

Παρόλο που η ταξινόμηση κατά *Lancefield* είναι μια χρήσιμη μέθοδος για το διαχωρισμό των β- αιμολυτικών στρεπτόκοκκων, ωστόσο δεν μπορεί να εφαρμοστεί με την ίδια αποτελεσματικότητα στους α- αιμολυτικούς ή τους γ- αιμολυτικούς στρεπτόκοκκους, καθώς δε διαθέτουν όλοι οι στρεπτόκοκκοι αντιγόνο κατά *Lancefield* ή μπορεί να εμφανίζεται ποικιλομορφία στα αντιγόνα

λόγω γενετικών διαφορών μεταξύ των ίδιων ειδών στρεπτόκοκκων, όπως για παράδειγμα συμβαίνει με τον *S. anginosus* ο οποίος εμφανίζει αντιγόνα κατά *Lancefield* για τις ομάδες A, C, F και G (6). Για το λόγο αυτό, η ταξινόμησή των *Streptococcus* spp. κατά ομάδες με μοριακές τεχνικές, φαίνεται να είναι πιο αξιόπιστη και αποτελεσματική.

Η ανάπτυξη της τεχνικής απευθείας σε βιολογικά υλικά με την εφαρμογή της PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *tuf*, έδωσε τη δυνατότητα ταυτοποίησης ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων ως προς το είδος των *Streptococcus* spp.. Με τον τρόπο αυτό ανακτήθηκε σημαντική πληροφορία για είδη άλλων στρεπτόκοκκων πλην των *S. pneumoniae*, *S. agalactiae* (GBS) και *S. pyogenes* (GAS).

Αναλυτικότερα, η πλειονότητα των βακτηρίων του γένους *Streptococcus* spp. που ταυτοποιήθηκαν, ανήκουν στην κατηγορία των Viridans Streptococci (VS), ενώ παράλληλα βρέθηκαν και είδη στρεπτόκοκκων των ομάδων Bovis και Pyogenic (6). Δείγματα τα οποία είχαν χαρακτηριστεί ως NT- *Streptococcus* spp., μετά την εφαρμογή του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου ταυτοποιήθηκαν ως βακτήρια του γένους *Lactococcus* spp., καθώς σύμφωνα με τη μελέτη των Picard *et al.*, βάσει της οποίας πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία, με τη χρήση του συγκεκριμένου γονιδίου, γίνεται εφικτή η ταυτοποίηση των συγκεκριμένων βακτηρίων (8).

Από το σύνολο των VS, τα είδη των στρεπτόκοκκων που εντοπίστηκαν στα βιολογικά δείγματα των ασθενών ήταν κυρίως στρεπτόκοκκοι των ομάδων Mitis, Salivarius και Anginosus. Αρχικά, σχετικά με τους στρεπτόκοκκους του Mitis Group (*S. mitis/ pseudopneumoniae*, *S. oralis*), προέρχονταν κυρίως από ασθενείς, οι οποίοι περιλαμβάνονταν στην ηλικιακή ομάδα των 0- 4 έτη καθώς επίσης και σε ενήλικες των ηλικιακών ομάδων 50- 59 και > 60 ετών, πράγμα το οποίο συμφωνεί με μελέτες κλινικών περιπτώσεων αναφέροντας ότι, η μηνιγγίτιδα/ σηψαιμία από *Streptococcus mitis/ pseudopneumoniae* και από *Streptococcus oralis* παρατηρείται κυρίως σε παιδιά καθώς και σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας, λόγω υποκείμενων νοσημάτων και χαμηλότερου ανοσοποιητικού συστήματος (65,70,142,143).

Επιπρόσθετα, κατά την ταυτοποίηση των κλινικών δειγμάτων ασθενών με μηνιγγίτιδα, βρέθηκαν σε εξίσου σημαντικό ποσοστό στρεπτόκοκκοι του είδους *S. salivarius*. Ένα κοινό χαρακτηριστικό των ασθενών της παρούσας μελέτης, το οποίο παρατηρείται και στη βιβλιογραφία, είναι οι ηλικιακές ομάδες, 50- 59 ετών και > 60 ετών (82,84). Ένα σχετικά μικρό ποσοστό συχνότητας εμφάνισης στρεπτόκοκκου κατά την ταυτοποίηση, ήταν εκείνο του *Streptococcus anginosus*. Συγκεκριμένα, κατά την εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθοδολογίας ταυτοποιήθηκαν 4 δείγματα στρεπτόκοκκων του συγκεκριμένου είδους, χωρίς να ακολουθείται κάποιο συγκεκριμένο ηλικιακό μοτίβο, καθώς σύμφωνα με τη βιβλιογραφία μπορεί να προκληθεί από τις πολύ μικρές ηλικίες έως και τις αρκετά μεγαλύτερες (144,145).

Στα περισσότερα βιολογικά δείγματα των ασθενών με σηψαιμία, τα οποία προέρχονταν από παιδιά ηλικίας 0-15 ετών, ταυτοποιήθηκαν ως επί το πλείστον στρεπτόκοκκοι του είδους *Streptococcus dysgalactiae*. Πρόκειται για ένα είδος στρεπτόκοκκου, το οποίο σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ευθύνεται για ένα μεγάλο αριθμό περιπτώσεων βακτηριαιμίας κυρίως σε παιδιά. Στη μελέτη των Baracco *et al.*, βρέθηκε ότι οι λοιμώξεις από *S. dysgalactiae* σχετίζονται με δερματικές λοιμώξεις, οι οποίες προκαλούν υψηλά ποσοστά βακτηριαιμίας, η οποία εξελίσσεται σε μηνιγγίτιδα (146).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασαν τα αποτελέσματα της αλληλούχισης, από τα οποία προέκυψε ότι σε ένα μικρό αριθμό δειγμάτων (4%), ο παθογόνος παράγοντας δεν άνηκε στα είδη των *Streptococcus* spp., αλλά άνηκαν στο είδος *Lactococcus* spp. Στη συγκεκριμένη μελέτη, κατά την ταυτόχρονη σύγκριση της αλληλουχίας του γονιδίου *tuf* των δειγμάτων που ταυτοποιήθηκαν ως *Lactococcus* spp., με την αλληλουχία του γονιδιώματος του *Lactococcus lactis* από τη γονιδιακή τράπεζα (GenBank) αλλά και με τους εκκινητές του γονιδίου *tuf* στο ελεύθερο λογισμικό CLUSTALW, επιβεβαιώθηκε η παρατήρηση ότι στο γονιδίωμα του *Lactococcus lactis*, εμπεριέχεται το εν λόγω γονίδιο (147), το οποίο εύρημα, συμφωνεί με τη μελέτη των Picard *et al.*, κατά την οποία έγινε ταυτοποίηση στελεχών με τη χρήση του γονιδίου *tuf*, ταυτοποίησαν και βακτήρια του είδους *Lactococcus* spp. (8).

Τέλος, μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση σχετικά με την ταυτοποίηση βακτηρίων *Lactococcus lactis* και *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. συγκριτικά με την ηλικία των ασθενών που είχαν προσβληθεί από το συγκεκριμένο μικροοργανισμό, είναι ότι πρόκειται για ασθενείς που ανήκαν στην ηλικιακή ομάδα 0-2 έτη. Βάσει αυτού του γεγονότος, μπορεί να διαμορφωθεί η υπόθεση ότι η μετάδοση των εν λόγω βακτηρίων, συνέβη κατά το μητρικό θηλασμό, καθώς έπειτα από μελέτη που έγινε σχετικά με το μικροβίωμα και συγκεκριμένα με το είδος των μικροοργανισμών που υπάρχουν στο μητρικό γάλα, βρέθηκε πως μεταξύ αυτών ήταν και βακτήρια του είδους *Lactococcus* spp. (148).

## 10. Συμπεράσματα

Η ανάπτυξη της τεχνικής και η εφαρμογή του γονιδίου *tuf* απευθείας σε κλινικά δείγματα, βοήθησε στην ταυτοποίηση των στρεπτόκοκκων, καθώς διαθέτει ισχυρότερη διακριτική ικανότητα συγκριτικά με τα υπόλοιπα γονίδια που χρησιμοποιούνται για τη μοριακή ταυτοποίηση (*sodA*, *16s rRNA*, *groB*). Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα της εφαρμογής της εν λόγω τεχνικής στην ταυτοποίηση των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, επιβεβαιώθηκαν από τα αποτελέσματα των καλλιεργειών, γεγονός που προσέδωσε μεγάλη διαγνωστική αξία στην τεχνική αυτή. Ωστόσο, στην περίπτωση των *Streptococcus mitis* και *Streptococcus pseudopneumoniae* τόσο στα κλινικά δείγματα όσο και στα στελέχη, φάνηκε ότι, η αλληλουχία του συγκεκριμένου γονιδίου είναι όμοια και στα 2 είδη, επιβεβαιώνοντας έτσι το αποτέλεσμα της αναζήτησης στο BLAST. Επιπλέον, κατά την ταυτοποίηση των *Streptococcus* spp., οι οποίοι σχετίζονταν με περιστατικά μηνιγγιτίδας και σηψαιμίας σε κλινικά δείγματα, ανευρέθηκαν και είδη βακτηρίων *Lactococcus* spp.. Το εύρημα αυτό, καταδεικνύει ότι τα 2 είδη βακτηρίων έχουν ίδια αλληλουχία του γονιδίου *tuf*. Επιπρόσθετα, διεγείρει το ενδιαφέρον για περαιτέρω μελέτης των βακτηρίων *Lactococcus* spp. ως προς την παθογονικότητα τους αλλά και το ρόλο τους στις λοιμώξεις.

Επιπρόσθετα, η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου το οποίο μπορεί να εφαρμοστεί απευθείας σε κλινικά δείγματα ασθενών, συμβάλλει αρχικά στη μείωση του χρόνου διεξαγωγής της ανάλυσης και στην τυποποίηση διαδικασιών, προκειμένου να παράγονται αξιόπιστα και με επαναληψιμότητα αποτελέσματα, με μείωση κινδύνου επιμόλυνσης, καθώς το δείγμα επεξεργάζεται όσο το δυνατό λιγότερο πριν την ανάλυση. Τέλος, η εφαρμογή του πρωτοκόλλου αποκάλυψε νέα δεδομένα σχετικά με τους στρεπτόκοκκους, καθώς ένα μεγάλο ποσοστό των δειγμάτων (58%) της μελέτης, τα οποία ήταν θετικά για *Streptococcus* spp., δεν είχαν ταυτοποιηθεί ως Group A ή Group B από ένα σύνολο βιολογικών δειγμάτων θετικά σε δοκιμασία PCR (63%) απουσία καλλιέργειας.

Αναφορικά με την ηλικιακή ομάδα των ασθενών, φαίνεται ότι τα παιδιά ηλικίας < 5 ετών και οι ενήλικες ηλικίας άνω των 50 ετών, ήταν πιο ευάλωτοι σε λοιμώξεις από

NT στρεπτόκοκκους σε σχέση με τις υπόλοιπες ηλικιακές ομάδες. Επιπλέον, οι στρεπτόκοκκοι που φάνηκαν να κυριαρχούν στο σύνολο των δειγμάτων ήταν είδη που ανήκουν στις ομάδες των Mitis Group, Salivarius Group και Pyogenic Group.



## Βιβλιογραφία

1. National Public Health Organization (N.P.H.O). Meningococcal disease. Epidemiological data in Greece 2004-2023 [Internet]. Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας. 2024 [cited 2024 Apr 14]. Available from: [https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/06/MENINGOCOCCAL-DISEASE-2004\\_2023\\_eng.pdf](https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/06/MENINGOCOCCAL-DISEASE-2004_2023_eng.pdf)[https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/06/MENINGOCOCCAL-DISEASE-2004\\_2023\\_eng.pdf](https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/06/MENINGOCOCCAL-DISEASE-2004_2023_eng.pdf)
2. Mańdziuk J, Kuchar EP. Streptococcal Meningitis. In: StatPearls [Internet] [Internet]. StatPearls Publishing; 2023 [cited 2024 Apr 14]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554448/>
3. Almatrafi MA, Almuflihi A, Jarwann R, Alghraibi S, Ashgar E, Alsahaf N, et al. Viridans Group Streptococcus Meningitis in an Immunocompetent Child: A Case Report. *Am J Case Rep.* 2021 Sep 14;22:e933089-1-e933089-4.
4. Tzanakaki G, Tsopanomichalou M, Kesanopoulos K, Matzourani R, Sioumala M, Tabaki A, et al. Simultaneous single-tube PCR assay for the detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae*. *Clinical Microbiology and Infection.* 2005 May;11(5):386–90.
5. Sadowy E, Hryniewicz W. Identification of *Streptococcus pneumoniae* and other Mitis streptococci: importance of molecular methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020 Dec 1;39(12):2247–56.
6. Toit M du, Huch M, Cho GS, Franz CMAP. The genus *Streptococcus*. In: *Lactic Acid Bacteria* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2014 [cited 2023 Dec 1]. p. 457–505. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118655252.ch28>
7. Kosecka-Strojek M, Wolska M, Żabicka D, Sadowy E, Międzobrodzki J. Identification of Clinically Relevant *Streptococcus* and *Enterococcus* Species Based on Biochemical Methods and 16S rRNA, *sodA*, *tuf*, *rpoB*, and *recA* Gene Sequencing. *Pathogens.* 2020 Nov 11;9(11):939.
8. Picard FJ, Ke D, Boudreau DK, Boissinot M, Huletsky A, Richard D, et al. Use of *tuf* Sequences for Genus-Specific PCR Detection and Phylogenetic Analysis of 28 Streptococcal Species. *J Clin Microbiol.* 2004 Aug;42(8):3686–95.
9. Kosecka-Strojek M, Sabat AJ, Akkerboom V, Kooistra-Smid AMD (Mirjam), Miedzobrodzki J, Friedrich AW. Development of a reference data set for assigning *Streptococcus* and *Enterococcus* species based on next generation sequencing of the 16S–23S rRNA region. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2019 Nov 15;8(1):178.
10. Centers for Disease Control and Prevention. Meningitis [Internet]. 2023 [cited 2023 Oct 6]. Available from: <https://www.cdc.gov/meningitis/index.html>
11. World Health Organization. Meningitis [Internet]. [cited 2023 Oct 31]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/meningitis>

12. Lombardi G, Zustovich F, Farina P, Della Puppa A, Manara R, Cecchin D, et al. Neoplastic Meningitis from Solid Tumors: New Diagnostic and Therapeutic Approaches. *Oncologist*. 2011 Aug;16(8):1175–88.
13. Centers for Disease Control and Prevention. Bacterial Meningitis [Internet]. 2023 [cited 2023 Oct 6]. Available from: <https://www.cdc.gov/meningitis/bacterial.html>
14. Davis LE. Acute Bacterial Meningitis. *Continuum (Minneap Minn)*. 2018 Oct;24(5, Neuroinfectious Disease):1264–83.
15. Adriani KS, Brouwer MC, van der Ende A, van de Beek D. Bacterial meningitis in pregnancy: report of six cases and review of the literature. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012 Apr 1;18(4):345–51.
16. Thairu Y, Nasir IA, Usman Y. Laboratory Perspective of Gram Staining and its Significance in Investigations of Infectious Diseases. *Sub-Saharan African Journal of Medicine*. 2014 Dec;1(4):168.
17. Ruhai R, Kataria R. Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria. *Microbiological Research*. 2021 Oct 1;251:126829.
18. Holmes CL, Anderson MT, Mobley HLT, Bachman MA. Pathogenesis of Gram-Negative Bacteremia. *Clin Microbiol Rev*. 2021 Mar 17;34(2):e00234-20.
19. Shahan B, Choi EY, Nieves G. Cerebrospinal Fluid Analysis. *Am Fam Physician*. 2021 Apr 1;103(7):422–8.
20. Viallon A, Botelho-Nevers E, Zeni F. Clinical decision rules for acute bacterial meningitis: current insights. *Open Access Emergency Medicine [Internet]*. 2016 Apr 4 [cited 2024 Jul 5]; Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.2147/OAEM.S69975>
21. Julián-Jiménez A, Morales-Casado MI. Usefulness of blood and cerebrospinal fluid laboratory testing to predict bacterial meningitis in the emergency department. *Neurología (English Edition)*. 2019 Mar 1;34(2):105–13.
22. Kohil A, Jemmieh S, Smatti MK, Yassine HM. Viral meningitis: an overview. *Arch Virol*. 2021;166(2):335–45.
23. McGill F, Heyderman RS, Panagiotou S, Tunkel AR, Solomon T. Acute bacterial meningitis in adults. *Lancet*. 2016 Dec 17;388(10063):3036–47.
24. Centers for Disease Control and Prevention. Viral Meningitis [Internet]. 2023 [cited 2023 Oct 31]. Available from: <https://www.cdc.gov/meningitis/viral.html>
25. Centers for Disease Control and Prevention. Lymphocytic Choriomeningitis (LCM): Signs and Symptoms [Internet]. 2019 [cited 2023 Nov 20]. Available from: <https://www.cdc.gov/vhf/lcm/symptoms/index.html>
26. Wright WF, Pinto CN, Palisoc K, Baghli S. Viral (aseptic) meningitis: A review. *Journal of the Neurological Sciences*. 2019 Mar;398:176–83.

27. European Centre for Disease Prevention and Control. Factsheet about meningococcal disease [Internet]. 2010 [cited 2024 Jul 5]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/meningococcal-disease/factsheet>
28. Jain S, Iverson LM. Glasgow Coma Scale. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [cited 2024 Jul 5]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513298/>
29. Tracy A, Waterfield T. How to use clinical signs of meningitis. *Archives of Disease in Childhood - Education and Practice*. 2020 Feb 1;105(1):46–9.
30. Forgie SE. The History and Current Relevance of the Eponymous Signs of Meningitis. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2016 Jul;35(7):749.
31. Jafari E, Azizian R, Asareh A, Akrami S, Karimi N. Comparative study between bacterial meningitis vs. viral meningitis and COVID-19. *Infect Dis Res*. 2022;3(2):9.
32. Behboudi E, Zeynali P. Global Study of Viral Meningitis: A Systematic Review and Meta-analysis. *International Journal of Pediatrics*. 2022 Feb 10;
33. Zueter AM, Zaiter A. Infectious Meningitis. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2015 Mar 15;37(6):43–51.
34. Young N, Thomas M. Meningitis in adults: diagnosis and management. *Internal Medicine Journal*. 2018;48(11):1294–307.
35. Van De Beek D, Cabellos C, Dzupova O, Esposito S, Klein M, Kloek AT, et al. ESCMID guideline: diagnosis and treatment of acute bacterial meningitis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2016 May;22:S37–62.
36. Breijyeh Z, Jubeh B, Karaman R. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules*. 2020 Jan;25(6):1340.
37. Owuama CI. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) using a novel dilution tube method. *AJMR*. 2017 Jun 21;11(23):977–80.
38. Alamarat Z, Hasbun R. Management of Acute Bacterial Meningitis in Children. *Infection and Drug Resistance*. 2020 Nov 11;13:4077–89.
39. World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics [Internet]. 2017 [cited 2024 Jul 10]. Available from: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
40. Jubeh B, Breijyeh Z, Karaman R. Resistance of Gram-Positive Bacteria to Current Antibacterial Agents and Overcoming Approaches. *Molecules*. 2020 Jan;25(12):2888.
41. Spellerberg B, Brandt C. Streptococcus. In: *Manual of Clinical Microbiology* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2015 [cited 2023 Oct 17]. p. 383–402. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1128/9781555817381.ch22>

42. Chalita M, Ha S min, Kim YO, Oh HS, Yoon SH, Chun J. Improved Metagenomic Taxonomic Profiling Using a Curated Core Gene-Based Bacterial Database Reveals Unrecognized Species in the Genus *Streptococcus*. *Pathogens*. 2020 Mar;9(3):204.
43. Dey M, Chatterjee S, Dhara B, Roy I, Mitra AK. Chapter 6 - Promoting crop growth with symbiotic microbes in agro-ecosystems. In: Malik JA, editor. *Microbes and Microbial Biotechnology for Green Remediation* [Internet]. Elsevier; 2022 [cited 2023 Nov 23]. p. 117–33. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323904520000438>
44. Tokarz-Deptuła B, Śliwa-Dominiak J, Adamiak M, Bąk K, Deptuła W. Commensal bacteria and immunity of the gastrointestinal, respiratory and genitourinary tracts. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2016 Jun 13;70(0):599–609.
45. Lannes-Costa P s., de Oliveira J s. s., da Silva Santos G, Nagao P e. A current review of pathogenicity determinants of *Streptococcus* sp. *Journal of Applied Microbiology*. 2021;131(4):1600–20.
46. Facklam R. What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Oct;15(4):613–30.
47. Parks T, Barrett L, Jones N. Invasive streptococcal disease: a review for clinicians. *Br Med Bull*. 2015 Sep;115(1):77–89.
48. Gao XY, Zhi XY, Li HW, Klenk HP, Li WJ. Comparative Genomics of the Bacterial Genus *Streptococcus* Illuminates Evolutionary Implications of Species Groups. *PLoS One*. 2014 Jun 30;9(6):e101229.
49. Pombert JF, Sitek V, Boissinot M, Frenette M. Evolutionary relationships among salivarius streptococci as inferred from multilocus phylogenies based on 16S rRNA-encoding, *recA*, *secA*, and *secY* gene sequences. *BMC Microbiology*. 2009 Oct 30;9(1):232.
50. Alves-Barroco C, Paquete-Ferreira J, Santos-Silva T, Fernandes AR. Singularities of Pyogenic Streptococcal Biofilms – From Formation to Health Implication. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2020 [cited 2023 Dec 6];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.584947>
51. Efstratiou A, Lamagni T. Epidemiology of *Streptococcus pyogenes*. In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA, editors. *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations* [Internet]. 2nd ed. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center; 2022 [cited 2023 Dec 4]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK587100/>
52. Guerra M, Marado D, Fortuna J. Acute meningitis complicated with ventriculitis caused by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*. *Arch Clin Cases*. 2023 Feb 20;10(1):11–4.
53. Chandnani HK, Jain R, Patamasucon P. Group C *Streptococcus* Causing Rheumatic Heart Disease in a Child. *J Emerg Med*. 2015 Jul;49(1):12–4.

54. Jourani M, Duprez T, Roelants V, Rodriguez-Villalobos H, Hantson P. Acute Bacterial Meningitis and Systemic Abscesses due to *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* Infection. *Case Rep Infect Dis*. 2017;2017:8645859.
55. Rantala S. *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* bacteremia: an emerging infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014 Aug 1;33(8):1303–10.
56. Dekker JP, Lau AF. An Update on the *Streptococcus bovis* Group: Classification, Identification, and Disease Associations. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016 Jun 24;54(7):1694–9.
57. van Samkar A, Brouwer MC, Schultsz C, van der Ende A, van de Beek D. *Streptococcus suis* Meningitis: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(10):e0004191.
58. Wardle M, Mu A, Tong SYC. *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus* meningitis complicated by venous sinus thrombosis: A case report. *International Journal of Infectious Diseases*. 2018 Jun 1;71:30–2.
59. Nguyen MT, Idriss S, Guzman E, De Oliveira ER. Neonatal meningitis, endocarditis, and pneumonitis due to *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus*: a case report. *BMC Pediatr*. 2019 Aug 1;19:265.
60. Li J, Yan C, Wei D, Gong X. *Streptococcus gallolyticus* Subspecies *pasteurianus* Meningitis in an Infant with Hypothyroidism and Diarrhea. *Infect Drug Resist*. 2023 Sep 14;16:6217–23.
61. Hede SV. Diagnosis and Treatment of Childhood Meningitis Caused by *Streptococcus bovis* Group. *Curr Infect Dis Rep*. 2016 Feb 15;18(4):11.
62. Van Samkar A, Brouwer MC, Pannekoek Y, Van Der Ende A, Van De Beek D. *Streptococcus gallolyticus* meningitis in adults: report of five cases and review of the literature. *Clinical Microbiology and Infection*. 2015 Dec;21(12):1077–83.
63. Garriss G, Wimmercranz Marking U, Nannapaneni P, Henriques-Normark B, Blomqvist K. A case of meningitis caused by *Streptococcus pseudopneumoniae* in Sweden. *Clin Microbiol Infect*. 2023 Jul;29(7):944–6.
64. Sisteck V, Boissinot M, Boudreau DK, Huletsky A, Picard FJ, Bergeron MG. Development of a real-time PCR assay for the specific detection and identification of *Streptococcus pseudopneumoniae* using the *recA* gene. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012 Nov;18(11):1089–96.
65. Colomba C, Garbo V, Boncori G, Albano C, Bagarello S, Condemi A, et al. *Streptococcus mitis* as a New Emerging Pathogen in Pediatric Age: Case Report and Systematic Review. *Antibiotics (Basel)*. 2023 Jul 23;12(7):1222.
66. Werno AM, Christner M, Anderson TP, Murdoch DR. Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from Nonpneumococcal *Streptococci* of the *Streptococcus mitis* Group by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2012 Sep;50(9):2863–7.

67. Okahashi N, Nakata M, Kuwata H, Kawabata S. Oral mitis group streptococci: A silent majority in our oral cavity. *Microbiology and Immunology*. 2022;66(12):539–51.
68. Andam CP, Hanage WP. Mechanisms of genome evolution of *Streptococcus*. *Infect Genet Evol*. 2015 Jul;33:334–42.
69. Rutherford ST, Bassler BL. Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Nov;2(11):a012427.
70. Fukayama H, Shoji K, Yoshida M, Iijima H, Maekawa T, Ishiguro A, et al. Bacterial meningitis due to the *Streptococcus mitis* group in children with cerebrospinal fluid leak. *IDCases*. 2022 Jan 1;27:e01406.
71. Fukumoto K, Manabe Y, Fujiwara S, Omote Y, Narai H, Yamada H, et al. Meningitis due to a Combination of *Streptococcus mitis* and *Neisseria subflava*: A Case Report. *Case Rep Neurol*. 2018 Jul 18;10(2):177–80.
72. Mavridis IN, Wimalachandra WSB, Rodrigues D, Lo WB. *Streptococcus oralis* infection of a ventriculoperitoneal shunt. *Brain Disorders*. 2023 Mar 1;9:100065.
73. Nakamura Y, Uemura T, Kawata Y, Hirose B, Yamauchi R, Shimohama S. *Streptococcus oralis* Meningitis with Gingival Bleeding in a Patient: A Case Report and Review of the Literature. *Intern Med*. 2021 Mar 1;60(5):789–93.
74. Patel MK, Scobie HM, Serhan F, Dahl B, Murrill CS, Nakamura T, et al. A global comprehensive vaccine-preventable disease surveillance strategy for the immunization Agenda 2030. *Vaccine*. 2022 Oct;S0264410X22009124.
75. Al Majid F, Aldrees A, Barry M, Binkhamis K, Allam A, Almohaya A. *Streptococcus anginosus* group infections: Management and outcome at a tertiary care hospital. *Journal of Infection and Public Health*. 2020 Nov 1;13(11):1749–54.
76. Pilarczyk-Zurek M, Sitkiewicz I, Koziel J. The Clinical View on *Streptococcus anginosus* Group – Opportunistic Pathogens Coming Out of Hiding. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2022 [cited 2023 Dec 6];13. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.956677>
77. Ismail K, Hughes I, Moloney S, Grimwood K. *Streptococcus anginosus* group infections in hospitalised children and young people. *Journal of Paediatrics and Child Health*. 2022;58(5):809–14.
78. Law V, Seow W, Townsend G. Factors influencing oral colonization of mutans streptococci in young children. *Australian Dental Journal*. 2007;52(2):93–100.
79. Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(4):499–515.
80. Delorme C, Abraham AL, Renault P, Guédon E. Genomics of *Streptococcus salivarius*, a major human commensal. *Infection, Genetics and Evolution*. 2015 Jul;33:381–92.

81. Wilson M, Martin R, Walk ST, Young C, Grossman S, McKean EL, et al. Clinical and Laboratory Features of *Streptococcus salivarius* Meningitis: A Case Report and Literature Review. *Clin Med Res*. 2012 Feb 1;10(1):15–25.
82. Yanagida M, Hosoi Y, Kawano T, Otake Y, Yamanaka Y, Baba T, et al. Noniatrogenic Meningitis Caused by *Streptococcus salivarius* Associated with Early Esophageal Cancer and Early Gastric Cancer. *Intern Med*. 2024 Feb 1;63(3):457–60.
83. Vignier N, Couzigou C, Nguyen Van JC, Gerber S, Gaillard S, Bruel C, et al. Diagnosis and treatment strategies for community-acquired *Streptococcus salivarius* meningitis. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2014 Jan 1;44(1):42–4.
84. Jovanovic U, Freyer M, Heckmann JG. *Streptococcus salivarius* meningitis: a spontaneous case in a 74-year-old man. *Acta Neurol Belg*. 2019 Sep 1;119(3):481–2.
85. Hlebowicz M, Jakubowski P, Smiatacz T. *Streptococcus suis* Meningitis: Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2019 Aug;19(8):557–62.
86. Díez de los Ríos J, Reynaga E, García-González M, Càmarà J, Ardanuy C, Cuquet J, et al. Clinical and Epidemiological Characteristics of *Streptococcus suis* Infections in Catalonia, Spain. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Dec 8;8:792233.
87. Kerdsin A. Human *Streptococcus suis* Infections in Thailand: Epidemiology, Clinical Features, Genotypes, and Susceptibility. *Trop Med Infect Dis*. 2022 Nov 8;7(11):359.
88. Segura M. *Streptococcus suis* Research: Progress and Challenges. *Pathogens*. 2020 Aug 27;9(9):707.
89. Lu M, Gong T, Zhang A, Tang B, Chen J, Zhang Z, et al. Mobile Genetic Elements in *Streptococci*. *Current Issues in Molecular Biology*. 2019 Jul;32(1):123–66.
90. Donati C, Glaser P, Mitchell T. Evolution and molecular epidemiology of streptococci. *Infection, Genetics and Evolution*. 2015 Jul 1;33:333.
91. Iasmina H. Acquired Antibiotic Resistance. *Journal of Experimental and Molecular Biology*. 2022 Sep 7;23(1):54–65.
92. Shelyakin PV, Bochkareva OO, Karan AA, Gelfand MS. Micro-evolution of three *Streptococcus* species: selection, antigenic variation, and horizontal gene inflow. *BMC Evol Biol*. 2019 Mar 27;19(1):83.
93. Soler N, Forterre P. Vesiduction: the fourth way of HGT. *Environ Microbiol*. 2020 Jul;22(7):2457–60.
94. Ren Y, Li C, Nanayakkara Sapugahawatte D, Zhu C, Spänig S, Jamrozny D, et al. Predicting hosts and cross-species transmission of *Streptococcus agalactiae* by interpretable machine learning. *Computers in Biology and Medicine*. 2024 Mar 1;171:108185.

95. Martín V, Mediano P, Del Campo R, Rodríguez JM, Marín M. Streptococcal Diversity of Human Milk and Comparison of Different Methods for the Taxonomic Identification of Streptococci. *J Hum Lact*. 2016 Nov;32(4):NP84–94.
96. da Silva Bastos V de A, Freitas-Fernandes LB, Fidalgo TK da S, Martins C, Mattos CT, de Souza IPR, et al. Mother-to-child transmission of *Streptococcus mutans*: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Dentistry*. 2015 Feb 1;43(2):181–91.
97. Mitchell TJ. The pathogenesis of streptococcal infections: from Tooth decay to meningitis. *Nat Rev Microbiol*. 2003 Dec;1(3):219–30.
98. Barnett TC, Cole JN, Rivera-Hernandez T, Henningham A, Paton JC, Nizet V, et al. Streptococcal toxins: role in pathogenesis and disease. *Cellular Microbiology*. 2015;17(12):1721–41.
99. Spaulding AR, Salgado-Pabón W, Kohler PL, Horswill AR, Leung DYM, Schlievert PM. Staphylococcal and Streptococcal Superantigen Exotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013 Jul;26(3):422–47.
100. Jiang Q, Zhou X, Cheng L, Li M. The Adhesion and Invasion Mechanisms of Streptococci. *Current Issues in Molecular Biology*. 2019 Jul;32(1):521–60.
101. Thomas L, Cook L. Two-Component Signal Transduction Systems in the Human Pathogen *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun*. 2020 Jun 22;88(7):e00931-19.
102. Aronson JK, editor. Tumor necrosis factor alfa. In: Meyler's Side Effects of Drugs (Sixteenth Edition) [Internet]. Oxford: Elsevier; 2016 [cited 2024 Mar 17]. p. 230–2. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444537171016085>
103. Brouwer S, Rivera-Hernandez T, Curren BF, Harbison-Price N, De Oliveira DMP, Jespersen MG, et al. Pathogenesis, epidemiology and control of Group A *Streptococcus* infection. *Nat Rev Microbiol*. 2023;21(7):431–47.
104. Raabe VN, Shane AL. Group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*). *Microbiol Spectr*. 2019 Mar;7(2):10.1128/microbiolspec.GPP3-0007–2018.
105. Wall EC, Chan JM, Gil E, Heyderman RS. Acute bacterial meningitis. *infectious diseases*. 2021;34(3).
106. Ghazanfar H, Qureshi Z, Kalangi H, Ata S, Jyala A, Perez EA. Recurrent group G *Streptococcus* bacteremia: A case report and literature review. *Clin Case Rep*. 2022 Aug;10(8):e6162.
107. Malke H. Genetics and Pathogenicity Factors of Group C and G *Streptococci*. *Microbiology Spectrum*. 2019 Mar 15;7(2):10.1128/microbiolspec.gpp3-0002–2017.
108. Nga TVT, Nghia HDT, Tu LTP, Diep TS, Mai NTH, Chau TTH, et al. Real-time PCR for detection of *Streptococcus suis* serotype 2 in cerebrospinal fluid of human patients with meningitis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2011 Aug;70(4):461–7.



109. Brouwer MC, van de Beek D. Epidemiology of community-acquired bacterial meningitis. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2018 Feb;31(1):78.
110. Fulde M, Valentin-Weigand P. Epidemiology and Pathogenicity of Zoonotic Streptococci. In: Chhatwal GS, editor. *Host-Pathogen Interactions in Streptococcal Diseases* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2013 [cited 2023 Dec 8]. p. 49–81. (Current Topics in Microbiology and Immunology). Available from: [https://doi.org/10.1007/82\\_2012\\_277](https://doi.org/10.1007/82_2012_277)
111. Demarigny Y, Soldat V, Gemelas L. From *Streptococcus lactis* to *Lactococcus lactis*: A qualitative and quantitative analysis of the scope of research undertaken around a microbial concept. *J Sci Res*. 2015;4(2):61.
112. Li TT, Tian WL, Gu CT. Elevation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* to the species level as *Lactococcus cremoris* sp. nov. and transfer of *Lactococcus lactis* subsp. *tractae* to *Lactococcus cremoris* as *Lactococcus cremoris* subsp. *tractae* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2021;71(3):004727.
113. Yother J, Trieu-Cuot P, Klaenhammer TR, de Vos WM. Genetics of Streptococci, Lactococci, and Enterococci: Review of the Sixth International Conference. *J Bacteriol*. 2002 Nov;184(22):6085–92.
114. Uchida Y, Morita H, Adachi S, Asano T, Taga T, Kondo N. Bacterial meningitis and septicemia of neonate due to *Lactococcus lactis*. *Pediatrics International*. 2011;53(1):119–20.
115. Karaaslan A, Soysal A, Kadayifci EK, Yakut N, Demir SO, Akkoc G, et al. *Lactococcus lactis* spp *lactis* infection in infants with chronic diarrhea: two cases report and literature review in children. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2016 Mar 31;10(03):304–7.
116. Wu F, Xie X, Du T, Jiang X, Miao W, Wang T. *Lactococcus lactis*, a bacterium with probiotic functions and pathogenicity. *World J Microbiol Biotechnol*. 2023 Dec 1;39(12):1–13.
117. Lahlou W, Bourial A, Maaouni T, Bensaad A, Bensahi I, Sabry M, et al. *Lactococcus lactis* endocarditis and liver abscess in an immunocompetent patient: a case report and review of the literature. *J Med Case Reports*. 2023 Mar 31;17(1):115.
118. Varghese R, Jayaraman R, Veeraraghavan B. Current challenges in the accurate identification of *Streptococcus pneumoniae* and its serogroups/serotypes in the vaccine era. *Journal of Microbiological Methods*. 2017 Oct;141:48–54.
119. Shahi S, Zununi Vahed S, Fathi N, Sharifi S. Polymerase chain reaction (PCR)-based methods: Promising molecular tools in dentistry. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018 Oct 1;117:983–92.
120. Tzanakaki G, Tsolia M, Vlachou V, Theodoridou M, Pangalis A, Foustoukou M, et al. Evaluation of non-culture diagnosis of invasive meningococcal disease by polymerase chain reaction (PCR). *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003 Oct 24;39(1):31–6.

121. Garibyan L, Avashia N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Invest Dermatol*. 2013 Mar;133(3):e6.
122. Rajalakshmi S. DIFFERENT TYPES OF PCR TECHNIQUES AND ITS APPLICATIONS. *IJCBS*. 2017;7(3):285–92.
123. İnce G, Yüksekaya M, Haberal E. Micro-polymerase chain reaction for point-of-care detection and beyond: a review microfluidics and nanofluidics. *Microfluidics and Nanofluidics*. 2023 Sep 11;27.
124. Singh J, Birbian N, Sinha S, Goswami A. A critical review on PCR, its types and applications. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences A critical review on PCR, its types and applications*. 2014 Oct 16;1:65–80.
125. Xirogianni A, Tzanakaki G, Karagianni E, Markoulatos P, Kourea-Kremastinou J. 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 Microbiology and Infectious Disease*. 2009 Feb;63(2):121–6.
126. Green MR, Sambrook J. Touchdown Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc*. 2018 May 1;2018(5):pdb.prot095133.
127. Moezi P, Kargar M, Doosti A, Khoshneviszadeh M. Multiplex touchdown PCR assay to enhance specificity and sensitivity for concurrent detection of four foodborne pathogens in raw milk. *Journal of Applied Microbiology*. 2019 Jul 1;127(1):262–73.
128. Crossley BM, Bai J, Glaser A, Maes R, Porter E, Killian ML, et al. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *J VET Diagn Invest*. 2020 Nov 1;32(6):767–75.
129. Valencia CA, Pervaiz MA, Husami A, Qian Y, Zhang K. Sanger Sequencing Principles, History, and Landmarks. In: Valencia CA, Pervaiz MA, Husami A, Qian Y, Zhang K, editors. *Next Generation Sequencing Technologies in Medical Genetics* [Internet]. New York, NY: Springer; 2013 [cited 2024 Apr 30]. p. 3–11. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9032-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9032-6_1)
130. NIHR Global Health Research Unit on Genomic Surveillance of AMR. Whole-genome sequencing as part of national and international surveillance programmes for antimicrobial resistance: a roadmap. *BMJ Glob Health*. 2020 Nov;5(11):e002244.
131. Xirogianni A, Marmaras N, Georgakopoulou T, Papandreou A, Simantirakis S, Magaziotou I, et al. Pneumococcal meningitis in Greece: A retrospective serotype surveillance study in the post-PCV13 era (2010–2020). *Vaccine*. 2022 Aug 12;40(34):5079–87.
132. Li X, Xing J, Li B, Wang P, Liu J. Use of *tuf* as a target for sequence-based identification of Gram-positive cocci of the genus *Enterococcus*, *Streptococcus*, coagulase-negative *Staphylococcus*, and *Lactococcus*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2012 Dec;11(1):31.
133. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool [Internet]. [cited 2023 Oct 23]. Available from: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

134. Fida M, Khalil S, Abu Saleh O, Challener DW, Sohail MR, Yang JN, et al. Diagnostic Value of 16S Ribosomal RNA Gene Polymerase Chain Reaction/Sanger Sequencing in Clinical Practice. *Clinical Infectious Diseases*. 2021 Sep 15;73(6):961–8.
135. Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*. 2021 Nov 1;82(11):801–11.
136. Kumar KR, Cowley MJ, Davis RL. Next-Generation Sequencing and Emerging Technologies\*. *Semin Thromb Hemost* [Internet]. 2024 May 1 [cited 2024 May 6]; Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0044-1786397>
137. Kchouk M, Gibrat JF, Elloumi M. Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. *Biol Med (Aligarh)* [Internet]. 2017 [cited 2024 May 6];09(03). Available from: <https://www.omicsonline.com/open-access/generations-of-sequencing-technologies-from-first-to-next-generation-0974-8369-1000395.php?aid=87862>
138. Akram A, Maley M, Gosbell I, Nguyen T, Chavada R. Utility of 16S rRNA PCR performed on clinical specimens in patient management. *International Journal of Infectious Diseases*. 2017 Apr 1;57:144–9.
139. Karmakar A, Das AK, Ghosh N, Sil PC. Chapter 2.7 - Superoxide dismutase. In: Nabavi SM, Silva AS, editors. *Antioxidants Effects in Health* [Internet]. Elsevier; 2022 [cited 2023 Dec 29]. p. 139–66. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128190968000276>
140. Moore MS, McCann CD, Jordan JA. Molecular Detection of Culture-Confirmed Bacterial Bloodstream Infections with Limited Enrichment Time. *Journal of Clinical Microbiology*. 2020 Dec 21;51(11):3720–5.
141. Váradi L, Lin Luo J, E. Hibbs D, D. Perry J, J. Anderson R, Orenga S, et al. Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: past, present, and future. *Chemical Society Reviews*. 2017;46(16):4818–32.
142. Poi BN, Pasupulety Venkata NK, Auckland CR, Paul SP. Neonatal meningitis and maternal sepsis caused by *Streptococcus oralis*. *J Neonatal Perinatal Med*. 2018;11(3):331–4.
143. Wydall S, Durrant F, Scott J, Cheesman K. *Streptococcus oralis* endocarditis leading to central nervous system infection in pregnancy. *Anaesthesia Reports*. 2021;9(2):e12133.
144. Madathil S, Matsumoto S, Mathews KD, Glykys J. Central Nervous System Infections Due to *Streptococcus anginosus* Group: A Single-Center Case Series. *J Child Neurol*. 2022 Mar 1;37(3):210–7.
145. Băncescu G, Băncescu A, Constantinescu MV. *Streptococcus anginosus* group - brief characterization and its contribution to the brain abscess pathogenesis. *EDUJ*. 2015;2(2):153–61.
146. Baracco GJ. Infections Caused by Group C and G *Streptococcus* (*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* and Others): Epidemiological and Clinical Aspects. *Microbiology Spectrum*. 2019 Apr 12;7(2):10.1128/microbiolspec.gpp3-0016–2018.

147. GenBank- National Center for Biotechnology Information (NCBI). *Lactococcus lactis* strain LAC460 chromosome, complete genome [Internet]. 2023 [cited 2024 Feb 16]. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ\\_CP059048.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ_CP059048.1)
148. Chathyushya KB, Prakash MS, Kodandapani YY, Bheema B, Babu JG, Rajkumar R. Studies on the isolation and molecular characterization of *Lactobacillus* spp. from human breast milk and assessment of their probiotic potential. *Environmental and Experimental Biology*. 2021;19(4):209–18.