



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΤΙΤΛΟΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ

ΜΑΚΡΟΛΙΔΩΝ (*mefA/E*, *ermB*, *ermA/TR*)

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΦΟΙΤΗΡΙΑΣ

ΜΑΡΙΝΑ ΔΕΛΕΓΚΟΥ

ΑΜ 19678054

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ:

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΓΕΩΡΓΙΑ (ΤΖΩΡΤΖΙΝΑ) ΤΖΑΝΑΚΑΚΗ

ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΜΠΕΛΟΥΚΑΣ

ΑΘΗΝΑ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2024



UNIVERSITY OF WEST ATTICA

FACULTY OF HEALTH AND CARING PROFESSIONS

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES

FACULTY OF MEDICAL LABORATORIES

TITLE

MOLECULAR DEVELOPMENT OF A multiplex PCR ASSAY FOR THE DETECTION  
OF GENES THAT CONFER RESISTANCE TO MACROLIDES (*mefA/E*, *ermB*,  
*ermA/TR*)

DISSERTATION

NAME OF STUDENT:  
MARINA DELEGKOU  
CANDIDATE NUMBER:  
19678054

SUPERVISORS:

PROFESSOR GEORGIA (TZORTZINA) TZANAKAKI  
ASSOCIATE PROFESSOR APOSTOLOS BELOUKAS

ATHENS, SEPTEMBER 2024

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ: 10/10/2024

ΟΝΟΜΑΤΑ ΕΞΕΤΑΣΤΩΝ

ΥΠΟΓΡΑΦΗ

1<sup>ΟΣ</sup> ΕΞΕΤΑΣΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΑ ΤΖΑΝΑΚΑΚΗ

2<sup>ΟΣ</sup> ΕΞΕΤΑΣΤΗΣ ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΜΠΕΛΟΥΚΑΣ

3<sup>ΟΣ</sup> ΕΞΕΤΑΣΤΗΣ ΧΡΥΣΑΝΘΗ ΒΟΓΙΑΤΖΑΚΗ





## Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη ΜΑΡΙΝΑ ΔΕΛΕΓΚΟΥ του ΓΕΩΡΓΙΟΥ, με αριθμό μητρώου 19678054 φοιτητής/τρια του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι: «Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής 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».

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγιτιδας, Εργαστήριο Επιτήρησης Λοιμωδών Νοσημάτων (ΕΕΛΝΟ), Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, Σχολή Δημόσια Υγεία.

Όνομα φοιτήτριας

Μαρίνα Δελέγκου

Υπογραφή φοιτήτριας

Μαρίνα Δελέγκου

## Ευχαριστίες

Κατ' αρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθ. Τζ. Τζανακάκη, η οποία μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας του Εργαστηρίου Επιτήρησης Λοιμωδών Νοσημάτων (ΕΕΛΝΟ του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, Σχολή Δημόσιας Υγείας). Η καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας μου ήταν σημαντική για να φέρω εις πέρας τη συγκεκριμένη εργασία.. Επιπλέον, μέσω εκείνης ήρθα σε ουσιαστική επαφή με τον κλάδο της Μικροβιολογίας αλλά και της έρευνας και ανακάλυψα καινούρια ενδιαφέροντα.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αθανασία Ξηρογιάννη, η οποία ήταν από την αρχή δίπλα μου και με συμβούλευε σε κάθε στάδιο της εργασίας μου. Χάρη σε εκείνη κατάφερα να αναπτύξω το ερευνητικό πρωτόκολλο στην καλύτερη δυνατή εκδοχή του.

Τέλος, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του Ε.Κ.Α.Μ., και συγκεκριμένα στον Κωνσταντίνο Καραμαλή, τον Στέλιο Σημαντηράκη, τη Νατάσα Παπανδρέου και τη Μαρισού Χαλίφε για τη συνεχή ενθάρρυνση και υποστήριξη τους.

## Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας .....	i
Ευχαριστίες .....	ii
Κατάλογος εικόνων .....	vi
Κατάλογος πινάκων.....	viii
Κατάλογος διαγραμμάτων .....	ix
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>1</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά <i>Streptococcus</i> spp. ....	3
1.1.2 Γενικά χαρακτηριστικά <i>Streptococcus pneumoniae</i> (πνευμονιόκοκκος) .....	3
<b>1.2 Ταυτοποίηση και τυποποίηση του <i>S. pneumoniae</i>.....</b>	<b>6</b>
1.2.1 Ταυτοποίηση <i>S. pneumoniae</i> .....	6
1.2.2 Τυποποίηση <i>S. pneumoniae</i> .....	10
<b>1.3 Λοιμώξεις που προκαλούνται από τον <i>S. pneumoniae</i>.....</b>	<b>17</b>
1.3.1 Φορεία και παθογένεια <i>S. pneumoniae</i> .....	17
1.3.2 <i>S. pneumoniae</i> και μηνιγγίτιδα.....	17
1.3.3 <i>S. pneumoniae</i> και βακτηραιμία/ σηψαιμία.....	18
1.3.4 <i>S. pneumoniae</i> και πνευμονία της κοινότητας.....	19
1.3.5 <i>S. pneumoniae</i> και Μέση Ωτίτιδα .....	19
1.3.6 <i>S.pneumoniae</i> και Οξεία Μαστοειδίτιδα.....	22
<b>1.4 Θεραπεία έναντι των λοιμώξεων από <i>S. pneumoniae</i>.....</b>	<b>24</b>
1.4.1 Θεραπεία μηνιγγίτιδας από <i>S. pneumoniae</i> .....	24
1.4.2 Θεραπεία σηψαιμίας από <i>S. pneumoniae</i> .....	25
1.4.3 Θεραπεία πνευμονίας από <i>S. pneumoniae</i> .....	25
1.4.4 Θεραπεία Οξείας Μέσης Ωτίτιδας από <i>S. pneumoniae</i> .....	25
1.4.5 Θεραπεία Οξείας Μαστοειδίτιδας από <i>S. pneumoniae</i> .....	25
<b>1.5 Μικροβιακή αντοχή.....</b>	<b>26</b>
1.5.1 Μικροβιακή αντοχή- Γενικά χαρακτηριστικά.....	26
1.5.2 Γονιδιακές μεταλλάξεις που προσδίδουν μικροβιακή αντοχή στα βακτήρια .....	27
1.5.3 Οριζόντια ανταλλαγή γονιδίων .....	28
1.5.4 Ποσοστά μικροβιακής αντοχής του <i>S. pneumoniae</i> .....	29
1.5.5 Μακρολίδες .....	30
1.5.6 Μέτρηση της μικροβιακής αντοχής in vitro .....	35
<b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....</b>	<b>41</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>42</b>



<b>2.1 Υλικά</b> .....	42
2.1.1 Δείγματα που μελετήθηκαν .....	42
2.1.2 Θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη της πολλαπλής τεχνικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (multiplex PCR, mPCR) ...	42
2.1.3 Υλικά για τις κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές.....	43
2.1.4 Υλικά για τις μοριακές τεχνικές.....	43
2.1.5 Υλικά για ανάγνωση των αποτελεσμάτων της μοριακής τεχνικής.....	44
2.1.6 Μηχανήματα για τις μικροβιολογικές και μοριακές τεχνικές .....	44
<b>2.2 Μέθοδοι</b> .....	44
2.2.1 Καλλιέργειες και συντήρηση βακτηριακών στελεχών .....	44
2.2.2 Έλεγχος ευαισθησίας του <i>S. pneumoniae</i> στις μακρολίδες (E-test) .....	45
2.2.3 Μέθοδοι απομόνωσης γενετικού υλικού.....	46
<b>2.3 Επιλογή εκκινητικών μορίων (primers) για την μοριακή ανίχνευση των γονιδίων αντοχής έναντι των μακρολίδων- Ανάπτυξη πολλαπλής τεχνικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης</b> .....	46
2.3.1 Επιλογή εκκινητικών μορίων.....	46
2.3.2 Έλεγχος εκκινητικών μορίων ως προς την ειδικότητα προς τα γονίδια-στόχους ...	47
2.3.3 Ανάπτυξη πολλαπλής τεχνικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης .....	47
<b>2.4 Πολλαπλή PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των γονιδίων αντοχής <i>mefA/E</i>, <i>ermA/TR</i>, <i>ermB</i> έναντι των μακρολίδων</b> .....	48
2.4.1 Εκκινητικά μόρια.....	48
2.4.2 Ανάπτυξη της τεχνικής: πειραματικά στάδια .....	49
<b>2.5 Ανάγνωση αποτελεσμάτων multiplex PCR</b> .....	55
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	56
<b>3.1 Αποτελέσματα δοκιμασίας E-test στα βακτηριακά στελέχη</b> .....	56
<b>3.2 Πολλαπλή PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των γονιδίων αντοχής <i>mefA/e</i>, <i>ermB</i>, <i>ermA/tr</i> έναντι του μικροοργανισμού <i>S. pneumoniae</i></b> .....	57
3.2.1 Στάδια ανάπτυξης της πειραματικής τεχνικής .....	57
<b>3.3 Ανάλυση αποτελεσμάτων της μοριακής τεχνικής που δημιουργήθηκε για την ταυτόχρονη ανίχνευση των γονιδίων <i>mefA/E</i>, <i>ermB</i> και <i>ermA/TR</i></b> .....	69
3.3.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων σε βακτηριακά στελέχη.....	69
3.3.2 Ανάλυση αποτελεσμάτων σε κλινικά δείγματα .....	71
3.3.3 Ορότυποι και αντοχή στα αντιβιοτικά .....	71
3.3.4 Συμπεράσματα επί του συνόλου των δειγμάτων .....	75
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	78
<b>Συμπεράσματα</b> .....	81
<b>Περίληψη</b> .....	82
<b>Abstract</b> .....	83

<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	84
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</b> .....	92

## Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1. Απεικόνιση σταδίων αποδιάταξης- υβριδισμού- επιμήκυνσης μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας δίκλωνου DNA. Πηγή φωτογραφίας από τον ιστότοπο (PCR -Principle, Steps, Types, Components And Applications Of PCR (byjus.com)).....	8
Εικόνα 2. Αναστολή ανάπτυξης ενός συγκεκριμένου βακτηριακού είδους σε διαφορετικά αντιβιοτικά. Ανάλογα με το αντιβιοτικό παρουσιάζεται και διαφορετική ζώνη αναστολής, δηλαδή διαφορετικά επίπεδα ευαισθησίας/αντοχής του βακτηρίου στα αντιβιοτικά. Φωτογραφία από τον ιστότοπο La gélose Mueller-Hinton (microbiologiemedicale.fr).....	36
Εικόνα 3. Μέθοδος D-test. Αριστερά είναι τοποθετημένος δίσκος ερυθρομυκίνης και δεξιά δίσκος κλινδαμυκίνης. Η δοκιμασία είναι θετική και έτσι παρατηρείται ευθειασμός της ζώνης αναστολής ανάπτυξης του βακτηρίου στην κλινδαμυκίνη παρουσία του αντιβιοτικού ερυθρομυκίνη. Η αναστολή ανάπτυξης του βακτηρίου έχει το χαρακτηριστικό γράμμα “D”, από όπου και πήρε το όνομά της η δοκιμασία. Πηγή εικόνας: Inducible Clindamycin Resistance (D Test) • Microbe Online .....	37
Εικόνα 4. Μέθοδος των αραιώσεων σε υγρό και στερεό μέσο. Και στις δύο περιπτώσεις εξετάζεται η ύπαρξη βακτηριακών αποικιών, οι οποίες καθορίζουν το οπτικό αποτέλεσμα. (Πηγή από την ιστοσελίδα Antibiotic Susceptibility Testing: Disc Diffusion & Dilution Methods (imicrobe.blogspot.com)).....	38
Εικόνα 5. Μέθοδος E-test. Το κίτρινο μέρος της εικόνας αντιστοιχεί σε βακτηριακή ανάπτυξη ενώ το λευκό σε αναστολή αυτής. Η αντιβιοτική ταινία αναγράφει πάνω της διαφορετικές συγκεντρώσεις του ίδιου αντιβιοτικού. Ως MIC ορίζεται το σημείο τομής της ζώνης αναστολής (λευκό μέρος εικόνας) με την ταινία. Χρήση εικόνας από τον ιστότοπο Метод e теста (akwatoria.ru) .....	39
Εικόνα 6. Αρχικές δοκιμασίες μεμονωμένων τεχνικών PCR. Διαδρομή 1: μάρτυρας μοριακού βάρους (ladder, 100 bp, διαδρομές 2-5: προϊόν θετικό για το γονίδιο <i>ermB</i> (πρόγραμμα 1, πίνακας 3), διαδρομές 6-9: προϊόν θετικό για το γονίδιο <i>mefA/E</i> (πρόγραμμα 2, πίνακας 4), διαδρομές: 10-12: προϊόν θετικό για το γονίδιο <i>ermA/TR</i> (προγράμματα 1 & 2, πίνακες 3 & 4 αντίστοιχα). Διαδρομή 13: αρνητικός μάρτυρας (δισ απιονισμένο νερό).....	57
Εικόνα 7. Δοκιμασία ανίχνευσης του γονιδίου <i>ermB</i> σύμφωνα με το πρόγραμμα 3 (πίνακας 5). 1 <sup>η</sup> διαδρομή: ladder (μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους), διαδρομές 2,3,5 και 6: θετικός μάρτυρας για το γονίδιο <i>ermB</i> συγκέντρωσης 5ng/μl και διαδοχικές αραιώσεις του στα 0, 5ng/μl, 0,05ng/μl και 0,005ng/μl αντίστοιχα. Διαδρομή 7: αρνητικός μάρτυρας (δισ απιονισμένο νερό).....	58
Εικόνα 8. Δοκιμασία ανίχνευσης του γονιδίου <i>mefA/E</i> σύμφωνα με το πρόγραμμα 3 (πίνακας 5). 1 <sup>η</sup> διαδρομή: ladder (μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους), διαδρομές 2-6: θετικός μάρτυρας για το γονίδιο <i>mefA/E</i> συγκέντρωσης 5ng/μl, 1ng/μl και διαδοχικές αραιώσεις του στα 0, 5ng/μl, 0,05ng/μl και 0,005ng/μl αντίστοιχα. Διαδρομή 7: αρνητικός μάρτυρας (δισ απιονισμένο νερό). .....	59
Εικόνα 9. Δοκιμασία ανίχνευσης του γονιδίου <i>ermA/TR</i> σύμφωνα με το πρόγραμμα 3 (πίνακας 5). 1 <sup>η</sup> διαδρομή: ladder (μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους), διαδρομές 2-4: θετικός μάρτυρας για το γονίδιο <i>ermA/TR</i> συγκέντρωσης 5ng/μl και διαδοχικές αραιώσεις του στα 0, 5ng/μl και 0,05ng/μl. Διαδρομή 5: αρνητικός μάρτυρας (δισ απιονισμένο νερό).....	59
Εικόνα 10. Δοκιμασία ανίχνευσης του γονιδίου <i>ermB</i> σύμφωνα με το πρόγραμμα 4 (πίνακας 6). 1 <sup>η</sup> διαδρομή: ladder (μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους), διαδρομή 2: αρνητικός μάρτυρας (δισ απιονισμένο νερό), διαδρομές 3-7: θετικός μάρτυρας για το γονίδιο <i>ermB</i> συγκέντρωσης 5ng/μl και διαδοχικές αραιώσεις του στα 0.5ng/μl, 0.05ng/μl και 0.005ng/μl αντίστοιχα. ....	60
Εικόνα 11. Δοκιμασία ανίχνευσης του γονιδίου <i>mefA/E</i> σύμφωνα με το πρόγραμμα 4 (πίνακας 6). 1 <sup>η</sup> διαδρομή: ladder (μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους), διαδρομές 2-5: θετικός	

μάρτυρας για το γονίδιο <i>mefA/E</i> συγκέντρωσης 5ng/μl, 1ng/μl και διαδοχικές αραιώσεις του στα 0,5ng/μl, 0,05ng/μl και 0,005ng/μl αντίστοιχα. Διαδρομή 6: αρνητικός μάρτυρας (δισ αποιονισμένο νερό). .....	61
Εικόνα 12. Δοκιμασία ανίχνευσης του γονιδίου <i>ermA/TR</i> σύμφωνα με το πρόγραμμα 4 (πίνακας 6) 1η διαδρομή: ladder (μάρτυρας γ γνωστού μοριακού βάρους), διαδρομές 2-4: θετικός μάρτυρας για το γονίδιο <i>ermA/TR</i> συγκέντρωσης 5ng/μl και διαδοχικές αραιώσεις του στα 0, 5ng/μl και 0,05ng/μl αντίστοιχα. Διαδρομή 5: αρνητικός μάρτυρας (δισ αποιονισμένο νερό).....	61
Εικόνα 13. Δοκιμασία ανίχνευσης του γονιδίου <i>mefA/E</i> στο πρόγραμμα 5 (πίνακας 7). Διαδρομή 1: ladder (μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους), διαδρομές 2-4: θετικός μάρτυρας για το γονίδιο <i>mefA/E</i> . Διαδρομή 5: αρνητικός μάρτυρας (δισ- αποιονισμένο νερό) .....	62
Εικόνα 14. Δοκιμασία ανίχνευσης του γονιδίου <i>ermB</i> στο πρόγραμμα 5 (πίνακας 7). Διαδρομή 1: ladder (μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους), διαδρομές 2-4: θετικός μάρτυρας για το γονίδιο <i>ermB</i> . Διαδρομή 5: αρνητικός μάρτυρας (δισ αποιονισμένο νερό).....	63
Εικόνα 15. Δοκιμασία ανίχνευσης του γονιδίου <i>ermA/TR</i> στο πρόγραμμα 5 (πίνακας 7). Διαδρομή 1: ladder (μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους), διαδρομές 2-4: θετικός μάρτυρας για το γονίδιο <i>ermA/TR</i> . Διαδρομή 5: αρνητικός μάρτυρας (δισ αποιονισμένο νερό). .....	63
Εικόνα 16. 1η δοκιμή multiplex PCR και για τα 3 γονίδια αντοχής έναντι των μακρολίδων σύμφωνα με το πρόγραμμα 5 (πίνακας 7). Διαδρομή 1: μάρτυρας μοριακού βάρους, διαδρομές 2-4: θετικός μάρτυρας σε συγκέντρωση 5 ng/μl, 0.5 ng/μl και 0.05 ng/μl αντίστοιχα, Τα γονίδια που διακρίνονται είναι με σειρά αυξανόμενου μοριακού βάρους, το <i>ermB</i> , το <i>mefA/E</i> και το <i>ermA/TR</i> . .....	64
Εικόνα 17. Ταυτόχρονη ανίχνευση των γονιδίων <i>ermB</i> , <i>mefA/E</i> , <i>ermA/TR</i> (πρόγραμμα 6, πίνακας 8). Διαδρομή 1: μάρτυρας μοριακού βάρους (100bp), διαδρομές 2&3: θετικός μάρτυρας και για τα 3 γονίδια, διαδρομές 4-7: διάφορα βακτηριακά στελέχη εκ των οποίων μόνο ένα ήταν θετικό για το γονίδιο <i>mefA/E</i> . Διαδρομή 8: αρνητικός μάρτυρας (δισ αποιονισμένο νερό). .....	65
Εικόνα 18. Εφαρμογή σε κλινικά δείγματα (πρόγραμμα 6, πίνακας 8). Διαδρομή 1: μάρτυρας μοριακού βάρους, διαδρομές 2-4 & 6: θετικός μάρτυρας των τριών γονιδίων, συγκέντρωσης 5 ng/ml, με τις αραιώσεις του (1:10, 1:100 και 1:1000 αντίστοιχα, διαδρομές 7 & 9-1: κλινικά δείγματα, που εμφανίζουν προϊόντα εκτός της περιοχής ανίχνευσης των γονιδίων. Διαδρομή 15: αρνητικό μάρτυρας (δισ αποιονισμένο νερό).....	66
Εικόνα 19. Δοκιμασία του τελικού πρωτοκόλλου ανίχνευσης των 3 γονιδίων (πρόγραμμα 7, πίνακας 9). Διαδρομή 1: μάρτυρας μοριακού βάρους (100bp). Διαδρομή 2: θετικός μάρτυρας σε συγκέντρωση 500pg/μl, διαδρομές 3-19: κλινικά δείγματα, διαδρομή 20: αρνητικός μάρτυρας. ....	67
Εικόνα 20. Δοκιμασία ευαισθησίας των 3 γονιδίων (πρόγραμμα 7, πίνακας 9). Διαδρομή 1:μάρτυρας μοριακού βάρους (ladder), διαδρομή 2: θετικός μάρτυρας και για τα 3 γονίδια ( <i>ermB</i> , <i>mefA/E</i> , <i>ermA/TR</i> ). Διαδρομές 3-5: στέλεχος θετικό για το γονίδιο <i>ermA/TR</i> σε συγκεντρώσεις 500pg/μl, 50 pg/μl, 5 pg/μl, όπως γίνεται και διαδρομές 6-8 και 9-11 για τα γονίδια <i>mefA/E</i> και <i>ermB</i> αντίστοιχα.....	67
Εικόνα 21. Δοκιμασία ευαισθησίας σε spiked κλινικά δείγματα σύμφωνα με το πρόγραμμα 7 (πίνακας 9). Διαδρομή 1: μάρτυρας μοριακού βάρους, διαδρομή 2: θετικός μάρτυρας της δοκιμής, διαδρομές 3-8: κλινικά δείγματα. Στις διαδρομές 3 και 7 έχουν ανιχνευθεί το γονίδιο <i>ermA/TR</i> , ενώ στη θέση 5 το γονίδιο <i>mefA/E</i> .....	68
Εικόνα 22. Στην επισημασμένη περιοχή ανιχνεύεται το γονίδιο <i>ermB</i> στην αραιώση του κλινικού δείγματος (θέση 7), και όχι στο πυκνό δείγμα. Αυτό παρατηρείται λόγω αναστολής που συμβαίνει από το μεγάλο φορτίο γενετικού υλικού. Η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα 7 (πίνακας 9).....	69

## Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1. Ορότυποι που καλύπτονται από τα διαθέσιμα εμβόλια έναντι του <i>S. pneumoniae</i> . Πηγές: Vaxneuvance   European Medicines Agency (EMA) (europa.eu), Apexxnar suspension for injection in pre-filled syringe - Summary of Product Characteristics (SmPC) - (emc) (medicines.org.uk), (Tsang, 2021).....	13
Πίνακας 2. Στοιχεία για τα εκκινητικά μόρια (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των γονιδίων <i>mefA/E</i> , <i>ermA/TR</i> και <i>ermB</i> αντίστοιχα. ....	48
Πίνακας 3. Στοιχειομετρία και συνθήκες αντίδρασης για τη μεμονωμένη ανίχνευση των γονιδίων αντοχής <i>ermB</i> & <i>ermA/TR</i> . ....	49
Πίνακας 4. Στοιχειομετρία και συνθήκες αντίδρασης για τη μεμονωμένη ανίχνευση των γονιδίων αντοχής <i>mefA/E</i> .....	50
Πίνακας 5. Δοκιμή των μεμονωμένων τεχνικών με πρόγραμμα της touchdown PCR. ....	51
Πίνακας 6. Ενδιάμεσο πρόγραμμα (πρόγραμμα 4) μεμονωμένων αντιδράσεων ανίχνευσης των γονιδίων αντοχής <i>mefA/E</i> , <i>ermB</i> και <i>ermA/TR</i> έναντι των μακρολίδων.....	51
Πίνακας 7. Διαμόρφωση πρωτοκόλλου με αντικατάσταση αντιδραστηρίων GC Buffer, MgCl <sub>2</sub> και Taq polymerase από το Kara mix. ....	52
Πίνακας 8. Αλλαγή στις ποσότητες των εκκινητών για κάθε γονίδιο ώστε να είναι δυνατή η ταυτόχρονη ανίχνευση και των 3 γονιδίων ( <i>mefA/E</i> , <i>ermB</i> , <i>ermA/TR</i> ). ....	53
Πίνακας 9. Τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων και συνθήκες υβριδισμού που αποτέλεσαν το τελικό πρωτόκολλο ταυτόχρονης ανίχνευσης και των 3 γονιδίων.....	54
Πίνακας 10. Αναλυτικά αποτελέσματα της μεθόδου E-test στα βακτηριακά στελέχη. Αναγράφονται οι τιμές ευαισθησίας/ αντοχής στην ερυθρομυκίνη και το πλήθος των βακτηριακών στελεχών (n1, n2) που αντιστοιχούν σε αυτές. ....	56
Πίνακας 11. Ποσοστά ανίχνευσης γονιδίων αντοχής ( <i>mefA/E</i> , <i>ermB</i> , <i>ermA/TR</i> ) έναντι των μακρολίδων στα βακτηριακά στελέχη. ....	70
Πίνακας 12. Αποτελέσματα δοκιμής E-test στα βακτηριακά στελέχη και συσχέτιση τιμών MIC με τα υπό μελέτη γονίδια. ....	71
Πίνακας 13. Ποσοστά των γονιδίων αντοχής ( <i>mefA/E</i> , <i>ermB</i> , <i>ermA/TR</i> ) έναντι των μακρολίδων που ανιχνεύθηκαν στα κλινικά δείγματα. ....	71
Πίνακας. 1- Παράρτημα. Καταγραφή δειγμάτων ανά ορότυπο και ανά έτος εμφάνισης.....	92
Πίνακας 2- Παράρτημα. Ποσοστά ανίχνευσης των γονιδίων αντοχής ( <i>mefA/E</i> , <i>ermB</i> , <i>ermA/TR</i> ) που ανιχνεύθηκαν σε σύνολο 47 δειγμάτων που οφείλονταν σε στέλεχος <i>S.pneumoniae</i> με υπεύθυνο ορότυπο που καλύπτεται από τα εμβόλια PCV13 & PCV15.....	93
Πίνακας. 3- Παράρτημα. Ποσοστά ανίχνευσης των γονιδίων αντοχής ( <i>mefA/E</i> , <i>ermB</i> , <i>ermA/TR</i> ) που ανιχνεύθηκαν σε σύνολο 43 δειγμάτων που οφείλονταν σε στέλεχος <i>S.pneumoniae</i> με υπεύθυνο ορότυπο που δεν καλύπτεται από τα εμβόλια PCV13 & PCV15 ή σε ορότυπο NT.....	94

## Κατάλογος διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1. Ποσοστό διαθέσιμων κλινικών δειγμάτων (culture negative= 63) και βακτηριακών στελεχών (culture positive= 27) που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.....	41
Διάγραμμα 2. Πορεία συχνότητας δειγμάτων στα οποία ανιχνεύθηκε <i>S. pneumoniae</i> οροτύπου 19A για τα έτη 2010-2023.....	72
Διάγραμμα 3. Πορεία συχνότητας δειγμάτων στα οποία ανιχνεύθηκε <i>S. pneumoniae</i> οροτύπου 3.....	73
Διάγραμμα 4. Ποσοστά ανίχνευσης των γονιδίων <i>mefA/E</i> , <i>ermB</i> και ποσοστά ταυτόχρονης ανίχνευση των <i>mefA/E</i> & <i>ermB</i> για τα δείγματα οροτύπου 19A.....	74
Διάγραμμα 5. Ποσοστά ανίχνευσης των γονιδίων αντοχής <i>mefA/E</i> και <i>ermB</i> , αλλά και ποσοστό απουσίας αυτών και των τριών γονιδίων ( <i>ermB</i> , <i>mefA/E</i> , <i>ermA/TR</i> ) σε δείγματα του οροτύπου 3.....	75
Διάγραμμα 6. Ποσοστά ευαισθησίας και αντοχής στους PCV13,15 και NON-PCV13,15/NT οροτύπους.....	76
Διάγραμμα 7. Συνολικά ποσοστά ανίχνευσης των γονιδίων <i>mefA/E</i> , <i>ermB</i> & <i>ermA/TR</i> που προσδίδουν αντοχή έναντι των μακρολίδων, στο σύνολο των 90 δειγμάτων που εξετάστηκαν. .....	77
Διάγραμμα 8. Ποσοστά αντοχής για τους συχνότερα εμφανιζόμενους οροτύπους επί του συνόλου των δειγμάτων (90). .....	77

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο *Streptococcus pneumoniae* (πνευμονιόκοκκος) είναι ένα από τα πλέον κοινά παθογόνα που προσβάλλει ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού και προκαλεί λοιμώξεις οι οποίες μπορεί να κυμαίνονται από ήπιας- μέτριας σοβαρότητας έως υψηλού κινδύνου για την ανθρώπινη ζωή. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν, εκτός των άλλων, οι λοιμώξεις της μέσης ωτίτιδας και της οξείας μαστοειδίτιδας (Ngo et al., 2016; Ubukata et al., 2018) ενώ στη δεύτερη κατατάσσονται οι διηθητικές λοιμώξεις, όπως μηνιγγίτιδα, σηψαιμία και πνευμονία (Oordt-Speets et al., 2018; Resti et al., 2010; Srzić et al., 2022).

Αξίζει να αναφερθεί πως οι λοιμώξεις των ωτών αποτελούν κύρια αιτία αλόγιστης χορήγησης αντιβιοτικών στην παιδική ηλικία (Suzuki et al., 2020), ενώ αν δεν θεραπευτούν κατάλληλα δύναται να προκαλέσουν σοβαρές επιπλοκές που μπορεί να οδηγήσουν σε εμφάνιση νευρολογικών δυσκολιών ή σε ακραίες περιπτώσεις να αποβούν μοιραίες για την ανθρώπινη ζωή (Yonamine et al., 2009).

Αυτές οι, κατά βάση, παιδικές ασθένειες, έδωσαν το έναυσμα για τη μελέτη των αντιβιοτικών που χορηγούνται για την αντιμετώπισή τους. Αντιβιοτικά πρώτης εκλογής αποτελούν συνήθως οι πενικιλίνες, ωστόσο έχει παρατηρηθεί πως η αντοχή του πνευμονιοκόκκου έχει αυξηθεί τόσο σε αυτές όσες και σε αντιβιοτικά με άλλους μηχανισμούς δράσης (Lei and Wang, 2022). Ειδικά σε περιστατικά ωτίτιδας, όταν οι ασθενείς παρουσιάζουν αλλεργική αντίδραση ή ευαισθησία στην πενικιλίνη, τότε προτιμώνται αντιβιοτικά όπως οι μακρολίδες (Danishyar and Ashurst, 2023). Για το λόγο αυτό κρίθηκε σημαντικός ο προσδιορισμός της αντοχής του πνευμονιοκόκκου σε αυτές. Ο προσδιορισμός αυτός βασίστηκε στην ανίχνευση των γονιδίων *ermB*, *mefA/E* και *ermA/TR*, η έκφραση των οποίων ευθύνεται για τους πιο συχνά εμφανιζόμενους μηχανισμούς αντοχής στις μακρολίδες (Schroeder and Stephens, 2016).

Ο μέχρι τώρα προσδιορισμός της μικροβιακής αντοχής των βακτηρίων στηρίζεται κυρίως σε συμβατικές μεθόδους, όπως η διάχυση δίσκων, οι μικροαραιώσεις ή σε κάποιο συνδυασμό των παραπάνω μεθόδων. Αυτές οι τεχνικές κρίνονται ιδιαίτερα χρήσιμες καθώς δίνουν τη δυνατότητα ημιποσοτικού ή ποσοτικού προσδιορισμού της μικροβιακής αντοχής των μικροοργανισμών, αλλά η δράση τους περιορίζεται μόνο σε βακτηριακά στελέχη που έχουν προηγουμένως απομονωθεί στο εργαστήριο (Giuliano et al., 2019). Ωστόσο η αριθμητική υπεροχή των κλινικών δειγμάτων έναντι των βακτηριακών στελεχών που ήταν διαθέσιμα προς μελέτη στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας, δηλώνει την ανάγκη ανάπτυξης τεχνικής ικανής να προσδιορίσει την ύπαρξη ή όχι της αντοχής στις επιθυμητές

αντιβιοτικές ουσίες. Λύση σε αυτή την κατάσταση δίνουν οι μοριακές τεχνικές, δηλαδή η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και οι παραλλαγές της, οι οποίες μπορούν να εφαρμοστούν σε κλινικά δείγματα, και ταυτόχρονα δίνουν άμεσα και αξιόπιστα αποτελέσματα (*Adzitey et al., 2013*).



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1.1 *Streptococcus pneumoniae*

### 1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά *Streptococcus* spp.

Οι στρεπτόκοκοι (*Streptococcus* species) είναι Gram θετικά βακτήρια που εμφανίζονται με τη μορφή ζευγών ή αλυσίδων. Παράγουν γαλακτικό οξύ που αποτελεί προϊόν ζύμωσης των σακχάρων, ενώ προτιμούν να αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα χωρίς οξυγόνο (δυσνητικά αναερόβια βακτήρια). Επιπλέον είναι αρνητικοί στη δοκιμασία της καταλάσης, δεν παρουσιάζουν κίνηση και δεν παράγουν σπόρια.

Ταξινομούνται σε 6 φυλογενετικές ομάδες, οι οποίες περιλαμβάνουν συνολικά πάνω από 50 είδη στρεπτόκοκκων. Από αυτά τα είδη άλλα είναι παθογόνα, άλλα συμβιωτικά και άλλα δυσνητικά παθογόνα για τον άνθρωπο. Επιπλέον διαχωρισμός τους μπορεί να γίνει με τις ομάδες κατά Lancefield, ο οποίος αφορά τον κύριο πολυσακχαρίτη του κυτταρικού τοιχώματος και τις διαφορές που παρουσιάζει ανάλογα με το είδος του στρεπτόκοκκου. Πλέον υπάρχουν 21 ομάδες κατά Lancefield (Greenwood D., 2016).

Οι στρεπτόκοκοι αναπτύσσονται άριστα σε αιματούχο άγαρ. Μία περαιτέρω διάκρισή τους μπορεί να επιτευχθεί χάρη στην χαρακτηριστική όψη που εμφανίζουν στο συγκεκριμένο υλικό. Διακρίνονται τρεις τύποι αιμόλυσης: η α-, η β- και η γ- αιμόλυση.

- Α- αιμόλυση: χαρακτηριστική των στρεπτόκοκκων της φυσιολογικής χλωρίδας. Το οπτικό αποτέλεσμα που δημιουργείται είναι η ύπαρξη πράσινης (Greenwood D., 2016) ή καφέ ζώνης γύρω από τις αποικίες του βακτηρίου (Madigan T. M., 2005). Αυτή οφείλεται στην οξείδωση της αιμοσφαιρίνης από το υπεροξείδιο του υδρογόνου, και όχι από καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων από τη δράση κάποιας αιμολυσίνης.
- Β- αιμόλυση: χαρακτηριστική των πυογόνων στρεπτοκόκκων: Διακρίνεται από την ύπαρξη διάφανους ζώνης γύρω από τις αποικίες στο καλλιεργητικό υλικό. Οφείλεται στη δράση των αιμολυσινών του βακτηρίου, οι οποίες καταστρέφουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια του υλικού.
- Γ- αιμόλυση: Δεν παρατηρείται αποχρωματισμός του καλλιεργητικού μέσου.

### 1.1.2 Γενικά χαρακτηριστικά *Streptococcus pneumoniae* (πνευμονιόκοκκος)

Ο *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*, πνευμονιόκοκκος) ανήκει στην ομάδα mitis του γένους των στρεπτόκοκκων (Greenwood D., 2016), και αποτελεί ευκαιριακό παθογόνο του ανθρώπου. Εντοπίζεται στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα και ιδιαίτερα στα παιδιά

που είναι οι κυριότεροι φορείς (Li et al., 2023) και η μετάδοσή του πραγματοποιείται μέσω αερολυμάτων και στενής επαφής (Isturiz et al., 2017). Είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο με λογχοειδές σχήμα (Dao and Rosch, 2021) και εμφανίζεται κυρίως με τη μορφή ζευγών κόκκων (διπλοκόκκων) (Greenwood D., 2016), ενώ δεν παρουσιάζει κίνηση ούτε είναι σπορογόνο (Dao and Rosch, 2021). Στις βακτηριακές καλλιέργειες σε αιματούχο άγαρ παρουσιάζει εικόνα β- αιμόλυσης (Greenwood D., 2016).

Ο πνευμονιόκοκκος εμφανίζει γενετική ποικιλομορφία η οποία αποδεικνύεται και από το διαχωρισμό του με βάση τους οροτύπους του, από τους οποίους άλλοι μοιάζουν γενετικά και άλλοι όχι (Elberse et al., 2011). Άλλο ένα χαρακτηριστικό του είναι η αδυναμία σύνθεσης ορισμένων αμινοξέων και η παραγωγή ενέργειας μέσω της ζύμωσης υδατανθράκων και φωσφορυλίωσης (Härtel et al., 2012).

Ο *S. pneumoniae* μπορεί να απομονωθεί από αρκετά βιολογικά υλικά όπως αίμα, πτύελα και εκκρίσεις του αναπνευστικού. Πέρα από τις συμβατικές μεθόδους ταυτοποίησης στο εργαστήριο, μπορεί να ανιχνευθεί με ανοσοχημικές και μοριακές τεχνικές (Enright and Spratt, 1998)

#### 1.1.2.1 Λοιμογόνοι παράγοντες του *S. pneumoniae*

Μέχρι τώρα έχουν ανακαλυφθεί πολλοί και ποικίλοι τρόποι προσκόλλησης και λοίμωξης από *S. pneumoniae*, οι οποίοι διαφέρουν ανάλογα με την περιοχή την οποία προσβάλλουν (Loughran et al., 2019). Όμως η εγκαθίδρυση του πνευμονιοκόκκου στα όργανα/ ιστούς που προσβάλλει (πνεύμονες, αίμα, μέσος ους, κεντρικό νευρικό σύστημα, άλλα όργανα) δεν εξαρτάται μόνο από το βακτήριο αλλά και από τον ίδιο τον ξενιστή (Marquart, 2021). Μέχρι στιγμής έχουν ενοχοποιηθεί πολλές από τις πρωτεΐνες που εκφράζονται στο βακτήριο αλλά και ορισμένες δομές του.

Τα ινίδια του *S. pneumoniae* είναι δομές που αποτελούνται από υπομονάδες πιλίνης, συναντώνται στο κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου (Miao et al., 2023) και συνδέονται μεταξύ τους με ομοιοπολικό δεσμό (Dzaraly et al., 2020; Miao et al., 2023). Συμβάλλουν στην εισβολή του βακτηρίου στους ιστούς του ξενιστή, στον αποικισμό του αλλά και την προστασία τους από το ανοσοποιητικό (Dzaraly et al., 2020; Miao et al., 2023). Διακρίνονται δύο είδη ινιδίων, τα ινίδια τύπου I και τα ινίδια τύπου II, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους γονιδιακά και πρωτεϊνικά (Dzaraly et al., 2020). Έχει βρεθεί ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν τα ινίδια δεν είναι σταθερά γενετικά στοιχεία, και για τον λόγο αυτό στα βακτηριακά στελέχη συναντώνται είτε και τα δύο είδη ινιδίων ταυτόχρονα, είτε το ένα από τα δύο ή ακόμα και κανένα είδος ινιδίων (Miao et al., 2023).

Τα ινίδια τύπου I είναι απαραίτητα για τη λοιμογονικότητα του βακτηρίου (*Dzaraly et al., 2020*), ενώ είναι τα πιο διαδεδομένα και εντοπίζονται σε όλη την επιφάνεια του βακτηρίου (*Miao et al., 2023*). Τα ινίδια τύπου II αποτελούνται σε μεγάλο βαθμό από την πρωτεΐνη *PitB*. Έχει παρατηρηθεί πως τα ινίδια του πνευμονιοκόκκου εμφανίζονται συχνότερα σε στελέχη που καλύπτονται από τα εμβόλια. Επιπλέον συνδέονται με την μικροβιακή αντοχή καθώς παρατηρήθηκε πως τα στελέχη που έφεραν ινίδια παρουσίαζαν ταυτόχρονη αντοχή σε αντιβιοτικά (*Dzaraly et al., 2020; Miao et al., 2023*), ενώ αξίζει να αναφερθεί πως τα ινίδια αποτελούν χρήσιμο στοιχείο για την παραγωγή εμβολίων έναντι του βακτηρίου (*Miao et al., 2023*).

Πέραν των ινιδίων του, όμως, ο πνευμονιόκοκκος διαθέτει πρωτεΐνες οι οποίες τον βοηθούν να διαφεύγει ή να τροποποιεί την ανοσολογική απόκριση. Διαφορετικές πρωτεΐνες δρουν ανάλογα με το σημείο της λοίμωξης. Παράδειγμα αποτελούν η πνευμολυσίνη (*ply*) η οποία συνδέεται με πνευμονική λοίμωξη, και η *PspA* και το πολυσακχαριδικό καψίδιο τα οποία συνδέονται με λοίμωξη στο αίμα. Επιπλέον προστατεύεται από τη φαγοκυττάρωση και την επαφή με παγίδες ουδετερόφιλων χάρη στην κάψουλα που διαθέτει (*Marquart, 2021*). Ωστόσο, μόνο ένα μικρό ποσοστό των φορέων πνευμονιοκόκκου, παρουσιάζει διεισδυτική νόσο (*Hava and Camilli, 2002*).

Οι πρωτεΐνες του *S. pneumoniae* παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών, όπως να:

- ευνοούν τη δέσμευση των κυττάρων ξενιστών, λ.χ. διάσπαση της πρωτεΐνης IgA1
- ευνοούν την προσκόλληση του πνευμονιοκόκκου στα επιθηλιακά κύτταρα
- συμβάλλουν στον αποικισμό του βακτηρίου, όπως οι επιφανειακές πρωτεΐνες δέσμευσης της χολίνης (choline-binding proteins, Cbp) και συγκεκριμένα η CbpG, η ClpP (συμμετέχει σε όλα τα στάδια αποικισμού)
- διασπών ανοσοσφαιρίνες, πρωτεΐνη IgA1
- διαπερνούν τον αιματικό φραγμό, ZmpB, και συμβάλλουν στην πρόκληση σηψαιμίας CbpG
- εμποδίζουν την οψωνινοποίηση, CppA, PepO, PhtA συνδυαστικά με άλλες πρωτεΐνες *Pht* (*Marquart, 2021*)

Ωστόσο, ίσως από τους σημαντικότερους λοιμογόνους παράγοντες του βακτηρίου αποτελεί το πολυσακχαριδικό καψίδιο του πνευμονιοκόκκου, για το οποίο αξίζει να γίνει αναφορά σε ξεχωριστή ενότητα (βλ ενότητα 1.2, παράγραφοι 1.2.2.1 & 1.2.2.2).

## 1.2 Ταυτοποίηση και τυποποίηση του *S. pneumoniae*

### 1.2.1 Ταυτοποίηση *S. pneumoniae*

Η ταυτοποίηση του πνευμονιοκόκκου μπορεί να γίνει είτε με συμβατικές μεθόδους, που περιλαμβάνουν την καλλιέργεια του βακτηρίου, την αναστολή ανάπτυξης του σε περιβάλλον με οπτοχίνη, αλλά και την τυποποίησή του ανοσολογικά. Πέραν των κλασικών μεθόδων, ο *S. pneumoniae* μπορεί να ανιχνευθεί και με μοριακές μεθόδους, που εξοικονομούν χρόνο και παρουσιάζουν μεγαλύτερη εξειδίκευση.

#### 1.2.1.1 Συμβατικές μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησης του *S. pneumoniae*

Η αρχική ταυτοποίηση του *S. pneumoniae* βασίζεται στην απομόνωση του βακτηρίου και την ανάπτυξή του σε αιματούχο άγαρ. Στο θρεπτικό υλικό το βακτήριο παίρνει συνήθως χαρακτηριστική μορφή που μοιάζει είτε με «κουμπί» είτε με βλεννώδες υλικό (*Sadowy and Hryniewicz, 2020*). Αυτή η μορφολογία εξαρτάται και από τον ορότυπο του εκάστοτε στελέχους.

Πέραν της χαρακτηριστικής του μορφολογίας η βασική μικροβιολογική εξέταση που πραγματοποιείται είναι ο έλεγχος ευαισθησίας του στην οπτοχίνη, ο έλεγχος της διαλυτότητάς του σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, και η αντίδραση Quellung (*Mundy et al., 1998; Sadowy and Hryniewicz, 2020*). Η εξέταση της διαλυτότητας σε χολή δεν είναι χαρακτηριστική μόνο για τον πνευμονιόκοκκο καθώς έχει βρεθεί πως και άλλα βακτήρια της ομάδας *Streptococcus mitis* εμφανίζουν θετικό αποτέλεσμα στη συγκεκριμένη αντίδραση (*Kaijalainen et al., 2002; Sadowy and Hryniewicz, 2020*). Άλλες βιοχημικές μέθοδοι ταυτοποίησης περιλαμβάνουν την εξέταση βιολογικών υλικών των προσβεβλημένων ασθενών όπως το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) σε περίπτωση μηνιγγίτιδας, και το αίμα σε περίπτωση διάχυτης πνευμονοκοκκικής λοίμωξης. Η εργαστηριακή εικόνα της πρώτης λοίμωξης αντιστοιχεί σε υψηλή τιμή λευκώματος, χαμηλή τιμή γλυκόζης και εντοπισμό λευκών αιμοσφαιρίων, κυρίως πολυμορφοπύρηνων ουδετερόφιλων, και της δεύτερης σε υψηλό αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων και γ- αντιδρώσας πρωτεΐνης (c-reactive protein, CRP) (*Poplin et al., 2020*).

Τέλος, ένας ακόμη τρόπος ταυτοποίησης του *S. pneumoniae* είναι η συγκόλληση με σωματίδια latex (latex agglutination test), σκοπός της οποίας είναι η ανίχνευση του καψιδίου του βακτηρίου χάρη στην ανίχνευση του καψιδιακού αντιγόνου. Η συγκεκριμένη δοκιμασία παρουσιάζει τα ίδια μειονεκτήματα με την μέθοδο της οροσυγκόλλησης, αλλά εμφανίζει το πλεονέκτημα της εφαρμογής απευθείας σε κλινικά δείγματα, χωρίς να είναι απαραίτητη η απομόνωση του βακτηρίου (*Sadowy and Hryniewicz, 2020*).

### 1.2.1.2 Μοριακές τεχνικές ταυτοποίησης του *S. pneumoniae*

Οι μοριακές τεχνικές περιλαμβάνουν τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR, polymerase chain reaction). Αυτές βασίζονται συνήθως στην ανίχνευση ενός γονιδίου το οποίο είναι χαρακτηριστικό για το είδος του βακτηρίου. Τέτοια γονίδια αποτελούν τα: *ply* (γονίδιο για το σχηματισμό της εξωκυτταρικής τοξίνης πνευμονολυσίνη), *lytA* (κύρια αυτολυσίνη του πνευμονιοκόκκου, του επιτρέπει τη διαλυτότητα του στη χολή) και το *psaA* (υπεύθυνο για την έκφραση του αντιγόνου επιφανείας *psaA*) (Gillespie et al., 1994; Morrison et al., 2000; Virolainen et al., 1994).

Άλλες τεχνικές ταυτοποίησης του βακτηρίου είναι η αλληλούχιση κατά Sanger και η τεχνικές που ταυτοποιούν ταυτόχρονα πολλαπλά γονίδια που ανιχνεύονται στο γονιδίωμα *S. pneumoniae*, τα οποία έχουν κριθεί αναγκαία για την κάλυψη των αναγκών του βακτηρίου και για το λόγο αυτό δεν υφίστανται συχνές μεταλλάξεις (house-keeping genes) (Sadowy and Hryniewicz, 2020).

#### 1.2.1.2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης- Βασικές αρχές

Σκοπός της μεθόδου είναι η ενίσχυση, δηλαδή η δημιουργία πολλών αντιγράφων, ενός αρχικού μορίου νουκλεϊκού οξέος, και συγκεκριμένα DNA όσον αφορά τη συμβατική PCR. Το αρχικό μόριο αποτελεί το πρότυπο από το οποίο θα προκύψουν όλα τα θυγατρικά μόρια (αντίγραφα).

Προκειμένου να ξεκινήσει η διαδικασία χρειάζεται να αποδιαταχθεί το αρχικό μόριο DNA. Η αποδιάταξη πραγματοποιείται στους 94-98C (Lorenz, 2012). Χάρη στην αποδιάταξη είναι διαθέσιμοι πλέον δύο μονοί κλώνοι DNA, καθένας από τους οποίους μπορεί να αποτελέσει ένα πρότυπο μόριο προς αντιγραφή. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντιγραφή είναι απαραίτητα κάποια ειδικά μόρια, οι εκκινητές (primers), οι οποίες είναι ειδικά σχεδιασμένες αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδικών βάσεων. Κάθε εκκινητής (primer) είναι συμπληρωματικός προς τον αντίστοιχο κλώνο DNA και ειδικός για το συγκεκριμένο τμήμα του γονιδιώματος που θέλουμε να ενισχύσουμε.

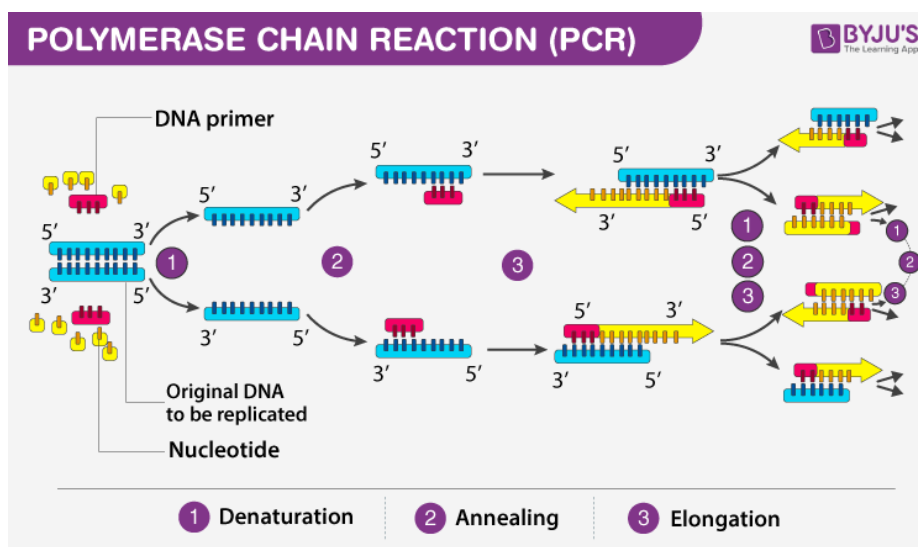
Η ένωση των εκκινητικών μορίων με τους αρχικούς κλώνους DNA επιτυγχάνεται κατά το στάδιο του υβριδισμού. Η θερμοκρασία υβριδισμού δεν είναι καθολική για όλες τις αντιδράσεις αλλά εξαρτάται από το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιείται κάθε φορά, καθώς το κάθε εκκινητικό μόριο έχει τη δική του χαρακτηριστική θερμοκρασία υβριδισμού. Σκοπός είναι η επιλογή μίας θερμοκρασίας στην οποία θα δρουν βέλτιστα και οι δύο primers.

Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την επιμήκυνση των εκκινητικών μορίων συμπληρωματικά στους κλώνους του DNA και κατά συνέπεια τη σύνθεση των νέων κλώνων. Απαραίτητο μόριο για την επιμήκυνση αποτελεί το ένζυμο της DNA πολυμεράσης. Η DNA πολυμεράση πρέπει να είναι θερμοανθεκτική ώστε να μην αποδιατάσσεται αλλά ταυτόχρονα να μπορεί να μείνει λειτουργική στις θερμοκρασίες των διαφόρων σταδίων και επαναλήψεων της PCR. Με τη λήξη αυτού του βήματος, προκύπτουν δύο νέα θυγατρικά μόρια ταυτόσημα με το μητρικό. Ακολουθεί η επανάληψη των παραπάνω σταδίων για όσες φορές κρίνεται απαραίτητο, ανάλογα με την επιμέρους δοκιμασία αλλά και την επιθυμητή ένταση των προϊόντων, ώστε με τη λήξη της διαδικασίας να λάβουμε το επιθυμητό προϊόν (*Garibyan and Avashia, 2013*).

Ως τελικό στάδιο, ορίζεται ένα χρονικό διάστημα εκτεταμένης επιμήκυνσης κατά το οποίο ολοκληρώνονται ημιτελή αντίγραφα (*Lorenz, 2012*).

Η παραπάνω αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμικό κυκλοποιητή ο οποίος ρυθμίζεται κατάλληλα ως προς τις θερμοκρασίες, τη χρονική διάρκεια αλλά και τις επαναλήψεις του κάθε σταδίου (*Lorenz, 2012*).

Εικόνα 1. Απεικόνιση σταδίων αποδιάταξης- υβριδισμού- επιμήκυνσης μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας δίκλωνου DNA. Πηγή φωτογραφίας από τον ιστότοπο (PCR -Principle, Steps, Types, Components And Applications Of PCR (byjus.com))



#### 1.2.1.2.2 Πολλαπλή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η διαδικασία της πολυπλεκτικής (multiplex) PCR (mPCR) ακολουθεί τις βασικές αρχές συμβατικής PCR. Η διαφορά που παρουσιάζει η συγκεκριμένη τεχνική, είναι πως επιτρέπει την ταυτόχρονη αντιγραφή παραπάνω του ενός γονιδίων. Έτσι προσφέρει μεγαλύτερη ταχύτητα αλλά και οικονομία στα αντιδραστήρια. Ωστόσο η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου ανίχνευσης πολλαπλών σημείων του γονιδιώματος ενός (μικρο)οργανισμού απαιτεί περισσότερες δοκιμασίες ώστε να βρεθούν οι κατάλληλες συγκεντρώσεις σε αντιδραστήρια και να διαμορφωθούν οι κατάλληλες συνθήκες ώστε να λειτουργούν βέλτιστα τα εκκινητικά μόρια για κάθε επιθυμητή περιοχή που θέλουμε να αντιγραφεί (*Adzitey et al., 2013*).

#### 1.2.1.2.3 Touchdown PCR (TD PCR)

Τόσο η συμβατική όσο και η touchdown PCR έχουν ως σκοπό την παραγωγή επιθυμητών προϊόντων και την αποφυγή ενίσχυσης διαφορετικών από των επιθυμητών αλληλουχιών. Η Touchdown PCR διαφέρει ως προς τη συμβατική στον τρόπο επίλυσης της παραγωγής μη ειδικών προϊόντων. Στη συμβατική PCR αυτό το πρόβλημα επιλύεται με την προσαρμογή της συγκέντρωσης των αντιδραστηρίων σε μία βέλτιστη ισορροπία, έτσι ώστε να ενισχύουν την παραγωγή μόνο των ειδικών προϊόντων. Η νοοτροπία αντιμετώπισης του συγκεκριμένου προβλήματος στην TD PCR είναι η αλλαγή (σταδιακή μείωση) της θερμοκρασίας υβριδισμού. Ενώ η συμβατική PCR έχει ως θερμοκρασία υβριδισμού μία θερμοκρασία ενδιάμεση στις θερμοκρασίες  $T_m$  του κάθε primer, η TD PCR ξεκινάει με μία υψηλότερη θερμοκρασία από τις θερμοκρασίες τήξης των εκκινητικών μορίων στους πρώτους κύκλους, η οποία μειώνεται στους επόμενους κύκλους αντιγραφής και φτάνει στο επιθυμητό επίπεδο. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η αποφυγή μη ειδικών προϊόντων κατά τους πρώτους κύκλους πολλαπλασιασμού της επιθυμητής αλληλουχίας, και η ενίσχυση του σχηματισμού των ειδικών κατά το δεύτερο στάδιο της αντίδρασης (*Hecker and Roux, 1996*).

Η TD PCR αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την εφαρμογή της τεχνικής απευθείας στα κλινικά δείγματα, καθώς με τον συνδυασμό υψηλής ειδικότητας και ευαισθησίας η συγκεκριμένη τεχνική μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό εργαλείο για την εφαρμογή της PCR απευθείας σε αυτά.



## 1.2.2 Τυποποίηση *S. pneumoniae*

### 1.2.2.1 Γενικές πληροφορίες για το πολυσακχαριδικό καψίδιο

Ένα πολύ σημαντικό στοιχείο του πνευμονιοκόκκου αποτελεί το πολυσακχαριδικό καψίδιο, το οποίο καθορίζει τον ορότυπο του. Πλέον έχουν βρεθεί 100 ορότυποι (*Ganaie et al., 2020; Geno, et al., 2015*), οι οποίοι επηρεάζουν τη μολυσματικότητα του βακτηρίου και την ανταπόκρισή του στα αντιβιοτικά (*Dobay, 2019*). Οι ορότυποι αναγράφονται με αραβικούς αριθμούς και λατινικούς κεφαλαίους χαρακτήρες, όταν χρειάζεται να γίνει περαιτέρω κατηγοριοποίησή τους. Μία από τις χρησιμότητες του καψιδίου είναι ο περαιτέρω διαχωρισμός του πνευμονιοκόκκου με βάση την ύπαρξη ή όχι αυτού (*Paton and Trappeti, 2019*).

Αναφέρεται ότι η πλειοψηφία των στελεχών που δεν φέρουν το καψίδιο δεν προκαλούν λοίμωξη και επιπλέον στελέχη των οποίων ο ορότυπος δεν μπορεί να ταυτοποιηθεί έχουν συσχετιστεί με λοιμώξεις του μέσου ωτός (*Paton and Trappeti, 2019*). Τέλος, βάσει των οροτύπων έχουν δημιουργηθεί συζευγμένα εμβόλια του πνευμονιοκόκκου έναντι αυτών (*Li et al., 2023*).

### 1.2.2.2 Ορότυπος και παθογένεια

Το πολυσακχαριδικό καψίδιο επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη μολυσματικότητα του πνευμονιοκόκκου, αλληλοεπιδρώντας με το συμπλήρωμα με τέτοιο τρόπο ώστε να προστατεύεται από την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή και να αποδρά της φαγοκυττάρωσης. Επίσης το καψίδιο συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό και την προσκόλληση του βακτηρίου, και περιορίζει το βαθμό αλληλεπίδρασής με τα αντιβιοτικά (*Mitchell and Mitchell, 2010; Paton and Trappeti, 2019*).

Το εν λόγω καψίδιο αποτελεί την εξωτερική επιφάνεια του πνευμονιοκόκκου και συνήθως είναι συνδεδεμένο με την πεπτιδογλυκάνη του κυτταρικού τοιχώματος. Διακρίνονται δύο τύποι πολυσακχαριδικών καψιδίων: τα απλά μόρια και τα δομικά σύνθετα. Η πρώτη κατηγορία συντίθεται από ένα ή δύο μονομερή, που συνθέτουν το πολυμερές, και σχηματίζουν ένα γραμμικό μόριο. Στη δημιουργία των σύνθετων μορίων μπορούν να συμμετέχουν από 1-6 μονοσακχαρίτες οι οποίοι επαναλαμβάνονται, ενώ επιπλέον αποτελούν διακλαδισμένα πολυμερή καθώς φέρουν και πλευρικές αλυσίδες (*Paton and Trappeti, 2019*).

Έχει παρατηρηθεί πως δεν έχουν όλοι οι ορότυποι την ίδια κλινική σημασία, ενώ διαφορετικοί ορότυποι σχετίζονται με διαφορετικές λοιμώξεις (*Hausdorff et al., 2000*). Συγκεκριμένα στην Ελλάδα δεδομένα από έρευνες έδειξαν πως στον παιδιατρικό πληθυσμό



οι ορότυποι 14, 19F, 6B, 18C, 3, 1 και 23F ήταν υπεύθυνοι για τα περισσότερα περιστατικά διάχυτων πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων (IPD, Invasive Pneumococcal Disease) και οξείας μέσης ωτίτιδας, με την προσθήκη του οροτύπου 19A (*Levidiotou et al., 2006; Zissis et al., 2004*). Ωστόσο αυτά τα δεδομένα αφορούν την περίοδο πριν την εισαγωγή των συζευγμένων πνευμονιοκοκκικών εμβολίων (PCVs, Pneumococcal Conjugate Vaccines) στο Εθνικό Πρόγραμμα Εμβολιασμών, τα οποία συνέβαλαν και στην ένταξη του εμβολίου σε αυτό (βλ. παράγραφο 1.2.2.3).

#### 1.2.2.2.1 Ορότυπος 19Α- Γενικά επιδημιολογικά χαρακτηριστικά

Ο ορότυπος 19Α παρουσιάζει μεγάλο κλινικό ενδιαφέρον καθώς έχει αυξημένη συχνότητα εμφάνισης και μεγάλη μικροβιακή αντοχή (*Isturiz et al., 2017; Kaplan et al., 2004; Moore et al., 2008*).

Σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Ελλάδα σε παιδιά που έπασχαν από διάχυτη πνευμονοκοκκική λοίμωξη ή από απλούστερες λοιμώξεις που είχαν προκληθεί από τον *S. pneumoniae*, κατά το διάστημα 1986-2015, προέκυψε πως ο ορότυπος 19Α ήταν υπεύθυνος για το 11,2% των περιστατικών. Συγκεκριμένα αποτέλεσε τον κυριότερο ορότυπο που απομονώθηκε από ωτικά υγρά ασθενών, στο 55,23% των περιπτώσεων, ενώ σαν σύνολο κρουσμάτων παρατηρήθηκε πως εμφάνιζε αύξουσα πορεία με κορύφωση το 2009. Από το 2009 έως το 2015 η συχνότητα εμφάνισης του μειώθηκε αλλά παρέμεινε υψηλότερη σε σχέση με το διάστημα 1986-2005. Επίσης παρατηρήθηκε πως η αντοχή του οροτύπου στα αντιβιοτικά φάρμακα αυξανόταν πλησιάζοντας προς το 2015, με το μεγαλύτερο ποσοστά αντοχής να καταγράφονται κατά το διάστημα 2011-2015, και συγκεκριμένα 80% στην ερυθρομυκίνη και 50,7% στην πενικιλίνη G (*Koutouzis et al., 2018*).

Σύμφωνα με άλλη επιδημιολογική έρευνα στη χώρα μας παρατηρήθηκε πως ο ορότυπος 19Α ήταν ο κυριότερος αποικιστικός ορότυπος στα παιδιά (*Grivea et al., 2014*), και ο δεύτερος πιο συχνός σε περιστατικά μηνιγγίτιδας ανεξαρτήτως της ηλικίας των ασθενών, κατά το διάστημα 2010-2022 (*Xirogianni et al., 2022*).

#### 1.2.2.3 Ορότυπος και εμβόλια

Για την εξάλειψη και την προστασία από *S. pneumoniae* υπάρχουν εμβόλια. Τα πρώτα εμβόλια, που αναπτύχθηκαν πριν την εποχή των αντιβιοτικών περιείχαν ολόκληρο το βακτήριο το οποίο είχε προηγουμένως απενεργοποιηθεί. Αυτά χορηγούνταν κυρίως σε ζώα και τα αντισώματα που παράγονταν από τα ζώα χορηγούνταν στη συνέχεια σε ανθρώπους

οι οποίοι είχαν ήδη προσβληθεί από τον *S. pneumoniae* (Siber, 1994). Η μεταγενέστερη τεχνολογία εμβολίων χρησιμοποιούσε ως αντιγόνο το πολυσακχαριδικό καψίδιο του πνευμονιοκόκκου, με αποτέλεσμα τη δημιουργία των πολυσακχαριδικών εμβολίων (PPSV, Pneumococcal Polysaccharide Vaccines). Τα πολυσακχαριδικά εμβόλια που κυκλοφόρησαν ευρέως ήταν δύο: το πρώτο, PPSV14, προσέφερε κάλυψη έναντι 14 οροτύπων και κυκλοφόρησε το 1977, ενώ το δεύτερο, PPSV23, είχε έτος κυκλοφορίας το 1988 και παρείχε κάλυψη σε 23 ορότυπους (βλ. πίνακα 1) και ήταν περισσότερο διαδεδομένο σε σχέση με το PPSV14 ορότυπους (Daniels et al., 2016). Ωστόσο τα συγκεκριμένα εμβόλια δεν ήταν ικανά να προκαλέσουν επαρκή ανοσολογική απόκριση σε παιδιά και ευπαθείς ομάδες και για το λόγο αυτό δημιουργήθηκαν εμβόλια που περιέχουν τα αντιγόνα του καψιδίου συζευγμένα με πρωτεΐνες (polysaccharide conjugate vaccines, PCVs). Αυτά πέραν της καλύτερης κάλυψης που παρέχουν στους εμβολιασμένους, συμβάλλουν και στην προστασία του ευρύτερου πληθυσμού (ανοσία της αγέλης) διότι συνεισφέρουν στη μείωση της μετάδοσης (Paton and Trappeti, 2019).

Τα συζευγμένα πολυσακχαριδικά εμβόλια που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι: το 7-δύναμο (PCV-7) με έτος κυκλοφορίας το 2000, το 10-δύναμο (PCV-10) και το 13-δύναμο (PCV-13) με έτος κυκλοφορίας το 2010 και 2011 που περιείχαν αντίστοιχα 3 και 6 οροτύπους σε σχέση με το PCV7 (Tsang, 2021), το 15-δύναμο (PCV-15) με έτος κυκλοφορίας 2020 και κάλυψη σε 2 επιπλέον οροτύπους από το PCV13, ενώ έχει κυκλοφορήσει και το 20-δύναμο εμβόλιο (PCV-20) το οποίο προσφέρει προστασία από 20 συνολικά οροτύπους και εγκρίθηκε από τον οργανισμό διαχείρισης τροφίμων και φαρμάκων των Η.Π.Α. (U.S. Food and Drug Administration, FDA) για χρήση στον παιδιατρικό πληθυσμό το 2023 (Shirley, 2023).

Αξίζει να αναφερθεί ότι το PCV-13 έχει θεωρηθεί σημαντικό εμβόλιο για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων από πνευμονιόκοκκο (Jansen and Anderson, 2018), κάτι που πιθανά να εξηγείται από το γεγονός ότι τα προηγούμενα εμβόλια ίδιας τεχνολογίας στόχευαν στους οροτύπους που είχαν επικρατήσει έπειτα από «πίεση επιλογής» λόγω χρήσης αντιβιοτικών (Du et al., 2021).

Οι ορότυποι για τους οποίους προσφέρουν κάλυψη τα παραπάνω εμβόλια αναγράφονται αναλυτικά στον πίνακα 1.

Πίνακας 1. Ορότυποι που καλύπτονται από τα διαθέσιμα εμβόλια έναντι του *S. pneumoniae*. Πηγές: [Vaxneuvance | European Medicines Agency \(EMA\) \(europa.eu\)](#), [Apexxnar suspension for injection in pre-filled syringe - Summary of Product Characteristics \(SmPC\) - \(emc\) \(medicines.org.uk\)](#), (Tsang, 2021)

	1	3	4	5	6A	6B	7F	9V	14	18C	19A	19F	23F	22F	33F	8	10A	11A	12F	15B	2	9N	17F	20	
PCV7			•			•		•	•	•		•	•												
PCV10	•		•	•		•	•	•	•	•		•	•												
PCV13	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•												
PCV15	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•										
PCV 20	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•					
PPSV 23	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•

#### 1.2.2.3.1. Εμβολιασμός έναντι του *S. pneumoniae* στην Ελλάδα

Το Εθνικό Πρόγραμμα Εμβολιασμών της Ελλάδας, ήδη από το 2004 είχε συμπεριλάβει το επταδύναμο συζευγμένο πολυσακχαριδικό εμβόλιο (PCV-7) έναντι του πνευμονιοκόκκου στη λίστα με τα εμβόλια που πρέπει να χορηγούνται σε παιδιά και ευαίσθητες κοινωνικές ομάδες. Το PCV-7 αντικαταστάθηκε από το PCV-10 το 2009 και αυτό με τη σειρά του αντικαταστάθηκε το 2010 από το PCV-13. (Grivea et al., 2014). Από το 2023 προτείνεται η χορήγηση είτε του PCV-13 είτε του PCV-15 στον παιδιατρικό πληθυσμό ([Τροποποιημένο Εθνικό Πρόγραμμα Εμβολιασμών Παιδιών και Εφήβων 2023 - Εθνικό Πρόγραμμα Εμβολιασμών \(ΕΠΕ\) παιδιών και εφήβων - Υπουργείο Υγείας \(moh.gov.gr\)](#)). Επιπλέον, πρέπει να αναφερθεί πως προβλέπεται και η χορήγηση του πολυσακχαριδικού εμβολίου PPSV23 αλλά αφορά μόνο παιδιά ηλικίας δύο ετών και άνω, και τα οποία ανήκουν σε ομάδα αυξημένου κινδύνου πνευμονιοκοκκικής λοίμωξης ([Εθνικό Πρόγραμμα Εμβολιασμών \(ΕΠΕ\) παιδιών και εφήβων - Υπουργείο Υγείας \(moh.gov.gr\)](#)).

Όσον αφορά τους ενήλικες, προβλέπεται να εμβολιάζονται άτομα ηλικίας 19-64 ετών τα οποία ανήκουν σε ομάδα αυξημένου κινδύνου. Σε αυτά χρειάζεται να γίνεται ανοσοποίηση και με τα δύο είδη εμβολίων: συζευγμένων και πολυσακχαριδικό. Αντιθέτως, στα άτομα ηλικίας >65 ετών συνίσταται η χορήγηση μόνο του πολυσακχαριδικού PPSV23 εμβολίου, 5 έτη μετά την τελευταία δόση ([Εθνικό Πρόγραμμα Εμβολιασμών \(ΕΠΕ\) Ενηλίκων - Υπουργείο Υγείας \(moh.gov.gr\)](#)). Τέλος, από το 2023 έχει προστεθεί και το εμβόλιο PCV-20 στον εμβολιασμό τους ([Εθνικό Πρόγραμμα Εμβολιασμών Ενηλίκων 2023 - Εθνικό Πρόγραμμα Εμβολιασμών \(ΕΠΕ\) Ενηλίκων - Υπουργείο Υγείας \(moh.gov.gr\)](#)).

#### 1.2.2.4 Οροτυπική αντικατάσταση- “serotype replacement”

Η εφαρμογή των συζευγμένων πνευμονοκοκκικών εμβολίων είχε ως αποτέλεσμα ένα φαινόμενο που ονομάστηκε «οροτυπική αντικατάσταση» (“serotype replacement”), κατά το οποίο αυξήθηκε η εμφάνιση οροτύπων που δεν περιλαμβάνονταν στο εμβόλιο και που προηγουμένως δεν συναντώνταν τόσο συχνά (Du et al., 2021).

Η εμφάνιση διαφορετικών οροτύπων του *S. pneumoniae* επηρεάζεται από πληθώρα παραγόντων όπως: η ηλικία, η γεωγραφική θέση των ατόμων, η κάλυψη που παρέχεται από τα εφαρμοζόμενα εμβόλια (Du et al., 2021; Li et al., 2023) και το είδος του πνευμονιοκόκκου, λοιμογόνος ή αποικιστικός αλλά και από το βαθμό ικανότητας λοίμωξης των οροτύπων (Li et al., 2023).

Οι ορότυποι οι οποίοι δεν συμπεριλαμβάνονται στα συζευγμένα PCV εμβόλια, αυξήθηκαν σε μεγάλο ποσοστό στις περισσότερες ηπείρους μετά την εφαρμογή του PCV-13, με την Ευρώπη να κατέχει την 1<sup>η</sup> θέση στις καταγραφές (*Du et al., 2021*).

Δύο είναι οι θεωρίες που επικρατούν για την εμφάνιση οροτύπων που δεν καλύπτονται από τα εμβόλια (NON-PCV ορότυποι) σε συνάρτηση με τη χρήση αντιβιοτικών:

1. Οι NON-PCV ορότυποι είναι ανθεκτικοί στα αντιβιοτικά οπότε αυτή η ιδιότητα σε συνδυασμό με τον περιορισμό των PCV οροτύπων (δηλαδή αυτών που καλύπτονται από τα εμβόλια PCVs) έπειτα από την εφαρμογή των συζευγμένων εμβολίων τους επέτρεψε αυξήσουν τη συχνότητα εμφάνισής τους.

2. Οι NON-PCV ορότυποι είναι ανθεκτικοί στα αντιβιοτικά ενώ οι PCV ορότυποι είναι ευαίσθητοι οπότε η αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών οδήγησε στη μείωση της 2<sup>ης</sup> κατηγορίας και στην αύξηση της 1<sup>ης</sup>, χωρίς να εμπλέκονται ιδιαίτερα τα συζευγμένα εμβόλια.

Όσον αφορά την μετατροπή των PCV οροτύπων σε NON-PCV, αυτή γίνεται στο ρινοφάρυγγα όπου συνυπάρχουν παραπάνω του ενός στελέχη. Αυτά μπορούν να ανταλλάξουν το γενετικό τους υλικό με οριζόντιο τρόπο, με αποτέλεσμα τα στελέχη είτε να αποκτούν καινούριο πολυσακχαριδικό καψίδιο είτε να γίνονται περισσότερο μολυσματικά. Η αλλαγή του καψιδίου (capsular switching) μπορεί να γίνει λόγω μετάλλαξης στη γενετική θέση του καψιδίου που ωστόσο αποτελεί σπάνιο συμβάν για την Ευρώπη (*Du et al., 2021*).

#### 1.2.2.4.1 Αποτελέσματα οροτυπικής αντικατάστασης

Μετά την εφαρμογή των συζευγμένων πνευμονοκοκκικών εμβολίων, και ιδιαίτερα του PCV-13, παρατηρήθηκε μείωση των περιστατικών διάχυτης πνευμονοκοκκικής νόσου (IPD, invasive pneumococcal disease), δηλαδή μηνιγγίτιδα, σηψαιμία και πνευμονία που οφειλόταν στους οροτύπους που καλύπτονταν από το συγκεκριμένο εμβόλιο.

Στη Γαλλία, ωστόσο, κατά το διάστημα 2015-2017 παρατηρήθηκε αύξηση των κρουσμάτων μηνιγγίτιδας και γενικότερη αύξηση των IPD λοιμώξεων οφείλονταν σε οροτύπους που δεν καλύπτονταν από το PCV-13 (*Ouldali et al., 2021*).

Παρομοίως, σε περιστατικά μηνιγγίτιδας στην Ελλάδα παρατηρήθηκε μία τάση αύξησης εμφάνισης των οροτύπων που δεν καλύπτονται από τα συζευγμένα εμβόλια. Επίσης, διαφορετικός ορότυπος που ήταν υπεύθυνος για τη συγκεκριμένη λοίμωξη ανάλογα με την ηλικιακή ομάδα των ασθενών (*Xirogianni et al., 2022*).

#### 1.2.2.4.2 Παγκόσμια διασπορά οροτύπων

Σύμφωνα με έρευνα των Li *et al.*, παρατηρήθηκε ότι πριν την συστηματική εφαρμογή των συζευγμένων πνευμονοκοκκικών εμβολίων οι ορότυποι που επικρατούσαν ήταν κυρίως αυτοί που καλύπτονται από το 13-δύναμο συζευγμένο πολυσακχαρδικό εμβόλιο, δηλαδή οι: 19A, 19F, 23F, 6B, 9V, 22F, 14, 6A, 9V, 1, 3, 5, και σε μικρότερη συχνότητα και γεωγραφική έκταση, εντοπίστηκαν ορισμένοι που δεν καλύπτονται από αυτό, όπως οι ορότυποι 4, 18, 18C, 7F. Μετά την εφαρμογή των εν λόγω εμβολίων παρατηρήθηκε αύξηση των οροτύπων οι οποίοι δεν συμπεριλαμβάνονται στα εμβόλια PCV, όπως οι 15A, 23A, 35B, 11A/D, 15B/C, 16F, 17F, 18C, 23B. Αξίζει όμως να αναφερθεί πως οι ορότυποι 19A, 3, 19F και 6B συνέχισαν να εμφανίζονται αλλά σε μικρότερο ποσοστό συγκριτικά με τον προ-PCV εποχή. Παράδοξο αποτελούν οι χώρες της Λατινικής Αμερικής, και συγκεκριμένα οι: Βραζιλία, Χιλή, Κολομβία, Αργεντινή αλλά και το Μεξικό και η Ουρουγουάη, στις οποίες η εμφάνιση του οροτύπου 19A όχι μόνο δεν περιορίστηκε αλλά αυξήθηκε σε σχέση με τις χρονιές πριν την εφαρμογή του PCV-13 (Li *et al.*, 2023).

#### 1.2.2.5 Μέθοδοι τυποποίησης του *S. pneumoniae* ως προς τον ορότυπο

Ο προσδιορισμός του οροτύπου του *S. pneumoniae* έχει μεγάλη κλινική σημασία καθώς προσδίδει στο βακτήριο χαρακτηριστικές ιδιότητες που αφορούν τη λοιμογονικότητά του, τη δυνατότητα να αποικίζει τον ανθρώπινο ρινοφάρυγγα αλλά και την προσβολή του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή (AlonsoDeVelasco *et al.*, 1995; Greenberg *et al.*, 2018). Μέχρι στιγμής έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνικές οι οποίες έχουν ως στόχο την τυποποίησή του πνευμονιοκόκκου με βάση το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό. Ίσως η πιο γνωστή συμβατική μέθοδος αποτελεί η αντίδραση Quellung κατά την οποία παρατηρείται η κάψα του βακτηρίου έντονα διαφοροποιημένη από το υπόλοιπο βακτήριο και διαθλούμενη. Η παρατήρηση αυτή γίνεται χάρη στη χρήση ειδικών αντι-ορών που είναι συγκεκριμένοι για κάθε ορότυπο του βακτηρίου (Mundy *et al.*, 1998). Επιπλέον για τον προσδιορισμό του οροτύπου μπορούν να πραγματοποιηθούν και ανοσολογικές μέθοδοι. Ωστόσο, οι συμβατικές μέθοδοι που περιλαμβάνουν χρήση συγκεκριμένων αντι-ορών για κάθε ορότυπο, δεν είναι ειδικές μόνο για τον *S. pneumoniae* καθώς δίνουν θετικό αποτέλεσμα και για άλλα είδη στρεπτοκόκκων, όπως *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* και *Streptococcus infantis* (Sadowy and Hryniewicz, 2020).

Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί και πολλές μοριακές μέθοδοι που εκτός από τη χρήση της συμβατικής PCR συνδυάζουν και τεχνικές πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων περιορισμού (restriction fragment length polymorphism, RFLP), τυποποίηση ακολουθίας

πολλαπλών γενετικών τόπων (Multi Locus Sequence Typing, MLST), μικροσυστοιχίες γονιδίων (DNA microarrays) και αλληλουχήσεις του γονιδιώματος του βακτηρίου (NGS, Next generation Sequencing και WGS, whole genome sequencing) (Geno, et al., 2015).

Τέλος έχουν αναπτυχθεί μοριακές τεχνικές οι οποίες ταυτοποιούν τον ορότυπο με βάση ένα γονίδιο που είναι καθοριστικό για αυτόν, το *wzh*, τόσο σε βακτηριακά στελέχη (Elberse et al., 2011) όσο και απευθείας σε κλινικά δείγματα (Marmaras et al., 2021).

### 1.3 Λοιμώξεις που προκαλούνται από τον *S. pneumoniae*

#### 1.3.1 Φορεία και παθογένεια *S. pneumoniae*

Οι λοιμώξεις που προκαλεί ο πνευμονιόκοκκος αφορούν διάφορα συστήματα του ανθρώπου, καθώς το βακτήριο είναι υπεύθυνο για λοιμώξεις όπως πνευμονία, μέση ωτίτιδα, μηνιγγίτιδα, σηψαιμία, βρογχίτιδα, αποστήματα, περικαρδίτιδα, και αυτές είναι μερικές μόνο από λοιμώξεις που προκαλεί (Marquart, 2021; Miao et al., 2023). Για τη μετάδοσή του απαιτείται η στενή επαφή ή μεταφορά αερολυμάτων (από έναν τον έναν ξενιστή στον επόμενο) (Marquart, 2021). Υποστηρίζεται πως ο συγχρωτισμός ή η επαφή με άτομα που βρίσκονται σε πολυσύχναστους χώρους, ευνοεί τον αποικισμό τους από *S. pneumoniae* (Syrogiannopoulos et al., 2001). Επιπλέον, η λοίμωξη έχει συνδεθεί με τον αποικισμό του βακτηρίου, χωρίς να είναι απαραίτητη η εκδήλωση λοίμωξης στα άτομα που αποικίζονται (Marquart, 2021).

Σε μεγαλύτερο κίνδυνο βρίσκονται τα άτομα με ευαίσθητο ανοσοποιητικό σύστημα, όπως τα μικρά παιδιά, οι ηλικιωμένοι και οι ανοσοκατεσταλμένοι (Li et al., 2023; Miao et al., 2023). Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι στα παιδιά το φαινόμενο του αποικισμού είναι 4 φορές μεγαλύτερο και για περισσότερο χρόνο σε σχέση με τους υγιείς ενήλικες. Επιπλέον, αποτελεί μια σημαντική αιτία θανάτου σε παιδιά ηλικίας μικρότερης των 5 ετών καθώς επίσης και στους ηλικιωμένους τόσο από μηνιγγίτιδα όσο και από σηψαιμία. Τέλος, πρέπει να αναφερθεί πως η φορεία του βακτηρίου ευνοείται από τις χαμηλές θερμοκρασίες (Loughran et al., 2019).

#### 1.3.2 *S. pneumoniae* και μηνιγγίτιδα

Ο *Streptococcus pneumoniae* είναι μία από τις βασικές αιτίες βακτηριακής μηνιγγίτιδας και συγκεκριμένα αποτελεί το κυριότερο παθογόνο στις ηλικιακές ομάδες των παιδιών και των ηλικιωμένων (Gil et al., 2022; Poplin et al., 2020). Τα συνήθη συμπτώματα που εμφανίζονται είναι πυρετός, δυσκαμψία του αυχένα, πονοκέφαλοι και φωτοφοβία. Η διάρκειά τους ποικίλλει ανάλογα με τη μορφή της νόσου, με πιο συχνή την οξεία η οποία



διαρκεί περίπου 5 μέρες και είναι συνήθως βακτηριακής προέλευσης, όπου τα συμπτώματα εμφανίζονται εντός 24 ωρών, προκαλώντας βαριά μορφή της συγκεκριμένης ασθένειας, καθώς το 20% των περιστατικών καταλήγει, ενώ το 50% των επιζώντων εμφανίζει κάποια νευρολογική πάθηση, συνήθως απώλεια ακοής (Poplin et al., 2020).

Ο τρόπος με τον οποίο εισβάλλει ο *S. pneumoniae* στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) αφορά την είσοδο μέσω του εγκεφαλικού φραγμού στην περίπτωση της μηνιγγίτιδας. Αυτή η είσοδος επηρεάζει τόσο το ίδιο το βακτήριο όσο και τους νευρώνες, καθώς τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα αλλά και ορισμένοι τοξικοί φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές οδηγούν σε απόπτωση των νευρώνων και βλάβη ορισμένων νευρώνων που δεν έχουν τη δυνατότητα του αναδιπλασιασμού, γεγονός που συμβάλλει στη νοσηρότητα και θνησιμότητα της λοίμωξης, αλλά και στην εμφάνιση μεταγενέστερων νευρολογικών βλαβών. Επιπλέον παρατηρείται αυξημένη ενδοεγκεφαλική πίεση κατά την οποία υπάρχει οίδημα που μπορεί να οδηγήσει σε ισχαιμία των άμεσα εμπλεκόμενων ιστών και άρα περαιτέρω βλάβη των νευρώνων (Gil et al., 2022).

### 1.3.3 *S. pneumoniae* και βακτηριαίμια/ σηψαιμία

Όταν ο *S. pneumoniae* βρεθεί στην κυκλοφορία του αίματος προκαλεί βακτηριαίμια, η οποία αν δε αντιμετωπιστεί κατάλληλα μπορεί να καταλήξει σε σηψαιμία (πιο βαριά μορφή της λοίμωξης). Ο ασθενής με πνευμονοκικκή βακτηριαίμια εμφανίζει ρίγη, πυρετό και μειωμένα αντανακλαστικά. Επιπλοκή της λοίμωξης αποτελεί η απώλεια των άκρων. Η θνησιμότητά της ορίζεται στο 1 στα 30 παιδιά και 1 στους 6-8 ενήλικες που εμφανίζουν τη συγκεκριμένη λοίμωξη (CDC, 2024).

Η σήψη ορίζεται ως οργανική ανεπάρκεια, απειλητική για τη ζωή, η οποία οφείλεται στην ακατάλληλη ανοσολογική απόκριση του ξενιστή σε κάποια λοίμωξη. Η οργανική ανεπάρκεια κρίνεται σημαντική ώστε να θεωρηθεί ότι κάποιος υφίσταται σήψη. Η πιο σοβαρή μορφή σήψης είναι το σηπτικό σοκ, το οποίο σχετίζεται με μεταβολές σε κυκλοφορικό, κυτταρικό και μεταβολικό επίπεδο, και συνοδεύεται από μεγαλύτερο κίνδυνο θανάτου. Ένα σημείο αναγνώρισης του σηπτικού σοκ είναι η έντονη υπόταση. Ωστόσο δίνεται σταθερά σημασία στην εργαστηριακή εικόνα του αίματος, και συγκεκριμένα στο επίπεδο οξυγόνου και γαλακτικών οξέων και την πίεση του αίματος. Οι πιο πρόσφατες κατευθυντήριες οδηγίες προτείνουν τη χρήση προγνωστικών προγραμμάτων που μπορούν να αναγνωρίσουν μία κρίσιμη κλινική κατάσταση με σκοπό την άμεση αντιμετώπιση και την όσο το δυνατόν βέλτιστη έκβαση της κατάστασης (Srzić et al., 2022).



#### 1.3.4 *S. pneumoniae* και πνευμονία της κοινότητας

Ως πνευμονία της κοινότητας ορίζεται η λοίμωξη της πνευμονίας η οποία μεταδίδεται εκτός του νοσοκομείου. Είναι μία από τις ασθένειες του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος, ανάμεσα σε βρογχίτιδα και βρογχολίτιδα. Αποτελεί τη σημαντικότερη αιτία εισαγωγής παιδιών στο νοσοκομείο στις Η.Π.Α. (Smith et al., 2021).

Τα συμπτώματα της πνευμονίας εντοπίζονται στη θωρακική περιοχή αλλά μπορεί να είναι και πιο γενικευμένα (Eshwara et al., 2020). Περιλαμβάνουν πυρετό, ταχύπνοια, παραγωγικό βήχα, ανορεξία, δύσπνοια, λήθαργο και αίσθημα πόνου στην περιοχή του στήθους, και αξιολογούνται μόνο τους αλλά και ως προς τη διάρκειά τους (Eshwara et al., 2020; Smith et al., 2021). Σε ασθενείς που εμφανίζουν πιο σοβαρή μορφή της νόσου συνήθως γίνονται απεικονιστικές (ακτινογραφία θώρακος, υπερηχογράφημα) και αιματολογικές εξετάσεις (γ-αντιδρώσα πρωτεΐνη, ταχύτητα καθίζησης ερυθρών αιμοσφαιρίων) για την εξακρίβωση της διάγνωσης (Smith et al., 2021).

Η καθυστερημένη ή ανεπαρκής αντιμετώπιση της λοίμωξης μπορεί να προκαλέσει κατάρρευση των πνευμόνων και συσσώρευση πύου σε αυτούς, εμπύημα, δηλαδή γενικευμένη λοίμωξη στους πνεύμονες και τη θωρακική περιοχή και τέλος περικαρδίτιδα, η οποία είναι λοίμωξη που αφορά την εξωτερική μεμβράνη της καρδιάς. Τέλος πρέπει να αναφερθεί ότι η θνησιμότητα λόγω πνευμονίας ανέρχεται στο 1 στα 20 άτομα που εμφανίζουν τη συγκεκριμένη λοίμωξη (CDC, 2024).

#### 1.3.5 *S. pneumoniae* και Μέση Ωτίτιδα

Η μέση ωτίτιδα αποτελεί μία λοίμωξη του μέσου ωτός που οφείλεται σε απόφραξη της Ευσταχιανής σάλπιγγας και προσβάλλει κυρίως παιδιά ηλικίας 0-3 ετών. Αποτελεί τη 2<sup>η</sup> συχνότερη παιδιατρική λοίμωξη μετά τις λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος (Danishyar and Ashurst, 2023) (Southwick, 2010) και την πιο συχνή αιτία χορήγησης αντιβιοτικών σε παιδιά (Castillo-Aguas et al., 2023; Gaddey et al., 2019). Ένας από τους λόγους που παρατηρείται αυτό είναι η ανατομία της συγκεκριμένης περιοχής, η οποία στα παιδιά μικρότερης ηλικίας είναι ατελώς σχηματισμένη (Southwick, 2010). Τα περισσότερα κρούσματα παρατηρούνται σε παιδιά ηλικίας μέχρι 5 ετών ενώ η πλειοψηφία αυτών εντοπίζεται στους πρώτους 6-24 μήνες ζωής.

Η οξεία μέση ωτίτιδα (ΟΜΩ) διακρίνεται σε 3 κατηγορίες:

- i. οξεία μέση ωτίτιδα
- ii. χρόνια πυώδη μέση ωτίτιδα (ΧΠΜΩ),
- iii. και μέση ωτίτιδα με διάχυση (ΜΩΔ) (Meherali et al., 2019)

### 1.3.5.1 Παθογένεση

Οι λοιμώξεις του μέσου ωτός δεν οφείλονται σε ένα μόνο αίτιο. Κυριότεροι παράγοντες αποτελούν τα βακτήρια, και συγκεκριμένα τα: *S. pneumoniae* (κύριο παθογόνο), *Haemophilus influenzae* και *Moraxella catarrhalis* ευθύνονται για πάνω από το 95% των περιπτώσεων ενώ φαίνεται πως η λοίμωξη μπορεί να προκληθεί και από ιούς (Danishyar and Ashurst, 2023; Loughran et al., 2019).

Για την πρόκληση οξείας μέσης ωτίτιδας από *S. pneumoniae*, υπάρχουν δύο θεωρίες:

- i. γίνεται μετατόπιση του βακτηρίου από τον ρινοφάρυγγα στον Ευσταχιανό σωλήνα (δομή του μέσου ωτός)
- ii. αλλάζει ο εξερισμός του Ευσταχιανού σωλήνα και δημιουργούνται ευνοϊκές συνθήκες για τον αποικισμό του *S. pneumoniae* (μειωμένο οξυγόνο και αυξημένη υγρασία).

Άλλα αίτια που ευνοούν την πρόκληση της λοίμωξης αποτελούν η φυσική κατάσταση του ασθενούς, η γενετική προδιάθεση και το οικογενειακό ιστορικό, η ύπαρξη γαστροοισοφαγικού συνδρόμου (Fichera et al., 2023), αλλεργίες (Danishyar and Ashurst, 2023) αλλά και το περιβάλλον του ασθενούς, καθώς φαίνεται πως υπάρχει θετική σχέση ανάμεσα σε πολυσύχναστους χώρους, όπως οι χώροι πρωινής φύλαξης των παιδιών, και στην πιθανότητα λοίμωξης (Castillo-Aguas et al., 2023; Danishyar and Ashurst, 2023; Fichera et al., 2023).

Υποστηρίζεται πως η ικανότητα του πνευμονιοκόκκου να μεταφέρεται και να εγκαθίσταται στην Ευσταχιανή σάλπιγγα οφείλεται στις νευραμινιδάσες, *NanA* και *NanB*, που εκφράζει (Loughran et al., 2019), ενώ σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Figueira et al. προέκυψε πως οι λοιμώξεις του μέσου ωτός ευνοούνται από τα στελέχη του *S. pneumoniae* που φέρουν τα ινίδια τύπου I, καθώς αυτά φέρουν υψηλότερο βακτηριακό φορτίο σε σχέση με τα υπόλοιπα (Miao et al., 2023). Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί πως μετά την εφαρμογή των συζευγμένων πνευμονοκοκκικών εμβολίων (PCVs), η ασθένεια προκαλείται από οροτύπους του πνευμονιοκόκκου που δεν συμπεριλαμβάνονται σε αυτό (Ubukata et al., 2018) (Danishyar and Ashurst, 2023).

Όμως έχει προκύψει πως η ανατομία του ωτός, και συγκεκριμένα της ευσταχιακής σάλπιγγας, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση της λοίμωξης (Yonamine et al., 2009). Αντίστοιχα έχει βρεθεί πως το παθητικό κάπνισμα είναι δυνητικά ένας παράγοντας που συνεισφέρει στην εμφάνιση της ασθένειας (Castillo-Aguas et al., 2023).

### 1.3.5.2 Συμπτώματα

Τα συμπτώματα που παρατηρούνται περιλαμβάνουν ερυθρότητα, ωταλγία και οίδημα του μέσου ωτός, τέτοιο ώστε να επηρεάζει τον εντοπισμό, την κινητικότητα και τον εξαερισμό της κινητικής μεμβράνης (Southwick, 2010).

Ένα από τα πιο βασικά συμπτώματα της ωτίτιδας είναι η ωταλγία, η συλλογή υγρού (του μέσου ωτός), ωστόσο οι ασθενείς μπορεί να φέρουν δευτερεύοντα σημάδια που να υποδεικνύουν την ασθένεια, όπως ευερεθιστότητα, πονοκέφαλοι, κακή ποιότητα ύπνου, η ανορεξία σε μικρότερα παιδιά κ.ο.κ. (Castillo-Aguas et al., 2023; Danishyar and Ashurst, 2023). Επιπλέον, η τυμπανική μεμβράνη είναι ερεθισμένη και παρουσιάζεται ως διογκωμένη, κόκκινη και αδιαφανής (Castillo-Aguas et al., 2023).

Σύμφωνα με τους Danishyar και Ashurst, ο πυρετός αποτελεί μία μη ειδική ένδειξη η οποία εκλείπει από το 1/3 των ασθενών. Επιπλέον οι απεικονιστικές και εργαστηριακές εξετάσεις κρίνονται συνήθως περιττές. Τέλος, χρειάζεται να γίνει διαφορική διάγνωση μεταξύ της οξείας μέσης ωτίτιδας και βλαβών της τυμπανικής μεμβράνης ή της εξωτερικής ωτίτιδας ώστε να μπορεί να δοθεί η κατάλληλη φαρμακευτική αγωγή (Danishyar and Ashurst, 2023).

### 1.3.5.3 Πρόληψη

Στην Αμερική η χρήση των εμβολίων έχει φανεί να μειώνει τα ποσοστά πρόκλησης της μέσης ωτίτιδας. Συγκεκριμένα, τα συζευγμένα πνευμονοκοκκικά εμβόλια μειώνουν σε μικρό βαθμό το γενικό ποσοστό εμφάνισης της νόσου, αλλά εμφανίζουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην μείωση των περιστατικών που οφείλονται σε πνευμονιόκοκκο, και ειδικά το 13-δύναμο εμβόλιο που φαίνεται να είναι κατά 86% περισσότερο αποτελεσματικό σε σχέση με το 7-δύναμο εμβόλιο (Gaddey et al., 2019).

### 1.3.5.4 Επιπλοκές

Η οξεία μέση ωτίτιδα αν δεν θεραπευτεί εγκαίρως μπορεί να εμφανίσει ορισμένες επιπλοκές, οι οποίες αφορούν γειτονικές δομές. Από τις σημαντικότερες επιπλοκές αποτελεί η μαστοειδίτιδα, αλλά μπορεί να εμφανιστούν επίσης παράλυση προσώπου, μηνιγγίτιδα και εγκεφαλικά αποστήματα (Fichera et al., 2023).

### 1.3.6 *S.pneumoniae* και Οξεία Μαστοειδίτιδα

Ο όρος μαστοειδίτιδα περιγράφει τη φλεγμονή ενός τμήματος του κροταφικού οστού και συνήθως οφείλεται σε κάποια βακτηριακή λοίμωξη. Το σημείο της φλεγμονής αφορά τα μαστοειδή κύτταρα, μία ονομασία που έχει δοθεί για να περιγράψει οστικά διαφραγματικά τμήματα επενδυμένα με επιθήλιο, τα οποία έρχονται σε συνέχεια με τον μέσο ου (*Sahi et al., 2023*). Η νόσος αποτελεί την πιο συχνή επιπλοκή της οξείας μέσης ωτίτιδας (*Cassano et al., 2020; Sahi et al., 2023*).

Μπορεί να εμφανιστεί με τρεις μορφές:

- Αρχόμενη μαστοειδίτιδα -επηρεάζει μόνο τα μαστοειδή κύτταρα χωρίς εμπλοκή του μέσου ωτός
- Οξεία μαστοειδίτιδα (OM) -διάβρωση των οστικών επιθηλιακών τμημάτων λόγω λοίμωξης του επιθηλίου. Πιθανή εμφάνιση αποστήματος και βλαβών στις παρακείμενες δομές.
- Υποξεία μαστοειδίτιδα -οφείλεται σε μόνιμη λοίμωξη ή επαναλαμβανόμενα επεισόδια Ο.Μ.Ω. που σε συνδυασμό με ακατάλληλη θεραπεία οδηγούν σε διάβρωση των διαφραγματικών τμημάτων των μαστοειδών κυττάρων (*Sahi et al., 2023*).

Η εμφάνιση της συγκεκριμένης νόσου οφείλεται σε διάφορους προδιαθεσικούς παράγοντες, όπως η ανατομία του κροταφικού οστού, η ηλικία, η βακτηριακή χλωρίδα και η ανοσολογική κατάσταση του ασθενούς. Η συχνότητα των περιστατικών της οξείας μαστοειδίτιδας εξαρτάται από τη γεωγραφική κατανομή, ενώ τα περιστατικά σημειώνονται σε ηλικίες 0-14 ετών. Συγκεκριμένα, η παιδική ηλικία ευνοεί τις λοιμώξεις που επηρεάζουν το μαστοειδές οστό λόγω της ανατομίας του αυτιού και του ατελώς ανεπτυγμένου ανοσοποιητικού συστήματος. Ο μέσος ους συνδέεται με τα μαστοειδή κύτταρα μέσω μιας δομής που ονομάζεται *aditus ad antrum*. Όταν υπάρχει λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού, ο Ευσταχιανός σωλήνας «κλείνει» στο σημείο του ρινοφαρυγγικού ανοίγματος λόγω των εκκρίσεων. Αυτό το εμπόδιο που δημιουργείται στη συγκεκριμένη δομή δημιουργεί κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξη βακτηριακής λοίμωξης λόγω της διαφοράς πίεσης που δημιουργείται μεταξύ της τυμπανικής κοιλότητας και του μέσου ωτός καθώς και τη διαφυγή υγρού από τον βλεννογόνο του. Έτσι η ένωση του μέσου αυτιού με την τυμπανική κοιλότητα μέσω του *aditus ad antrum*, έχει ως αποτέλεσμα οι χώροι του μαστοειδούς οστού να γεμίζουν με υγρό (*Lin et al., 2010*). Όπως αναφέρουν οι *Cassano et al.* (*Cassano et al., 2020*), το μαστοειδές οστό είναι περισσότερο πεπιεσμένο σε σχέση με

των ενηλίκων, γι' αυτό και είναι πιο εύκολο να συσσωρευτούν τα εκκρίματα και να προκληθεί μόλυνση του οστού.

Επιπλέον, η εξέλιξη και η σοβαρότητα της ασθένειας εξαρτάται από την ηλικία του ασθενούς, με τα σοβαρότερα περιστατικά να αφορούν παιδιά νεότερης ηλικίας (Cassano *et al.*, 2020).

#### 1.3.6.1 Παθογένεση

Από μικροβιολογικής απόψεως, κύριο αίτιο για την μαστοειδίτιδα θεωρείται ο *S. pneumoniae*, ακολουθούν τα *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* και *Haemophilus influenzae*, ενώ δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα η συμμετοχή του *Pseudomonas aeruginosa* (ψευδομονάδα). Σύμφωνα με μελέτες η λοίμωξη από ψευδομονάδα σχετίζεται με την ηλικία των παιδιών, προηγούμενες και εμμένουσες καταστάσεις ωτίτιδας καθώς και με τα συμπτώματα της οξείας μαστοειδίτιδας (Butbul-Aviel *et al.*, 2003; Cassano *et al.*, 2020).

#### 1.3.6.2 Συμπτώματα

Πριν δοθεί η διάγνωση της μαστοειδίτιδας πρέπει να διασφαλιστεί ότι τα συμπτώματα του ασθενούς δεν οφείλονται σε ασθένειες με παρόμοια χαρακτηριστικά όπως κυτταρίτιδα, εξωτερική ωτίτιδα, λεμφαδενοπάθεια, τραύμα και κυρίως σε κάποιον όγκο. Επίσης είναι σημαντικό η διάγνωση και η θεραπεία να γίνεται από κάποιον ωτορινολαρυγγολόγο (ΩΡΛ) για τη σωστή αξιολόγηση της κατάστασης (Sahi *et al.*, 2023).

Τα συμπτώματα που οφείλονται σε μαστοειδίτιδα είναι συνήθως όμοια με αυτά της οξείας μέσης ωτίτιδας, αλλά είναι συχνά πιο σοβαρά με αυθόρμητο ή πιεστικό πόνο στη μαστοειδή περιοχή και πόνο στο δέρμα πίσω από το αυτί (Cassano *et al.*, 2020). Αξίζει να σημειωθεί πως τα παιδιά εμφανίζουν περισσότερα συμπτώματα σε σχέση με τους ενήλικες τα οποία σχετίζονται και με την ανταπόκρισή τους στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, αλλά τα κλινικά ευρήματα παραμένουν τα ίδια σε όλες τις ηλικιακές ομάδες (Sahi *et al.*, 2023).

#### 1.3.6.3 Επιπλοκές

Η οξεία μαστοειδίτιδα αν δεν αντιμετωπιστεί σωστά μπορεί να εμφανίσει επιπλοκές. Δυστυχώς, μπορεί να αποβούν μοιραίες καθώς μπορεί να είναι είτε εξωκρανιακές είτε ενδοκρανιακές. Το κυριότερο σύμπτωμα είναι το υποπεριστολικό απόστημα. Αυτό οφείλεται στη φλεγμονώδη κατάσταση που έχει δημιουργηθεί κατά την οποία το μαστοειδές

οστό υφίσταται απασβέστωση και καταστροφή λόγω της δράσης των κυτταροκινών και των οστεοκλαστών (Cassano et al., 2020).

Η συγκεκριμένη διαδικασία γίνεται αντιληπτή με πόνο στο αυτί, έμμονο πυρετό, μεταωτική ευαισθησία και συλλογή πύου με μετατόπιση του πτερυγίου. Σε μικρότερο βαθμό ευθύνονται προηγούμενες ασθένειες που αφορούν το ωτορινολαρυγγικό σύστημα, όπως χρόνια μέση ωτίτιδα, ή επαναλαμβανόμενη Ο.Μ.Ω. και αδενοειδή, δεν επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τις επιπλοκές της μαστοειδίτιδας. Οι απόψεις δίστανται για το ποιες εξετάσεις, εξειδικευμένες ή μη, πρέπει να γίνονται στα περιστατικά μαστοειδίτιδας. Κριτήριο συνήθως αποτελεί η βαρύτητα του κάθε περιστατικού (Cassano et al., 2020).

#### **1.4 Θεραπεία έναντι των λοιμώξεων από *S. pneumoniae***

Τα αντιβιοτικά που χορηγούνται για τη θεραπεία των λοιμώξεων που προκαλούνται από τον *S. pneumoniae* διαφέρουν ανάλογα με το είδος της λοίμωξης αλλά και την ευαισθησία του εκάστοτε υπαίτιου στελέχους σε αυτά.

##### **1.4.1 Θεραπεία μηνιγγίτιδας από *S. pneumoniae***

Η θεραπεία της πνευμονιοκοκκικής μηνιγγίτιδας εξαρτάται από την ηλικία των ασθενών και την αντοχή που παρουσιάζει ο *S. pneumoniae* στην πενικιλίνη και στις κεφαλοσπορίνες 3<sup>ης</sup> γενιάς που έχουν καταγραφεί στην εκάστοτε γεωγραφική περιοχή. Ειδικά στην ευρωπαϊκή ήπειρο σημειώνονται μεγάλα ποσοστά αντοχής στα εν λόγω αντιβιοτικά. (van de Beek et al., 2012).

Η εμπειρική θεραπεία βασίζεται στη χρήση κεφαλοσπορινών 3<sup>ης</sup> γενιάς όπως κεφτριαξόνη και κεφοταξίμη (Dao and Rosch, 2021), ωστόσο σε περιοχές που έχει παρατηρηθεί η ανωτέρω αντοχή, αντιβιοτικά εκλογής αποτελούν η βανκομυκίνη ή συνδυαστικά η ριφαμπικίνη (van de Beek et al., 2012). Η διάρκειά της ορίζεται στις 10-14 ημέρες (Brouwer et al., 2012; van de Beek et al., 2012). Επιπλέον, ήδη από το 2014 έχει προταθεί ο συνδυασμός των ανωτέρων αντιβιοτικών (βανκομυκίνης ή ριφαμπικίνης με κάποια κεφαλοσπορίνη 3<sup>ης</sup> γενιάς- κεφτριαξόνη/ κεφοταξίμη) από την Ευρωπαϊκή Κοινότητα Κλινικής Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων (ESCMID, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) (Erdem et al., 2014).

#### 1.4.2 Θεραπεία σηψαιμίας από *S. pneumoniae*

Η αρχική θεραπευτική προσέγγιση στους ασθενείς με σηψαιμία περιλαμβάνει τη χρήση πενικιλίνης ή το συνδυασμό πενικιλίνης - αμινογλυκοσίδης. Ωστόσο αυτή μπορεί να τροποποιηθεί ανάλογα με τη εντόπιση της ασθένειας (Nygård *et al.*, 2014). Σε περίπτωση εμφάνισης λοίμωξης και συνεπώς αντοχής του *S. pneumoniae* προτείνεται η χρήση βανκομυκίνης ή λινεζολίδης (Garcia-Vidal *et al.*, 2010).

#### 1.4.3 Θεραπεία πνευμονίας από *S. pneumoniae*

Η φαρμακευτική αντιμετώπιση της πνευμονίας διαφοροποιείται ανάλογα με την ένταση της ασθένειας και την ηλικία του ασθενούς. Σε περιστατικά ήπιας έως μέτριας λοίμωξης σε παιδιά χορηγείται αμοξυκιλλίνη. Στους ενήλικες με ανάλογη ήπια λοίμωξη δίνονται μακρολίδες, όπως ερυθρομυκίνη, αζιθρομυκίνη ή κλαριθρομυκίνη ενώ εναλλακτικά χορηγείται φθοροκινολόνη. Σε περιπτώσεις σοβαρής λοίμωξης η αγωγή αλλάζει σε κεφτριαξόνη ή κεφοταξίμη ενώ αν κριθεί πως ο ασθενής βρίσκεται σε κρίσιμη για τη ζωή του κατάσταση, χορηγείται βανκομυκίνη (Dao and Rosch, 2021).

#### 1.4.4 Θεραπεία Οξείας Μέσης Ωτίτιδας από *S. pneumoniae*

Κριτήρια για τη θεραπεία αποτελούν η ηλικία του ασθενούς καθώς και η μορφή της ωτίτιδας κάθε φορά (βλ. παράγραφο 1.3.5), η σοβαρότητα και η τοποθεσία της λοίμωξης (μονόπλευρα ή αμφίπλευρα) (Castillo-Aguas *et al.*, 2023; Danishyar and Ashurst, 2023).

Κατά τη θεραπεία χορηγούνται αντιφλεγμονώδη φάρμακα και αντιβιοτικά που έχουν ως στόχο τη διαχείριση του πόνου και τη διακοπή της φλεγμονής αντίστοιχα. Πρώτη επιλογή αποτελεί η αμοξυκιλλίνη ή συνδυασμό αμιξυκιλλίνης/ κλαβουλανικού οξέος (Danishyar and Ashurst, 2023; Smolinski *et al.*, 2022). Ωστόσο σε ασθενείς αλλεργικούς σε πενικιλίνη χορηγούνται 2<sup>ης</sup> γενιάς μακρολίδες και 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> γενιάς κεφαλοσπορίνες. Σε περίπτωση διάτρησης της τυμπανικής μεμβράνης γίνεται χορήγηση τοπικών φαρμάκων, με σκοπό την άμεση δράση και την αποφυγή παρενεργειών (Danishyar and Ashurst, 2023).

#### 1.4.5 Θεραπεία Οξείας Μαστοειδίτιδας από *S. pneumoniae*

Τα αντιβιοτικά αποτελούν τον κύριο τρόπο θεραπείας της οξείας μαστοειδίτιδας ωστόσο δεν έχουν 100% αποτελεσματικότητα καθώς σε ένα ποσοστό <10% εμφανίζονται επιπλοκές παρά τη χορήγησή τους. Ανάλογα με τη σοβαρότητα της λοίμωξης ακολουθείται διαφορετικό θεραπευτικό σχήμα που έχει ως σταθερά την ενδοφλέβια χορήγηση



αντιβιοτικών, και που μπορεί να επεκταθεί από την ενδοφλέβια χορήγηση στεροειδών έως και την επέμβαση μυριγγοτομής και την τοποθέτηση σωληνίσκου. Το αντιβιοτικό εκλογής διαφέρει ανάλογα με το αίτιο της μαστοειδίτιδας. Έτσι αν οφείλεται σε χρόνια μέση ωτίτιδα χορηγείται βανκομυκίνη, ενώ σύνηθες αντιβιοτικό εκλογής αποτελεί η κεφτριαξόνη. Η χρήση άλλων αντιβιοτικών πέραν των κεφαλοσπορινών θα πρέπει να γίνεται έπειτα από ειδική εξέταση και αντιβιογράμμα. Λιγότερο συχνά γίνεται χρήση πενικιλινών ή ερυθρμικίνης (Cassano et al., 2020; Sahi et al., 2023).

**1.4.5.1 Άλλες θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση της οξείας μαστοειδίτιδας**  
Μεγάλο μέρος της επιστημονικής κοινότητας συμφωνεί πως η πραγματοποίηση μυριγγοτομής με/ χωρίς τυμπανοστομία, είναι απαραίτητη, ειδικά στα περιστατικά όπου δεν υπάρχει αυθόρμητη διάτρηση της τυμπανικής μεμβράνης, ή σε παιδιά με επαναλαμβανόμενα περιστατικά αρχόμενης οξείας μαστοειδίτιδας (AOM) ή εμμένουσας οξείας μαστοειδίτιδας (EOM). Η προσέγγιση της συγκεκριμένης επέμβασης σε συνδυασμό με οπίσθια ωτική παρακέντηση του αποστήματος ή με οπίσθια ωτική εντομή και χορήγηση αντιβίωσης έφερε τα ίδια αποτελέσματα με την πραγματοποίηση μαστοειδεκτομής και αντιβιοτικών. Πιστεύεται πως οι πιο δύσκολες επεμβατικές πρακτικές (μαστοειδεκτομή, νευροχειρουργικές επεμβάσεις κοκ.) πρέπει να πραγματοποιηθούν σε σημαντικές επιπλοκές, κυρίως ενδοκρανιακές και ενδοκρανιακές, ή όταν μπλέκονται αγγεία (Cassano et al., 2020).

## **1.5 Μικροβιακή αντοχή**

### **1.5.1 Μικροβιακή αντοχή- Γενικά χαρακτηριστικά**

Ως μικροβιακή αντοχή ορίζεται η ιδιότητα που έχουν οι μικροοργανισμοί να μην ανταποκρίνονται σε αντιμικροβιακά φάρμακα (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023) Η μικροβιακή αντοχή αποτελεί ένα φυσικό χαρακτηριστικό των μικροοργανισμών καθώς ορισμένοι από αυτούς έχουν την ιδιότητα να παράγουν αντιμικροβιακές ουσίες. Όσοι δεν φέρουν αυτή την ιδιότητα αλλά συνυπάρχουν με μικροοργανισμούς που παράγουν αντιβιοτικά και άλλες αντιμικροβιακές ουσίες, έχουν τη δυνατότητα να προσαρμοστούν ώστε να συνυπάρχουν μαζί τους (Munita and Arias, 2016).

Ωστόσο, στις μέρες μας η μικροβιακή αντοχή αποτελεί πολύ μεγάλο κίνδυνο για τη δημόσια υγεία και αφορά στην επίκτητη αντοχή που αποκτούν στα αντιβιοτικά αυτές ενώ αρχικά ήταν ευαίσθητα σε αυτά. Ακόμα μεγαλύτερη ανησυχία προκαλούν τα στελέχη βακτηρίων



που παρουσιάζουν αντοχή σε πολλά αντιβιοτικά, καθώς προκαλούν λοιμώξεις με μεγάλη δυσκολία θεραπείας, οι οποίες μπορεί να αποβούν μοιραίες για την ανθρώπινη ζωή (*Munita and Arias, 2016*). Αυτά ορίζονται ως πολυανθεκτικά βακτήρια (multidrug resistant bacteria, MDR bacteria) και εμφανίζουν αντοχή σε τουλάχιστον ένα αντιβιοτικό-εκπρόσωπο από τρεις διαφορετικές τάξεις αντιβιοτικών ουσιών (λ.χ. β-λακτάμες, κινολόνες, τετρακυκλίνες) (*Magiorakos et al., 2012*).

Τα βακτήρια διαθέτουν δύο μηχανισμούς προσαρμογής για τη δράση έναντι των αντιβιοτικών. Ο πρώτος είναι μέσω της γονιδιακής μετάλλαξης και ο δεύτερος αφορά τη πρόσληψη γονιδίων που προσφέρουν αντιμικροβιακή αντοχή μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων (HGT, Horizontal Gene Transfer) (*Munita and Arias, 2016*).

### 1.5.2 Γονιδιακές μεταλλάξεις που προσδίδουν μικροβιακή αντοχή στα βακτήρια

Οι μεταλλάξεις του εν λόγω μηχανισμού παρατηρούνται αρχικά σε ένα μέρος του βακτηριακού πληθυσμού και στη συνέχεια εξαπλώνονται όταν λόγω περιβαλλοντικής πίεσης

Οι μεταλλάξεις στο γονιδίωμα του βακτηρίου μπορεί να έχουν τα εξής αποτελέσματα:

- i. Τροποποίηση του ίδιου του αντιβιοτικού, δηλαδή απενεργοποίησή του μέσω:
  - a. χημικών μεταβολών που εμποδίζουν τη δραστηριότητα του μορίου, οι οποίες επηρεάζουν κυρίως αντιμικροβιακές ουσίες που δρουν στο ριβοσωμικό επίπεδο και αναστέλλουν την πρωτεϊνσύνθεση του βακτηρίου (*Wilson, 2014*)
  - b. καταστροφή του αντιβιοτικού μορίου, μέσω ενζύμων τα οποία παρουσιάζουν δράση έναντι αρκετών αντιβιοτικών, όπως πενικιλίνες, 3<sup>η</sup> γενιά κεφαλοσπορινών, μονοβακτάμες (*Munita and Arias, 2016*)
- ii. Μειωμένη εισχώρηση του αντιβιοτικού ή εκροή αυτού. Διακρίνονται διαφορετικοί μηχανισμοί:
  - a. μειωμένη διαπερατότητα κυτταρικού τοιχώματος και/ή κυτταροπλασματικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα τη μειωμένη πρόσβαση του αντιβιοτικού στο βακτηριακό στόχο (*Munita and Arias, 2016*)
  - b. μέσω αντλιών εκροής, οι οποίες εξωθούν το αντιβιοτικό από το βακτήριο. Διακρίνονται αντλίες εκροής που είναι ειδικές για ορισμένα αντιβιοτικά, όπως αυτές που οφείλονται στα γονίδια *mef* ή *tet* και προσδίδουν αντοχή σε μακρολίδες ή τετρακυκλίνες αντίστοιχα, ή σε αντλίες που δεν έχουν ειδικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό και συναντώνται συνήθως σε πολυανθεκτικά βακτήρια (*Poole, 2005*).
- iii. Αλλαγές στο βακτηριακό στόχο. Αυτές μπορεί να πάρουν τη μορφή:

- a. απομάκρυνσης ή μη σταθεροποίησης του αντιβιοτικού (*Munita and Arias, 2016*). Παράδειγμα αποτελούν οι πρωτεΐνες που εκφράζονται από τα γονίδια *tetM* και *tetO* που αποσυνδέουν την τετρακυκλίνη από το ριβόσωμα και το τροποποιούν ώστε να συνεχίσει κανονικά η πρωτεϊνοσύνθεση (*Dönhöfer et al., 2012; Li et al., 2013*).
- b. Τροποποίηση του βακτηριακού στόχου με συνέπεια την αδυναμία πρόσδεσης του αντιβιοτικού. Αυτή η τροποποίηση μπορεί να οφείλεται:
- σε σημειακές μεταλλάξεις
  - σε ενζυματικές τροποποιήσεις, π.χ. μεθυλίωση του βακτηριακού ριβοσώματος και παρεμπόδιση της πρωτεϊνοσύνθεσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα γονίδια *erm* που προσδίδουν αντοχή στις μακρολίδες (*Leclercq, 2002*)
  - σε αντικατάσταση/ προσπέραση του στόχου, που μπορεί να οφείλονται είτε σε παραγωγή από το βακτήριο παρόμοιων στόχων που όμως δεν είναι κατάλληλοι για την πρόσδεση του αντιβιοτικού, είτε σε παράκαμψη της μεταβολικής οδού που παράγει το στόχο (*Munita and Arias, 2016*)
- iv. Τέλος, έχει παρατηρηθεί μικροβιακή αντοχή που οφείλεται σε προσαρμογές του βακτηρίου ώστε να προσπερνάει τις ανοσολογικές αποκρίσεις του ξενιστή και να συνεχίζει να ανταποκρίνεται στις βιολογικές του ανάγκες μέσω της πραγματοποίησης των βιολογικών του διαδικασιών (*Munita and Arias, 2016*).

### 1.5.3 Οριζόντια ανταλλαγή γονιδίων

Πρόκειται για έναν τρόπο που συμβάλλει σημαντικά στη διάδοση της μικροβιακής αντοχής, και παρατηρείται στη φύση όταν τα βακτήρια βρίσκονται στο ίδιο περιβάλλον. Η οριζόντια μεταφορά γονιδίων επιτυγχάνεται με τρεις τρόπους.

- i) Μέσω μετασχηματισμού, δηλαδή είσοδο γυμνού “ξένου” DNA στο βακτήριο
- ii) Μέσω σύζευξης., η οποία οφείλεται σε μεταθετά στοιχεία, κυρίως πλασμίδια και τρανσποζόνια
- iii) Μέσω μεταγωγής, όπου απαιτείται η χρήση βακτηριοφάγων οι οποίοι φέρουν κάποιο γονίδιο αντοχής, και με την είσοδό του στο βακτήριο αυτό ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του βακτηρίου (*Munita and Arias, 2016*)
- iv) Μέσω ιντεγκρονίων, δηλαδή μέσω ειδικών δομών που λειτουργούν ως μπορούν να παρεμβάλλουν στο γονιδίωμα των βακτηρίων και να το ανασυνδυάζουν, παρουσιάζοντας ειδική σχέση για κάθε τοποθεσία και τη δυνατότητα επιλογής των γονιδίων που

παρουσιάζουν αντοχή σε αντιβακτηριακά φάρμακα (*Emamalipour et al., 2020; Mazel, 2006*).

#### 1.5.4 Ποσοστά μικροβιακής αντοχής του *S. pneumoniae*

Η αντοχή του *S. pneumoniae* διαφέρει ανάλογα με το είδος του αντιβιοτικού (*Lei and Wang, 2022*) αλλά και με το είδος της λοίμωξης που προκαλεί (*Li et al., 2023*). Σύμφωνα με μελέτη των Lei και Wang (*Lei and Wang, 2022*) που πραγματοποιήθηκε σε παιδιά- φορείς του *S. pneumoniae* στην Κίνα, τα ποσοστά αντοχής του βακτηρίου έναντι των κυριότερων αντιβιοτικών ήταν τα εξής:

- Αμοξικιλίνη 56,6%
- Αμοξικιλίνη- κλαβουλανικό οξύ 37,3%
- Αζιθρομυκίνη 63,9%
- Κεφτριαξόνη 3,6%
- Τριμεθοπρίμη- σουλφομεθαζόλη 37,3%
- Ριφαμπικίνη 41%

Οι ορότυποι οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τα μεγαλύτερα ποσοστά αντοχής σε πενικιλίνη και ερυθρομυκίνη είναι οι 6B, 6A, 9V, 14, 15A, 19F, 19A και 23F (*Liñares et al., 2010*).

Σημαντικό ρόλο στους ορότυπους που εμφανίζουν αντοχή, έπαιξε και η εφαρμογή των συζευγμένων πνευμονοκοκκικών εμβολίων καθώς στόχευε σε στελέχη που παρουσίαζαν αντοχή στις πενικιλίνες και είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του ποσοστού των ανθεκτικών στελεχών σε αυτές. Παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση της Ισπανίας (*Sempere et al., 2022*). Με την εφαρμογή του εμβολίου PCV7 παρατηρήθηκε μείωση της αντοχής στην πενικιλίνη ωστόσο εμφανίστηκαν περισσότερα περιστατικά λοιμώξεων από ορότυπους που δεν καλύπτονταν από το εμβόλιο (*Liñares et al., 2010*).

Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν τα ίδια αποτελέσματα και για τις μακρολίδες, αφού η αντοχή των στελεχών του πνευμονιοκόκκου σε αυτές αυξήθηκε (*Li et al., 2023*). Εξαίρεση αποτελούν ορισμένες χώρες της Ασίας, ανατολικής Ασίας και της Ωκεανίας, στις οποίες βρέθηκε πως τα στελέχη του *S. pneumoniae* που ήταν υπεύθυνα για διάχυτες λοιμώξεις παρουσίασαν μειωμένη αντοχή στις μακρολίδες (*Li et al., 2023*).

## 1.5.5 Μακρολίδες

### 1.5.5.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Οι μακρολίδες αποτελούν μία τάξη αντιβιοτικών που χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση λοιμώξεων, κυρίως αυτών που προκαλούνται από θετικά κατά gram βακτήρια (*Nakayama, 1984*), και δρουν αποτελεσματικά στα είδη *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Diplococcus*, αλλά και σε Gram αρνητικά βακτήρια όπως *Neisseria gonorrhoea*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis* και *Neisseria meningitis* (*Dinos, 2017*).

Οι περισσότερες μακρολίδες αποτελούν προϊόν των βακτηρίων του γένους *Streptomyces*, και έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό τους έναν κύκλο λακτόνης. Η περαιτέρω διαφοροποίησή τους γίνεται με βάση το μέγεθος του δακτυλίου, καθώς αυτός μπορεί να αποτελείται από 12, 14, 15 ή 16 άτομα άνθρακα. Στην πλειοψηφία των μακρολίδων εντοπίζονται αμινο-σάκχαρα ή ουδέτερα σάκχαρα, τα οποία συνδέονται στη λακτόνη μέσω γλυκοσιδικού δεσμού. Επίσης, μπορούν να διακριθούν δομικά ανάλογα με την ύπαρξη μονο- ή δισακχαρίτη, ο οποίος συνδέεται με τον δακτύλιο. Τέλος, έχει βρεθεί πως ορισμένες μακρολίδες που φέρουν 14- ή 16-μελή δακτύλιο λακτόνης, μπορεί να προέρχονται από το γένος *Micromonospora* (*Dinos, 2017*). Οι μακρολίδες χορηγούνται τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζώα, με αυτές με 14 και 15 άτομα άνθρακα να ανήκουν στην πρώτη κατηγορία και τις 16-μελείς στη δεύτερη (*Arsic et al., 2018*). Μέχρι στιγμής υπάρχουν τρεις γενιές της συγκεκριμένης τάξης αντιβιοτικών, με κάθε νέα γενιά να αποτελεί προσπάθεια βελτιστοποίησης της προηγούμενης. Αυτό συνέβη καθώς η πρώτη γενιά μακρολίδων υστερούσε σε βιοδιαθεσιμότητα, φαρμακοκινητικές ιδιότητες και εμφάνιζε αστάθεια στο όξινο περιβάλλον του στόμαχου (*Dinos, 2017*).

Ο μηχανισμός δράσης των μακρολίδων εντοπίζεται στο επίπεδο της πρωτεϊνοσύνθεσης. Συγκεκριμένα τα αντιβιοτικά αυτής της τάξης προσδένονται στο 23S rRNA της 50S ριβοσωμικής υπομονάδας, στο κέντρο της πεπτιδικής μεταφοράς ή κοντά σε αυτό, και παρεμποδίζει την έξοδο των νεοσχηματισμένων πεπτιδίων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης του βακτηρίου (*Jednačak et al., 2020*).

Η αύξηση της αντοχής στις μακρολίδες συνδέθηκε σε παγκόσμιο επίπεδο με την αύξηση κατανάλωσης αυτών, και ειδικά της αζιθρομυκίνης και κλαριθρομυκίνης. Αυτή η παρατήρηση έγινε τη δεκαετία του '90. Η Ελλάδα ανήκει στις χώρες της Ευρώπης με τη μεγαλύτερη αντοχή στις μακρολίδες, τη στιγμή που η νότιος Ευρώπη καταλαμβάνει τη 2η θέση με μεγαλύτερο ποσοστό αντοχής παγκοσμίως (*Liñares et al., 2010*).

#### 1.5.5.1.1 1<sup>H</sup> γενιά μακρολίδων

Βασικό εκπρόσωπο των 14μελών μακρολίδων αποτελεί η ερυθρομυκίνη, η οποία ανήκει στην 1<sup>η</sup> γενιά και αποτελείται από έναν δακτύλιο λακτόνης με 14 άτομα άνθρακα και σε αυτόν συνδέονται 2 σάκχαρα. Το πρώτο, η d-δεσοσαμύνη διαδραματίζει ρόλο στις ιδιότητες της ερυθρομυκίνης ενώ το 2ο, η 1- κλαδινόζη είναι μοναδικό για την ερυθρομυκίνη. Η ερυθρομυκίνη χωρίζεται σε υποπροϊόντα με την ερυθρομυκίνη A να αποτελεί το κύριο συστατικό των φαρμακευτικών σκευασμάτων, ενώ τα υπόλοιπα παράγοντα εντοπίζονται σε μικρότερες ποσότητες (Kanfer et al., 1998).

#### 1.5.5.1.2 2<sup>H</sup> γενιά μακρολίδων

Σύμφωνα με τα παραπάνω, ήταν φανερό πως υπήρχε ανάγκη για βελτίωση των φαρμάκων και τελικά προέκυψε, έπειτα από έρευνες, η 2<sup>η</sup> γενιά μακρολίδων. Περισσότερο γνωστές, από αυτή τη γενιά, είναι η αζιθρομυκίνη (Girard et al., 1987; Retsema et al., 1987) και η κλαριθρομυκίνη (Omura et al., 1992), ενώ ακολουθούν η διριθρομυκίνη (Counter et al., 1991), ροξιθρομυκίνη (Chantot et al., 1986) και φλοριθρομυκίνη (Toscano et al., 1983; Gialdroni-Grassi et al., 1986). Και οι πέντε είναι ημισυνθετικές και προέρχονται από την ερυθρομυκίνη A. Ιδιαίτερα η κλαριθρομυκίνη και η αζιθρομυκίνη εμφανίζουν βελτιωμένη απορρόφηση όταν χορηγείται από το στόμα και έχουν αυξημένο χρόνο ημίσειας ζωής, δεδομένα που οδηγούν στην μείωση της ημερήσιας δοσολογίας του στις 1 με 2 φορές. Επιπλέον εμφάνισαν καλύτερη διείσδυση στους ιστούς (Dinos, 2017).

Ωστόσο, οι βελτιωμένες φαρμακοδυναμικές/ κινητικές τους ιδιότητες δεν ήταν ανάλογες με την ικανότητα δράσης τους έναντι των Gram θετικών βακτηρίων ειδικότερα η αζιθρομυκίνη είχε μειωμένη δραστηριότητα σε σχέση με την ερυθρομυκίνη (Dinos, 2017).

#### 1.5.5.1.3 3<sup>H</sup> γενιά μακρολίδων

Οι βελτιωμένες φαρμακοδυναμικές/ φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες των φαρμάκων της 2<sup>ης</sup> γενιάς μακρολίδων, δεν ήταν ανάλογες με την ικανότητα δράσης τους έναντι των Gram θετικών βακτηρίων. Ειδικότερα η αζιθρομυκίνη είχε μειωμένη δραστηριότητα σε σχέση με την ερυθρομυκίνη.

Για το λόγο αυτό, δημιουργήθηκε η ανάγκη σχηματισμού μίας νέας γενιάς μακρολίδων που θα συνδύαζε τις αντιβακτηριδιακές ιδιότητες της 1<sup>ης</sup> γενιάς με τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες της 2<sup>ης</sup>. Τα αντιβιοτικά αυτής της κατηγορίας ονομάζονται κετολίδες, οι οποίες διαφέρουν χημικά από τις δύο προηγούμενες γενιές.

Μερικές κετολίδες αποτελούν η τελιθρομυκίνη, η κεθρομυκίνη και η σολιθρομυκίνη, οι οποίες κρίνονται εξαιρετικά αποτελεσματικές έναντι των Gram θετικών βακτηρίων, ακόμα και σε στελέχη του πνευμονιοκόκκου που είναι ανθεκτικά σε άλλες μακρολίδες. Επιπλέον είναι αποτελεσματικά και έναντι Gram αρνητικών βακτηρίων, όπως τα *Moraxella catarrhalis* και *H. Influenzae*, και άλλων ενδοκυτταρικών παθογόνων που προκαλούν πνευμονία της κοινότητας (Bébéar et al., 1997; Hammerschlag et al., 2001; Fernandes et al., 2016).

Επιπλέον, η τελιθρομυκίνη δεν επηρεάζεται από τον μηχανισμό αντοχής με αντλία εκροής που φέρουν τα βακτήρια *S. pneumoniae* και *S. pyogenes*, και δεν επάγουν μικροβιακή αντοχή που οφείλεται σε ριβοσωμική μεθυλίωση των συγκεκριμένων βακτηρίων. Ωστόσο, Τα στελέχη των *S. pneumoniae* και *S. pyogenes* που φέρουν τον τύπο της συνεχούς ριβοσωμικής μεθυλίωσης δεν είναι ευαίσθητα στις κετολίδες. Πρέπει να αναφερθεί πως έχουν ήδη εμφανιστεί παγκοσμίως ορισμένα βακτηριακά στελέχη που είναι ανθεκτικά στις κετολίδες, αλλά αυτό αποτελεί σπάνιο φαινόμενο.

Τέλος, οι κετολίδες παρουσιάζουν διαφορά σε σχέση με τις μακρολίδες και στον τρόπο δράσης τους, καθώς οι πρώτες επηρεάζονται από την ώρα ενώ οι δεύτερες από τη συγκέντρωσή τους στον οργανισμό (Zhanel and Hoban, 2002; Woosley et al., 2010).

Επιπλέον αποτελούν εναλλακτικό αντιβιοτικό σε ασθενείς οι οποίοι είναι αλλεργικοί ή παρουσιάζουν ευαισθησία στην πενικιλίνη (Kanfer et al., 1998).

#### 1.5.5.2 Μηχανισμοί αντοχής έναντι των μακρολίδων

Η υφιστάμενη βιβλιογραφία αναφέρει δύο κύριους μηχανισμούς που προσδίδουν αντοχή στα βακτήρια έναντι των μακρολίδων και έναν τρίτο που εμφανίζεται σπάνια. Οι μηχανισμοί αυτοί οφείλονται: 1) στη μεθυλίωση της 23S ριβοσωμικής υπομονάδας και 2) στην αντλία εκροής και 3) σε ένα μικρό ποσοστό σε μεταλλάξεις των ριβοσωμικών πρωτεϊνών.

##### 1.5.5.2.1 Μεθυλίωση της 23S βακτηριακής ριβοσωμικής υπομονάδας

Άλλο είδος μετάλλαξης το οποίο οδηγεί σε υψηλά επίπεδα αντοχής στις μακρολίδες είναι οι σημειακές μεταλλάξεις οι οποίες οφείλονται στην οικογένεια γονιδίων *erm* (erythromycin ribosomal methylation) που είναι υπεύθυνα για τη μεθυλίωση του βακτηριακού ριβοσώματος (Munita and Arias, 2016). Η έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενζύμου που προσθέτει μία ή δύο μεθυλ- ομάδες στην αδενίνη που βρίσκεται στη θέση A2058 στον τομέα V του 23S rRNA της 50s ριβοσωμικής υπομονάδας. Αυτή η μετάλλαξη προσδίδει αντοχή όχι μόνο έναντι των μακρολίδων αλλά

επίσης έναντι στις λινκοσαμίδες και στη στρεπτογραμμίνη Β καθώς αυτές οι τρεις κατηγορίες αντιβιοτικών εμφανίζουν κοινά σημεία πρόσδεσης τους με το βακτηριακό ριβόσωμα (Leclercq, 2002; Weisblum, 1995).

Τα γονίδια *erm* εντοπίζονται σε μεταθετά στοιχεία και για το λόγο αυτό υπάρχει μεγάλη εξάπλωσή τους στα βακτηριακά είδη. Συγκεκριμένα έχουν ανιχνευθεί γονίδια αυτής της οικογένειας σε πάνω από 30 είδη (Roberts, 2008). Στον πνευμονιόκοκκο εντοπίζεται κυρίως το γονίδιο *ermB*, ενώ σε μικρότερο βαθμό εντοπίζεται το *ermA* (εντοπίζεται κυρίως σε *S. aureus*) (Munita and Arias, 2016) και το *ermTR* που αποτελεί υποκατηγορία του *ermA* (Varaldo et al., 2009). Ωστόσο πρέπει να αναφερθεί πως τα γονίδια της συγκεκριμένης οικογένειας επηρεάζουν τη γενικότερη καλή λειτουργία του βακτηρίου (fitness cost) λόγω της “αλλοιωμένης” μετάφρασης του βακτηρίου εξαιτίας του μεθυλιωμένου ριβοσώματος. Για το λόγο αυτό και το βακτήριο έχει αναπτύξει έναν μηχανισμό ελέγχου της γονιδιακής του έκφρασης και έτσι εμφανίζει δύο φαινότυπους MLSB ανάλογα με το γονίδιο που φέρει. Ο ένας φαινότυπος χαρακτηρίζεται ως συνεχής (cMLSB, c= constitutive), δηλαδή η μεθυλίωση στο ριβόσωμα συμβαίνει είτε υπάρχει το αντιβιοτικό, δηλαδή κάποια μακρολίδη, στο περιβάλλον του βακτηρίου είτε όχι. Ο δεύτερος φαινότυπος είναι συχνότερος και χαρακτηρίζεται ως επαγόμενος (iMLSB, i=inducive), καθώς η μεθυλίωση του ριβοσώματος συμβαίνει μόνο παρουσία μακρολίδης στο περιβάλλον του βακτηρίου που δρα ως επαγωγέας του μηχανισμού μεθυλίωσης. Ο καλύτερος επαγωγέας θεωρείται η ερυθρομυκίνη. Πρέπει να σημειωθεί πως ο φαινότυπος iMLSB δεν προσδίδει ανοχή σε λινκοσαμίδες και στην στρεπτογραμμίνη Β απουσία κάποιας μακρολίδης, καθώς αυτή την ιδιότητα την έχει το βακτήριο με φαινότυπο cMLSB (Munita and Arias, 2016; Schroeder and Stephens, 2016).

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι το γονίδιο *ermB* προσφέρει υψηλά ποσοστά ανοχής έναντι των μακρολίδων. Συνήθως η ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) που εμφανίζει το βακτήριο που φέρει το γονίδιο *ermB* στο γονιδίωμά του είναι >256 µg/ml (Schroeder and Stephens, 2016).

#### 1.5.5.2.2 Αντλία εκροής έναντι των μακρολίδων

Ο εν λόγω μηχανισμός κωδικοποιείται από το οπερόνιο *mefE/mel* ο οποίος είναι υπεύθυνος για την πρόσδεση των μακρολίδων και τη μεμβρανική στοχοποίηση για την αντλία. Η ανοχή στις μακρολίδες απαιτεί την ύπαρξη και των 2 γονιδίων του *S. pneumoniae*, καθώς δρουν συνεργατικά και λειτουργούν ως μία αντλία 2 συνιστωσών (Schroeder and Stephens, 2016).



Το *mef(E)* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 405 αμινοξέων που ανήκει στην υπερουκογένεια διαμεσολαβητών (*Schroeder and Stephens, 2016*).

Το γονίδιο *mel* (γνωστό και ως *msr(D)*), το οποίο είναι ομόλογο του γονιδίου *msrA* του μικροοργανισμού *S.pyogenes* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη μεταφορέα κασέτας πρόσδεσης - ATP (ABC) αλλά του λείπουν τυπικές υδρόφοβες περιοχές δέσμευσης της μεμβράνης, και προβλέπεται να αλληλεπιδρά με χρωμοσωμικά κωδικοποιημένα διαμεμβρανικά συμπλέγματα (*Schroeder and Stephens, 2016*).

Η οικογένεια των γονιδίων *Msr* προσδίδει αντοχή στις 14- και 15-μελείς μακρολίδες, και έχουν αρχικά απομονωθεί από στρεπτόκοκκο. Λειτουργούν με παρόμοιο τρόπο με τις πρωτεΐνες TetM/TetO, “κυνηγώντας” την προσδεδεμένη μακρολίδη από το ριβόσωμα (*Dinos, 2017*).

Εκτός από το γονίδιο *mefE*, έχει ενοχοποιηθεί και το γονίδιο *mefA* για την παραγωγή της συγκεκριμένης αντλίας εκροής. Τα γονίδια *mefA* και *mefE* εμφανίζουν ομολογία σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80% και εντοπίζονται σε διαφορετικούς γενετικούς τόπους (*Daikos et al., 2008; Dinos, 2017; Grivea et al., 2012*).

Το γονίδιο *mefE/mel* εντοπίζεται πιο συχνά στο γονιδίωμα του *S. pneumoniae* σε σχέση με το *mefA*, το οποίο απομονώνεται κυρίως από στελέχη του *S. pyogenes* (*Daikos et al., 2008*). Παρ’ όλο που έχουν συσχετιστεί με χαμηλά επίπεδα αντοχής στις μακρολίδες, έχει παρατηρηθεί πως αυτά αυξάνονται όταν υπάρχουν μακρολίδες στο περιβάλλον (*Schroeder and Stephens, 2016*).

#### 1.5.5.2.3 Μετάλλαξη των ριβοσωμικών πρωτεϊνών του βακτηρίου

Είναι ένας τρίτος μηχανισμός αντοχής στις μακρολίδες, ο οποίος όμως είναι σπάνιος από τους άλλους δύο αναφερόμενους και αφορά σε μετάλλαξη των γονιδίων που κωδικοποιούν τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες *L4* και *L22* του πνευμονιοκόκκου. Οι πρωτεΐνες *L4* και *L22* έχουν περιοχές στην επιφάνεια του ριβοσώματος καθώς και “tentacles” (“πλοκάμια”) τα οποία εκτείνονται προς το σημείο πρόσδεσης των μακρολιδών. Η μετάλλαξή τους διαταράσσει τη δομή του 23S rRNA και συνεπώς και την ικανότητα πρόσδεσης των μακρολιδών σε αυτό (*Schroeder and Stephens, 2016*).

#### 1.5.5.2.4. Ανταλλαγή μεταθετών στοιχείων και γονιδιακός μετασχηματισμός

Με το πέρασμα των χρόνων παρατηρείται αύξηση των στελεχών που φέρουν τα γονίδια *mefE* και *ermB*. Αυτά εντοπίζονται κυρίως στο μεταθετό στοιχείο *Tn2010*, το οποίο εντοπίζεται και στο μεταλλαγμένο στέλεχος *ST230* οροτύπου 19A, ο οποίος εμφανίστηκε



μετά τη χρήση του PCV7. Καθώς το γονίδιο *ermB* προσδίδει μεγαλύτερη αντοχή καθιστά το γονίδιο *mefE/mel* μη αναγκαίο για αντοχή στον πνευμονιόκοκκο. Τα τραπεζοζόνια που σχετίζονται με τα γονίδια αντοχής είναι τα : *Tn2009* (M phenotype), *Tn6002* (MLSB phenotype, *ermB*), *Tn3872* (*ermB*), *Tn2010* (*ermB* και *mefE/mel*). Αυτά μπορεί να βρίσκονται σε άλλα σημεία του γονιδιώματος του πνευμονιοκόκκου, ενώ γενικά είναι ένα στοιχείο που δεν μεταφέρεται συχνά μέσω μεταφοράς, μόλις "εγκατασταθεί" στο γονιδίωμα εξαπλώνεται με οριζόντια ανταλλαγή DNA και ομόλογο ανασυνδυασμό. Η ανταλλαγή των μεταθετών στοιχείων του γονιδιώματος μεταξύ των πνευμονιοκόκκων ευνοείται από τη συμβιωτική σχέση που δύναται να έχει στον ανθρώπινο οργανισμό και την ικανότητά του να ενσωματώνει DNA άλλων βακτηρίων που αποικίζουν τον ρινοφάρυγγα, μέσω της διαδικασίας του ομόλογου ανασυνδυασμού. Σύμφωνα με τους Schroeder *et al.* (Schroeder and Stephens, 2016), το πιο κοινό παθογόνο που βρέθηκε στον ανθρώπινο ρινοφάρυγγα και έφερε γονίδια αντοχής έναντι των μακρολίδων ήταν ο *S. mitis*. Η μετέπειτα ανταλλαγή γονιδίων μεταξύ διαφορετικών στελεχών του πνευμονιοκόκκου ευνοείται λόγω της βιομεμβράνης που σχηματίζουν κατά τον αποικισμό τους στο ρινοφάρυγγα.

#### 1.5.6 Μέτρηση της μικροβιακής αντοχής in vitro

##### 1.5.6.1 Διάχυση δίσκων- Kirby Bauer

Η συγκεκριμένη δοκιμασία είναι γνωστή με το όνομα Kirby-Bauer. Πρόκειται για μία ποιοτική μέθοδο προσδιορισμού της ευαισθησίας των βακτηρίων σε αντιβιοτικά (εικόνα 2). Πραγματοποιείται επίστρωση του θρεπτικού υλικού με εναιώρημα του βακτηρίου σε Phosphate Buffer Saline (PBS) και τοποθέτηση των υπό μελέτη αντιβιοτικών σε μορφή εμποτισμένων δίσκων. Ακολουθεί επώαση του βακτηρίου για τουλάχιστον 24 ώρες. Το βακτήριο χαρακτηρίζεται ως ευαίσθητο (S, sensitive), ανθεκτικό (R, resistant) ή ενδιάμεσης ευαισθησίας (I, intermediate), ανάλογα με την αναστολή της ανάπτυξης του. Η αναστολή της ανάπτυξης (ζώνη αναστολής) έχει τη μορφή ομόκεντρου κύκλου από το αντιβιοτικό, και για να υπολογισθεί μετράται η διάμετρος του κύκλου (Giuliano *et al.*, 2019).

Εικόνα 2. Αναστολή ανάπτυξης ενός συγκεκριμένου βακτηριακού είδους σε διαφορετικά αντιβιοτικά. Ανάλογα με το αντιβιοτικό παρουσιάζεται και διαφορετική ζώνη αναστολής, δηλαδή διαφορετικά επίπεδα ευαισθησίας/αντοχής του βακτηρίου στα αντιβιοτικά. Φωτογραφία από τον ιστότοπο [La gélose Mueller-Hinton \(microbiologiemedicale.fr\)](http://La_gélose_Mueller-Hinton_(microbiologiemedicale.fr))

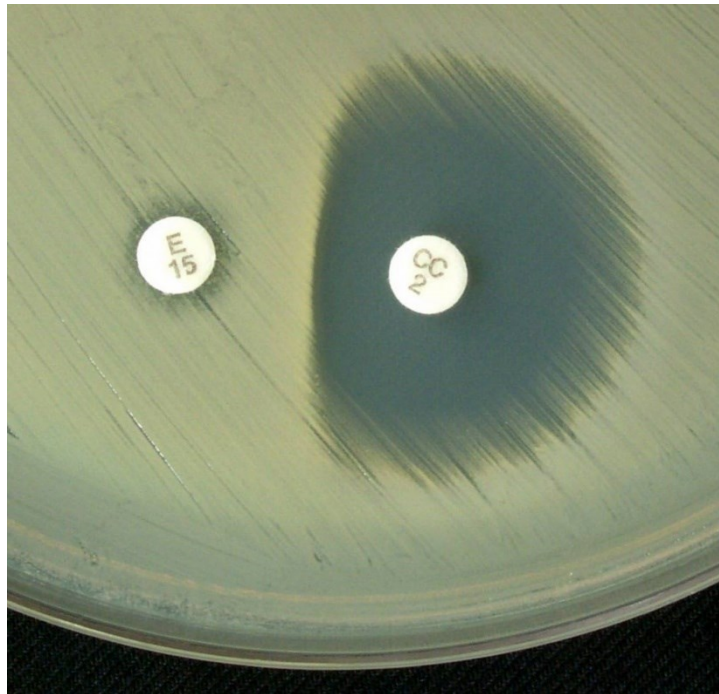


#### 1.5.6.2 Δοκιμασία επαγόμενης αντοχής του *S. pneumoniae* στην κλινδαμυκίνη με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων- μέθοδος D-test

Μία εξειδικευμένη τεχνική για τον έλεγχο της επαγόμενης αντοχής του πνευμονιοκόκκου στις λινκοσαμίδες και στην στρεπτογραμμίνη Β είναι η μέθοδος του D-test. Η ερυθρομυκίνη αποτελεί κύριο εκπρόσωπο της κατηγορίας αντιβιοτικών των μακρολίδων και αντίστοιχα η κλινδαμυκίνη της κατηγορίας των λινκοσαμίδων. Ο έλεγχος αυτός γίνεται για την παρατήρηση ή όχι της αναστολής της δράσης της κλινδαμυκίνης έναντι του *S. pneumoniae* παρουσία ερυθρομυκίνης στο περιβάλλον του βακτηρίου. Η αναστολή υποδηλώνει πως το βακτήριο φέρει τον iMLSΒ φαινότυπο ο οποίος προσδίδει αντοχή στις μακρολίδες, ενώ αντοχή στην στρεπτογραμμίνη β και στις λινκοσαμίδες προκύπτει μόνο όταν στο περιβάλλον του βακτηρίου υπάρχει μακρολίδη (βλ. παράγραφο 1.5.5.2.2). Σε απουσία μακρολίδης ο πνευμονιόκοκκος παραμένει ευαίσθητος στη δράση των εν λόγω αντιβιοτικών. Η δοκιμασία πραγματοποιείται την τοποθέτηση ενός δίσκου εμποτισμένου με το αντιβιοτικό ερυθρομυκίνη κοντά σε έναν δίσκο αντιβιοτικού κλινδαμυκίνης σε στερεό θρεπτικό υλικό που έχει προηγουμένως επιστρωθεί με εναιώρημα 24h του πνευμονιόκοκκου προς μελέτη. Σε αρνητική δοκιμασία, γύρω από τον δίσκο ερυθρομυκίνης το βακτήριο αναπτύσσεται κανονικά, ενώ γύρω από τον δίσκο κλινδαμυκίνης υπάρχει αναστολή της ανάπτυξης (εικόνα 3). Ωστόσο όταν το βακτήριο φέρει τον φαινότυπο iMLSΒ τότε

παρατηρείται ευθειασμός της ζώνης αναστολής του βακτηρίου γύρω από την κλινδαμυκίνη που οφείλεται στην αναστολή της δράσης της (Lewis and Jorgensen, 2005).

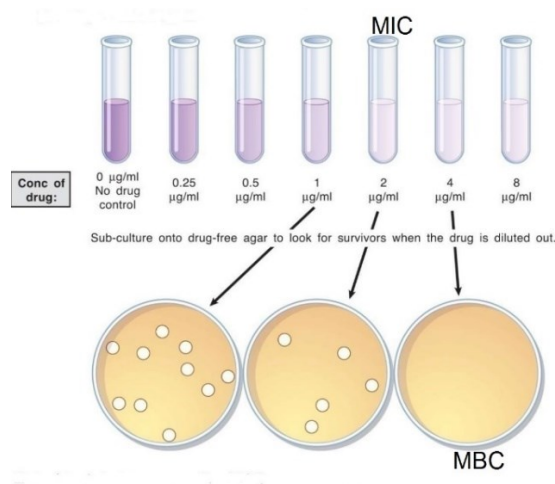
Εικόνα 3. Μέθοδος D-test. Αριστερά είναι τοποθετημένος δίσκος ερυθρομυκίνης και δεξιά δίσκος κλινδαμυκίνης. Η δοκιμασία είναι θετική και έτσι παρατηρείται ευθειασμός της ζώνης αναστολής ανάπτυξης του βακτηρίου στην κλινδαμυκίνη παρουσία του αντιβιοτικού ερυθρομυκίνη. Η αναστολή ανάπτυξης του βακτηρίου έχει το χαρακτηριστικό γράμμα “D”, από όπου και πήρε το όνομά της η δοκιμασία. Πηγή εικόνας: [Inducible Clindamycin Resistance \(D Test\) • Microbe Online](#)



#### 1.5.6.3 Δοκιμασία διαδοχικών αραιώσεων

Η συγκεκριμένη δοκιμασία μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε σε υγρό μέσο (ζωμός) είτε σε στερεό (άγαρ). Η αρχή της είναι ότι προσδιορίζεται η ανάπτυξη του βακτηρίου σε μέσο που περιέχει αντιβιοτικό γνωστής συγκέντρωσης. Όταν η δοκιμασία πραγματοποιείται σε υγρό μέσο τότε προστίθενται βακτήρια σε πηγάδια με γνωστές συγκεντρώσεις του ίδιου αντιβιοτικού, ενώ όταν πραγματοποιείται σε στερεό μέσο, τότε το ίδιο το μέσο περιέχει το αντιβιοτικό και γίνεται η επίστρωση του βακτηρίου πάνω σε αυτό (εικόνα 4). Το αποτέλεσμα που προκύπτει δηλώνει, πέραν της ύπαρξης ή όχι βακτηριακής ανάπτυξης, και την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του αντιβιοτικού που μελετάται, αλλά όχι με απόλυτη ακρίβεια (Giuliano et al., 2019)

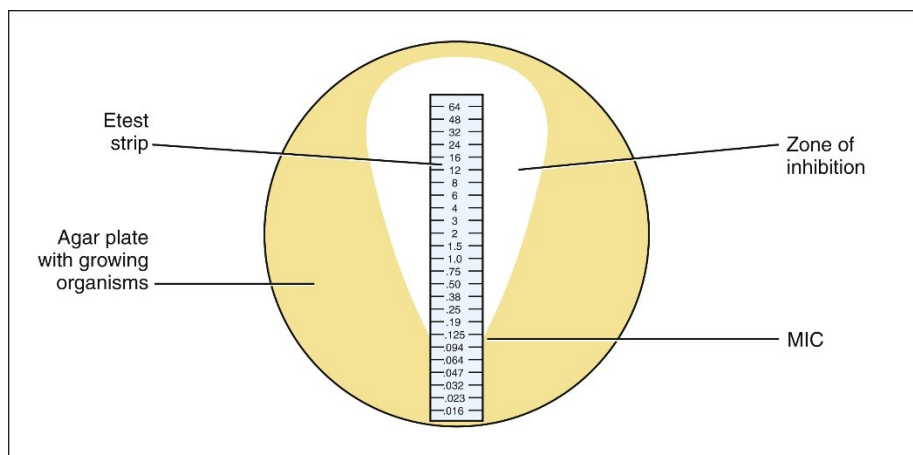
Εικόνα 4. Μέθοδος των αραιώσεων σε υγρό και στερεό μέσο. Και στις δύο περιπτώσεις εξετάζεται η ύπαρξη βακτηριακών αποικιών, οι οποίες καθορίζουν το οπτικό αποτέλεσμα. (Πηγή από την ιστοσελίδα [Antibiotic Susceptibility Testing: Disc Diffusion & Dilution Methods \(imicrobe.blogspot.com\)](http://Antibiotic Susceptibility Testing: Disc Diffusion & Dilution Methods (imicrobe.blogspot.com)))



#### 1.5.6.4 Συνδυασμός τεχνικών διάχυσης και αραιώσης: Μέθοδος E-test

Πραγματοποιείται σε στερεό μέσο ανάπτυξης, κατά προτίμηση Mueller- Hinton Agar. Παρασκευάζεται βακτηριακό εναιώρημα από αποικίες 24 ωρών και γίνεται επίστρωση του θρεπτικού μέσου με το συγκεκριμένο εναιώρημα. Το εναιώρημα πρέπει να έχει συγκεκριμένη συγκέντρωση κλίμακας McFarland ανάλογα με το είδος του βακτηρίου που μελετάται. Αφού γίνει η επίστρωση του μέσου τοποθετούνται ταινίες των επιθυμητών αντιβιοτικών. Κάθε ταινία είναι εμποτισμένη με διαφορετικές συγκεντρώσεις του ίδιου αντιβιοτικού οι οποίες και αναγράφονται στο μπροστινό μέρος της ταινίας. Ακολουθεί επώαση του τρυβλίου για 24 ώρες, ή για όσο χρόνο ενδείκνυται για κάθε βακτηριακό είδος, και αφού παρέλθει το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα γίνεται ανάγνωση των αποτελεσμάτων. Η εικόνα που προκύπτει από τη συγκεκριμένη δοκιμασία είναι πολύ χαρακτηριστική και αποτελείται από τη “ζώνη” αναστολής του βακτηρίου και έχει ελλειπτικό σχήμα. Η MIC προσδιορίζεται στο σημείο που η ζώνη αναστολής τέμνει την αντιβιοτική ταινία (εικόνα 5). Αν το σημείο τομής βρίσκεται ανάμεσα σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις, τότε ως MIC ορίζεται η μεγαλύτερη, αφού στην αμέσως μικρότερη υπάρχει ανάπτυξη του βακτηρίου (Giuliano et al., 2019).

Εικόνα 5. Μέθοδος E-test. Το κίτρινο μέρος της εικόνας αντιστοιχεί σε βακτηριακή ανάπτυξη ενώ το λευκό σε αναστολή αυτής. Η αντιβιοτική ταινία αναγράφει πάνω της διαφορετικές συγκεντρώσεις του ίδιου αντιβιοτικού. Ως MIC ορίζεται το σημείο τομής της ζώνης αναστολής (λευκό μέρος εικόνας) με την ταινία. Χρήση εικόνας από τον ιστότοπο [Metod e recta \(akwatoria.ru\)](http://Metod e recta (akwatoria.ru))



#### 1.5.6.5 Κλινικά όρια αντοχής του *S. pneumoniae* στις μακρολίδες

Προκειμένου να δοθεί μία καλύτερη εικόνα της αντοχής του *S. pneumoniae* έναντι των μακρολίδων, όπως αυτή προκύπτει με τις ανωτέρω τεχνικές, χρειάζεται να δοθούν τα κλινικά όρια της ευαισθησίας και της αντοχής του σε αυτές.

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Επιτροπή Κλινικής Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων, και πιο συγκεκριμένα με την Ευρωπαϊκή Επιτροπή Ελέγχου της Μικροβιακής Αντοχής (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST), η χρήση ερυθρομυκίνης είναι αντιπροσωπευτική για τον έλεγχο της αντοχής τόσο στο ίδιο το αντιβιοτικό όσο και σε αζιθρομυκίνη και κλαριθρομυκίνη, και με τις μεθόδους του E-test και με τη διάχυση δίσκων. Η ροξιθρομυκίνη εξετάζεται ξεχωριστά όταν πρόκειται να προσδιοριστεί η αντοχή του πνευμονιοκόκκου σε αυτή με τη μέθοδο του E-test ενώ όταν εξετάζεται με τη μέθοδο της διάχυσης δίσκων, η αντοχή σε αυτή μπορεί να προσδιοριστεί με χρήση της ερυθρομυκίνης.

Αναλυτικά, για τη μέθοδο του E-test ισχύουν τα παρακάτω για τον *S. pneumoniae* σύμφωνα με τις οδηγίες του EUCAST για το 2023 ([eucast: Clinical breakpoints and dosing of antibiotics](http://eucast: Clinical breakpoints and dosing of antibiotics)):

- κρίνεται ευαίσθητος στη δράση των αντιβιοτικών: ερυθρομυκίνη, αζιθρομυκίνη, κλαριθρομυκίνη όταν παρουσιάζει MIC < ή = με 0.25 mg/L, ενώ παρουσιάζει αντοχή σε αυτές για τιμές MIC > 0.25mg/L.

- κρίνεται ευαίσθητος στη δράση της ροξιθρομυκίνης για τιμή MIC  $< \text{ή} =$  με 0.5 mg/L, ενώ παρουσιάζει αντοχή στη δράση τους όταν η τιμή MIC είναι  $> 0.5$  mg/L.

Για τη μέθοδο της διάχυσης δίσκων ισχύουν τα παρακάτω, σύμφωνα με τις οδηγίες του EUCAST για το 2023 ([eucast: Clinical breakpoints and dosing of antibiotics](#)) :

- ο *S. pneumoniae* εμφανίζει αντοχή στις ανωτέρω μακρολίδες όταν η διάμετρος της ζώνης αναστολής είναι  $<$  από 22 mm, ενώ είναι ευαίσθητος στη δράση τους όταν η διάμετρος της ζώνης αναστολής είναι  $> \text{ή} =$  με 22 mm

#### 1.5.6.6 Αυτοματοποιημένα συστήματα προσδιορισμού μικροβιακής αντοχής

Πλέον δίνεται η δυνατότητα προσδιορισμού της μικροβιακής αντοχής των βακτηρίων με χρήση αυτοματοποιημένων συστημάτων. Βασίζονται στις αρχές της αραίωσης, ενώ τα πλήρως αυτοματοποιημένα συστήματα μπορούν να προσδιορίσουν την ευαισθησία των βακτηρίων στα αντιβιοτικά χάρη στην τοποθέτησή τους σε panel, την επώασή τους και την ανάγνωση των αποτελεσμάτων. Χάρη στη χρήση ειδικών αλγορίθμων μπορούν, επίσης, να προσδιορίσουν και τα επίπεδα ευαισθησίας/ αντοχής και σε άλλα αντιβιοτικά ενώ παρουσιάζουν στενά όρια λάθους. Μερικά από τα πλεονεκτήματα των αυτοματοποιημένων συστημάτων είναι η μείωση της εργασίας του εργαστηριακού προσωπικού και η ταχεία λήψη των αποτελεσμάτων.

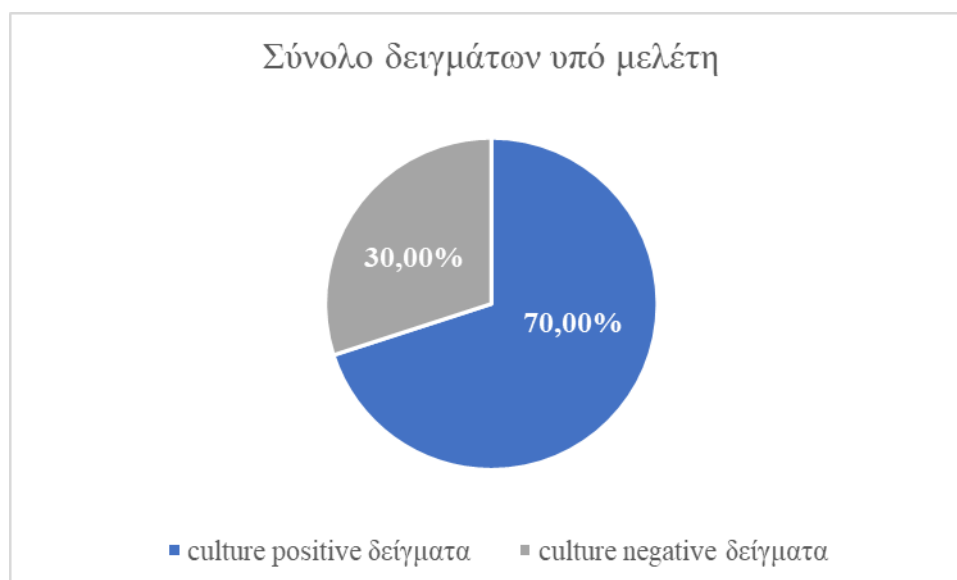
## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία είναι πλέον εμφανές πως ο *S. pneumoniae* αποτελεί ένα σημαντικό παθογόνο της σύγχρονης εποχής που προσβάλλει ευαίσθητες ηλικιακές και κοινωνικές ομάδες, και εμφανίζει μεγάλη γενετική ποικιλία και υψηλά ποσοστά μικροβιακής αντοχής σε πολλά αντιβιοτικά.

Ο προσδιορισμός της μικροβιακής αντοχής στηρίζεται κυρίως στις κλασικές μεθόδους οι οποίες μπορούν να διενεργηθούν μόνο όταν γίνει επιτυχής απομόνωση του βακτηρίου από τον ασθενή σε καλλιέργεια. Ωστόσο, επειδή η απομόνωση δεν είναι πάντα δυνατή, χάνεται χρήσιμη πληροφορία που μπορεί να χρησιμεύσει σε περαιτέρω επιτήρηση των χαρακτηριστικών του βακτηρίου.

Σκοπός λοιπόν της παρούσας ερευνητικής μελέτης ήταν η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου προσδιορισμού της ύπαρξης ή όχι μικροβιακής αντοχής του *S. pneumoniae* στις μακρολίδες, το οποίο θα είχε εφαρμογή τόσο σε βακτηριακά στελέχη όσο και σε κλινικά δείγματα, και θα έδινε αξιόπιστα αποτελέσματα και για τις δύο κατηγορίες δειγμάτων. Αυτή η ανάγκη προέκυψε από την υπεροχή των θετικών κλινικών δειγμάτων σε σχέση με τα στελέχη που απομονώθηκαν σε καλλιέργεια και ήταν διαθέσιμα προς μελέτη, καθώς από τα 90 συνολικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν, μόνο τα 27 ήταν στελέχη (30%, culture positive) ενώ τα 63 (70%, culture negative) ήταν δείγματα ωτικών υγρών αρνητικά στην καλλιέργεια (διάγραμμα 1). Όλα προέρχονταν από παιδιά με οξεία μέση ωτίτιδα ή οξεία μαστοειδίτιδα.

Διάγραμμα 1. Ποσοστό διαθέσιμων κλινικών δειγμάτων (culture negative= 63) και βακτηριακών στελεχών (culture positive= 27) που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.





## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Υλικά

#### 2.1.1 Δείγματα που μελετήθηκαν

Η τεχνική αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε σε στελέχη *S. pneumoniae* και στη συνέχεια σε κλινικά δείγματα (ωτικά υγρά) που είχαν αποσταλεί στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας (Ε.Κ.Α.Μ.). Συνολικά εξετάστηκαν 90 δείγματα παιδιών με κλινικά χαρακτηριστικά οξείας μέσης ωτίτιδας/ οξείας μαστοειδίτιδας που συλλέχθηκαν από το 2010 έως και τον Απρίλιο του 2023.

Συγκεκριμένα, ήταν διαθέσιμα προς μελέτη 27 στελέχη (30% των συνολικών δειγμάτων), η αρχική απομόνωση των οποίων είχε γίνει στα νοσοκομεία νοσηλείας των ασθενών, και ακολούθησε εκ νέου καλλιέργεια και ταυτοποίηση του υπεύθυνου βακτηρίου που ήταν ο *S.pneumoniae*. Δεν υπήρχε κανένα κλινικό δείγμα που να συνοδευόταν από τα αντίστοιχο βακτηριακό στέλεχος απομονωμένο από το νοσοκομείο.

Η ταυτοποίηση των δειγμάτων ως προς το υπεύθυνο βακτήριο έγινε την περίοδο παραλαβής τους στο εργαστήριο (2010-2022), με χρήση multiplex PCR που ανιχνεύει ταυτόχρονα τα βακτήρια *Neisseria meningitidis*, *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae type b* και *Listeria monocytogenes* (Tzanakaki et al., 2005). Επιπλέον είχε προηγηθεί περαιτέρω τυποποίηση τους ώστε να προσδιοριστούν ως προς τον ορότυπο, μέσω multiplex PCR και περαιτέρω επεξεργασίας του μέσω αλληλούχισης του γονιδιώματος του καψιδίου (Capsular Sequence Typing, CST)(Marmaras et al., 2021).

Δεδομένα για το εμβολιαστικό προφίλ των παιδιών ήταν διαθέσιμα για 47 ασθενείς, αλλά θεωρούμε πως είχαν εμβολιαστεί όλα τα παιδιά, καθώς η περίοδος μελέτης ξεκινάει από το 2010, τη χρονιά δηλαδή που εντάχθηκε το 13-δύναμο συζευγμένο πνευμονοκοκκικό εμβόλιο στο Εθνικό Πρόγραμμα Εμβολιασμών της Ελλάδας.

#### 2.1.2 Θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη της πολλαπλής τεχνικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (multiplex PCR, mPCR)

##### Θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες

Προκειμένου να εξασφαλιστεί πως τόσο οι μεμονωμένες όσο και η πολλαπλή τεχνική που θα αναπτυχθούν παρακάτω (βλ. παράγραφο 2.4.2), ήταν αξιόπιστες ως προς τα αποτελέσματα που έδιναν, χρησιμοποιήθηκαν θετικοί και αρνητικοί μάρτυρας.



Θετικό μάρτυρα για το κάθε επιθυμητό γονίδιο αποτέλεσε βακτηριακό DNA που είχε απομονωθεί από καλλιέργεια 24ώρου του κάθε μικροοργανισμού που ήταν προηγουμένως γνωστό πως έφερε το υπό εξέταση γονίδιο (*mefA/E*, *ermB*, *ermA/TR*). Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 3 βακτηριακά στελέχη: 1 αποτέλεσε θετικό μάρτυρα για το γονίδιο *mefA/E*, 1 αποτέλεσε θετικό μάρτυρα για το γονίδιο *ermA/TR*, και 1 αποτέλεσε θετικό μάρτυρα για το γονίδιο *ermB*. Πριν τη χρήση του, ο κάθε μάρτυρας φωτομετρήθηκε και χρησιμοποιήθηκε ποσότητα αυτού αραιωμένη κατάλληλα ώστε το τελικό προϊόν να αντιστοιχεί σε 5ng/ μl. Για την πολλαπλή τεχνική παρασκευάστηκε μείγμα των 3 μαρτύρων το οποίο περιείχε 1ng/ μl από το κάθε γονίδιο- στόχο.

Ο αρνητικός μάρτυρας χρησίμευσε για τον αποκλεισμό των επιμολύνσεων (ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων), και για τη συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιήθηκε δις- απεσταγμένο νερό.

### 2.1.3 Υλικά για τις κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές

- Έτοιμα τριβλία αιματούχου άγαρ (Blood agar (horse blood)), Bioprepare, Ελλάδα
- Έτοιμα τριβλία MUELLER HINTON άγαρ 5% v/v horse blood, Bioprepare, Ελλάδα
- Θρεπτικός ζωμός (Brain Heart Infusion Broth, OXOID CM0225, Hampshire, Ηνωμένο Βασίλειο
- Phosphate Buffer Saline (PBS) 0.1M pH 7.4, Sigma Aldrich, Γερμανία
- Tris-Hcl (TR04251000), Scharlau, Sentmenat, Ισπανία
- Tris base (TR04251000), Scharlau, Sentmenat, Ισπανία
- Γλυκερόλη, Glycerol 99.5%, Scharlau, Ισπανία
- Strips ερυθρομυκίνης, 0.016-256μg/ml , LIOFILCHEM, S.R.L., Ιταλία
- Tris-HCl Buffer 1M pH 8.0, JENA BIOSCIENCE, Γερμανία
- COTTON BUDS, SARSTEDT, Γερμανία
- Κρικοφόροι στυλεοί 1μl και 10μl, SARSTEDT, Γερμανία

### 2.1.4 Υλικά για τις μοριακές τεχνικές

- Νερό για μοριακή τεχνική (water for molecular biology), APPLICHEM
- Ρυθμιστικό διάλυμα: Phusion GC Buffer Pack (New England Biolabs, Ipswich, England)
- Phusion High-Fidelity DNA polymerase set, New England Biolabs, Ipswich, England)

- Deoxynucleotide (dNTPs) DNA solution set, New England Biolabs, Ipswich, Ηνωμένο Βασίλειο
- Kapa 2G Fast Multiplex mix, KAPA Biosystems, Cape Town, Νότιος Αφρική
- Εκκινητικά μόρια, Eurofins Genomics, Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής

#### 2.1.5 Υλικά για ανάγνωση των αποτελεσμάτων της μοριακής τεχνικής

- Σκόνη αγαρόζης, Agarose, Nippon Genetics, Ιαπωνία
- GelRed Nucleic Acid Gel Prestaining Kit, Biotium, Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής
- 10x TBE buffer, AppliChem, ITW Reagents, S.R.L, Ιταλία
- Ladder FastGene, 100bp DNA, Nippon Genetics, Ιαπωνία

#### 2.1.6 Μηχανήματα για τις μικροβιολογικές και μοριακές τεχνικές

- Doppio thermal cycler, Doppio Gradient 2 x 48 well, VWR, Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής
- Heat Block, M502-HBD, MPM, Ιταλία
- PowerPack, 3000, BIO-RAD, Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής
- pHMeter, Basic pH Meter, Denver Instrument Company, Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής
- Hellenic Labware, KE-80A, Hellenic Labware, Ελλάδα
- Binder CO2 Incubator, CB-S / CB-S-UL, Binder, Γερμανία
- Autoclave, Tuttnauer, Ολλανδία
- MagCore HF 16 nucleic acid extraction system (RBC Bioscience, New Taipei City, Taiwan)
- Θερμαινόμενος αναδευτήρας, Magnetic Stirrer, Velp Scientifica, Ιταλία

## 2.2 Μέθοδοι

### 2.2.1 Καλλιέργειες και συντήρηση βακτηριακών στελεχών

Όλα τα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε έτοιμα τρυβλία αιματούχου άγαρ Έτοιμα τριβλία αιματούχου άγαρ ((Blood agar (horse blood)), Bioprepere, Ελλάδα) και επώαστηκαν στους 37°C παρουσία 5% v/v CO<sub>2</sub> για 24 ώρες. Κάθε στέλεχος ήταν συντηρημένο από την χρονολογία που είχε παραληφθεί στο εργαστήριο, σε συνθήκες βαθιάς κατάψυξης στους -80°C σε θρεπτικό ζωμό, Brain Heart Infusion Broth (Brain Heart Infusion Broth, OXOID CM0225, Hampshire, Ηνωμένο Βασίλειο). Για την επεξεργασία τους, αυτά ξεπάγωσαν σε

συνθήκες δωματίου, και καλλιεργήθηκαν στα θρεπτικά υλικά υπό στείρες συνθήκες με χρήση φλόγας. Τα τρυβλία με το θρεπτικό υλικό φυλάσσονται στους 4°C έως ότου χρησιμοποιηθούν. Με το τέλος της επεξεργασίας των στελεχών, οι 24ωρες καλλιέργειές τους, φυλάχθηκαν ξανά για πιθανή μελλοντική χρήση σε , Brain Heart Infusion Broth.

\*Παρασκευή θρεπτικού ζωμού συντήρησης

1. Για παρασκευή 500ml θρεπτικού υλικού προστίθενται 500ml απιονισμένου νερού και 17,5 g Brain Heart Infusion Broth. Το διάλυμα τοποθετείται σε θερμαινόμενο αναδευτήρα (Magnetic Stirrer, Velp Scientifica, Ιταλία), όπου και αναδεύεται με τη βοήθεια μαγνήτη.
2. Μόλις το διάλυμα γίνει ομοιογενές και διαυγές απομακρύνεται από τον αναδευτήρα και προστίθεται σε αυτό 125 ml γλυκερόλης (Glycerol 99.5%, Scarlau, Ισπανία). Στη συνέχεια αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο (Hellenic Labware, KE-80A, Hellenic Labware, Ελλάδα) στους 121°C για 15 min.
3. Στη συνέχεια μοιράζεται από 1 ml του υλικού σε cryovials όγκου 2ml.
4. Τα cryovials τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 37°C για 24h, για να ελεγχθούν τυχόν επιμολύνσεις.
5. Το υλικό συντηρείται στους 4 °C.

### 2.2.2 Έλεγχος ευαισθησίας του *S. pneumoniae* στις μακρολίδες (E-test)

Η ευαισθησία των στελεχών στις μακρολίδες ελέγχθηκε ώστε να γίνει συσχέτιση των αποτελεσμάτων της μοριακής μεθόδου με τον φαινότυπο του βακτηρίου, και συγκεκριμένα για να προσδιοριστεί ποιοτικά η ύπαρξη των γονιδίων αντοχής έναντι των μακρολίδων. Η ευαισθησία ελέγχθηκε με τη μέθοδο του E-test με ταινίες ερυθρομυκίνης συγκέντρωσης 0.016-256µg/ml (Strips ερυθρομυκίνης, 0.016-256µg/ml , LIOFILCHEM, S.R.L., Ιταλία). Γίνεται παρασκευή εναιωρήματος 24ωρου βακτηριακού στελέχους σε 1ml διαλύματος Phosphate Buffer Saline (PBS) (0.1M pH 7.4, Sigma Aldrich, Γερμανία). Το εναιώρημα πρέπει να αντιστοιχεί σε θολερότητα 0.5 της κλίμακας McFarland (θολερότητα ίση με 1 της κλίμακας για στελέχη οροτύπου 3 καθώς παρουσιάζουν γλοιώδεις αποικίες). Γίνεται ανάδευση του εναιωρήματος (vortex) και στη συνέχεια με χρήση βαμβακοφόρου στυλεού (COTTON BUDS, SARSTEDT, Γερμανία) πραγματοποιείται επίστρωση αυτού σε έτοιμα αιματούχα τρυβλία Mueller Hinton Agar 5% (MUELLER HINTON άγαρ 5% v/v horse blood, Bioprepate, Ελλάδα). Στη συνέχεια, σε κάθε τρυβλίο τοποθετείται μία ταινία (strip) ερυθρομυκίνης, η οποία είναι εμποτισμένη κατά μήκος της με διαφορετικές συγκεντρώσεις του συγκεκριμένου αντιβιοτικού. Τα τρυβλία επωάζονται στη συνέχεια σε κλίβανο στους 37°C σε συνθήκες 5% CO<sub>2</sub> για 24 ώρες.

Έπειτα από το απαραίτητο χρονικό διάστημα γίνεται ανάγνωση του E-test. Ως ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση ορίζεται η ελάχιστη τιμή της συγκέντρωσης του αντιβιοτικού, για την οποία είναι αδύνατη η ανάπτυξη του βακτηρίου (ζώνη αναστολής).

### 2.2.3 Μέθοδοι απομόνωσης γενετικού υλικού

#### 2.2.3.1 Απομόνωση γενετικού υλικού από βακτηριακά στελέχη

Για να απομονωθεί το DNA από τα βακτηριακά στελέχη, χρειάζεται να υπάρχει διαθέσιμη 24ωρη καλλιέργεια του βακτηρίου, από την οποία παρασκευάζεται εναιώρημα σε 200μl διαλύματος Tris\* (Tris base (TR04251000), Scharlau, Sentmenat, Ισπανία) σε σωληνάριο τύπου erpendorf. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση (vortex) και θέρμανσή του σε θερμαινόμενη πλάκα στους 100°C για 10 min. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 14.000 στροφές (rpm) για 12 min. Τέλος το υπερκείμενο διάλυμα που περιέχει το DNA μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάριο Eppendorf και φυλάσσεται στους -20°C, ενώ το ίζημα απορρίπτεται.

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

Γίνεται ανάμειξη 0.635gr Tris-HCl Tris-Hcl (TR04251000), Scharlau, Sentmenat, Ισπανία) και 0.118gr Tris base) με 500 ml απιονισμένου νερού. Γίνεται έλεγχος του pH ώστε να εξασφαλιστεί ότι θα είναι 7,3 στους 25°C. Σε αντίθετη περίπτωση ρυθμίζεται κατάλληλα.. Τέλος το διάλυμα διοχετεύεται σε φίλτρα, διαδικασία που πραγματοποιείται σε στείρο περιβάλλον.

#### 2.2.3.2 Απομόνωση γενετικού υλικού από δείγματα ωτικών υγρών

Η απομόνωση του γενετικού υλικού, από αρχική ποσότητα 200μl κάθε κλινικού δείγματος έγινε σε συσκευή MagCore HF 16, με χρήση του kit MagCore® Genomic DNA Whole Blood Kit system (RBC Bioscience, New Taipei City, Taiwan), σε τελικό όγκο 100μl.

## 2.3 Επιλογή εκκινητικών μορίων (primers) για την μοριακή ανίχνευση των γονιδίων αντοχής έναντι των μακρολίδων- Ανάπτυξη πολλαπλής τεχνικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

### 2.3.1 Επιλογή εκκινητικών μορίων

Η επιλογή των εκκινητικών μορίων (primers) έγινε σύμφωνα με υπάρχουσες δημοσιεύσεις που είχαν προηγουμένως ασχοληθεί με ταυτόχρονη ή μεμονωμένη ανίχνευση γονιδίων αντοχής έναντι στις μακρολίδες σε στελέχη *Streptococcus* spp. Τα κρήρια επιλογής των εκκινητών αποτέλεσαν:

- Η δυνατότητα συνύπαρξής τους και η ικανοποιητική δράση τους σε κοντινές θερμοκρασίες τήξης ( $T_m$ ).
- Η αποφυγή υβριδισμού μεταξύ τους.
- Η παραγωγή PCR προϊόντων που είναι δυνατόν να διαχωριστούν ευκρινώς σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, βάση του μεγέθους τους, ως αποτέλεσμα multiplex PCR. Για τον έλεγχο των παραπάνω προϋποθέσεων των εκκινητικών μορίων, χρησιμοποιήθηκε το ελεύθερο λογισμικό FastPCR ([www.primerdigital.com/fastpcre.html](http://www.primerdigital.com/fastpcre.html)).

### 2.3.2 Έλεγχος εκκινητικών μορίων ως προς την ειδικότητα προς τα γονίδια-στόχους

Όλα τα εκκινητικά μόρια ελέγχθηκαν ως προς τον υβριδισμό τους προς τα επιθυμητά γονίδια στόχους με χρήση του BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), ώστε να διερευνηθεί σε ένα πρώτο στάδιο η ειδικότητά τους στα εν λόγω γονίδια.

### 2.3.3 Ανάπτυξη πολλαπλής τεχνικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Η πειραματική πορεία βασίστηκε σε υπάρχουσα αντίστοιχη πειραματική τεχνική πολλαπλής ανίχνευσης των γονιδίων που είχε πραγματοποιηθεί στο EKAM (*Xirogianni et al., 2009*) και τροποποιήθηκε κατάλληλα λόγω διαφοροποίησης των συνθηκών της (μηχανήματα και αντιδραστήρια). Αυτή ακολούθησε την εξής πειραματική πορεία:

- i. Πραγματοποίηση μονών αντιδράσεων για κάθε ζεύγος εκκινητών που αντιστοιχούν στο κάθε γονίδιο, ώστε να καθοριστούν οι συνθήκες υβριδισμού και πολλαπλασιασμού του γενετικού υλικού για το κάθε γονίδιο.
- ii. Ταυτόχρονη ανίχνευση και των 3 γονιδίων-στόχων και κατάλληλη προσαρμογή των αντιδραστηρίων και των συνθηκών της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, ώστε να είναι δυνατή η λήψη αξιόπιστου και αξιόλογου οπτικού αποτελέσματος.
- iii. Εφαρμογή της δοκιμής στα βακτηριακά στελέχη ώστε να εξασφαλιστεί η ειδικότητα της αντίδρασης ανάλογα με το γονίδιο αντοχής/ βακτηριακό φαινότυπο.
- iv. Εφαρμογή της τεχνικής απευθείας σε κλινικά δείγματα και προσαρμογή συνθηκών και αντιδραστηρίων ώστε να εξαλειφθούν κατά το δυνατό τα μη ειδικά προϊόντα.
- v. Έλεγχος ευαισθησίας της τεχνικής για να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία των θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων.

## 2.4 Πολλαπλή PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των γονιδίων αντοχής *mefA/E*, *ermA/TR*, *ermB* έναντι των μακρολίδων

### 2.4.1 Εκκινητικά μόρια

Οι εκκινητές Εκκινητικά μόρια, (Eurofins Genomics, Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής) επιλέχθηκαν σύμφωνα με τις δημοσιεύσεις των Zeng *et al.* 2006 (Zeng *et al.*, 2006) και Poyart (Poyart *et al.*, 2003) *et al.* 2003 (πίνακας 2). Συγκεκριμένα η δημοσίευση των Zeng *et al.* 2006 αποτέλεσε τη βάση για τη χρήση των εκκινητικών μορίων για τα γονίδια *mefA/E* (*mefS/mefA*), τα οποία εμπλέκονται στον μηχανισμό της αντλίας, και για το γονίδιο *ermB* (*ermBS/ermBA*), που κωδικοποιεί τη μεθυλάση και προκαλεί μεθυλίωση στο βακτηριακό ριβόσωμα και αντοχή σε μακρολίδες, λινκοσαμίδες και στρεπτογραμμίνη Β. Οι εκκινητές για το γονίδιο *ermB* τροποποιήθηκαν με την αφαίρεση μερικών νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο τους, ώστε η θερμοκρασία υβριδισμού τους να είναι πιο κοντά με αυτή των υπόλοιπων εκκινητικών μορίων που επιλέχθηκαν. Η δημοσίευση των Poyart *et al.* 2003 αξιοποιήθηκε για τη χρήση των εκκινητικών μορίων για τα γονίδια *ermA/TR* (*ermatrA/ermatrS*) τα οποία έχουν την ίδια ιδιότητα με το γονίδιο *ermB*.

Πίνακας 2. Στοιχεία για τα εκκινητικά μόρια (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των γονιδίων *mefA/E*, *ermA/TR* και *ermB* αντίστοιχα.

ΟΝΟΜΑΣΙΑ PRIMER	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ 5'-3'	ΓΟΝΙΔΙΟ ΣΤΟΧΟΣ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ	ΜΕΓΕΘΟΣ	Δημοσίευση
			T <sub>m</sub> (°C)	ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ (bp)	
<b>mef A</b>	CTG TTC TTC TGG TAC TAA AAG TGG	<i>mef</i>	53	360	<i>Zheng et al.</i> , 2006
<b>mef S</b>	GGC AGG GCA AGC AGT ATC	<i>mef</i>	57		
<b>ermTR A</b>	ATA CTT TTT GTA GTC CTT CTT	<i>ermA/TR</i>	47	459	<i>Poyart et al.</i> , 2003
<b>ermTR S</b>	TCA GGA AAA GGA CAT TTT ACC	<i>ermA/TR</i>	51		
<b>ermB A</b>	GGA ACA TCT GTG GTA TGG	<i>ermB</i>	50	211	<i>Zheng et al.</i> , 2006
<b>ermB S</b>	TGG TTT TTG AAA GCC ATG	<i>ermB</i>	50		

## 2.4.2 Ανάπτυξη της τεχνικής: πειραματικά στάδια

### ΣΤΑΔΙΟ Ι: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΤΩΝ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν μεμονωμένες δοκιμασίες ανίχνευσης για κάθε γονίδιο. Αυτές διαμορφώθηκαν ανάλογα με τις θερμοκρασίες υβριδισμού για κάθε ζεύγος primers. Έτσι για τα γονίδια *ermB* και *ermA/TR*, των οποίων οι εκκινήτες παρουσιάζουν κοντινές  $T_m$ , χρησιμοποιήθηκε στην αρχή ένα κοινό πρόγραμμα (πίνακας 3), ενώ η δοκιμασία ανίχνευσης του *mefA/E* πραγματοποιήθηκε σε ξεχωριστό πρόγραμμα του θερμικού κυκλοποιητή (Doppio thermal cycler, Doppio Gradient 2 x 48 well, VWR, Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής) (πίνακας 4).

Πίνακας 3. Στοιχειομετρία και συνθήκες αντίδρασης για τη μεμονωμένη ανίχνευση των γονιδίων αντοχής *ermB* & *ermA/TR*.

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ 1	ΣΥΝΘΗΚΕΣ	PCR MIX
ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>ermB</i> , <i>ermA/TR</i>	95°C 2 min 95°C 30 sec 55°C 15 sec 72°C 30 sec 72°C 1 min 4°C forever } 33 κύκλοι	Buffer 1x 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,6mM dNTPs 1U Taq/ αντίδραση 0,8μM primer <i>ermb</i> 0,6 μM primer <i>ermtr</i> 5μl DNA template Τελικός όγκος 25μl

Πίνακας 4. Στοιχειομετρία και συνθήκες αντίδρασης για τη μεμονωμένη ανίχνευση των γονιδίων αντοχής *mefA/E*.

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ 2	ΣΥΝΘΗΚΕΣ	PCR MIX
ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>mefA/E</i>	95°C 3 min 95°C 15 sec 57°C 15 sec 72°C 30 sec 72°C 1 min 4°C forever } 30 κύκλοι	Buffer 1x 0,8 mM MgCl <sub>2</sub> 0,4 mM dNTPs 0,5U Taq/ αντίδραση 0,1μM primer mef 5μl DNA template Τελικός όγκος 25μl

Τα παραπάνω προγράμματα διαμορφώθηκαν σύμφωνα με τις δημοσιεύσεις των Zeng *et al.*, 2006 και Royart *et al.*, 2003 που αποτέλεσαν τις ερευνητικές εργασίες από τις οποίες επιλέχθηκαν τα μόρια- εκκινήτες (Royart *et al.*, 2003; Zeng *et al.*, 2006).

Η ανίχνευση των γονιδίων δεν ήταν ικανοποιητική, καθώς τα τρία γονίδια δεν μπορούσαν να ανιχνευθούν επαρκώς. Για την επίλυση αυτού του προβλήματος θεωρήθηκε αρχικά σημαντική η αλλαγή του προγράμματος της PCR με βάση την τεχνική της touchdown PCR όπου χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδισμού σε δύο στάδια:

58°C στο πρώτο στάδιο για 15 κύκλους και 57°C στο δεύτερο στάδιο για 18 κύκλους (πίνακας 5), στο οποίο εφαρμόστηκε ένα ενδιάμεσο στάδιο που πραγματοποιείται στην τεχνική της touchdown PCR (παράγραφος 1.2.1.2.3) . Έτσι διαμορφώθηκε το παρακάτω πρόγραμμα.



Πίνακας 5. Δοκιμή των μεμονωμένων τεχνικών με πρόγραμμα της touchdown PCR.

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ 3	ΣΥΝΘΗΚΕΣ	PCR MIX
MEMONΩΜΕΝΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>mefA/E, ermB,</i> <i>ermA/TR</i> (κοινό πρόγραμμα)	95°C 3 min	Buffer 1x
	95°C 15 sec	0,4 mM MgCl <sub>2</sub>
	58°C 15 sec	0,4 mM dNTPs
	72°C 30 sec	0,5U Taq/ αντίδραση
	95°C 15 sec	0,8 μM primer ermB
	57°C 15 sec	0,05 μM primer mef
	72°C 30 sec	0,6 μM primer ermtr
	72°C 1 min	1μl DNA template
	4°C forever	Τελικός όγκος 25μl

Καθώς η απόδοση των τελικών προϊόντων δεν ήταν εξίσου ικανοποιητική για όλα τα γονίδια, έγινε δοκιμή για μείωση των κύκλων αποδιάταξης- υβριδισμού-επιμήκυνσης στο δεύτερο στάδιο της αντίδρασης (πίνακας 6).

Πίνακας 6. Ενδιάμεσο πρόγραμμα (πρόγραμμα 4) μεμονωμένων αντιδράσεων ανίχνευσης των γονιδίων αντοχής *mefA/E, ermB* και *ermA/TR* έναντι των μακρολίδων.

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ 4	ΣΥΝΘΗΚΕΣ	PCR MIX
MEMONΩΜΕΝΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>mefA/E, ermB,</i> <i>ermA/TR</i> (κοινό πρόγραμμα)	95°C 3 min	Buffer 1x
	95°C 15 sec	0,4 mM MgCl <sub>2</sub>
	58°C 15 sec	0,4 mM dNTPs
	72°C 30 sec	0,5U Taq/ αντίδραση
	95°C 15 sec	0,8 μM primer ermB
	57°C 15 sec	0,05 μM primer mef
	72°C 30 sec	0,6 μM primer ermtr
	72°C 1 min	1μl DNA template
	4°C forever	Τελικός όγκος 25μl

Τα συνεχή μη ικανοποιητικά αποτελέσματα οδήγησαν στην αλλαγή αντιδραστηρίων. Συγκεκριμένα το GC Buffer (Phusion GC Buffer Pack (New England Biolabs, Ipswich, England), τα dNTPs (Deoxynucleotide (dNTPs) DNA solution set, New England Biolabs, Ipswich, Ηνωμένο Βασίλειο) και η Taq πολυμεράση (Phusion High-Fidelity DNA polymerase set, New England Biolabs, Ipswich, England) αντικαταστάθηκαν από το αντιδραστήριο Kapa 2G Fast Multiplex mix (Kapa 2G Fast Multiplex mix, KAPA

Biosystems, Cape Town, Νότιος Αφρική), το οποίο περιέχει Taq πολυμεράση με το buffer της και dNTPs.

Το πρωτόκολλο με το νέο αντιδραστήριο αρχικά δοκιμάστηκε με τις ίδιες ποσότητες του κάθε ζεύγους primers ενώ έγινε επιστροφή στο αρχικό πρόγραμμα του κυκλοποιητή, καθώς δεν είχε παρατηρηθεί ιδιαίτερη βελτίωση με τη μείωση των κύκλων του προγράμματος. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε μείωση του τελικού όγκου της αντίδρασης από 25μl σε 20μl (πίνακας 7).

Πίνακας 7. Διαμόρφωση πρωτοκόλλου με αντικατάσταση αντιδραστηρίων GC Buffer, MgCl<sub>2</sub> και Taq polymerase από το Kara mix.

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ 5	ΣΥΝΘΗΚΕΣ	PCR MIX
MEMONΩΜΕΝΕΣ	95°C 3 min	Kara mix 1x
ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ	95°C 15 sec	0,0 mM MgCl <sub>2</sub>
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ	58°C 15 sec	0,0 mM dNTPs
ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ	72°C 30 sec	0,5U Taq/ αντίδραση
<i>mefA/E, ermB,</i>	95°C 15 sec	0,8 μM primer ermB
<i>ermA/TR</i> (κοινό	57°C 15 sec	0,05 μM primer mef
πρόγραμμα)	72°C 30 sec	0,6 μM primer ermtr
	72°C 1 min	3μl DNA template
	4°C forever	Τελικός όγκος 20μl

Η παραπάνω αλλαγή έδωσε ενθαρρυντικά αποτελέσματα και για το λόγο αυτό αποφασίστηκε οι δοκιμασίες από εκείνο το σημείο και έπειτα να πραγματοποιηθούν με τη χρήση του αντιδραστηρίου Kara mix.

## ΣΤΑΔΙΟ ΙΙ: ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΓΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ PCR

Σε αυτό το στάδιο, έγινε συνδυασμός των 3 ζευγών εκκινητικών μορίων, ώστε να είναι δυνατή η ταυτόχρονη ανίχνευση των γονιδίων. Για το σκοπό αυτό, έγιναν αυξομειώσεις των primers για όλα τα γονίδια και αύξηση του Kara mix από 1X σε 1.2X. Τέλος, αναπροσαρμόστηκε η ποσότητα του DNA template και πραγματοποιήθηκε σύνθεση ενός κοινού θετικού μάρτυρα ο οποίος περιείχε στην ίδια συγκέντρωση το κάθε ένα από τα DNA των τριών γονιδίων (*mefA/E, ermB, ermA/TR*).

Πίνακας 8. Αλλαγή στις ποσότητες των εκκινητών για κάθε γονίδιο ώστε να είναι δυνατή η ταυτόχρονη ανίχνευση και των 3 γονιδίων (*mefA/E*, *ermB*, *ermA/TR*).

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ 6	ΣΥΝΘΗΚΕΣ	PCR MIX
multiplex PCR για τα γονίδια <i>mefA/E</i> , <i>ermB</i> , <i>ermA/TR</i>	95°C 3 min	Buffer 1.2x 1 μM primers ermB 0,03 μM primers mef 0.1 μM primers ermtr 3μl DNA template Τελικός όγκος 20μl
	95°C 15 sec	
	58°C 15 sec	
	72°C 30 sec	
	95°C 15 sec	
	57°C 15 sec	
	72°C 30 sec	
	72°C 1 min	
	4°C forever	

### ΣΤΑΔΙΟ ΙΙΙ: ΔΟΚΙΜΗ ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Η ρύθμιση των παραμέτρων που αναφέρθηκαν παραπάνω (πρόγραμμα 6, πίνακας 8) έδωσε ένα ικανοποιητικό αποτέλεσμα ως προς την απόδοση των προϊόντων και των τριών γονιδίων, και έτσι έγινε εφαρμογή του έως τώρα πρωτοκόλλου στο γενετικό υλικό των βακτηριακών στελεχών.

### ΣΤΑΔΙΟ ΙV: ΔΟΚΙΜΗ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ- ΡΥΘΜΙΣΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ

Τα πρώτα αποτελέσματα από την εφαρμογή της τεχνικής σε κλινικά δείγματα περιείχαν πάρα πολλά μη ειδικά προϊόντα ενώ παράλληλα η ένταση των ειδικών προϊόντων μειώθηκε σημαντικά. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αλλαγές (αυξομειώσεις) στη συγκέντρωση του buffer mix (Καρα mix) οι οποίες συνοδεύονταν και από αυξομειώσεις στις συγκεντρώσεις των primers, έτσι ώστε να διατηρηθεί η ισορροπία ανάμεσα στα παραγόμενα προϊόντα. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε επιπλέον μείωση της θερμοκρασίας υβριδισμού στους 54°C στο 2<sup>ο</sup> στάδιο της αντίδρασης ώστε να αυξηθεί η συνολική απόδοση και ευαισθησία της τεχνικής. Έτσι το τελικό πρωτόκολλο που δημιουργήθηκε ήταν κατάλληλο να ανιχνεύει γονίδια τόσο σε κλινικά δείγματα όσο και σε βακτηριακά στελέχη. Το τελικό πρωτόκολλο που διαμορφώθηκε είχε την εξής στοιχειομετρία και πραγματοποιήθηκε στις παρακάτω συνθήκες (πίνακας 9).

Πίνακας 9. Τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων και συνθήκες υβριδισμού που αποτέλεσαν το τελικό πρωτόκολλο ταυτόχρονης ανίχνευσης και των 3 γονιδίων.

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ 7	ΣΥΝΘΗΚΕΣ	PCR MIX
multiplex PCR για τα γονίδια <i>mefA/E</i> , <i>ermB</i> , <i>ermA/TR</i>	95°C 3 min	Buffer 1.2x 0.1μM primers <i>ermB</i> 0.05μM primers <i>mef</i> 0.125μM primers <i>ermtr</i> 3μl DNA template Τελικός όγκος 20μl
	95°C 15 sec	
	58°C 15 sec	
	72°C 30 sec	
	95°C 15 sec	
	54°C 15 sec	
	72°C 30 sec	
	72°C 1 min	
4°C forever		

#### ΣΤΑΔΙΟ IV: ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ

Η ευαισθησία της παραπάνω τεχνικής ελέγχθηκε με εφαρμογή της σε βακτηριακά στελέχη, στα οποία έγιναν διαδοχικές αραιώσεις ώστε να προσδιοριστεί η ελάχιστη ποσότητα γενετικού υλικού που θα ανιχνευόταν. Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ειδικά για τα γονίδια στόχους και προέρχονταν από 24ωρες καλλιέργειες έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η καλή ποιότητα του γενετικού τους υλικού. Για τη συγκεκριμένη διαδικασία παρασκευάστηκαν διαλύματα του κάθε βακτηρίου που αντιστοιχούσαν σε ποσότητα DNA 5ng/μl, 0.5 ng/μl (500 pg/μl), 0.05 ng/μl (50 pg/μl), 0.005 ng/μl (5 pg/μl), αφού πρώτα η αρχική ποσότητα DNA που απομονώθηκε, φωτομετρήθηκε ώστε να αραιωθεί κατάλληλα για να έχει τελική συγκέντρωση 5ng/μl. Έπειτα πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις 1/10 του πρώτου διαλύματος ώστε να παρασκευαστούν και οι υπόλοιπες αραιώσεις.

Μία επιπλέον δοκιμασία που πραγματοποιήθηκε για να διαπιστωθεί η ευαισθησία της τεχνικής ήταν η δοκιμή στην PCR παρασκευασμένων τεχνητά θετικών κλινικών δειγμάτων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ωτικών υγρών που είχαν προηγουμένως εξεταστεί και ήταν αρνητικά. Τα δείγματα ενοφθαλμίστηκαν με βακτηριακό DNA θετικό για τα εν λόγω γονίδια, συγκέντρωσης 5 ng/μl και 0.5 ng/μl (“spiked” samples). Συνεπώς κατά τη διάρκεια της απομόνωσης γενετικού υλικού με το kit MagCore (απόδοση 90-100%), για 100μl DNA δείγματος απομονώνονται 4.5 -5 ng/μl (0.45-0.5 ng/μl αντίστοιχα) βακτηριακού γενετικού υλικού (5ng/ 100μl και 0.5ng/ 100μl). Η τελική συγκέντρωση του θετικού DNA σε αυτά τα δείγματα ανέρχεται σε 0.05ng/μl και 0.005ng/μl.

## **2.5 Ανάγνωση αποτελεσμάτων multiplex PCR**

Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης (σκόνη αγαρόζης, Agarose, Nippon Genetics, Ιαπωνία), 2% w/v ενώ το υπόλοιπο 98% αποτελούσε διάλυμα TBE 1X (10x TBE buffer, AppliChem, ITW Reagents, S.R.L, Ιταλία). Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση μπλε και πράσινου φωτός. Για τη χρώση των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε χρωστική Gel Red 6X (GelRed Nucleic Acid Gel Prestaining Kit, Biotium, Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής) σε τελική συγκέντρωση 1X (3μl χρωστικής σε 20μl PCR προϊόντος). Σε κάθε ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε μάρτυρα μοριακού βάρους 100bp (Ladder FastGene, 100bp DNA, Nippon Genetics, Ιαπωνία).

\*Παρασκευή διαλύματος TBE 1X

Σε 9 L απιονισμένου νερού προστίθεται 1L TBE 10X και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 Αποτελέσματα δοκιμασίας E-test στα βακτηριακά στελέχη

Τα διαθέσιμα βακτηριακά στελέχη ελέγχθηκαν ως προς την ευαισθησία τους στην ερυθρομυκίνη ώστε να γίνει συσχέτιση του φαινοτύπου με τον γονότυπο. Από τα 27 στελέχη *S. pneumoniae* τα 17 (17/27, 62,96%) ήταν ευαίσθητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό, δηλαδή εμφάνιζαν ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση στην ερυθρομυκίνη (MIC)  $\leq 0,25$  mg/L. Τα υπόλοιπα 11 στελέχη ήταν ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη (MIC  $>0.25$ mg/L). Συνολικά παρατηρήθηκε πως τα στελέχη τα οποία χαρακτηρίστηκαν ευαίσθητα στην ερυθρομυκίνη, παρουσίασαν ένα μεγάλο εύρος τιμών ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας ( $\leq 0.016$  έως και 0.25 mg/L), ενώ τα στελέχη που χαρακτηρίστηκαν ανθεκτικά έδωσαν υψηλές τιμές MIC ( $\geq 8$  mg/L). Τέλος 3 από τα 17 στελέχη (17,65%) που έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα στην εφαρμογή της μοριακής τεχνικής, εμφάνισαν οριακή τιμή ευαισθησίας στην ερυθρομυκίνη (MIC= 0.25mg/L) με βάση τις τιμές που προτείνει το EUCAST.

Παρακάτω παρατίθενται πίνακας (πίνακας 10) με τα αναλυτικά αποτελέσματα της δοκιμασίας του E- test.

Πίνακας 10. Αναλυτικά αποτελέσματα της μεθόδου E-test στα βακτηριακά στελέχη. Αναγράφονται οι τιμές ευαισθησίας/ αντοχής στην ερυθρομυκίνη και το πλήθος των βακτηριακών στελεχών (n1, n2) που αντιστοιχούν σε αυτές.

	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ <i>S. pneumoniae</i>	ΤΙΜΕΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΕ ΕΡΥΘΡΟΜΥΚΙΝΗ (mg/L)	ΤΙΜΕΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΕ ΕΡΥΘΡΟΜΥΚΙΝΗ (mg/L)
Αριθμός στελεχών <i>S. pneumoniae</i> ευαίσθητα στην ερυθρομυκίνη (n1=16)	1	$\leq 0,016$	-
	2	0,064	-
	1	0,094	-
	3	0,125	-
	5	0,19	-
	4	0,25	-
Αριθμός στελεχών <i>S. pneumoniae</i> ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη (n2=11)	1	-	8
	1	-	48
	9	0	$>256$

### 3.2 Πολλαπλή PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των γονιδίων αντοχής *mefA/e*, *ermB*, *ermA/tr* έναντι του μικροοργανισμού *S. pneumoniae*

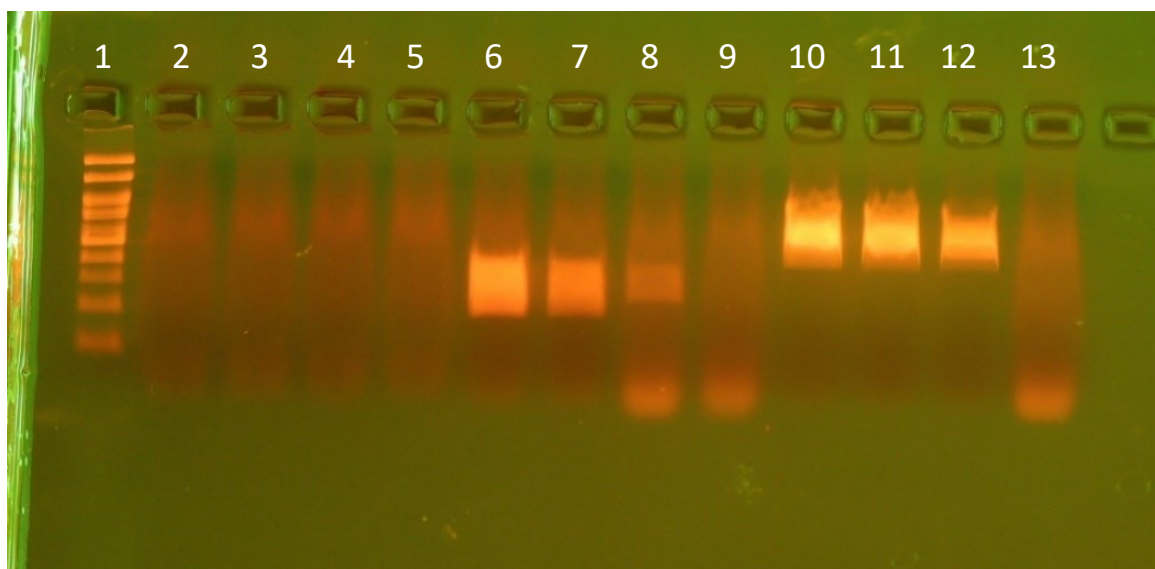
#### 3.2.1 Στάδια ανάπτυξης της πειραματικής τεχνικής

#### ΣΤΑΔΙΟ Ι: ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ – ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ

Η δοκιμή ανίχνευσης κάθε γονιδίου έγινε με τις ίδιες συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων αλλά σε διαφορετικά προγράμματα του θερμικού κυκλοποιητή για κάθε γονίδιο (προγράμματα 1 & 2, πίνακες 3 & 4 αντίστοιχα) έτσι ώστε να μπορεί να αξιολογηθεί το κατά πόσο είναι δυνατόν να επιτευχθεί η μεμονωμένη ανίχνευσή τους. Η αρχική δοκιμασία έδωσε προϊόν για τα γονίδια *ermA/TR* (459bp) (εικόνα 6, διαδρομές 10-12) και *mefA/E* (360bp) (εικόνα 6, διαδρομές 6-9) αλλά όχι για το γονίδιο *ermB* (211 bp) (εικόνα 6, διαδρομές 2-5).

Τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά αφού το γονίδιο *ermB* δεν ήταν ανιχνεύσιμο, η οπτική απεικόνιση των γονιδίων *mefA/E* και *ermA/TR* δεν είχε την ίδια ένταση, ενώ απουσίαζε η ευκρίνεια καθώς είχαν έντονο “smear”.

Εικόνα 6. Αρχικές δοκιμασίες μεμονωμένων τεχνικών PCR. Διαδρομή 1: μάρτυρας μοριακού βάρους (ladder, 100 bp, διαδρομές 2-5: προϊόν θετικό για το γονίδιο *ermB* (πρόγραμμα 1, πίνακας 3), διαδρομές 6-9: προϊόν θετικό για το γονίδιο *mefA/E* (πρόγραμμα 2, πίνακας 4), διαδρομές: 10-12: προϊόν θετικό για το γονίδιο *ermA/TR* (προγράμματα 1 & 2, πίνακες 3 & 4 αντίστοιχα). Διαδρομή 13: αρνητικός μάρτυρας (δix απιονισμένο νερό).



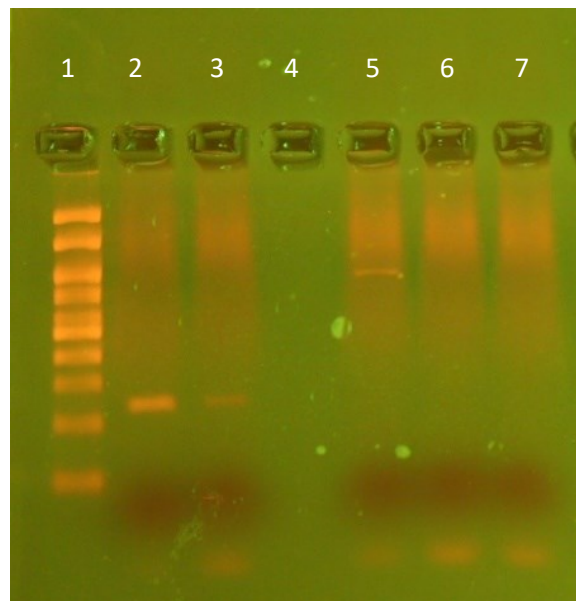


Για το λόγο αυτό έγιναν οι εξής αλλαγές:

- Έγινε μετάβαση σε ένα κοινό πρόγραμμα του θερμικού κυκλοποιητή (πρόγραμμα 3, βλ. πίνακα 5) στο οποίο οι συνθήκες της αντίδρασης χωρίστηκαν σε δύο στάδια (touchdown PCR). Ο συνολικός αριθμός των κύκλων του προγράμματος παρέμεινε ο ίδιος με αυτούς του προγράμματος 1 αλλά μοιράστηκε σε 15 επαναλήψεις στο πρώτο στάδιο (Ta 58°C) και σε 18 επαναλήψεις στο δεύτερο στάδιο (Ta 57°C).
- Επιπλέον με σκοπό τη μείωση του “smear” που εμφανίστηκε στα προϊόντα, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δοκιμασίες με αλλαγές στις συγκεντρώσεις των εκκινητών για όλα τα γονίδια (*ermB*, *mefA/E*, *ermA/TR*) και αλλαγή της ποσότητας του DNA template.

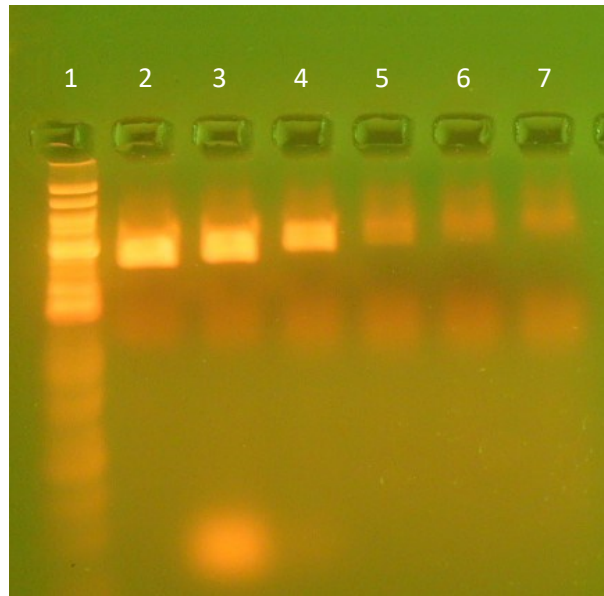
Τα αποτελέσματα των αλλαγών για κάθε μία από τις PCR παρουσιάζονται στις εικόνες 7 (γονίδιο *ermB*), 8 (γονίδιο *mefA/E*) και 9 (γονίδιο *ermA/TR*). Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των τριών μεμονωμένων PCR παρατηρήθηκε ότι τα γονίδια *mefA/E* και *ermA/TR* ανιχνεύονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0.05 ng/μl) (εικόνες 8 & 9) ενώ για το γονίδιο *ermB* η απόδοση της PCR δεν είναι καλή ούτε στη συγκέντρωση των 5 ng/μl (εικόνα 7).

Εικόνα 7. Δοκιμασία ανίχνευσης του γονιδίου *ermB* σύμφωνα με το πρόγραμμα 3 (πίνακας 5). 1<sup>η</sup> διαδρομή: ladder (μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους), διαδρομές 2,3,5 και 6: θετικός μάρτυρας για το γονίδιο *ermB* συγκέντρωσης 5ng/μl και διαδοχικές αραιώσεις του στα 0, 5ng/μl, 0,05ng/μl και 0,005ng/μl αντίστοιχα. Διαδρομή 7: αρνητικός μάρτυρας (δύο απιονισμένο νερό).

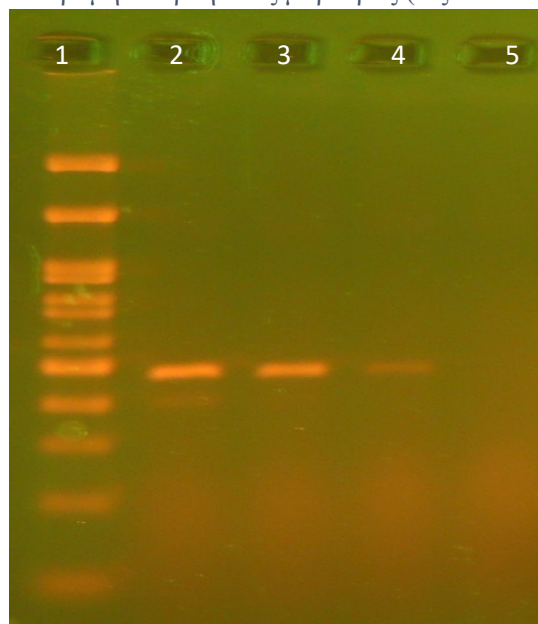




Εικόνα 8. Δοκιμασία ανίχνευσης του γονιδίου *mefA/E* σύμφωνα με το πρόγραμμα 3 (πίνακας 5). 1η διαδρομή: ladder (μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους), διαδρομές 2-6: θετικός μάρτυρας για το γονίδιο *mefA/E* συγκέντρωσης 5ng/μl, 1ng/μl και διαδοχικές αραιώσεις του στα 0, 5ng/μl, 0,05ng/μl και 0,005ng/μl αντίστοιχα. Διαδρομή 7: αρνητικός μάρτυρας (δισ απιονισμένο νερό).

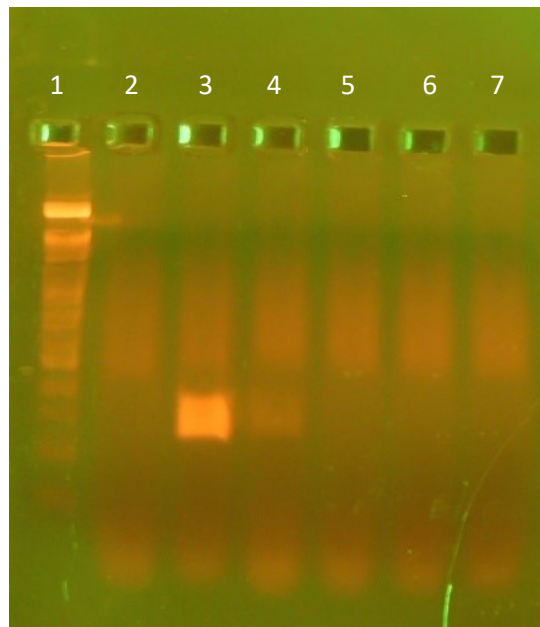


Εικόνα 9. Δοκιμασία ανίχνευσης του γονιδίου *ermA/TR* σύμφωνα με το πρόγραμμα 3 (πίνακας 5). 1η διαδρομή: ladder (μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους), διαδρομές 2-4: θετικός μάρτυρας για το γονίδιο *ermA/TR* συγκέντρωσης 5ng/μl και διαδοχικές αραιώσεις του στα 0, 5ng/μl και 0,05ng/μl. Διαδρομή 5: αρνητικός μάρτυρας (δισ απιονισμένο νερό).

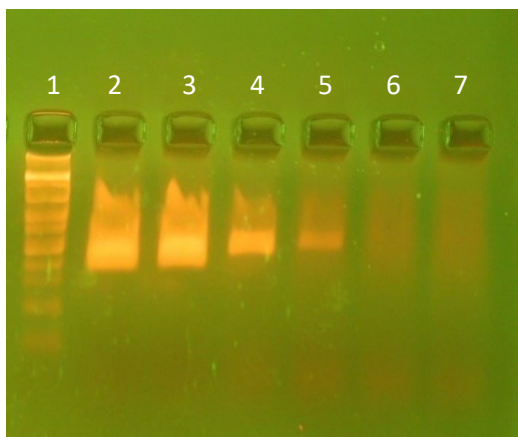


Για να εξετάσουμε το ενδεχόμενο μη απόδοσης λόγω αναστολής της PCR για το γονίδιο *ermB*, επόμενο βήμα αποτέλεσε η μείωση των κύκλων του δεύτερου σταδίου του προγράμματος του θερμικού κυκλοποιητή από 18 σε 15 (πρόγραμμα 4, βλ. πίνακα 6). Η συγκεκριμένη αλλαγή δεν ωφέλησε την ένταση των προϊόντων (εικόνα 10) της PCR για το *ermB*. Επιπλέον τα αποτελέσματα ήταν κακής ποιότητας σε σχέση με τα προηγούμενα και για τις άλλες δύο PCR για τα γονίδια *mefA/E* και *ermA/TR* (εικόνες 11 & 12 αντίστοιχα) και για το λόγο αυτό απορρίφθηκε. Οι συγκεντρώσεις των εκκινητών και η ποσότητα του DNA κάθε αντίδρασης παρέμεινε σταθερή, όπως αναγράφεται στο πρόγραμμα 3 (πίνακας 5).

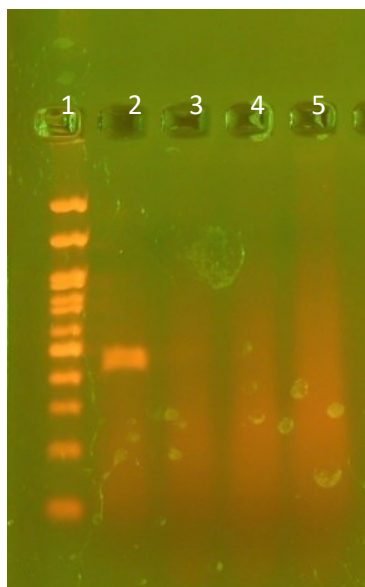
Εικόνα 10. Δοκιμασία ανίχνευσης του γονιδίου *ermB* σύμφωνα με το πρόγραμμα 4 (πίνακας 6). 1η διαδρομή: ladder (μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους), διαδρομή 2: αρνητικός μάρτυρας (δισαπιονισμένο νερό), διαδρομές 3-7: θετικός μάρτυρας για το γονίδιο *ermB* συγκέντρωσης 5ng/μl και διαδοχικές αραιώσεις του στα 0.5ng/μl, 0.05ng/μl και 0.005ng/μl αντίστοιχα.



Εικόνα 11. Δοκιμασία ανίχνευσης του γονιδίου *mefA/E* σύμφωνα με το πρόγραμμα 4 (πίνακας 6). 1η διαδρομή: ladder (μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους), διαδρομές 2-5: θετικός μάρτυρας για το γονίδιο *mefA/E* συγκέντρωσης 5ng/μl, 1ng/μl και διαδοχικές αραιώσεις του στα 0,5ng/μl, 0,05ng/μl και 0,005ng/μl αντίστοιχα. Διαδρομή 6: αρνητικός μάρτυρας (δισ απιονισμένο νερό).



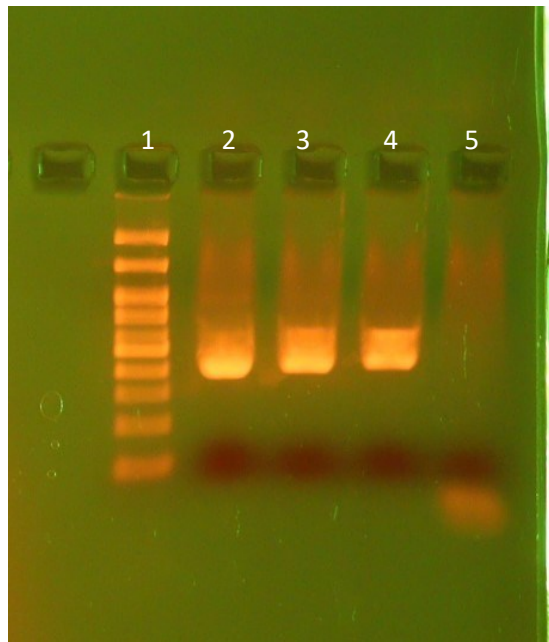
Εικόνα 12. Δοκιμασία ανίχνευσης του γονιδίου *ermA/TR* σύμφωνα με το πρόγραμμα 4 (πίνακας 6). 1η διαδρομή: ladder (μάρτυρας γ γνωστού μοριακού βάρους), διαδρομές 2-4: θετικός μάρτυρας για το γονίδιο *ermA/TR* συγκέντρωσης 5ng/μl και διαδοχικές αραιώσεις του στα 0, 5ng/μl και 0,05ng/μl αντίστοιχα. Διαδρομή 5: αρνητικός μάρτυρας (δισ απιονισμένο νερό).



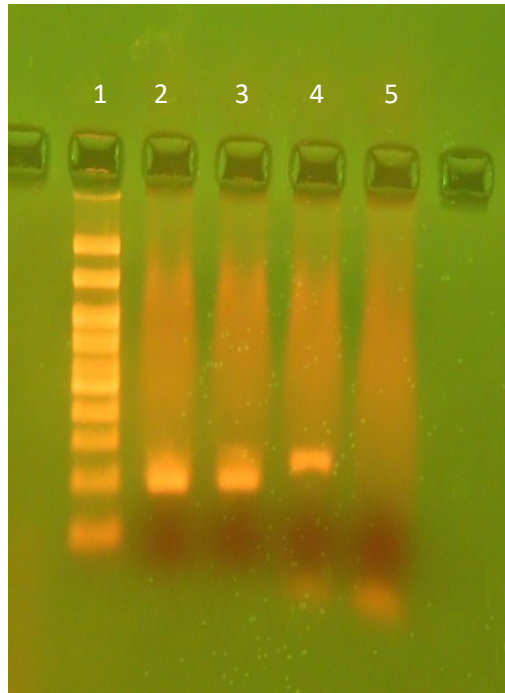
Τα συνεχή μη ικανοποιητικά αποτελέσματα οδήγησαν στην αντικατάσταση των αντιδραστηρίων από το Kara 2G Fast multiplex PCR mix. Ταυτόχρονα έγινε επιστροφή στις συνθήκες του προγράμματος 3 (αύξηση του αριθμού των κύκλων σε 18 στο δεύτερο στάδιο της αντίδρασης). Οι παραπάνω αλλαγές συνοψίζονται στο πρόγραμμα 5 (πίνακας 7).

Τα αποτελέσματα των ανωτέρω δοκιμασιών ήταν σαφώς καλύτερα και για τα τρία γονίδια, με το προϊόν για κάθε γονίδιο να δίνει ευδιάκριτο οπτικό αποτέλεσμα μεγάλης έντασης όπως φαίνεται στις εικόνες 13, 14 και 15 αντίστοιχα. Για το λόγο αυτό οι δοκιμές συνεχίστηκαν με χρήση του Kara mix.

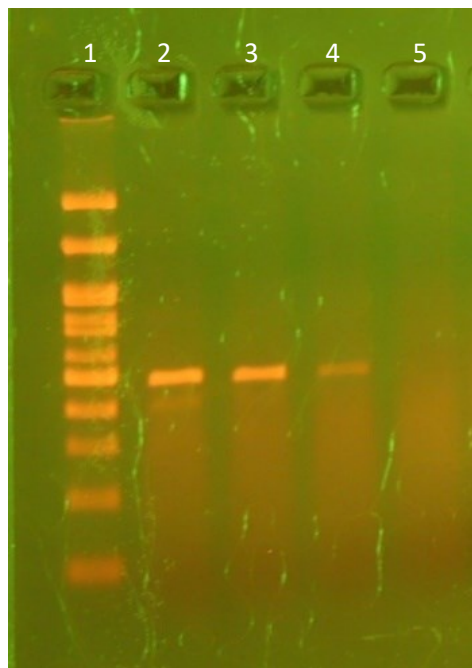
Εικόνα 13. Δοκιμασία ανίχνευσης του γονιδίου *mefA/E* στο πρόγραμμα 5 (πίνακας 7). Διαδρομή 1: ladder (μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους), διαδρομές 2-4: θετικός μάρτυρας για το γονίδιο *mefA/E*. Διαδρομή 5: αρνητικός μάρτυρας (δισ-απιονισμένο νερό)



Εικόνα 14. Δοκιμασία ανίχνευσης του γονιδίου *ermB* στο πρόγραμμα 5 (πίνακας 7). Διαδρομή 1: ladder (μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους), διαδρομές 2-4: θετικός μάρτυρας για το γονίδιο *ermB*. Διαδρομή 5: αρνητικός μάρτυρας (δισ απιονισμένο νερό).



Εικόνα 15. Δοκιμασία ανίχνευσης του γονιδίου *ermA/TR* στο πρόγραμμα 5 (πίνακας 7). Διαδρομή 1: ladder (μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους), διαδρομές 2-4: θετικός μάρτυρας για το γονίδιο *ermA/TR*. Διαδρομή 5: αρνητικός μάρτυρας (δισ απιονισμένο νερό).

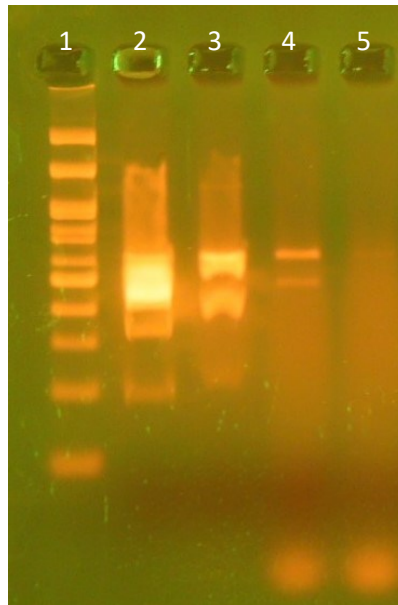


## ΣΤΑΔΙΟ ΙΙ: ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΓΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ PCR- ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ

Σε αυτό το στάδιο, έγινε συνδυασμός των 3 ζευγών εκκινητικών μορίων, ώστε να είναι δυνατή η ταυτόχρονη ανίχνευση των γονιδίων.

Η αρχική δοκιμασία έγινε σύμφωνα με τις παραμέτρους του προγράμματος 5 (πίνακας 7), αλλά δεν έδωσε καλό οπτικό αποτέλεσμα, καθώς η ανίχνευση των γονιδίων (*ermB*, *mefA/E*, *ermA/TR*) ήταν άνιση.

Εικόνα 16. 1η δοκιμή multiplex PCR και για τα 3 γονίδια αντοχής έναντι των μακρολιδών σύμφωνα με το πρόγραμμα 5 (πίνακας 7). Διαδρομή 1: μάρτυρας μοριακού βάρους, διαδρομές 2-4: θετικός μάρτυρας σε συγκέντρωση 5 ng/μl, 0.5 ng/μl και 0.05 ng/μl αντίστοιχα, Τα γονίδια που διακρίνονται είναι με σειρά αυξανόμενου μοριακού βάρους, το *ermB*, το *mefA/E* και το *ermA/TR*.



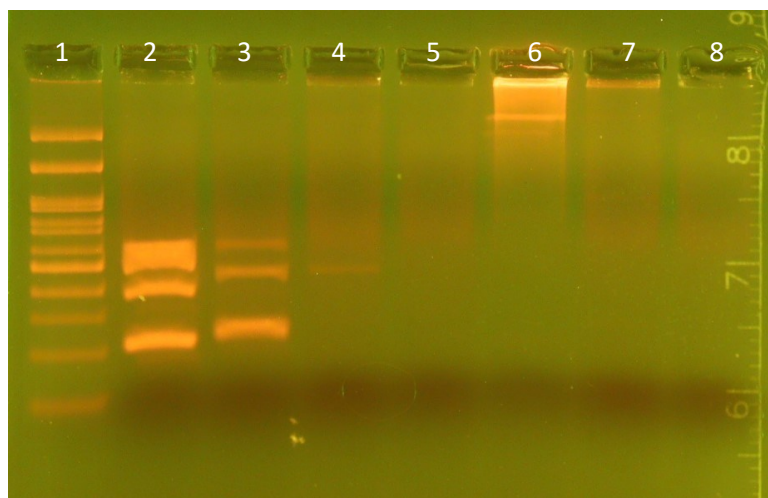
Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες αλλαγές:

- i. Έγιναν προσαρμογές στο πρόγραμμα του θερμικού κυκλοποιητή, ενώ πραγματοποιήθηκαν και αυξομειώσεις των primers για όλα τα γονίδια (πρόγραμμα 6, βλ. πίνακα 8)
- ii. Προσαρμόστηκε η ποσότητα του DNA template στα 3μl από 1μl. Τέλος παράχθηκε θετικός μάρτυρας για την πολλαπλή δοκιμή, ο οποίος περιείχε γενωμικό υλικό σε συγκέντρωση 1ng/μl από κάθε DNA στόχο.



Αποτέλεσμα των παραπάνω αλλαγών ήταν η ικανοποιητική ανίχνευση των γονιδίων *ermA/TR* και *mefA/E*, και *ermB*.

Εικόνα 17. Ταυτόχρονη ανίχνευση των γονιδίων *ermB*, *mefA/E*, *ermA/TR* (πρόγραμμα 6, πίνακας 8). Διαδρομή 1: μάρτυρας μοριακού βάρους (100bp), διαδρομές 2&3: θετικός μάρτυρας και για τα 3 γονίδια, διαδρομές 4-7: διάφορα βακτηριακά στελέχη εκ των οποίων μόνο ένα ήταν θετικό για το γονίδιο *mefA/E*. Διαδρομή 8: αρνητικός μάρτυρας (δύο απιονισμένο νερό).



### ΣΤΑΔΙΟ ΙΙΙ: ΔΟΚΙΜΗ ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

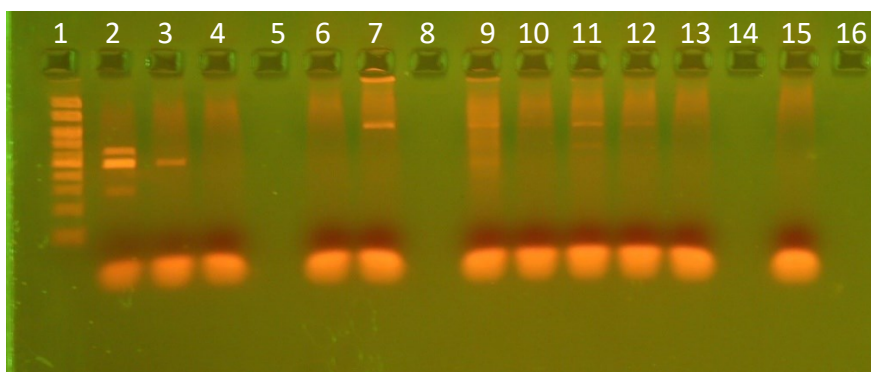
Τα στελέχη ήταν σημαντικά για τη συγκεκριμένη τεχνική, καθώς αφενός προσέφεραν στην ευρύτερη εφαρμογή της τεχνικής, αφετέρου αποτέλεσαν έναν τρόπο επαλήθευσης της μοριακής τεχνικής, διότι χρησιμοποιήθηκαν και ως επαλήθευση των αποτελεσμάτων του ελέγχου του φαινοτύπου τους μέσω της δοκιμασίας του E-test. Επιπλέον έδωσαν ένα ποσοτικό αποτέλεσμα και έκαναν δυνατή την επιπλέον συσχέτιση των γονιδίων αντοχής με τον βαθμό αντοχής που αυτά προσφέρουν στα βακτηριακά στελέχη που τα φέρουν στο γονιδίωμά τους.

Με την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τα βακτηριακά στελέχη έγινε επιπλέον συσχέτιση των γονιδίων αντοχής με τα επίπεδα της MIC.

### ΣΤΑΔΙΟ ΙV: ΔΟΚΙΜΗ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Η πρώτη εφαρμογή της τεχνικής στα κλινικά δείγματα (πρόγραμμα 6, πίνακας 8) έδωσε μη ειδικά προϊόντα (εικόνα 18). Συνεπώς χρειάστηκε περαιτέρω προσαρμογή των συνθηκών της αντίδρασης αλλά και της συγκέντρωσης των αντιδραστηρίων.

Εικόνα 18. Εφαρμογή σε κλινικά δείγματα (πρόγραμμα 6, πίνακας 8). Διαδρομή 1: μάρτυρας μοριακού βάρους, διαδρομές 2-4 & 6: θετικός μάρτυρας των τριών γονιδίων, συγκέντρωσης 5 ng/ml, με τις αραιώσεις του (1:10, 1:100 και 1:1000 αντίστοιχα, διαδρομές 7 & 9-1: κλινικά δείγματα, που εμφανίζουν προϊόντα εκτός της περιοχής ανίχνευσης των γονιδίων. Διαδρομή 15: αρνητικό μάρτυρας (δix απιονισμένο νερό).

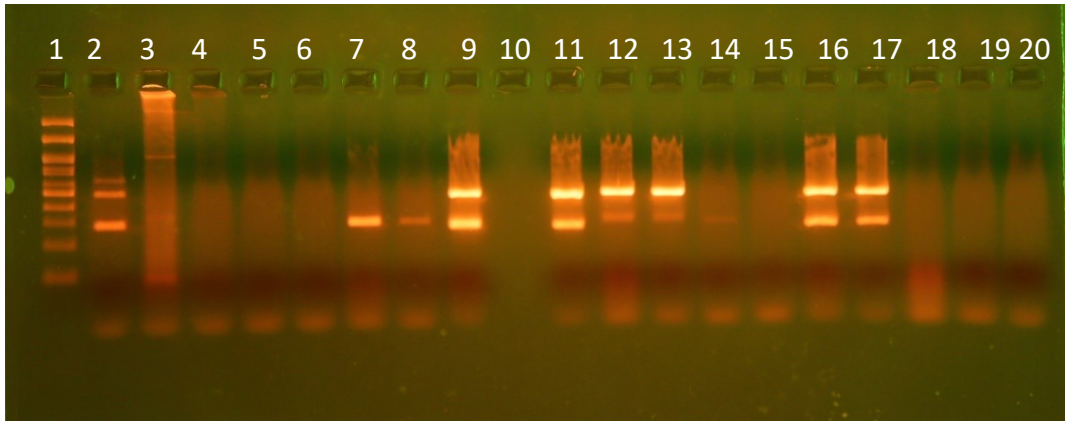


Αυτό συνέβη γιατί τα κλινικά δείγματα έφεραν εκτός από το γενωμικό υλικό του βακτηρίου, και το ανθρώπινο γενωμικό υλικό που επηρέαζε την ειδικότητα και την ευαισθησία της αντίδρασης.

Η αναπροσαρμογή των αντιδραστηρίων με σκοπό την εξάλειψη των μη ειδικών προϊόντων επηρέασε παράλληλα και την ένταση των τελικών προϊόντων, με αποτέλεσμα να χρειαστεί να γίνουν περαιτέρω αλλαγές, και συγκεκριμένα μείωση των συγκεντρώσεων των εκκινητικών μορίων για τα γονίδια. Το τελικό πρωτόκολλο που διαμορφώθηκε (πρόγραμμα 7, πίνακας 9) δίνει τη δυνατότητα ικανοποιητικής ανίχνευσης και των τριών γονιδίων, ενώ έχει ελαχιστοποιηθεί κατά το δυνατό η ενίσχυση των μη ειδικών προϊόντων (εικόνα 19).



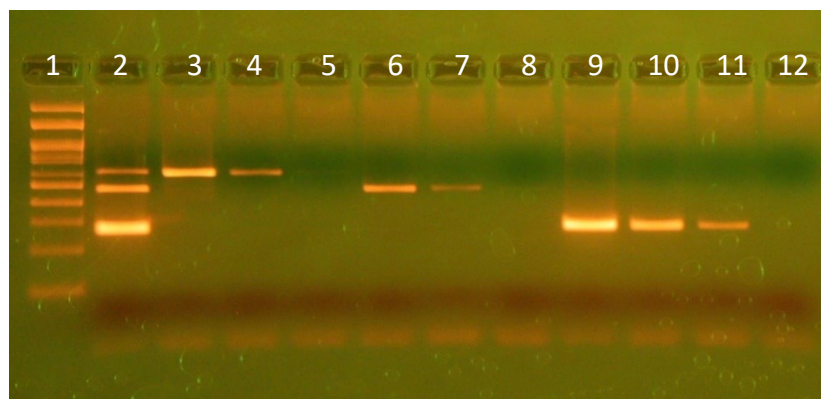
Εικόνα 19. Δοκιμασία του τελικού πρωτοκόλλου ανίχνευσης των 3 γονιδίων (πρόγραμμα 7, πίνακας 9). Διαδρομή 1: μάρτυρας μοριακού βάρους (100bp). Διαδρομή 2: θετικός μάρτυρας σε συγκέντρωση 500pg/μl, διαδρομές 3-19: κλινικά δείγματα, διαδρομή 20: αρνητικός μάρτυρας.



#### ΣΤΑΔΙΟ V: ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ

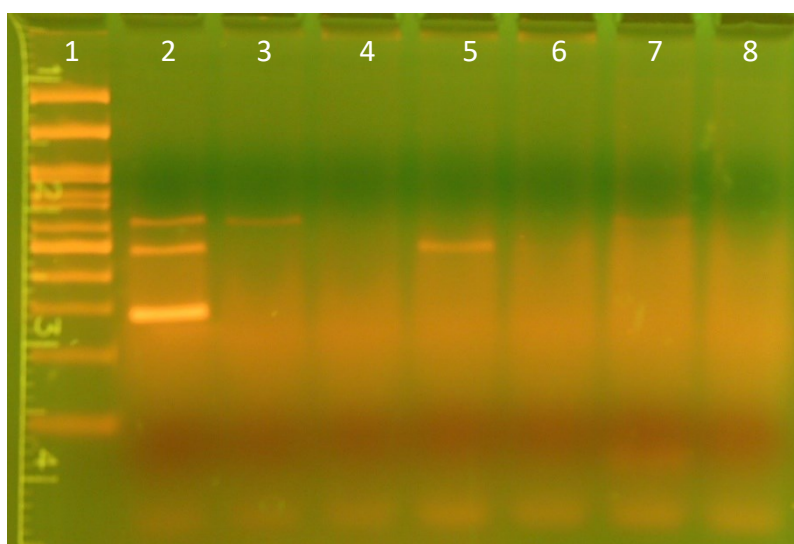
Η συγκεκριμένη δοκιμασία, ελέγχθηκε ως προς την ευαισθησία της με διαδοχικές αραιώσεις γενετικού υλικού. Η ευαισθησία κρίνεται υψηλή καθώς επετεύχθη ανίχνευση βακτηριακού γενετικού υλικού συγκέντρωσης έως και 50 pg/μl (εικόνα 20) και για τα τρία γονίδια.

Εικόνα 20. Δοκιμασία ευαισθησίας των 3 γονιδίων (πρόγραμμα 7, πίνακας 9). Διαδρομή 1: μάρτυρας μοριακού βάρους (ladder), διαδρομή 2: θετικός μάρτυρας και για τα 3 γονίδια (*ermB*, *mefA/E*, *ermA/TR*). Διαδρομές 3-5: στέλεχος θετικό για το γονίδιο *ermA/TR* σε συγκεντρώσεις 500pg/μl, 50 pg/μl, 5 pg/μl, όπως γίνεται και διαδρομές 6-8 και 9-11 για τα γονίδια *mefA/E* και *ermB* αντίστοιχα.



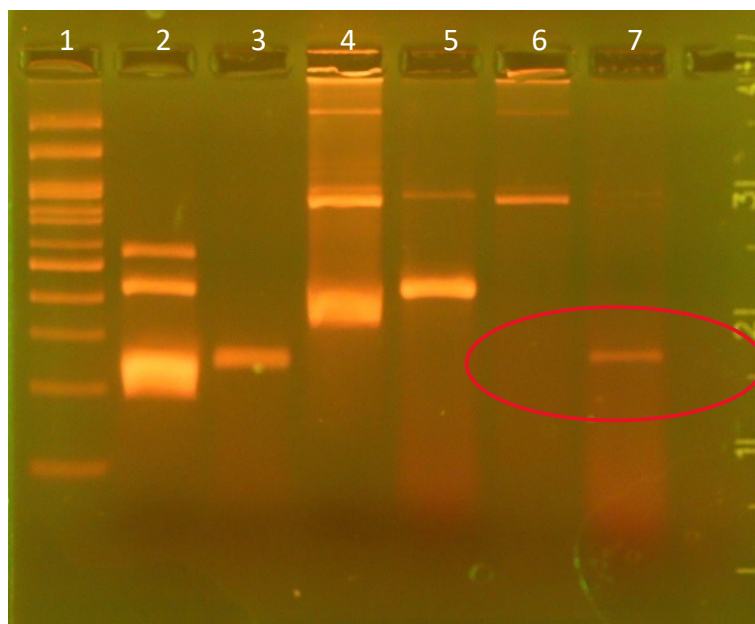
Επιπλέον, η δοκιμή στην PCR τεχνητώς θετικών δειγμάτων (spiked) με συγκεντρώσεις DNA των γονιδίων 0.05ng/μl και 0.005 ng/μl ήταν επιτυχής διότι έδωσαν θετικό αποτέλεσμα έως και τη συγκέντρωση 50 pg/μl. Στην εικόνα 21 φαίνονται τα αποτελέσματα της δοκιμής για τα γονίδια *ermA/TR* και *mefA/E*.

Εικόνα 21. Δοκιμασία ευαισθησίας σε spiked κλινικά δείγματα σύμφωνα με το πρόγραμμα 7 (πίνακας 9). Διαδρομή 1: μάρτυρας μοριακού βάρους, διαδρομή 2: θετικός μάρτυρας της δοκιμής, διαδρομές 3-8: κλινικά δείγματα. Στις διαδρομές 3 και 7 έχουν ανιχνευθεί το γονίδιο *ermA/TR*, ενώ στη θέση 5 το γονίδιο *mefA/E*.



Για τον αποκλεισμό των ψευδώς αρνητικών δειγμάτων λόγω αναστολής της αντίδρασης εξαιτίας μεγάλου φορτίου βακτηριακού γενωμικού υλικού και ταυτόχρονα της παρουσίας του ανθρώπινου γενωμικού υλικού, το οποίο δεν απομακρύνεται κατά την απομόνωση του γενετικού υλικού από τα κλινικά δείγματα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αραιώσης των δειγμάτων. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις διπλούν, μία φορά ως “πυκνό” δηλαδή χωρίς κάποια περεταίρω επεξεργασία, και μία φορά ως “αραιωμένο”. Το αραιωμένο δείγμα αποτελούταν από το πυκνό αραιωμένο κατά 9 φορές (αραίωση 1:10). Η συγκεκριμένη αραιώση επιλέχθηκε με βάση τη φύση και τη σύσταση των δειγμάτων (ωτικά υγρά και βακτηριακά στελέχη), καθώς μέσα από μία σειρά δοκιμασιών είχε βρεθεί ότι σε αυτή την αραιώση υπάρχει εμφανές οπτικό αποτέλεσμα το οποίο μπορεί να αξιολογηθεί.

Εικόνα 22. Στην επισημασμένη περιοχή ανιχνεύεται το γονίδιο *ermB* στην αραιώση του κλινικού δείγματος (θέση 7), και όχι στο πυκνό δείγμα. Αυτό παρατηρείται λόγω αναστολής που συμβαίνει από το μεγάλο φορτίο γενετικού υλικού. Η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα 7 (πίνακας 9).



### 3.3 Ανάλυση αποτελεσμάτων της μοριακής τεχνικής που δημιουργήθηκε για την ταυτόχρονη ανίχνευση των γονιδίων *mefA/E*, *ermB* και *ermA/TR*

#### 3.3.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων σε βακτηριακά στελέχη

Από τα 27 στελέχη που εξετάστηκαν, θετικό αποτέλεσμα έδωσαν τα 10 από τα 27, δηλαδή το 37,04%. Παρατηρήθηκε πως στο μεγαλύτερο μέρος των θετικών στελεχών, και συγκεκριμένα στα 8 από τα 10 (29,63%) ανιχνεύθηκαν ταυτόχρονα δύο γονίδια, τα *mefA/E* και *ermB*. Ένα (1) από τα 10 στελέχη με θετικό αποτέλεσμα ήταν θετικό μόνο για το γονίδιο *mefA/E* και επίσης 1 στα 10 ήταν θετικό μόνο για το γονίδιο *ermB*. Παρατηρήθηκε λοιπόν πως το μεγαλύτερο ποσοστό των βακτηριακών στελεχών, δηλαδή το 62,96% (17/27) εμφάνισε πλήρη απουσία των ανιχνευόμενων γονιδίων, δεδομένο που δηλώνει πως εμφανίζουν ευαισθησία στις μακρολίδες.

Πίνακας 11. Ποσοστά ανίχνευσης γονιδίων αντοχής (*mefA/E*, *ermB*, *ermA/TR*) έναντι των μακρολίδων στα βακτηριακά στελέχη.

ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ	ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ				ΑΠΟΥΣΙΑ ΓΟΝΙΔΙΩΝ
	<i>mefA/E</i>	<i>ermB</i>	<i>ermA/TR</i>	<i>mefA/E &amp; ermB</i>	
27	1	1	-	8	17
ΠΟΣΟΣΤΟ %	3,70%	3,70%	0,00%	29,63%	62,96%

### 3.3.1.1 Σύγκριση αποτελεσμάτων μοριακής τεχνικής και μεθόδου E-test στα βακτηριακά στελέχη

Τα αποτελέσματα από τη μοριακή ανάλυση των βακτηριακών στελεχών σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας του E-test (πίνακας 13) έδειξαν πως όσα από αυτά έφεραν το γονίδιο *ermB* (1/27, 3,7%) ή τον συνδυασμό των γονιδίων *mefA/E & ermB* (8/27, 29,63%) εμφάνιζαν υψηλές τιμές MIC (>256 mg/L) στην ερυθρομυκίνη. Μόνο 1 από τα 8 στελέχη που έφερε τα γονίδια *mefA/E & ermB* (1/8, 12,5%) εμφάνισε μικρότερη τιμή MIC (=48 mg/L). Αντιθέτως το στέλεχος στο οποίο ανιχνεύθηκε μόνο το γονίδιο *mefA/E* (1/27, 3,7%) εμφάνισε μικρότερη τιμή MIC (= 8 mg/L).

Από την άλλη πλευρά, η πλειονότητα των στελεχών στα οποία δεν ανιχνεύθηκε κάποιο από τα υπό μελέτη γονίδια (16/27, 59,26%) εμφάνισαν χαμηλές τιμές MIC ( $\leq 0.25$ mg/L). Μόνο 1 από αυτά εμφάνισε φαινότυπο αντοχής (MIC>256 mg/L) δεν εμφάνισαν καθόλου αντοχή στην ερυθρομυκίνη ενώ μόνο ένα από αυτά (1/27, 3,7%) εμφάνισε αντοχή, και μάλιστα πολύ υψηλή (MIC >256 mg/L), που πιθανά οφείλεται στη μετάλλαξη του ριβοσωμικού rRNA του βακτηρίου με αποτέλεσμα τη μειωμένη πρόσδεση του αντιβιοτικού (παράγραφος 1.5.5.2.3)

Πίνακας 12. Αποτελέσματα δοκιμής E-test στα βακτηριακά στελέχη και συσχέτιση τιμών MIC με τα υπό μελέτη γονίδια .

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ	ΕΛΑΧΙΣΤΗ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (MIC, mg/L)
	<i>S. pneumoniae</i>	
<i>ermB</i>	1	>256
<i>mefA/E</i>	1	8
<i>mefA/E &amp; ermB</i>	7	>256
<i>mefA/E &amp; ermB</i>	1	48
απουσία γονιδίων	16	≤ 0,25
	1	>256

### 3.3.2 Ανάλυση αποτελεσμάτων σε κλινικά δείγματα

Συνολικά εξετάστηκαν 63 κλινικά δείγματα, τα οποία αντιστοιχούσαν σε 62 περιστατικά. Από αυτά, θετικό αποτέλεσμα για την PCR έδωσαν τα 29 (29/63, 46,03%) ενώ στα υπόλοιπα 34 (34/63, 53,97%) δεν ανιχνεύθηκε κανένα γονίδιο αντοχής. Από τα 29 θετικά δείγματα, τα 10 (10/29, 15,87%) έφεραν το γονίδιο *mefA/E*, τα 9 (9/29, 14,29%) το γονίδιο *ermB*, ενώ τα 2 (2/29, 3,17%) το γονίδιο *ermA/TR*. Επίσης σε 8 από τα 29 δείγματα ανιχνεύθηκαν ταυτόχρονα τα γονίδια *mefA/E & ermB* (12,7%).

Πίνακας 13. Ποσοστά των γονιδίων αντοχής (*mefA/E*, *ermB*, *ermA/TR*) έναντι των μακρολιδών που ανιχνεύτηκαν στα κλινικά δείγματα.

ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΓΟΝΙΔΙΑ ΑΝΤΟΧΗΣ				
	<i>mefA/E</i>	<i>ermB</i>	<i>ermA/TR</i>	<i>mefA/E &amp; ermB</i>	ΑΠΟΥΣΙΑ ΓΟΝΙΔΙΩΝ
63	10	9	2	8	34
ΠΟΣΟΣΤΟ %	15,87%	14,29%	3,17%	12,70%	53,97%

### 3.3.3 Ορότυποι και αντοχή στα αντιβιοτικά

Στην παρούσα έρευνα όλα τα δείγματα είχαν μελετηθεί προηγουμένως ως προς τον ορότυπο (Marmaras et al., 2021). Οι ορότυποι του *S. pneumoniae* μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε αυτούς που καλύπτονται από τα εμβόλια PCV13 & PCV15 (σύνολο 47 δείγματα) και σε

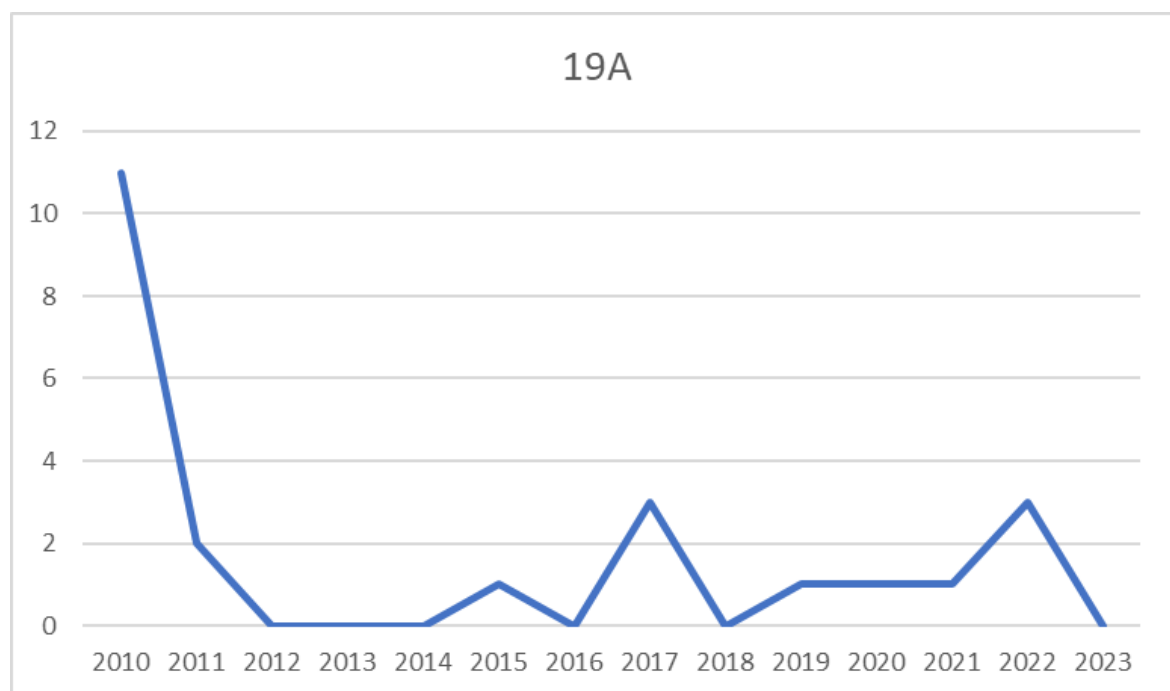
αυτούς που δεν καλύπτονται από τα συγκεκριμένα εμβόλια (σύνολο 35 δείγματα). Ωστόσο για 8 από τα 90 δείγματα δεν κατέστη δυνατή η ταυτοποίηση του ορότυπου και τα συγκεκριμένα δείγματα αναφέρονται ως Non -Tytable (NT).

Γίνεται εμφανές, σύμφωνα με τον πίνακα 1 του παραρτήματος, πως όσο απομακρυνόμαστε χρονολογικά από το 2010 αρχίζουν να φθίνουν οι ορότυποι που καλύπτονται από το πολυσακχαριδικό συζευγμένο εμβόλιο PCV 13 και εν συνεχεία και από το 15-δύναμο συζευγμένο πολυσακχαριδικό εμβόλιο PCV 15, και παρατηρείται εμφάνιση ορότυπων που δεν συμπεριλαμβάνονται σε αυτά.

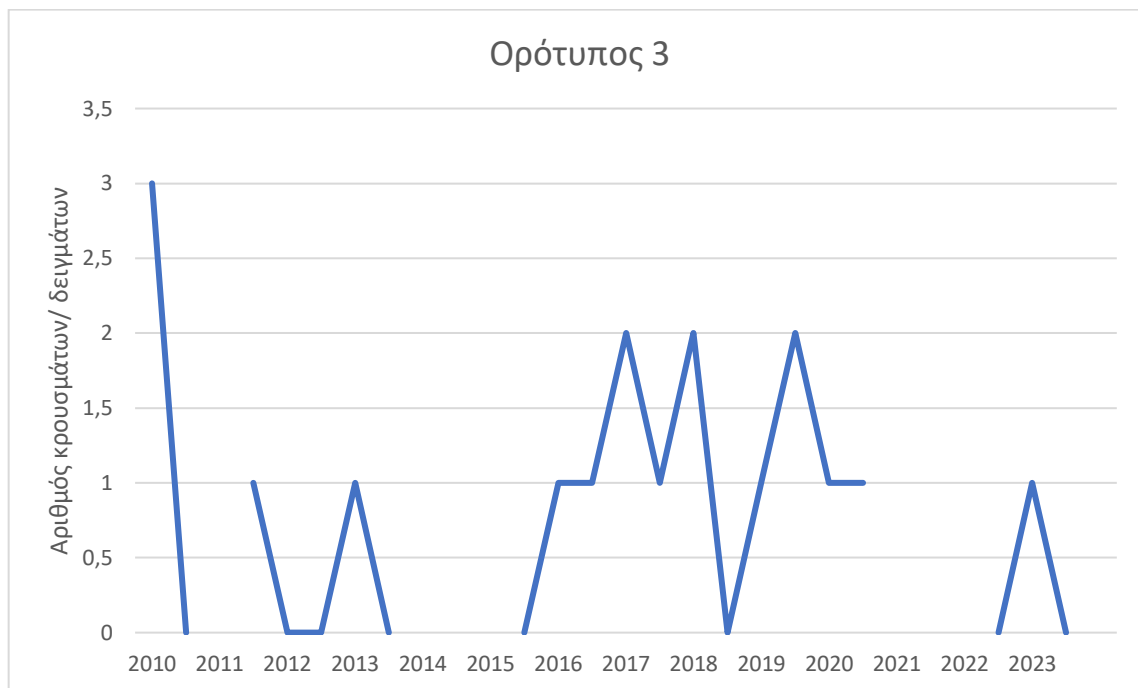
Από τους προαναφερθέντες ορότυπους, μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι 19A και 3, καθώς είναι αυτοί που αντιστοιχούν στα περισσότερα δείγματα, αλλά επίσης καλύπτονται και οι δύο από τα συζευγμένα πολυσακχαριδικά εμβόλια PCV13/PCV15.

Συγκεκριμένα, ο ορότυπος 19A είχε ταυτοποιηθεί σε 23/90 δείγματα που μελετήθηκαν (25,56%) ενώ ο ορότυπος 3 σε 15 από τα 90 δείγματα (16,67%). Ο ορότυπος 19A όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 2 παρουσιάζει μία καθοδική πορεία από το 2010 και έπειτα, ενώ ο ορότυπος 3 εμφανίζει ανώμαλη πορεία η οποία αυξομειώνεται στο εύρος της δεκαετίας (διάγραμμα 3).

Διάγραμμα 2. Πορεία συχνότητας δειγμάτων στα οποία ανιχνεύθηκε *S. pneumoniae* ορότυπου 19A για τα έτη 2010-2023.



Διάγραμμα 3. Πορεία συχνότητας δειγμάτων στα οποία ανιχνεύθηκε *S. pneumoniae* οροτύπου 3.

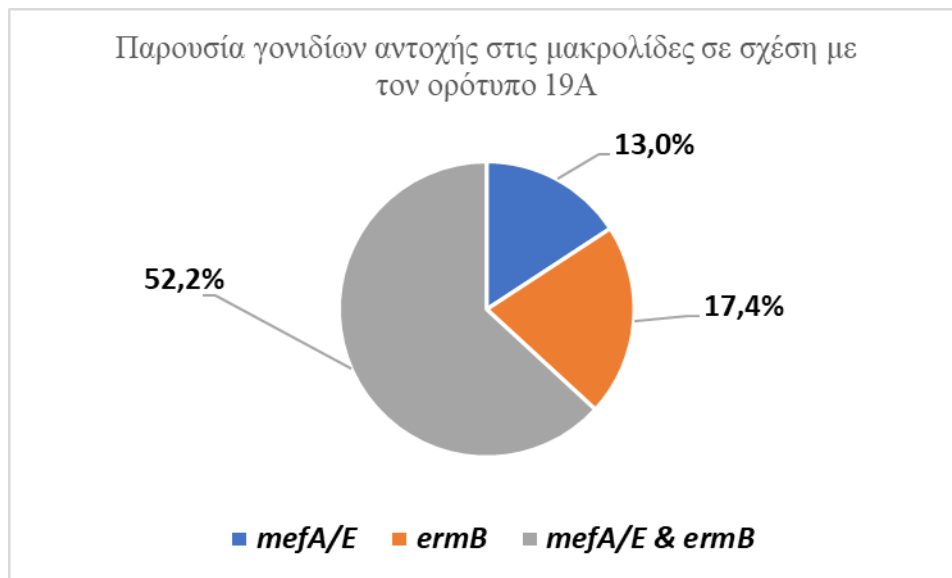


Οι υπόλοιποι ορότυποι, ανεξαρτήτως από το αν καλύπτονται από το συζευγμένο πολυσακχαριδικό εμβόλιο ή όχι, αφορούν πολύ μικρότερο αριθμό δειγμάτων. Για το λόγο αυτό μπορεί να γίνει μια απλή αναφορά σε σχέση με το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό και με τυχόν περαιτέρω συσχετισμό αποτελεσμάτων (βλ. πίνακα 2, παράρτημα).

Από την αναπτυχθείσα ερευνητική μέθοδο προέκυψε πως μόλις 4 δείγματα οροτύπου 19<sup>A</sup> (4/23, 17,39%) δεν έφεραν κανένα από τα υπό μελέτη γονίδια αντοχής (*mefA/E*, *ermB*, *ermA/TR*) έναντι των μακρολίδων. Δηλαδή ο ορότυπος εμφανίζει ευαισθησία σε ποσοστό 17,39%. Αντίθετα η αντοχή τους στις μακρολίδες είναι πολύ υψηλή, αφού τα 19/23 δείγματα έφεραν τουλάχιστον ένα γονίδιο αντοχής, ενώ στην πλειοψηφία των δειγμάτων (12/23, 52,17%) ανιχνεύθηκαν ταυτόχρονα τα γονίδια *mefA/E* και *ermB*. Στο διάγραμμα 4 παρουσιάζονται αναλυτικά τα ποσοστά εμφάνισης των γονιδίων στον συγκεκριμένο ορότυπο.



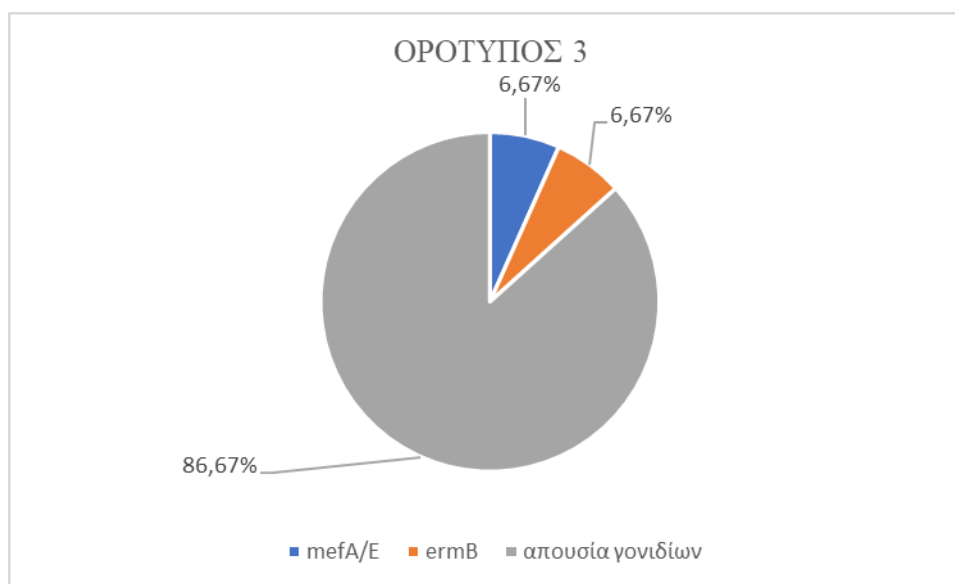
Διάγραμμα 4. Ποσοστά ανίχνευσης των γονιδίων *mefA/E*, *ermB* και ποσοστά ταυτόχρονης ανίχνευσης των *mefA/E* & *ermB* για τα δείγματα ορότυπου 19A.



Όσον αφορά τον ορότυπο 3, είναι ο δεύτερος επικρατέστερος καθώς βρέθηκε πως 15 από τα 90 συνολικά δείγματα ήταν θετικά για *S. pneumoniae* ορότυπου 3. Ωστόσο, από αυτά μόνο σε 2 (2/15, 13,33%) ανιχνεύθηκε κάποιο από τα τρία υπό μελέτη γονίδια αντοχής έναντι των μακρολίδων, και μάλιστα το ένα δείγμα ήταν θετικό για το γονίδιο *mefA/E* και το άλλο για το γονίδιο *ermB*. Προκύπτει λοιπόν, πως ο ορότυπος 3 εμφανίζει σε μεγάλο ποσοστό, 86,66% (13/15) ευαισθησία στις μακρολίδες (διάγραμμα 5).



Διάγραμμα 5. Ποσοστά ανίχνευσης των γονιδίων αντοχής *mefA/E* και *ermB*, αλλά και ποσοστό απουσίας αυτών και των τριών γονιδίων (*ermB*, *mefA/E*, *ermA/TR*) σε δείγματα του ορότυπου 3.



### 3.3.4 Συμπεράσματα επί του συνόλου των δειγμάτων

Τέλος, από την ανασκόπηση των δεδομένων προέκυψε πως τα δείγματα που μελετήθηκαν, και επομένως και τα περιστατικά των λοιμώξεων, οφείλονταν, με μικρή διαφορά, κυρίως σε ορότυπους που καλύπτονται από τα συζευγμένα πολυσακχαριδικά εμβόλια PCV13 και PCV15. Στο σύνολό τους αυτά τα δείγματα ανήλθαν στα 47, ενώ τα δείγματα που αντιστοιχούσαν σε ορότυπους που δεν καλύπτονται από τα προαναφερθέντα εμβόλια ή που δεν γνωρίζαμε τον ορότυπό τους (δείγματα με NT ορότυπο) ήταν 43 στο σύνολο.

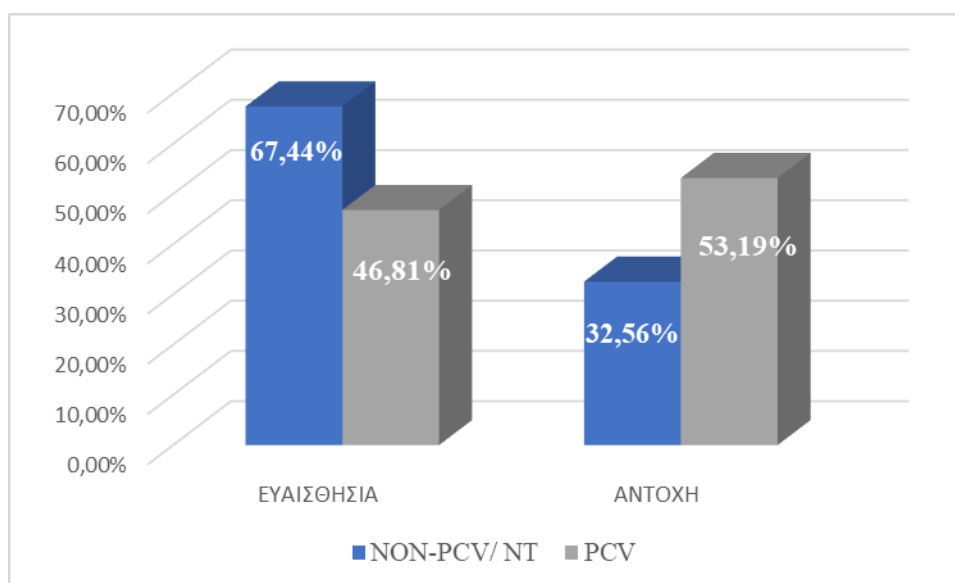
Στην πρώτη κατηγορία προέκυψε πως το 53,19% των δειγμάτων (25/47) έφερε τουλάχιστον ένα γονίδιο αντοχής έναντι των μακρολιδών, ενώ το υπόλοιπο 46,81% παρουσίαζε ευαισθησία στις μακρολίδες, με βάση τους μηχανισμούς αντοχής που μπορούν να ταυτοποιηθούν από τα επιλεγμένα γονίδια. Επιπλέον προέκυψε πως το μεγαλύτερο πλήθος των δειγμάτων, δηλαδή 13 από τα 47, έφερε ταυτόχρονα τα γονίδια *mefA/E* και *ermB*, το ποσοστό των οποίων ανήλθε στο 27,66%. Ακολούθησαν με φθίνουσα σειρά εμφάνισης, τα γονίδια *mefA/E* (7/47, 14,89%) και *ermB* (5/47, 10,64%), ενώ δεν ανιχνεύθηκε καθόλου το γονίδιο *ermA/TR*. Τα δεδομένα παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 2 του παραρτήματος.

Στην δεύτερη κατηγορία δειγμάτων (NON-PCV ορότυποι) (βλ. πίνακα 3, παράρτημα), παρατηρήθηκε πως το ποσοστό ευαισθησίας ανήλθε στο 67,44%, που αντιστοιχεί σε 29 από τα 43 δείγματα. Από τα υπόλοιπα 14 δείγματα της συγκεκριμένης ομάδας, προέκυψε πως το *ermB* ανιχνεύθηκε στα περισσότερα δείγματα, δηλαδή στα 5 από τα 43, που αντιστοιχεί σε ποσοστό 11,63%. Ακολούθησε το γονίδιο *mefA/E* με ποσοστό εμφάνισης 9,30% (4/43 δείγματα), και έπειτα η ταυτόχρονη ανίχνευση των γονιδίων *mefA/E* και *ermB* το οποίο εντοπίστηκε συνολικά σε 3

δείγματα, δηλαδή στο 6,98% των δειγμάτων της κατηγορίας. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως το γονίδιο *ermA/TR* ανιχνεύθηκε μόνο σε 2 δείγματα της συγκεκριμένης κατηγορίας (4,65%) αλλά και στο σύνολο της μελέτης (2,22%). Στον πίνακα 3 του παραρτήματος παρουσιάζονται αναλυτικά τα δεδομένα ανά ορότυπο της κατηγορίας.

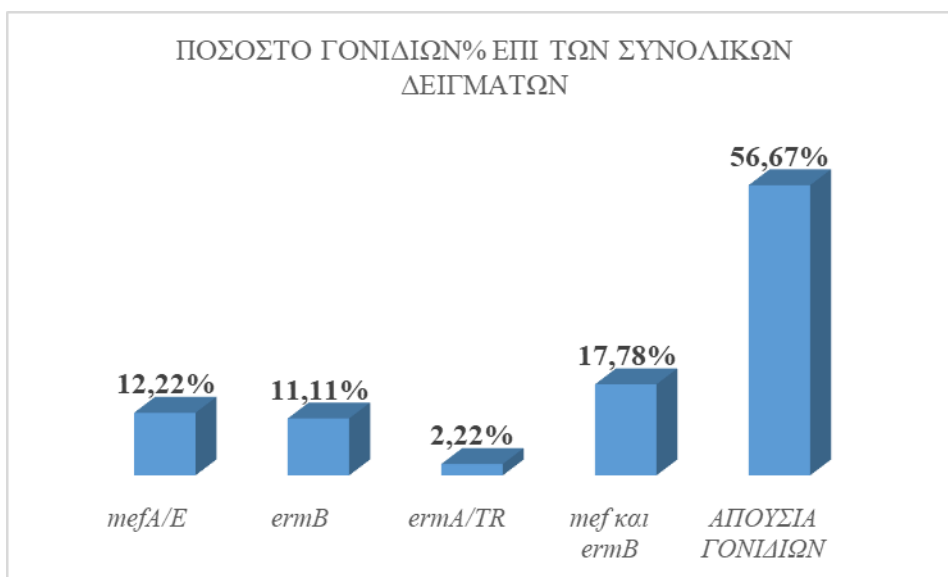
Στο διάγραμμα 6 φαίνεται η συνολική αντοχή και ευαισθησία στις μακρολίδες, των οροτύπων του πνευμονιοκόκκου που καλύπτονται αλλά και αυτών που δεν καλύπτονται από τα συζευγμένα πολυσακχαριδικά εμβόλια PCV13 και PCV15. Από αυτό προκύπτει πως στην πρώτη κατηγορία οι ορότυποι εμφανίζουν σε ποσοστό >50% αντοχή έναντι των μακρολίδων, ενώ παίρνουμε την αντίθετη εικόνα από τους οροτύπους της δεύτερης κατηγορίας.

Διάγραμμα 6. Ποσοστά ευαισθησίας και αντοχής στους PCV13,15 και NON-PCV13,15/NT οροτύπους.



Από τον συνδυασμό των παραπάνω δεδομένων προκύπτει επίσης πως στο σύνολο τους τα δείγματα εμφάνισαν ευαισθησία στις μακρολίδες (απουσία γονιδίων) σε ποσοστό 56,67% και αντοχή στο 43,33%. Τα γονίδια που ανιχνεύονται συνολικά, με φθίνουσα σειρά κατάταξης είναι τα: *mefA/E* & *ermB* (ταυτόχρονη ανίχνευση) σε ποσοστό 17,78% (16/90), ακολουθούν μεμονωμένα τα *mefA/E*, 12,22% (11/90) και *ermB*, 11,11%(10/90). Τελευταίο σε συχνότητα εμφάνισης είναι το γονίδιο *ermA/TR* με ποσοστό 2,22% (2/90 δείγματα).

Διάγραμμα 7. Συνολικά ποσοστά ανίχνευσης των γονιδίων *mefA/E*, *ermB* & *ermA/TR* που προσδίδουν αντοχή έναντι των μακρολίδων, στο σύνολο των 90 δειγμάτων που εξετάστηκαν.

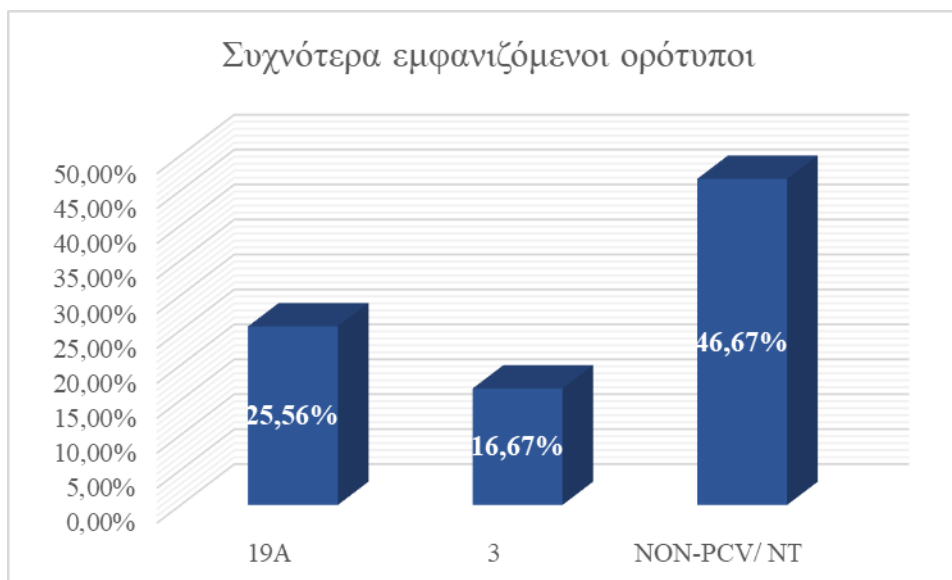


Τέλος, αν από τους PCV οροτύπους εξαιρέσουμε τους οροτύπους 19A και 3 παρατηρούμε πως οι NON-PCV ορότυποι, αθροιστικά, αντιστοιχούν στους συχνότερα εμφανιζόμενους επί του συνόλου των δειγμάτων, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 10.

Διάγραμμα 8. Ποσοστά αντοχής για τους συχνότερα εμφανιζόμενους οροτύπους επί του συνόλου των δειγμάτων (90).

NT\*= ορότυποι που δεν έχουν ταυτοποιηθεί.

NON-PCV\*= ορότυποι που δεν καλύπτονται από τα συζευγμένα εμβόλια PCV13 & PCV15.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η συγκεκριμένη ερευνητική εργασία είχε ως στόχο τον προσδιορισμό της αντοχής που παρουσιάζει το βακτήριο *Streptococcus pneumoniae* έναντι στις μακρολίδες, απευθείας σε κλινικά δείγματα ασθενών με οξεία μέση ωτίτιδα και μαστοειδίτιδα.

Το βακτήριο επιλέχθηκε ως προς τη μεγάλη κλινική του σημασία, ως κύριο παθογόνο για σοβαρές και απλούστερες λοιμώξεις παγκοσμίως (Hava et al., 2003). Η μελέτη περιορίστηκε στις παιδιατρικές λοιμώξεις της οξείας μέσης ωτίτιδας και της οξείας μαστοειδίτιδας και η επιλογή του αντιβιοτικού έγινε λόγω της εναλλακτικής χρήσης του αντί της πενικιλίνης, που αποτελεί το βασικό αντιβιοτικό για την αντιμετώπιση των συγκεκριμένων λοιμώξεων και στην οποία ο πνευμονιόκοκκος παρουσιάζει ήδη μεγάλα ποσοστά αντοχής (Lei and Wang, 2022). Ο αριθμός των κλινικών δειγμάτων που δεν μπορούσαν να μελετηθούν με τις συμβατικές μικροβιολογικές τεχνικές λόγω απουσίας θετικού αποτελέσματος στην καλλιέργεια, αποτέλεσε το έναυσμα για την ανάπτυξη μια μοριακής τεχνικής η οποία θα μπορεί να δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα για την αντοχή του βακτηρίου στις μακρολίδες, τόσο ως προς την απευθείας εφαρμογή της σε κλινικά δείγματα όσο και σε βακτηριακά στελέχη.

Για τον προσδιορισμό λοιπόν της μικροβιακής αντοχής του εν λόγω βακτηρίου στις μακρολίδες, επιλέχθηκαν 3 γονίδια, τα *mefA/E*, *ermB* και *ermA/TR* τα οποία είναι υπεύθυνα για τους συνηθέστερους μηχανισμούς βακτηριακής αντοχής έναντι αυτών, και είναι και αυτά που εντοπίζονται με τη μεγαλύτερη συχνότητα (Li et al., 2023). Τα τρία αυτά γονίδια όταν εκφράζονται, και υπό δεδομένες συνθήκες, είναι υπεύθυνα για τον σχηματισμό αντλίας εκροής που εξωθεί το αντιβιοτικό έξω από το βακτήριο ή για μεθυλίωση συγκεκριμένης θέσης της 23S ριβοσωμικής υπομονάδας του βακτηρίου με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η πρόσδεση του αντιβιοτικού (Jednačak et al., 2020).

Η μοριακή τεχνική που επιλέχθηκε ήταν αυτή της πολυπλεκτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (multiplex PCR, mPCR) η οποία έδωσε τη δυνατότητα ταυτόχρονης ταυτοποίησης και των τριών υπό μελέτη γονιδίων. Με τον τρόπο αυτό εξοικονομήθηκαν χρόνος και αντιδραστήρια, γεγονός που καθιστούν δυνατή τη χρήση της σε καθημερινή συχνότητα.

Για την ανάπτυξη της μεθοδολογίας επιλέχθηκαν ειδικά μόρια εκκινητές για τα συγκεκριμένα γονίδια στόχους, τα οποία είχαν προηγουμένως χρησιμοποιηθεί σε άλλες ερευνητικές εργασίες και είχαν κριθεί επαρκή ως προς το τελικό αποτέλεσμα που έδιναν (Poyart et al., 2003; Zeng et al., 2006). Ωστόσο για την παρούσα δοκιμή χρειάστηκε να γίνει

μία μικρή τροποποίηση- αφαίρεση νουκελοτιδίων στο 3' άκρο του ενός εκ των δύο εκκινητών για το γονίδιο *ermB*.

Η τεχνική που αναπτύχθηκε ανιχνεύει σε χαμηλή συγκέντρωση 50 pg/μL το γενετικό υλικό του πνευμονιοκόκκου, ενώ ταυτόχρονα μπορεί να εφαρμοστεί απευθείας σε κλινικά δείγματα. Οι αρχικές δοκιμασίες αφορούσαν την μεμονωμένη ανίχνευση των γονιδίων οι οποίες με κατάλληλες προσαρμογές στα αντιδραστήρια και στις συνθήκες της αντίδρασης μπόρεσαν να συνδυαστούν σε μία πολυπλεκτική (multiplex) αντίδραση η οποία εφαρμόστηκε αρχικά σε βακτηριακά στελέχη. Σε αυτό το στάδιο δεν χρειάστηκε να γίνουν περαιτέρω τροποποιήσεις, ενώ παράλληλα έγινε έλεγχος της μικροβιακής αντοχής των στελεχών με τη μέθοδο του E- test, ως ένα μέτρο ελέγχου της αξιοπιστίας της μοριακής τεχνικής. Τόσο η μέθοδος του E-test (έλεγχος φαινότυπου) όσο και η μοριακή επεξεργασία τους έδειξε πως πράγματι η ύπαρξη των γονιδίων *mefA/E*, *ermB* και *ermA/TR* προσδίδει αντοχή στα στελέχη. Μέσω του φαινοτυπικού ελέγχου αντοχής μπόρεσε να γίνει η συσχέτιση των υπό μελέτη γονιδίων με τον βαθμό αντοχής που αυτά προσδίδουν στο βακτήριο. Από τη συγκεκριμένη σύγκριση προέκυψαν τρία αποτελέσματα: Πρώτον, το γονίδιο *ermB* προσδίδει μεγάλο βαθμό αντοχής έναντι των μακρολιδών (MIC > 256 mg/mL). Δεύτερον, το γονίδιο *mefA/E* να μεν προσδίδει αντοχή στα στελέχη του *S. pneumoniae* (MIC = 8 mg/mL), αλλά όχι στον ίδιο βαθμό με το *ermB*. Τέλος, σε περιπτώσεις που στο γονιδίωμα του βακτηρίου ανιχνεύθηκαν ταυτόχρονα τα γονίδια *ermB* και *mefA/E*, τα βακτηριακά στελέχη που τα έφεραν, να μεν εμφάνιζαν υψηλή αντοχή έναντι των μακρολιδών (MIC > 256 mg/mL) η οποία όμως μπορεί να αποδοθεί κυρίως στο γονίδιο *ermB*. Τα παραπάνω επιβεβαιώνονται και από την υπάρχουσα βιβλιογραφία (*Schroeder and Stephens, 2016*).

Τελικό στάδιο της δοκιμασίας αποτέλεσε η εφαρμογή της σε δείγματα ωτικών υγρών, όπου και έγιναν οι τελικές αναπροσαρμογές στη στοιχειομετρία της αντίδρασης, ώστε να παράγεται ένα δυνατό προϊόν.

Τόσο τα βακτηριακά στελέχη όσο και τα κλινικά δείγματα, είχαν προηγουμένως ταυτοποιηθεί με μοριακή τεχνική που είχε αναπτυχθεί στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας ως προς το είδος του βακτηρίου, και είχαν δώσει θετικό αποτέλεσμα για *S. pneumoniae* (*Tzanakaki et al., 2005*). Επιπλέον είχε γίνει τυποποίησή τους, ώστε να προσδιοριστεί ο ορότυπος του εκάστοτε στελέχους του πνευμονιοκόκκου (*Marmaras et al., 2021*). Αυτά τα δεδομένα αξιοποιήθηκαν στην συνέχεια και συνδυάστηκαν με τα αποτελέσματα της αναπτυχθείσας τεχνικής, ώστε να προκύψει μία όσο το δυνατόν πιο ολοκληρωμένη εικόνα για την αντοχή στις μακρολίδες που εμφανίζει ο πνευμονιόκοκκος

που είναι υπεύθυνος για ωτίτιδες/ μαστοειδίτιδες, στην Ελλάδα. Ωστόσο δεν μπορεί να προκύψει ένα ασφαλές συμπέρασμα καθώς το E.K.A.M. δεν αποτελεί Κέντρο Αναφοράς για τις συγκεκριμένες λοιμώξεις και συνεπώς μπορεί να έχει παραληφθεί σημαντικός αριθμός δειγμάτων ενδιαφέροντος.

Στο σύνολο των δειγμάτων που εξετάστηκαν, τα αποτελέσματα ανίχνευσης των γονιδίων αντοχής έναντι των μακρολίδων υψηλή τιμή ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) έναντι αυτών. Αυτό το δεδομένο ταιριάζει με την παγκόσμια αντοχή που εμφανίζει ο *S. pneumoniae* στις μακρολίδες η οποία δεν περιορίστηκε από την εφαρμογή των συζευγμένων πνευμονοκοκκικών εμβολίων (Li et al., 2023).

Επιπλέον, παρατηρήθηκε πως μεγαλύτερη αντοχή στις εμφάνισε ο ορότυπος 19A. Συγκεκριμένα η συνολική αντοχή του ανήλθε στο 82.61% δειγμάτων που μελετήθηκαν, ενώ στο μεγαλύτερο ποσοστό αυτών ανιχνεύθηκαν ταυτόχρονα τα γονίδια *ermB* και *mefA/E*. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα υποδηλώνει και υψηλά ποσοστά αντοχής (Schroeder and Stephens, 2016) και ταυτόχρονα την εντόπιση των δύο γονιδίων στο ίδιο μεταθετό στοιχείο, Tn2010, χαρακτηριστικό του οροτύπου 19A (Del Grosso et al., 2007). Αυτά τα δεδομένα συμφωνούν με την παγκόσμια εικόνα αντοχής που παρουσιάζει ο συγκεκριμένος ορότυπος τόσο στις μακρολίδες (Isturiz et al., 2017). Ακριβώς αντίθετη εικόνα παρουσίασε ο ορότυπος 3 με ποσοστό αντοχής μόλις στο 13,33% των δειγμάτων που ήταν θετικά για αυτόν.

Η μελέτη της αντοχής για αυτούς τους ορότυπους διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μελέτη και εξέλιξη της επιδημιολογίας του μικροοργανισμού, καθώς καλύπτονται από τα συζευγμένα πολυσακχαριδικά εμβόλια, τα οποία συστήνονται από το εθνικό Πρόγραμμα Εμβολιασμού της Ελλάδας. Παρά τη φαινομενική κάλυψη που παρέχουν τα εμβόλια, φαίνεται πως συνεχίζει να προκαλεί λοιμώξεις των ωτών, αλλά σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τον 19A. Το κλωνικό σύμπλεγμα του οροτύπου 3 μπορεί να διαχωριστεί σε δύο κλάδους. Δεδομένα από μελέτες προτείνουν πως στελέχη τα οποία ανήκουν στον δεύτερο κλάδο δεν καλύπτονται από τα συζευγμένα εμβόλια και γι' αυτό το λόγο σημειώνεται η διαρκής παρουσία τους παρά την εφαρμογή των εμβολίων (Groves et al., 2019).

Για τους οροτύπους που δεν καλύπτονται από τα συγκεκριμένα εμβόλια, παρατηρήθηκε πως αυτοί παρουσιάζουν μεγαλύτερα ποσοστά αντοχής στο σύνολο των περιστατικών που εμπλέκονται. Ωστόσο τα συγκεκριμένα αποτελέσματα κρίνονται επισφαλή λόγω του όγκου των αντίστοιχων δειγμάτων που μελετήθηκαν.

Όπως προκύπτει και από τα παραπάνω αποτελέσματα, η ανάπτυξη της συγκεκριμένης τεχνικής συμβάλλει σημαντικά στην επιδημιολογική επιτήρηση του *S. pneumoniae* σε

εμβολιασμένα παιδιά, ιδιαίτερα στα δείγματα που δεν έχουν θετική καλλιέργεια και επομένως δεν μπορεί να γίνει μελέτη της αντοχής στις μακρολίδες με τη μέθοδο του E-test. Καθώς μόνο ένα μικρό ποσοστό των στελεχών (<5%) παρουσιάζουν μηχανισμό αντοχής έναντι των μακρολίδων, ο οποίος οφείλεται στη μετάλλαξη των ριβοσωμικών πρωτεϊνών L4 και L22 (Zeng et al., 2006), ο εν λόγω μηχανισμός δεν έχει συμπεριληφθεί στο παρόν ερευνητικό πρωτόκολλο.

## **Συμπεράσματα**

Η παρούσα ερευνητική εργασία είχε ως στόχο την ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου ταυτόχρονης ανίχνευσης γονιδίων (*mefA/E, ermB, ermA/TR*) που προσδίδουν αντοχή στον *S. pneumoniae* έναντι στις μακρολίδες, ειδικά στα δείγματα που δεν έχουν θετική καλλιέργεια και δεν μπορεί να γίνει μελέτη της αντοχής με τη μέθοδο του E-test.

Η πειραματική πορεία που πραγματοποιήθηκε έκανε εμφανές πως πρόκειται για μία διαδικασία που απαιτεί χρόνο και μεγάλη προσοχή στη λεπτομέρεια προκειμένου το τελικό αποτέλεσμα να είναι το καλύτερο δυνατό που μπορεί να προκύψει. Ωστόσο φάνηκε πως οι προσπάθειες απέδωσαν αφού τελικά η ανάπτυξη του πρωτοκόλλου κατέστη δυνατή και μάλιστα με μεγάλη ευαισθησία εξασφαλίζοντας έτσι τον περιορισμό των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων. Επιπλέον, το συγκεκριμένο πρωτόκολλο δημιουργήθηκε με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι λειτουργικό τόσο σε βακτηριακά στελέχη όσο και σε κλινικά δείγματα. Για το λόγο αυτό προσδίδει ένα μεγάλο πλεονέκτημα στην επιδημιολογική επιτήρηση της αντοχής του πνευμονιοκόκκου στις μακρολίδες, καθώς όπως παρατηρήθηκε το μεγαλύτερο μέρος των δειγμάτων αποτελούνταν από βιολογικό υλικό (ωτικό υγρό). Με αυτό ως δεδομένο συμπεραίνουμε αφενός τη δυσκολία απομόνωσης του βακτηρίου κατά τη διάρκεια της νοσηλείας των ασθενών, και αφετέρου το σημαντικό πλεονέκτημα που φέρουν οι μοριακές τεχνικές, αφού αν η διερεύνηση βασιζόταν μόνο σε φαινοτυπικές μεθόδους το μεγαλύτερο μέρος της πληροφορίας θα είχε χαθεί. Αυτό όμως δεν σημαίνει πως οι κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές μπορούν να αντικατασταθούν τελείως από τις μοριακές, καθώς για την ανάπτυξη των δεύτερων είναι απαραίτητη η απομόνωση, πρώτη μελέτη και χρήση των επιθυμητών μικροοργανισμών.

Τέλος, η επιτυχής εφαρμογή της αναπτυχθείσας μοριακής τεχνικής απευθείας σε κλινικά δείγματα, μπορεί να δώσει την κατάλληλη ώθηση για την επέκταση του πρωτοκόλλου για τη μελέτη αντοχής του *S. pneumoniae* και σε άλλα αντιβιοτικά που χορηγούνται για την αντιμετώπιση ασθενειών που μπορούν να αποβούν μοιραίες για την ανθρώπινη ζωή.

## Περίληψη

**Εισαγωγή:** Ο *Streptococcus pneumoniae* αποτελεί ένα ευκαιριακό παθογόνο του ανθρώπου το οποίο προκαλεί λοιμώξεις όπως μηνιγγίτιδα, σηψαιμία, πνευμονία, ωτίτιδα και μαστοειδίτιδα. Για την αντιμετώπιση τους χορηγούνται μεταξύ άλλων και μακρολίδες. Η μελέτη των κυριότερων γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στο μηχανισμό αντοχής τους (*ermB*, *mefA/E* και *ermA/TR*) παρουσιάζει ενδιαφέρον ως προς την παρακολούθηση της εξέλιξης της.

**Σκοπός** της μελέτης αποτελεί η ανάπτυξη μοριακής mPCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των εν λόγω γονιδίων, με στόχο την εφαρμογή της τεχνικής απευθείας σε κλινικά δείγματα (ωτικό υγρό) ασθενών με μέση ωτίτιδα/μαστοειδίτιδα.

**Υλικά και μέθοδοι:** Μελετήθηκαν συνολικά 90 θετικά κλινικά δείγματα θετικά για *S. pneumoniae* (ωτικά υγρά (n=63) και στελέχη (n=27)) ασθενών με οξεία μέση ωτίτιδα/μαστοειδίτιδα. Η μελέτη της ειδικότητας έγινε με τον έλεγχο της ευαισθησίας στα στελέχη (E-test) και της ευαισθησίας με διαδοχικές αραιώσεις βακτηριακού DNA.

**Αποτελέσματα:** Η τεχνική ανιχνεύει ταυτόχρονα τα γονίδια αντοχής *ermB*, *mefA/E* και *ermA/TR* απευθείας σε βιολογικά υλικά με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα.

Συνολικά η αντοχή στις μακρολίδες ανήλθε στο 43,33%. Οι ορότυποι που δεν καλύπτονται από τα PCV εμβόλια παρουσίασαν υψηλότερη ευαισθησία σε σχέση με αυτούς που καλύπτονται. Στη δεύτερη κατηγορία ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι ορότυποι 19A με υψηλή αντοχή 82,6% (19/23) και ο 3 με αντοχή σε χαμηλότερα ποσοστά 13,3% (2/15).

**Συμπεράσματα:** Η συγκεκριμένη τεχνική αποτελεί μία αξιόπιστη, ταχεία και χαμηλού κόστους μέθοδο ανίχνευσης των γονιδίων αντοχής στις μακρολίδες απευθείας σε κλινικά δείγματα. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στην επιτήρηση της αντοχής του *S. pneumoniae* καθώς ανιχνεύεται απευθείας σε βιολογικά υλικά, πράγμα εξαιρετικά χρήσιμο καθώς συχνά η καλλιέργεια αποτυγχάνει.

Λέξεις κλειδιά: πνευμονιόκοκκος, ωτίτιδα, μαστοειδίτιδα, μακρολίδες, μοριακές μέθοδοι, αντοχή, ευαισθησία



## Abstract

**Introduction:** *Streptococcus pneumoniae* is an opportunistic human pathogen that causes infections such as meningitis, septicemia, pneumonia, otitis media and mastoiditis. The latter infection is treated with the use of macrolide antibiotics, among others. The study of the main genes responsible for macrolide resistance (*ermB*, *mefA/E* και *ermA/TR*) helps to monitor its development.

**Purpose:** The purpose of this research paper is the development of a multiplex PCR that allows the simultaneous detection of said genes. This technique is to be further applied on clinical samples of patients suffering from otitis media/ mastoiditis.

**Materials and methods:** A total of 90 clinical samples positive for *S. pneumoniae* were studied (n1= 63 ear fluid, n2= 27 bacterial strains). The specificity of the method was tested through the E-test method applied in the bacterial strains and the sensitivity was determined by consecutive dilutions of the bacterial DNA.

**Results:** The molecular method developed can simultaneously detect the *ermB*, *mefA/E* και *ermA/TR* genes responsible for macrolide resistance, directly on clinical samples. It also offers great sensitivity and specificity.

The total macrolide resistance of the studied samples accumulated for 43,33%. Serotypes of *S. pneumoniae* that are not covered from the PCV vaccines are more sensitive than those covered. In the second category, it is important to talk about serotypes 19A with a total resistance up to 82,6% (19/23) and serotype 3 with 86,67% (13/15) sensitivity to macrolide antibiotics.

**Conclusions:** The developed technique is a reliable, fast and low cost method of detection of genes that confer resistance to macrolide antibiotics. It is an important tool for monitoring the resistance of *S. pneumoniae*, as it can be applied directly on clinical samples, which can be useful when the bacterial culture is unsuccessful.

Key-words: *Streptococcus pneumoniae*, otitis, mastoiditis, macrolides, molecular methods, resistance, sensitivity

## BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

- Adzitey, F., Huda, N., Ali, G.R.R., 2013. Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks. 3 Biotech 3, 97–107. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0074-4>
- AlonsoDeVelasco, E., Verheul, A.F., Verhoef, J., Snippe, H., 1995. *Streptococcus pneumoniae* : virulence factors, pathogenesis, and vaccines. Microbiol. Rev. 59, 591–603. <https://doi.org/10.1128/mr.59.4.591-603.1995>
- Arsic, B., Barber, J., Čikoš, A., Mladenovic, M., Stankovic, N., Novak, P., 2018. 16-membered macrolide antibiotics: a review. Int. J. Antimicrob. Agents 51, 283–298. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.05.020>
- Brouwer, M.C., Thwaites, G.E., Tunkel, A.R., van de Beek, D., 2012. Dilemmas in the diagnosis of acute community-acquired bacterial meningitis. The Lancet 380, 1684–1692. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61185-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61185-4)
- Butbul-Aviel, Y., Miron, D., Halevy, R., Koren, A., Sakran, W., 2003. Acute mastoiditis in children: Pseudomonas aeruginosa as a leading pathogen. Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. 67, 277–281. [https://doi.org/10.1016/s0165-5876\(02\)00388-9](https://doi.org/10.1016/s0165-5876(02)00388-9)
- Cassano, P., Ciprandi, G., Passali, D., 2020. Acute mastoiditis in children. Acta Bio Medica Atenei Parm. 91, 54–59. <https://doi.org/10.23750/abm.v91i1-S.9259>
- Castillo-Aguas, G.D., García-Vera, C., Urkin, J., Moretto, M., Spreitzer, M.V., Keronen, P., Werner, A., Reali, L., Geitmann, K., Poloskey, P., Kartousova, B., Sauseng, W., Schumacher, M., Reingold, S., Sánchez-Pina, C., 2023. Acute otitis media management: A survey of European primary care pediatricians. Glob. Pediatr. 4, 100057. <https://doi.org/10.1016/j.gped.2023.100057>
- CDC, 2024. Pneumococcal Disease Symptoms and Complications [WWW Document]. Pneumococcal Dis. URL <https://www.cdc.gov/pneumococcal/signs-symptoms/index.html> (accessed 10.3.24).
- Daikos, G.L., Koutsolioutsou, A., Tsiodras, S., Theodoridou, M., Koutouzis, E.I., Charissiadiou, A., Pangalis, A., Michos, A.G., Chaidopoulou, F., Braoudaki, M., Syriopoulou, V.P., 2008. Evolution of macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates in the prevaccine era. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 60, 393–398. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.10.020>
- Daniels, C.C., Rogers, P.D., Shelton, C.M., 2016. A Review of Pneumococcal Vaccines: Current Polysaccharide Vaccine Recommendations and Future Protein Antigens. J. Pediatr. Pharmacol. Ther. JPPT 21, 27–35. <https://doi.org/10.5863/1551-6776-21.1.27>
- Danishyar, A., Ashurst, J.V., 2023. Acute Otitis Media, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Dao, T.H., Rosch, J.W., 2021. JMM Profile: *Streptococcus pneumoniae* : sugar-coated captain of the men of death. J. Med. Microbiol. 70, 001446. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001446>
- Del Grosso, M., Northwood, J.G.E., Farrell, D.J., Pantosti, A., 2007. The Macrolide Resistance Genes erm(B) and mef(E) Are Carried by Tn2010 in Dual-Gene *Streptococcus pneumoniae* Isolates Belonging to Clonal Complex CC271. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 4184–4186. <https://doi.org/10.1128/aac.00598-07>
- Dinos, G.P., 2017. The macrolide antibiotic renaissance. Br. J. Pharmacol. 174, 2967–2983. <https://doi.org/10.1111/bph.13936>
- Dobay, O., 2019. The complexity of serotype replacement of pneumococci. Hum. Vaccines Immunother. 15, 2725–2728. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1621068>
- Dönhöfer, A., Franckenberg, S., Wickles, S., Berninghausen, O., Beckmann, R., Wilson, D.N., 2012. Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109, 16900–16905. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208037109>

- Du, Q., Shi, W., Yu, D., Yao, K., 2021. Epidemiology of non-vaccine serotypes of *Streptococcus pneumoniae* before and after universal administration of pneumococcal conjugate vaccines. *Hum. Vaccines Immunother.* 17, 5628–5637. <https://doi.org/10.1080/21645515.2021.1985353>
- Dzaraly, N.D., Muthanna, A., Mohd Desa, M.N., Taib, N.M., Masri, S.N., Rahman, N.I.A., Suhaili, Z., Tuan Soh, T.S., Abdullah, F.H., 2020. Pilus islets and the clonal spread of piliated *Streptococcus pneumoniae* : A review. *Int. J. Med. Microbiol.* 310, 151449. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2020.151449>
- Elberse, K.E.M., van de Pol, I., Witteveen, S., van der Heide, H.G.J., Schot, C.S., van Dijk, A., van der Ende, A., Schouls, L.M., 2011. Population structure of invasive *Streptococcus pneumoniae* in The Netherlands in the pre-vaccination era assessed by MLVA and capsular sequence typing. *PloS One* 6, e20390. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020390>
- Emamalipour, M., Seidi, K., Zununi Vahed, S., Jahanban-Esfahlan, A., Jaymand, M., Majdi, H., Amoozgar, Z., Chitkushev, L.T., Javaheri, T., Jahanban-Esfahlan, R., Zare, P., 2020. Horizontal Gene Transfer: From Evolutionary Flexibility to Disease Progression. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 229. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00229>
- Enright, M.C., Spratt, B.G., 1998. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae* : identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiol. Read. Engl.* 144 ( Pt 11), 3049–3060. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-11-3049>
- Erdem, H., Elaldi, N., Öztoprak, N., Sengoz, G., Ak, O., Kaya, S., Inan, A., Nayman-Alpat, S., Ulu-Kilic, A., Pekok, A.U., Gunduz, A., Gozel, M.G., Pehlivanoglu, F., Yasar, K., Yilmaz, H., Hatipoglu, M., Cicek-Senturk, G., Akcam, F.Z., Inkaya, A.C., Kazak, E., Sagmak-Tartar, A., Tekin, R., Ozturk-Engin, D., Ersoy, Y., Sipahi, O.R., Guven, T., Tuncer-Ertem, G., Alabay, S., Akbulut, A., Balkan, I.I., Oncul, O., Cetin, B., Dayan, S., Ersoz, G., Karakas, A., Ozgunes, N., Sener, A., Yesilkaya, A., Erturk, A., Gundes, S., Karabay, O., Sirmatel, F., Tosun, S., Turhan, V., Yalci, A., Akkoyunlu, Y., Aydın, E., Diktas, H., Kose, S., Ulcay, A., Seyman, D., Savasci, U., Leblebicioglu, H., Vahaboglu, H., 2014. Mortality indicators in pneumococcal meningitis: therapeutic implications. *Int. J. Infect. Dis.* 19, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.09.012>
- Eshwara, V.K., Mukhopadhyay, C., Rello, J., 2020. Community-acquired bacterial pneumonia in adults: An update. *Indian J. Med. Res.* 151, 287–302. [https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR\\_1678\\_19](https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1678_19)
- Fichera, P., Bruschini, L., Berrettini, S., Capobianco, S., Fiacchini, G., 2023. Acute Otitis Media and Facial Paralysis in Children: A Systemic Review and Proposal of an Operative Algorithm. *Audiol. Res.* 13, 889–897. <https://doi.org/10.3390/audiolres13060077>
- Gaddey, H.L., Wright, M.T., Nelson, T.N., 2019. Otitis Media: Rapid Evidence Review. *Am. Fam. Physician* 100, 350–356.
- Ganaie, F., Saad, J.S., McGee, L., van Tonder, A.J., Bentley, S.D., Lo, S.W., Gladstone, R.A., Turner, P., Keenan, J.D., Breiman, R.F., Nahm, M.H., 2020. A New Pneumococcal Capsule Type, 10D, is the 100th Serotype and Has a Large cps Fragment from an Oral *Streptococcus*. *mBio* 11, e00937-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00937-20>
- Garcia-Vidal, C., Ardanuy, C., Tubau, F., Viasus, D., Dorca, J., Liñares, J., Gudiol, F., Carratalà, J., 2010. Pneumococcal pneumonia presenting with septic shock: host- and pathogen-related factors and outcomes. *Thorax* 65, 77–81. <https://doi.org/10.1136/thx.2009.123612>
- Garibyan, L., Avashia, N., 2013. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J. Invest. Dermatol.* 133, e6. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Geno, K.A., Gwendolyn L. Gilbert, Joon Young Song, Ian C. Skovsted, Keith P. Klugman, Christopher Jones, Helle B. Konradsen, Moon H. Nahm, 2015. Pneumococcal

- Capsules and Their Types: Past, Present, and Future [WWW Document].  
<https://doi.org/10.1128/cmr.00024-15>
- Gil, E., Noursadeghi, M., Brown, J.S., 2022. *Streptococcus pneumoniae* interactions with the complement system. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12, 929483.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.929483>
- Gillespie, S.H., Ullman, C., Smith, M.D., Emery, V., 1994. Detection of *Streptococcus pneumoniae* in sputum samples by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32, 1308–1311.  
<https://doi.org/10.1128/jcm.32.5.1308-1311.1994>
- Giuliano, C., Patel, C.R., Kale-Pradhan, P.B., 2019. A Guide to Bacterial Culture Identification And Results Interpretation. *Pharm. Ther.* 44, 192–200.
- Greenberg, D., Hoover, P.A., Vesikari, T., Peltier, C., Hurley, D.C., McFetridge, R.D., Dallas, M., Hartzel, J., Marchese, R.D., Collier, B.-A.G., Stek, J.E., Abeygunawardana, C., Winters, M.A., MacNair, J.E., Pujar, N.S., Musey, L., 2018. Safety and immunogenicity of 15-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV15) in healthy infants. *Vaccine* 36, 6883–6891. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.02.113>
- Grivea, I.N., Priftis, K.N., Giotas, A., Kotzia, D., Tsantouli, A.G., Douros, K., Michoula, A.N., Syrogiannopoulos, G.A., 2014. Dynamics of pneumococcal carriage among day-care center attendees during the transition from the 7-valent to the higher-valent pneumococcal conjugate vaccines in Greece. *Vaccine* 32, 6513–6520.  
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.09.016>
- Grivea, I.N., Sourla, A., Ntokou, E., Chryssanthopoulou, D.C., Tsantouli, A.G., Syrogiannopoulos, G.A., 2012. Macrolide resistance determinants among *Streptococcus pneumoniae* isolates from carriers in Central Greece. *BMC Infect. Dis.* 12, 255. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-255>
- Groves, N., Sheppard, C.L., Litt, D., Rose, S., Silva, A., Njoku, N., Rodrigues, S., Amin-Chowdhury, Z., Andrews, N., Ladhani, S., Fry, N.K., 2019. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 3 in England and Wales: A Major Vaccine Evader. *Genes* 10, 845. <https://doi.org/10.3390/genes10110845>
- Härtel, T., Eylert, E., Schulz, C., Petruschka, L., Gierok, P., Grubmüller, S., Lalk, M., Eisenreich, W., Hammerschmidt, S., 2012. Characterization of central carbon metabolism of *Streptococcus pneumoniae* by isotopologue profiling. *J. Biol. Chem.* 287, 4260–4274.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.304311>
- Hausdorff, W.P., Bryant, J., Kloek, C., Paradiso, P.R., Siber, G.R., 2000. The Contribution of Specific Pneumococcal Serogroups to Different Disease Manifestations: Implications for Conjugate Vaccine Formulation and Use, Part II. *Clin. Infect. Dis.* 30, 122–140.  
<https://doi.org/10.1086/313609>
- Hava, D.L., Camilli, A., 2002. Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol. Microbiol.* 45, 1389–1406.
- Hava, D.L., LeMieux, J., Camilli, A., 2003. From nose to lung: the regulation behind *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol. Microbiol.* 50, 1103–1110.
- Hecker, K.H., Roux, K.H., 1996. High and Low Annealing Temperatures Increase Both Specificity and Yield in Touchdown and Stepdown PCR. *BioTechniques* 20, 478–485.  
<https://doi.org/10.2144/19962003478>
- Isturiz, R., Sing, H.L., Hilton, B., Arguedas, A., Reinert, R.-R., Jodar, L., 2017. *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A: worldwide epidemiology. *Expert Rev. Vaccines* 16, 1007–1027. <https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1362339>
- Jansen, K.U., Anderson, A.S., 2018. The role of vaccines in fighting antimicrobial resistance (AMR). *Hum. Vaccines Immunother.* 14, 2142–2149.  
<https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1476814>
- Jednačák, T., Mikulandra, I., Novak, P., 2020. Advanced Methods for Studying Structure and Interactions of Macrolide Antibiotics. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 7799.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21207799>

- Kaijalainen, T., Rintamäki, S., Herva, E., Leinonen, M., 2002. Evaluation of gene-technological and conventional methods in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. J. Microbiol. Methods 51, 111–118. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00061-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00061-1)
- Kanfer, I., Skinner, M.F., Walker, R.B., 1998. Analysis of macrolide antibiotics. J. Chromatogr. A 812, 255–286. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00276-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00276-3)
- Kaplan, S.L., Mason, E.O., Wald, E.R., Schutze, G.E., Bradley, J.S., Tan, T.Q., Hoffman, J.A., Givner, L.B., Yogev, R., Barson, W.J., 2004. Decrease of invasive pneumococcal infections in children among 8 children’s hospitals in the United States after the introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. Pediatrics 113, 443–449. <https://doi.org/10.1542/peds.113.3.443>
- Koutouzis, E.I., Daikos, G.L., Chatzichristou, P., Michos, A.G., Koutouzi, F.I., Chrousos, G.P., Syriopoulou, V.P., 2018. Characteristics of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A isolates from children in the pre and post Conjugate Vaccine Era. Single center experience 1986–2015. Vaccine 36, 5245–5250. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.07.055>
- Leclercq, R., 2002. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. 34, 482–492. <https://doi.org/10.1086/324626>
- Lei, L., Wang, X., 2022. Determining the frequency of *Streptococcus pneumoniae* carriers and its microbial resistance in children. Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr. 68, 203–207. <https://doi.org/10.14715/cmb/2022.68.2.29>
- Levidiotou, S., Vrioni, G., Tzanakaki, G., Pappa, C., Gesouli, H., Gartzonika, C., Papamichail, D., Kremastinou, J., 2006. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* in north-western Greece and implications for a vaccination programme. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 48, 179–182. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00126.x>
- Lewis, J.S., II, Jorgensen, J.H., 2005. Inducible Clindamycin Resistance in Staphylococci: Should Clinicians and Microbiologists be Concerned? Clin. Infect. Dis. 40, 280–285. <https://doi.org/10.1086/426894>
- Li, L., Ma, J., Yu, Z., Li, M., Zhang, W., Sun, H., 2023. Epidemiological characteristics and antibiotic resistance mechanisms of *Streptococcus pneumoniae* : An updated review. Microbiol. Res. 266, 127221. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127221>
- Li, W., Atkinson, G.C., Thakor, N.S., Allas, U., Lu, C., Chan, K.-Y., Tenson, T., Schulten, K., Wilson, K.S., Haurlyiuk, V., Frank, J., 2013. Mechanism of tetracycline resistance by ribosomal protection protein Tet(O). Nat. Commun. 4, 1477. <https://doi.org/10.1038/ncomms2470>
- Lin, H.W., Shargorodsky, J., Gopen, Q., 2010. Clinical Strategies for the Management of Acute Mastoiditis in the Pediatric Population. Clin. Pediatr. (Phila.) 49, 110–115. <https://doi.org/10.1177/0009922809344349>
- Liñares, J., Ardanuy, C., Pallares, R., Fenoll, A., 2010. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. Clin. Microbiol. Infect. 16, 402–410. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03182.x>
- Lorenz, T.C., 2012. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. J. Vis. Exp. JoVE 3998. <https://doi.org/10.3791/3998>
- Loughran, A.J., Orihuela, C.J., Tuomanen, E.I., 2019. *Streptococcus pneumoniae* : Invasion and Inflammation. Microbiol. Spectr. 7, 10.1128/microbiolspec.GPP3-0004–2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0004-2018>
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin.

- Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 18, 268–281.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Marmaras, N., Xirogianni, A., Papandreou, A., Petinaki, E., Papaevangelou, V., Tsofia, M., Tzanakaki, G., 2021. Pneumococcal Serotype Identification by Capsular Sequence Typing (CST): A Modified Novel Approach for Serotyping Directly in Clinical Samples. *Diagnostics* 11, 2353. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11122353>
- Marquart, M.E., 2021. Pathogenicity and virulence of *Streptococcus pneumoniae* : Cutting to the chase on proteases. *Virulence* 12, 766–787.  
<https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1889812>
- Mazel, D., 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 608–620.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1462>
- Meherali, S., Campbell, A., Hartling, L., Scott, S., 2019. Understanding Parents' Experiences and Information Needs on Pediatric Acute Otitis Media: A Qualitative Study. *J. Patient Exp.* 6, 53–61. <https://doi.org/10.1177/2374373518771362>
- Miao, C., Cui, Y., Yan, Z., Jiang, Y., 2023. Pilus of *Streptococcus pneumoniae* : structure, function and vaccine potential. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 13, 1270848.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1270848>
- Mitchell, A.M., Mitchell, T.J., 2010. *Streptococcus pneumoniae* : virulence factors and variation. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 411–418. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03183.x>
- Moore, M.R., Gertz, R.E., Woodbury, R.L., Barkocy-Gallagher, G.A., Schaffner, W., Lexau, C., Gershman, K., Reingold, A., Farley, M., Harrison, L.H., Hadler, J.L., Bennett, N.M., Thomas, A.R., McGee, L., Pilishvili, T., Brueggemann, A.B., Whitney, C.G., Jorgensen, J.H., Beall, B., 2008. Population snapshot of emergent *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in the United States, 2005. *J. Infect. Dis.* 197, 1016–1027.  
<https://doi.org/10.1086/528996>
- Morrison, K.E., Lake, D., Crook, J., Carlone, G.M., Ades, E., Facklam, R., Sampson, J.S., 2000. Confirmation of *psaA* in All 90 Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* by PCR and Potential of This Assay for Identification and Diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 38, 434–437. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.1.434-437.2000>
- Mundy, L.S., Janoff, E.N., Schwebke, K.E., Shanholtzer, C.J., Willard, K.E., 1998. Ambiguity in the Identification of *Streptococcus pneumoniae* Optochin, Bile Solubility, Quellung, and the AccuProbe DNA Probe Tests. *Am. J. Clin. Pathol.* 109, 55–61.  
<https://doi.org/10.1093/ajcp/109.1.55>
- Munita, J.M., Arias, C.A., 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Spectr.* 4, 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016–2015.  
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Ngo, C.C., Massa, H.M., Thornton, R.B., Cripps, A.W., 2016. Predominant Bacteria Detected from the Middle Ear Fluid of Children Experiencing Otitis Media: A Systematic Review. *PLoS ONE* 11, e0150949. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150949>
- Nygård, S.T., Langeland, N., Flaatten, H.K., Fanebust, R., Haugen, O., Skrede, S., 2014. Aetiology, antimicrobial therapy and outcome of patients with community acquired severe sepsis: a prospective study in a Norwegian university hospital. *BMC Infect. Dis.* 14, 121. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-121>
- Oordt-Speets, A.M., Bolijn, R., Hoorn, R.C. van, Bhavsar, A., Kyaw, M.H., 2018. Global etiology of bacterial meningitis: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE* 13, e0198772. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198772>
- Ouldali, N., Varon, E., Levy, C., Angoulvant, F., Georges, S., Ploy, M.-C., Kempf, M., Cremniter, J., Cohen, R., Bruhl, D.L., Danis, K., 2021. Invasive pneumococcal disease incidence in children and adults in France during the pneumococcal conjugate vaccine era: an interrupted time-series analysis of data from a 17-year national prospective

- surveillance study. *Lancet Infect. Dis.* 21, 137–147. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30165-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30165-1)
- Paton, James, C., Trappetti, Claudia, 2019. *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide. [https://doi.org/DOI: 10.1128/microbiolspec.gpp3-0019-2018](https://doi.org/DOI:10.1128/microbiolspec.gpp3-0019-2018)
- Poole, K., 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 20–51. <https://doi.org/10.1093/jac/dki171>
- Poplin, V., Boulware, D.R., Bahr, N.C., 2020. Methods for rapid diagnosis of meningitis etiology in adults. *Biomark. Med.* 14, 459–479. <https://doi.org/10.2217/bmm-2019-0333>
- Poyart, C., Jardy, L., Quesne, G., Berche, P., Trieu-Cuot, P., 2003. Genetic Basis of Antibiotic Resistance in *Streptococcus agalactiae* Strains Isolated in a French Hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 794–797. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.2.794-797.2003>
- Resti, M., Moriondo, M., Cortimiglia, M., Indolfi, G., Canessa, C., Beccioli, L., Bartolini, E., Benedictis, F.M. de, Martino, M. de, Azzari, C., Diseasea for the Italian Group for the Study of Invasive Pneumococcal, 2010. Community-Acquired Bacteremic Pneumococcal Pneumonia in Children: Diagnosis and Serotyping by Real-Time Polymerase Chain Reaction Using Blood Samples. *Clin. Infect. Dis.* 51, 1042–1049. <https://doi.org/10.1086/656579>
- Roberts, M.C., 2008. Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 282, 147–159. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01145.x>
- Sadowy, E., Hryniewicz, W., 2020. Identification of *Streptococcus pneumoniae* and other Mitis streptococci: importance of molecular methods. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 39, 2247–2256. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03991-9>
- Sahi, D., Nguyen, H., Callender, K.D., 2023. Mastoiditis, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Schroeder, M.R., Stephens, D.S., 2016. Macrolide Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6, 98. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00098>
- Sempere, J., González-Camacho, F., Domenech, M., Llamós, M., Del Río, I., López-Ruiz, B., Gimeno, M., Coronel, P., Yuste, J., 2022. A national longitudinal study evaluating the activity of cefditoren and other antibiotics against non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* strains during the period 2004–20 in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 77, 1045–1051. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab482>
- Shirley, M., 2023. 20-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine: Pediatric First Approval. *Pediatr. Drugs* 25, 613–619. <https://doi.org/10.1007/s40272-023-00584-9>
- Siber, G.R., 1994. Pneumococcal Disease: Prospects for a New Generation of Vaccines. *Science* 265, 1385–1387. <https://doi.org/10.1126/science.8073278>
- Smith, D.K., Kuckel, D.P., Recidoro, A.M., 2021. Community-Acquired Pneumonia in Children: Rapid Evidence Review. *Am. Fam. Physician* 104, 618–625.
- Smolinski, N.E., Antonelli, P.J., Winterstein, A.G., 2022. Watchful Waiting for Acute Otitis Media. *Pediatrics* 150, e2021055613. <https://doi.org/10.1542/peds.2021-055613>
- Srzić, I., Neseček Adam, V., Tunjić Pejak, D., 2022. SEPSIS DEFINITION: WHAT'S NEW <sup>[1]</sup><sub>[SEP]</sub> IN THE TREATMENT GUIDELINES. *Acta Clin. Croat.* 61, 67–72. <https://doi.org/10.20471/acc.2022.61.s1.11>
- Suzuki, H.G., Dewez, J.E., Nijman, R.G., Yeung, S., 2020. Clinical practice guidelines for acute otitis media in children: a systematic review and appraisal of European national guidelines. *BMJ Open* 10, e035343. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-035343>
- Syrogianopoulos, G.A., Grivea, I.N., Tait-Kamradt, A., Katopodis, G.D., Beratis, N.G., Sutcliffe, J., Appelbaum, P.C., Davies, T.A., 2001. Identification of an erm(A) erythromycin resistance methylase gene in *Streptococcus pneumoniae* isolated in

- Greece. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 342–344.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.45.1.342-344.2001>
- Tsang, R.S.W., 2021. A Narrative Review of the Molecular Epidemiology and Laboratory Surveillance of Vaccine Preventable Bacterial Meningitis Agents: *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus agalactiae*. *Microorganisms* 9, 449. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020449>
- Tzanakaki, G., Tsopanomichalou, M., Kesanopoulos, K., Matzourani, R., Sioumalas, M., Tabaki, A., Kremastinou, J., 2005. Simultaneous single-tube PCR assay for the detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae*. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 386–390. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01109.x>
- Ubukata, K., Morozumi, M., Sakuma, M., Takata, M., Mokuno, E., Tajima, T., Iwata, S., Group, and the A.S.S., 2018. Etiology of Acute Otitis Media and Characterization of Pneumococcal Isolates After Introduction of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine in Japanese Children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 37, 598.  
<https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001956>
- van de Beek, D., Brouwer, M.C., Thwaites, G.E., Tunkel, A.R., 2012. Advances in treatment of bacterial meningitis. *The Lancet* 380, 1693–1702. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61186-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61186-6)
- Varaldo, P.E., Montanari, M.P., Giovanetti, E., 2009. Genetic Elements Responsible for Erythromycin Resistance in Streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 343–353. <https://doi.org/10.1128/AAC.00781-08>
- Virolainen, A., Salo, P., Jero, J., Karma, P., Eskola, J., Leinonen, M., 1994. Comparison of PCR assay bacterial culture for detecting *Streptococcus pneumoniae* in middle ear fluid of children with acute otitis media. *J. Clin. Microbiol.* 32, 2667–70.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.32.11.2667-2670.1994>
- Weisblum, B., 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 577–585.
- Wilson, D.N., 2014. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 35–48. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3155>
- Xirogianni, A., Marmaras, N., Georgakopoulou, T., Papandreou, A., Simantirakis, S., Magaziotou, I., Eliades, A., Getsi, V., Anastasiou-Katsiardani, A., Staikou, E., Markou, F., Argyropoulou, A., Vlachaki, G., Chronopoulou, G., Pangalis, A., Liakopoulou, T., Michos, A., Spoulou, V., Lagona, E., Panagiotakopoulos, G., Petinaki, E., Mantadakis, E., Roilides, E., Galanakis, M., Papaevangelou, V., Tsolia, M., Tzanakaki, G., 2022. Pneumococcal meningitis in Greece: A retrospective serotype surveillance study in the post-PCV13 era (2010–2020). *Vaccine* 40, 5079–5087.  
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.07.015>
- Xirogianni, A., Tzanakaki, G., Karagianni, E., Markoulatos, P., Kourea-Kremastinou, J., 2009. 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. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 63, 121–126. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.09.017>
- Yonamine, F.K., Tuma, J., Silva, R.F.N. da, Soares, M.C.M., Testa, J.R.G., 2009. Facial paralysis associated with acute otitis media. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* 75, 228–230.  
[https://doi.org/10.1016/S1808-8694\(15\)30782-5](https://doi.org/10.1016/S1808-8694(15)30782-5)
- Zeng, X., Kong, F., Wang, H., Darbar, A., Gilbert, G.L., 2006. Simultaneous Detection of Nine Antibiotic Resistance-Related Genes in *Streptococcus agalactiae* Using Multiplex PCR and Reverse Line Blot Hybridization Assay. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 204–209. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.204-209.2006>
- Zissis, N.P., Syriopoulou, V., Kafetzis, D., Daikos, G.L., Tsilimingaki, A., Galanakis, E., Tsangaropoulou, I., 2004. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of



*Streptococcus pneumoniae* causing invasive infections and acute otitis media in children. Eur. J. Pediatr. 163, 364–368. <https://doi.org/10.1007/s00431-004-1447-4>

[Τροποποιημένο Εθνικό Πρόγραμμα Εμβολιασμών Παιδιών και Εφήβων 2023 - Εθνικό Πρόγραμμα Εμβολιασμών \(ΕΠΕ\) παιδιών και εφήβων - Υπουργείο Υγείας \(moh.gov.gr\)](#)

[Εθνικό Πρόγραμμα Εμβολιασμών \(ΕΠΕ\) παιδιών και εφήβων - Υπουργείο Υγείας \(moh.gov.gr\)](#)).

[\(Εθνικό Πρόγραμμα Εμβολιασμών \(ΕΠΕ\) Ενηλίκων - Υπουργείο Υγείας \(moh.gov.gr\)\)](#)

[\(Εθνικό Πρόγραμμα Εμβολιασμών Ενηλίκων 2023 - Εθνικό Πρόγραμμα Εμβολιασμών \(ΕΠΕ\) Ενηλίκων - Υπουργείο Υγείας \(moh.gov.gr\)\)](#)).

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας. 1- Παράρτημα. Καταγραφή δειγμάτων ανά ορότυπο και ανά έτος εμφάνισης.

	2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016		2017		2018		2019		2020		2021		2022		2023		ΣΥΝΟΛΟ
	n1=63	n2=27	n1=63	n2=27	n1=63	n2=27	n1=63	n2=27	n1=63	n2=27	n1=63	n2=27	n1=63	n2=27	n1=63	n2=27	n1=63	n2=27	n1=63	n2=27	n1=63	n2=27	n1=63	n2=27	n1=63	n2=27	n1=63	n2=27	
NT	4	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8
1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
3	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	1	2	1	2	-	1	2	1	1	-	-	-	-	-	1	-	-	15
6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
14	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2
10A	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	3
11AD	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	2	-	-	6
15A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	4
15B/C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	4
16F	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
17A, 35 B/C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
19A	11	-	2	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2	1	-	-	-	1	1	-	-	-	1	-	3	-	-	23
19F	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
22F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	3
23A	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
23B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	3
24F, 40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
25A/F, 38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
33A/F, 35A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	2
35F, 47F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
7A/F	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
7C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<b>ΣΥΝΟΛΟ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ</b>	<b>21</b>		<b>11</b>		<b>1</b>		<b>1</b>		<b>0</b>		<b>6</b>		<b>8</b>		<b>8</b>		<b>7</b>		<b>8</b>		<b>3</b>		<b>1</b>		<b>13</b>		<b>2</b>		<b>90</b>

Πίνακας 2- Παράρτημα. Ποσοστά ανίχνευσης των γονιδίων αντοχής (*mefA/E*, *ermB*, *ermA/TR*) που ανιχνεύθηκαν σε σύνολο 47 δειγμάτων που οφείλονταν σε στέλεχος *S.pneumoniae* με υπεύθυνο ορότυπο που καλύπτεται από τα εμβόλια PCV13 & PCV15.

ΟΡΟΤΥΠΟ PCV13,15	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	<i>mefA/E</i>	<i>ermB</i>	<i>ermA/TR</i>	<i>mef</i> και <i>ermB</i>	ΠΟΣΟΣΤΑ		
						ΑΠΟΥΣΙΑ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΑ ΟΡΟΤΥΠΟ	ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΑ ΟΡΟΤΥΠΟ	ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΑ ΟΡΟΤΥΠΟ
1	1	0	0	0	0	1	0	0,00%
3	15	1	1	0	0	13	2	13,33%
14	2	0	0	0	1	1	1	50,00%
19A	23	3	4	0	12	4	19	82,61%
19F	3	3	0	0	0	0	3	100,00%
22F	3	0	0	0	0	3	0	0,00%
ΣΥΝΟΛΟ	47	7	5	0	13	22	25	-
ΠΟΣΟΣΤΟ %	100,00%	14,89%	10,64%	0,00%	27,66%	46,81%	53,19%	-

Πίνακας. 3- Παράρτημα. Ποσοστά ανίχνευσης των γονιδίων αντοχής (*mefA/E*, *ermB*, *ermA/TR*) που ανιχνεύθηκαν σε σύνολο 43 δειγμάτων που οφείλονταν σε στέλεχος *S.pneumoniae* με υπεύθυνο ορότυπο που δεν καλύπτεται από τα εμβόλια PCV13 & PCV15 ή σε ορότυπο NT.

ΟΡΟΤΥΠΟΙ NON-PCV13,15/ NT	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	<i>mefA/E</i>	<i>ermB</i>	<i>ermA/TR</i>	<i>mef</i> και <i>ermB</i>	ΑΠΟΥΣΙΑ ΓΟΝΙΔΙΩΝ	ΠΑΡΟΥΣΙΑ	ΠΟΣΟΣΤΑ
						ΑΝΑ ΟΡΟΤΥΠΟ	ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΑ ΟΡΟΤΥΠΟ	ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΑ ΟΡΟΤΥΠΟ
NT	8	2	0	0	0	6	2	25,00%
6	1	0	0	0	0	1	0	0,00%
8	1	0	0	0	0	1	0	0,00%
10A	3	0	0	0	0	3	0	0,00%
11A/D	6	0	1	0	2	3	3	50,00%
15A	4	0	2	1	0	1	3	75,00%
15B/C	4	0	0	0	0	4	0	0,00%
16F	3	0	0	0	0	3	0	0,00%
17A, 35 B/C	1	1	0	0	0	0	1	100,00%
23A	2	0	0	1	0	1	1	50,00%
23B	3	0	0	0	0	3	0	0,00%
24F, 40	1	0	0	0	1	0	1	100,00%
25A/F, 38	1	0	0	0	0	1	0	0,00%
33A/F, 35A	2	0	2	0	0	0	2	100,00%
35F, 47F	1	1	0	0	0	0	1	100,00%
7A/F	1	0	0	0	0	1	0	0,00%
7C	1	0	0	0	0	1	0	0,00%
ΣΥΝΟΛΟ	43	4	5	2	3	29	14	-
ΠΟΣΟΣΤΟ %	100,00%	9,30%	11,63%	4,65%	6,98%	67,44%	32,56%	-

Η παρούσα εργασία παρουσιάστηκε στο 3<sup>ο</sup> πανελλήνιο συνέδριο παιδιατρικών λοιμώξεων.

# 3<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Παιδιατρικών Λοιμώξεων

8-10 Δεκεμβρίου 2023

Ξενοδοχείο ROYAL OLYMPIC - Αθήνα



## ΒΕΒΑΙΩΣΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΗΣ

Με την παρούσα επιστολή βεβαιώνουμε ότι η εργασία με τίτλο:

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΙΣ ΜΑΚΡΟΛΙΔΕΣ  
ΑΠΕΥΘΕΙΑΣ ΣΕ ΩΤΙΚΑ ΥΓΡΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΛΟΙΜΩΞΗ ΑΠΟ S. Pneumoniae**

και συγγραφείς τους:

**Μαρίνα Δελέγκου**, Αθανασία Ξηρογιάννη, Αθανασία Ρήγκου,  
Στέλιος Σημαντηράκης, Τζωρτζίνα Τζανακάκη

Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας, Εργαστήριο Επιτήρησης Λοιμωδών Νοσημάτων (ΕΕΛΝΟ), Τμήμα  
Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, Σχολή Δημόσιας Υγείας, ΠΑΔΑ

παρουσιάστηκε ως **Ελεύθερη Ανακοίνωση**

με αριθμό ταξινόμησης εργασίας **ΕΑ 06**

στο πλαίσιο του 3<sup>ου</sup> Πανελληνίου Συνεδρίου Παιδιατρικών Λοιμώξεων  
που πραγματοποιήθηκε, στις 08 - 10 Δεκεμβρίου 2023 στην Αθήνα.

Η Πρόεδρος του Συνεδρίου

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Tsoli'.

**Μαρίζα Τσολιά**

Καθηγήτρια Παιδιατρικής - Λοιμωξιολογίας Ε.Κ.Π.Α.  
Πρόεδρος Ελληνικής Εταιρείας Παιδιατρικών Λοιμώξεων



