

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ
ΤΩΝ GRAM ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΟΚΚΩΝ ΣΤΙΣ
ΟΞΑΖΟΛΙΔΙΝΟΝΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2009

B



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
Αρ. Πρωτ. 689
Ημερομηνία 20-9-09

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ
ΤΩΝ GRAM ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΟΚΚΩΝ ΣΤΙΣ
ΟΞΑΖΟΛΙΔΙΝΟΝΕΣ**

ΛΑΡΙΣΑ 2009



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 7657/1

Ημερ. Εισ.: 01-12-2009

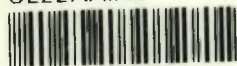
Δωρεά: ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2009

ΛΙΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087146



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΤΩΝ GRAM
ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΟΚΚΩΝ ΣΤΙΣ ΘΕΑΖΟΛΙΔΙΝΟΝΕΣ**

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Πετεινάκη Ευθυμία: Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Επιτροπή Αξιολόγησης:

Πετεινάκη Ευθυμία: Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος: Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μόσιαλος Δημήτριος: Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Επιμέλεια:  Λιακόπουλος Χ. Απόστολος

ΠΑΝΕΠ. ΓΕΝ. ΝΟΣΟΚ. ΛΑΡΙΣΑΣ
ΕΠΙΧΟΛΗ ΠΕΤΕΙΝΑΚΗ
ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
Δ/ΝΤΡΙΑ ΕΡΓΑΣΤ. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2009

**Στους γονείς και
τα αδέρφια μου . . .**

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα	3
Εισαγωγή	6
<u>1. Πρόλογος</u>	7
<u>2. Αντιβιοτικά και Βακτηριακή Πρωτεϊνική Σύνθεση</u>	8
<u>3. Βακτηριακή Πρωτεϊνική Σύνθεση</u>	10
3.1 Βακτηριακό Ριβόσωμα.....	10
3.2 Σχηματισμός αμινοακυλο-tRNA.....	12
3.3 Εκκίνηση της Πρωτεϊνοσύνθεσης.....	13
3.4 Επιμήκυνση Πρωτεϊνοσύνθεσης.....	14
3.5 Τερματισμός Πρωτεϊνοσύνθεσης.....	16
<u>4. Οξαζολιδινόνες</u>	17
4.1 Γενικά.....	17
4.2 Φάσμα Αντιμικροβιακής Δραστικότητας.....	19
4.3 Μηχανισμός Δράσης.....	20
4.4 Μηχανισμός Αντοχής.....	23
4.5 Επιδημιολογικά Δεδομένα της Αντοχής για την Ελλάδα.....	25
<u>5. Σκοπός της εργασίας</u>	26
Υλικά και Μέθοδοι	27
<u>1. Χρόση κατά Gram</u>	28
<u>2. Δοκιμασία παραγωγής καταλάση</u>	29
<u>3. Δοκιμασία παραγωγής πηκτάσης</u>	30
<u>4. Έλεγχος Αντοχής στα Αντιβιοτικά (Αντιβιόγραμμα)</u>	32
4.1 Δοκιμασία των Δίσκων.....	32
4.2 Δοκιμασία E (E-test).....	33
<u>5. Απομόνωση Γενετικού Υλικού</u>	34
<u>6. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)</u>	35
6.1 Ενίσχυση τμήματος του <i>tuf</i> γονιδίου.....	39
6.2 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου του 23S rRNA.....	39
6.3 Ενίσχυση τμήματος του <i>cfp</i> γονιδίου.....	40
6.4 Ενίσχυση τμήματος των <i>rplD</i> και <i>rplV</i> γονιδίων.....	41

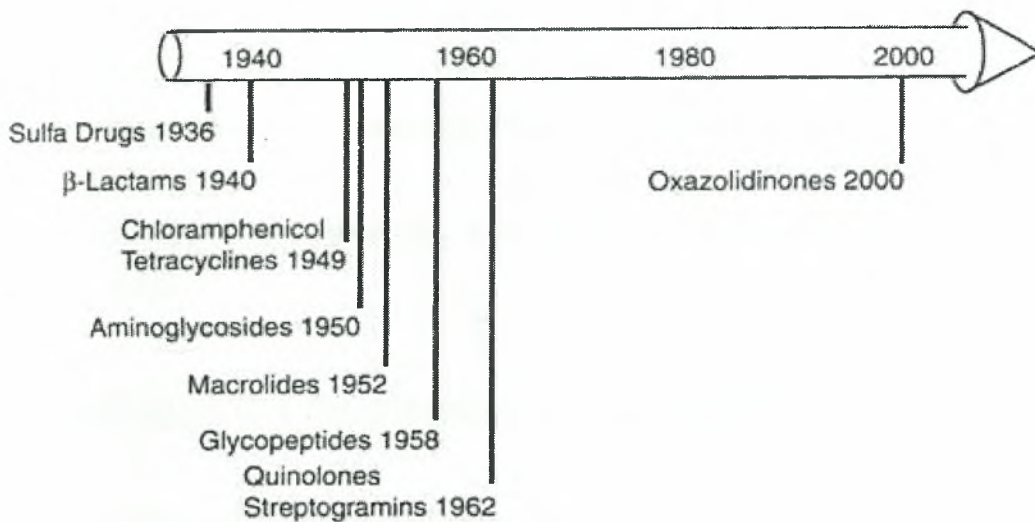
<u>7. Διπλή ή Εμφωλεάζουσα PCR (nested PCR)</u>	41
7.1 Ενίσχυση τμήματος του οπερονίου <i>rflA</i>	44
7.2 Ενίσχυση τμήματος του οπερονίου <i>rflB</i>	44
7.3 Ενίσχυση τμήματος του οπερονίου <i>rflC</i>	45
7.4 Ενίσχυση τμήματος του οπερονίου <i>rflD</i>	45
7.5 Ενίσχυση τμήματος του οπερονίου <i>rflE</i>	46
7.6 Ενίσχυση τμήματος του οπερονίου <i>rflF</i>	46
7.7 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου του 23S <i>rRNA</i> έκαστου οπερονίου.....	47
<u>8. Ανάλυση RFLP με <i>NheI</i></u>	48
<u>9. Ηλεκτροφόρηση Προϊόντων PCR, nested PCR και RFLP</u>	49
<u>10. Καθαρισμός Προϊόντων της PCR</u>	51
<u>11. Ανάλυση πρωτοδιάταξης αλληλουχίας DNA (sequencing)</u>	53
Αποτελέσματα	56
<u>1. Ταυτοποίηση στελεχών</u>	57
<u>2. Έλεγχος Αντοχής στα Αντιβιοτικά (Αντιβιογράμμα)</u>	59
<u>3. Διερεύνηση μηχανισμών αντοχής</u>	60
3.1 Μεταλλάξεις στη περιοχή <i>V</i> του 23S <i>rRNA</i> γονιδίου.....	60
3.2 Μεταλλάξεις στα <i>rplD</i> και <i>rplV</i> γονίδια.....	63
3.3 Επιβεβαίωση ύπαρξης <i>cfr</i> γονιδίου.....	64
Συζήτηση	65
Βιβλιογραφία	73

Εισαγωγή

1. Πρόλογος

Ογδόντα χρόνια μετά την ανακάλυψη της πενικιλίνης (Εικόνα 1), οι μικροοργανισμοί κατορθώνουν και επιβιώνουν μέσα στο περιβάλλον της αντιμικροβιακής θεραπείας, κινητοποιώντας αρχικά απλούστερους και στη συνέχεια πιο σύνθετους μηχανισμούς αντοχής.

Συγκεκριμένα, οι μικροοργανισμοί είτε μειώνουν τη διαπερατότητα των αντιβιοτικών μέσω αλλαγών της κυτταρικής μεμβράνης τους, είτε παράγουν υδρολυτικά (π.χ. β-λακταμάσες) ή μη υδρολυτικά (π.χ. τροποποιητές των αμινογλυκοσίδων) ένζυμα που μεταβάλλουν τη δομή του αντιβιοτικού, είτε τέλος τροποποιούν τον ίδιο το στόχο δράσης του αντιβιοτικού.



Εικόνα 1. Σχεδιάγραμμα εισαγωγής στην κλινική πράξη έκαστης τάξης αντιβιοτικών (αναπαραγωγή από Walsh, 2003).

Το κύριο ερέθισμα για την ανάπτυξη της επίκτητης αντοχής στα αντιβιοτικά είναι η χρήση των ίδιων των αντιβιοτικών, καθώς η χρήση τους λειτουργεί ως επιλεκτική πίεση ευνοώντας την επιβίωση των ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών. Όμως η πιθανότητα ανάπτυξης αντοχής φαίνεται να εξαρτάται από το συγκεκριμένο φάρμακο και το συγκεκριμένο βακτήριο. Σε κάποιες περιπτώσεις μια απλή μετάλλαξη στο βακτηριακό γονιδίωμα είναι ικανή να προκαλέσει κλινικά σημαντική αντοχή, ενώ σε άλλες περιπτώσεις χρειάζονται πολλαπλές μεταλλάξεις για την εμφάνιση φαινοτυπικής αντοχής (για ανασκόπηση βλέπε Page *et al*, 2000).

Έτσι, η ευρεία χρήση των αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία και στη γεωργία και η αλόγιστη χρήση τους στη κλινική πράξη ευθύνονται για την ανάπτυξη πολυανθεκτικών μικροοργανισμών σε διάφορες τάξεις αντιβιοτικών, τα στελέχη των οποίων έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν και να διασπείρονται μέσα στο ενδονοσοκομειακό περιβάλλον.

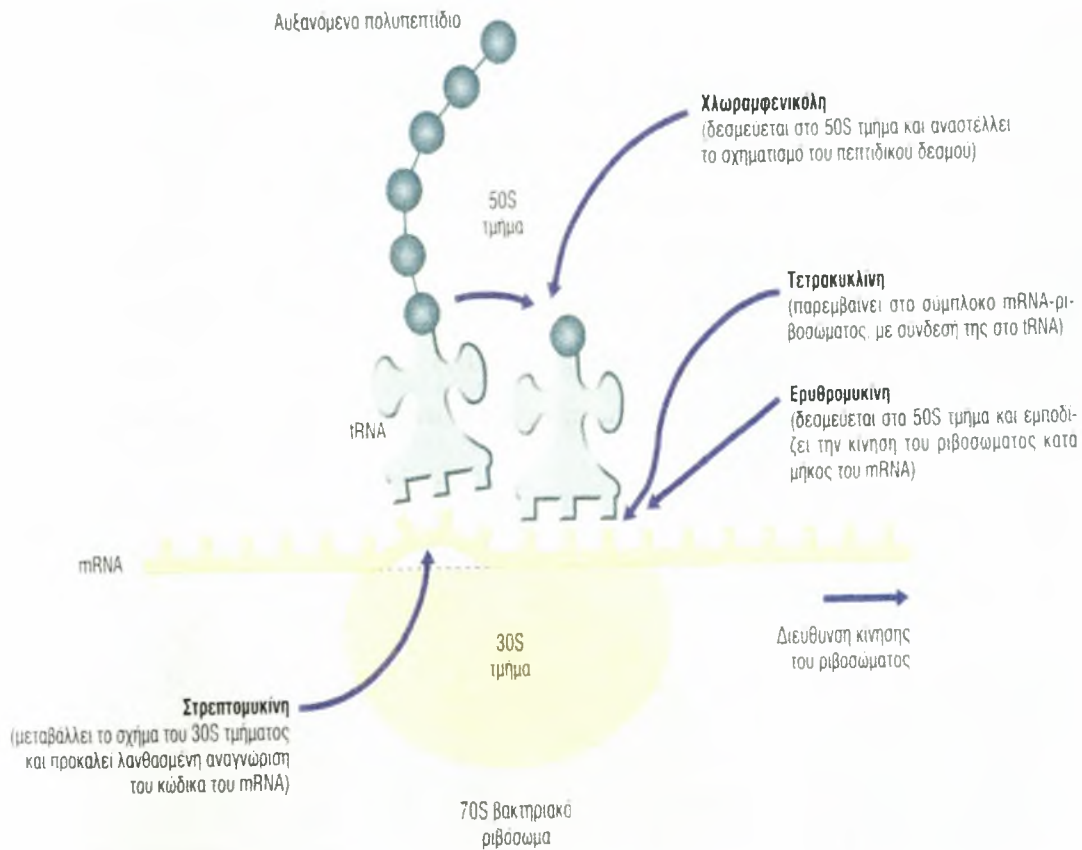
Μελέτες έχουν δείξει ότι οι Gram θετικοί κόκκοι και ιδιαίτερα τα είδη των γενών *Staphylococcus* και *Enterococcus* ενοχοποιούνται τουλάχιστον για το 60% των σοβαρών ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων (Banerjee *et al*, 1991; Pfaller *et al*, 1998; Marshall *et al*, 1998). Το θεραπευτικό πρόβλημα στις περιπτώσεις αυτές έγκειται στη διασπορά μέσα στα νοσοκομεία στελεχών του γένους *Staphylococcus* με αντοχή στις β-λακταμάσες, στις αμινογλυκοσίδες, στις μακρολίδες, στις λινκοσαμίδες και στις κινολόνες με ταυτόχρονη μειωμένη ευαισθησία στα γλυκοπεπτίδια, καθώς και στελεχών του γένους *Enterococcus* με αντοχή στα γλυκοπεπτίδια (βανκομυκίνη και τεικοπλανίνη). Συνεπώς, υπήρξε επιτακτική ανάγκη εύρεσης νέων αντιμικροβιακών παραγόντων στην κλινική θεραπευτική, ανάγκη που ικανοποιήθηκε μετά το 2002 με την είσοδο των οξαζολιδινονών και του κύριου εκπρόσωπου τους, της λινεζολίδης, οι οποίες αναστέλλουν τη βακτηριακή πρωτεϊνική σύνθεση (για ανασκόπηση βλέπε Κυρίτση, 2006).

2. Αντιβιοτικά και Βακτηριακή Πρωτεϊνική Σύνθεση

Αρκετές σημαντικές κατηγορίες αντιβιοτικών (αμινογλυκοσίδες, μακρολίδες, λινκοσαμίδες, στρεπτογραμίνες, τετρακυκλίνες, αμφενικόλες και οξαζολιδινόνες) δρουν κυρίως αναστέλλοντας τη βακτηριακή πρωτεϊνοσύνθεση. Τα φάρμακα αυτά ασκούν εκλεκτική τοξικότητα, αναστέλλοντας τη βακτηριακή σύνθεση πρωτεϊνών σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από την αναστολή που προκαλούν στην πρωτεϊνοσύνθεση των κυττάρων του ξενιστή. Το γεγονός αυτό οφείλεται στη δέσμευση τους σε ειδικούς βακτηριακούς στόχους (Εικόνα 2). Τα περισσότερα από τα φάρμακα είναι κυρίως βακτηριοστατικά, εκτός από τις αμινογλυκοσίδες που είναι βακτηριοκτόνες.

Συγκεκριμένα, οι αμινογλυκοσίδες (γενταμικίνη, στρεπτομυκίνη, κτλ) δεσμεύονται μη αντιστρεπτά σε κάποια σημεία του ριβοσώματος αναστέλλοντας τη μετάφραση. Οι μακρολίδες (ερυθρομυκίνη, κλαρυθρομυκίνη, κτλ), οι λινκοσαμίδες (λινκομυκίνη

και κλινδαμυκίνη) και οι στρεπτογραμίνες (πριστιναμυκίνη, βιτριζιανιαμυκίνη, κτλ), παρότι διαφέρουν χημικώς μεταξύ τους, έχουν παρόμοιους μηχανισμούς δράσης.



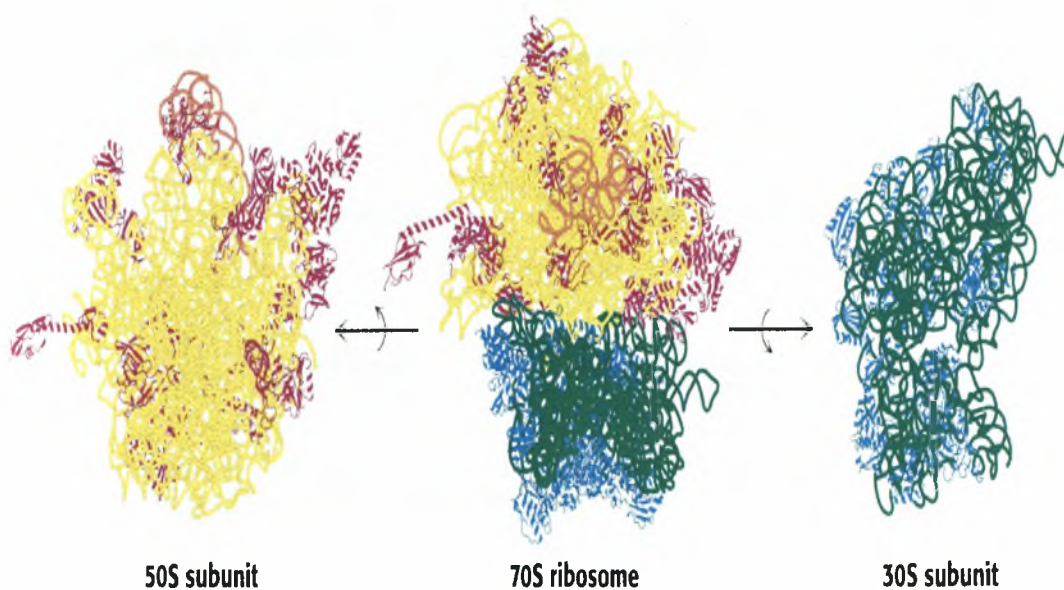
Εικόνα 2. Διάφορες κατηγορίες αντιβιοτικών αναστέλλουν τη βακτηριακή πρωτεϊνοσύνθεση (αναπαραγωγή από Page *et al*, 2000).

Τα αντιβιοτικά αυτά δεσμεύονται αντιστρεπτά στην 50S υπομονάδα των ριβωσώματων και έτσι εμποδίζουν τη διαδικασία μετατόπισης του ριβωσώματος κατά μήκος του mRNA. Οι τετρακυκλίνες (τετρακυκλίνη, δοξυκυκλίνη, κτλ), αυτές δεσμεύονται αντιστρεπτά στην 30S ριβοσωμική υπομονάδα, με τρόπο ο οποίος αποκλείει τη δέσμευση του tRNA στο σύμπλεγμα mRNA-ριβωσώματος, εμποδίζοντας έτσι την προσθήκη νέων αμινοξέων στην επιμηκυνόμενη πεπτιδική αλυσίδα. Οι αμφενικόλες (χλωραμφενικόλη και τριαμφενικόλη) δεσμεύονται αντιστρεπτά στην 50S υπομονάδα του ριβωσώματος, αναστέλλοντας τη δράση της πεπτιδυλο-τρανσφεράσης με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η σύνδεση του αμινοξέος που περιέχεται στο άκρο του tRNA με την πεπτιδική αλυσίδα. Όσον αφορά, τέλος, τις οξαζολιδινόνες (λινεζολιδή) θα γίνει εκτενέστερη αναφορά στη συνέχεια της παρούσας εργασίας (για ανασκόπηση βλέπε Page *et al*, 2000).

3. Βακτηριακή Πρωτεϊνική Σύνθεση

3.1 Βακτηριακό Ριβόσωμα

Τα ριβοσώματα είναι οι μοριακές μηχανές που συντονίζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φορτισμένων tRNA, του mRNA και των πρωτεϊνών κατά την πολύπλοκη διεργασία της πρωτεϊνοσύνθεσης. Το ριβόσωμα, για παράδειγμα, του κολοβακτηριδίου *E. coli* είναι μια συναρμολόγηση ριβονουκλεοπρωτεϊνών σχετικής μάζας περίπου 2.700 Kd και διαμέτρου περίπου 200 Å με συντελεστή καταβύθισης 70S (μονάδες Svedberg). Τα 20.000 περίπου ριβοσώματα ενός βακτηριακού κύτταρου αποτελούν σχεδόν το ένα τέταρτο της συνολικής του μάζας.

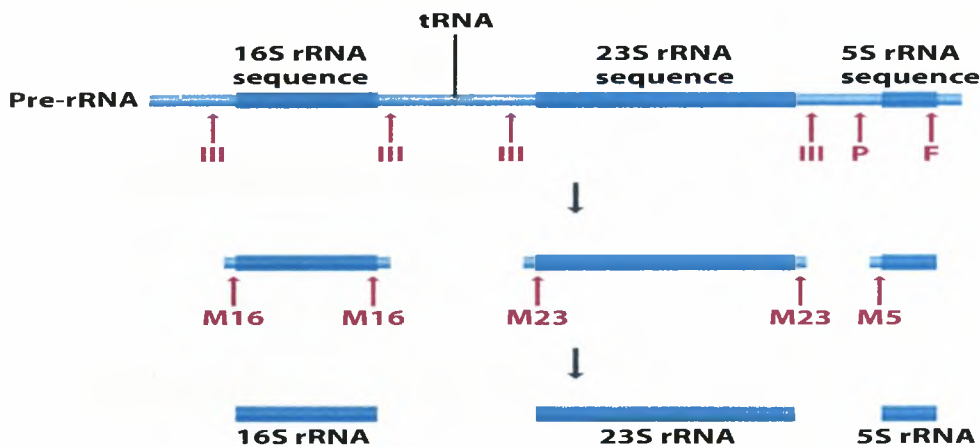


Εικόνα 3. Λεπτομερή μοντέλα του ριβοσώματος 70S καθώς και των υπομονάδων 30S και 50S βάσει κρυσταλλογραφικών μελετών με ακτίνες X. Το RNA 23S φαίνεται κίτρινο, το RNA 5S πορτοκαλι, το RNA 30S πρασινο και οι πρωτεϊνες των υπομονάδων 50S και 30S κοκκινες και μπλε αντιστοιχα (αναπαραγωγή από Berg *et al*, 2005).

Το σωματίο αυτό αποτελείται από μια μεγάλη (50S) και μια μικρή (30S) υπομονάδα (Εικόνα 3). Αυτές οι υπομονάδες μπορούν να χωριστούν περαιτέρω στα συστατικά που τις αποτελούν, δηλαδή σε μόρια πρωτεϊνών και rRNA. Η υπομονάδα 30S περιέχει 21 διαφορετικές πρωτεΐνες (που συμβολίζονται S1 έως S21) και ένα

μόριο RNA 16S, ενώ η υπομονάδα 50S περιέχει 34 διαφορετικές πρωτεΐνες (που συμβολίζονται L1 έως L34) και δυο είδη μορίων RNA, ένα 23S και ένα 5S. Ένα ριβόσωμα αποτελείται από ένα αντίγραφο από κάθε είδος μορίου RNA, δυο αντίγραφα των πρωτεϊνών L7 και L12 καθώς και ένα αντίγραφο από κάθε άλλη πρωτεΐνη. Η πρωτεΐνη L7 είναι όμοια με την πρωτεΐνη L12 εκτός του ότι το αμινοτελικό άκρο της είναι ακετυλιωμένο. Μόνο μια πρωτεΐνη είναι κοινή και στις δυο υπομονάδες, καθώς η πρωτεΐνη S20 είναι ίδια με την L26.

Τα τρία μόρια του ριβοσωματικού RNA (5S, 16S και 23S), τα οποία αποτελούν σχεδόν τα δυο τρίτα της μάζας των ριβοσωμάτων, είναι κρίσιμα για την αρχιτεκτονική και τη λειτουργία τους και προέρχονται από περαιτέρω επεξεργασία πρόδρομων μορίων μεγέθους 5S, 16S και 23S που εκτέμνονται μέσω της δράσης της



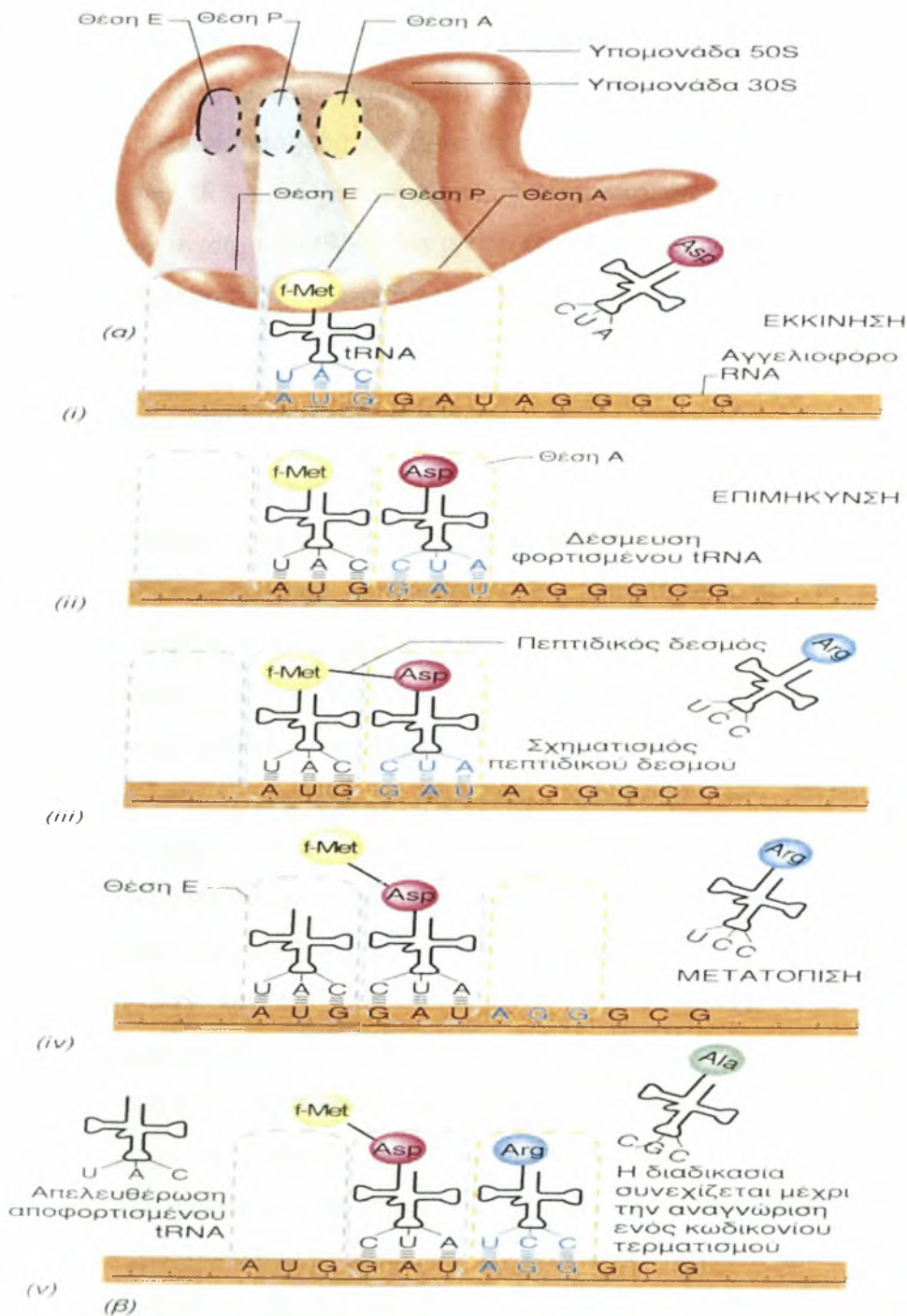
Εικόνα 4. Πρωτογενές μεταγράφημα. Διάσπαση αυτού του μεταγραφήματος παράγει μόρια rRNA μεγέθους 5S, 16S και 23S (αναπαραγωγή από Brown, 2007).

ριβονουκλεάσης III από ένα πρωτογενές μεταγράφημα (Εικόνα 4), διασπώντας περιοχές δίκλωνων φουρκετών σε ειδικές θέσεις.

Τα ριβοσώματα περιέχουν τέσσερις θέσεις δέσμησης για RNA: η μια προορίζεται για το mRNA ενώ οι άλλες τρεις για τα tRNA. Η θέση δέσμησης του mRNA στο ριβόσωμα εδράζεται στο 3' άκρο του 16S και διασφαλίζει τον σχηματισμό του συμπλόκου μεταξύ ριβοσώματος και mRNA. Οι τρεις θέσεις δέσμησης του tRNA ονομάζονται θέση A (αρχική δέσμηση του νεοεισερχόμενου αμινοακυλο-tRNA), θέση P (συγκράτηση του επιμηκνόμενου πεπτιδίου από ένα μόριο tRNA) και θέση E (αποδέσμηση του απακυλιωμένου tRNA) (για ανασκόπηση βλέπε Berg *et al*, 2005).

3.2 Σχηματισμός αμινοακυλο-tRNA

Η αντίδραση προσάρτησης ενός συγκεκριμένου αμινοξέος σε ένα ειδικό μόριο tRNA καταλύεται από ειδικά ένζυμα, τις συνθετάσες των αμινοακυλο-tRNA. Το



Εικόνα 5. Δομή του ριβοσώματος και μετάφραση της πληροφορίας από ένα αγγελιοφόρο RNA στην αμινοξική αλληλουχία μιας πρωτεΐνης (αναπαραγωγή από Madigan *et al*, 2005).

πρώτο βήμα είναι ο σχηματισμός ενός αμινοακυλοαδενυλικού από ένα αμινοξύ και ATP. Τα ενεργοποιημένα αυτά μόρια (αμινοακυλο-AMP) είναι μεικτοί ανυδρίτες, στους οποίους η καρβοξυλική ομάδα του αμινοξέος είναι συνδεδεμένη με την φωσφορυλική ομάδα της AMP. Το ενδιάμεσο μόριο αμινοακυλο-AMP δεν αποσυνδέεται από τη συνθετάση αλλά, αντίθετα, παραμένει σταθερά συνδεδεμένο με το ενεργό κέντρο του ενζύμου μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων.

Το επόμενο βήμα, που καταλύεται από το ίδιο ένζυμο αμινοακυλο-tRNA συνθετάσης, είναι η μεταφορά της αμινοακυλικής ομάδας του αμινοακυλο-AMP σε ένα ειδικό μόριο tRNA για να σχηματιστεί ένα αμινοακυλο-tRNA. Συγκεκριμένα τα αμινοξέα συνδέονται με τα tRNA δια μέσου εστερικών δεσμών είτε στο 2'- είτε στο 3'-υδροξυλικό άκρο της 3'-αδενοσίνης του tRNA.

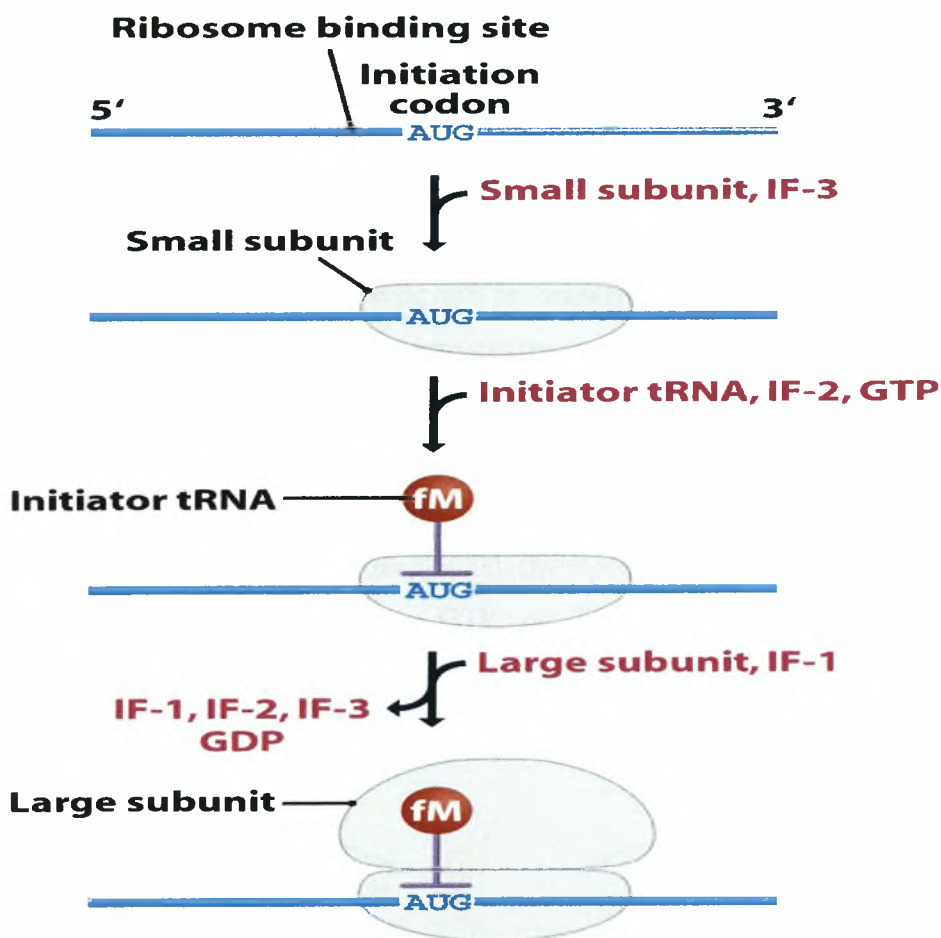
3.3 Εκκίνηση της Πρωτεϊνοσύνθεσης

Η εκκίνηση περιλαμβάνει τις αντιδράσεις που προηγούνται του σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού ανάμεσα στα δυο πρώτα αμινοξέα της πρωτεΐνης (Εικόνα 6). Προϋποθέτει την πρόσδεση του ριβοσώματος στο mRNA και το σχηματισμό συμπλόκου έναρξης που περιέχει το πρώτο αμινοακυλο-tRNA. Αυτό το βήμα της πρωτεϊνοσύνθεσης, που απαιτείται η παρουσία τριφωσφορικής γουανοσίνης, είναι σχετικά αργό και καθορίζει το ρυθμό της μετάφρασης του mRNA (για ανασκόπηση βλέπε Berg *et al*, 2005). Η διεξοδική διερεύνηση του μηχανισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης απέδειξε ότι τρεις πρωτεϊνικοί παράγοντες, ο IF1, ο IF2 και ο IF3, αλληλεπιδρούν ασθενώς με τα 70S ριβοσώματα και σχετίζονται με το στάδιο αυτό.

Συγκεκριμένα, η σύνθεση πρωτεϊνών αρχίζει με την αλληλεπίδραση της υπομονάδας 30S και του mRNA διάμεσου της αλληλουχίας Shine-Dalgarno (αλληλουχία μήκους 3 έως 9 νουκλεοτιδίων που βρίσκεται στο 5' ακρο του mRNA) με τη συμμετοχή του παράγοντα εκκίνησης IF-3.

Με το σχηματισμό αυτού του συμπλόκου, συμπλέκονται και ο παράγοντας εκκίνησης IF-2 καθώς και ένα μόριο GTP. Ο παράγοντας εκκίνησης IF-2 μεταφέρει στη θέση P και κατευθύνει τη δέσμευση του ειδικού εναρκτήριου αμινοακυλο-tRNA, N-φορμυλομεθειόνυλο-tRNA_f (fMet- tRNA_f) στο σύνηθες κωδικόνιο έναρξης AUG, αλλά και στο κατά περίπτωση κωδικόνιο έναρξης GUG.

Έπειτα στη θέση A του συμπλόκου αυτού, δεσμεύεται ο παράγοντας εκκίνησης IF-1, ο οποίος αφενός εμποδίζει την είσοδο του αμινοακυλο-tRNA στη θέση αυτή και



Εικόνα 6. Εκκίνηση πρωτεϊνοσύνθεσης (αναπαραγωγή από Brown, 2007).

αφετέρου ενισχύει τον ρυθμό σχηματισμού του τριμερούς συμπλόκου μεταξύ του mRNA, του εναρκτήριου tRNA και της 30S ριβοσωμικής υπομονάδας.

Στο σημείο αυτό, οι παράγοντες εκκίνησης IF-1 και IF-2 αποδεσμεύονται από το σύμπλοκο με μια διαδικασία που εξαρτάται από την υδρόλυση του προαναφερθέντος μορίου GTP σε GDP και ανόργανο φωσφορικό. Τέλος, ο παράγοντας εκκίνησης IF-3 αποδεσμεύεται παρουσία μιας υπομονάδας 50S επιτρέποντας το σχηματισμό του πλήρους ριβοσώματος 70S. Η συμπλοκή των υπομονάδων 50S και 30S περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις τόσο μεταξύ των πρωτεϊνών τους όσο και μεταξύ των mRNA αλυσίδων τους (για ανασκόπηση βλέπε Franklin and Snow, 1998).

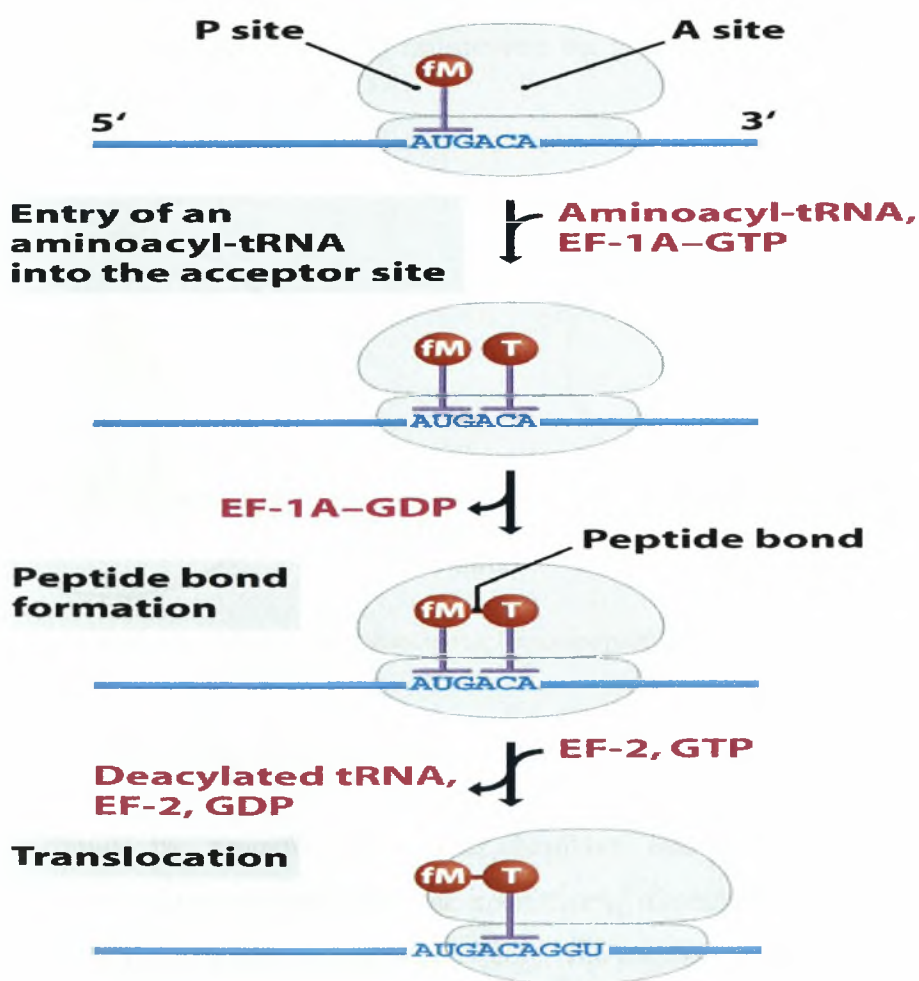
3.4 Επιμήκυνση Πρωτεϊνοσύνθεσης

Η επιμήκυνση της πρωτεϊνοσύνθεσης περιλαμβάνει όλες τις αντιδράσεις, από τη σύνθεση του πρώτου πεπτιδικού δεσμού μέχρι την προσθήκη του τελευταίου

αμινοξέος (Εικόνα 7). Παρότι τα αμινοξέα προστίθενται ένα κάθε φορά, το βήμα αυτό είναι το γρηγορότερο στην πρωτεϊνσύνθεση.

Μετά το σχηματισμό ενός πλήρους ριβοσώματος στο κωδικόνιο έναρξης, κάθε κύκλος σύνθεσης ξεκινά με την είσοδο ενός αμινοακυλο-tRNA στη θέση A του ριβοσώματος, ενώ η θέση P είναι κατειλημμένη από το πεπτιδύλο-tRNA. Οποιοδήποτε αμινοάκυλο-tRNA, εκτός από το εναρκτήριο tRNA, μπορεί να εισέρθει στη θέση A με τη βοήθεια ενός παράγοντα επιμήκυνσης EF-Tu.

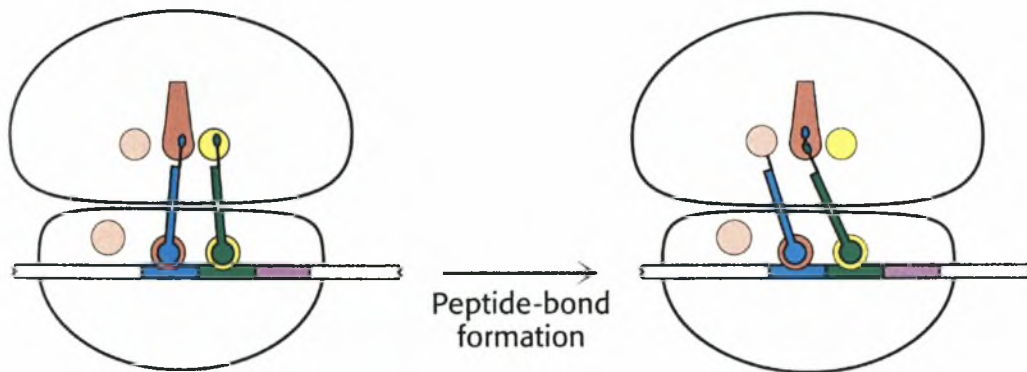
Το αμινοάκυλο-tRNA εισέρχεται στη θέση A σε δυο στάδια. Πρώτα, το άκρο του αντικωδικονίου προσδένεται στη θέση A της υπομονάδας 30S. Στο σημείο αυτό, η αναγνώριση κωδικονίου-αντικωδικονίου πυροδοτεί μια αλλαγή στη διαμόρφωση του ριβοσώματος. Η αλλαγή αυτή σταθεροποιεί την πρόσδεση του tRNA και έχει ως αποτέλεσμα να υδρολύσει ο EF-Tu το GTP του. Το άκρο CCA του tRNA κινείται τώρα στη θέση A της υπομονάδας 50S και το σύμπλοκο EF-Tu • GDP αποδεσμεύεται.



Εικόνα 7. Επιμήκυνση πρωτεϊνσύνθεσης. (αναπαραγωγή από Brown, 2007)

Έτσι, η αμινική ομάδα του αμινοακυλο-tRNA της θέσης A προσβάλλει την καρβονυλική ομάδα του εστερικού δεσμού του εναρκτήριου φορμυλομεθειονυλο-tRNA, σχηματίζοντας ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο. Το ενδιάμεσο αυτό είναι ασταθές και οδηγεί στο σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού. Η διεργασία αυτή λαμβάνει χώρα σε μια ειδική θέση του ριβοσώματος που ονομάζεται κέντρο της πεπτιδυλομεταφοράς.

Κάθε κύκλος προσθήκης ενός αμινοξέος στην επιμηκυνόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα ολοκληρώνεται με τη μετατόπιση, κατά την οποία το ριβόσωμα προχωρεί τρία νουκλεοτίδια κατά μήκος του mRNA. Η μετατόπιση αυτή, η οποία απαιτεί έναν παράγοντα επιμήκυνσης EF-G και ένα μόριο GTP ανά μετατοπιζόμενο tRNA, πραγματοποιείται σε δυο στάδια. Αρχικά μετατοπίζεται η υπομονάδα 50S σε σχέση με την υπομονάδα 30S (Εικόνα 8). Έπειτα, συμβαίνει μια δεύτερη μετατόπιση, καθώς η υπομονάδα 30S μετακινείται κατά μήκος mRNA αποκαθιστώντας την αρχική διαμόρφωση. Κατά τη διαδικασία αυτή, το αποακυλιωμένο tRNA μετακινείται στη θέση E, το πεπτιδυλο-tRNA μετακινείται στη θέση P και η θέση A εκκενώνεται. Ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται καθώς ένα νέο αμινοακυλο-tRNA εισέρχεται στη θέση A, επιτρέποντας έτσι τη συνεχή επιμήκυνση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (για ανασκόπηση βλέπε Lewin, 2004).



Εικόνα 8. Πρώτο στάδιο μετατόπισης του ριβοσώματος (αναπαραγωγή από Berg *et al*, 2005).

3.5 Τερματισμός Πρωτεϊνοσύνθεσης

Ο τερματισμός της πρωτεϊνοσύνθεσης περιλαμβάνει δυο στάδια. Η αντίδραση τερματισμού ενέχει την αποδέσμευση της πρωτεϊνικής αλυσίδας από το τελευταίο tRNA, ενώ η αντίδραση μετα-τερματισμού ενέχει την αποδέσμευση του tRNA, του mRNA και των ριβοσωματικών υπομονάδων.

Ο τερματισμός συντελείται όταν το ριβόσωμα αφιχθεί σε ένα κωδικόνιο που δεν ορίζει κάποιο αμινοακυλο-tRNA, δηλαδή σε ένα κωδικόνιο τερματισμού (UAA, UAG και UGA). Τα κωδικόνια τερματισμού αναγνωρίζονται από παράγοντες αποδέσμευσης (RF) τάξης 1, οι οποίοι δρουν στη ριβοσωμική θέση A και χρειάζονται την παρουσία πεπτιδυλο-tRNA στη θέση P. Οι παράγοντες αποδέσμευσης (RF) τάξης 1 υποβοηθούνται από τους παράγοντες αποδέσμευσης (RF) τάξης 2, οι οποίοι δεν εμφανίζουν εξειδίκευση.

Συγκεκριμένα, οι παράγοντες αποδέσμευσης (RF) τάξης 1 αναγνωρίζουν τα κωδικόνια τερματισμού και ενεργοποιούν το ριβόσωμα ώστε να υδρολύσει το πεπτιδυλο-tRNA. Η αποκοπή του πολυπεπτιδίου από το tRNA πραγματοποιείται με μια αντίδραση ανάλογη με τη συνήθη πεπτιδυλο-μεταφορά, αλλά στην περίπτωση αυτή ο αποδέκτης του πολυπεπτιδίου είναι ένα μόριο νερού αντί για το αμινοακυλο-tRNA. Εν συνεχεία, οι παράγοντες αποδέσμευσης (RF) τάξης 1 αποδεσμεύονται από ριβόσωμα μέσω των παραγόντων αποδέσμευσης (RF) τάξης 2.

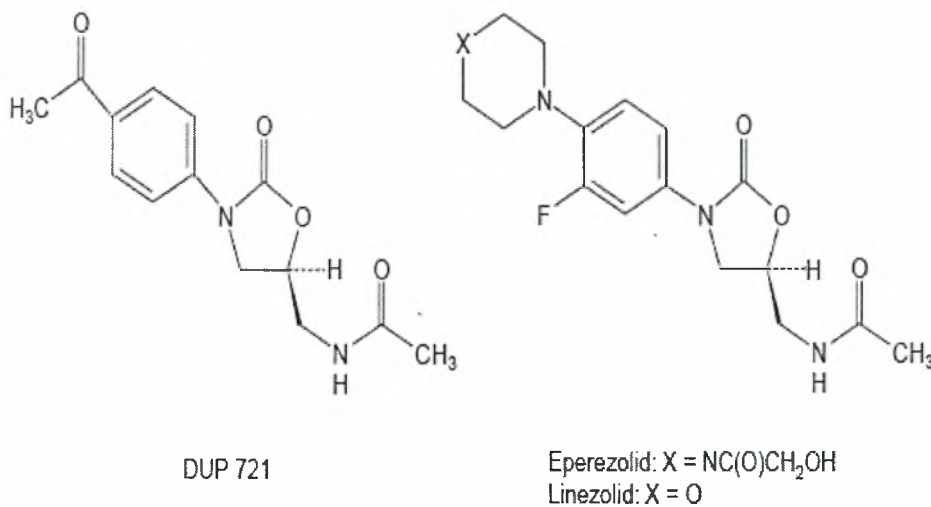
Ωστόσο, ένα αποακυλιωμένο tRNA και το mRNA παραμένουν συνδεδεμένα με το ριβόσωμα οπότε απαιτείται ο παράγοντας ανακύκλωσης ριβοσωμάτων (RRF) ώστε να αποσυναρμολογηθούν τα υπόλοιπα συστατικά (tRNA, mRNA, υπομονάδες 30S και 50S). Αυτός ο παράγοντας δρα μαζί με τον EF-G σε μια αντίδραση που χρησιμοποιεί την υδρόλυση του GTP (για ανασκόπηση βλέπε Lewin, 2004).

4. Οξαζολιδινόνες

4.1 Γενικά

Οι πρώτες οξαζολιδινόνες αναπτύχθηκαν από τη EI DuPont de Nemours & Co. Inc. το 1978 και συντέθηκαν εξαιτίας της δραστικότητάς τους έναντι συγκεκριμένων παθογόνων των φυτών. Εννέα χρόνια αργότερα, το 1987, οι οξαζολιδινόνες DuP 721 και DuP 105 συντέθηκαν ως αντιβακτηριδιακοί παράγοντες έναντι παθογόνων του ανθρώπου. Εξαιτίας της τοξικότητάς τους, όμως, σταμάτησε η ανάπτυξη αυτών των δυο παραγόντων. Η Upjohn Laboratories (αργότερα η Pharmacia και τώρα η Pfizer) συνέχισε να μελετά τις οξαζολιδινόνες και το 1996 ανέπτυξε δυο μη τοξικά παράγωγα αυτών των φαρμάκων (Εικόνα 9), τη λινεζολίδη που είναι παράγωγο της μορφολίνης {U-100766 (S)-N-[[3-[3- φθορο-4-μορφολινυλοφαινυλο)- 2- οξο-5-οξαζολιδινυλο] μεθυλο] ακεταμίδη} και την επερεζολίδη που είναι παράγωγο της

πιπεραζίνης {U-100592 (S) -N-[[3-[3- φθορο-4- [N-1- (4-υδροξυακετυλο) πιπεραζινυλο] φαινυλο]-2-οξο-5-οξαζολιδινυλο] μεθυλο] ακεταμίδη} (Bozdogan and Appelbaum, 2004).



Εικόνα 9. Χημική δομή των αντιμικροβιακών παραγόντων DuP 721, Λινεζολίδη και Επερεζολίδη (αναπαραγωγή από Diekema and Jones, 2000).

Σε αντίθεση με την επερεζολίδη που δεν αναπτύχθηκε πέραν της φάσης I (Diekema and Jones, 2001), η λινεζολίδη εγκρίθηκε για χρήση τον Απρίλιο του 2000 από τον FDA των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής και εν συνεχεία από τον Καναδά και τη Νότια Αμερική. Στην Ευρώπη, η λινεζολίδη εγκρίθηκε το Φεβρουάριο του 2001 από το Ηνωμένο Βασίλειο, την Ελβετία καθώς και από διάφορες άλλες μη Ευρωπαϊκές χώρες (Bouza and Muñoz, 2001).

Η λινεζολίδη, λοιπόν, όπως είναι εμπειρικά γνωστή η (S)-N-[[3-[3-φθορο-4-μορφολινυλοφαινυλο]-2-οξο-5-οξαζολιδινυλο]μεθυλο] ακεταμίδη είναι ένας συνθετικός αντιμικροβιακός παράγοντας με μοριακό τύπο C₁₆H₂₀FN₃O₄ και μοριακό βάρος 337.35, που διαφέρει δομικά από τους παλαιότερους. Η αντιμικροβιακή της δράση οφείλεται στην υδροξυακετυλική ομάδα που είναι προσαρτημένη στο ετεροκυκλικό άζωτο ενώ η αυξημένη δραστηριότητα της, τόσο in vivo όσο και in vitro, οφείλεται στη ύπαρξη του φθορίου ως υποκαταστάτη στη 3 φαινυλική θέση (Paladino, 2002).

4.2 Φάσμα Αντιμικροβιακής Δραστηριότητας

Οι οξαζολιδινόνες, και συγκεκριμένα η λινεζολίδη, διαθέτουν έντονη δράση έναντι των Gram θετικών παθογόνων βακτηρίων, όπως *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* και *Enterococcus faecium*, συμπεριλαμβανομένων στελεχών που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε ένα ή περισσότερα αντιβιοτικά (MRSA, VRE, VISA και PRPN), όπως θα αναλυθεί παρακάτω (Marchese and Schito, 2001). Οι οξαζολιδινόνες κυρίως δρουν βακτηριοστατικά εναντίον των γενών *Staphylococcus* και *Enterococcus* και βακτηριοκτόνα εναντίον των περισσότερων ειδών του γένους *Streptococcus* (Paladino, 2002).

Οι οξαζολιδινόνες ελέγχθησαν εναντίον ενός εκτενούς φάσματος Gram θετικών παθογόνων βακτηρίων και αποδείχθησαν δραστικές εναντίον στελεχών *Staphylococcus aureus* τόσο ευαίσθητων στη μεθικιλίνη (MSSA) όσο και ανθεκτικών σε αυτή (MRSA) με την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση για το 90% των στελεχών (MIC₉₀) να κυμαίνεται από 1 έως 4 mg/L. Επίσης, επέδειξαν σημαντική δραστηριότητα έναντι των πηκτάση αρνητικών ειδών του γένους *Staphylococcus* (CoNS), συμπεριλαμβανομένων και των στελεχών που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη με MIC να κυμαίνεται από 0,25 έως 4 mg/L.

Επιπρόσθετα, επετεύχθη αναστολή όλων των ειδών του γένους *Streptococcus* που ελέγχθησαν, με MIC₉₀ που κυμαίνονταν από 0,25 έως 1 mg/L, σημειώνοντας εξαιρετική δραστηριότητα έναντι των στελεχών *Streptococcus pneumoniae* που παρουσίαζαν τόσο ανθεκτικότητα όσο και ευαισθησία στη πενικιλίνη.

Η δραστηριότητα των οξαζολιδινονών στα είδη του γένους *Enterococcus* ήταν αξιοσημείωτη ακόμα και σε στελέχη με ανθεκτικότητα στη βανκομυκίνη, με την MIC να κυμαίνεται μεταξύ 0,5 και 4 mg/L.

Παρότι από τους ‘πρασινίζοντες’ στρεπτόκοκκους και τα *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Listeria monocytogenes*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp. και *Rhodococcus equi* ελέγχθησαν λίγα στελέχη, εντούτοις οι οξαζολιδινόνες επέδειξαν σε αυτά σημαντική ανασταλτική δράση, με MIC που δεν ξεπερνούσε τα 4 mg/L.

Σε αντίθεση με τα Gram θετικά παθογόνα βακτήρια, οι οξαζολιδινόνες είναι λιγότερο ενεργές έναντι των Gram αρνητικών. Μεταξύ των αερόβιων Gram

αρνητικών παθογόνων βακτηρίων, οι οξαζολιδινόνες διαθέτουν μέτρια δραστικότητα έναντι των *Moraxella catarrhalis* (MIC₉₀ από 4 έως 8 mg/L), *Haemophilus influenzae* (MIC₉₀ από 4 έως 16 mg/L), *Legionella* spp. (MIC₉₀ από 8 έως 16mg/L) και *Neisseria gonorrhoeae* (MIC₉₀ ίση με 16mg/L) και σημαντική δραστικότητα έναντι των *Pasteurella* spp., συμπεριλαμβανομένου της *P. multocida* (MIC₉₀ ίση με 2mg/L) και *Flavobacterium meningosepticum* (MIC₉₀ ίση με 4 mg/L). Ωστόσο, δεν εμφανίζουν ανασταλτική δράση (MIC₉₀ μεγαλύτερη από 64mg/L) έναντι των *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. ή *Acinetobacter* spp.

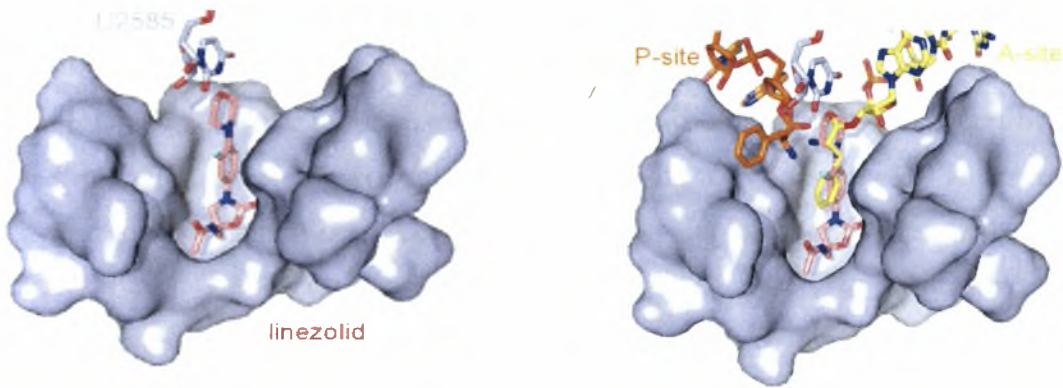
Ορισμένα στοιχεία υποδεικνύουν τη δραστικότητα των οξαζολιδινονών και έναντι των *Mycoplasma* και *Chlamydia* spp, αν και χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση της δραστικότητας τους κατά αυτών των κοινών παθογόνων μικροοργανισμών του αναπνευστικού συστήματος.

Τέλος, οι οξαζολιδινόνες εμφανίζουν δραστικότητα έναντι των *Mycobacterium tuberculosis* και *M. avium* complex σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 2 mg/L, υποδεικνύοντας την πιθανότητα αυτοί οι παράγοντες να διαδραματίσουν ρόλο στην διαχείριση αυτών των δύσκολων μολύνσεων (Diekema and Jones, 2000).

Συνεπώς, η λινεζολίδη, η οποία είναι το μόνο αυτή τη στιγμή διαθέσιμο μέλος των οξαζολιδινονών, εγκρίθηκε από τον FDA για τη θεραπεία επιπλεγμένων δερματικών λοιμώξεων από MRSA, ενδονοσοκομειακών πνευμονιών από MRSA, συνυπαρχουσών βακτηριαμιών με λοιμώξεις από ανθεκτικά στη βανκομυκίνη στελέχη *Enterococcus faecium* καθώς και συνυπαρχουσών βακτηριαμιών με πνευμονίες της κοινότητας από ανθεκτικά στη πενικιλίνη στελέχη *Streptococcus pneumoniae*.

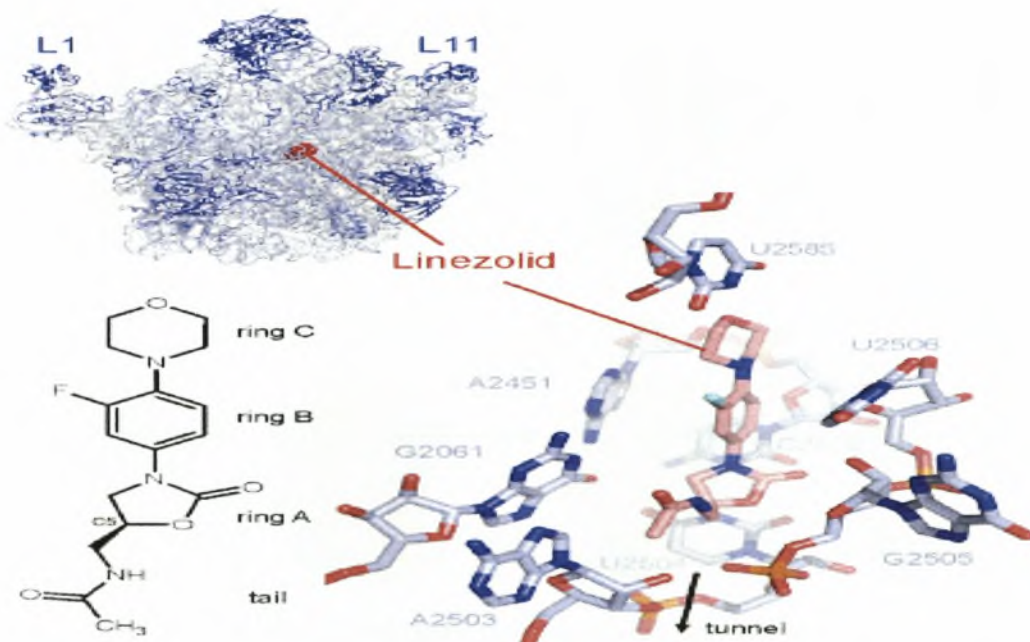
4.3 Μηχανισμός Δράσης

Μέσω πρόσφατων μελετών με κρυσταλλογραφία ακτινών X προσδιορίστηκε η θέση δέσμευσης της λινεζολίδης στη μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα του *D. radiodurans* (Εικόνα 10). Συγκεκριμένα, η λινεζολίδη δεσμεύεται στο ενεργό κέντρο της πεπτιδυλομεταφοράς (PTC) της θέσης A του ριβοσώματος και επικαλύπτει τη θέση δέσμευσης των tRNA στη θέση αυτή. Αναλυτικότερα, δεσμεύεται στο ενεργό κέντρο της πεπτιδυλομεταφοράς, εντός ενός θύλακα (Εικόνα 11) που σχηματίζεται



Εικόνα 10. Θέσεις δέσμευσης της λινεζολίδης και του tRNA αντίστοιχα (αναπαραγωγή από Wilson *et al.*, 2008).

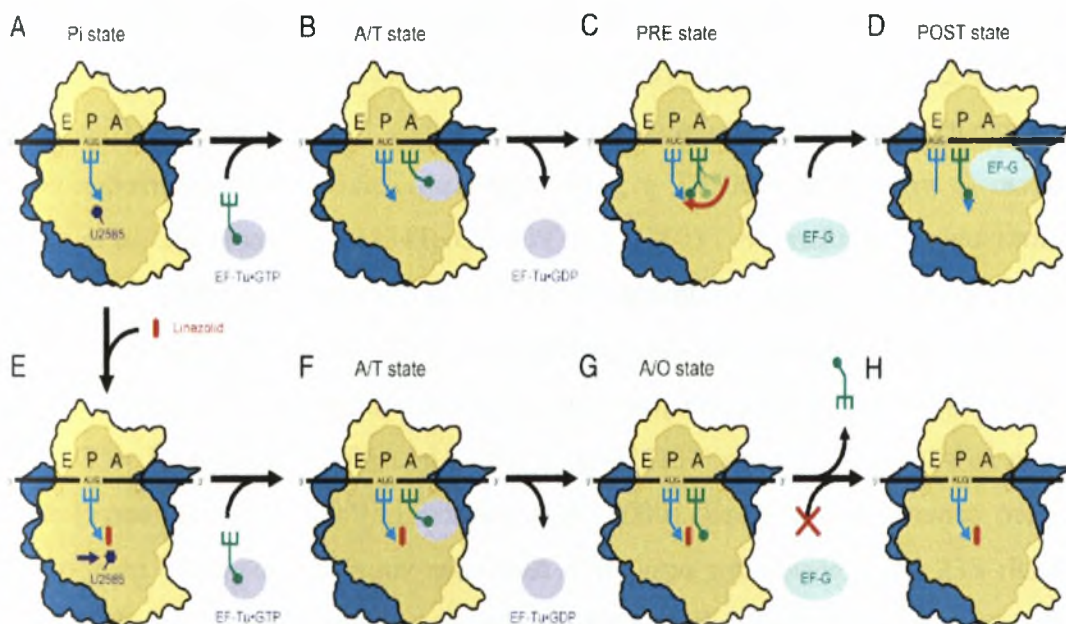
από συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα και τοποθετείται έτσι ώστε ο δακτύλιος C της να προσανατολίζεται προς την διεπιφάνεια των ριβοσωμικών υπομονάδων, ενώ ο δακτύλιος A κατά την κατεύθυνση της ριβοσωμικής σήραγγας. Εντός του θύλακα, ο δακτύλιος A αλληλεπιδρά με την U2504 (η αρίθμηση γίνεται βάσει του γονιδίου του 23S rRNA της *E. coli*), ο υποκαταστάτης του C5 του δακτυλίου A με την A2503 και ο δακτύλιος B με την A2451 και την U2506. Τα κρυσταλλογραφικά αυτά ευρήματα σε συνδυασμό με τα διαθέσιμα βιοχημικά δεδομένα επιτρέπουν να προταθεί το παρακάτω μοντέλο για το μηχανισμό δράσης των οξαζολιδινονών.



Εικόνα 11. Ο θύλακας δέσμευσης της λινεζολίδης αποτελείται από συντηρημένα αμινοξέα (αναπαραγωγή από Wilson *et al.*, 2008).

Μετά την έναρξη της μετάφρασης, η είσοδος ενός εναρκτήριου tRNA στη θέση P του ριβοσώματος επάγει μια διακριτή διαμόρφωση της U2585 (Schmeing *et al*, 2005). Εν συνεχεία, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ένα αμινοάκυλο-tRNA εισέρχεται στη θέση A του ριβοσώματος ως ένα τριμερές σύμπλοκο με τον παράγοντα EF-Tu και το GTP (για ανασκόπηση βλέπε Lewin, 2004), το οποίο αρχικά δεσμεύεται στην κατάσταση A/T και έπειτα μετατίθεται στη θέση A/A ώστε να σχηματιστεί η κατάσταση προ της μετατόπισης (PRE), όπου τα tRNA βρίσκονται στις θέσεις A και P. Ο σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού μεταφέρει την νεοσυντιθέμενη αλυσίδα στο tRNA της θέσης A και επακόλουθα ο EF-G παράγοντας καταλύει τη μεταφορά των tRNA από την κατάσταση PRE στη κατάσταση μετά μετατόπισης (POST), όπου τα tRNA βρίσκονται στις θέσεις P και E (Wilson *et al*, 2008).

Η λινεζολίδη δύναται να συνδεθεί στην ελεύθερη θέση A της 50S υπομονάδας ή στην Pi κατάσταση του ριβοσώματος (Lin *et al*, 1997; Sander *et al*, 2002; Burghardt *et al*, 1998) και σταθεροποιεί την U2585 σε μια ανασταλτική διαμόρφωση (Εικόνα 12). Επειδή η U2585 χρειάζεται για την ορθή είσοδο του tRNA στη θέση P, η παρουσία της λινεζολίδης επηρεάζει έμμεσα την δέσμευση ή/και την είσοδο του εναρκτήριου tRNA στη θέση P, αλλά δεν επηρεάζει τη δέσμευση του τριμερούς συμπλόκου. Ωστόσο, μετά την υδρόλυση του GTP και την απελευθέρωση του EF-Tu



Εικόνα 12. Μηχανισμός της ανασταλτικής δράσης των οξαζολιδινονών κατά τη μετάφραση. Γεγονότα κατά τη διάρκεια φυσιολογικής μετάφρασης (A-D) και παρουσία λινεζολίδης (E-H). Η μικρή και μεγάλη υπομονάδα απεικονίζονται με κίτρινο και μπλε αντίστοιχα (αναπαραγωγή από Wilson *et al*, 2008).

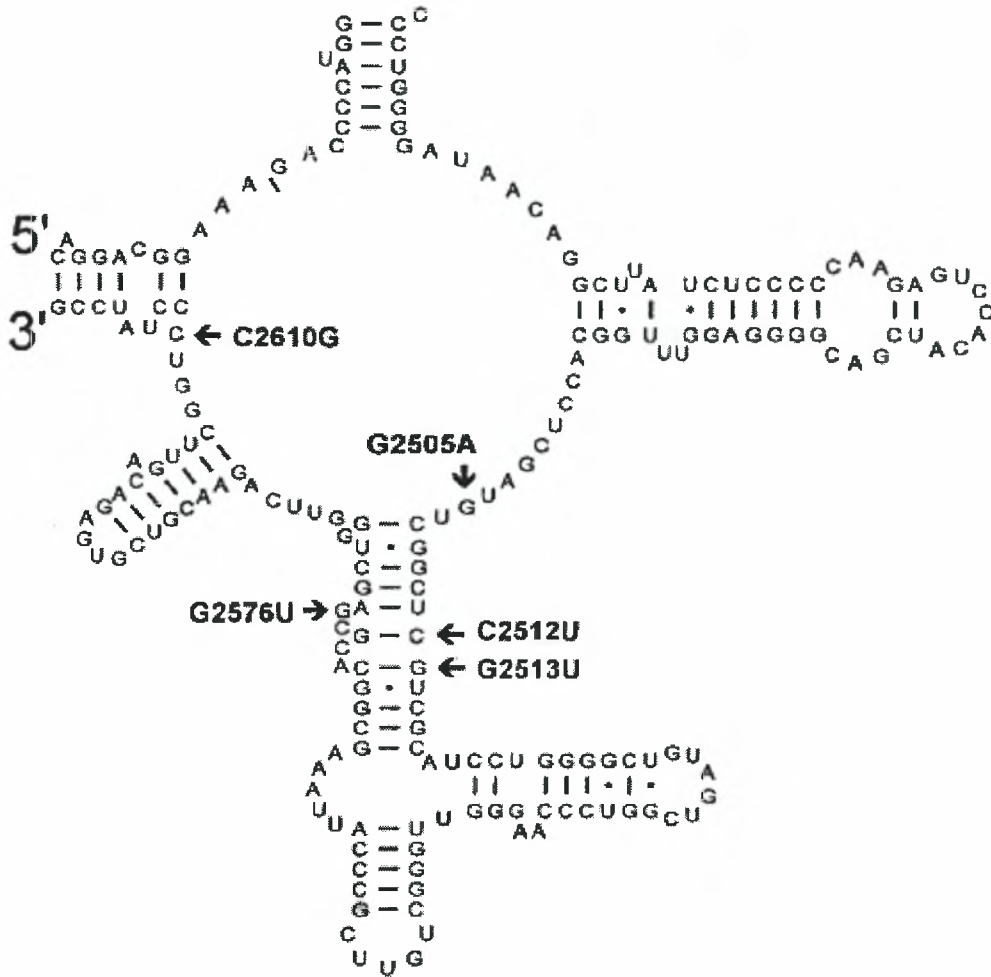
παράγοντα, το tRNA αδυνατεί να εισέλθει πλήρως στη θέση A και συγκεκριμένα στο ενεργό κέντρο της πεπτιδυλομεταφοράς, επειδή το σημείο φράσσεται από τη λινεζολίδη, οπότε το tRNA απομακρύνεται από το ριβόσωμα και κατά συνέπεια αναστέλλεται η δράση του παράγοντα EF-G. Έτσι, η απώλεια του tRNA από τη θέση A κατά τη διάρκεια του σταδίου της επιμήκυνσης οδηγεί σε αποσταθεροποίηση καθώς και σε μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου (Wilson *et al*, 2008).

4.4 Μηχανισμός Αντοχής

Οι οξαζολιδινόνες είναι μια νέα τάξη αντιβιοτικών, στην οποία τα βακτήρια δεν εμφανίζουν προϋπάρχοντες μηχανισμούς αντοχής. Επιπλέον, οι περισσότεροι ερευνητές πίστευαν ότι λόγω της συνθετικής δομής του αντιβιοτικού η αντοχή στη λινεζολίδη θα αναπτυχθεί δύσκολα. Εντούτοις, σύντομα μετά την εισαγωγή της λινεζολίδης στην κλινική πράξη άρχισαν να αναφέρονται παγκόσμια σποραδικά κρούσματα ανθεκτικότητας στον εν λόγω αντιμικροβιακό παράγοντα κυρίως σε στελέχη των γενών *Staphylococcus* και *Enterococcus*.

Ο πιο κοινός μηχανισμός ανθεκτικότητας στη λινεζολίδη περιλαμβάνει μεταλλάξεις στο κεντρικό βρόγχο της V επικράτειας του 23S rRNA (Εικόνα 13). Συγκεκριμένα, η πιο συχνά εμφανιζόμενη μετάλλαξη που σχετίζεται με ανθεκτικότητα έναντι της λινεζολίδης σε κλινικά απομονωμένα στελέχη των γενών *Staphylococcus* και *Enterococcus* είναι η G2576T (η αρίθμηση γίνεται βάσει του γονιδίου του 23S rRNA της *E. coli*) (Jones *et al*, 2008). Εντούτοις, σε κλινικά απομονωμένα στελέχη σπανίως έχουν παρατηρηθεί και άλλες μεταλλάξεις όπως η T2500A σε στελέχη *S. aureus* (Meka *et al*, 2004) και οι C2534T, G2447T και G2603T σε στελέχη *S. epidermidis* (Zhu *et al*, 2006; Lincoran *et al*, 2009). Επιπρόσθετες μεταλλάξεις που έχουν παρατηρηθεί προς το παρόν μόνο σε εργαστηριακά απομονωμένα στελέχη Gram θετικών κόκκων και προσδίδουν ανθεκτικότητα στη λινεζολίδη είναι η G2444T, η A2503G, η T2504C, η G2505A, η G2512T, η G2513T και η C2610G (Pillai *et al*, 2002; Prystowsky *et al*, 2001; Lincoran *et al*, 2009). Εφόσον είναι γνωστό ότι τα περισσότερα βακτήρια διαθέτουν πολλαπλά αντίγραφα του γονιδίου του 23S rRNA (για παράδειγμα τα στελέχη *S. aureus* φέρουν 5 ή 6 αντίγραφα), αξίζει να σημειωθεί ότι το επίπεδο της εμφανιζόμενης ανθεκτικότητας εξαρτάται από τον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου του 23S rRNA που φέρουν τη μετάλλαξη (Bourgeois *et al*,

2007). Δηλαδή, όσο μεγαλύτερο αριθμό μεταλλαγμένων αντιγράφων του γονιδίου 23S rRNA έχει ένα στέλεχος τόσο υψηλότερη είναι η αντοχή που εμφανίζει έναντι της λινεζολίδης.



Εικόνα 13. Απεικόνιση κάποιων μεταλλάξεων του τμήματος της πεπτιδυλομεταφοράς που προσδίδουν ανθεκτικότητα στη λινεζολίδα (η αρίθμηση γίνεται βάσει του γονιδίου του 23S rRNA της *E. coli*) (αναπαραγωγή από Prystowsky *et al*, 2001).

Ένας όχι και τόσο κοινός μηχανισμός ανθεκτικότητας στη λινεζολίδα περιλαμβάνει μεταλλάξεις στο γονίδιο *grlD* που κωδικοποιεί την ριβοσωμική πρωτεΐνη L4, η οποία αποτελεί μέρος της σήραγγας εξόδου από τη μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα και θεωρείται ότι συμμετέχει στην επεξεργασία της νεοσυντιθέμενης πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Συγκεκριμένα, σε στελέχη *S. pneumoniae* μια έλλειψη 6bp στο γονίδιο *grlD* βρέθηκε ότι προσδίδει ανθεκτικότητα στη λινεζολίδα. Τέλος, μεταλλάξεις στο ίδιο γονίδιο έχουν ενοχοποιηθεί για ανθεκτικότητα στις μακρολίδες και στη χλωραμφενικόλη (Wolter *et al*, 2005).

Πρόσφατα τόσο σε κλινικά στελέχη *S. aureus* όσο και σε κλινικά στελέχη *S. epidermidis* περιγράφηκε ένας νέος μηχανισμός ανθεκτικότητας στις οξαζολιδινόνες, ο οποίος σχετίζεται με την ύπαρξη του γονιδίου *cfz* (Mendes *et al*, 2008). Το εν λόγω γονίδιο κωδικοποιεί μια μεθυλοτρασφεράση, η οποία παρέχει μια μετα-μεταφραστική μεθυλίωση της αδενίνης στη θέση 2503 του 23S rRNA της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας. Η μεθυλίωση αυτή επηρεάζει την δέσμευση διαφόρων αντιμικροβιακών παραγόντων (οξαζολιδινόνες, αμφενικόλες, λινκοσαμίδες και στρεπτογραμίνη Α), οδηγώντας σε έναν πολυανθεκτικό φαινότυπο (Arias *et al*, 2008). Αξίζει να σημειωθεί ότι το γονίδιο αυτό, αρχικά εντοπίστηκε σε πλασμίδια γεγονός που υποδηλώνει την ικανότητα του για οριζόντια μεταφορά μεταξύ στελεχών (Long *et al*, 2006). Ωστόσο, πρόσφατα το εν λόγω γονίδιο βρέθηκε ότι εδράζεται σε ενσωματωμένα στο χρωμόσωμα ορισμένων MRSA στελεχών πλασμίδια, τα οποία διατηρούν την ικανότητα για εκτομή και μεταβίβαση σε άλλα στελέχη (Toh *et al*, 2007).

4.5 Επιδημιολογικά Δεδομένα της Αντοχής για την Ελλάδα

Παρόλο που η λινεζολίδη, όπως προαναφέρθηκε, χρησιμοποιείται στην κλινική πρακτική για σχετικά βραχύ χρονικό διάστημα, εντούτοις υπάρχουν ήδη διάφορες αναφορές για στελέχη των γενών *Staphylococcus* και *Enterococcus* που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στον εν λόγω αντιμικροβιακό παράγοντα. Συγκεκριμένα, στην Ελλάδα το πρώτο στέλεχος με ανθεκτικότητα στη λινεζολίδη που απομονώθηκε από κλινικό δείγμα ήταν ένας *E. faecium*. Το στέλεχος αυτό απομονώθηκε το 2004 στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας από ασθενή της μονάδας εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ), ο οποίος είχε υποβληθεί σε τετραήμερη θεραπεία με λινεζολίδη. Έκτοτε, σε διάφορα νοσοκομεία της χώρας στελέχη ανθεκτικά στη λινεζολίδη του γένους *Enterococcus*, τόσο του είδους *faecium* όσο και του είδους *faecalis* έχουν απομονωθεί από ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία με λινεζολίδη (Bersos *et al*, 2004).

Κατά τη διάρκεια μελέτης που διεξήχθη από το 2005 από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας σε 4.670 κλινικά στελέχη από 7 νοσοκομεία της χώρας, βρέθηκαν 19 στελέχη του γένους *Enterococcus* ανθεκτικά στη λινεζολίδη (12 *E. faecalis* και 7 *E. faecium*) καθώς και ένα στέλεχος *S. haemolyticus*, το οποίο

προέρχονταν από ασθενή που δεν είχε υποβληθεί ποτέ σε θεραπεία με λινεζολίδη (Pratti *et al*, 2007).

Εν συνεχεία, ένα στέλεχος *S. cohnii* πηκτάση αρνητικό απομονώθηκε από ασθενείς που νοσηλεύονταν στη μονάδα εντατικής θεραπείας του Σισμανόγλειου Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών (Ιούλιος έως Οκτώβριος 2007) (Petinaki *et al*, 2009).

Τέλος το 2007, κατά τη διάρκεια μιας εκτεταμένης μελέτης σχετικά με την δραστηριότητα της λινεζολίδης έναντι 2.600 κλινικών στελεχών του γένους *Staphylococcus* προερχόμενα από διάφορα νοσοκομεία της χώρας βρέθηκαν τέσσερα στελέχη *S. xylosus* και ένα στέλεχος *S. epidermidis*, τα οποία εμφάνιζαν ανθεκτικότητα έναντι της λινεζολίδης (Spiliopoulou *et al*, 2008).

5. Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση των μηχανισμών εκείνων που προσδίδουν ανθεκτικότητα στη λινεζολίδη, τον κύριο εκπρόσωπο των οξαζολιδινονών, στους Gram θετικούς κόκκους. Συγκεκριμένα, σκοπός μας ήταν η εύρεση ανθεκτικών στη λινεζολίδη στελεχών και η μελέτη αυτών για την ύπαρξη τόσο των μέχρι τώρα γνωστών μηχανισμών (που περιγράφηκαν ανωτέρω) όσο και άλλων μηχανισμών που θα μπορούσαν να ενοχοποιηθούν για ανθεκτικότητα στον εν λόγω αντιμικροβιακό παράγοντα.

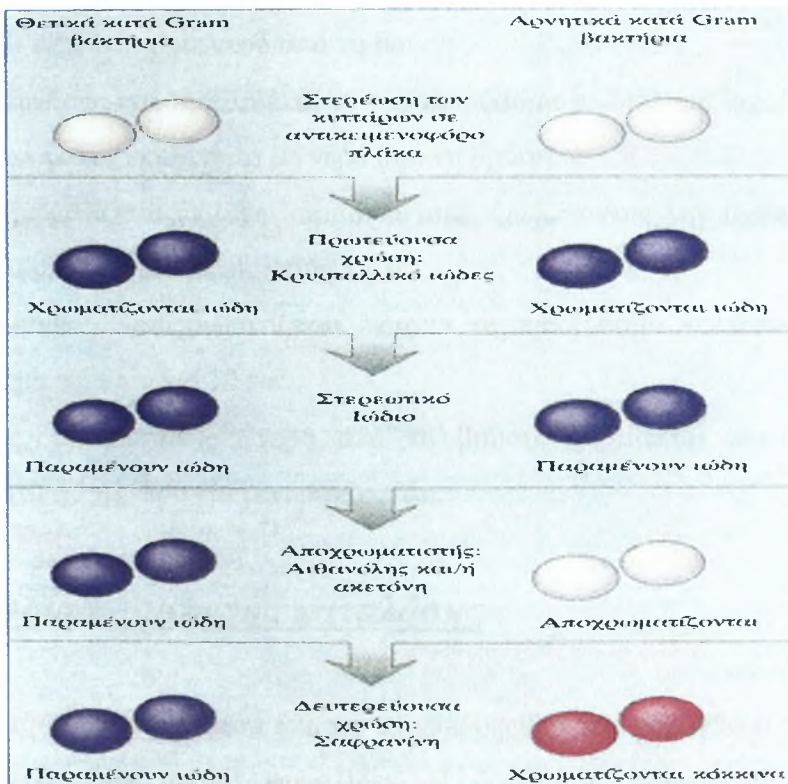
Υλικά και Μέθοδοι

1. Χρώση κατά Gram

Η χρώση κατά Gram αποτελεί την πιο σημαντική χρώση στη βακτηριολογία και χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση βακτηρίων με βάση τις φυσιολογικές ιδιότητες του κυτταρικού τους τοιχώματος.

Έχοντας υπόψη τη διαφορά της δομής των θετικών και αρνητικών κατά Gram κυττάρων είναι δυνατό να κατανοήσουμε εύκολα το μηχανισμό της εν λόγω χρώσης (Εικόνα 14). Η διαφορά ανάμεσα στους δύο τύπους κυττάρων οφείλεται στον αποχρωματισμό που προκαλεί η αιθανόλη.

Τα κύτταρα βάφονται με κρυσταλλικό ιώδες (ιώδες της γεντιανής) και ιώδιο με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός συμπλόκου κρυσταλλικού ιώδους-ιώδους. Όταν ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο εκπλυθεί με αιθανόλη, τα λιπίδια της εξωτερικής μεμβράνης διαλύονται και απομακρύνονται. Αυτό αποσταθεροποιεί την εξωτερική μεμβράνη και αυξάνει την διαπερατότητά της. Έτσι, το σύμπλοκο της χρωστικής δύναται να εκπλυθεί αποχρωματίζοντας το αρνητικό κατά Gram βακτήριο, το οποίο στη συνέχεια χρωματίζεται ερυθρόχρωμο από τη σαφρανίνη. Στα θετικά κατά Gram



Εικόνα 14. Ο χρωματισμός των βακτηριακών κυττάρων σε κάθε στάδιο της χρώσης κατά Gram (αναπαραγωγή από Καραγκούνη-Κύρτσου, 1999).

βακτήρια, η αιθανόλη προκαλεί το σχηματισμό πόρων στο στρώμα της πεπτιδογλυκάνης, που συρρικνώνεται και εγκλωβίζει το σύμπλοκο κρυσταλλικού ιώδους-ιώδους της χρωστικής εντός του κυττάρου.

Για τη χρώση κατά Gram των υπό μελέτη στελεχών χρησιμοποιήθηκε το Gram Color Kit όπως αναφέρεται αναλυτικότερα παρακάτω.

Υλικά:

- WFI (στείρο απυρετογόνο H₂O)
- Διάλυμα crystal violet (Liofilchem)
- Διάλυμα lugol (Liofilchem)
- Διάλυμα safranin (Liofilchem)
- Αντικειμενοφόρες πλάκες (Mediware)
- Οπτικό μικροσκόπιο (ZEISS).

Πειραματική διαδικασία:

- Αρχικά μονιμοποιούνται τα παρασκευάσματα πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες.
- Καλύπτεται έναστο παρασκεύασμα με διάλυμα crystal violet για 20 sec και έπειτα εκπλένεται με νερό από τη βρύση.
- Στη συνέχεια καλύπτεται έναστο παρασκεύασμα με διάλυμα lugol PVP για 15 sec και έπειτα εκπλένεται με νερό από τη βρύση.
- Αποχρωματίζεται έναστο παρασκεύασμα ξεπλένοντας την αντικειμενοφόρο πλάκα με διάλυμα decolorizing.
- Ακολούθως, μεταχρωματίζεται έναστο παρασκεύασμα καλύπτοντας το με διάλυμα safranin για 10 sec.
- Τέλος, εκπλένεται με νερό από τη βρύση, ξηραίνεται μεταξύ φύλλων διηθητικού χαρτιού και μικροσκοπείται.

2. Δοκιμασία παραγωγής καταλάσης

Η καταλάση είναι ένζυμο που διασπά το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο, παράγοντας μικρές φυσαλίδες. Η δοκιμασία παραγωγής καταλάσης

αποτελεί την πρώτη κατατοπιστική διαχωριστική δοκιμή όσον αφορά τους Gram θετικούς κόκκους.

Συγκεκριμένα, ενώ πολλά είδη βακτηρίων παράγουν καταλάση, στην καθημερινή πρακτική η δοκιμασία παραγωγής καταλάσης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των σταφυλόκοκκων (καταλάση θετικοί) από τους στρεπτόκοκκους (καταλάση αρνητικοί).

Για τη δοκιμασία παραγωγής καταλάσης των υπό μελέτη στελεχών χρησιμοποιήθηκε η ID Color Catalase (bioMerieux) όπως αναφέρεται αναλυτικότερα παρακάτω.

Υλικά:

- Διάλυμα ID-ASE (bioMerieux) .
- Κρικοφόροι σπειροί
- Αντικειμενοφόρες πλάκες (Mediware)

Πειραματική διαδικασία:

- Αρχικά τοποθετείται πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες μια σταγόνα ID έγχρωμη καταλάση.
- Έπειτα λαμβάνεται και τοποθετείται μια αποικία ή μέρος αυτής εντός της σταγόνας.
- Τέλος, παρατηρείται η ύπαρξη ή μη άφθονων μικρών φυσαλίδων εντός της σταγόνας.

3. Δοκιμασία παραγωγής πηκτάσης

Χαρακτηριστική και μοναδική ιδιότητα του *S. aureus* είναι η παραγωγή του ενζύμου πηκτάση. Για το λόγο αυτό και όλοι οι άλλοι σταφυλόκοκκοι ονομάζονται πηκτάση αρνητικοί σταφυλόκοκκοι.

Ο *S. aureus* φέρει δύο είδη πηκτάσης, τη συνδεδεμένη και την ελεύθερη. Η συνδεδεμένη βρίσκεται καθηλωμένη στο κυτταρικό τοίχωμα και μετατρέπει άμεσα το ινωδογόνο σε αδιάλυτη ινική, προκαλώντας τη συγκόλληση και τη συσσώρευση των μικροβιακών κυττάρων. Ομοίως, η ελεύθερη πηκτάση έχει την ίδια δράση, καταλήγει όμως έμμεσα στο σχηματισμό ινικής μέσω μιας σφαιρίνης του πλάσματος (coagulase-reacting factor).

Η δοκιμασία παραγωγής πηκτάσης γίνεται, συνήθως, με δυο μεθόδους. Μια ταχεία πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα και μια βραδεία μέσα σε σωληνάριο. Με την πρώτη ανιχνεύουμε τη συνδεδεμένη πηκτάση ενώ με τη δεύτερη την ελεύθερη. Ωστόσο, για τη δοκιμασία παραγωγής πηκτάσης των υπό μελέτη στελεχών χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό SLIDEX Staph Plus kit της bioMeriex σύμφωνα με το οποίο μια θετική εξέταση για *S. aureus* παρατηρείται από μια ορατή αντίδραση συγκόλλησης.

Το αντιδραστήριο του συγκεκριμένου kit περιλαμβάνει κυανά σωματίδια latex ευαισθητοποιημένα με ανθρώπινο ινωδογόνο και μονοκλωνικά αντισώματα, για αυτό καθιστά δυνατή την ταυτόχρονη ανίχνευση: του παράγοντα θρόμβου, της πρωτεΐνης A χρησιμοποιώντας το Fc κλάσμα της IgM ποντικού και μιας ειδικής αντιγονικής ομάδας συνδεδεμένης με ειδικές περιφερικές δομές του *S. aureus*.

Υλικά:

- Διάλυμα R1 *S.aureus* (L)
- Διάλυμα R2 *S.aureus* (LCΘ)
- Αναλώσιμες κάρτες πεδίων αντίδρασης
- Κρικοφόροι στείλεοί.

Πειραματική διαδικασία:

- Αρχικά αφήνονται τα αντιδραστήρια να έλθουν σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) και τα επανεωρούνται πριν από τη χρήση.
- Στον ένα κύκλο μιας αναλώσιμης κάρτας προσθέεται μια σταγόνα διαλύματος R1 ενώ στο δεύτερο μια σταγόνα διαλύματος R2.
- Ακολούθως, χρησιμοποιώντας δυο διαφορετικούς κρικοφόρους στείλεούς προσθέτονται αποικίες σε έκαστο κύκλο.
- Αναδεύονται καλά για 10 sec και απλώνεται η σταγόνα σε ολόκληρη την περιοχή του κύκλου.
- Τέλος, παρατηρείται η αντίδραση κάτω από φυσιολογικές συνθήκες φωτισμού και χωρίς τη βοήθεια μεγεθυντικού φακού.

4. Έλεγχος Αντοχής στα Αντιβιοτικά (Αντιβιογράμμα)

Ο έλεγχος της ευαισθησίας όλων των εξεταζόμενων στελεχών στη λινεζολίδα έγινε με τη δοκιμασία διάχυσης σε άγαρ και με τη δοκιμασία E (E-test), όπως αναφέρεται αναλυτικότερα παρακάτω.

4.1 Δοκιμασία των Δίσκων

Πρόκειται για την πιο διαδεδομένη και απλή μέθοδο που χρησιμοποιείται στα διαγνωστικά εργαστήρια των νοσοκομείων. Στη συγκεκριμένη μέθοδο το αντιβιοτικό εμποτίζεται σε δίσκους από διηθητικό χαρτί, το οποίο δεν έχει επίδραση επί του μικροοργανισμού, και η πυκνότητα του αντιβιοτικού στο δίσκο επιλέγεται έτσι ώστε να αντιστοιχεί με την *in vivo* πυκνότητα του. Μια ομογενοποιημένη καλλιέργεια του προς εξέταση μικροοργανισμού επιστρώνεται σε ειδικό άγαρ, πάνω στο οποίο εναποτίθενται οι εμποτισμένοι αυτοί δίσκοι. Το αντιβιοτικό διαχέεται στα χρησιμοποιούμενα υλικά και προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού, οπότε μετά από 18-24 ώρες επώαση μετρώνται οι διάμετροι των ζωνών αναστολής του αντιβιοτικού και συγκρίνονται με τα κριτήρια της CLSI.

Υλικά:

- Τρυβλία Mueller-Hinton άγαρ
- Δίσκοι λινεζολίδης περιεκτικότητας 30μg.
- WFI (στείρο απυρετογόνο H₂O)
- Κλίβανος επώασης
- Λύχνος Bunsen
- Πουάρ μιας χρήσεως
- Βαμβακοφόροι στείλεοί
- Λαβίδα
- Χάρακα

Πειραματική διαδικασία:

- Αρχικά διαλύονται μερικές μεμονωμένες αποικίες από ολονύχτια καλλιέργεια έκαστου στελέχους σε υλικό εναιώρησης έως ότου γαλακτωματοποιηθούν.

- Έπειτα ενοφθαλμίζεται ομοιόμορφα με αυτό η επιφάνεια του Mueller-Hinton άγαρ και απομακρύνεται η περίσσεια του εναιωρήματος από το τρυβλίο.
- Αφού απορροφηθεί πλήρως η πλεονάζουσα υγρασία, τοποθετούνται τα δισκία στην επιφάνεια του άγαρ και τα τρυβλία επωάζονται ανεστραμμένα σε κλίβανο για 24 ώρες.
- Τέλος, αξιολογούνται τα αποτελέσματα με βάση τα κριτήρια της CLSI.

4.2 Δοκιμασία E (E-test)

Ο προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοστατικής συγκέντρωσης του αντιβιοτικού (MIC) γίνεται με τη χρήση μιας πλαστικής ταινίας, η οποία είναι εμποτισμένη με μια ορισμένη και σταθερή διαβάθμιση της συγκέντρωσης του εξεταζόμενου αντιβιοτικού. Αυτή τοποθετείται πάνω στη πλάκα του άγαρ που έχει ομογενώς εμβολιασθεί με το ερευνούμενο μικρόβιο. Η ανάγνωση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης γίνεται στο σημείο τομής της ελλειπτικής καμπύλης αναστολής με την κλίμακα.

Υλικά:

- Τρυβλία Mueller-Hinton άγαρ
- Ταινίες λινεζολίδης 0,016-256 µg/ml (AB BIODISK)
- WFI (στείρο απυρετογόνο H₂O)
- Κλίβανος επώασης
- Λύχνος Bunsen
- Πουάρ μιας χρήσεως
- Βαμβακοφόροι στείλεοί
- Χάρακα
- Λαβίδα

Πειραματική διαδικασία:

- Αρχικά διαλύονται μερικές μεμονωμένες αποικίες από ολονύχτια καλλιέργεια έκαστου στελέχους σε υλικό εναιώρησης έως ότου γαλακτωματοποιηθούν.
- Έπειτα ενοφθαλμίζεται ομοιόμορφα με αυτό η επιφάνεια του Mueller-Hinton άγαρ και απομακρύνεται η περίσσεια του εναιωρήματος από το τρυβλίο.

- Αφού απορροφηθεί πλήρως η πλεονάζουσα υγρασία, τοποθετούνται οι ταινίες στην επιφάνεια του άγαρ και τα τρυβλία επωάζονται ανεστραμμένα σε κλίβανο για 24 ώρες.
- Τέλος, αξιολογούνται τα αποτελέσματα με βάση τα κριτήρια της CLSI

5. Απομόνωση Γενετικού Υλικού

Το DNA είναι η απαραίτητη πρώτη ύλη των περισσότερων πειραματικών διεργασιών της μοριακής μικροβιολογίας και η απελευθέρωση του σε διαλυτή μορφή μετά από ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών καθώς και μεμβρανών υποκυτταρικών οργανιδίων όπως οι πυρήνες, είναι προϋπόθεση για κάθε περαιτέρω διαδικασία.

Για την εκχύλιση του DNA των υπό μελέτη στελεχών χρησιμοποιήθηκε το αυτόματο σύστημα Magtration 12GC σε συνδυασμό με το Magtration-MagaZorb DNA Common Kit-200 N καθώς και η μέθοδος που αναφέρεται αναλυτικότερα παρακάτω.

Υλικά:

- WFI (στείρο απυρετογόνο H₂O)
- Πρωτεΐνάση K (Invitrogen)
- Tris-HCl pH 7.0 (Ambion)
- Triton-X-100 (Research Organics)
- EDTA pH 8.0 (Ambion)
- Φυγόκεντρο Mini Spin (Eppendorf)
- Υδατόλουτρο (BIOLine scientific)
- Vortex (BICASA)
- Eppendorf, βαμβακοφόροι στείλοι, πιπέτες και ακροφύσια.

Πειραματική διαδικασία:

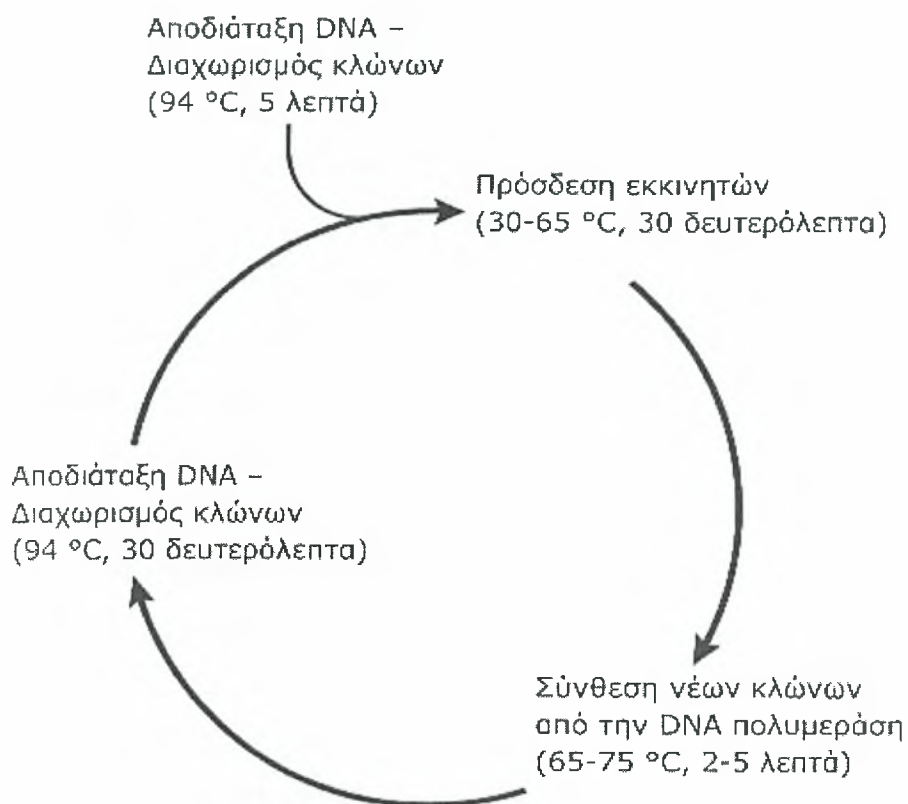
- Αρχικά παρασκευάζεται το λυτικό διάλυμα προσθέτοντας 5 ml Tris-HCl pH 7.0, 1ml Triton-X-100, 0,5 ml EDTA pH 8.0 και αραιώνεται με WFI μέχρι τελικού όγκου 100 ml.
- Λαμβάνεται με βαμβακοφόρο στείλο ικανοποιητική ποσότητα μικροοργανισμού από το τρυβλίο αμιγούς καλλιέργειας και εναιωρείται σε 200 μl WFI.

- Φυγοκεντρείται στις 13.400 rpm για 10 λεπτά και απορρίπτεται το υπερκείμενο.
- Προσθέεται σε ένα ζεύγος 2 μl διαλύματος πρωτεΐνης K και 100 μl λυτικού διαλύματος και εν συνεχεία αναδεύεται με τη χρήση vortex.
- Επωάζεται ένα δείγμα σε υδατόλουτρο στους 52°C για 1 ώρα και κατόπιν στους 100°C για 10 λεπτά.
- Τέλος, φυγοκεντρείται στις 13.400 rpm για 1 λεπτό και λαμβάνεται το υπερκείμενο, απορρίπτοντας το ίζημα.

6. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) είναι μια μέθοδος που στηρίζεται στη κινητική επανασύνδεσης θερμικά αποδιαταγμένου δίκλωνου DNA και παρέχει τη δυνατότητα εκλεκτικού *in vitro* πολλαπλασιασμού μιας αλληλουχίας DNA, η οποία ορίζεται από ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers) για το 5' και το 3' άκρο, με τη δράση μιας ειδικής θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (Taq πολυμεράσης) (Mullis *et al*, 1986; Saiki *et al*, 1988). Στο ρυθμιστικό διάλυμα για την τέλεση της PCR επιπλέον του DNA-στόχου, του ζεύγους των εκκινητών και της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης απαιτείται η παρουσία ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) για τη σύνθεση των θυγατρικών αλυσίδων καθώς και δισθενών ιόντων μαγνησίου για την βέλτιστη δράση της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης.

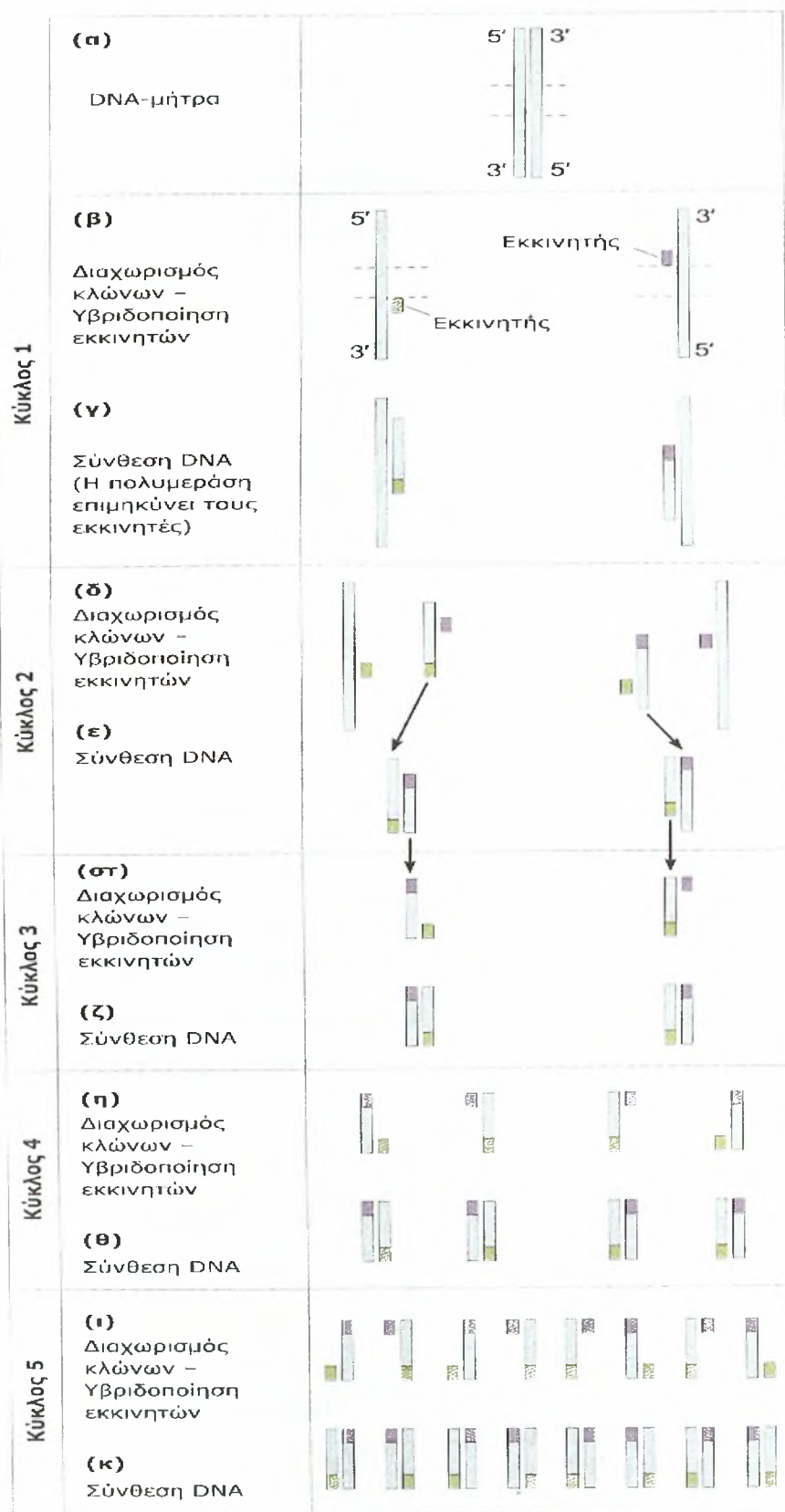
Στη στοιχειώδη μορφή της PCR κάθε κύκλος επιτελείται σε τρία στάδια (εικόνα 15). Το πρώτο στάδιο είναι η μετουσίωση του DNA-στόχου (denaturation), κατά την οποία επιτυγχάνεται μετατροπή του δίκλωνου DNA σε μονόκλωνο συνήθως σε θερμοκρασίες 92-95°C. Το δεύτερο εν σειρά στάδιο είναι ο υβριδισμός των εκκινητικών μορίων (annealing), όπου σε θερμοκρασία 50-65 °C (ανάλογα με τη σύσταση σε γουανίνη και κυτοσίνη) επιτυγχάνεται η εναπόθεση τους στις συμπληρωτικές για αυτούς περιοχές του DNA-στόχου. Τέλος, το τρίτο στάδιο είναι η επέκταση (extension) των εκκινητών με τη προσθήκη δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο ιχνάριο του DNA (με κατεύθυνση 5'- 3') μέσω της ενζυμικής δράσης της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης σε θερμοκρασία 70-78 °C.



Εικόνα 15. Σχηματική αναπαράσταση ενός κύκλου της PCR (αναπαραγωγή από Watson *et al*, 2007).

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης συνήθως πραγματοποιείται επί 25 έως 40 κύκλους. Κάθε φορά που συμπληρώνεται ένας κύκλος, η αλληλουχία-στόχος θεωρητικά διπλασιάζεται, με αποτέλεσμα αυξάνοντας τον αριθμό των κύκλων να αυξάνεται εκθετικά και ο αριθμός των ανατύπων του διότι οι κλώνοι που σχηματίζονται χρησιμοποιούνται ως πρότυπο στον επόμενο κύκλο (Εικόνα 16). Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται μια γεωμετρική συσσώρευση πολλαπλασιασθέντων αλληλουχιών-στόχων (2^n όπου n ο αριθμός των κύκλων) αυξάνοντας κατά πολύ την ευαισθησία της τεχνικής αυτής.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, κάθε στέλεχος υποβλήθηκε σε πέντε διαφορετικές αντιδράσεις PCR, των οποίων οι συνθήκες και οι λοιπές πληροφορίες παρατίθενται αναλυτικότερα κάτωθι.



Εικόνα 16. Εκθετική αύξηση των αντιγράφων του DNA κατά την PCR (αναπαραγωγή από Watson *et al.*, 2007).

Υλικά:

- WFI (στείρο απυρετογόνο H₂O)
- Taq DNA πολυμεράση 5u/μl (Fermentas)
- 10X Taq Buffer με KCl (Fermentas)
- MgCl₂ 25mM (Fermentas)
- Primer 1 100pmol/μl (Ανάδραση)
- Primer 2 100pmol/μl (Ανάδραση)
- dNTP Set 100mM (Fermentas)
- DNAEngine Peltier Thermal Cyclor (BIO-RAD)
- Συσκευή καθέτου νηματικής ροής κλάσης II
- Vortex (BICASA)
- Eppendorf, πιπέτες και ακροφύσια.

Πειραματική διαδικασία:

- Αρχικά παρασκευάζεται το master mix έκαστης αντίδρασης αναμιγνύοντας σε eppendorf ποσότητες πολλαπλάσιες του αριθμού των δειγμάτων (συμπεριλαμβανομένου του θετικού και του αρνητικού μάρτυρα) από τις αντίστοιχες βασικές ποσότητες (Πίνακας 1) των κάτωθι αντιδραστηρίων: Taq DNA πολυμεράση, 10X Taq Buffer με KCl, MgCl₂ 25mM, Primer 1, Primer 2, μίγματος dNTPs και WFI.

DNA	5 μl
10X Taq Buffer (με KCl)	5 μl
MgCl ₂ 25mM	3 μl
dNTPs (20mM)	1 μl
Primer 1 (50 pmol/μl)	0,5 μl
Primer 2 (50 pmol/μl)	0,5 μl
Taq DNA πολυμεράση (5u/μl)	0,4 μl
WFI	34,6 μl
Τελικός Όγκος	50 μl

Πίνακας 1. Βασικές ποσότητες αντιδραστηρίων για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

- Αναμιγνύεται ήπια το master mix με τη χρήση vortex και μοιράζονται σε ένα εppendorf 45 μl αυτού.
- Τέλος, προσθέτονται σε ένα εppendorf 5 μl από κάθε δείγμα και τα εppendorf τοποθετούνται στο θερμικό κυκλοποιητή στο πρόγραμμα της επιλογής μας.

6.1 Ενίσχυση τμήματος του *tuf* γονιδίου:

Για την ενίσχυση του τμήματος του *tuf* γονιδίου σχεδιάστηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

Tuf 1: 5'-TAC CAT TTC AGT ACC TTC TGG TAA-3'

Tuf 2: 5'-GGC CGT GTT GAA CGT GGT CAA ATC A-3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε 40 κύκλους, σε θερμικό κυκλοποιητή όπως ακολουθεί:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	96°C	3 min	1
Μετουσίωση	95°C	1 min	40
Υβριδισμός	55°C	30 sec	
Επιμήκυνση	72°C	30 sec	
Τελική επιμήκυνση	72°C	4 min	1

Πίνακας 2. Πρόγραμμα θερμικού κυκλοποιητή για την ενίσχυση του *tuf* γονιδίου.

6.2 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου του *23S rRNA*:

Για την ενίσχυση του τμήματος του *23S rRNA* γονιδίου σχεδιάστηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

Lin 1: 5'-GCG GTC GCC TCC TAA AAG-3'

Lin 2: 5'-ATC CCG GTC CTC TCG TAC TA-3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε 30 κύκλους, σε θερμικό κυκλοποιητή όπως ακολουθεί:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min	1
Μετουσίωση	94°C	30 sec	30
Υβριδισμός	55°C	30 sec	
Επιμήκυνση	72°C	1 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min	1

Πίνακας 3. Πρόγραμμα θερμικού κυκλοποιητή για την ενίσχυση του 23S rRNA γονιδίου.

6.3 Ενίσχυση τμήματος του *cfr* γονιδίου:

Για την ενίσχυση του τμήματος του *cfr* γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

Cfr 1: 5'-TGA AGT ATA AAG CAG GTT GGG AGT CA-3'

Cfr 2: 5'-ACC ATA TAA TTG ACC ACA AGC AGC-3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε 35 κύκλους, σε θερμικό κυκλοποιητή όπως ακολουθεί:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	1 min	1
Μετουσίωση	94°C	1 min	35
Υβριδισμός	48°C	2 min	
Επιμήκυνση	72°C	3 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	7 min	1

Πίνακας 4. Πρόγραμμα θερμικού κυκλοποιητή για την ενίσχυση του *cfr* γονιδίου.

6.4 Ενίσχυση τμήματος των *rplD* και *rplV* γονιδίων:

Για την ενίσχυση του τμήματος του *rplD* γονιδίου σχεδιάστηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

rplD 1: 5'-TTA TGC GAG CAC CTC CTC AA-3'

rplD 2: 5'-ATG GCT AAT TAT GAT GTT TT-3'

Ομοίως, όσον αφορά την ενίσχυση του τμήματος του *rplV* γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που σχεδιάστηκαν με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

rplV 1: 5'-TTA AGC TTC TTT AGC TTC TT-3'

rplV 2: 5'-ATG GAA GCA AAA GCG GTT-3'

Η ενίσχυση των εν λόγω τμημάτων τελέστηκε σε 30 κύκλους, σε θερμικό κυκλοποιητή όπως ακολουθεί:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min	1
Μετουσίωση	94°C	30 sec	30
Υβριδισμός	55°C	30 sec	
Επιμήκυνση	72°C	1 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min	1

Πίνακας 5. Πρόγραμμα θερμικού κυκλοποιητή για την ενίσχυση των *rplD* και *rplV* γονιδίων.

7. Διπλή ή Εμφωλεάζουσα PCR (nested PCR)

Ανάμεσα στις παραλλαγές της βασικής αντίδρασης της PCR από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες στη μοριακή διαγνωστική μικροβιολογία είναι η διπλή ή εμφωλεάζουσα PCR (nested PCR).

Η συγκεκριμένη παραλλαγή πρόκειται για δυο συνεχόμενες αντιδράσεις PCR. Στην πρώτη χρησιμοποιείται ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών που περικλείει την ευρύτερη περιοχή της ακολουθίας που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Στη συνέχεια, το προϊόν του πρώτου πολλαπλασιασμού μεταφέρεται σε δεύτερο δοκιμαστικό σωλήνα και επιτελείται η δεύτερη αντίδραση PCR με ένα ή περισσότερα ζεύγη εκκινητών ειδικών ως προς την εσωτερική αλληλουχία που πολλαπλασιάστηκε με το πρώτο ζεύγος εκκινητών. Έτσι, αυξάνεται η ειδικότητα και η ευαισθησία της μεθόδου.

Μετά το δεύτερο πολλαπλασιασμό, όπως και στη κλασική PCR, τα προϊόντα ανιχνεύονται σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, κάθε στέλεχος υποβλήθηκε σε έξι διαφορετικές αντιδράσεις nested-PCR (μια για έκαστο από τα έξι αντίγραφα του 23S rRNA), των οποίων οι συνθήκες και οι λοιπές πληροφορίες παρατίθενται αναλυτικότερα κάτωθι. Συγκεκριμένα, ενισχύθηκε αρχικά κάθε αντίγραφο του 23S rRNA με τη χρήση των rrlA, rrlB, rrlC, rrlD, rrlE και rrlF εκκινητών αντίστοιχα, και κατόπιν ενισχύθηκε η V περιοχή του 23S rRNA γονιδίου με τη χρήση εσωτερικών εκκινητών (Lin1 και Lin2) σε καθένα από αυτά.

Υλικά:

- WFI (στείρο απυρετογόνο H₂O)
- Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen)
- 10X High Fidelity PCR Buffer (Invitrogen)
- MgSO₄ 50mM (Invitrogen)
- Taq DNA πολυμεράση 5u/μl (Fermentas)
- 10X Taq Buffer με KCl (Fermentas)
- MgCl₂ 25mM (Fermentas)
- Primer 1 100pmol/μl (Ανάδραση)
- Primer 2 100pmol/μl (Ανάδραση)
- dNTP Set 100mM (Fermentas)
- DNAEngine Peltier Thermal Cycler (BIO-RAD)
- Συσκευή καθέτου νηματικής ροής κλάσης II
- Vortex (BICASA)
- Eppendorf, πιπέτες και ακροφύσια.

Πειραματική διαδικασία:

Όσον αφορά την πρώτη αντίδραση:

- Αρχικά παρασκευάζεται το master mix της αντίδρασης αναμιγνύοντας σε eppendorf ποσότητες πολλαπλάσιες του αριθμού των δειγμάτων (συμπεριλαμβανομένου του θετικού και του αρνητικού μάρτυρα) από τις αντίστοιχες βασικές ποσότητες (Πίνακας 6) των κάτωθι αντιδραστηρίων: Platinum Taq DNA πολυμεράση High Fidelity, 10X Taq Buffer με KCl, MgCl₂ 25mM, Primer 1, Primer 2, μίγματος dNTPs και WFI.

DNA	5 μl
10X High Fidelity PCR Buffer	5 μl
MgSO ₄ 50Mm	1,5 μl
dNTPs (20mM)	1 μl
Primer 1 (50 pmol/μl)	0,5 μl
Primer 2 (50 pmol/μl)	0,5 μl
Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity	0,4 μl
WFI	36,1 μl
Τελικός Όγκος	50 μl

Πίνακας 6. Βασικές ποσότητες αντιδραστηρίων για την ενίσχυση τμήματος έκαστου οπερονίου.

- Αναμιγνύεται ήπια το master mix με τη χρήση vortex και μοιράζονται σε έκαστο eppendorf 45 μl αυτού.
- Τέλος, προσθέτονται σε έκαστο eppendorf 5 μl από κάθε δείγμα και τα eppendorf τοποθετούνται στο θερμικό κυκλοποιητή στο πρόγραμμα της επιλογής μας.

Όσον αφορά τη δεύτερη αντίδραση:

- Ομοίως με την πρώτη αντίδραση, παρασκευάζεται το master mix αναμιγνύοντας σε eppendorf τα κάτωθι αντιδραστήρια: Taq DNA

πολυμεράση, 10X Taq Buffer με KCl, MgCl₂ 25mM, Primer 1, Primer 2, μίγματος dNTPs και WFI.

- Αναμιγνύεται ήπια το master mix με τη χρήση vortex και μοιράζονται σε ένα εppendorf 49,5 μl αυτού.
- Τέλος, προσθέτονται σε ένα εppendorf 0,5 μl από κάθε προϊόν ενίσχυσης των παραπάνω δειγμάτων και τα εppendorf τοποθετούνται στο θερμικό κυκλοποιητή κυκλοποιητή στο πρόγραμμα της επιλογής μας.

7.1 Ενίσχυση τμήματος του οπερονίου *rrlA*:

Για την ενίσχυση του τμήματος του οπερονίου *rrlA* σχεδιάστηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

rrlA 1: 5'-AAA-CCA-ATT-GGG-ATT-AAA-GT-3'

rrlA 2: 5'-TTC-GAG-GGA-TCT-TAT-AAC-CG-3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε 30 κύκλους, σε θερμικό κυκλοποιητή όπως ακολουθεί:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min	1
Μετουσίωση	94°C	30 sec	30
Υβριδισμός	55°C	30 sec	
Επιμήκυνση	72 °C	7 min	
Τελική επιμήκυνση	72 °C	10 min	1

Πίνακας 7. Πρόγραμμα θερμικού κυκλοποιητή για την ενίσχυση τμήματος του οπερονίου *rrlA*.

7.2 Ενίσχυση τμήματος του οπερονίου *rrlB*:

Για την ενίσχυση του τμήματος του οπερονίου *rrlB* σχεδιάστηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

rrlB 1: 5'-CCT-CCA-ACT-GGT-GGT-CTA-GG-3'

rrlB 2: 5'-TCC-TTG-CCA-TTG-TCA-CCA-GA-3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε 30 κύκλους, σε θερμικό κυκλοποιητή όπως ακολουθεί:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min	1
Μετουσίωση	94°C	30 sec	30
Υβριδισμός	55°C	30 sec	
Επιμήκυνση	72 °C	6 min	
Τελική επιμήκυνση	72 °C	10 min	1

Πίνακας 8. Πρόγραμμα θερμικού κυκλοποιητή για την ενίσχυση τμήματος του οπερονίου *rflB*.

7.3 Ενίσχυση τμήματος του οπερονίου *rflC*:

Για την ενίσχυση του τμήματος του οπερονίου *rflC* σχεδιάστηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

rflC 1: 5'-GAG-TCC-ACT-TAG-GCC-CAC-CA-3'

rflC 2: 5'-GAG-TCC-ACT-TAG-GCC-CAC-CA-3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε 30 κύκλους, σε θερμικό κυκλοποιητή όπως ακολουθεί:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min	1
Μετουσίωση	94°C	30 sec	30
Υβριδισμός	55°C	30 sec	
Επιμήκυνση	72 °C	4 min	
Τελική επιμήκυνση	72 °C	10 min	1

Πίνακας 9. Πρόγραμμα θερμικού κυκλοποιητή για την ενίσχυση τμήματος του οπερονίου *rflC*.

7.4 Ενίσχυση τμήματος του οπερονίου *rflD*:

Για την ενίσχυση του τμήματος του οπερονίου *rflD* σχεδιάστηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

rflD 1: 5'-CTA-CTC-TTT-TTA-TAG-CAA-TG-3'

rrlD 2: 5'-GCC-TGG-CAA-CGT-CCT-ACT-CT-3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε 30 κύκλους, σε θερμικό κυκλοποιητή όπως ακολουθεί:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min	1
Μετουσίωση	94°C	30 sec	30
Υβριδισμός	58°C	30 sec	
Επιμήκυνση	72 °C	7 min	
Τελική επιμήκυνση	72 °C	10 min	1

Πίνακας 10. Πρόγραμμα θερμικού κυκλοποιητή για την ενίσχυση τμήματος του οπερονίου rrlD.

7.5 Ενίσχυση τμήματος του οπερονίου rrlE:

Για την ενίσχυση του τμήματος του οπερονίου rrlE σχεδιάστηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

rrlE 1: 5'-TGT-TGA-TGG-AGC-TTC-AGT-AG-3'

rrlE 2: 5'-TAA-CCA-TTT-GGA-GCT-AGC-CG-3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε 30 κύκλους, σε θερμικό κυκλοποιητή όπως ακολουθεί:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min	1
Μετουσίωση	94°C	30 sec	30
Υβριδισμός	58°C	30 sec	
Επιμήκυνση	72 °C	7 min	
Τελική επιμήκυνση	72 °C	10 min	1

Πίνακας 11. Πρόγραμμα θερμικού κυκλοποιητή για την ενίσχυση τμήματος του οπερονίου rrlE.

7.6 Ενίσχυση τμήματος του οπερονίου rrlF:

Για την ενίσχυση του τμήματος του οπερονίου rrlF σχεδιάστηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

π1F 1: 5'-TCT-TGT-ATC-TCT-TCC-TAC-TA-3'

π1F 2: 5'-TAA-CCA-TTT-GGA-GCT-AGC-CG-3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε 30 κύκλους, σε θερμικό κυκλοποιητή όπως ακολουθεί:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min	1
Μετουσίωση	94°C	30 sec	30
Υβριδισμός	58°C	30 sec	
Επιμήκυνση	72 °C	7 min	
Τελική επιμήκυνση	72 °C	10 min	1

Πίνακας 12. Πρόγραμμα θερμικού κυκλοποιητή για την ενίσχυση τμήματος του οπερονίου π1F.

7.7 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου του 23S rRNA έκαστου οπερονίου:

Για την ενίσχυση του τμήματος του 23S rRNA γονιδίου, όπως έχει ήδη αναφερθεί, σχεδιάστηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

Primer 1: 5'-GCG GTC GCC TCC TAA AAG-3'

Primer 2: 5'-ATC CCG GTC CTC TCG TAC TA-3'

Για τη συγκεκριμένη αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν οι βασικές ποσότητες που αναφέρονται στον κάτωθι πίνακα:

DNA	5 μl
10X Taq Buffer (με KCl)	5 μl
MgCl ₂ 25mM	3 μl
dNTPs (20mM)	1 μl
Primer 1 (50 pmol/μl)	0,5 μl
Primer 2 (50 pmol/μl)	0,5 μl
Taq DNA πολυμεράση (5u/μl)	0,4 μl
WFI	34,6 μl
Τελικός Όγκος	50 μl

Πίνακας 13. Αντιδραστήρια για την ενίσχυση του 23S rRNA γονιδίου.

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε 30 κύκλους, σε θερμικό κυκλοποιητή όπως ακολουθεί:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min	1
Μετουσίωση	94°C	30 sec	30
Υβριδισμός	55°C	30 sec	
Επιμήκυνση	72°C	1 min	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min	1

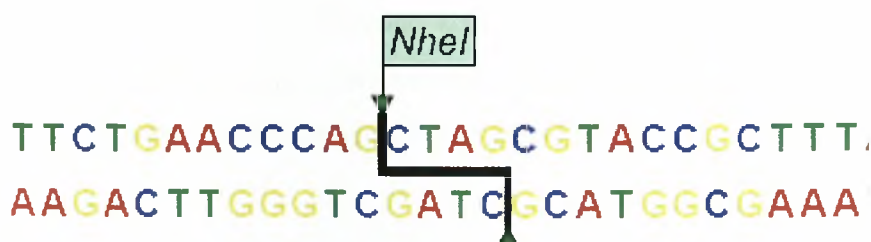
Πίνακας 14. Πρόγραμμα θερμικού κυκλοποιητή για την ενίσχυση του 23S rRNA γονιδίου.

8. Ανάλυση RFLP με NheI

Η ανάλυση πολυμορφισμού μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP) είναι μια από τις μεθόδους που μπορούν να συμπληρώσουν τις εφαρμογές της PCR για τον προσδιορισμό διαφορών στη νουκλεοτιδική αλληλουχία μεταξύ προϊόντων PCR, καθιστώντας δυνατό με αυτό τον τρόπο τον εντοπισμό μιας μετάλλαξης ή μιας διαφοράς στη νουκλεοτιδική αλληλουχία.

Η εν λόγω μέθοδος βασίζεται στη χρήση ενδονουκλεασών περιορισμού, ενζύμων που αναγνωρίζουν μια συγκεκριμένη αλληλουχία μήκους τεσσάρων με οκτώ νουκλεοτιδία και τέμνουν το DNA σε ποικίλες αποστάσεις από αυτά τα σημεία ακόμα κι εντός αυτών.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η ενδονουκλεάση περιορισμού που προέρχεται από το μικροοργανισμό *Neisseria mucosa heidelbergensis* (NheI), η οποία αναγνωρίζει και τέμνει την αλληλουχία 5'-GCTAGC-3' μετά την πρώτη γουανίνη με φορά 5' προς 3' (Εικόνα 17).



Εικόνα 17. Σημείο τομής της ενδονουκλεάσης περιορισμού NheI.

Υλικά:

- WFI (στείρο απυρετογόνο H₂O)
- 10X Buffer Tango (Fermentas)
- Ένζυμο NheI, 10units/μl (Fermentas)
- Κλίβανος επώασης (Heal Force)
- Πιπέτες, erpendorf και ακροφύσια.

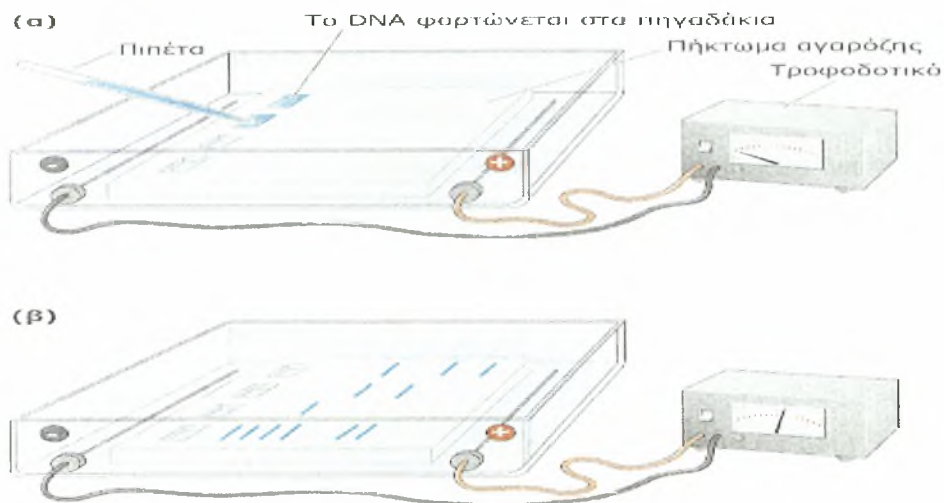
Πειραματική διαδικασία:

- Προσθέτονται σε ένα erpendorf 3 μl 10X Buffer Tango, 2 μl ένζυμο NheI και 5 μl WFI.
- Εν συνεχεία προσθέτονται 20 μl DNA από κάθε προϊόν της PCR σε κάθε erpendorf και επωάζονται για 3 ώρες στους 37°C.
- Τέλος, ηλεκτροφορούνται 15 μl αυτού όπως έχει ήδη αναλυθεί άνωθεν σε πήκτωμα αγαρόζης 3% ώστε να οπτικοποιηθούν τα αποτελέσματα.

9. Ηλεκτροφόρηση Προϊόντων PCR, nested PCR και RFLP

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό και την αναγνώριση τμημάτων DNA είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η τεχνική αυτή είναι απλή, γρήγορη και ικανή να διαχωρίζει μίγματα τμημάτων DNA που δεν μπορούν να διαχωριστούν με άλλες τεχνικές.

Σύμφωνα με αυτή την τεχνική, τα τμήματα DNA αναγκάζονται να κινηθούν μέσω των πόρων που σχηματίζονται σε πήκτωμα αγαρόζης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου (Εικόνα 18). Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται κυρίως από τέσσερις παραμέτρους: το μέγεθος του DNA, τη συγκέντρωση της αγαρόζης, τη στερεοδιάταξη του DNA και την ένταση του ρεύματος. Η θέση του DNA στο πήκτωμα προσδιορίζεται υπό υπεριώδες φως με τη χρήση μικρής συγκέντρωσης βρωμιούχου αιθιδίου, μιας φθορίζουσας χρωστικής που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις αζωτούχες βάσεις του DNA.



Εικόνα 18. Διαχωρισμός μορίων DNA διαφορετικού μεγέθους μέσω ηλεκτροφόρησης (αναπαραγωγή από Watson *et al*, 2007).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης 2% και 3% για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των PCR και nested PCR και της πέψης αντίστοιχα, όπως παρατίθεται αναλυτικότερα παρακάτω.

Υλικά:

- WFI (στείρο απυρετογόνο H₂O)
- TBE Buffer 10X (Ambion)
- SeaKem LE Agarose (Cambrex)
- Ethidium bromide soln, 10 mg/ml (Research Organics)
- 6X DNA Loading Dye Solution (Fermentas)
- GeneRuler 100bp DNA Ladder (Fermentas)
- MassRuler DNA Ladder, High Range (Fermentas)
- Λάμπα UV (MiniBisPro, Bio-Imaging Systems)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (EC105-LVD Submarine Gel System Classic, Thermo Electron Co)
- Τροφοδοτικό τάση (EC105-LVD, Thermo Electron Co.)
- Φούρνο μικροκυμάτων
- Κωνική φιάλη 250 ml
- Εκμαγείο και «χτενάκια» στερεοποίησης πηκτώματος
- Πιπέτες, ακροφύσια και παραφίλμ.

Πειραματική διαδικασία:

- Προσθέτονται και αναμιγνύονται σε κωνική φιάλη 10 ml TBE 10X σε 90 ml WFI καθώς και 2g (ή 3g κατά περίπτωση) αγαρόζης.
- Θερμαίνεται έως ότου διαλυθεί η αγαρόζη και αφήνεται να κατέβει η θερμοκρασία περίπου στους 55°C (κωνική ανεκτή στη παρεία) ώστε το διάλυμα να μην επηρεάσει το πλαστικό εκμαγείο.
- Προσθέτεται βρωμιούχο αιθίδιο έτσι ώστε αυτό να έχει τελική συγκέντρωση 0,5 µg/ml στο διάλυμα.
- Τοποθετούνται τα «χτενάκια» στο εκμαγείο και ρίχνεται σε αυτό προσεκτικά το διάλυμα της αγαρόζης.
- Αφού στερεοποιηθεί εντελώς η αγαρόζη, αφαιρούνται προσεκτικά τα «χτενάκια» και δύναται να συνεχίσουμε στην ηλεκτροφόρηση εμβαπτίζοντας το πήκτωμα στη συσκευή της ηλεκτροφόρησης.
- Αναμειγνύεται έκαστο δείγμα με μικρή ποσότητα χρωστικής και τοποθετείται, όπως και ο μάρτυρας στα πηγαδάκια του πηκτώματος.
- Το πήκτωμα ηλεκτροφορείται σε σταθερή τάση 100V για 40 λεπτά περίπου και τέλος εκθέτοντας το πήκτωμα σε υπεριώδη ακτινοβολία λαμβάνεται η απεικόνιση των ζωνώσεων μέσω του ηλεκτρονικού υπολογιστή.

10. Καθαρισμός Προϊόντων της PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR ώστε να επακολουθήσει η διαδικασία της αλληλούχισής τους έγινε με το PureLink PCR Purification Kit της Invitrogen, όπως αναφέρεται αναλυτικότερα παρακάτω.

Υλικά:

- Binding Buffer (B2)
- Wash Buffer (W1)
- Elution Buffer : 10mM Tris-HCl, pH 8,5 (E1)
- PureLink PCR στήλες φυγοκέντρωσης με σωλήνες συλλογής
- PureLink σωλήνες έκλουσης (1,7ml)
- Ισοπροπανόλη 100%

- Αιθανόλη 96-100%
- Φυγόκεντρο Mini Spin (eppendorf)
- Πιπέτες και ακροφύσια

Πειραματική διαδικασία:

- Προσθέτονται 10 ml ισοπροπανόλης 100% στα 15 ml Binding Buffer και το διάλυμα αναδεύεται ελαφρώς ώστε να καταστεί ομοιογενές.
- Προσθέτονται 32 ml αιθανόλης 96-100% στα 8 ml Wash Buffer και το διάλυμα αναδεύεται ελαφρώς ώστε να καταστεί ομοιογενές.
- Εν συνεχεία, προσθέτεται τετραπλάσιος όγκος ανασυσταμένου με ισοπροπανόλη Binding Buffer από τον όγκο του προϊόντος της PCR σε καθένα από αυτά και αναμειγνύεται καλά.
- Τοποθετείται έναστο από τα παραπάνω διαλύματα Binding Buffer-προϊόντος της PCR σε PureLink στήλη φυγοκέντρωσης.
- Φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά στις 7.000 rpm και απορρίπτεται το διήθημα.
- Έπειτα, προσθέτονται σε έναστη στήλη 650 μl ανασυσταμένου με αιθανόλη Wash Buffer.
- Φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά στις 7.000 rpm και απορρίπτεται εκ νέου το διήθημα.
- Επαναφυγοκεντρείται έναστη στήλη σε θερμοκρασία δωματίου για 4 λεπτά στις 13.400 rpm και απορρίπτεται το διήθημα ώστε να απομακρυνθούν τα τυχόν υπολείμματα του Wash Buffer.
- Απορρίπτονται οι σωλήνες συλλογής και έναστη στήλη τοποθετείται σε σωλήνα έκλουσης PureLink (1,7 ml).
- Προσθέτονται 50 μl Elution Buffer (10mM Tris-HCl, pH 8,5) στο κέντρο κάθε στήλης.
- Επωάζονται οι στήλες για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούνται σε θερμοκρασία δωματίου για 4 λεπτά στις 13.400 rpm.
- Τέλος, το διήθημα (~48 μl) περιέχει το καθαρισμένο προϊόν της PCR, οπότε απορρίπτεται έναστη στήλη.

11. Ανάλυση πρωτοδιάταξης αλληλουχίας DNA (sequencing)

Η αναλύση της πρωτοδιάταξης της αλληλουχίας του DNA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Sanger, γνωστή και ως διδεόξυ-μέθοδος, που βασίζεται στον βασεο-ειδικό τερματισμό μιας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης επέκτασης εκκινητή.

Σύμφωνα με αυτή, διενεργείται μια αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την εκτέλεση της οποίας εκτός των τέσσερων δεοξυριβονουκλεοτιδίων χρησιμοποιούνται και τροποποιημένα νουκλεοτίδια (διδεόξυριβονουκλεοτίδια) που δύναται να σταματούν την επέκταση της συμπληρωματικής αλυσίδας.

Το διδεόξυριβονουκλεοτίδιο αυτό μπορεί να ενσωματώνεται στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, όμως δεν μπορεί να σχηματίσει φωσφοδιεστερικό δεσμό με επόμενο νουκλεοτίδιο, γιατί λείπει το υδροξύλιο στην 3' θέση. Τα διδεοξυριβονουκλεοτίδια αυτά είναι σημασμένα το καθένα με διαφορετική φθορίζουσα χημική ομάδα. Έτσι, σχηματίζεται μείγμα προϊόντων τερματισμού που μπορεί να έχουν οποιαδήποτε από τις τέσσερις βάσεις στο 3' άκρο τους. Τα προϊόντα αυτά προκύπτουν από την ενσωμάτωση ενός διδεοξυριβονουκλεοτιδίου σε μία τυχαία θέση κατά τη σύνθεση.

Επειδή οι 4 φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται εκπέμπουν φωτεινή ακτινοβολία σε διαφορετικό μήκος κύματος, η ταυτότητα της βάσης στην οποία τερματίζεται η σύνθεση αντιστοιχεί στο χρώμα του διδεοξυριβονουκλεοτιδίου που έχει ενσωματωθεί στο 3' άκρο.

Όταν τα προϊόντα αυτής της αντίδρασης ηλεκτροφορηθούν στη σειρά, η ακολουθία με την οποία τα νουκλεοτίδια προστίθενται στον εκκινητή δύναται να βρεθεί από τα αυξανόμενου μεγέθους διαδοχικά θραύσματα που προκύπτουν στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης της συσκευής αυτόματης αλληλούχισης.

Τα κομμάτια μεταναστεύουν σύμφωνα με το μέγεθός τους και οι φθορίζουσες χρωστικές διακρίνουν πο νουκλεοτίδιο είναι στο τέλος κάθε κομματιού. Κάθε διαδοχικό τμήμα είναι κατά ένα νουκλεοτίδιο μεγαλύτερο από το προηγούμενο. Οι φθορίζουσες χρωστικές διεγείρονται από την ακτίνα laser ενός ανιχνευτή, καθώς τα τμήματα περνούν κατά την ηλεκτοφόρηση (Εικόνα 19). Ο αισθητήρας του ανιχνευτή καταγράφει την ένταση και το μήκος κύματος του φωτός, μετατρέπει το σήμα φθορισμού σε ηλεκτρικό σήμα και το στέλνει σε έναν υπολογιστή. Αυτό το σήμα αναλύεται με αλγόριθμους ειδικούς για αλληλούχιση, οι οποίοι αναγνωρίζουν τη

Η αλληλούχιση των διαφόρων τμημάτων ενίσχυσης στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία COGENICS, η οποία εδρεύει στο Hope End, Takeley Essex CM22 6TA (UK). Συγκεκριμένα για την αντίδραση της αλληλούχισης αποστέλλονται 50 μl από το προϊόν ενίσχυσης και 20 μl από έκαστο εκκινητή με αραιώση 1:5.

Αποτελέσματα

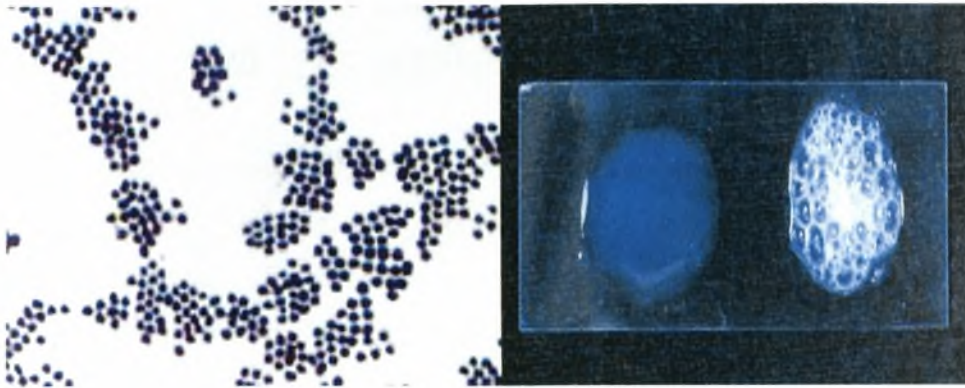
1. Ταυτοποίηση στελεχών

Το υλικό της παρούσας μελέτης αποτέλεσαν 10 στελέχη *S. epidermidis* με αντοχή στη λινεζολίδα που απομονώθηκαν από διάφορα κλινικά δείγματα από τα μικροβιολογικά εργαστήρια του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας και του Σισμανόγλειου Γενικού Νοσοκομείου Αθήνας (Εικόνα 21).



Εικόνα 21. Περιοχές συλλογής ανθεκτικών στη λινεζολίδα στελεχών.

Αρχικά, κεχρωσμένα παρασκευάσματα (χρώση Gram) των συλλεχθέντων στελεχών με αντοχή στη λινεζολίδα υποβλήθηκαν σε μικροσκοπική εξέταση, με σκοπό τη διαφοροδιάγνωση όσον αφορά το μέγεθος, τη μορφολογία και το πρότυπο χρώσης τους βάσει της συγκεκριμένης χρωστικής. Εφόσον τα εν λόγω στελέχη ήταν Gram θετικοί κόκκοι με σταφυλοειδή ή άτακτη διάταξη, προχωρήσαμε σε δοκιμή παραγωγής καταλάσης (Εικόνα 22) προκειμένου να αποκλείσουμε τους στρεπτόκοκκους, που δίνουν αρνητική την εν λόγω δοκιμή. Εν συνεχεία, εφόσον τα εν λόγω στελέχη ήταν θετικά στη δοκιμή παραγωγής καταλάσης διενεργήθηκε δοκιμή παραγωγής πηκτάσης με σκοπό το διαχωρισμό των στελεχών *S. aureus* από αυτά των αρνητικών στην πηκτάση σταφυλόκοκκων (CoNS).



Εικόνα 22. Αποτελέσματα Gram χρώσης και δοκιμής παραγωγής καταλάσης αντίστοιχα.

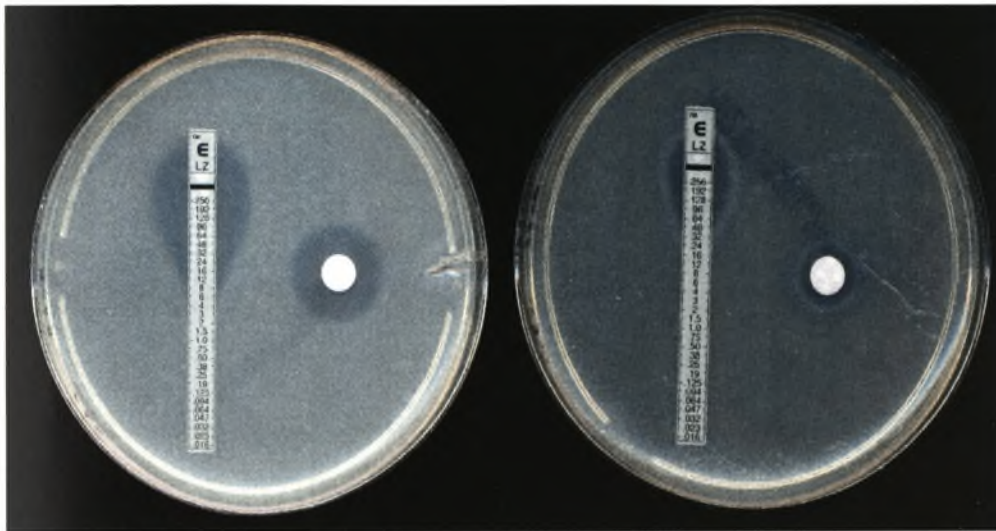
Τέλος, αντί του σχήματος Kloos και Schleifer που αποτελεί και τη μέθοδο αναφοράς για την περαιτέρω ταυτοποίηση των αρνητικών στην πηκτάση σταφυλόκοκκων χρησιμοποιήθηκε η ενίσχυση και ακολούθως η αλληλούχιση ενός τμήματος 370 bp του γονιδίου που κωδικοποιεί τον παράγοντα επιμήκυνσης EF-Tu (Kontos *et al*, 2003). Η ταυτοποίηση έκαστου στελέχους ολοκληρώθηκε με τη σύγκριση της αλληλουχίας του συγκεκριμένου τμήματος μέσω του προγράμματος BLAST με τις ήδη υπάρχουσες σε βάσεις δεδομένων αλληλουχίες για το γονίδιο που κωδικοποιεί τον παράγοντα επιμήκυνσης EF-Tu, οπότε προέκυψαν τα αποτελέσματα που παρατίθενται στον κάτωθι πίνακα.

Α/Α ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	GRAM ΧΡΩΣΗ	ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΚΑΤΑΛΑΣΗΣ	ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΠΗΚΤΑΣΗΣ	ΕΙΔΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ
1	+	+	-	<i>S. epidermidis</i>
2	+	+	-	<i>S. epidermidis</i>
3	+	+	-	<i>S. epidermidis</i>
4	+	+	-	<i>S. epidermidis</i>
5	+	+	-	<i>S. epidermidis</i>
6	+	+	-	<i>S. epidermidis</i>
7	+	+	-	<i>S. epidermidis</i>
8	+	+	-	<i>S. epidermidis</i>
9	+	+	-	<i>S. epidermidis</i>
10	+	+	-	<i>S. epidermidis</i>

Πίνακας 15. Αποτελέσματα δοκιμών για την ταυτοποίηση του είδους έκαστου στελέχους.

2. Έλεγχος Αντοχής στα Αντιβιοτικά (Αντιβιόγραμμα)

Εφόσον τα στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως *S. epidermidis* υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ευαισθησίας στη λινεζολίδη με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ, ενώ ο καθορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης για τη λινεζολίδη (MIC) διενεργήθηκε με τη δοκιμασία E (Εικόνα 22) (Clinical and Laboratory Standards Institute 2006a, 2006b).



Εικόνα 23. Ενδεικτικά αποτελέσματα της δοκιμασίας ευαισθησίας με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ και του καθορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) με τη δοκιμασία E για ένα ευαίσθητο και ένα ανθεκτικό στη λινεζολίδη στέλεχος αντίστοιχα.

Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων (Πίνακας 16) των άνωθι δοκιμασιών διενεργήθηκε μετά την παρέλευση 24 ωρών σύμφωνα με τα κριτήρια της CLSI, και η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα τους ελέγχθηκε με το πρότυπο στέλεχος *S. epidermidis* ATCC 14990.

Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τα κριτήρια της CLSI όλα τα υπό μελέτη στελέχη είναι ανθεκτικά έναντι της λινεζολίδης εφόσον τα ευαίσθητα στη λινεζολίδη στελέχη χαρακτηρίζονται αφενός από ζώνη αναστολής με διάμετρο μεγαλύτερη ή ίση με 21mm και αφετέρου από ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) μικρότερη ή ίση των 4μg/mL.

Α/Α ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	ΔΙΑΜΕΤΡΟΣ ΖΩΝΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ (mm)	MIC (μg/ml)
1	18	12
2	13	48
3	15	24
4	0	>256
5	0	>256
6	17	12
7	16	12
8	15	48
9	15	32
10	17	12

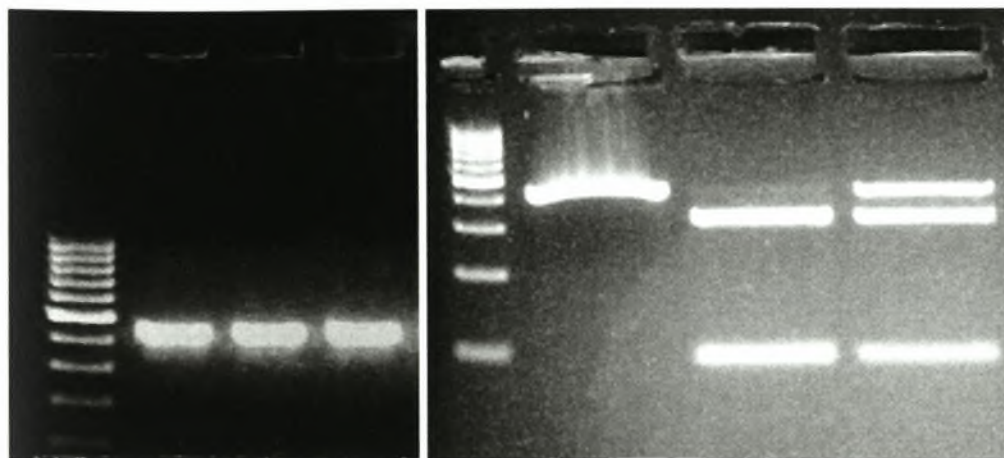
Πίνακας 16. Αποτελέσματα διαμέτρου της ζώνης αναστολής και της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης για έκαστο στέλεχος.

3. Διερεύνηση μηχανισμών αντοχής

Για να αποσαφηνίσουμε τους μηχανισμούς που ενοχοποιούνται για την ανθεκτικότητα έναντι της λινεζολίδης, αρχικά προχωρήσαμε στην απομόνωση του γενετικού υλικού των υπό μελέτη στελεχών χρησιμοποιώντας κυρίως το αυτόματο σύστημα Magtraction 12GC σε συνδυασμό με το Magtraction-MagaZorb DNA Common Kit-200 N και εν συνεχεία μελετήσαμε την ύπαρξη μεταλλάξεων τόσο στη V περιοχή του 23S rRNA γονιδίου όσο και στα γονίδια των ριβοσωμικών πρωτεϊνών *grlD* και *grlV*, καθώς και την ύπαρξη του *cfb* γονιδίου.

3.1 Μεταλλάξεις στη περιοχή V του 23S rRNA γονιδίου

Πρωτίστως, ελέγξαμε την παρουσία της πιο κοινής μετάλλαξης (G2576T) που ευθύνεται για την ανθεκτικότητα στη λινεζολίδα ενισχύοντας ένα τμήμα 420 bp της V περιοχής του 23S rRNA γονιδίου και υποβάλλοντας το προϊόν της ενίσχυσης αυτής σε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *NheI* (Woodford *et al*, 2002), το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία που δημιουργείται από τη μετάλλαξη αυτή (Εικόνα 23) και τέμνει το τμήμα 420 bp σε δυο τμήματα 98 και 322 bp. Η εν λόγω μετάλλαξη βρέθηκε σε 5 από τα υπό μελέτη στελέχη, και συγκεκριμένα στα στελέχη 2, 3, 8, 9 και 10 όπως φαίνεται και στο Πίνακα 17.



Εικόνα 23. Ενδεικτικά αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης από την ενίσχυση της V περιοχής του 23S rRNA γονιδίου και την πέψη με NheI για τα στελέχη 1, 2 και 3.

Για την παρουσία άλλων μεταλλάξεων στην ίδια περιοχή του 23S rRNA γονιδίου μετά την ενίσχυση διενεργήθηκε καθαρισμός του προϊόντος, ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του και σύγκριση της με το αντίστοιχο τμήμα του προτύπου στελέχους *S. epidermidis* με τη βοήθεια του προγράμματος ClustalW. Η παρουσία

Α/Α ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ 23S rRNA ΓΟΝΙΔΙΟΥ
1	C2534T
2	C2534T G2576T
3	C2534T G2576T
4	T2504A C2534T
5	T2504A C2534T
6	C2534T
7	C2534T
8	C2534T G2576T
9	C2534T G2576T
10	C2534T G2576T

Πίνακας 17. Αποτελέσματα πολυμορφισμών του 23S rRNA γονιδίου που ενοχοποιούνται για ανθεκτικότητα έναντι της λινεζολίδης (η αριθμηση γίνεται βάσει του γονιδίου του 23S rRNA της *E. coli*).

των προκυπτόντων πολυμορφισμών ελέγχθηκε, επίσης, σε 40 στελέχη *S. epidermidis* ευαίσθητα στην λινεζολίδη ώστε να καθοριστεί ποιοι εξ αυτών είναι πιθανό να ευθύνονται για την ανθεκτικότητα. Από την προαναφερθείσα διαδικασία προέκυψε η ύπαρξη δυο ακόμα μεταλλάξεων που ενοχοποιούνται για ανθεκτικότητα έναντι της λινεζολίδης (C2534T και T2504A, βάσει της αρίθμησης του γονιδίου του 23S rRNA της *E. coli*) όπως φαίνεται στο Πίνακα 17.

Εφόσον, καθορίσαμε τους πολυμορφισμούς της V περιοχής του 23S rRNA γονιδίου που φέρει έκατο στέλεχος και πιθανώς ενοχοποιούνται για την ανθεκτικότητα τους έναντι της λινεζολίδης εργαστήκαμε όπως αναφέρεται παρακάτω για να καθορίσουμε τον αριθμό των αλληλίων του 23S rRNA γονιδίου που φέρει έκαστη μετάλλαξη.

Συγκεκριμένα, ανατρέχοντας στη GeneBank για τον *S. epidermidis* RP62A (no CP000029) σχεδιάσαμε εκκινήτες ώστε να ενισχύσουμε έκατο από τα 6 αντίγραφα του 23S rRNA γονιδίου (rflA, rflB, rflC, rflD, rflE και rflF) των υπό μελέτη στελεχών.

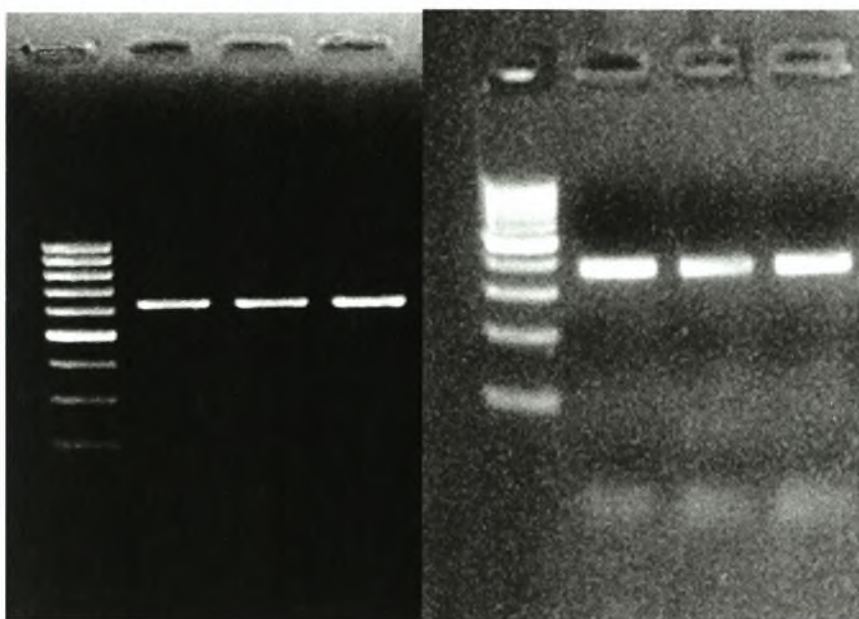
Ακολουθώντας εργαζόμενοι όπως αναφέρθηκε παραπάνω, χρησιμοποιήσαμε τα προϊόντα ενίσχυσης των 6 αντιγράφων του 23S rRNA γονιδίου και ενισχύσαμε το τμήμα των 420 bp του 23S rRNA γονιδίου κάθε αντιγράφου ξεχωριστά προκειμένου να καθορίσουμε τον αριθμό των αντιγράφων που φέρουν την υπεύθυνη για την ανθεκτικότητα μετάλλαξη σε κάθε στέλεχος και τα εν λόγω αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 18.

Α/Α ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΝΤΙΓΡΑΦΩΝ ΤΟΥ 23S rRNA ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΠΟΥ ΦΕΡΕΙ ΕΚΑΣΤΟ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ		
	T2504A	C2534T	G2576T
1	0/5	2/5	0/5
2	0/5	2/5	5/5
3	0/5	2/5	4/5
4	5/6	4/6	0/6
5	5/6	4/6	0/6
6	0/5	2/5	0/5
7	0/6	1/6	0/6
8	0/6	3/6	4/6
9	0/6	4/6	6/6
10	0/6	1/6	5/6

Πίνακας 18. Αποτελέσματα για τον αριθμό αντιγράφων του 23S rRNA γονιδίου που φέρει έκατο πολυμορφισμό στα υπό μελέτη στελέχη.

3.2 Μεταλλάξεις στα *rplD* και *rplV* γονίδια

Ομοίως, τα προαναφερθέντα στελέχη ελέχθησαν με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών και ανάλυση της πρωτοταγούς δομής του προϊόντος της ενίσχυσης (Εικόνα 25) μέσω του προγράμματος ClustalW τόσο για την παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο *rplD* που κωδικοποιεί την ριβοσωμική πρωτεΐνη L4 και οι οποίες ενοχοποιούνται για την ανθεκτικότητα έναντι της λινεζολίδης, όσο και για μεταλλάξεις στο γονίδιο *rplV* που κωδικοποιεί την ριβοσωμική πρωτεΐνη L22, μεταλλάξεις στην οποία μέχρι τώρα έχουν ενοχοποιηθεί για ανθεκτικότητα σε άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες που δρουν αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση (μακρολίδες, στρεπτογραμίνες και λινκοσαμίδες) (Cattoir *et al*, 2007; Malbrunoy *et al*, 2002; Canu *et al*, 2002).



Εικόνα 25. Ενδεικτικά αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης από την ενίσχυση των γονιδίων *rplD* και *rplV* αντίστοιχα για τα στελέχη 1, 2 και 3.

Ωστόσο, κανένα από τα υπό μελέτη στελέχη δεν έφερε μεταλλάξεις στα γονίδια των *rplD* και *rplV* που κωδικοποιούν τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες L4 και L22 αντίστοιχα (Πίνακας 19).

3.3 Επιβεβαίωση ύπαρξης *cftr* γονιδίου

Τέλος, τα εν λόγω στελέχη ελέχθησαν για την παρουσία του *cftr* γονιδίου με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών που ενισχύουν ένα τμήμα 746 bp εντός του συγκεκριμένου γονιδίου (Kehrenberg and Schwarz, 2006), το οποίο κωδικοποιεί μια μεθυλοτρασφεράση που παρέχει μια μετα-μεταφραστική μεθυλίωση της αδενίνης στη θέση 2503 της V περιοχής του 23S rRNA της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας, επηρεάζοντας τη δέσμευση της λινεζολίδης και παρέχοντας ανθεκτικότητα έναντι αυτής. Ωστόσο, κατά την εν λόγω ενίσχυση δεν λάβαμε προϊόν συμπεραίνοντας ότι κανένα από τα υπό μελέτη στελέχη δεν έφερε το *cftr* γονίδιο (Πίνακας 19).

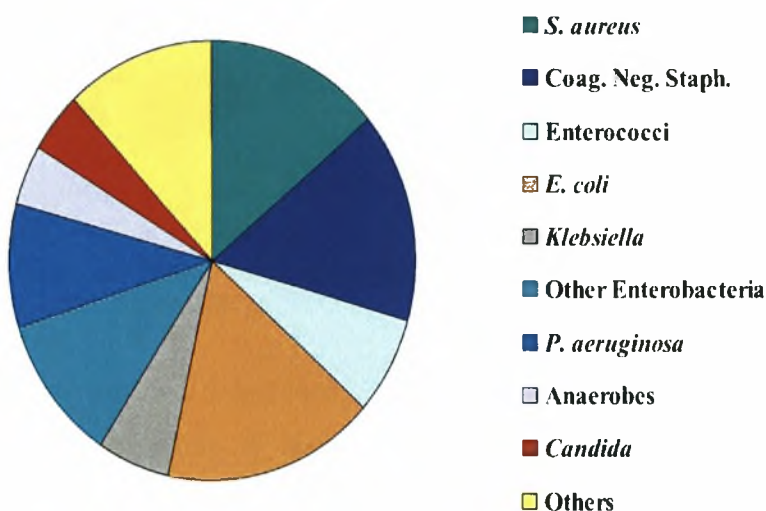
Αναλυτικότερα, οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη έχουν αναφερθεί παραπάνω (ενότητα Υλικά και Μέθοδοι).

	Ν/Α ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	ΕΙΔΟΣ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	MIC µg/ml	ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ T2504A	ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ C2534T	ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ G2576T	ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΣΤΗ L4	ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΣΤΗ L22	ΠΑΡΟΥΣΙΑ CFR ΓΟΝΙΔΙΟΥ
1	<i>S.epidermidis</i>	12	-	+	-	-	-	-	-
2	<i>S.epidermidis</i>	48	-	+	+	-	-	-	-
3	<i>S.epidermidis</i>	24	-	+	+	-	-	-	-
4	<i>S.epidermidis</i>	>256	+	+	-	-	-	-	-
5	<i>S.epidermidis</i>	>256	+	+	-	-	-	-	-
6	<i>S.epidermidis</i>	12	-	+	-	-	-	-	-
7	<i>S.epidermidis</i>	12	-	+	-	-	-	-	-
8	<i>S.epidermidis</i>	48	-	+	+	-	-	-	-
9	<i>S.epidermidis</i>	32	-	+	+	-	-	-	-
10	<i>S.epidermidis</i>	12	-	+	+	-	-	-	-

Πίνακας 19. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των υπό μελέτη στελεχών.

Συζήτηση

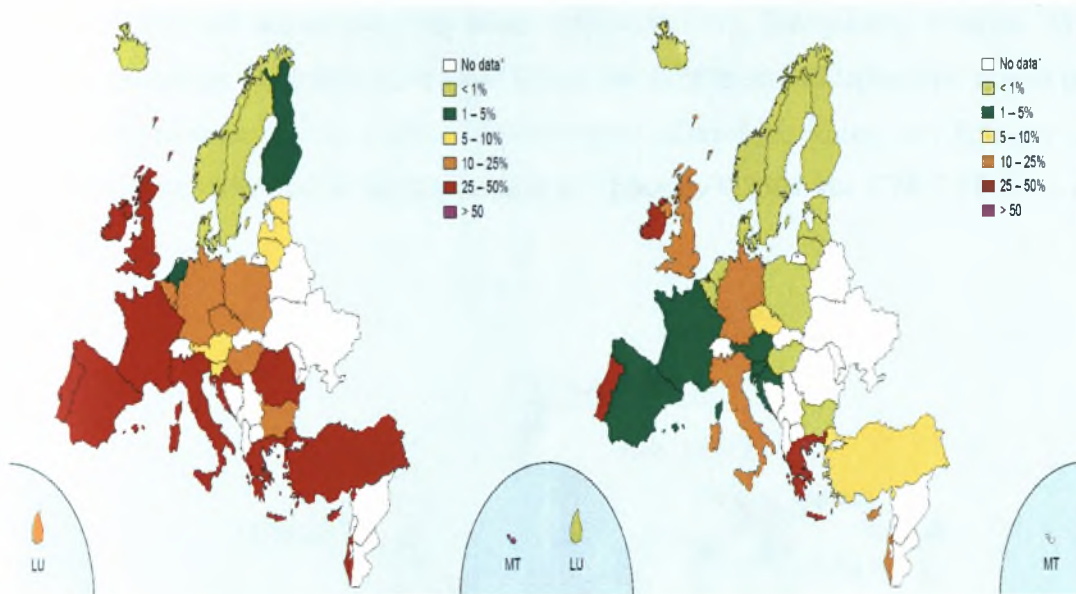
Τόσο η παρατηρούμενη κατά τις τελευταίες δεκαετίες σταδιακή αύξηση των λοιμώξεων που οφείλονται σε Gram θετικούς κόκκους, όπως οι σταφυλόκοκκοι και οι εντερόκοκκοι (Struelens *et al*, 2004) σε σχέση με τις λοιμώξεις που οφείλονται σε Gram αρνητικούς βακίλους (Εικόνα 26) όσο και η ωθούμενη από την αυξημένη χρήση αντιβιοτικών ευρέως φάσματος εξάπλωση ανθεκτικών στελεχών (Εικόνα 27), όπως MRSA και VRE οδήγησαν στη χρήση της λινεζολίδης (EARSS Annual Report 2007), η οποία αποτελεί τον πρώτο εγκεκριμένο αντιμικροβιακό παράγοντα για τη θεραπεία λοιμώξεων προκαλούμενων από MRSA και το δεύτερο για τη θεραπεία λοιμώξεων προκαλούμενων από VRE.



Εικόνα 26. Μικροοργανισμοί που προκαλούν ενδονοσοκομειακές βακτηριαμίες (Struelens *et al*, 2004).

Η λινεζολίδα διαθέτει κάποια χαρακτηριστικά που υποδεικνύουν την πιθανότητα να αποφευχθεί η εμφάνιση ανθεκτικότητας στα βακτήρια. Πρωτίστως, ο εν λόγω αντιμικροβιακός παράγοντας είναι συνθετικός, γεγονός που ελαχιστοποιεί την πιθανότητα ύπαρξης φυσικών μηχανισμών ανθεκτικότητας σαν αυτούς που υπάρχουν σε μικροοργανισμούς που είτε παράγουν αντιβιοτικά είτε συνυπάρχουν σε περιβάλλον με άλλους μικροοργανισμούς που παράγουν. Δευτερευόντως, η λινεζολίδα δεσμεύεται στο rRNA και συγκεκριμένα στη V επικράτεια του 23S rRNA της 50S ριβοσωμικής υπομονάδας, το οποίο κωδικεύεται από γονίδια (rDNA) παρόντα σε πολλαπλά αντίγραφα στους μικροοργανισμούς (πχ ο *E. faecium* και ο *S. aureus* διαθέτουν 5 ή 6 αντίγραφα). Έτσι, η ανθεκτικότητα οφειλόμενη σε μεταλλάξεις φαινόταν ότι θα ήταν δύσκολη εφόσον θα απαιτούσε μεταλλάξεις σε

περισσότερα του ενός αντίγραφα του 23S rDNA. Τέλος, οι *in vitro* μελέτες απέδειξαν ότι η επικράτηση ανθεκτικών στη λινεζολίδη στελεχών είναι δύσκολη (Meka and Gold, 2004).



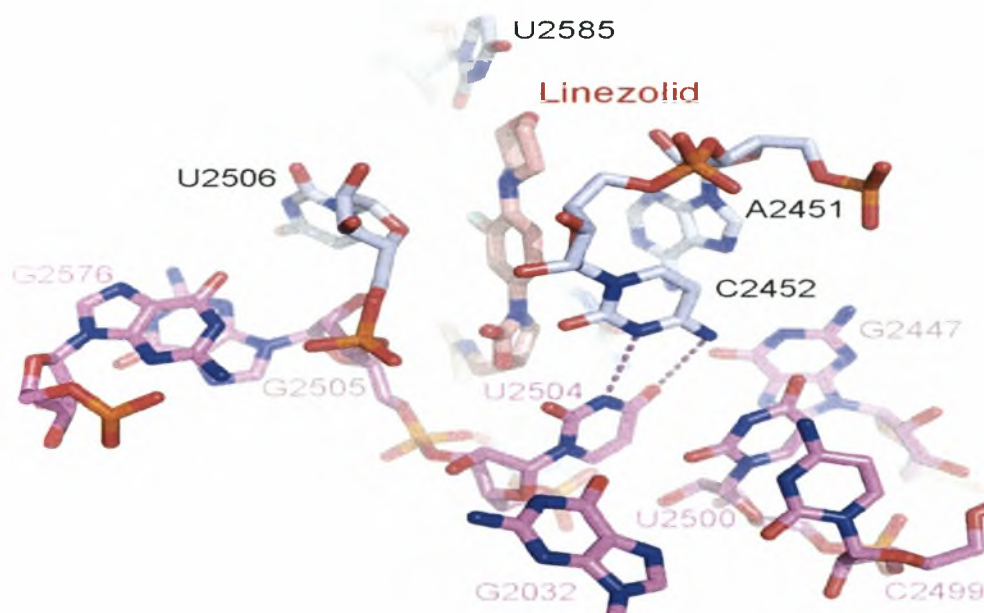
Εικόνα 27. Εξάπλωση των MRSA και VRE στελεχών αντίστοιχα στα κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης (EARSS Annual Report 2007).

Ωστόσο, η εμφάνιση ανθεκτικότητας έναντι της λινεζολίδης παρατηρήθηκε μετά από παρατεταμένη θεραπεία ή θεραπεία με μειωμένη δοσολογία του εν λόγω παράγοντα. Συγκεκριμένα τα ευρήματα πρόσφατης μελέτης αναφέρουν ότι εξετάστηκαν 98 στελέχη VRE και προέκυψε ότι το 4% αυτών ήταν ανθεκτικά έναντι της λινεζολίδης (Paterson *et al*, 2003).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι ο πιο κοινός μηχανισμός που ευθύνεται για την ανθεκτικότητα έναντι της λινεζολίδης είναι αυτός που περιλαμβάνει σημειακές μεταλλάξεις στον κεντρικό βρόγχο της V επικράτειας του 23S rRNA, εφόσον στα υπό μελέτη στελέχη αποκλείσαμε την παρουσία τόσο του γονιδίου *cfr* όσο και μεταλλάξεων στα γονίδια *grlD* και *grlV* που κωδικεύουν τις L4 και L22 ριβοσωμικές πρωτεΐνες αντίστοιχα.

Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι όλα τα νουκλεοτίδια (A2451, U2506, U2585 και A2602) που σχηματίζουν τη θέση πρόσδεσης της λινεζολίδης είναι εξαιρετικά συντηρημένα (Youngman *et al*, 2004) και έχει αποδειχθεί ότι διαδραματίζουν σημαντικό λειτουργικό ρόλο είτε στη πεπτιδυλομεταφορά είτε στην υδρόλυση του πεπτιδυλο- tRNA (Youngman *et al*, 2004; Schmeing *et al*, 2005). Παρότι, λοιπόν, η

πλειοψηφία των μεταλλάξεων που ενοχοποιούνται για την εν λόγω ανθεκτικότητα εντοπίζεται σε νουκλεοτίδια που δεν αλληλεπιδρούν άμεσα με τη λινεζολίδη, εντούτοις όλα τα κατά καιρούς ανακαλυφθέντα σημεία μεταλλάξεων αφορούν νουκλεοτίδια παρακείμενα σε τουλάχιστον ένα από τα εξαιρετικά αυτά συντηρημένα νουκλεοτίδια που απαρτίζουν τη θέση πρόσδεσης της λινεζολίδης (εικόνα 28). Συγκεκριμένα, με ελάχιστες εξαιρέσεις (όπως την G2576 που αλληλεπιδρά άμεσα με τη G2505) τα σημεία μετάλλαξης εντοπίζονται σε αζωτούχες βάσεις που βρίσκονται συμπλεγμένες γύρω από το δεσμό μεταξύ των βάσεων G2504 και C2452 (Wilson *et al*, 2008).

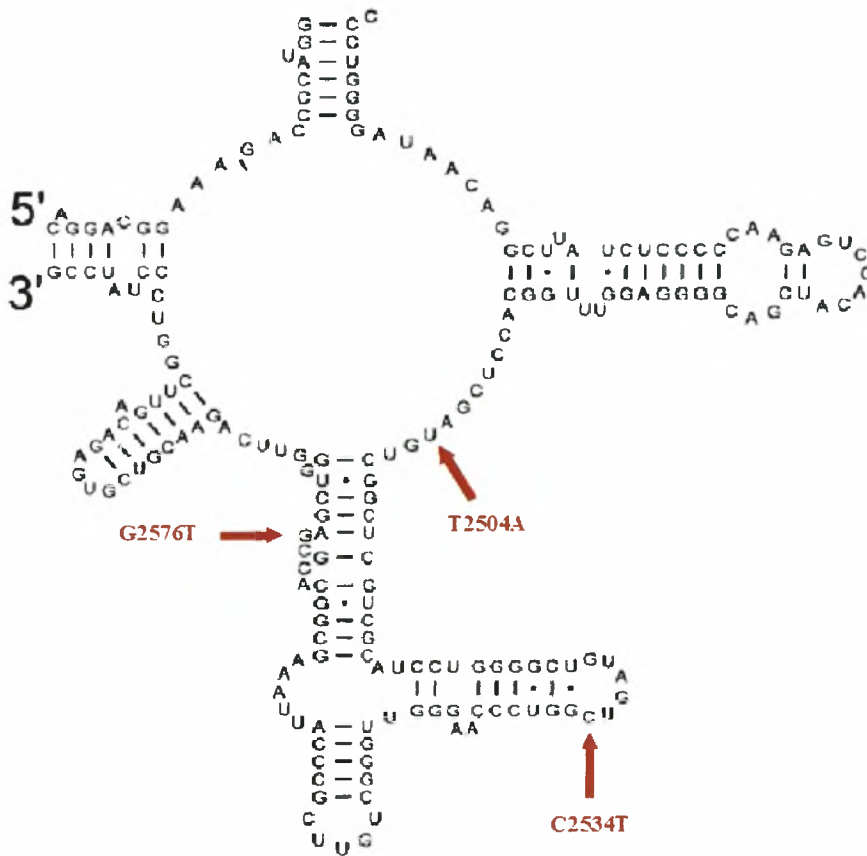


Εικόνα 28. Θέση πρόσδεσης της λινεζολίδης και απεικόνιση ενδεικτικών μεταλλάξεων που προσδίδουν ανθεκτικότητα έναντι αυτής (Wilson *et al*, 2008).

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 17, η μετάλλαξη C2534T που έχει ενοχοποιηθεί για την ανθεκτικότητα έναντι στη λινεζολίδη σε στελέχη *S. epidermidis* (Zhu *et al*, 2006; Lincoran *et al*, 2009) είναι παρούσα σε όλα τα στελέχη και είναι ικανή να παρέχει ανθεκτικότητα είτε μόνη της είτε συνεργιστικά με άλλες μεταλλάξεις της V επικράτειας του 23S rRNA (Εικόνα 29). Η υψηλή συχνότητα παρουσίας της εν λόγω μετάλλαξης πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι το συγκεκριμένο νουκλεοτίδιο δεν αποτελεί μέρος του θύλακα των εξαιρετικά συντηρημένων νουκλεοτιδίων και πιθανώς δε διαθέτει κάποιο σημαντικά λειτουργικά ρόλο κατά τη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης. Εντούτοις η μετάλλαξη στο σημείο αυτό δύναται να επιφέρει

αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωση του θύλακα, αναστέλλοντας την πρόσδεση της λινεζολίδης και την εκδήλωση ανθεκτικότητας.

Όσον αφορά τη συνηθέστερη μετάλλαξη που έχει ενοχοποιηθεί για την ανθεκτικότητα στη λινεζολίδα, την G2576T, αυτή απαντάται στα μισά εκ των μελετηθέντων στελεχών πιθανώς διότι παρά το ότι το εν λόγω νουκλεοτίδιο δεν αποτελεί μέρος του θύλακα των εξαιρετικά συντηρημένων νουκλεοτιδίων, ωστόσο αλληλεπιδρά άμεσα με τη G2505. Εξαιτίας της αλληλεπίδρασης αυτής η G2576T έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωση των νουκλεοτιδίων 2504 έως 2507 με αποτέλεσμα την απομάκρυνση της U2504 από τη θέση σύνδεσης με τη λινεζολίδα (Blaha *et al*, 2008) και την αδυναμία πρόσδεσης αυτής.



Εικόνα 29. Μεταλλάξεις στη V επικράτεια του 23S rRNA που παρουσιάζουν τα υπό μελέτη στελέχη και ευθύνονται για την εκδήλωση ανθεκτικότητας έναντι της λινεζολίδης.

Τέλος, όσον αφορά τη μετάλλαξη T2504A, την οποία φέρουν δυο εκ των μελετηθέντων στελεχών, αυτή επηρεάζει άμεσα την πρόσδεση της λινεζολίδης στη V επικράτεια του 23S rRNA εφόσον η ίδια η T2504 αλληλεπιδρά με τον δακτύλιο A

της λινεζολίδης για την πρόσδεσή της. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι ενώ η T2504C μετάλλαξη έχει ενοχοποιηθεί για την εκδήλωση ανθεκτικότητας έναντι των οξαζολιδινονών σε εργαστηριακά απομονωμένα στελέχη (Livermore *et al*, 2007) η T2504A μετάλλαξη περιγράφεται και σχετίζεται για πρώτη φορά με την εμφάνιση ανθεκτικότητας σε στελέχη και δη κλινικά απομονωμένα (Liakopoulos *et al*, 2009).

Σε όλα τα μελετηθέντα στελέχη, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 18, βρέθηκε η παρουσία των εν λόγω μεταλλάξεων σε περισσότερα από ένα αντίγραφα γεγονός που επιτελείται μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού μεταξύ των αγρίου τύπου (wt) και των μεταλλαγμένων αντιγράφων του 23S rRNA κάτω από την δημιουργούμενη από τη λινεζολίδα επιλεκτική πίεση (Marshall *et al*, 2002; Meka *et al*, 2004).

Σε προηγούμενες μελέτες αποδείχθηκε η συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των μεταλλαγμένων αυτών αντιγράφων με το επίπεδο της ανθεκτικότητας (Εικόνα 30). Συγκεκριμένα, έχει προκύψει ότι η αύξηση του αριθμού των μεταλλαγμένων αντιγράφων επιφέρει και αυξημένη ανθεκτικότητα έναντι της λινεζολίδης. (Livermore, 2003; Marshall *et al*, 2002; Meka *et al*, 2004; Pillai *et al*, 2002). Ωστόσο, στη παρούσα μελέτη εξαιτίας της συνεργιστικής δράσης των μεταλλάξεων δεν είναι δυνατό να προβούμε σε ακριβή συμπεράσματα παρότι φαίνεται να επιβεβαιώνεται το γεγονός αυτό.

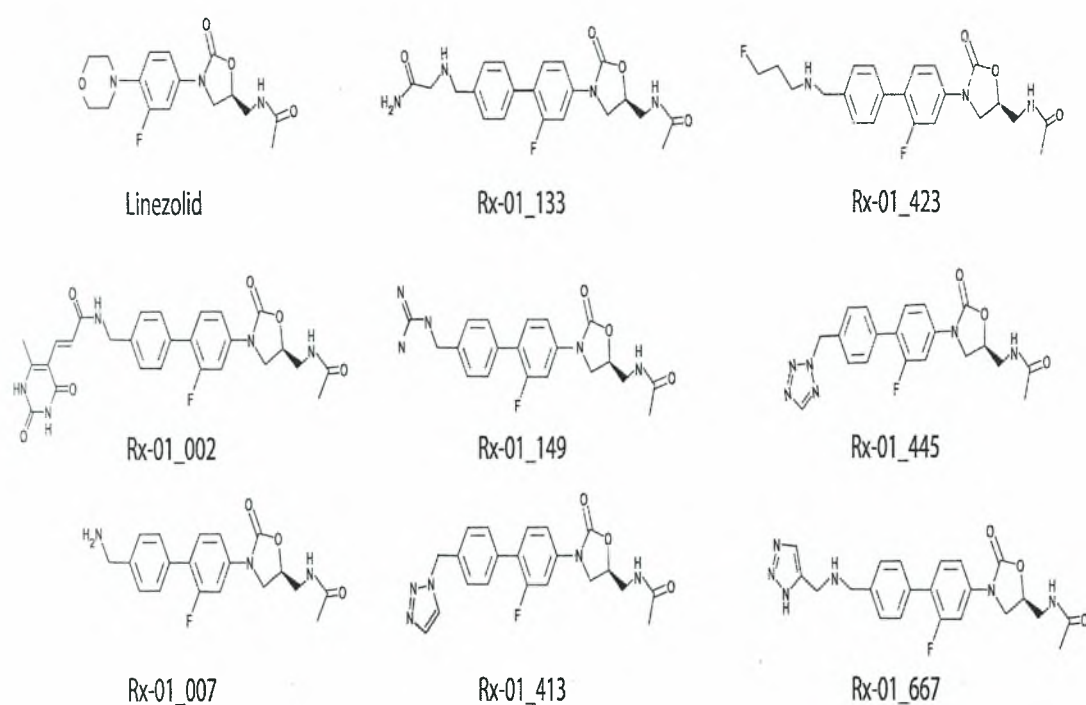
Enterococcal strain	Linezolid MIC (μg/ml)	No. of mutated genes/total no. of 23S genes (%)
<i>E. faecium</i> LS-1	2	0/6 (0)
<i>E. faecium</i> LR-6	8	1/6 (17)
<i>E. faecium</i> LR-9	16	1/6 (17)
<i>E. faecium</i> LR-1	32	2/6 (33)
<i>E. faecium</i> LR-3	32	2/6 (33)
<i>E. faecium</i> LR-5	32	2/6 (33)
<i>E. faecium</i> LR-8	32	3/6 (50)
<i>E. faecium</i> LR-7	64	4/6 (67)
<i>E. faecium</i> LR-4	64	5/6 (83)
<i>E. faecalis</i> LR-2	128	4/4 (100)

Εικόνα 30. Συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των μεταλλαγμένων αντιγράφων με το επίπεδο της ανθεκτικότητας σε στελέχη εντεροκοκκων (Marshall *et al*, 2002).

Εφόσον όλα τα στελέχη της παρούσας μελέτης προέκυψαν από κλινικά δείγματα και δεν προχωρήσαμε σε ανάλυση της πρωτοδιάταξης ολόκληρου του γονιδίου του

23S rRNA, είναι πιθανό να συνυπάρχουν κι άλλοι μηχανισμοί ανθεκτικότητας έναντι της λινεζολίδης στα εν λόγω στελέχη, παρότι δεδομένα από in vitro έρευνες υποδεικνύουν την άμεση συμμετοχή της V επικράτειας του 23S rRNA στην εκδήλωση της ανθεκτικότητας (Kloss *et al*, 1999; Prystowsky *et al*, 2001).

Συμπερασματικά, εξαιτίας της αυξανόμενης επικράτησης των πολυανθεκτικών Gram θετικών κόκκων και των σχετικά περιορισμένων θεραπευτικών επιλογών έναντι των λοιμώξεων που προκαλούν αυτοί οι μικροοργανισμοί, η διερεύνηση των μηχανισμών αντοχής της λινεζολίδης καθίσταται απαραίτητη ώστε να σχεδιαστεί η επόμενη γενιά οξαζολιδινονών.



Εικόνα 31. Χημική δομή της λινεζολίδης και των μελών της νέας Rx-01 υποοικογένειας των οξαζολιδινονών (Skripkin *et al*, 2008).

Είναι αξιοσημείωτο ότι από το συνδυασμό δομικών μελετών αναπτύχθηκε η Rx-01, μια νέα υποοικογένεια οξαζολιδινονών τα μέλη της οποίας είναι αποτελεσματικά έναντι πολυανθεκτικών στελεχών τόσο ενδονοσοκομειακά όσο και της κοινότητας (Εικόνα 31). Τα μέλη της εν λόγω υποοικογένειας είναι σχεδιασμένα αφενός να διαθέτουν αυξημένη αντιμικροβιακή δραστηριότητα σε σχέση με τη λινεζολίδα και αφετέρου να μην αναστέλλεται η δράση τους από τις ριβοσωμικές μεταλλάξεις που είναι παρούσες στα περισσότερα ανθεκτικά στη λινεζολίδα στελέχη. Τα χαρακτηριστικά τους αυτά υποδεικνύουν ότι τα συγκεκριμένα μέλη των

οξαζολιδινονών είναι εφικτό να χρησιμοποιηθούν ενάντια των ανθεκτικών στη λινεζολίδη στελεχών (Skripkin *et al*, 2008).

Βιβλιογραφία

Arias, C.A., Vallejo, M., Reyes, J., Panesso, D., Moreno, J., Castañeda, E., Villegas, M.V., Murray, B.E. and Quinn, J.P. (2008). Clinical and microbiological aspects of linezolid resistance mediated by the cfr gene encoding a 23S rRNA methyltransferase. *Journal of Clinical Microbiology* **46**(3), 892-896.

Banerjee, S.N., Emori, T.G., Culver, D.H., Gaynes, R.P., Jarvis, W.R., Horan, T., Edwards, J.R., Tolson, J., Henderson, T. and Martone, W.J. (1991). Molecular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. *The American Journal of Medicine* **91**(3B), 86S-89S

Berg, J.M., Tymoczko, J.L. and Stryer, L. (2005). Βιοχημεία. 5th ed. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

Bersos, Z., Maniati, M., Kontos, F., Petinaki, E. and Maniatis, A.N. (2004). First report of a linezolid-resistant vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain in Greece. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **53**(4), 685-686.

Blaha, G., Gurel, G., Schroeder, S.J., Moore, P.B. and Steitz, T.A. (2008). Mutations outside the anisomycin binding site can make ribosomes drug-resistant. *Journal of Molecular Biology* **379**(6), 505-519.

Bourgeois, N.N., Massias, L., Couson, B., Butel, M.J., Andremont, A. and Doucet, P.F. (2007). Dose dependence of emergence of resistance to linezolid in *Enterococcus faecalis* in vivo. *The journal of Infectious Diseases* **195**, 1480-1488.

Bouza, E. and Muñoz, P. (2001). Linezolid: pharmacokinetic characteristics and clinical studies. *Clin Microbiol infect* **7**, 75-82.

Bozdogan, B. and Appelbaum, P.C. (2004). Oxazolidinones: activity, mode of action and mechanism of resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* **23**, 113-119.

Brown, T.A. (2007). Genomes 3. 3rd ed. Garland Science Publishing.

Burghardt, H., Schimz, K.L. and Müller, M. (1998). On the target of a novel class of antibiotics, oxazolidinones, active against multidrug-resistant Gram-positive bacteria. *FEBS Letters* **425**, 40-44.

Canu, A., Malbruny, B., Coquemont, M., Davies, T.A., Appelbaum, P.C. and Leclercq, R. (2002). Diversity of ribosomal mutations conferring resistance to Macrolides, Clindamycin, Streptogramin and Telithromycin in streptococcus pneumoniae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**(1), 125-131.

Cattoir, V., Merabet, L., Legrand, P., Sousy, C.J. and Leclercq, R. (2007). Emergence of a *Streptococcus pneumoniae* isolate resistant to streptogramins by mutation in ribosomal protein L22 during pristinamycin therapy of pneumococcal pneumonia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **59**, 1010-1012.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard-seventh edition, M7-A7. CLSI: Wayne, PA 2006a.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard-ninth edition, M2-A9. CLSI: Wayne, PA 2006b.

Diekema, D.J. and Jones, R.N. (2000). Oxazolidinones: A Review. *Drugs* **59**(1), 7-16.

Diekema, D.J. and Jones, R.N. (2001). Oxazolidinone antibiotics. *The Lancet* **358**, 1975-1982.

EARSS Annual Report 2007

Franklin, T.J. and Snow, G.A. (1998). Biochemistry and Molecular Biology of Antimicrobial Drug Action. 5th ed. Kluwer Academic Publishers.

Jones, P.N., Poss, J.E., Castanheira, m. and Mendes, R.E. (2008). United States resistance surveillance results for linezolid (Leader program for 2007). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **62**, 416-426.

Kehrenberg, C. and Schwarz, S. (2006). Distribution of florfenicol resistance genes *fexA* and *cfr* among chloramphenicol-resistant staphylococcus isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**(4), 1156-1163.

Kloss, P., Xiong, L., Shinabarger, D.L. and Mankin, A.S. (1999). Resistance mutations in 23S rRNA identify the site of action of the protein synthesis inhibitor linezolid in the ribosomal peptidyl transferase center. *Journal of Molecular Biology* **294**, 93-101.

Kontos, F., Petinaki, E., Spiliopoulou, I., Maniati, M. and Maniatis, A.N. (2003). Evaluation of a novel method based on PCR Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *tuf* gene for the identification of staphylococcus species. *Journal of Microbiological Methods* **55**, 465-469.

Lewin, B. (2004). Genes VIII. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.

Liakopoulos, A., Neocleous, C., Klapsa, D., Kanellopoulou, M., Spiliopoulou, I., Mathiopoulos, K.D., Papafragas, E. and Petinaki, E. (2009). A T2504A mutation in the 23S rRNA gene responsible for high-level resistance to linezolid of staphylococcus epidermidis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **64**, 206-211.

Lin, A.H., Murray, R.W., Vidmar, T.J. and Marotti, K.R. (1997). The oxazolidinone eperezolid binds to the 50S ribosomal subunit and competes with binding of chloramphenicol and lincomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**(10), 2127-2131.

Lincopan, N., de Almeida, L.M., Elmor de Araújo, M.R. and Mamizuka, E.M. (2009). Linezolid resistance in Staphylococcus epidermidis associated with a G2603T

mutation in the 23S rRNA gene. *International Journal of Antimicrobial Agents*. In press.

Livermore, D.M. (2003). Linezolid in vitro: mechanism and antibacterial spectrum. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51**(S2), ii9-ii16.

Livermore, D.M., Warner, M., Mushtaq, S., North, S. and Woodford, N. (2007). In vitro activity of the oxazolidinone RWJ-416457 against linezolid-resistant and – susceptible staphylococci and enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**(3), 1112-1114.

Long, K.S., Poehlsgaard, J., Kehrenberg, C., Schwarz, S. and Vester, B. (2006). The cfr rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins and streptogramin A antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**(7), 2500-2505.

Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. (2005). Brock: Βιολογία των Μικροοργανισμών. 10th ed. . Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

Malbruny, B., Nagai, K., Coquemont, M., Bozdogan, B., Andrasevic, A.T., Hupkova, H., Leclercq, R. and Appelbaum, P.C. (2002). Resistance to macrolides in clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* due to ribosomal mutations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**, 935-939.

Marchese, A. and Schito, G.C. (2001). The oxazolidinones as a new family of antimicrobial agent. *Clin Microbiol infect* **7**, 66-74.

Marshall, S.A., Wilke, W.W., Pfaller, M.A. and Jones, R.N. (1998). *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular (*mec A*) characterisation of oxacillin resistance in the SCOPE program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* **30**(3), 205-214

Marshall, S.H., Donskey, C.J., Hutton-Thomas, R., Salata, A. and Rice, L.B. (2002). Gene dosage and linezolid resistance in enterococcus faecium and Enterococcus faecalis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**(10), 3334-3336.

Meka, V.G. and Gold, H.S. (2004). Antimicrobial resistance to Linezolid. *Antimicrobial Resistance* **39**, 1010-1015.

Meka, V.G., Gold, H.S., Cooke, A., Venkataraman, L., Eliopoulos, G.M., Moellering, R.C. and Jenkins, S.G. (2004). Reversion to susceptibility in a linezolid-resistant clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **54**, 818-820.

Meka, V.G., Pillai, S.K., Sakoulas, G., Wennersten, Ch., Venkataraman, L., DeGirolami, G.M., Eliopoulos, G.M., Moellering, R.C. and Gold, H.S. (2004). Linezolid resistance in sequential *Staphylococcus aureus* isolates associated with a T2500A mutation in the 23S rRNA gene and loss of a single copy of rRNA. *The journal of Infectious Diseases* **190**, 311-317.

Mendes, R.E., Deshpande, L.M., Castanheira, M., DiPersio, G., Saubolle, M.A. and Jones, R.N. (2008). First report of cfr-mediated resistance to linezolid in human Staphylococcal clinical isolates recovered in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**(6), 2244-2246.

Mullis K.B., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. and Erlich. H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51**(1), 263-273.

Page, C. et al. (2000). Φαρμακολογία. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.

Paladino, J.A. (2002). Linezolid: An oxazolidinone antimicrobial agent. *Am J Health-Syst pharm* **59**, 2413-2425.

Paterson, D.L., Harrison, L.H., Linden, P.K., Pasculle, A.W. and Muto, C.A. (2003). Susceptibility of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* (VRE) to quinupristin/dalfopristin (Q/D), linezolid (LZD) and daptomycin. *Programm and abstracts of the 43rd Interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy*. Chicago, IL, 2003.

Petinaki, E., Kanellopoulou, M., Damani, A., Foka, A., Spiliopoulou, I., Skalmoutsou, N., Raitsiou, B., Valakis, K. and Papafragas, E. (2009). Linezolid-resistant *Staphylococcus cohnii*, Greece. *Emerging Infectious Diseases* **15**(1), 116-118.

Pfaller, M.A., Jones, R.N., Doern, G.V., Kugler, K. and THE SENTRY PARTICIPANTS GROUP. (1998). Bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infection: frequencies of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program (United States and Canada, 1997). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**(7), 1762-1770

Pillai, S.K., Sakoulas, G., Wennersten, Ch., Eliopoulos, G.M., Moellering, R.C., Ferraro, M.J. and Gold, H.S. (2002). Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: Characterization and Stability of resistant phenotype. *The journal of Infectious Diseases* **186**, 1603-1607.

Pratti, A., Karanika, M., Maniatis, A.N., Petinaki, E., Spiliopoulou, I., Kolonitsiou, F., Tasiopoulos, A., Alexiou-Daniel, S., Bakola, D., Koutsia-Carousou, Ch., Malamou-Lada, L., Siafakas, N. and Zerva, L. (2007). Activity of linezolid against gram-positive cocci: a multicentre study in Greek hospitals. *International Journal of Antimicrobial Agents* **29**(5), 604-605.

Prystowsky, J., Siddiqui, F., Chosay, J., Shinabarger, D.L., Millichap, J., Peterson, L.R. and Noskin, G.A. (2001). Resistance to linezolid: characterization of mutations in rRNA and comparison of their occurrences in vancomycin-resistant *Enterococci*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**(7), 2154-2156.

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J. Higuchi R., Horn G., Mullis K.B. and Erlich. H. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

Sander, P., Belova, L., Kidan, Y.G., Pfister, P., Mankin, A.S. and Böttger E.C. (2002). Ribosomal and non-ribosomal resistance to oxazolidinones: species-specific idiosyncrasy of ribosomal alterations. *Molecular Microbiology* **46**(5), 1295-1304.

Schmeing, T., Huang, K., Strobel, S. and Steitz, T. (2005). An induced fit mechanism to promote peptide bond formation and exclude hydrolysis of peptidyl-tRNA. *Nature* **438**, 520-524.

Skripkin, E., McConnell, T.S., DeVito, J., Lawrence, L., Ippolito, J.A., Duffy, E.M., Sutcliffe, J. and Franceschi, F. (2008). Rx-01, a new family of oxazolidinone that overcome ribosome-based linezolid resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**(10), 3550-3557.

Spiliopoulou, I., Kanellopoulou, M., Damani, A., Foka, A., Chini, V., Papafragas, E., Anastassiou, E. and Petinaki, E. (2008). Emergence of linezolid-resistant staphylococci in Greece. *Proceedings of the 48th Inerscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Washington, DC, 2008.

Struelens, M.J., Devis, O. and Rodriguez-Villalobos, H. (2004). Microbiology of nosocomial infections: progress and challenges. *Microbes and Infections* **6**, 1043-1048

Thompson, J., O'Connor, M., Mills, J.A. and Dahlberg, A.E. (2002). The protein synthesis inhibitors, oxazolidinones and chloramphenicol, cause extensive translational inaccuracy in vivo. *Journal of Molecular Biology* **322**, 273-279.

Toh, S.M., Xiong, L., Arias, C.A., Villegas, M.V., Lolans, K., Quinn, J. and Mankin, A.S. (2007). Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. *Molecular Microbiology* **64** (6), 1506-1514.

Walsh, Ch. (2003). Antibiotics: actions ,origins, resistance. ASM PRESS.

Watson, D.J., Caudy, A.A, Myers, R.M. and Witkowski, J.A. (2007). Ανασυνδυασμένο DNA. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.

Wilson, D.N. and Nierhaus, K.H. (2007). The oxazolidinone class of drugs find their orientation on the ribosome. *Molecular Cell* **26**, 460-462.

Wilson, D.N., Schluenzen, F., Harms, J.M., Starosta, A., Connell, S.R. and Fucini, P. (2008). The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. *PNAS* **105**(36), 13339-13344.

Wolter, N., Smith, A.M., Farrell, D.J., Schaffner, W., Moore, M., Whitney, C.G., Jorgensen, J.H. and Klugman, K.P. (2005). Novel mechanism of resistance to oxazolidinones, macrolides, and chloramphenicol in ribosomal protein L4 of the *Pneumococcus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**(8), 3554-3557.

Woodford, N., Tysall, L., Auckland, C., Stockdale, M.W., Lawson, A.J., Walker, R.A. and Livermore, D.M. (2002). Detection of oxazolidinone-resistant *Enterococcus*

faecalis and Enterococcus faecium strains by Real-Time PCR and PCR Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* **40**(11), 4298-4300.

Youngman, E.M., Brunelle, J.L., Kochaniak, A.B. and Green, R. (2004). The site of the ribosome is composed of two layers of conserved nucleotides with distinct roles in peptide bond formation and peptide release. *Cell* **117**, 589-599.

Zhu, W., Tenover, F.C., Limor, J., Lonsway, D., Prince, D., Dunne Jr, W.M. and Patel, J.B. (2006). Use of pyrosequencing to identify point mutations in domain V of 23S rRNA genes of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **26**, 161-165.

Καραγκούνη-Κύρτσου, Α.Δ. (1999). Μικροβιολογία. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης.

Κυρίτση, Μ. (2006). Νεότερα αντιβιοτικά έναντι των Gram θετικών κόκκων: Οξαζολιδινόνες & Στρεπτογραμίνες. Msc. Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.