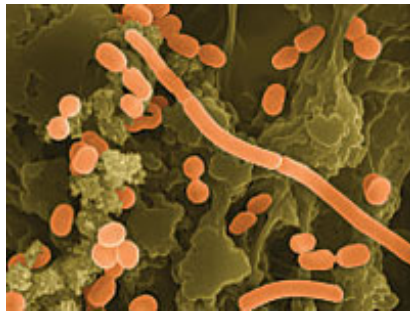


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ κ. Α. Ν. ΜΑΝΙΑΤΗΣ

---

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ  
ΠΟΛΥΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *Acinetobacter baumannii***

**ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Δ. ΟΙΚΟΝΟΜΙΔΗΣ**  
**ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΒΙΟΛΟΓΟΣ – ΓΕΝΕΤΙΣΤΗΣ**



**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2007**

**Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΑΝΤΩΝΙΟΣ ΜΑΝΙΑΤΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ Π.Θ.**

**ΣΠΥΡΟΣ ΠΟΥΡΝΑΡΑΣ, ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ Π.Θ.**

**ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΤΖΟΥΒΕΛΕΚΗΣ, ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ Ε.Κ.Π.Α.**

**Η ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΑΝΤΩΝΙΟΣ ΜΑΝΙΑΤΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ Π.Θ.**

**ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΒΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ Π.Θ.**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΥΚΟΥΛΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ Π.Θ.**

**ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΤΣΑΚΡΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ Ε.Κ.Π.Α.**

**ΣΠΥΡΟΣ ΠΟΥΡΝΑΡΑΣ, ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ Π.Θ.**

**ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΤΖΟΥΒΕΛΕΚΗΣ, ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ Ε.Κ.Π.Α.**

**ΧΡΗΣΤΟΣ ΧΑΤΖΗΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΥ, ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ Π.Θ.**

*Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας  
δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 άρθρο 202 παράγραφος 7).*

*Στη μητέρα μου και τον πατέρα μου γιατί μου καλλιέργησαν την ψυχή,  
στον κ. Σπύρο Πουρνάρα γιατί μου καλλιέργησε το πνεύμα,  
στον Κώστα και τη Μαγδαλένα γιατί μου καλλιεργούνε την καρδιά...*

# Π Ε Ρ Ι Ε Χ Ο Μ Ε Ν Α

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	8
ΜΕΡΟΣ Ι: ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ – ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ – ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	9
I.1. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ <i>Acinetobacter</i> .....	9
I.1.A. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ.....	10
I.1.B. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ <i>Acinetobacter</i> .....	11
I.1.Γ. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ.....	13
I.2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	14
I.2.A. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ.....	15
I.2.B. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ.....	17
I.3. ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	25
I.3.A. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ.....	25
I.3.B. ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΣ ΔΥΝΑΜΗ.....	32
I.3.Γ. ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ & ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ.....	36
ΜΕΡΟΣ ΙΙ: ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ.....	39
II.1. ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΠΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ: Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΕΣ.....	41
II.2. ΜΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΤΟΙΧΩΜΑΤΟΣ: ΠΟΡΙΝΕΣ.....	62
II.3. ΕΝΕΡΓΟΣ ΕΚΡΟΗ: ΑΝΤΑΙΕΣ.....	64
II.4. ΑΔΥΝΑΜΙΑ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΤΟΙΧΩΜΑ: ΠΕΝΙΚΙΛΙΝΟ-ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ.....	66
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	68
I. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	69
II. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	69
II.1. ΣΤΕΛΕΧΗ – ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ.....	69
II.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ.....	71
II.3. ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ.....	71
II.4. ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΩΝ.....	73
II.5. ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΚΑΙ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΕΙΣΔΟΧΗΣ ΜΕ PCR....	74
II.6. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ ΜΕ ΠΟΣΟΤΙΚΗ PCR.....	74
II.7. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ....	75
II.8. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΙΒΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΦΟΡΕΙΑΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ.....	75
II.9. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΕΞΩΤΕΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ.....	77
II.10. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΑΙΩΝ ΕΚΡΟΗΣ.....	77

II.11. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ AdeABC ΑΝΤΑΙΑΣ.....	78
II.12. ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΓΕΝΟΥΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ.....	78
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	81
III.1. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.....	81
III.2. ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	81
III.3. ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΓΙΑ ΤΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΦΟΡΕΙΑΣ ΜΕΤΑΛΛΟ-Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΩΝ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ.....	83
III.4. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΟΞΑΚΙΛΙΝΑΣΩΝ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΕΙΣΔΟΧΗΣ.....	87
III.5. ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΑΝ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΟ ΕΠΙΠΕΔΟ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ.....	89
III.6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ.....	91
III.7. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΙΒΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΦΟΡΕΙΑΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ.....	91
III.8. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΕΞΩΤΕΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΑΙΩΝ ΕΚΡΟΗΣ (ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ AdeABC ΑΝΤΑΙΑΣ).....	92
III.9. ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΓΕΝΟΥΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ.....	93
IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	97
V. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	103
VI. SUMMARY.....	106
ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	108



## Π Ρ Ο Λ Ο Γ Ο Σ

**T**ο είδος *Acinetobacter baumannii* είναι ένα από τα τρία ενδονοσοκομειακά παθογόνα, μαζί με τα *Pseudomonas aeruginosa* και *Klebsiella pneumoniae*, που αναπτύσσουν γρήγορα μηχανισμούς αντοχής σε διάφορες κατηγορίες αντιβιοτικών όπως τα β-λακταμικά, οι αμινογλυκοσίδες και οι κινολόνες. Οι λοιμώξεις από πολυανθεκτικά στελέχη αυτών των ειδών μπορεί να αποβούν κρίσιμες για την πορεία του ασθενή, ιδιαίτερα για τους ανοσοκατεσταλμένους νοσηλευόμενους της Μονάδας Εντατικής Θεραπείας. Ωστόσο, τέτοια στελέχη παραμένουν ακόμα ευαίσθητα σε συγκεκριμένες κατηγορίες αντιμικροβιακών παραγόντων που θεωρούνται θεραπεία τελευταίας εκλογής. Οι καρβαπενέμες, κυρίως η ιμιπενέμη και η μεροπενέμη, αποτελούν ενδονοσοκομειακή θεραπεία τελευταίας εκλογής και χορηγούνται ακόμα και εμπειρικά, όπως για παράδειγμα σε βαριά περιστατικά νοσοκομειακής πνευμονίας οφειλούμενη σε *A. baumannii*. Η υπέρμετρη όμως χρήση τους σε συνδυασμό με τα ανύπαρκτα, πολλές φορές, μέτρα υγιεινής φαίνεται να έχουν προκαλέσει την όλο και πιο συχνή απομόνωση ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών Gram αρνητικών βακτηριδίων και κατεξοχήν στελεχών *A. baumannii*.

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών αντοχής ενός σημαντικού ενδονοσοκομειακού παθογόνου, του *A. baumannii*, σε μία κατηγορία αντιμικροβιακών παραγόντων, των καρβαπενεμών, που ιδιαίτερα για τη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας παραμένει ακόμα θεραπεία εκλογής για την αντιμετώπιση της πλειοψηφίας των περιστατικών των λοιμώξεων από αυτό το είδος. Ιδιαίτερη σημασία δόθηκε στη συλλογή στελεχών από απομακρυσμένα μεταξύ τους νοσοκομεία ώστε να μελετηθούν όσο το δυνατόν περισσότεροι γονότυποι και τα εξαγόμενα αποτελέσματα να είναι πιο αντιπροσωπευτικά για το είδος. Συνολικά, θεωρώ

πως ο πρωταρχικός στόχος της μελέτης αυτής εκπληρώθηκε και μπορούμε πλέον με ασφάλεια να υποθέσουμε πως η υψηλή αντοχή του *A. baumannii* στις καρβαπενέμες έχει πολυπαραγοντική αιτιολογία και πως οι άλλοτε θεωρούμενες ως υπεύθυνες για αυτό, τύπου VIM μεταλλο-β-λακταμάσες συμβάλλουν μόνο σε μικρό ποσοστό.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω να εκφράσω στον κ. Αντώνιο Μανιάτη, Καθηγητή Μικροβιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στον κ. Σπύρο Πουρνάρα, Επικ. Καθηγητή Μικροβιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και στον κ. Λεωνίδα Τζουβελέκη, Επικ. Καθηγητή Μικροβιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών για τις επισημάνσεις τους κατά τη συγγραφή αυτής της μελέτης. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον κ. Πουρνάρα και τον κ. Αθανάσιο Τσακρή, Καθηγητή Μικροβιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, για τη σημαντική συμβολή τους στη διεξαγωγή της έρευνας αυτής και την υπομονή που έδειξαν στη καθοδήγηση των ερευνητικών μου δραστηριοτήτων. Ευχαριστώ επίσης τον κ. Νικόλαο Βαμβακόπουλο και τον κ. Γεώργιο Κουκούλη, Καθηγητές του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας όπως και τον κ. Χρήστο Χατζηχριστοδούλου, Επικ. Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, που με χαρά δέχθηκαν να συμμετέχουν στην επταμελή επιτροπή. Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα όλους εκείνους που με στήριξαν με την υπομονή τους και την αγάπη τους κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου.

*Λάρισα, 2007*

*Οικονομίδης Δ. Αλέξανδρος  
Μοριακός Βιολόγος - Γενετιστής*

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



**ΜΕΡΟΣ Ι****ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ – ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ – ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ****I.1. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *Acinetobacter*****ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Ο έλεγχος των νοσοκομειακών λοιμώξεων που προκαλούνται από Gram αρνητικά βακτήρια απασχολεί τα τελευταία τριάντα χρόνια όλες τις ανεπτυγμένες χώρες. Μετά την εισαγωγή νέων, ευρέως φάσματος αντιβιοτικών για την αντιμετώπιση ανθεκτικών κλινικών στελεχών του γένους *Enterobacteriaceae* κατά τη δεκαετία του '70, καινούργια αερόβια Gram αρνητικά παθογόνα διαδραμάτισαν καίριο ρόλο στο προσκήνιο της ενδονοσοκομειακής μικροβιακής αντοχής. Ανάμεσα σε αυτά, σημαντικότερα είναι τα είδη *Pseudomonas aeruginosa* και *Acinetobacter baumannii*.

Ιδιαίτερα το γένος *Acinetobacter* πρωταγωνιστεί στον αποικισμό και στις λοιμώξεις των νοσηλεύομενων στα νοσοκομεία. Είδη του γένους αυτού ενοχοποιούνται για ένα εύρος νοσοκομειακών λοιμώξεων όπως βακτηριαιμία, ουρολοίμωξη και δευτερογενής μηνιγγίτιδα. Κυρίαρχο ωστόσο ρόλο το γένος αυτό διαδραματίζει στη νοσοκομειακή πνευμονία και κυρίως στον τύπο που σχετίζεται με την παρουσία αναπνευστήρων ιδιαίτερα στους ασθενείς των μονάδων εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ). Τέτοιου είδους λοιμώξεις είναι συχνά εξαιρετικά δύσκολες στη θεραπευτική τους αντιμετώπιση λόγω του ότι τα μικροβιακά στελέχη που εμπλέκονται εμφανίζουν πολυανθεκτικό φαινότυπο αντοχής στις κυριότερες κατηγορίες των αντιβιοτικών. Οι μοριακοί μηχανισμοί στους οποίους έχει αποδοθεί αυτή η πολυαντοχή είναι ποικίλοι και συνήθως απαιτείται συνδυασμός θεραπευτικών παραγόντων για την επιτυχή αντιμετώπιση των νοσοκομειακών λοιμώξεων που προκαλούν τα στελέχη αυτά. Το γεγονός αυτό επιβαρύνεται ακόμα περισσότερο από το ότι τα μικρόβια αυτά μπορούν να επιβιώσουν για μεγάλο διάστημα στο νοσοκομειακό περιβάλλον και έχουν τη δυνατότητα διασποράς τόσο μέσω του ανθρώπινου δυναμικού όσο και των νοσοκομειακών υλικών. Παρόλο που έχουν περιγραφεί ορισμένα περιστατικά λοιμώξεων από στελέχη *Acinetobacter* της κοινότητας, το γένος αυτό θεωρείται ευκαιριακό παθογόνο του νοσοκομειακού περιβάλλοντος.

### I.1.A. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Παρά τη διαρκώς αυξανόμενη συχνότητα των λοιμώξεων από πολυανθεκτικά στελέχη *Acinetobacter*, πολλοί κλινικοί ιατροί αγνοούσαν παλαιότερα το ρόλο αυτών των μικροοργανισμών, εν μέρει λόγω της σύγχυσης που επικρατούσε στη ταξινόμησή τους. Νέες μοριακές τεχνικές ταυτοποίησης και τυποποίησης αυτού του είδους, που περιγράφονται παρακάτω, εξυπηρετούν άμεσα την επιδημιολογική μελέτη στελεχών *Acinetobacter* σε περιπτώσεις εξάρσεων νοσοκομειακών λοιμώξεων.

Όσον αφορά στην ταξινόμηση του μικροβίου, αρχικά το γένος *Acinetobacter* περιλάμβανε έναν ετερογενή πληθυσμό Gram αρνητικών, ακίνητων, οξειδάση θετικών και οξειδάση αρνητικών σαπρόφυτων που ξεχώριζαν από τα άλλα μικρόβια από την αδυναμία χρώσης τους. Εκτενείς μελέτες επί των τροφικών τους απαιτήσεων έδειξαν ότι τα οξειδάση αρνητικά στελέχη διέφεραν από τα οξειδάση θετικά. Το 1971, η επιτροπή ταξινόμησης των *Moraxella* και σχετικών με αυτές βακτηρίων (Subcommittee on the Taxonomy of *Moraxella* and Allied Bacteria) πρότεινε ότι το γένος *Acinetobacter* αποτελείται αποκλειστικά από οξειδάση αρνητικά στελέχη (Lessel, 1971). Μερικά από τα Gram αρνητικά, αζυμωτικά βακτήρια που τώρα ανήκουν στο γένος αυτό είχαν παλαιότερα ονομασίες όπως *Bacterium anitratum*, *Herellea vaginicola* και *Mima polymorpha*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Micrococcus calcoaceticus* και “B5W”, *Moraxella glucidolytica* και *Moraxella lwoffii*.

Σήμερα, το γένος *Acinetobacter* ορίζεται ως το σύνολο των Gram αρνητικών κοκκοβακτηριδίων με αναλογία βάσεων G-C στο γένωμά τους 39 – 47 % (Bergogne-Berezin *et al*, 1996). Είναι αυστηρά αερόβια, ακίνητα, καταλάση θετικά και οξειδάση αρνητικά κοκκοβακτηρίδια που αναπτύσσονται κανονικά σε σύνθετα θρεπτικά υλικά και σε θερμοκρασία μεταξύ 20° και 30°C χωρίς την ανάγκη ειδικών αναπτυξιακών παραγόντων, ενώ ανάγουν σπάνια τα νιτρικά. Τα περισσότερα στελέχη *Acinetobacter* μπορούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υλικό που περιέχει αμμώνιο ή νιτρικά άλατα ως πηγή αζώτου και οξικό ή γαλακτικό ή πυροσταφυλικό οξύ ως πηγή άνθρακα.

Το *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* ταξινόμησε το γένος *Acinetobacter* στην οικογένεια *Neisseriaceae* με μοναδικό είδος το *Acinetobacter calcoaceticus*. Αυτό το είδος έχει πολλές φορές υποκατηγοριοποιηθεί στη διεθνή βιβλιογραφία σε δύο υποείδη, το *anitratum* (παλαιότερα *H. vaginicola*) και το *lwoffii* (παλιότερα *M. polymorpha*). Ωστόσο αυτή η υποκατηγοριοποίηση δεν υιοθετήθηκε ποτέ επίσημα από τους ταξινομητές. Πρόσφατα δεδομένα ορίζουν ότι κάποια μέλη του

γένους πρέπει να ταξινομηθούν στην νέα οικογένεια *Moraxellaceae* που περιλαμβάνει τα γένη *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* και τους σχετιζόμενους με αυτά οργανισμούς (Rossau *et al*, 1991) ενώ δημιουργεί ξεχωριστό κλάδο στην υπεριοικογένεια II των *Proteobacteria*, βάσει μελετών του 16SrRNA και πειραμάτων υβριδισμού rRNA-DNA.

### I.1.B. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ *Acinetobacter*

Παραδοσιακά, ή έννοια “μικροβιακό είδος” καθόριζε το σύνολο των στελεχών ενός μικροοργανισμού με κοινά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Ωστόσο σήμερα, η δυνατότητα χαρτογράφησης του γενετικού υλικού των μικροοργανισμών με μοριακές μεθόδους παρέχει πιο αξιόπιστα και αντικειμενικά δεδομένα ταξινόμησης των μικροβίων. Επίσημως έχει διατυπωθεί ότι ως μικροβιακό είδος ορίζεται το σύνολο των στελεχών με τουλάχιστον 70% DNA-DNA ομολογία και με μέγιστη διαφορά 5 °C στη θερμοκρασία αποδιάταξης του DNA ( $T_m$ ) (Wayne *et al*, 1987). Τα γενωμικά είδη που προκύπτουν από αυτά τα μοριακά δεδομένα και που έχουν διαφορετικές φαινοτυπικές ιδιότητες μεταξύ τους, πληρούν τις προϋποθέσεις ώστε να αποκτήσουν επίσημα διαφορετικές ονομασίες.

Παρόλο που πειράματα υβριδισμού DNA είχαν αποδείξει από νωρίς την ετερογένεια του γένους *Acinetobacter* (Johnson *et al*, 1970) μόνο τα είδη *A. calcoaceticus* και *A. lwoffii* είχαν συμπεριληφθεί στον επίσημο κατάλογο των μικροβιακών ονομάτων (*Approved Lists of Bacterial Names*) και μόνο ένα είδος είχε περιγραφεί στο *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Ήδη μέχρι το τέλος της δεκαετίας του 1990, με βάση δεδομένα συσχέτισης του DNA που αναφέρθηκαν προηγουμένως, είχαν αναγνωριστεί 19 ομάδες (γενωμικά είδη) με επαρκή DNA-DNA ομολογία, εάν και μεταξύ των διαφορετικών εργαστηρίων δεν είχε καθιερωθεί ακόμα μία ενιαία αρίθμηση αυτών των ειδών. Σε επτά από τα γενωμικά είδη είχαν αποδοθεί επίσημες ονομασίες. Οι ομάδες 1, 2, 3 και 13TU (*13 sensu Tjernberg and Ursing*) έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται στενά και αναφέρονται από μερικά εργαστήρια ως σύμπλεγμα *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* (Gerner-Smidt *et al*, 1991). Παρολαυτά, μία γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδος κατάταξης νέων στελεχών στις ομάδες αυτές παραμένει ακόμα αναγκαία.

Όνομασία	Ταξινόμηση σύμφωνα με:			Πρότυπο Στέλεχος
	Bouvet <i>et al</i> , 1989	Tjernberg <i>et al</i> , 1989	Nishimura <i>et al</i> , 1988	
<i>A. calcoaceticus</i>	1	1	1N	ATCC 23055
<i>A. baumannii</i>	2	2	1N	CIP 70.34
AN	3	3	MM	ATCC 19004
AN	MK	13TU	MM	ATCC 17903
<i>A. haemolyticus</i>	4	4	4N	ATCC 17906
<i>A. junii</i>	5	5	MM	ATCC 17908
AN	6	6	4N	ATCC 17979
<i>A. johnsonii</i>	7	7	3N	ATCC 17909
<i>A. lwoffii</i>	8	8TU	2N	ATCC 15309
AN	9	8TU	MM	ATCC 9957
AN	10	10	MK	ATCC 17924
AN	11	11	MK	ATCC 11171
<i>A. radioresistens</i>	(12)*	12	5N	IAM 13186
AN	13	14TU	MM	ATCC 17905
AN	14	MM	MM	Bouvet 382
AN	15	MM	MM	Bouvet 240
AN	16	MK	MM	ATCC 17988
AN	17	MM	MM	Bouvet 942
AN	MM	15TU	MM	Tjernberg 151a

AN: Ανώνυμο, MM: Μη Μελετημένο, MK: Μη Κατηγοριοποιημένο, \*μη δημοσιευμένο δεδομένο

### Πίνακας 1: Διάκριση των γενωμικών ειδών *Acinetobacter* (Bergogne-Berezin *et al*, 1996).

Πολλές μελέτες υποστηρίζουν την αρχική παρατήρηση (Bouvet *et al*, 1987) ότι το είδος *A. baumannii* ευθύνεται κυρίως για τις νοσοκομειακές λοιμώξεις του γένους. Μία αντιπροσωπευτική μελέτη περιέλαβε 584 στελέχη *Acinetobacter* που είχαν απομονωθεί από 420 ασθενείς σε 12 διαφορετικά νοσοκομεία και σε χρονικό διάστημα 12 μηνών (Seifert *et al*, 1993). Από αυτά τα στελέχη, τα 426 (72.9%) ήταν *A. baumannii* εκ των οποίων τα 208 είχαν απομονωθεί από το αναπνευστικό, τα 113 από το αίμα και κεντρικούς φλεβικούς καθετήρες, τα 70 από τραύματα και τα υπόλοιπα 35 από διάφορες άλλες πηγές. Αυτή η μελέτη αναγνώρισε επίσης 158 στελέχη που ανήκαν σε άλλα είδη *Acinetobacter* όπως το γενωμικό είδος 3 (55 στελέχη), το *A. johnsonii* (29 στελέχη) και το *A. lwoffii* (21 στελέχη).

Για να καθοριστεί ο ρόλος και η κλινική σημασία των άλλων ειδών *Acinetobacter* χρειάζονται περαιτέρω μελέτες. Τα είδη αυτά όταν απομονώνονται από κλινικά δείγματα θεωρούνται συνήθως επιμολύνσεις από το περιβάλλον. Συνεπώς η διάγνωση μιας λοίμωξης από σπάνιο είδος *Acinetobacter* στηρίζεται κατά κύριο λόγο

στη κλινική συμπτωματολογία και την επαναλαμβανόμενη απομόνωση του συγκεκριμένου στελέχους από τον ασθενή. Τα γενωμικά είδη 3 και 13TU έχουν συσχετιστεί με νοσοκομειακές λοιμώξεις ενώ το *A. johnsonii* έχει ενοχοποιηθεί για βακτηριαμία προερχόμενη από καθετηριασμό. Μια μελέτη από τη Σουηδία έδειξε ότι το γενωμικό είδος 3 κυριαρχούσε μεταξύ των κλινικών στελεχών (**Tjernberg et al, 1989**).

Είναι σημαντικό να τονισθεί η στενή σχέση ανάμεσα στα γενωμικά είδη 1 (*A. calcoaceticus*), 2 (*A. baumannii*), 3 και 13TU. Το σύμπλεγμα *A. calcoaceticus* – *A. baumannii*, όπως συνήθως αναφέρεται, περιλαμβάνει στελέχη που οξειδώνουν τη γλυκόζη και αναφέρεται σε αρκετές σύγχρονες αναφορές ως υποείδος *anitratum* του είδους *A. calcoaceticus*. Μελέτες έδειξαν ότι αυτοί οι οργανισμοί, αρχικά με τις ονομασίες *M. polymorpha* και *H. vaginicola*, ανήκουν στη χλωρίδα του δέρματος του ανθρώπου (**Taplin et al, 1963**). Η πλειοψηφία των γλυκόζη αρνητικών, μη αιμολυτικών στελεχών που ανευρίσκονται σε κλινικά δείγματα αναγνωρίζονται κυρίως ως *A. lwoffii*, *A. johnsonii* και γενωμικό είδος 12 του γένους *Acinetobacter*, τα οποία φαίνεται επίσης να αποικίζουν φυσικά το δέρμα του ανθρώπου. Τα πιο αιμολυτικά στελέχη είναι τα *A. haemolyticus* και το γενωμικό είδος 6. Τα υπόλοιπα είδη σχετίζονται μόνο περιστασιακά με τις ανθρώπινες λοιμώξεις. Συμπερασματικά, εάν και το *A. baumannii* φαίνεται να είναι το επικρατέστερο είδος *Acinetobacter* αναφορικά με τις ανθρώπινες λοιμώξεις, η επαναλαμβανόμενη απομόνωση άλλων γενωμικών ειδών (κυρίως αυτών που ανήκουν στο σύμπλεγμα *A. calcoaceticus* – *A. baumannii*) από τον ίδιο ασθενή, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη από τον κλινικό ιατρό ως πιθανό αίτιο υποκείμενης λοίμωξης, ιδιαίτερα όταν συνυπάρχουν κλινικά συμπτώματα.

### 1.1.Γ. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Τα *Acinetobacter* είναι βραχέα, στρογγυλά, Gram αρνητικά κοκκοβακτηρίδια, με ποικίλη συμπεριφορά στη Gram χρώση. Στη λογαριθμική φάση της ανάπτυξής τους κυριαρχούν οι βακτηριοειδείς μορφές με μέγεθος 1.0-1.5 x 1.5-2.5 μm, ενώ στη στατική φάση οι κοκκώδεις (**Bergogne-Berezin et al, 1996**). Στις καθαρές καλλιέργειες είναι εμφανής η ανωτέρω ποικιλομορφία τόσο ως προς τη χρώση Gram και το κυτταρικό μέγεθος αλλά και ως προς τη διάταξη των μικροβιακών κυττάρων. Τα είδη *Acinetobacter* συνήθως σχηματίζουν λείες, σπάνια βλενώδεις, υποκίτρινες έως γκριζόλευκες αποικίες σε στερεά θρεπτικά υλικά, αν και υπάρχουν μερικά

περιβαλλοντικά στελέχη που παράγουν μια διαχεόμενη καφέ χρωστική (**Pagel et al, 1976**). Οι αποικίες είναι συγκρίσιμες σε μέγεθος με αυτές των εντεροβακτηριακών. Όλα τα μέλη του γένους είναι αυστηρά αερόβια, οξειδάση αρνητικά, καταλάση θετικά και αζυμωτικά. Η δοκιμασία οξειδάσης είναι αυτή που μπορεί να διαχωρίσει τα είδη *Acinetobacter* από άλλα παρόμοια αζυμωτικά βακτήρια. Τα περισσότερα στελέχη του γένους *Acinetobacter* δεν είναι ικανά να ανάγουν τα νιτρικά άλατα σε νιτρώδη με την κλασική αναγωγική οδό. Μερικά κλινικά είδη, ειδικά το γενωμικό είδος 4 (*A. haemolyticus*), μπορούν να προκαλέσουν αιμόλυση σε αιματούχο άγαρ εμπλουτισμένο με αίμα προβάτου. Επίσης, εάν και περιστασιακά έχουν απομονωθεί στελέχη που έχουν αυξημένες απαιτήσεις σε αναπτυξιακούς παράγοντες, τα περισσότερα στελέχη μπορούν να αναπτυχθούν σε απλά αλατούχα θρεπτικά υλικά με μία μόνο πηγή άνθρακα. Ένα ευρύ φάσμα οργανικών ενώσεων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή άνθρακα αλλά λίγα στελέχη μπορούν να μεταβολίσουν τη γλυκόζη. Ωστόσο, η βιοχημική διάκριση του γένους απαιτεί παραπάνω από μία δοκιμασία.

## 1.2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα *Acinetobacter* μπορούν να αναπτυχθούν εύκολα σε κοινά εργαστηριακά θρεπτικά υλικά. Τα κλινικά στελέχη που ανήκουν κυρίως στο γενωμικό είδος 2 (*A. baumannii*), 3 και 13TU αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 37 °C ή μεγαλύτερη ενώ κάποια άλλα είδη αναπτύσσονται μόνο σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Γενικά έχει προταθεί η θερμοκρασία των 30 °C αλλά χαμηλότερη τιμή ή συνδυασμός τιμών μπορεί να είναι απαραίτητος ανάλογα με το είδος και την προέλευση του δείγματος. Για την άμεση απομόνωση του γένους από κλινικά δείγματα είναι σκόπιμη η χρήση εκλεκτικών υλικών που αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών. Ένα πρόσφατα χαρακτηρισμένο εκλεκτικό θρεπτικό μέσο, το LAM, είναι κατάλληλο για την απομόνωση των περισσότερων ειδών *Acinetobacter* τόσο από κλινικές όσο και από περιβαλλοντικές πηγές. Το υλικό αυτό είναι εκλεκτικό λόγω της παρουσίας αντιβιοτικών (η σύστασή του και η περιεκτικότητά του σε αντιβιοτικά φαίνεται στον Πίνακα 2).

Για τη ταυτοποίηση των *Acinetobacter*, οι φαινοτυπικές δοκιμασίες δεν είναι πάντοτε αξιόπιστες και για το λόγο αυτό είναι απαραίτητο στις μελέτες να αναφέρεται η μέθοδος ταυτοποίησης. Συνεπώς οι φαινοτυπικές δοκιμασίες θα πρέπει να συμπληρώνονται με νέες μοριακές τεχνικές, πέρα από τις κλασσικές μεθόδους υβριδισμού του DNA. Μελέτες ριβοτυπίας, όπως αναφέρεται παρακάτω, σε στελέχη που ανήκουν στο σύμπλεγμα *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* δείχνουν ότι η μέθοδος αυτή μπορεί να διακρίνει επαρκώς τα σχετιζόμενα με αυτό γενωμικά είδη. Παρομοίως, ανάλυση με 5 περιοριστικά ένζυμα των προϊόντων των γονιδίων που κωδικοποιούν το 16S rRNA μετά από πολλαπλασιασμό με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (**PCR – Polymerase Chain Reaction**) φαίνεται να μπορεί να διακρίνει τα περισσότερα γενωμικά είδη συμπεριλαμβανομένων των ειδών 1, 2, 3 και 13TU.

## 1.2.A. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ

Τα επικρατέστερα στην κλινική πράξη είδη του γένους *Acinetobacter* απομονώνονται ευχερώς στα συνήθη θρεπτικά μέσα. Επιπρόσθετα έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα εκλεκτικά θρεπτικά υλικά. Το πρώτο υλικό που χρησιμοποιήθηκε περιγράφηκε το 1964 (**Mandel et al, 1964**) μετά από προσπάθεια απομόνωσης οργανισμών του γένους *Mima* και *Herellea* σε ουρηθρικά και κολπικά δείγματα ασθενών που έπασχαν από γονόρροια και οι καλλιέργειές τους ήταν μεικτές λόγω της παρουσίας διάφορων κόκκων και βακίλων (ιδιαίτερα της οικογένειας *Enterobacteriaceae*). Το καλλιεργητικό αυτό υλικό μετά την αντικατάσταση της σουκρόζης με μαλτόζη καθιερώθηκε με την ονομασία *Herella agar*. Η εκλεκτική του συμπεριφορά στηρίζεται στην ανασταλτική δράση των χολικών αλάτων για τα Gram θετικά βακτήρια, τη ζυμωτική δραστηριότητα των εντεροβακτηριακών και την αδυναμία ζύμωσης των σακχάρων του γένους *Mima* και *Herellea*. Μετά από επώαση 24 ωρών στους 37 °C οι αποικίες έχουν ένα ωχρό χρώμα λεβάντας και είναι πιο βλενώδεις από τις αντίστοιχες αποικίες στα συνήθη θρεπτικά υλικά ή το αιματούχο άγαρ. Επίσης, όλες οι αποικίες που παράγουν οξέα εμφανίζονται κίτρινες και τις περιβάλλει μία άλω ιδίου χρώματος. Στο ανωτέρω θρεπτικό υλικό αναστέλλεται η ανάπτυξη των κόκκων αλλά αναπτύσσονται αποικίες του γένους *Pseudomonas* και *Proteus*, οι οποίες δεν παράγουν οξέα. Ωστόσο, οι αποικίες των ψευδομονάδων μπορούν εύκολα να ταυτοποιηθούν λόγω του γκριζοπράσινου χρώματός τους και της διαχεόμενης στο θρεπτικό μέσο χρωστικής. Επίσης, η προσθήκη 5 g/l φαινυλαλανίνης και 0.5 g/l  $C_6H_8O_7 \cdot nFe \cdot nH_3N$  καθιστά τις αποικίες του γένους *Proteus*

καφέ με μία περιβάλλουσα καφέ άλω. Το 1983 (**Holton, 1983**) το παραπάνω θρεπτικό υλικό τροποποιήθηκε στη βασική του θρεπτική σύσταση και ενισχύθηκε με τη προσθήκη αντιβιοτικών έναντι τόσο Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων όσο και μυκήτων. Το Holton's agar όπως ονομάστηκε από τον ομώνυμο ερευνητή, περιείχε αποξηραμένη χολή αντί των χολικών αλάτων και αντί της λακτόζης και το κυανού της βρωμοκρεσόλης περιείχε φρουκτόζη, μαννιτόλη, φαινυλαλανίνη και ερυθρό της φαινόλης. Τα αντιβιοτικά που περιείχε ήταν αμπικιλίνη, βανκομυκίνη και κεφσουλοδίνη. Έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλα θρεπτικά υλικά με μικρότερο όμως φάσμα ανάπτυξης βακτηρίων (**Grehn et al, 1978**).

Herellea agar		Holton's agar		LAM	
Άγαρ	16g	Άγαρ	10g	Άγαρ	10g
Καζαμινοξέα	15g	Καζαμινοξέα	15g	Καζαμινοξέα	15g
Πεπτόνη	5g	Πεπτόνη	5g	Πεπτόνη	5g
NaCl	5g	NaCl	5g	NaCl	5g
Λακτόζη	10g	Αποξηραμένη χολή	1.5g	Φρουκτόζη	5g
Μαλτόζη	10g	Φρουκτόζη	5g	Μαννιτόλη	5g
Χολικά άλατα	1.25g	Σουκρόζη	5g	Φαινυλαλανίνη	1g
Κυανό της βρωμοκρεσόλης	0.02g	Μαννιτόλη	5g	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> .nFe.nH <sub>3</sub> N	0.4g
		Φαινυλαλανίνη	10g	Κόκκινο της φαινόλης	0.02g
		Κόκκινο της φαινόλης	0.02g	Ρύθμιση pH 7.0 και αποστείρωση. Μετά την ψύξη του υλικού (50°C) προσθήκη των εξής αντιβιοτικών:	
		Ρύθμιση pH 7.0 και αποστείρωση. Μετά την ψύξη του υλικού (50°C) προσθήκη των εξής αντιβιοτικών:			
		Βανκομυκίνη	0.01g		Βανκομυκίνη
		Αμπικιλίνη	0.016g	Κεφσουλοδίνη	0.015g
		Κεφσουλοδίνη	0.03g	Κεφραδίνη	0.05g

**Πίνακας 2:** Σύνθεση των κυριότερων εκλεκτικών θρεπτικών υλικών που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση των ειδών του *Acinetobacter*. Η ποσότητα των συστατικών σε γραμμάρια (g) αντιστοιχεί σε τελικό όγκο ενός λίτρου απιονισμένου νερού.

Το 1994 (**Jawad et al, 1994**) έγινε προσπάθεια παρασκευής ενός εκλεκτικού θρεπτικού υλικού, ιδιαίτερα ευνοϊκού για τα γενωμικά είδη 1, 2, 3 και 13 του γένους *Acinetobacter* αλλά κατασταλτικού για τα λοιπά βακτήρια. Ιδιαίτερη σημασία δόθηκε



στη συγκέντρωση των αντιβιοτικών που καθορίστηκε με βάση την ελάχιστη ανασταλτική τους συγκέντρωση (**MIC** – **Minimal Inhibitory Concentration**) σε πλήθος 134 στελεχών *Acinetobacter* ώστε να επιτρέπουν την ανάπτυξή τους και όχι την αναστολή τους. Επίσης αποκλείστηκε η χρήση των χολικών αλάτων λόγω της πιθανολογούμενης αντιμικροβιακής τους δραστηριότητας αλλά και επειδή τα ήδη χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά αρκούσαν για να αναστείλουν την ανάπτυξη των ανεπιθύμητων μικροβιακών ειδών. Το νέο υλικό με την ονομασία **LAM** (**Leeds Acinetobacter Medium**) συγκρίθηκε με τα προηγούμενα δύο ως προς την εκλεκτικότητά του σε κλινικά και περιβαλλοντικά στελέχη *Acinetobacter*. Συγκεκριμένα, το LAM επιτρέπει την ανάπτυξη περισσότερων στελεχών από το Herellea και το Holton's agar και η διάκριση των άλλων οξειδάση αρνητικών μικροβίων που αναπτύσσονται σε αυτό το μέσο γίνεται εύκολα από την αλλαγή του χρώματος του θρεπτικού υλικού και τη μορφολογία των αποικιών τους. Επίσης, κλινικά στελέχη *Acinetobacter* αναπτύσσονται καλύτερα από περιβαλλοντικά εκτός των *A. johnsonii* και *A. haemolyticus* τα οποία όμως σπανίως απομονώνονται από κλινικά δείγματα.

## 1.2.B. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

Τα περισσότερα εργαστήρια βασίζονται σε αυτοματοποιημένες ή ημιαυτοποιημένες φαινοτυπικές μεθόδους που χρησιμοποιούν τα διάφορα εμπορικά συστήματα για την ταυτοποίηση των βακτηριακών παθογόνων. Οι αλγόριθμοι και οι βάσεις δεδομένων που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των αποτελεσμάτων στηρίζονται σε πρότυπα μικροβιακά στελέχη με γνωστές βιοχημικές και φυσιολογικές ιδιότητες, υπό βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης. Ένα τέτοιο αυτοματοποιημένο σύστημα ταυτοποίησης μικροοργανισμών είναι το VITEK<sup>®</sup> 2 (bioMerieux, Inc., Βόρεια Καρολίνα, ΗΠΑ) που ταυτοποιεί τα στελέχη σε λιγότερο από 10 ώρες. Η ταυτοποίηση με το σύστημα αυτό βασίζεται στις βιοχημικές ιδιότητες που έχουν συλλεχθεί από πρότυπα στελέχη. Συγκεκριμένα για τα Gram αρνητικά βακτήρια εξετάζονται 47 βιοχημικές δοκιμασίες πάνω σε μία μήτρα (κάρτα GN) μίας χρήσης. Εάν δεν υπάρξει μοναδική ταυτοποίηση, δίνεται μία λίστα πιθανών μικροοργανισμών ή το στέλεχος κρίνεται ότι βρίσκεται εκτός του πεδίου της βάσης δεδομένων. Επίσης προτείνονται συμπληρωματικές εξετάσεις που είναι απαραίτητες για την ολοκλήρωση της ταυτοποίησης. Ένα από τα κυριότερα πλεονεκτήματα του συστήματος είναι ότι διαθέτει μήτρες μίας χρήσης για τον

ταυτόχρονο προσδιορισμό της ευαισθησίας του υπό μελέτη μικροοργανισμού στα αντιβιοτικά. Έχει διαπιστωθεί υψηλή επαναληψιμότητα τέτοιων αποτελεσμάτων σε μεγάλα δείγματα εντεροβακτηριακών και άλλων Gram αρνητικών στελεχών (**Ling et al, 2001**). Οι περιορισμοί που αναφέρονται για το VITEK<sup>®</sup> 2 είναι ότι δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε άμεσα κλινικά δείγματα ή άλλα δείγματα που περιέχουν μικτή χλωρίδα. Επίσης, είδη που έχουν περιγραφεί πρόσφατα ή είναι σπάνια ενδέχεται να μη συμπεριλαμβάνονται στη βάση δεδομένων του συστήματος.

Ένα άλλο ημιαυτόματο και ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα ταυτοποίησης για μη απαιτητικά, μη εντεροβακτηριακά Gram αρνητικά βακτήρια, όπως είναι το *A. baumannii*, είναι το Api 20 NE (bioMerieux). Το σύστημα αυτό αποτελείται από μία ταινία με 20 βοθρία που περιέχουν αφυδατωμένα υποστρώματα μικροβιακών μεταβολικών ενζύμων. Το μικροβιακό εναιώρημα ενοφθαλμίζεται στα βοθρία και προκαλεί ανασύσταση των υποστρωμάτων, ενώ με επώαση στην κατάλληλη θερμοκρασία τα υποστρώματα αυτά μεταβολίζονται με εμφανείς χρωματικές αλλαγές. Μετά το πέρας της επώασης το χρωματικό προφίλ της ταινίας συγκρίνεται με μία βάση δεδομένων και το λογισμικό εξάγει το αποτελέσματα. Ωστόσο, το φαινοτυπικό προφίλ των υπό εξέταση βακτηρίων που περιλαμβάνει τη Gram χρώση, τη μορφολογία των αποικιών, τις τροφικές απαιτήσεις καθώς και την ενζυμική και τη μεταβολική δραστηριότητα μπορεί να είναι μεταβλητό υπό περιβαλλοντική πίεση ή για εξελικτικούς λόγους (**Ochman et al, 2005**). Για το λόγο αυτό, οι φαινοτυπικές διαδικασίες πολύ συχνά αποτυγχάνουν στην ακριβή ταυτοποίηση του μικροβίου. Τέτοιες περιπτώσεις παρατηρούνται όταν, για παράδειγμα, γνωστοί μικροοργανισμοί επιδεικνύουν ασυνήθιστο φαινότυπο, όταν σπάνιοι μικροοργανισμοί δεν περιλαμβάνονται στις βάσεις δεδομένων αναφοράς ή όταν η χρησιμοποιούμενη βάση δεδομένων δεν έχει ενημερωθεί.



**Εικόνα 1:** Το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK<sup>®</sup> 2 με τις μήτρες ταυτοποίησης μίας χρήσης (A) και η ταινία των βιοχημικών δοκιμασιών του ημιαυτόματου συστήματος API 20NE (B).

Τα είδη του συμπλέγματος *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* έχουν παρόμοιες γενετικές και φαινοτυπικές ιδιότητες. Λόγω της ομοιότητας αυτής, η διάκριση των ανωτέρω ειδών με τις κλασσικές φαινοτυπικές δοκιμασίες είναι δυσχερής, αλλά κρίνεται αναγκαία λόγω της διαφορετικής κλινικής τους σημασίας. Οι μοριακές μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί για το σκοπό αυτό και που αναλύονται παρακάτω περιλαμβάνουν τη μελέτη πολλαπλασιασμένου ριβοσωμικού DNA με τη χρήση ενζύμων περιορισμού (**ARDRA** - **A**mplified **r**DNA **R**estriction **A**nalysis), τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που βρίσκεται μεταξύ των γονιδίων που κωδικοποιούν για 16SrRNA και 23SrRNA (**ITS** – **I**nter**S**pac**S**er), τον προσδιορισμό της αλληλουχίας ολόκληρου του ριβοσωμικού οπερονίου καθώς και ενδογενών γονιδίων στο γένος *Acinetobacter* όπως τα *recA*, *gyrB*, *rpoB*, *adeB* και *bla<sub>OXA-51</sub>*. Η ριβοτυπία και η ανάλυση του αποτυπώματος του DNA που προκύπτει από πολλαπλασιασμό με ειδικούς εκκινητές μετά από κατατεμαχισμό ολόκληρου του γονιδιώματος σε ειδικές θέσεις (**AFLP** – **A**mplified **F**ragment **L**ength **P**olymorphism) είναι δύο τεχνικές που έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για τον ίδιο σκοπό.

Από τις πρώτες προσπάθειες γενετικής ταυτοποίησης του γένους *Acinetobacter* ήταν ο πολλαπλασιασμός του γενετικού υλικού με PCR και η μελέτη του γονιδίου που κωδικοποιούσε για 16SrRNA. Το πρωτόκολλο αρχικά περιλαμβάνει τον

πολλαπλασιασμό του εν λόγω γονιδίου με εκκινητές που υβριδίζονται σε συντηρημένες αλληλουχίες, ώστε να επιτυγχάνεται ο υβριδισμός τους ανεξάρτητα του μικροβιακού είδους. Εν συνεχεία προδιορίζεται η ακριβής αλληλουχία του προϊόντος της PCR, που λόγω της εξέλιξης είναι ειδική για κάθε μικροβιακό είδος και η εξαγόμενη νουκλεοτιδική ακολουθία συγκρίνεται με μία βάση δεδομένων. Στην προσπάθεια συσχέτισης τέτοιων αποτελεσμάτων με τα δεδομένα από πειράματα υβριδισμού DNA-DNA για τα είδη του γένους *Acinetobacter* παρατηρείται μερική ασυμφωνία (**Ibrahim et al, 1997**). Αυτό οφείλεται κυρίως στην απώλεια φυλογενετικής πληροφορίας λόγω του ότι η εξαγόμενη αλληλουχία νουκλεοτιδίων στο γονίδιο του 16SrRNA περιέχει και περιοχές με υψηλό ρυθμό εξέλιξης μέσω μεταλλάξεων. Η μελέτη του 16SrDNA έχει συμβάλει στην έγκαιρη διάγνωση της αιτιολογίας σοβαρών λοιμώξεων όπως η ενδοκαρδίτιδα (**Petti et al, 2005**), όταν οι κλασικές φαινοτυπικές δοκιμασίες αποτυγχάνουν να αποκαλύψουν την ταυτότητα του παθογόνου αιτίου. Επίσης, πρόσφατα αναφέρθηκε η δημιουργία μίας μικροσυστοιχίας ειδικών για 16SrDNA ολιγονουκλεοτιδίων που προοριζόταν για τη διαφορική διάγνωση είκοσι μικροβιακών ειδών συμπεριλαμβανομένου και του *A. calcoaceticus* (**Liu et al, 2005**) σε εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Η μελέτη απέδειξε τη χρησιμότητα της μεθόδου, με ευαισθησία ανίχνευσης τα 7 βακτηριακά κύτταρα (CFUs – Colony Forming Units), στη διαφορική διάγνωση της αιτιολογίας λοιμώξεων όπως η πολυμικροβιακή μηνιγγίτιδα. Παρόμοια εργασία επικεντρώθηκε στην κατασκευή μίας μικροσυστοιχίας με 15μερή ολιγονουκλεοτιδία, ειδικά για την ανίχνευση προϊόντων PCR που αντιστοιχούσαν εν μέρει σε αλληλουχίες 16SrDNA και 23rDNA των ειδών *A. baumannii* και *P. aeruginosa* (**Keum et al, 2006**) ώστε τα μικρόβια αυτά να ταυτοποιούνται σε κλινικά δείγματα.

Η μελέτη της ITS περιοχής γίνεται μετά από πολλαπλασιασμό με PCR της διάμεσης νουκλεοτιδικής ακολουθίας μεταξύ των γονιδίων 16SrDNA και 23SrDNA (**Chang et al, 2005**). Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται υβριδίζουν με συντηρημένες αλληλουχίες και στη συνέχεια προδιορίζεται η αλληλουχία του προϊόντος της PCR ενώ η εξαγόμενη αλληλουχία συγκρίνεται με μία βάση δεδομένων. Η ITS περιοχή είναι ιδιαίτερα συντηρημένη στα είδη του συμπλόκου *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* αλλά είναι περισσότερο ποικιλόμορφη από την αλληλουχία του 16SrDNA που χρησιμοποιείται σε αντίστοιχες μελέτες. Επίσης, το παραγόμενο προϊόν είναι μόλις 600bp περίπου σε αντίθεση με το μήκος του γονιδίου του 16SrDNA (περίπου 1.5kb) που καθιστά τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του περισσότερο αξιόπιστο. Για τους

λόγους αυτούς, η ITS περιοχή κρίνεται πιο κατάλληλη για τη ταυτοποίηση των ειδών του γένους *Acinetobacter*.

Είδος και Στέλεχος	Μήκος ITS (bp)	<i>A. calcoaceticus</i>	<i>A. baumannii</i>	Genomic species 3	Genomic species 13TU	<i>A. haemolyticus</i>	<i>A. junii</i>	Genomic species 6	<i>A. johnsonii</i>	<i>A. lwoffii</i>	Genomic species 10	Genomic species 11	<i>A. radioresistens</i>	Genomic species 14TU	Genomic species 15TU	Genomic species 14BJ	Genomic species 15BJ	Genomic species 16	Genomic species 17	" <i>A. venetianus</i> "	<i>A. ursingii</i>
<i>A. calcoaceticus</i> LMG 1046T	638																				
<i>A. baumannii</i> BCRC 10591T	607	0.86																			
Genomic species 3 LMG 1035	619	0.89	0.91																		
Genomic species 13TU BCRC 15417	615	0.91	0.92	0.89																	
<i>A. haemolyticus</i> BCRC 14852T	614	0.67	0.66	0.67	0.63																
<i>A. junii</i> BCRC 14854T	706	0.62	0.61	0.65	0.63	0.61															
Genomic species 6 BCRC 15421	606	0.68	0.76	0.68	0.74	0.68	0.63														
<i>A. johnsonii</i> BCRC 14853T	703	0.60	0.60	0.61	0.61	0.54	0.68	0.63													
<i>A. lwoffii</i> BCRC 14855T	629	0.65	0.69	0.65	0.68	0.57	0.57	0.69	0.67												
Genomic species 10 BCRC 15423	613	0.71	0.68	0.71	0.69	0.67	0.65	0.69	0.65	0.65											
Genomic species 11 BCRC 15424	593	0.72	0.68	0.72	0.69	0.65	0.65	0.67	0.64	0.69	0.88										
<i>A. radioresistens</i> BCRC 15425T	632	0.71	0.78	0.71	0.77	0.65	0.67	0.78	0.66	0.68	0.73	0.70									
Genomic species 14TU LMG 1235	667	0.67	0.69	0.72	0.69	0.71	0.76	0.76	0.67	0.63	0.71	0.70	0.74								
Genomic species 15TU CCUG 26390	661	0.61	0.65	0.62	0.65	0.59	0.65	0.67	0.70	0.70	0.66	0.63	0.73	0.66							
Genomic species 14BJ CCUG 34435	620	0.74	0.71	0.73	0.71	0.73	0.68	0.71	0.58	0.64	0.72	0.75	0.70	0.75	0.61						
Genomic species 15BJ CCUG 34436	667	0.67	0.67	0.71	0.67	0.67	0.77	0.77	0.67	0.63	0.73	0.71	0.72	0.90	0.69	0.74					
Genomic species 16 BCRC 15883	595	0.71	0.71	0.77	0.70	0.77	0.74	0.71	0.60	0.64	0.71	0.73	0.70	0.81	0.62	0.84	0.81				
Genomic species 17 CCUG 34437	655	0.69	0.70	0.73	0.70	0.67	0.79	0.74	0.67	0.62	0.76	0.72	0.74	0.84	0.69	0.75	0.92	0.81			
" <i>A. venetianus</i> " CCUG 45561	612	0.68	0.69	0.74	0.67	0.73	0.78	0.67	0.60	0.64	0.68	0.72	0.67	0.74	0.62	0.81	0.73	0.92	0.73		
<i>A. ursingii</i> LMG 19575	715	0.69	0.73	0.67	0.75	0.61	0.52	0.70	0.48	0.61	0.64	0.65	0.68	0.59	0.59	0.66	0.58	0.68	0.61	0.67	
<i>A. schindleri</i> LMG 19576	638	0.65	0.63	0.63	0.62	0.69	0.61	0.62	0.63	0.61	0.70	0.67	0.65	0.64	0.76	0.65	0.66	0.65	0.68	0.61	0.57

BCRC: Bioresources Collection and Research Center, Hsichu, Taiwan

LMG: Laboratorium voor Microbiologie, Ghent, Belgium

CCUG: Culture Collection, University of Goteborg, Goteborg, Sweden

ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, Va

### Πίνακας 3: Ποσοστό ομοιότητας της αλληλουχίας ITS μεταξύ 21 γενωμικών ειδών *Acinetobacter* (Chang *et al*, 2005).

Το μοναδικό μειονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι τα πολλαπλά προϊόντα PCR που παράγονται στα είδη *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. lwoffii* και στα γενωμικά είδη 10, 11, 14TU και 14BJ οπότε και ο άμεσος προσδιορισμός της αλληλουχίας του τελικού προϊόντος της PCR είναι αδύνατος. Ωστόσο, η μέθοδος είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για τη διάκριση των ειδών του συμπλέγματος *A. calcoaceticus* – *A. baumannii*. Η τεχνική αυτή έχει εξελιχθεί περαιτέρω και έχει αυτοματοποιηθεί στην ονομαζόμενη ανάλυση **ARISA** (Automated Ribosomal Spacer Analysis). Η ανάλυση ARISA αρχικά περιλαμβάνει την ενίσχυση της ITS περιοχής με τους συντηρημένους εκκινητές εκ των

οποίων ο ένας είναι σημασμένος με φθορίζουσα χρωστική. Στη συνέχεια το προϊόν ηλεκτροφορείται σε τριχοειδές σύστημα όπου ανιχνεύεται ο φθορισμός, μια τεχνική γνωστή με το όνομα **FALA (Fluorescent Amplicon Length Polymorphism)**. Η FALA επιτρέπει την ανίχνευση πολλαπλών προϊόντων PCR επιτρέποντας τη διάκριση περισσότερων του ενός μικροβίου σε ένα κλινικό δείγμα (**Massonet et al, 2006**).

Η τεχνική ARDRA περιλαμβάνει περιοριστική πέψη του ειδικού προϊόντος PCR για γονίδιο που κωδικοποιεί το ριβοσωμικό RNA με περιοριστικά ένζυμα και σύγκριση των προϊόντων της πέψης με ηλεκτροφόρηση. Στην τεχνική αυτή αρχικά χρησιμοποιήθηκαν δέκα διαφορετικά ένζυμα για τη ταυτοποίηση 18 γενωμικών ειδών *Acinetobacter* και την ομαδοποίησή τους σε 20 rDNA σύνολα (**Vaneechoutte et al, 1995**). Η διάκριση των ειδών του συμπλέγματος *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* ήταν άμεση και η όλη διαδικασία εμφάνισε υψηλή επαναληψιμότητα όταν χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές καλλιέργειες, βακτηριακά εναιωρήματα, προϊόντα PCR και αντιδράσεις πέψης στο ίδιο είδος. Η ειδικότητα της τεχνικής ήταν επίσης υψηλή αφού το ίδιο ένζυμο έδινε επαναλήψιμο πρότυπο πέψης σε επιδημιολογικά άσχετα μεταξύ τους στελέχη του ίδιου είδους. Ωστόσο για τη διάκριση των γενωμικών ειδών 4 (*A. haemolyticus*) και 7 (*A. johnsonii*), 5 (*A. junii*) και 17, 10 και 11 απαιτείται η τεχνική να συμπληρωθεί με τις φαινοτυπικές δοκιμασίες παραγωγής ζελατινάσης, αιμόλυσης, παραγωγής οξέος από γλυκόζη και ανάπτυξης στους 37 °C. Η ARDRA εμφάνισε μερική ασυμφωνία με τα δεδομένα από πειράματα DNA-DNA υβριδισμού. Το 1997 (**Garcia-Arata et al, 1997**) η τεχνική αυτή βελτιώθηκε με τη χρήση του ενζύμου *Sau3AI* (ή του ισοσχιζομερούς *MboI*) για την πέψη ενός προϊόντος περίπου 4.5kb που περιελάμβανε τα γονίδια 16SrDNA και 23SrDNA καθώς και την περιοχή ITS. Η μελέτη περιελάμβανε 67 στελέχη και εκτός των γενωμικών ειδών 3 και 13TU όλα τα υπόλοιπα είδη είχαν ένα και ειδικό πρότυπο πέψης, ενώ τα δεδομένα ήταν σε πλήρη συμφωνία με τα προηγούμενα πειράματα υβριδισμού.

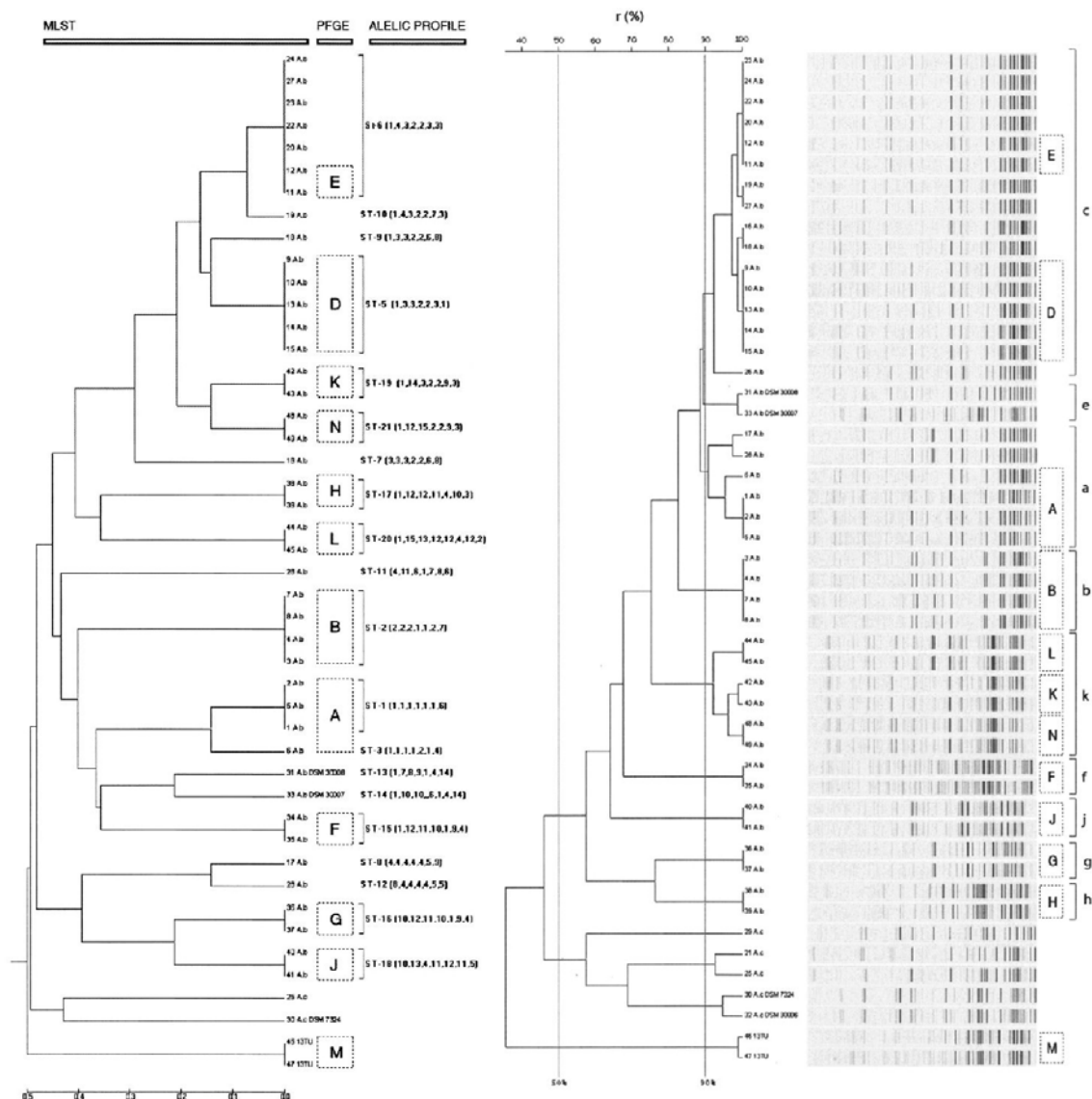
Η ριβοτυπία είναι μία τεχνική με ιδιαίτερη διακριτική ικανότητα που περιλαμβάνει τη πέψη του γενωμικού DNA με περιοριστικά ένζυμα και στη συνέχεια την αποτύπωση κατά Southern με ειδικούς ανιχνευτές για το ριβοσωμικό 16SrDNA και 23SrDNA. Το προφίλ των ζωνών που προκύπτει θεωρείται αντιπροσωπευτικό κάθε είδους. Σε μία ανάλογη μελέτη (**Gerner-Smidt, 1992**) η μέθοδος έδειξε υψηλή επαναληψιμότητα και ειδικότητα για τη διάκριση των ειδών του συμπλέγματος *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI*, *ClaI* και *SalI*. Η διαφοροποίηση των τεσσάρων ειδών (*A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, γενωμικά είδη

3 και 13TU) ήταν ιδιαίτερα ικανοποιητική και κάλυπτε το 97% των περιπτώσεων, μόνο με τη χρήση του *EcoRI*.

Για την ταυτοποίηση των ειδών του γένους *Acinetobacter* έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί και γονίδια που κωδικοποιούν απαραίτητες πρωτεΐνες για το μεταβολισμό των μικροβίων. Η αλληλουχία του *recA* γονιδίου, που κωδικοποιεί για τη ρεκομπινάση A, θεωρείται αντιπροσωπευτική για κάθε είδος και για το λόγο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της φυλογενετικής σχέσης μεταξύ των γενωμικών ειδών *Acinetobacter*. Σε μία τέτοια μελέτη (**Krawczyk et al, 2002**) πολλαπλασιάστηκε με PCR τμήμα του γονιδίου σε δείγμα 77 στελεχών που περιελάμβανε 43 πρότυπα είδη και 34 κλινικά στελέχη και στη συνέχεια η αλληλουχία των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία του φυλογενετικού δένδρου. Επίσης, το περιοριστικό ένζυμο *Tsp5091* έδωσε μοναδικό πρότυπο πέψης του προϊόντος της PCR για κάθε είδος σε πειράματα **RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)** και θεωρείται το πιο κατάλληλο για τη μοριακή ταυτοποίηση του *Acinetobacter* με την εν λόγω τεχνική. Ωστόσο, η διαδικασία απαιτεί επαλήθευση σε μεγαλύτερο και αντιπροσωπευτικότερο δείγμα στελεχών ώστε να διαπιστωθεί τυχόν ενδο-ειδική ποικιλομορφία του γονιδίου *recA* που θα μπορούσε δυνητικά να δώσει διαφορετικό προφίλ πέψης ακόμα και για το ίδιο είδος. Παρόμοιες εργασίες έχουν δημοσιευθεί για άλλα γονίδια όπως το *gyrB* (**Yamamoto et al, 1999**) που κωδικοποιεί για τη γυράση B, το *rpoB* (**La Scola et al, 2006**) που κωδικοποιεί για τη β-υπομονάδα της RNA πολυμεράσης και το *adeB* (**Huys et al, 2005**) που κωδικοποιεί για την AdeB πρωτεϊνική υπομονάδα της AdeABC αντλίας εκροής στα *Acinetobacter*. Ειδικά για την ταυτοποίηση του είδους *A. baumannii* έχει μελετηθεί πρόσφατα (**Turton et al, 2006a**) η χρησιμότητα του γονιδίου *bla<sub>OXA-51</sub>* που κωδικοποιεί για την OXA-51 οξακιλλινάση που ανήκει στη κλάση D των β-λακταμασών. Το συγκεκριμένο γονίδιο φαίνεται να είναι ενδογενές στο είδος *A. baumannii* και το μόνο μειονέκτημα στην ανίχνευσή του με PCR είναι ο μεγάλος αριθμός αλληλομόρφων που υπάρχει. Για το λόγο αυτό απαιτείται ο σχεδιασμός εκφυλισμένων εκκινητών, ικανών να υβριδίζουν με όλα τα αλλήλια που έχουν περιγραφεί.

Η συνδυαστική μελέτη περισσοτέρων του ενός γονιδίου που κωδικοποιούν κρίσιμες μεταβολικές πρωτεΐνες φαίνεται να παράγει πιο αντικειμενικά και επαναλήψιμα αποτελέσματα. Η τυποποίηση πολλαπλών γενετικών θέσεων όπως λέγεται η συγκεκριμένη τεχνική (**MLST – MultiLocus Sequence Typing**) περιλαμβάνει την ταυτόχρονη ενίσχυση μερικών γονιδιακών θέσεων που αναφέρθηκαν παραπάνω

(π.χ. *recA*, *gyrB* κ.λπ.) με PCR. Στη συνέχεια προσδιορίζεται η αλληλουχία των προϊόντων της PCR και τελικά κάθε εξεταζόμενο στέλεχος αποκτά έναν κωδικό αριθμό που υποδηλώνει το αλληλόμορφο που διαθέτει για κάθε εξεταζόμενο γονίδιο (αριθμός ST). Επίσης, πολλαπλή αντιστοίχιση των αλληλουχιών χρησιμεύει στη φυλογενετική διάκριση των υπό μελέτη στελεχών. Τα αποτελέσματα που παράγονται από MLST φαίνεται να συμφωνούν με αυτά που προκύπτουν από περιοριστική πέψη του μικροβιακού γενώματος σε μεγάλα τμήματα και ηλεκτροφόρηση σε μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE – Pulsed Field Gel Electrophoresis) και από AFLP (Bartual *et al*, 2005).



**Εικόνα 2:** Αποτελέσματα PFGE, MLST και AFLP (από αριστερά προς τα δεξιά) για 42 κλινικά στελέχη *A. baumannii* και 7 πρότυπα είδη *Acinetobacter* (Bartual *et al*, 2005). Παρατηρείται η συμφωνία μεταξύ των τριών τεχνικών και ιδιαίτερα μεταξύ MLST και PFGE.



### I.3. ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

#### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ως επιδημία ορίζεται η αυξημένη συχνότητα κρουσμάτων μιας λοίμωξης σε ένα συγκεκριμένο χώρο και για συγκεκριμένη χρονική περίοδο σε σχέση με τη στατιστικά αναμενόμενη. Η πρώτη εμφάνιση ανθεκτικών στην ιμιπενέμη στελεχών *A. baumannii* αναφέρθηκε στη Νέα Υόρκη των ΗΠΑ (**Go et al, 1994**) μετά από θεραπεία με το εν λόγω αντιβιοτικό λοιμώξεων από στελέχη *Klebsiella* που ήταν ανθεκτικά στις κεφαλοσπορίνες. Αν και η συγκεκριμένη επιδημία αντιμετωπίστηκε αποτελεσματικά, οι σχετικές αναφορές άρχισαν να πληθαίνουν παγκοσμίως (**Afzal-Shah et al, 1998**) και να κάνουν πιο επιτακτική την ανάγκη επιδημιολογικής μελέτης αυτών των στελεχών με φαινοτυπικές και μοριακές μεθόδους. Το γεγονός ότι η απομόνωση ενός στελέχους *A. baumannii* ενδέχεται να οφείλεται σε αποικισμό του ασθενούς και όχι σε λοίμωξη αλλά και το ότι πολλές από τις λοιμώξεις των ασθενών που νοσηλεύονται στη ΜΕΘ είναι πολυμικροβιακές, εμποδίζουν την διερεύνηση τέτοιων επιδημικών συμβάντων. Τον περιορισμό δε μιας ενδεχόμενης επιδημίας δυσχεραίνει σε μεγάλο βαθμό η παρουσία στο νοσοκομειακό περιβάλλον ανθεκτικών στελεχών *Acinetobacter*, που μεταδίδονται ταχέως μέσω του νοσηλευτικού προσωπικού, καθώς και η χρήση ευρέως φάσματος αντιμικροβιακών φαρμάκων και ιδιαίτερα των καρβαπενεμών.

#### I.3.A. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Ο κύριος σκοπός της τυποποίησης των μικροβίων είναι να αποδείξει τη γενετική σχέση μεταξύ επιδημιολογικά σχετιζόμενων στελεχών. Με τα δεδομένα που παρέχουν οι τεχνικές τυποποίησης γίνεται αντιληπτός ο τρόπος διασποράς ενός παθογόνου μικροοργανισμού και έτσι είναι δυνατός ο περιορισμός του φαινομένου τόσο ενδο- όσο και εξω- νοσοκομειακά. Για το σκοπό αυτό γίνονται οι εξής παραδοχές: α) τα στελέχη που εκπροσωπούν έναν επιδημικό κλώνο έχουν κοινό πρόγονο και συνεπώς έχουν τον ίδιο γονότυπο και β) επιδημιολογικά μη σχετιζόμενα στελέχη θα έχουν διαφορετικό γονότυπο ενώ σπάνια συμβαίνει το αντίθετο και κυρίως σε είδη με περιορισμένη γενετική ποικιλομορφία. Πρακτικά, η τυποποίηση είναι πιο αποτελεσματική στη διερεύνηση επιδημικών συμβάντων όταν το δείγμα μελέτης αναφέρεται σε μικρό αριθμό επιδημιολογικά σχετιζόμενων στελεχών. Τα στελέχη πρέπει να συλλέγονται από

τους ασθενείς και το περιβάλλον που σχετίζονται με α) το χώρο και β) το χρόνο εμφάνισης των κρουσμάτων των λοιμώξεων καθώς και από οποιαδήποτε ενδεχόμενη πηγή διασποράς.

Οι κλασσικές φαινοτυπικές μέθοδοι τυποποίησης περιλαμβάνουν την εξέταση και σύγκριση των βιοχημικών ιδιοτήτων των μικροβίων (βιοτυπία) όπως αυτές αποτυπώνονται από το μεταβολισμό έξι πηγών άνθρακα (λεβουλινικό, κιτρακονικό, L-φαινυλαλανίνη, φαινυλοξικό, 4-υδροξυβενζοϊκό και L-ταρταρικό) (**Bouvet et al, 1987**) καθώς και τη μελέτη του φαινότυπου αντοχής στους αντιμικροβιακούς παράγοντες (αντιβιογράμμα) (**Joly-Guillou et al, 1990**). Άλλες μέθοδοι είναι η ανάλυση των πρωτεϊνών του μικροβιακού κυττάρου (**Bouvet et al, 1990**), η ανάλυση των πλασμιδίων (**Seifert et al, 1994**), η οροτυπία (**Traub, 1989**) και η λυσιτυπία (**Bouvet et al, 1990**). Ωστόσο, όλες οι παραπάνω μέθοδοι στερούνται ταχύτητας και διακριτικής ικανότητας ενώ αδυνατούν να τυποποιήσουν όλα τα είδη. Για τους λόγους αυτούς νεότερες μοριακές τεχνικές διερευνήθηκαν ως προς την καταλληλότητά τους για τη τυποποίηση μικροβίων.

Από αυτές, ως μέθοδος αναφοράς έχει καθιερωθεί η μακρο-περιοριστική πέψη του μικροβιακού DNA (RFLP) με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE), γιατί συνδυάζει την υψηλή επαναληψιμότητα με τη διακριτική ικανότητα. Συνοπτικά, το μικρόβιο ενσωματώνεται σε γέλη αгарόζης και η λύση του κυτταρικού τοιχώματος καθώς και η πέψη του γενωμικού DNA γίνεται *in situ*. Με αυτόν τον τρόπο διασφαλίζεται η προστασία του DNA από μηχανικές πιέσεις που ενδέχεται να προκαλέσουν μη ειδικές κατατμήσεις. Το προϊόν της πέψης ηλεκτροφορείται εντός μεταβαλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου και το πρότυπο των ζωνών που προκύπτει συγκρίνεται με τα υπόλοιπα στελέχη της μελέτης ώστε να βρεθεί ενδεχόμενη γενετική σχέση (**Allardet-Servent et al, 1989**). Από τις πρώτες κιόλας μελέτες (**Gouby et al, 1992**) φάνηκε η δυνατότητα της τεχνικής αυτής να διαχωρίζει διαφορετικούς βιότυπους αλλά και επιδημιολογικά μη σχετιζόμενα στελέχη με τον ίδιο βιότυπο. Επίσης, σε μία πρόσφατη μελέτη δημοσιεύτηκε ένα πρωτόκολλο RFLP-PFGE για *A. baumannii* (**Seifert et al, 2005**) στην προσπάθεια εύρεσης ενός κοινά αποδεκτού πρωτοκόλλου ώστε τα αποτελέσματα να είναι επαναλήψιμα και συγκρίσιμα μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων. Απώτερος σκοπός της προσπάθειας αυτής είναι η δημιουργία μιας παγκόσμιας βάσης επιδημιολογικών δεδομένων για το είδος αυτό, ώστε να γίνεται άμεσα η ανίχνευση της κλωνικής διασποράς πολυανθεκτικών στελεχών.

Τα κριτήρια ανάλυσης των δεδομένων από RFLP-PFGE που δημοσιεύτηκαν το 1995 (**Tenover *et al*, 1995**) τηρούνται μέχρι και σήμερα αλλά αναφέρονται ρητά σε μικρό αριθμό στελεχών ( $\leq 30$ ) και σε μικρό χρονικό διάστημα συλλογής τους ( $\leq 12$  μήνες). Σύμφωνα με τα κριτήρια αυτά:

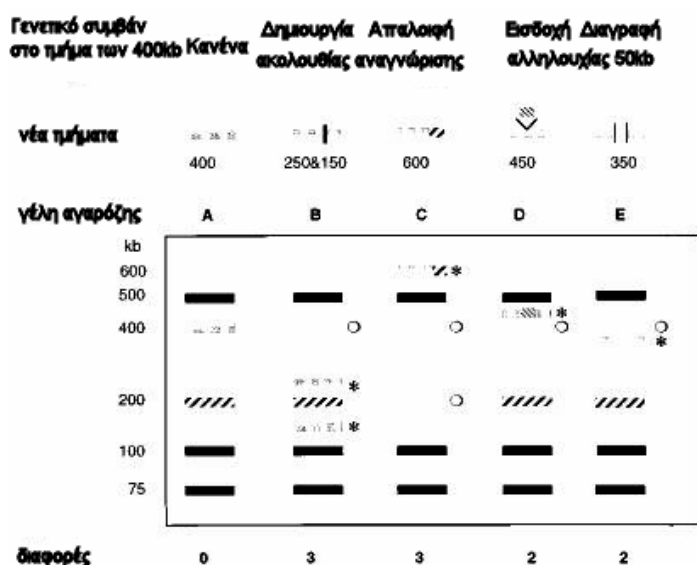
α) Το κοινό πρότυπο των ζωνών που επιδεικνύουν τα περισσότερα από τα στελέχη της συλλογής θεωρείται το επιδημικό προφίλ. Αυτά τα στελέχη είναι απίθανο να επιδείξουν διαφορετικό πρότυπο με κάποια άλλη τεχνική τυποποίησης.

β) Στελέχη που διαφέρουν σε 2-3 ζώνες θεωρούνται στενώς σχετιζόμενα με το επιδημικό προφίλ. Οι διαφορές αυτές προκύπτουν από ένα γενετικό συμβάν (π.χ. σημειακή μετάλλαξη, εισδοχή ή διαγραφή νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, που προκάλεσαν δημιουργία ή απαλοιφή ακολουθίας αναγνώρισης από το αντίστοιχο περιοριστικό ένζυμο). Πρέπει να σημειωθεί ότι έχουν παρατηρηθεί τέτοιου είδους διαφορές στο ίδιο στέλεχος μετά από επαναλαμβανόμενες ανακαλλιέργειες (**Sader *et al*, 1993**).

γ) Στελέχη που διαφέρουν σε 4-6 ζώνες θεωρούνται πιθανώς σχετιζόμενα με το επιδημικό προφίλ και προκύπτουν από δύο ανεξάρτητα γενετικά συμβάντα. Τα στελέχη αυτά είναι λιγότερο πιθανό να σχετίζονται επιδημιολογικά και συνήθως τέτοιες διαφορές παρατηρούνται σε μεγάλες συλλογές από άποψη δειγμάτων ή χρονικού διαστήματος. Επίσης, μπορούν να παρουσιάσουν διαφορετικό πρότυπο με άλλη τεχνική τυποποίησης.

δ) Στελέχη που διαφέρουν σε ποσοστό 50% των παρατηρούμενων ζωνών θεωρούνται μη σχετιζόμενα με το επιδημικό προφίλ.

Όσον αφορά στην επαναληψιμότητα, η RFLP-PFGE μπορεί να συγκριθεί με τη ριβοτυπία. Η τελευταία μέθοδος έχει το πλεονέκτημα της ταξινόμησης σε επίπεδο είδους αλλά για να φθάσει τη διακριτική ικανότητα της RFLP-PFGE πρέπει να χρησιμοποιηθούν τουλάχιστον δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες (**Seifert *et al*, 1995**).



## Πρότυπα Ζωνών στη Γέλη Αγαρόζης

- A. Επιδημικό προφίλ.
- B. Δημιουργία ακολουθίας αναγνώρισης π.χ. μετά από μία σημειακή μετάλλαξη.
- C. Απαλοιφή ακολουθίας αναγνώρισης π.χ. μετά από μία σημειακή μετάλλαξη.
- D. Εισδοχή αλληλουχίας DNA που δεν περιέχει ακολουθία αναγνώρισης.
- E. Διαγραφή αλληλουχίας DNA που δεν περιέχει ακολουθία αναγνώρισης.

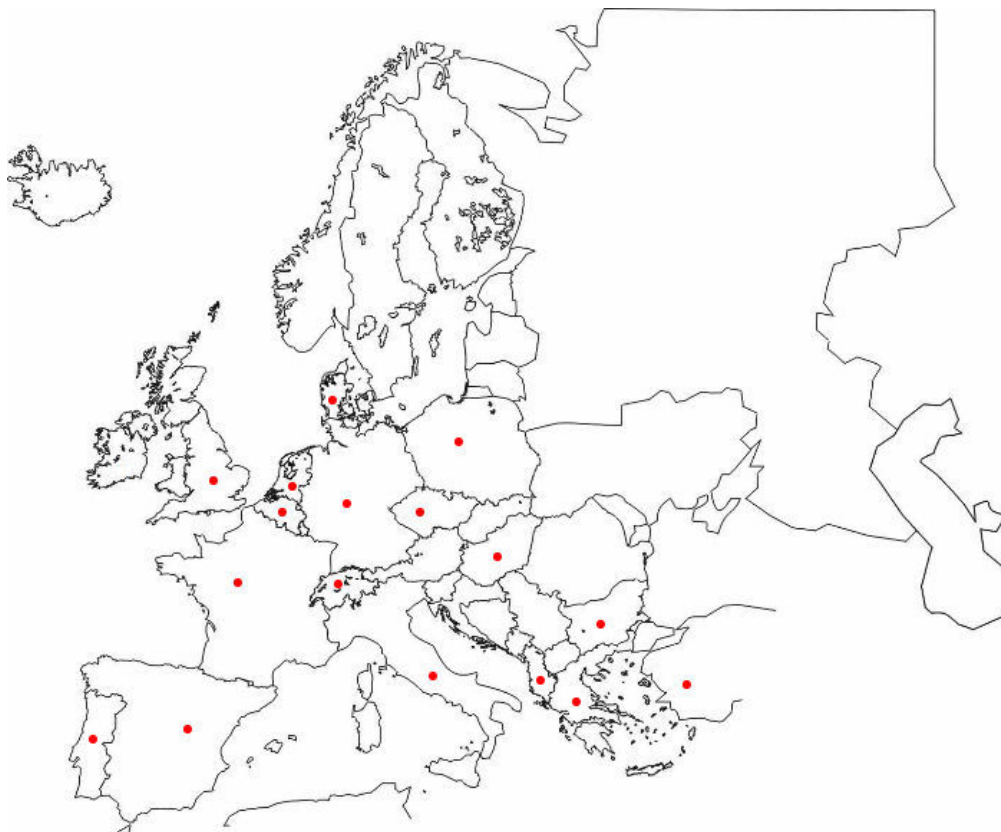
**Εικόνα 3:** Σχηματική απεικόνιση των αλλαγών στο πρότυπο ζωνών της RFLP-PFGE μετά από ένα γενετικό συμβάν. Οι κύκλοι υποδεικνύουν τα τμήματα του επιδημικού προτύπου που δεν υφίστανται μετά το γενετικό συμβάν και οι αστερίσκοι τα τμήματα που προκύπτουν (Tenover *et al*, 1995).

Οι τεχνικές τυποποίησης που βασίζονται στον πολλαπλασιασμό με PCR επαναλαμβανόμεμων αλληλουχιών γενωμικού DNA προτιμούνται λόγω της ευκολίας, της ταχύτητας και του φθηνότερου εξοπλισμού που απαιτούν. Ωστόσο, η επαναληψιμότητα των τεχνικών αυτών, κυρίως μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων, καθώς και η διακριτική ικανότητά τους, ιδιαίτερα μεταξύ επιδημιολογικά σχετιζόμενων στελεχών, αμφισβητούνται από το ευρύτερο επιστημονικό κοινό. Εν μέρει, τα προβλήματα αυτά έχουν ξεπεραστεί με την πιο ευαίσθητη ανάλυση των προϊόντων PCR από laser μετά από φθορισμό (ALF – Automated Laser Fluorescence). Σε πολυκεντρική μελέτη (Grundmann *et al*, 1997) τυποποιήθηκαν 40 στελέχη του συμπλέγματος *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* σε 7 διαφορετικά ευρωπαϊκά εργαστήρια. Η μελέτη ήταν τυφλή όσον αφορά στην επιδημιολογική σχέση των στελεχών και χρησιμοποίησε τέσσερα ζεύγη εκκινητών για τυποποίηση με PCR. Τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά αφού όλα τα συμβαλλόμενα εργαστήρια συμφώνησαν κατά 96.8% με το κοινά αποδεκτό προφίλ των στελεχών και εντόπισαν,

όλα ανεξαιρέτως, δύο επιδημιολογικά μη σχετιζόμενα στελέχη. Ιδιαίτερα ο εκκινητής M13, που υβριδίζει με το γονιδίωμα του φάγου M13, έδωσε το πιο ξεκάθαρο πρότυπο στη γέλη αγαρόζης με ελάχιστες ισχνές, δευτερεύουσας σημασίας, ζώνες. Ο εκκινητής DAF4 (ολιγονουκλεοτίδιο αυθαίρετης αλληλουχίας) και το ζεύγος εκκινητών REP1/REP2 (που υβριδίζουν με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του βακτηριακού γενώματος) έδωσαν τα πιο επαναλήψιμα αποτελέσματα σε αντίθεση με τον εκκινητή ERIC-2 (υβριδίζει με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες), για τον οποίο δικαιολογείται η χαμηλή επαναληψιμότητα λόγω της μικρής θερμοκρασίας υβριδισμού (25 °C). Κριτήρια ανάλυσης των δεδομένων που προκύπτουν από πειράματα τυποποίησης με PCR δεν έχουν οριστεί. Ωστόσο, σε σχέση πάντα με το συνολικό αριθμό ζωνών χρειάζονται παραπάνω από δύο διαφορές για τον επιδημιολογικό διαχωρισμό δύο στελεχών. Αυτό γίνεται εύκολα αντιληπτό όταν συγκριθούν αυτές οι τεχνικές με την RFLP-PFGE (**Graser et al, 1993**) ώστε να υπάρχει μια κοινά αποδεκτή μέθοδος αναφοράς για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Αξιοσημείωτη επίσης είναι μία μελέτη (**Liu et al, 1997**) που έδειξε ότι ο συνδυασμός των εκκινητών που χρησιμοποιούνται μεμονωμένα στη τυποποίηση με PCR (π.χ. M13, REP1/REP2) μπορεί να αποβεί περισσότερο διακριτικός. Η πολλαπλή PCR (**MPCR – Multiplex PCR**) που συνδυάζει αυτούς τους εκκινητές μπορεί να διαχωρίσει δύο επιδημιολογικά σχετιζόμενα στελέχη με αποτέλεσμα συγκρίσιμο με αυτό της RFLP-PFGE.

Τα είδη του γένους *Acinetobacter* είναι ευρέως διασπαρμένα στη φύση και στο νοσοκομειακό περιβάλλον, όπου κυριαρχούν τα πολυανθεκτικά στελέχη *A. baumannii*. Τα νοσοκομειακά στελέχη διαχωρίζονται τυπικά σε επιδημικά και σε σποραδικά στελέχη ανάλογα με τη συχνότητα απομόνωσής τους. Σε μία μελέτη τυποποίησης επιδημικών και σποραδικών στελεχών σε διαφορετικές πόλεις της Βορειοδυτικής Ευρώπης καταγράφηκαν τέσσερις κυρίαρχοι γονότυποι (I, II, III και IV) (**Dijkshoorn et al, 1996**). Η έρευνα περιελάμβανε την επιδημιολογική μελέτη 14 επιδημικών και 17 σποραδικών στελεχών *A. baumannii* με AFLP, ριβοτυπία, μελέτη των πρωτεϊνών του μικροβιακού κυττάρου, βιοτυπία και αντιβιογράμμα. Από τη σύγκριση των επιμέρους αποτελεσμάτων φάνηκε ότι οι γονότυποι I και II σχετίζονται κατά πολύ μεγάλο ποσοστό με επιδημίες. Τα στελέχη των γονοτύπων αυτών παρουσιάζουν κατά κανόνα ανθεκτικότερο φαινότυπο αντοχής και ο πληθυσμός τους είναι περισσότερο ομοιογενής σε γενετική βάση από τα σποραδικά στελέχη που αντιπροσωπεύονται από τους γονότυπους III και IV. Επιδημικά στελέχη των γονοτύπων I και II έχουν ανευρεθεί σε διάφορα ευρωπαϊκά κράτη όπως η Τσεχία (**Nemec et al, 2004**), η Αγγλία, το Βέλγιο και

η Δανία (**Dijkshoorn et al, 1996**), η Αυστρία, η Γαλλία, η Γερμανία, η Ελλάδα, η Ιταλία, η Πολωνία, η Πορτογαλία, η Ισπανία, η Ελβετία, η Τουρκία και η Αλβανία (**Brisse et al, 2000**) καθώς και η Βουλγαρία και η Ουγγαρία (**Pantophlet et al, 2001**). Ιδιαίτερα για την Ελλάδα, μία από τις πρώτες σχετικές μελέτες σύγκρινε επιδημιολογικά 121 πολυανθεκτικά στελέχη *A. baumannii* από μονάδες εντατικής θεραπείας εννέα νοσοκομείων της Αθήνας (**Maniatis et al, 2003**). Η μελέτη έγινε με RFLP-PFGE και έδειξε την επικράτηση δύο γονοτύπων σε ποσοστό 68.1% των στελεχών που μελετήθηκαν (N=69). Η σχέση των δύο αυτών γονοτύπων με τους γνωστούς Ευρωπαϊκούς κλώνους I και II δεν διερευνήθηκε αλλά γεωγραφικοί λόγοι υπαγορεύουν την αναμενόμενη αντιστοιχία.



**Εικόνα 4:** Εξάπλωση των Ευρωπαϊκών κλώνων I και II του είδους *A. baumannii*.

Στελέχη *A. baumannii* του Ευρωπαϊκού κλώνου I απομονώθηκαν και από στρατιώτες που συμμετείχαν στον πρόσφατο πόλεμο του Ιράκ, μετά τον επαναπατρισμό τους, κατά τη νοσηλεία τους σε στρατιωτικά νοσοκομεία (**Turton et al, 2006b**). Η υπόθεση ότι τα στελέχη αυτά αποίκισαν τους στρατιώτες στο Ιρακινό έδαφος φαίνεται απίθανη, διότι απομονώθηκαν ανεξάρτητα από ασθενείς οι οποίοι τραυματίστηκαν σε διαφορετικά

γεωγραφικά σημεία της μάχης. Πιθανότερη είναι η εκδοχή ότι τα επιδημικά αυτά στελέχη είχαν αποικίσει τον ιατρικό εξοπλισμό (ήδη από τον τόπο προέλευσής του) που ήρθε στη συνέχεια σε επαφή με τους ασθενείς κατά τη μεταφορά τους για επαναπατρισμό. Γενικά, η απομόνωση γενετικά σχετιζόμενων στελεχών σε σχετικά μεγάλη γεωγραφική έκταση υποδηλώνει κοινή καταγωγή. Η ενδοκλωνική ωστόσο ποικιλομορφία που υφίσταται σε αρκετές περιπτώσεις είναι ενδεικτική της συνεχιζόμενης εξελικτικής διαδικασίας.

Τα *Acinetobacter* είναι δυναμικά παθογόνα μικρόβια για τον άνθρωπο, αποικίζουν το δέρμα και ιδιαίτερα τις υγρές περιοχές όπως οι μασχάλες, η βουβωνική χώρα και η μεταξύ των δακτύλων των ποδιών περιοχή. Ωστόσο, σε περιπτώσεις ανοσοκαταστολής ή μετεγχειρητικά μπορεί να προκαλέσουν σοβαρές λοιμώξεις. Βασικό ρόλο στην εγκατάσταση και διασπορά τους στο νοσοκομειακό περιβάλλον διαδραματίζει το νοσηλευτικό προσωπικό και ο νοσοκομειακός εξοπλισμός. Μελέτες έχουν αποδείξει την ικανότητα των συγκεκριμένων μικροβίων να επιβιώνουν σε ξηρές επιφάνειες με μέσο χρόνο επιβίωσης μεγαλύτερο κατά τουλάχιστον 20 ημέρες σε σχέση με πρότυπα στελέχη *Acinetobacter* (**Jawad et al, 1998**). Ιδιαίτερα το *A. baumannii* φαίνεται να υπερτερεί σε αυτό το χαρακτηριστικό έναντι άλλων ειδών όπως το *A. johnsonii*, το *A. junii* και το *A. lwoffii* και ίσως για αυτό το λόγο τα τελευταία είδη σπάνια αναφέρονται σε νοσοκομειακές επιδημίες (**Jawad et al, 1996, Musa et al, 1990**). Ένα άλλο στοιχείο που δυσχεραίνει τον έλεγχο μιας νοσοκομειακής επιδημίας από *Acinetobacter* είναι η παρουσία τους στο νοσοκομειακό μικροπεριβάλλον, η οποία ευνοείται κυρίως λόγω της φορείας τους στα χέρια του νοσηλευτικού προσωπικού αλλά και στα άμεσα σχετιζόμενα με τους ασθενείς αντικείμενα (**Aygun et al, 2002, Weernink et al, 1995**). Τα σωματίδια της σκόνης φαίνεται επίσης να αποτελούν ικανό μέσο διασποράς του *A. baumannii* ενδονοσοκομειακά (**Bernards et al, 2004**). Γενικά, υπάρχουν μελέτες που έχουν χαρακτηρίσει το νοσοκομειακό περιβάλλον ως ενδεχόμενη μικροβιακή δεξαμενή που ευνοεί τη διασπορά *Acinetobacter* σε περιπτώσεις επιδημικών κρουσμάτων αλλά και μελέτες που δεν βρίσκουν τέτοια συσχέτιση. Στη τελευταία περίπτωση ο βραχυπρόθεσμος αποικισμός του νοσηλευτικού προσωπικού μπορεί να εξυπηρετεί τον ίδιο σκοπό (**D' Agata et al, 2000**). Σε οποιαδήποτε ωστόσο περίπτωση, εξω-νοσοκομειακά στελέχη φαίνεται να μην σχετίζονται με νοσοκομειακές επιδημίες λόγω των διαφορετικών επιδημιολογικών χαρακτηριστικών που παρουσιάζουν (**Zeana et al, 2003**). Για τους παραπάνω λόγους, η φυσική ενδονοσοκομειακή επιλογή των *Acinetobacter*, κυρίως λόγω της ακατάλληλης

αντιμικροβιακής θεραπείας και των ελαστικών μέτρων υγιεινής, συμβάλλει στην επικράτηση και τη διασπορά πολυανθεκτικών στελεχών.

Όσον αφορά στους παράγοντες κινδύνου για ενδεχόμενη λοίμωξη από πολυανθεκτικό στέλεχος *A. baumannii* φαίνεται να υπάρχει μερική συμφωνία ανάμεσα στις δημοσιευμένες μελέτες, τουλάχιστον ως προς τα βασικά στοιχεία του ιατρικού ιστορικού ενός ασθενούς (Abbo *et al*, 2005, Mahgoub *et al*, 2002, Cisneros *et al*, 2005). Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές παράγοντες όπως η ύπαρξη αναπνευστήρα, η υποκείμενη νόσος και η προηγούμενη θεραπεία με χημειοθεραπευτικά, όπως η μετρονιδαζόλη, που αλλοιώνουν τη φυσική χλωρίδα και υποβοηθούν έτσι τον αποικισμό από *Acinetobacter* είναι πρωταρχικής σημασίας. Μία μελέτη (Abbo *et al*, 2005) ωστόσο έδειξε την προστατευτική δράση της πενικιλίνης έναντι αυτού του αποικισμού λόγω, εν μέρει, της μεταβολής της φυσιολογικής χλωρίδας που προκαλεί. Επίσης, άλλοι παράγοντες όπως ο καθετηριασμός και η νοσηλεία σε περισσότερα του ενός νοσοκομεία φαίνεται να σχετίζονται με αυξημένη πιθανότητα λοίμωξης από *Acinetobacter*. Ιδιαίτερα ο τελευταίος παράγοντας αυξάνει το ενδεχόμενο να έρθουν σε επαφή ασθενείς φορείς του μικροβίου με άλλους, ώστε να προκληθεί έτσι η διασπορά του.

### 1.3.B. ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΣ ΔΥΝΑΜΗ

Παρόλο που πολλές δημοσιεύσεις έχουν συσχετίσει το *A. baumannii* με ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις και επιδημίες, οι λοιμογόνοι παράγοντες του μικροβίου παραμένουν άγνωστοι. Ως βασική προϋπόθεση για τον αποικισμό και τη λοίμωξη του ξενιστή από τα μικρόβια θεωρείται η προσκόλληση τους στα επιθηλιακά κύτταρα (Beachey, 1981). Υπάρχουν επιδημιολογικές μελέτες που αποδεικνύουν τον παρατεταμένο αποικισμό του ανθρώπινου δέρματος και των βλεννογόνων από είδη του γένους *Acinetobacter* (Berlau *et al*, 1999). Ιδιαίτερα οι αεροφόροι οδοί στον άνθρωπο θεωρούνται τα πρώτα σημεία που αποικίζονται από *A. baumannii*. Μία πρόσφατη έρευνα (Lee *et al*, 2006) μελέτησε με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM – Scanning Electron Microscopy) την προσκόλληση τέτοιων στελεχών, εκ των οποίων αρκετά ανήκαν στους Ευρωπαϊκούς κλώνους I και II, σε κυτταροκαλλιέργειες ανθρωπίνων βρογχικών επιθηλιακών κυττάρων (κυτταρική σειρά NCI-H<sub>292</sub>). Στην εν λόγω μελέτη παρατηρήθηκαν δύο πρότυπα προσκόλλησης, το διεσπαρμένο και το ομαδοποιημένο. Αν και δεν βρέθηκαν ποσοτικές διαφορές μεταξύ επιδημικών και

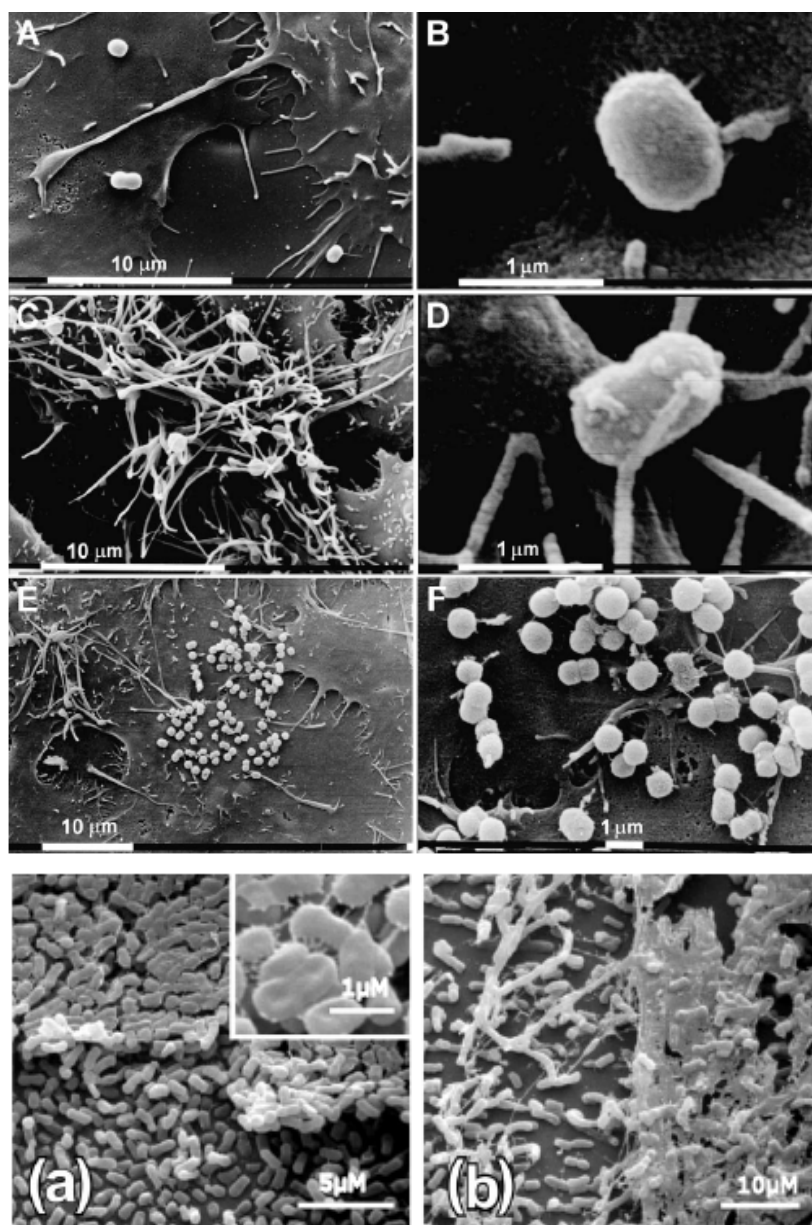


σποραδικών στελεχών, ωστόσο ο ευρωπαϊκός κλώνος II φάνηκε να προσκολλάται περισσότερο από τον κλώνο I. Αυτό εν μέρει μπορεί να οφείλεται στα διαφορετικά λιποπολυσακχαριδικά O-αντιγόνα που διαθέτουν και τα οποία ενδέχεται να βοηθούν στη προσκόλληση των *Acinetobacter* (**Pantophlet et al, 2001**). Σε αυτά τα αντιγόνα έχουν αποδοθεί και ανοσογόνες ιδιότητες (**Garcia et al, 1999**). Επίσης, το ομαδοποιημένο πρότυπο προσκόλλησης έδειχνε χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά των βιομεμβρανών. Με τον όρο βιομεμβράνη χαρακτηρίζεται η στατική οργάνωση των μικροβίων με διαφορετικά μορφολογικά, μεταβολικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά από τα ελεύθερα κύτταρα (**Stoodley et al, 2002**). Η οργάνωση αυτή θεωρείται ότι προστατεύει τα μικρόβια από αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η έλλειψη αυξητικών παραγόντων και η χημειοθεραπεία. Η ανάπτυξη βιομεμβράνης έχει παρατηρηθεί και σε πρότυπο στέλεχος *A. baumannii* (ATCC 19606<sup>T</sup>) πάνω σε υάλινες (**Vidal et al, 1996**) ή πλαστικές επιφάνειες (**Tomaras et al, 2003**). Η τελευταία μελέτη ήταν η συνέχεια δημοσιευμένων πειραμάτων μεταλλαξιγένεσης (**Dorsey et al, 2002**) που απέδειξαν την ύπαρξη ενός οπερονίου (γενετικός τόπος *csuABCDE*) που κωδικοποιεί 6 πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές συμβάλλουν στο σχηματισμό μεμβρανικών ακρολοφιών που φαίνεται να είναι ικανές και αναγκαίες για την κυτταρική προσκόλληση και το σχηματισμό βιομεμβράνης. Το εν λόγω οπερόνιο ανευρίσκεται αρκετά συντηρημένο σε πολλά είδη μικροβίων όπως τα *P. aeruginosa* και *Yersinia pestis* (**Thanassi et al, 1998**).

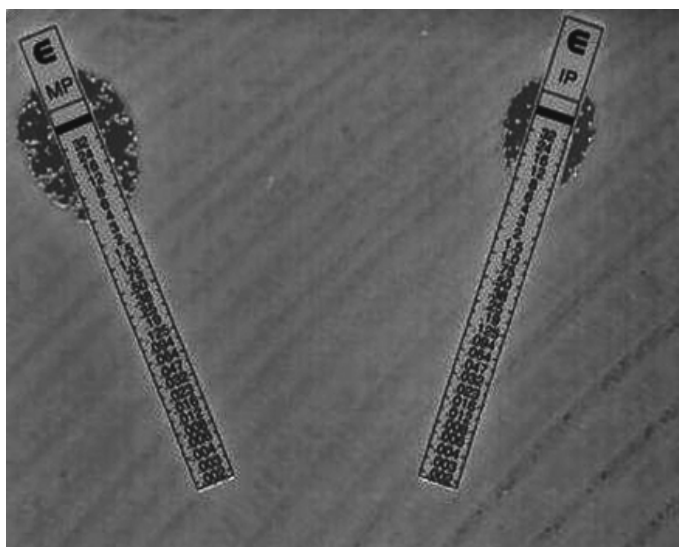
Εκτός από τα γονίδια που συμβάλλουν στην προσκόλληση του *A. baumannii* έχουν διερευνηθεί περιστασιακά και άλλοι πιθανοί λοιμογόνοι παράγοντες. Μία μελέτη εξέτασε τα επίπεδα γαστρίνης και ιντερλευκίνης 8 (IL-8) στον ορό αχλωρυδικών ποντικών, μετά τον αποικισμό του στομάχου τους από *Acinetobacter* spp (**Ofori-Darko et al, 2000**). Το σχετικά αλκαλικό περιβάλλον που επικρατεί στο στομάχο αχλωρυδικών ασθενών ευνοεί τον αποικισμό του από αερόβια και αναερόβια μικρόβια όπως τα *A. baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* και *Pseudomonas* spp. (**Garrouste-Orgeas et al, 1997**). Η μελέτη απέδειξε δόσοεξαρτώμενη (από τον μικροβιακό πληθυσμό) επαγωγή της έκφρασης τόσο της γαστρίνης όσο και της IL-8 και τη συσχέτισε με μία πρωτεΐνη 38kD που βρέθηκε να είναι ανάλογη της μεμβρανικής πρωτεΐνης OmpA και η οποία ανευρίσκεται σε πολλά μικροβιακά είδη. Η ίδια πρωτεΐνη έχει συσχετισθεί από άλλη μελέτη (**Choi et al, 2005**) με την κυτταρική απόπτωση σε *in vitro* κυτταροκαλλιέργειες ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων λάρυγγα (κυτταρική σειρά HEp-2). Η πορίνη OmpA φαίνεται να αλληλεπιδρά με τα επιθηλιακά κύτταρα και

να επάγει την διάχυση απαραίτητων για την ενεργοποίηση των κασπασών, συστατικών των μιτοχονδρίων (κυτόχρωμα c, παράγοντας επαγωγής της απόπτωσης **AIF** – **A**pop $t$ osis **I**nducing **F**actor) στο κυτταρόπλασμα. Στη συνέχεια, η ενεργοποιημένη κασπάση-3 αναλαμβάνει την κατάτμηση του ευκαρυωτικού DNA και συνεπώς τον κυτταρικό θάνατο. Η απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων προφανώς αποτελεί το πρωταρχικό βήμα στην έναρξη της λοίμωξης αφού έτσι μόνο λύεται η συνέχεια του βλεννογόνου χιτώνα και τα μικρόβια μπορούν πλέον να έχουν πρόσβαση στους υποκείμενους ιστούς. Επομένως, η επαγόμενη από το *A. baumannii* απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων προφανώς καθορίζει την εξέλιξη της λοίμωξης και περαιτέρω έρευνα ίσως αναδείξει αναστολείς της όλης διαδικασίας με ιδιαίτερο κλινικό ενδιαφέρον.

Τέλος, ένα ελάχιστο διερευνημένο χαρακτηριστικό των Gram αρνητικών βακτηριδίων είναι η ετερογένεια στην αντοχή στα β-λακταμικά. Στη διεθνή βιβλιογραφία, τα ετεροανθεκτικά κύτταρα διακρίνονται σε μεταλλάκτες που διατηρούν τον ετερογενή φαινότυπο λόγω κάποιας συγκεκριμένης μετάλλαξης, όπως για παράδειγμα στην *P. aeruginosa* (**Pournaras et al, 2007**), και στα λεγόμενα «εμμένοντα» (persisters) κύτταρα των οποίων ο ετερογενής φαινότυπος είναι παροδικός (**Balaban et al, 2004**) και ανατάσσεται με την απομάκρυνση του δυσμενούς περιβαλλοντικού παράγοντα, δηλαδή του αντιμικροβιακού. Ο ετεροανθεκτικός φαινότυπος στις καρβαπενέμες είχε αρχικά παρατηρηθεί σε στελέχη σταφυλοκόκκων που ήταν ανθεκτικά στη μεθικιλίνη αλλά ευαίσθητα στη μεροπενέμη (**Kayser et al, 1989**). Αργότερα, υπήρξαν προκαταρκτικές αναφορές για το είδος *A. baumannii* που κατέγραψαν την ετερογένεια στις καρβαπενέμες από την ανάπτυξη διακριτών αποικιών μέσα στην άλω αναστολής της ανάπτυξης των μικροβίων στις φαινοτυπικές δοκιμασίες (**Pournaras et al, 2005, Pascual et al, 1997**). Μέχρι και σήμερα όμως παραμένει άγνωστη η συχνότητα των φαινομενικά ευαίσθητων στελεχών *A. baumannii* που είναι ωστόσο ικανά να παράγουν ετερο-ανθεκτικούς υποπληθυσμούς όπως άγνωστη παραμένει και η λοιμογόνος δύναμή τους σε σχέση με τα πλήρως ευαίσθητα στελέχη. Η δραστηριότητα των καρβαπενεμών έναντι τέτοιων στελεχών δεν έχει επίσης διερευνηθεί ώστε να εξακριβωθεί το θεραπευτικό δυναμικό τους σε περιπτώσεις λοιμώξεων από τέτοια στελέχη.



**Εικόνα 5:** Φωτογραφίες SEM από δύο ανεξάρτητες εργασίες που αποδεικνύουν ότι η ύπαρξη μεμβρανικών ακρολοφιών στο *A. baumannii* είναι αναγκαία και ικανή προϋπόθεση για την προσκόλληση και δημιουργία βιομεμβράνης. (A-B) *A. baumannii* προσκολλημένα μέσω μεμβρανικών ακρολοφιών σε κυτταροκαλλιέργεια ανθρώπινων βρογχικών επιθηλιακών κυττάρων (NCI-H<sub>292</sub>). (C-D) Μεγέθυνση της στενής επαφής του μικροβίου με τα επιθηλιακά κύτταρα. (E-F) Ομαδοποιημένο πρότυπο προσκόλλησης (Lee *et al*, 2006). (a-b) Προσκόλληση *A. baumannii* σε τρυβλία Petri (Tomaras *et al*, 2003). (a) Πρότυπο στέλεχος ATCC 19606<sup>T</sup>. (b) Ανασυνδυασμένο παράγωγο του ATCC 19606<sup>T</sup> στο οποίο είχε απενεργοποιηθεί τμήμα του οπερονίου που κωδικοποιεί για τις μεμβρανικές ακρολοφίες. Η λειτουργική νουκλεοτιδική αλληλουχία είχε εισαχθεί στο στέλεχος με πλασμίδιο που το κατέστησε ικανό να παράγει τις εν λόγω μεμβρανικές δομές. Το ανασυνδυασμένο στέλεχος χωρίς το πλασμίδιο αδυνατούσε να παράγει ακρολοφίες και να προσκολληθεί στη πλαστική επιφάνεια.



**Εικόνα 6:** Ανάπτυξη ετεροανθεκτικών αποικιών μέσα στην άλω αναστολής της ιμιπενέμης (IP) και της μεροπενέμης (MP) σε στέλεχος *A. baumannii* (Pournaras *et al*, 2005).

### 1.3.Γ. ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ & ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

Ως νοσοκομειακή πνευμονία ορίζεται ο τύπος της πνευμονίας που εμφανίζεται αφού παρέλθουν πάνω από 48 ώρες από τη στιγμή της εισαγωγής του ασθενούς στο νοσοκομείο. Η νοσοκομειακή πνευμονία παραμένει ακόμα και σήμερα η πρώτη σε ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας ενδονοσοκομειακή λοίμωξη, τα οποία κυμαίνονται από 20 έως 70 % ανάλογα με το δείγμα μελέτης (Ferrer *et al*, 2002). Εμφανίζεται τόσο σε ασθενείς με μηχανική υποστήριξη της αναπνοής όσο και σε ασθενείς χωρίς αυτήν, αλλά η πρώτη κατηγορία εκπροσωπεί τη πλειοψηφία των περιπτώσεων (Chastre *et al*, 2002). Αν και το *A. baumannii* ευθύνεται για αρκετά είδη λοιμώξεων ωστόσο οι περισσότερες περιπτώσεις νοσοκομειακής πνευμονίας σχετίζονται αιτιολογικά με το είδος αυτό (Ferrara, 2006). Ορισμένοι δε παράγοντες όπως η παραμονή στη ΜΕΘ, η προηγούμενη χρήση αντιβιοτικών ευρέως φάσματος (κεφαλοσπορίνες γ' γενιάς, φλουοροκινολόνες, καρβαπενέμες) και βέβαια η μηχανική υποστήριξη της αναπνοής αυξάνουν το κίνδυνο νοσηρότητας από νοσοκομειακή πνευμονία οφειλόμενη σε *A. baumannii* (Jain *et al*, 2004).

Η βακτηριαμία, η οποία προέρχεται συνήθως από νοσοκομειακή πνευμονία ή λοίμωξη χειρουργικών τραυμάτων, είναι συχνό φαινόμενο ιδιαίτερα στις ΜΕΘ. Το *A. baumannii* μπορεί να ανευρίσκεται ως το μοναδικό αιτιολογικό παθογόνο ή να

αποτελεί ένα από τα είδη της γλωρίδας σε περιπτώσεις πολυμικροβιακής βακτηριαμίας οι οποίες είναι και οι συνηθέστερες (Cisneros *et al*, 2002). Ιδιαίτερα επιρρεπή ομάδα αποτελούν οι ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς αλλά και τα νεογνά (Bergogne-Berezin *et al*, 1996). Οι αντίστοιχοι παράγοντες κινδύνου δεν διαφέρουν ουσιαστικά από τους ήδη σχετιζόμενους με τη νοσοκομειακή πνευμονία οφειλόμενη σε *A. baumannii*. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εποχιακή διακύμανση που εμφανίζεται στις περιπτώσεις βακτηριαμίας από *A. baumannii* με αύξηση να παρατηρείται τους καλοκαιρινούς μήνες (McDonald *et al*, 1996).

Η νοσοκομειακή μηνιγγίτιδα που οφείλεται σε *A. baumannii* είναι συνήθως δευτερογενής μετά από νευροχειρουργικές επεμβάσεις και κρανιακά τραύματα (Bergogne-Berezin *et al*, 1996) και παρουσιάζει σχετικά υψηλά ποσοστά νοσηρότητας ενώ σποραδικές είναι οι αναφορές πρωτογενούς μηνιγγίτιδας από αυτό το είδος. Εκτός από τη χρήση ισχυρών αντιμικροβιακών στη νευροχειρουργική ΜΕΘ άλλοι παράγοντες, όπως η μόνιμη επικοινωνία των κοιλιών με το εξωτερικό περιβάλλον, η κοιλιοστομία, το συρίγγιο εκροής εγκεφαλονωτιαίου υγρού και η παρουσία καθετήρων των κοιλιών για περισσότερες από 5 μέρες αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης μηνιγγίτιδας οφειλόμενη σε *A. baumannii*. Άλλες, λιγότερο συχνές, λοιμώξεις που σχετίζονται με το είδος, είναι περιπτώσεις λοίμωξης του ανώτερου ουροποιητικού που συνήθως παρατηρούνται σε ηλικιωμένους και εξασθενημένους ασθενείς, σε νοσηλεύομενους στη ΜΕΘ και σε ασθενείς με μόνιμους καθετήρες στο ουροποιητικό. Επίσης σποραδικά είναι τα περιστατικά ενδοκαρδίτιδας που συνήθως σχετίζονται με επεμβάσεις ανοιχτής καρδιάς (Olut *et al*, 2005).

Όσον αφορά στις θεραπευτικές επιλογές, αυτές φαίνεται να περιορίζονται συνεχώς λόγω της διασποράς ανθεκτικών στελεχών *A. baumannii* ακόμα και σε ευρέως φάσματος β-λακταμικά αντιβιοτικά όπως οι καρβαπενέμες παρόλο που διεθνή προγράμματα παρακολούθησης της μικροβιακής αντοχής (MYSTIC, SENTRY) έχουν καταγράψει σχετικά καλή δραστηριότητα της ιμιπενέμης και της μεροπενέμης (Turner *et al*, 2003, Gales *et al*, 2001). Η ιμιπενέμη φαίνεται να υπερέχει έναντι της μεροπενέμης στα στελέχη που επικρατούν στις ΗΠΑ ( $MIC_{50/90} = 0.25/16$  και  $1/32$  mg/mL αντίστοιχα) (Jones *et al*, 2006), ενώ μια πρόσφατη μελέτη από τον Ελληνικό χώρο έδειξε την αντίστροφη δραστηριότητα σε 320 στελέχη που ανήκαν τουλάχιστον σε 16 γονότυπους ( $MIC_{50/90} = 8/64$  και  $4/8$  mg/mL αντίστοιχα για ιμιπενέμη και μεροπενέμη) (Ikonomidis *et al*, 2006). Σε περιπτώσεις αντοχής στις καρβαπενέμες η σουλμπακτάμη μόνη της ή σε συνδυασμό με την αμπικιλίνη φαίνεται

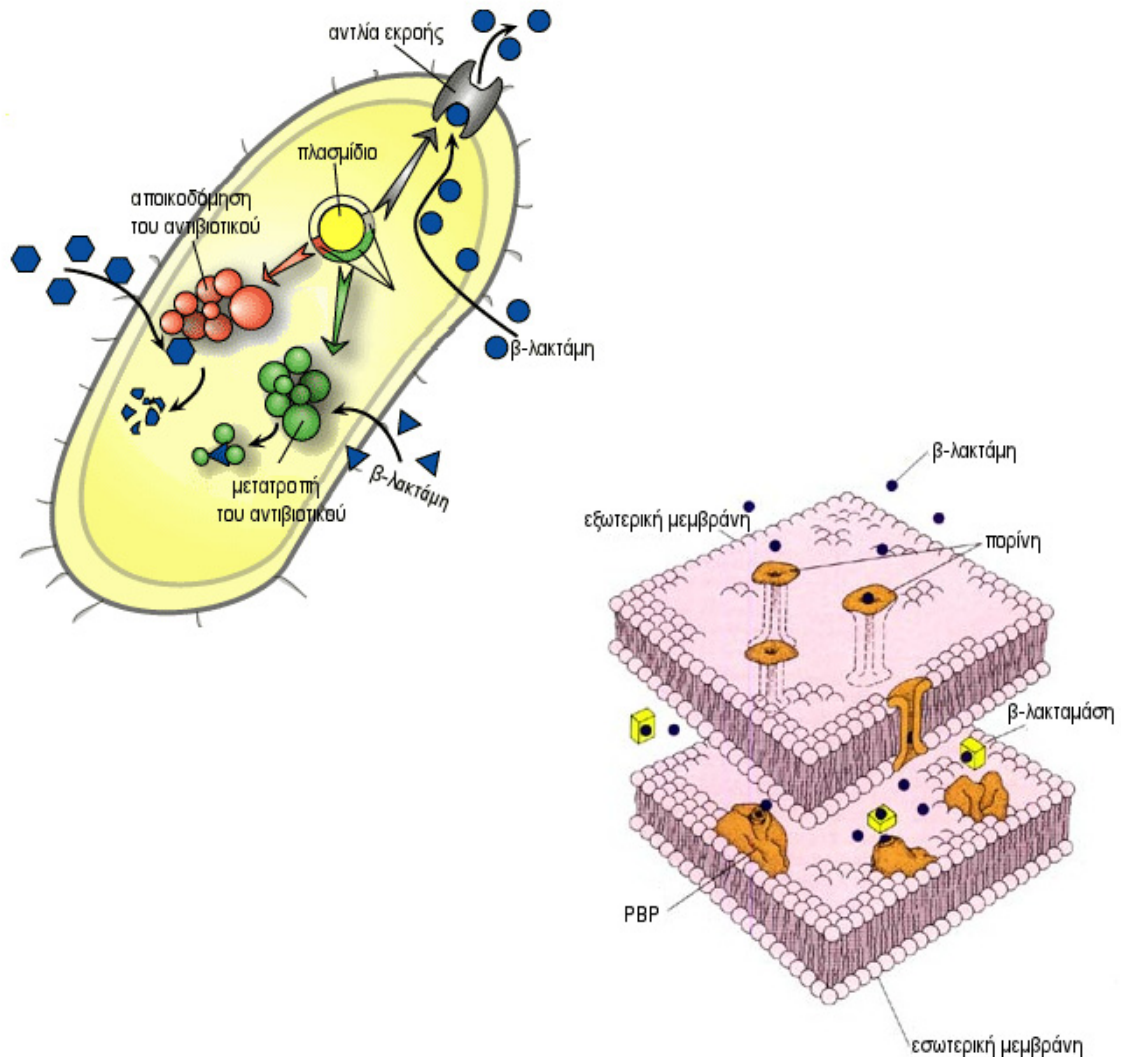
να έχει καλύτερη δραστηριότητα (**Montero et al, 2004**). Η κολιστίνη (παράγωγο πολυμυξίνης E) επίσης είναι φάρμακο εκλογής σε περιπτώσεις πολυανθεκτικών στελεχών, με συνοδά ωστόσο τοξικά αποτελέσματα (**Li et al, 2005**). Η τιγκεκυκλίνη (νέα γλυκυλκυκλίνη) βρίσκεται ακόμα στη φάση των κλινικών δοκιμών, αν και έχουν υπάρξει ήδη σποραδικές αναφορές αντοχής και σε αυτό το φάρμακο (**Insa et al, 2007**). Τα μικτά θεραπευτικά σχήματα προτιμούνται για τρεις κυρίως λόγους: α) στοχεύουν στη συνεργική δράση δύο ή περισσότερων αντιμικροβιακών παραγόντων, β) κάθε παράγοντας χορηγείται σε χαμηλότερες δόσεις από εκείνες που ενδείκνυται όταν χορηγείται μονοθεραπευτικά και έτσι μειώνεται η ενδεχόμενη τοξικότητά του για τον ξενιστή και γ) η συνδυαστική χρήση αντιμικροβιακών δυνητικά αναστέλλει την εμφάνιση αντοχής. Τα σχήματα αυτά περιλαμβάνουν α) β-λακτάμες με αναστολείς β-λακταμασών ή σε συνδυασμό με αμινογλυκοσίδες ή φλουοροκινολόνες, β) αμπικιλίνη/σουλμπακτάμη ή σουλμπακτάμη με κεφεπίμη ή καρβαπενέμη και γ) πολυμυξίνη B, ιμιπενέμη και ριφαμπικίνη (**Ferrara, 2006, Rahal, 2006**). Ωστόσο, η συνδυαστική χορήγηση αντιμικροβιακών παραγόντων δεν έχει ευρέως μελετηθεί σε κλινικό επίπεδο και το πρόβλημα της αντιμετώπισης πολυανθεκτικών στελεχών *A. baumannii* παραμένει άλυτο και ιδιαίτερα σημαντικό. Η βιολογία του είδους, η επιδημιολογία της πολυαντοχής του, αλλά και η μερική έως ανύπαρκτη μερικές φορές εφαρμογή των βασικών μέτρων ελέγχου λοιμώξεων δεν επιτρέπει την καθιέρωση κοινών θεραπευτικών οδηγιών για το *A. baumannii*. Αντίθετα, η εξατομικευμένη θεραπευτική αγωγή σε τοπικό νοσοκομειακό επίπεδο που θα εξάγεται από τα εκάστοτε ενδο-νοσοκομειακά επίπεδα αντοχής των στελεχών φαίνεται να αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο στη βελτίωση της πρόγνωσης των λοιμώξεων από *A. baumannii*.



**ΜΕΡΟΣ II****ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ  
ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ****ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Η αντοχή στις καρβαπενέμες για το *A. baumannii* γίνεται τα τελευταία χρόνια όλο και συχνότερο φαινόμενο σε παγκόσμιο επίπεδο ενώ οι υποκείμενοι μοριακοί μηχανισμοί παραμένουν άγνωστοι, παρά τη συστηματική μελέτη τους. Οι περισσότερες σχετικές μελέτες αναφέρονται στην παραγωγή β-λακταμασών και την περιγραφή τόσο ενδογενών ενζύμων (AmpC και OXA-51) όσο και εξωγενών όπως οι τύπου VIM και IMP μεταλλο-β-λακταμάσες και η OXA-58 οξακιλινάση. Το φάσμα υποστρωμάτων αυτών των ενζύμων ποικίλει και υπάρχουν αλληλόμορφα γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες όπως η οξακιλινάση OXA-24 που υδρολύουν ισχυρά τις καρβαπενέμες. Επίσης, η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για αυτές τις λακταμάσες ρυθμίζεται πολλές φορές από αλληλουχίες εισδοχής (IS στοιχεία), όπως ισχύει για την OXA-58 οξακιλινάση, που ενσωματώνονται κατά το ανάρρουν του γονιδίου και παρέχουν αλληλουχίες ισχυρού υποκινητή. Παρολαυτά, κανένα από τα γονίδια που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα δεν κωδικοποιεί για ένζυμο με τόσο ισχυρή δραστηριότητα καρβαπενεμάσης ώστε να δικαιολογεί πολύ υψηλά επίπεδα αντοχής. Άλλοι μηχανισμοί όπως η ελαττωμένη διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος λόγω μειωμένης έκφρασης πορινών (π.χ. η CarO πορίνη) φαίνεται να δρουν συνεργικά με τις β-λακταμάσες και να προσδίδουν υψηλά επίπεδα αντοχής. Η ύπαρξη επίσης αντλιών ενεργού εκροής διερευνάται συστηματικά σε σχέση με τον πολυανθεκτικό φαινότυπο του είδους, αν και δεν έχουν ακόμα βρεθεί αντλίες που να επηρεάζουν τις καρβαπενέμες. Τέλος, η μελέτη της μειωμένης έκφρασης πενικιλινο-δεσμευτικών πρωτεϊνών στο τοίχωμα της πεπτιδογλυκάνης, οι οποίες εκτός της σύνθεσης του στρώματος πεπτιδογλυκάνης προσδένουν και β-λακταμικά αντιβιοτικά, βρίσκεται σε πολύ πρώιμα στάδια. Τα δεδομένα που θα εξαχθούν από καλά σχεδιασμένες μελέτες του κυτταρικού τοιχώματος σε σχέση με τα στοιχεία που ήδη υπάρχουν στο πεδίο των β-λακταμασών, θα επιτρέψουν τον προσδιορισμό της σχετικής συνεισφοράς κάθε βακτηριακού παράγοντα στην αντοχή στις καρβαπενέμες. Η σημασία αυτών των δεδομένων διαφαίνεται αν κανείς αναλογιστεί πως στις λοιμώξεις της ΜΕΘ επικρατούν

στελέχη *A.baumannii* που εμφανίζουν συχνά πανανθεκτικό χαρακτήρα, με υψηλή έως πολύ υψηλή αντοχή στις καρβαπενέμες στις περισσότερες των περιπτώσεων.



**Εικόνα 7:** Μηχανισμοί αντοχής Gram αρνητικών βακτηρίων στα αντιβιοτικά. Η συνεργική δράση ενδοκυττάρων ενζύμων (β-λακταμάσες) και κυτταρικού τοιχώματος (πορίνες, αντλίες εκροής, πενικιλινο-δεσμευτικές πρωτεΐνες) φαίνεται να ευθύνεται για υψηλά επίπεδα αντοχής (τροποποιημένο από [www.scq.ubc.ca](http://www.scq.ubc.ca), [www.hls.utas.edu.au](http://www.hls.utas.edu.au)).



## II.1. ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ: Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΕΣ

### Ταξινόμηση

Οι πρώτες προσπάθειες ταξινόμησης των β-λακταμασών βάση της λειτουργίας τους άρχισαν όταν οι κεφαλοσπορινάσες διαχωρίστηκαν από τις πενικιλινάσες τη δεκαετία του 1970. Έκτοτε προτάθηκαν διάφορα ταξινομικά σχήματα που στηρίχθηκαν κυρίως στη λειτουργική διάκριση των ενζύμων (**Bush et al, 1995**). Ως υποστρώματα αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν κυρίως η βενζυλοπενικιλίνη με την κεφαλοριδίνη ή την κεφαλοθίνη. Σήμερα, η μοριακή κατάταξη, που είχε αρχίσει ήδη από το 1980 με ελάχιστα διαθέσιμα μοριακά δεδομένα πρωτεϊνικής αλληλουχίας (**Ambler, 1980**), και η κατάταξη που διαχώρισε τις β-λακταμάσες βάση υποστρώματος και αναστολέα (**Bush, 1989a, Bush, 1989b, Bush, 1989c**) είναι τα επικρατέστερα σχήματα στη διεθνή επιστημονική αρθρογραφία.

Η ταξινόμηση κατά Ambler διαχωρίζει τις β-λακταμάσες βάση της αμινοξικής τους αλληλουχίας. Αρχικά προτάθηκαν οι μοριακές τάξεις A και B (**Ambler, 1980**) που περιελάμβαναν ένζυμα με κατάλοιπο σερίνης στο ενεργό κέντρο και ένζυμα που χρειάζονται δισθενή κατιόντα μετάλλων (συνήθως  $Zn^{2+}$ ) για να δράσουν, αντίστοιχα. Ιδιαίτερα η μοριακή τάξη B έχει σήμερα κατηγοριοποιηθεί σε τρεις επιμέρους υποτάξεις (B1, B2 και B3) λόγω της ποικιλομορφίας που παρατηρείται στην αμινοξική αλληλουχία των μελών της (**Galleni et al, 2001**). Οι β-λακταμάσες τύπου VIM και IMP ανήκουν στην υποτάξη B2 και παρουσιάζουν ενδιαφέρον λόγω της παρουσίας τους σε κλινικά στελέχη *A. baumannii*. Αργότερα, άλλες σερινο-β-λακταμάσες που δεν είχαν αμινοξική ομοιότητα με την τάξη A, καταχωρήθηκαν στις μοριακές τάξεις C (**Jaurin et al, 1981**) και D (**Ouellette et al, 1987**). Μόλις πρόσφατα προτάθηκε μία αναθεώρηση (**Hall et al, 2005**) του σχήματος του Ambler για να εξυπηρετήσει την πιο ορθή κατηγοριοποίηση νέων μελών. Σύμφωνα με αυτή, οι β-λακταμάσες χωρίζονται σε σερινο- και μεταλλο-β-λακταμάσες (ομάδα S και M αντίστοιχα). Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τις υποομάδες SA, SC και SD κατ' αντιστοιχία με τις ομάδες του Ambler και η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τις MB (B1 και B2 κατά Ambler) και ME (B3 κατά Ambler).

Στη λειτουργική ταξινόμηση κατά Bush προτείνονται τέσσερις κύριες ομάδες. Η ομάδα 1 περιλαμβάνει κεφαλοσπορινάσες που δεν αναστέλλονται επαρκώς από το κλαβουλανικό οξύ και τη σουλμπακτάμη ενώ δυνητικοί αναστολείς είναι η αζτρεονάμη

και η κλοξακιλίνη. Στην πλειοψηφία τους είναι χρωμοσωμικές και συχνά η δράση τους είναι επαγωγίμη. Τα ένζυμα αυτά ανήκουν στη μοριακή τάξη C κατά Ambler (**Bush, 1989b**). Η ομάδα 2 υποδιαιρείται σε 8 υποομάδες λόγω της ποικιλομορφίας που παρουσιάζουν τα μέλη της ως προς τα υποστρώματα που υδρολύουν. Γενικά τα ένζυμα αυτά αναστέλλονται περισσότερο από το κλαβουλανικό οξύ παρά από την αζτρεονάμη και πολλά από αυτά εμπίπτουν στη μοριακή τάξη A κατά Ambler (**Bush, 1989b, Bush, 1989c**). Η υποομάδα 2a περιλαμβάνει πενικιλινάσες και η 2b ένζυμα που υδρολύουν πενικιλίνες και κεφαλοσπορίνες ευρέος φάσματος. Οι υποομάδες 2be και 2br έχουν προέλθει φυλογενετικά από τη 2b (**Bush et al, 1995**) και περιλαμβάνουν ευρέος φάσματος β-λακταμάσες η πρώτη και ένζυμα με χαμηλή συγγένεια στους αναστολείς των β-λακταμασών η δεύτερη. Στην υποομάδα 2c ανήκουν τα ένζυμα που υδρολύουν την καρβενικιλίνη και αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ ενώ έχουν μικρότερη συγγένεια για την αζτρεονάμη και την κλοξακιλίνη. Στην υποομάδα 2d ανήκουν οι β-λακταμάσες που υδρολύουν την κλοξακιλίνη και δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ αλλά από το χλωριούχο νάτριο σε συγκέντρωση 100mM. Η τάξη D κατά Ambler περιλαμβάνει τα ίδια ένζυμα (**Bush, 1989c**). Η υποομάδα 2e αναφέρεται σε κεφαλοσπορινάσες που όμως αναστέλλονται από χαμηλές συγκεντρώσεις κλαβουλανικού οξέος σε σύγκριση με τα μέλη της πρώτης ομάδας. Ανήκουν στη μοριακή τάξη A κατά Ambler (**Bush, 1989c**). Στην υποομάδα 2f ανήκουν ένζυμα που υδρολύουν τις καρβαπενέμες, αναστέλλονται ασθενώς από το κλαβουλανικό οξύ και φέρουν σερίνη στο ενεργό τους κέντρο (**Bush et al, 1995**). Ανήκουν στην τάξη A κατά Ambler. Η ομάδα 3 κατά Bush περιλαμβάνει β-λακταμάσες που χρειάζονται δισθενή κατιόντα μετάλλων για να δράσουν και για το λόγο αυτό αναστέλλονται από το **EDTA** (**EthyleneDiamineTetraacetic Acid**) και το **pCMB** (**p-ChloroMercuriBenzoate**) ενώ δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ. Ανήκουν στη μοριακή τάξη B κατά Ambler (**Bush, 1989c**). Τέλος, η ομάδα 4 περιλαμβάνει ασυνήθιστες πενικιλινάσες που δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ και δεν έχει οριστεί ακόμα σαφώς η αντιστοιχία τους στο σχήμα του Ambler (**Bush, 1989c**).

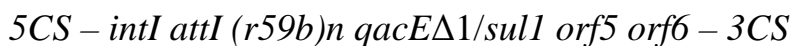
**INTEΓΚΡΟΝΙΑ (Bennett, 1999)**

Το ιντεγκρόνιο είναι μία γενετική δομή που περιλαμβάνει τρία διακριτά μέρη: την 5' συντηρημένη περιοχή (5'-CS) μήκους περίπου 1.4kb, την 3' συντηρημένη περιοχή (3'-CS) μήκους περίπου 2kb και την ενδιάμεση μεταβλητή περιοχή. Η 5'-CS περιοχή φέρει ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για μία ιντεγκράση, ένζυμο που καταλύει τον τοπο-ειδικό ανασυνδυασμό (site-specific recombination) γονιδιακών κασσετών στη συντηρημένη αλληλουχία *attI* που ανευρίσκεται μερικές βάσεις κατά το κατάρρουν του γονιδίου. Οι γονιδιακές κασσέτες είναι διακριτά γενετικά στοιχεία μήκους 500-1000 ζευγών βάσεων που συνήθως αποτελούν τμήμα μεγαλύτερων γενετικών στοιχείων, όπως τα πλασμίδια και το βακτηριακό χρωμόσωμα. Όταν μετακινούνται από τον ένα γενετικό τόπο στον άλλο, θεωρητικά μπορεί να υπάρξουν ως ελεύθερα, κυκλικά μόρια DNA. Οι γονιδιακές κασσέτες φυσιολογικά περιλαμβάνουν ένα μόνο γονίδιο, χωρίς την παρουσία υποκινητή, καθώς και μία μικρή ακολουθία που ονομάζεται γενετικό στοιχείο 59 βάσεων (*59-base element* ή *59be*) κατά το κατάρρουν του εκάστοτε γονιδίου, η οποία εξυπηρετεί τον τοπο-ειδικό γενετικό ανασυνδυασμό. Η διαδοχική τους εισροή μέσα στην ιντεγκρονική δομή δημιουργεί και τη μεταβλητή περιοχή αυτής. Η ιντεγκράση εκτός από την ενσωμάτωση της γονιδιακής κασσέτας καταλύει και την εκτομή της, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα στις κασσέτες των γονιδίων να μεταπηδούν από τον ένα γενετικό τόπο στον άλλο. Τα *cis*-στοιχεία που αναγνωρίζει για τη δράση της είναι το *attI* στοιχείο του ιντεγκρονίου και το στοιχείο 59 βάσεων της γονιδιακής κασσέτας. Στην 3'-CS περιοχή βρίσκονται δύο γονίδια: το ελλειπές γονίδιο αντοχής στο αντισηπτικό τεταρτοταγές αμμώνιο *qacE* (*qacEΔ1*), που είναι συντηγμένο με το γονίδιο αντοχής στις σουλφοναμίδες *sul1*.

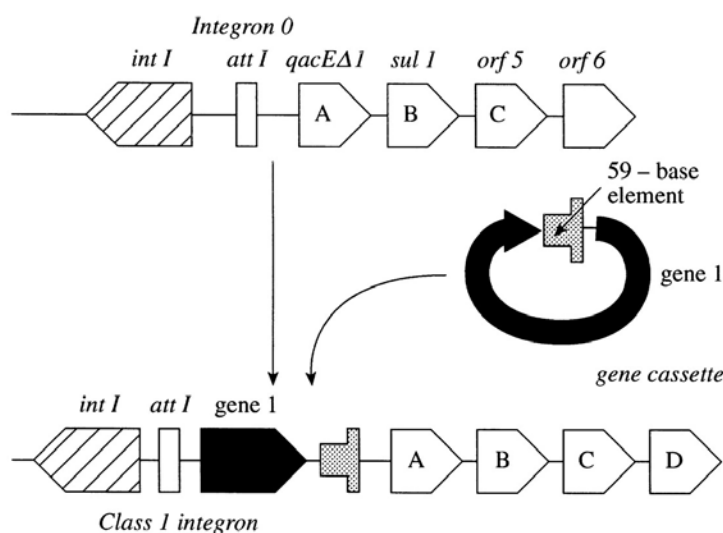
Έχουν αναφερθεί τρία είδη ιντεγκρονίων, καθένα από τα οποία έχει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Τα ιντεγκρόνια τάξης 1 αποτελούν την πλειοψηφία των ιντεγκρονίων που ανευρίσκονται σε κλινικά στελέχη και το πρώτο ιντεγκρόνιο που ανακαλύφθηκε ανήκε σε αυτή την κατηγορία. Ιντεγκρόνιο τάξης 2 χαρακτηρίστηκε στο τρανσποζόνιο Tn7 και περιλαμβάνει τρεις γενετικές κασσέτες δίπλα σε ένα ελλειμματικό γονίδιο ιντεγκράσης ενώ δεν έχει 3'-CS. Τάξης 3 ιντεγκρόνια ανευρίσκονται πιο σπάνια.

Η βασική δομή του ιντεγκρονίου 0 (In0) που ανήκει στην τάξη 1, περιλαμβάνει τις περιοχές 5'-CS και 3'-CS χωρίς την μεταβλητή περιοχή. Στην 5' περιοχή βρίσκονται το γονίδιο της ιντεγκράσης (*intI*) δίπλα στο σημείο ανασυνδυασμού (*attI*) και ένας

υποκινητής (*Pant*) που επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου που ενσωματώνεται στη μεταβλητή περιοχή του ιντεγκρονίου. Στην 3' περιοχή βρίσκονται τα συντηγμένα γονίδια *qacEΔ1/sul1* καθώς και δύο αναγνωστικά πλαίσια *orf5* και *orf6* που κωδικοποιούν πρωτεΐνες αγνώστου λειτουργίας. Επομένως, ένα ιντεγκρόνιο τάξης 1 έχει την ακόλουθη δομή:



όπου *r59b* είναι η γονιδιακή κασσέτα και *n* ο αριθμός των κασσετών. Η ενσωμάτωση μίας ή περισσότερων γονιδιακών κασσετών με επαναλαμβανόμενα γεγονότα ανασυνδυασμού γίνεται πάντα στο σημείο *attI*. Τόσο η ενσωμάτωση όσο και η εκτομή είναι μία τυχαία διαδικασία που δημιουργεί νέες ιντεγκρονικές δομές. Το ποια δομή είναι βιώσιμη εξαρτάται από το προφίλ αντοχής που προσδίδει στο βακτήριο που το αποκτά και επομένως είναι αποκλειστικά θέμα φυσικής επιλογής.

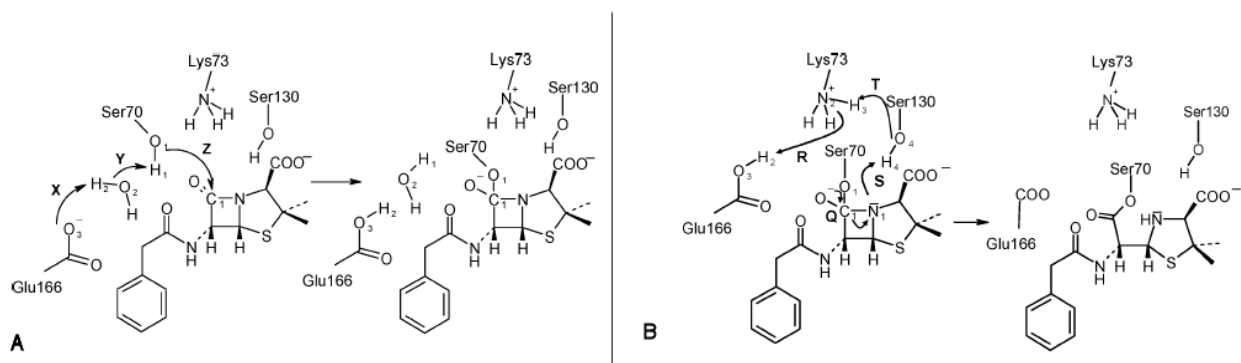


**Εικόνα 8:** Σχηματική αναπαρασταση της ενσωμάτωσης γονιδιακών κασσετών σε ιντεγκρονικές δομές (Bennett, 1999). Διακρίνονται η 5'-CR (*intI*) και η 3'-CR (*qacEΔ1/sul1*) περιοχή καθώς και τα απαραίτητα *cis*-στοιχεία για τον ανασυνδυασμό (*attI* και 59-base element).

### **β-λακταμάσες τάξης A σύμφωνα με τη μοριακή ταξινόμηση κατά Ambler**

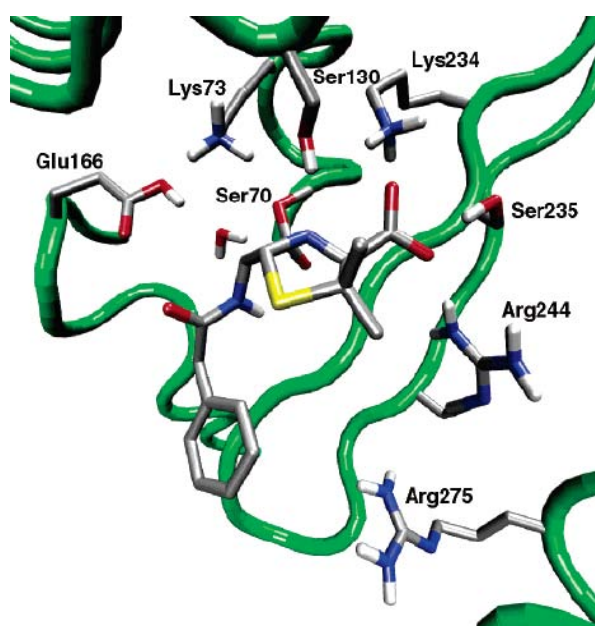
Στις β-λακταμάσες τάξης A τα κρίσιμα αμινοξικά κατάλοιπα είναι το Ser70 που προσβάλλει το λακταμικό δακτύλιο, το Lys 73 που δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με τα Ser70, Ser130, Asn132 και Glu166 και συμμετέχει στο δεύτερο κύκλο ακυλίωσης

καθώς και το Asn170 που μαζί με τα κατάλοιπα Ser70 και Glu166 συγκρατούν με δεσμούς υδρογόνου ένα συντηρημένο μόριο νερού, σημαντικό στον πρώτο κύκλο ακυλίωσης (η αμινοξική αρίθμηση ακολουθεί το πρότυπο κατά **Ambler et al, 1991**). Η αμινομάδα της πλευρικής αλυσίδας του καταλοίπου Asn132 συμβάλλει επίσης στην πρόσδεση του υποστρώματος. Το πρώτο βήμα, μετά την πρόσδεση του υποστρώματος, για την κατάλυση της υδρόλυσης του β-λακταμικού δακτυλίου είναι η ακυλίωση του Ser70. Ένα προσφάτως δημοσιευμένο μοντέλο (**Hermann et al, 2005**) προτείνει αρχικά τη δημιουργία μίας τετραεδρικής δομής κατά την οποία το Glu166 αφαιρεί ένα πρωτόνιο από ένα μόριο νερού που λειτουργεί ως γέφυρα για το κατάλοιπο Ser70, το οποίο και από-πρωτονιώνει. Η σερίνη στη θέση 70 είναι ικανή τώρα να προσβάλει πυρηνόφιλα την καρβονυλική ομάδα του β-λακταμικού δακτυλίου. Κατά την επακόλουθη δεύτερη φάση, δημιουργείται μία αλληλουχία μεταφοράς πρωτονίων στο οποίο αρχικά, το άτομο N που ελευθερώνεται μετά την υδρόλυση του β-λακταμικού δακτυλίου πρωτονιώνεται από το κατάλοιπο Ser130. Το Ser130 δημιουργεί δεσμό υδρογόνου με το Lys73 και ένα δεύτερο πρωτόνιο μεταφέρεται στο Ser130 αφήνοντας πλέον ουδέτερα φορτισμένο το Lys73. Τελικά, το αρχικά πρωτονιωμένο Glu166 μεταφέρει το πρωτόνιο στο Lys73 και το όλο δίκτυο των καταλυτικών αμινοξικών καταλοίπων επανέρχεται στην αρχική του ηλεκτρονιακή κατάσταση. Ο λόγος που το σύστημα οδηγείται στη δεύτερη φάση ακυλίωσης είναι γιατί ο σχηματιζόμενος ακυλοενζυμικός εστέρας είναι πιο σταθερός (κατά τουλάχιστον 15kcal/mol) από την αρχική τετραεδρική δομή.



**Εικόνα 9:** Α. Η πυρηνόφιλη προσβολή του β-λακταμικού δακτυλίου και ο σχηματισμός της τετραεδρικής δομής. Β. Σχηματισμός του ακυλενζύμου. (**Hermann et al, 2005**)

Μία ιδιαίτερη διαμόρφωση των β-λακταμασών που σταθεροποιεί την τετραεδρική δομή που δημιουργείται με την πρόσδεση του υποστρώματος είναι η λεγόμενη “τρύπα οξυανιόντος” (oxyanion hole). Στην TEM-1 β-λακταμάση η εν λόγω δομή σχηματίζεται από τις αμινομάδες των πεπτιδικών δεσμών μεταξύ των κατάλοιπων Met69 – Ser70 και Gly236 – Ala237. Συγκεκριμένα, τα υδρογόνα των αμινομάδων αυτών αλληλεπιδρούν με το καρβονυλικό οξυγόνο της β-λακτάμης και οι σχηματιζόμενοι δεσμοί υδρογόνου ισχυροποιούνται καθώς δημιουργείται η τετραεδρική δομή κατά την πυρηνόφιλη προσβολή. Ο κυριότερος λόγος σταθεροποίησης του συμπλόκου είναι η σταδιακή αύξηση του φορτίου του καρβονυλικού οξυγόνου του β-λακταμικού δακτυλίου που μεγιστοποιείται στη φάση της τετραεδρικής δομής. Σημαντικά επίσης κατάλοιπα στη σταθεροποίηση της δομής αυτής είναι τα Lys234, Ser235, Arg244 και Arg275. Καθώς το Glu166 πρωτονιώνεται, αρνητικό φορτίο μεταφέρεται στο β-λακταμικό δακτύλιο και ενισχύει την αλληλεπίδραση με τα θετικά φορτισμένα Lys234, Ser235 και Arg244 που βρίσκονται σε αντιδιαμετρική θέση του ενεργού κέντρου προς το Glu166 και δημιουργούν μία κοιλότητα που περιβάλλει τη καρβοξυλική πλευρική αλυσίδα του υποστρώματος. Το κατάλοιπο Arg275 δημιουργεί ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με το υπόστρωμα όταν η καρβονυλική ομάδα του τελευταίου αλλάζει στερεοδιαμόρφωση μετά την πυρηνόφιλη προσβολή, σταθεροποιώντας με αυτό το τρόπο τη τετραεδρική δομή.



**Εικόνα 10:** Τετραεδρική δομή για τη TEM-1 β-λακταμάση όπου απεικονίζονται τα απαραίτητα αμινοξικά κατάλοιπα για τη κατάλυση της υδρόλυσης του β-λακταμικού δακτυλίου και τη σταθεροποίηση του συμπλόκου (**Hermann et al, 2005**).

Ένζυμα της ομάδας αυτής που έχουν ανευρεθεί σε κλινικά στελέχη *A. baumannii* ανήκουν στη μεγάλη οικογένεια των ευρέος φάσματος β-λακταμασών (**ESBL – Extended Spectrum β-Lactamases**) τα μέλη της οποίας προέρχονται κατά κύριο λόγο από μεταλλάξεις στα γονίδια  $bla_{TEM}$  και  $bla_{SHV}$  που είναι ιδιαίτερα διαδεδομένα στα εντεροβακτηριακά (**Paterson et al, 2005**). Αν και αυτή η τάξη β-λακταμάσων δεν περιλαμβάνει μέλη που να υδρολύουν τις καρβαπενέμες ωστόσο παρουσιάζει ενδιαφέρον λόγω της ευρείας διασποράς μερικών αντιπροσώπων της, όπως τα γονίδια  $bla_{PER-1}$  και  $bla_{VEB-1}$ , στο γένος *Acinetobacter*.

Το  $bla_{PER-1}$  φαίνεται να είναι χρωμοσωμικό γονίδιο και αποτελεί τμήμα ενός τρανσποζονίου (*Tn1213*) που έχει ανευρεθεί σε διαφορετικά είδη και σε ξεχωριστές γεωγραφικές περιοχές (**Poirel et al, 2005a**). Έχει αναγνωστικό πλαίσιο 924bp και κωδικοποιεί για την PER-1 β-λακταμάση με μήκος προπρωτεΐνης 308aa και μοριακό βάρος 33.5kD που φέρει το μοτίβο S-X-X-K (σερίνη-X-X-λυσίνη, όπου X οποιοδήποτε αμινοξύ) στο ενεργό κέντρο με τα χαρακτηριστικά συντηρημένα κατάλοιπα σερίνης και λυσίνης (**Nordmann et al, 1994**). Η ώριμη πρωτεΐνη είναι κατά 26 αμινοξικά κατάλοιπα μικρότερη λόγω του αποκομένου οδηγού πεπτιδίου και έχει μοριακό βάρος 29kD και ισοηλεκτρικό σημείο 5.4 (**Nordmann et al, 1993**). Η ευρέος φάσματος αυτή β-λακταμάση υδρολύει αποτελεσματικά την αμοξικιλίνη, τη τικαρσιλίνη, τη κεφαλοθίνη και τις ευρέος φάσματος κεφαλοσπορίνες. Αναστέλλεται από το κλαβουλανικό οξύ, τη σουλμπακτάμη, την μιπενέμη και τις κεφαμυκίνες. Είναι η πρώτη ESBL που εντοπίστηκε σε *A. baumannii* στη Τουρκία (**Vahaboglu et al, 1997**) και αργότερα στη Κορέα (**Yong et al, 2003, Jeong et al, 2005**) και στο Βέλγιο (**Naas et al, 2006**). Η φορεία του  $bla_{PER-1}$  έχει συσχετιστεί με ιδιαίτερα λοιμογόνους κλώνους *A. baumannii* (**Vahaboglu et al, 2001**).

Το αναγνωστικό πλαίσιο του  $bla_{VEB-1}$  έχει μήκος 897bp και κωδικοποιεί τη VEB-1 β-λακταμάση με μήκος προπρωτεΐνης 299aa και μοριακό βάρος 33kD. Η αμινοξική αλληλουχία φέρει το μοτίβο S-X-X-K στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και άλλα χαρακτηριστικά για τη τάξη A κατά Ambler μοτίβα όπως το S-D-N (σερίνη-ασπαρτικό-ασπαραγίνη) και το K-T-G (λυσίνη-θρεονίνη-αργινίνη). Η ώριμη πρωτεΐνη έχει μοριακό βάρος 30kD και ισοηλεκτρικό σημείο 5.35 ενώ υδρολύει σημαντικά την αμοξικιλίνη, τη τικαρσιλίνη, τη πιπερακιλίνη, τη κεφοταξίμη, τη κεφταζιδίμη και την αζτρεονάμη (**Poirel et al, 1999**). Η αντοχή στα αντιβιοτικά αυτά αναστρέφεται παρουσία κλαβουλανικού οξέος και για το λόγο αυτό η VEB-1 λακταμάση ανιχνεύεται φαινοτυπικά από τη παρατηρούμενη συνέργεια αυτών των αντιβιοτικών με το

κλαβουλανικό οξύ η οποία επιτείνεται παρουσία κλοξακιλίνης που απενεργοποιεί τις ενδογενείς τύπου AmpC κεφαλοσπορινάσες στο *A. baumannii* (Poirel *et al*, 1999). Σημαντικό επιδημιολογικό στοιχείο είναι επίσης ότι το *bla*<sub>VEB-1</sub> γονίδιο υφίσταται ως γονιδιακή κασσέτα (συνολικό μήκος 1059bp) με 59be μήκους 133bp και ανευρίσκεται σε ιντεγκρόνια τάξης 1 (Poirel *et al*, 1999). Σε μία νοσοκομειακή επιδημία (Poirel *et al*, 2003) η συγκεκριμένη λακταμάση βρέθηκε σε χρωμοσωμικό ιντεγκρόνιο τάξης 1 που έφερε άλλες τέσσερες γονιδιακές κασσέτες που κωδικοποιούσαν για αντοχή στις αμινογλυκοσίδες, στη ριφαμπικίνη και τις οξακιλίνες. Κλωνική διασπορά ανθεκτικών *A. baumannii* στελεχών που έφεραν το *bla*<sub>VEB-1</sub> αναφέρθηκε πρόσφατα για 53 νοσοκομεία της Γαλλίας (Naas *et al*, 2006) ενώ είχε προηγηθεί παρόμοια αναφορά για ασθενείς της ΜΕΘ σε γαλλικό νοσοκομείο (Carbonne *et al*, 2005).

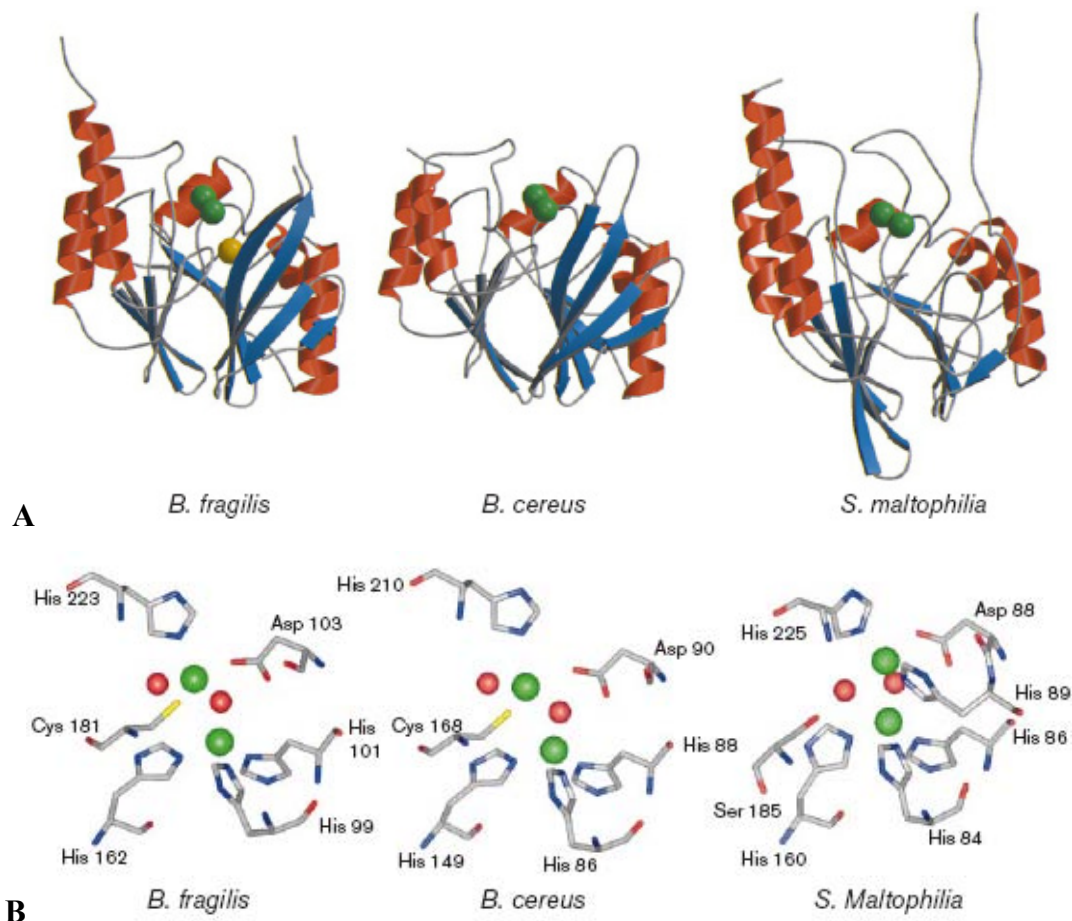
Αντιβιοτικό	VEB-1		
	$V_{max}$ (rel)	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{max}/K_m$ (rel $\mu$ M <sup>-1</sup> )
Βενζυλοπενικιλίνη	100	2.8	100
Αμοξικιλίνη	110	6.0	50
Τικαρσιλίνη	8	1.0	22
Κεφαλοθίνη	700	6.0	325
Κεφαλοριδίνη	2300	12.0	533
Κεφαμαντόλη	800	5.6	397
Κεφοπεραζόνη	140	4.5	86
Κεφτριαξόνη	2900	22.0	366
Κεφοταξίμη	4300	38.0	314
Κεφουροξίμη	2000	24.0	230
Κεφταζιδίμη	8000	460.0	47
Αζτρεονάμη	400	500.0	2

**Πίνακας 4:** Ενδεικτικός πίνακας κινητικών τιμών  $V_{max}$ ,  $K_m$ ,  $V_{max}/K_m$  του VEB-1 (Poirel *et al*, 1999) β-λακταμασών για εύρος αντιμικροβιακών υποστρωμάτων.



**β-λακταμάσες τάξης B σύμφωνα με τη μοριακή ταξινόμηση κατά Ambler**

Στην τάξη αυτή ανήκουν ένζυμα που για τη δράση τους απαιτούν κατιόντα μετάλλων (συνήθως  $Zn^{2+}$ ) ως συμπαραγόνα. Ιδιαίτερα τα ένζυμα των υποτάξεων B1 και B3 πρέπει να προσδέσουν δύο τέτοια κατιόντα ώστε να αποδώσουν τη μέγιστη δραστηριότητά τους. Παρόλο που τα μέλη της τάξης αυτής μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά, η αμινοξική τους αλληλουχία ποικίλλει σημαντικά παρά το γεγονός ότι διατηρούν συντηρημένο το γενικό μοτίβο HXHxD(X)iH(X)jC(X)kH (όπου X οποιοδήποτε αμινοξύ,  $i=55-74$ ,  $j=18-24$  και  $k=37-41$ ) στο οποίο εντοπίζονται τα κρίσιμα αμινοξικά κατάλοιπα που προσδέουν τα κατιόντα ψευδαργύρου. Το ίδιο μοτίβο έχει επίσης αναγνωριστεί σε διάφορες υδρολάσες (Melino *et al*, 1998).



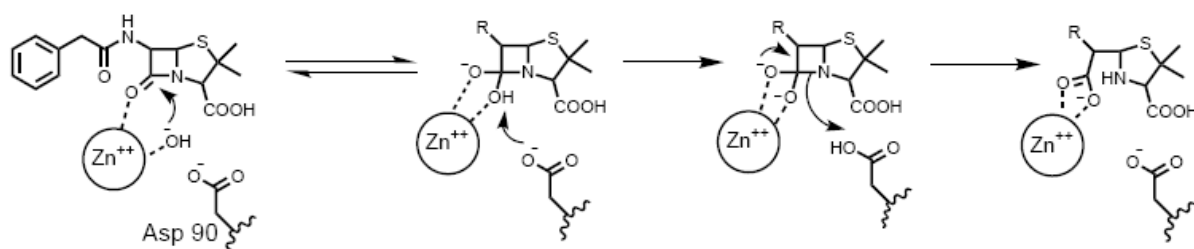
**Εικόνα 11:** Α. Σύγκριση της δευτεροταγής δομής των μεταλλο-β-λακταμασών CcrA (*B. fragilis*), BcII (*B. cereus*) και L1 (*S. Maltophilia*). Τα ιόντα ψευδαργύρου διακρίνονται ως πράσινες σφαίρες και το ιόν νατρίου στο *B. fragilis* φαίνεται κίτρινο. Διακρίνεται ο πυρήνας των β-πτυχωτών φύλλων (μπλε λωρίδες) και οι α-έλικες που τον περιβάλλουν (κόκκινες έλικες) Β. Σύγκριση των κέντρων πρόσδεσης των κατιόντων  $Zn^{2+}$ . Τα ιόντα ψευδαργύρου διακρίνονται ως πράσινες σφαίρες και τα άτομα οξυγόνου των μορίων νερού που συμμετέχουν στη πρόσδεση φαίνονται κόκκινα. Διακρίνεται επίσης η συντηρημένη τριάδα καταλοίπων ιστιδίνης (Wang *et al*, 1998).

Από το 1995 άρχισαν να δημοσιεύονται αναλυτικές κρυσταλλογραφικές μελέτες για τα μεταλλο-ένζυμα BcII του *Bacillus cereus*, CcrA του *Bacteroides fragilis* και L1 του *Stenotrophomonas maltophilia*. Παρά τη χαμηλή αμινοξική τους ομοιότητα, τα ένζυμα αυτά έχουν παρόμοια τρισδιάστατη διαμόρφωση που αντιπροσωπεύεται από μία αβ/βα δομή με δύο β-πτυχωτά φύλλα στο πυρήνα και πέντε α-έλικες στη περιφέρεια (Wang *et al*, 1998). Τα κέντρα πρόσδεσης των κατιόντων  $Zn^{2+}$  βρίσκονται σε μία μεγάλη αύλακα, κάτι που εξασφαλίζει την εύκολη πρόσβαση του υποστρώματος και έτσι το μεγάλο εύρος υδρόλυσης, που σχηματίζεται από τα δύο β-πτυχωτά φύλλα της αβ/βα δομής. Σε κάθε τέτοιο κέντρο βρίσκονται μέχρι και δύο κατιόντα  $Zn^{2+}$ . Το πρώτο (Zn1) ιόν είναι τετραεδρικός συντονισμένο από μία συντηρημένη τριάδα καταλοίπων ιστιδίνης και από ένα ενδιάμεσο μόριο νερού και το δεύτερο (Zn2) ιόν είναι συντονισμένο τριγωνικά-διπυραμιδικά μέσω ενός μορίου νερού και συντηρημένων καταλοίπων ιστιδίνης και κυστεΐνης καθώς και από ένα δεύτερο μόριο νερού και ένα κατάλοιπο ασπαρτικού οξέος. Και στα τρία ένζυμα τα κατιόντα  $Zn^{2+}$  σταθεροποιούνται μέσω δεσμών υδρογόνου στους οποίους συμμετέχουν εκτός των αμινοξικών καταλοίπων και μόρια νερού ενώ στο BcII μεσολαβεί και ένα άτομο νατρίου.

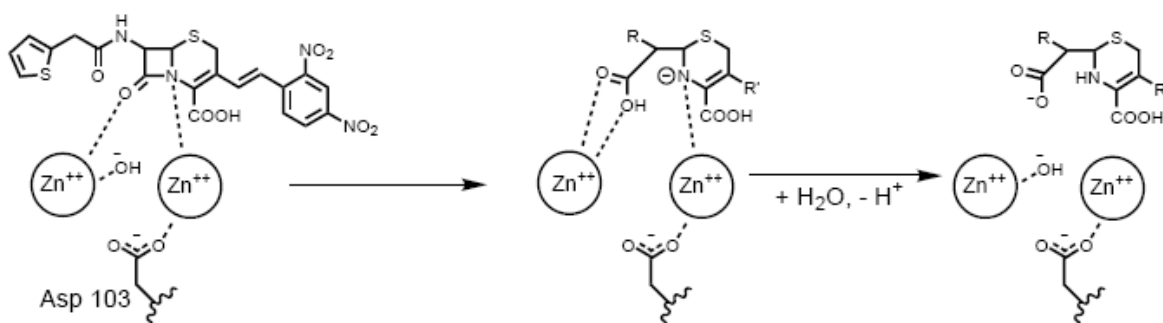
Για την κατάλυση της υδρόλυσης μετά την πρόσδεση των υποστρωμάτων το προτεινόμενο μοντέλο (Wang *et al*, 1998) ορίζει ότι το Zn1 ιόν μαζί με ένα κατάλοιπο ασπαραγίνης (Asn193 για το CcrA και Asn180 για το BcII) ή μία τυροσίνη στο L1 (Tyr191) πολώνει την καρβονυλική ομάδα του β-λακταμικού δακτυλίου και δημιουργεί μία “τρύπα οξυανιόντος” που εξυπηρετεί στην υδρόλυσή του. Το Zn2 βρίσκεται κοντά στο άτομο αζώτου του β-λακταμικού δακτυλίου και γι’ αυτό εικάζεται ότι συμμετέχει στον κατάλληλο προσανατολισμό του υποστρώματος για την επερχόμενη πυρηνόφιλη προσβολή, στην περαιτέρω πόλωση του αμιδικού δεσμού και στη σταθεροποίηση του ενδιάμεσου κατά την αντίδραση υδρόλυσης. Για προφανείς λόγους, είναι πιθανό η απόσταση μεταξύ των ιόντων Zn1 και Zn2 να είναι καθοριστική για τη δραστηριότητα του μεταλλο-ενζύμου. Η μελέτη του μηχανισμού κατάλυσης (Bounaga *et al*, 1998) αποκάλυψε το μοντέλο που φαίνεται στην παρακάτω εικόνα για τα ένζυμα με ένα ιόν  $Zn^{2+}$ . Μετά την πρόσδεση του καρβονυλίου του υποστρώματος στο  $Zn^{2+}$ , το άτομο άνθρακα της καρβονυλικής ομάδας προσβάλλεται πυρηνόφιλα από το υδροξύλιο που είναι ήδη προσδεδεμένο στο ψευδάργυρο. Το οξυανιόν που σχηματίζεται σταθεροποιείται από τον ψευδάργυρο και από το κατάλοιπο Asn180. Το Asp90 αποπρωτονιώνει το οξυανιόν (όξινη κατάλυση) και έτσι δημιουργείται ένα τετραεδρικό διανιόν (ενδιάμεσο) που προωθεί περαιτέρω το νέφος ηλεκτρονίων ώστε να διασπαστεί

ο δεσμός C-N. Ο ρόλος δηλαδή του  $Zn^{2+}$  είναι να προσδέσει το πυρηνόφιλο υδροξύλιο ώστε αυτό σε συνεργασία με το Asp90 να προσανατολίσει τη πυρηνόφιλη προσβολή και να προάγει την όξινη κατάλυση πολώνοντας την καρβονυλική ομάδα του β-λακταμικού δακτυλίου και αυξάνοντας την ηλεκτρονιοφιλία του. Αντίθετα, τα ένζυμα με δύο ιόντα  $Zn^{2+}$  καταλύουν την άνυδρη υδρόλυση του β-λακταμικού δακτυλίου. Συγκεκριμένα, μία ομάδα υδροξυλίου προσδέεται στο Zn1 και η πρόσδεση του υποστρώματος πολώνει το β-λακταμικό δεσμό συντονίζοντας το άτομο άνθρακα στο Zn1 και το άτομο του αζώτου στο Zn2. Η πυρηνόφιλη προσβολή από το υδροξύλιο του Zn1 οδηγεί στη δημιουργία οξυανιόντος που σταθεροποιείται από το Zn1 και το κατάλοιπο Asn193, οδηγώντας σε διάσπαση του C-N δεσμού. Το άτομο αζώτου αποβάλλεται ως ανιόν που σταθεροποιείται από το Zn2 λειτουργώντας ως υπεροξύ και αντικαθιστώντας το πρωτόνιο που αποβάλλεται στο προηγούμενο μηχανισμό του ενός ιόντος  $Zn^{2+}$ . Αυτός ο δεύτερος μηχανισμός οδηγεί σε ιδιαίτερα αυξημένο ποσοστό διάσπασης του δεσμού C-N, με την επιπλέον πόλωσή του που προκαλεί το Zn2 καθώς και την αυξημένη σταθεροποίηση της ομάδας του αζώτου που αποσπάται. Για το λόγο αυτό, τα μεταλλοένζυμα με δύο ιόντα  $Zn^{2+}$  ενδέχεται να είναι εξελικτικός απόγονος των ενζύμων με ένα ιόν λόγω της μεγαλύτερης καταλυτικής τους δραστηριότητας.

**A**



**B**



**Εικόνα 12:** Α. Μηχανισμός κατάλυσης της υδρόλυσης της βενζυλοπενικιλίνης από το BcII μεταλλοένζυμο. Β. Μηχανισμός κατάλυσης της υδρόλυσης της νιτροσεφίνης από το CcrA μεταλλοένζυμο (Wang *et al*, 1998).

Μέχρι σήμερα έχουν ανευρεθεί στο *A. baumannii* οι μεταλλο-β-λακταμάσες τύπου IMP, VIM και SIM-1 (Poirel *et al*, 2006b). Οι τύπου IMP είναι ευρέως διαδεδομένες στο εν λόγω είδος με κύριους αντιπροσώπους την IMP-1 στην Ιταλία (Cornaglia *et al*, 1999), Ιαπωνία (Nishio *et al*, 2004), και Ν. Κορέα (Lee *et al*, 2003), την IMP-2 στην Ιταλία (Ricchio *et al*, 2000) και την Ιαπωνία (Shibata *et al*, 2003), την IMP-4 στο Χονγκ Κονγκ (Chu *et al*, 2001), την IMP-5 στη Πορτογαλία (Da Silva *et al*, 2002), την IMP-6 στη Βραζιλία (Gales *et al*, 2003) και την IMP-11 στην Ιαπωνία (Walsh *et al*, 2005). Αντίθετα οι τύπου VIM είναι ιδιαίτερα σπάνιες στα *Acinetobacter* με μοναδικούς εκπροσώπους τη VIM-1 στην Ελλάδα (Tsakris *et al*, 2006a) και τη VIM-2 στη Ν. Κορέα (Lee *et al*, 2003). Η SIM-1 έχει εντοπιστεί μόνο στη Ν. Κορέα (Lee *et al*, 2005) αν και εικάζεται η ευρεία εξάπλωσή της. Και οι τρεις τύποι ενζύμων σχετίζονται με αντοχή στις καρβαπενέμες και στα β-λακταμικά αντιβιοτικά εκτός της αζτρεονάμης. Είναι γενικό ωστόσο χαρακτηριστικό των μεταλλο-β-λακταμασών το γεγονός ότι παρά τα κοινά χαρακτηριστικά αναδίπλωσης και αρχιτεκτονικής του ενεργού τους κέντρου, η δεσμευτική και η υδρολυτική τους ικανότητα για τις β-λακτάμες ποικίλει όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η πρόσφατα χαρακτηρισισμένη VIM-12 μεταλλο-β-λακταμάση (Kontou *et al*, 2007) που παρά την αμινοξική της ομοιότητα με τη VIM-1 και τη VIM-2 λακταμάση στο αμινο-τελικό και στο καρβοξυ-τελικό άκρο αντίστοιχα, παρουσιάζει στενότερο φάσμα υδρόλυσης. Επίσης, πρόσφατες μελέτες και σε άλλα γένη μικροβίων (Loli *et al*, 2006) υποδεικνύουν ότι οι μεταλλο-β-λακταμάσες δεν επαρκούν για να προσδώσουν υψηλά επίπεδα αντοχής στις καρβαπενέμες και ότι μάλλον αυτό επιτυγχάνεται λόγω της συνύπαρξης άλλων μηχανισμών αντοχής όπως της αδιαβατότητας του κυτταρικού τοιχώματος. Αυτό γίνεται αντιληπτό σε κλωνικά στελέχη που φέρουν μεταλλο-β-λακταμάση αλλά η ευαισθησία τους στις καρβαπενέμες εκτείνεται από τα όρια της ευαισθησίας μέχρι της πλήρους αντοχής.

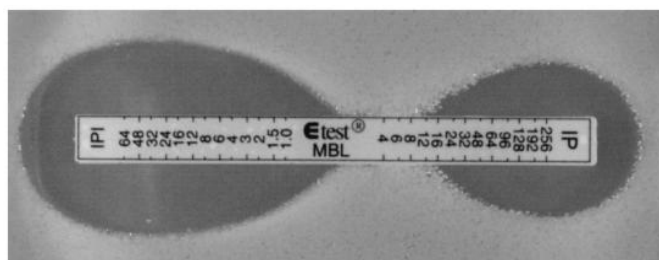
Αντιβιοτικό	IMP-1*			VIM-1			VIM-2		
	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m$ (μM)	$k_{cat}/K_m$ (μM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m$ (μM)	$k_{cat}/K_m$ (μM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m$ (μM)	$k_{cat}/K_m$ (μM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
Πενικιλίνη	320	520	0.62	29	841	0.034	55.8	49	1.14
Αμπικιλίνη	950	200	4.8	37	917	0.04			
Καρβενικιλίνη	ND	ND	0.02	167	75	2.2			
Πιπερακιλίνη	ND	ND	0.72	1860	3500	0.53	32.7	72	0.45
Τικαρσυλίνη	1.1	740	0.0015	452	1117	0.41	31.7	46	0.69
Νιτροσεφίνη	63	27	2.3	95	17	5.6			
Κεφαλοθίνη	48	21	2.4	281	53	5.3	56.2	44	1.28
Κεφοξιτίνη	16	8	2	26	131	0.2	3	24	0.12
Κεφταζιδίμη	8	44	0.18	60	794	0.076	89	98	0.90
Κεφοταξίμη	1.3	4	0.35	169	247	0.68	27.5	32	0.86
Κεφεπίμη	7	11	0.66	549	145	3.8	4.7	184	0.03
Ιμιπενέμη	46	39	1.2	2.0	1.5	1.3	9.9	10	0.99
Μεροπενέμη	50	10	0.12	13	48	0.27	1.4	5	0.28
Αζτρεονάμη	>0.01	>1000	<1 x 10 <sup>-5</sup>	<0.01	>1000	<1 x 10 <sup>-5</sup>	<0.5	ND	ND
Ταζομπακτάμη	>1000	>3.98	0.0039	5.3	337	0.016			

\* ND, μη προσδιορισμένες τιμές

**Πίνακας 5:** Ενδεικτικός πίνακας κινητικών τιμών  $k_{cat}$ ,  $K_m$ ,  $k_{cat}/K_m$  των IMP-1, VIM-1 και VIM-2 μεταλλο-β-λακταμασών για εύρος αντιμικροβιακών υποστρωμάτων (Walsh *et al*, 2005). Είναι χαρακτηριστική η ποικιλομορφία στην ικανότητα πρόσδεσης ( $K_m$ ) και υδρόλυσης ( $k_{cat}$ ) που εμφανίζουν παρά τη κοινή δομή του ενεργού τους κέντρου.

Σε αντίθεση με τις σερινο-β-λακταμάσες, οι μεταλλο-β-λακταμάσες αναστέλλονται από χηλικούς παράγοντες όπως το EDTA διότι δεσμεύουν τα δισθενή κατιόντα των μετάλλων που χρειάζεται αυτή η τάξη των ενζύμων για να δράσει. Πολλές διαγνωστικές φαινοτυπικές δοκιμασίες εκμεταλλεύονται το χαρακτηριστικό αυτό για την ανίχνευση μεταλλο-β-λακταμασών στα Gram αρνητικά βακτήρια με πιο διαδεδομένη την Etest MBL (AB BIODISK, Solna, Sweden). Η δοκιμασία αυτή αποτελείται από μία ταινία με βαθμίδωση συγκέντρωσης ιμιπενέμης από τη μία πλευρά και ιμιπενέμης με EDTA από την άλλη. Διαφορά στην MIC από τη πλευρά της

ιμιπενέμης με το EDTA  $\geq 8$  φορές εκείνης από την πλευρά της ιμιπενέμης, θεωρείται ενδεικτική ύπαρξης μεταλλο-β-λακταμάσης.



**Εικόνα 13:** Δοκιμασία Etest MBL σε στέλεχος *Serratia marcescens* που εκφράζει την IMP-1 μεταλλο-β-λακταμάση. Η MIC της ιμιπενέμης μειώθηκε από 16  $\mu\text{g/ml}$  σε  $< 1 \mu\text{g/ml}$  μετά την έκθεση σε EDTA (Walsh *et al*, 2002).

Η συγκεκριμένη δοκιμασία φαίνεται να έχει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα όταν το βακτήριο καλλιεργείται σε Mueller Hinton agar (Walsh *et al*, 2002) εάν και υπάρχουν αναφορές που συστήνουν προσεκτική αξιολόγησή της (Segal *et al*, 2005b) λόγω της ιδιότητας του EDTA να επηρεάζει τη δράση και των OXA-τύπου καρβαπενεμασών. Ένα άλλο διαγνωστικό πρόβλημα με τη συγκεκριμένη δοκιμασία είναι η ύπαρξη ευαίσθητων στην ιμιπενέμη στελεχών ( $\text{MIC} \leq 4\text{mg/L}$ ) θετικών για μεταλλο-β-λακταμάση, που κάνει αδύνατη την οπτική ανίχνευση της συνέργειας της ιμιπενέμης με το EDTA. Σε τέτοια στελέχη εφαρμόζονται τεχνικές που βασίζονται στην ίδια αρχή, με τη διαφορά ότι τόσο η ιμιπενέμη όσο και το EDTA ενσωματώνονται σε δισκία (DDST – double disk synergy test, combined-disk test) και σε σταθερή συγκέντρωση, η δε συνεργική τους δράση συνάγεται από την αύξηση στην άλω αναστολής του βακτηρίου (Franklin *et al*, 2006).

### **β-λακταμάσες τάξης C σύμφωνα με τη μοριακή ταξινόμηση κατά Ambler**

Η τύπου AmpC β-λακταμάση είναι χρωμοσωμική και είναι η μοναδική κεφαλοσπορινάση που έχει ανευρεθεί σε *A. baumannii* μέχρι σήμερα (Bou *et al*, 2000a, Segal *et al*, 2004). Το πρώτο αλληλόμορφο που κλωνοποιήθηκε είχε αναγνωστικό πλαίσιο 1152bp και η παραγόμενη πρωτεΐνη είχε pI 9.4 και μήκος 383aa (Bou *et al*, 2000a). Περιείχε τα τυπικά μοτίβα σερίνο-β-λακταμασών (SXSK, YXN και KTG) και η δράση της αναστελλόταν μετρίως από τη σουλμπακτάμη και την ταζομπακτάμη ενώ δεν υδρόλυε την ιμιπενέμη. Εκτός από μία θέση Shine-Dalgarno (AGGAG) για τη

πρόσδεση του ριβοσώματος κατά το ανάρρουν του γονιδίου, η εκατέρωθεν νουκλεοτιδική αλληλουχία δεν εμφάνισε ιδιαίτερα γενετικά στοιχεία. Ωστόσο, άλλο κλωνοποιημένο αλληλόμορφο (Segal *et al*, 2004) εμφάνισε 35 νουκλεοτίδια κατά το ανάρρουν του κωδικονίου έναρξης μία νουκλεοτιδική αλληλουχία με στοιχεία αλληλουχίας εισδοχής. Μέσα σε αυτή την αλληλουχία εντοπίστηκαν -10 και -35 στοιχεία υποκινητή ενώ η θέση Shine-Dalgarno εντοπίστηκε 7bp κατά το ανάρρουν του κωδικονίου έναρξης.

Σχετικά πρόσφατα (Corvec *et al*, 2003) μελετήθηκε η διαφορά στην ευαισθησία της κεφαζιδίμης σε σχέση με την έκφραση του *bla*<sub>AmpC</sub> γονιδίου. Η μελέτη έδειξε πως μία αλληλουχία με χαρακτηριστικά αλληλουχίας εισδοχής συσχετιζόταν με υπερέκφραση του γονιδίου και αυξημένη αντοχή. Η αλληλουχία αυτή ονομάστηκε *ISAbal* και παρουσιάζει ανεστραμμένες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 11bp που περιβάλλονται από επαναλήψεις των 9bp, οι οποίες μαζί με την τρανσποζάση που κωδικοποιείται από την ίδια την αλληλουχία εξυπηρετούν τη μετάθεση της όλης γενετικής δομής. Η ίδια αλληλουχία ήταν αυτή που βρέθηκε στην προηγούμενη μελέτη (Segal *et al*, 2004) και η οποία παρείχε υποκινητή μεταγραφής στο *bla*<sub>AmpC</sub> γονίδιο. Άλλη μελέτη (Segal *et al*, 2005a) έδειξε την αφθονία της *ISAbal* αλληλουχίας στο *A. baumannii* και για το λόγο αυτό εικάζεται ότι η αυξημένη αντοχή του είδους στη κεφαζιδίμη (Heritier *et al*, 2006) αλλά και σε άλλα αντιβιοτικά όπως οι καρβαπενέμες (Turton *et al*, 2006c) σχετίζεται και με την υπερέκφραση γονιδίων που προκαλείται από την εν λόγω δομή. Σε φαινοτυπικό επίπεδο, η υπερέκφραση της AmpC κεφαλοσπορινάσης και η συμμετοχή της στην αντοχή του βακτηρίου σε κάποιο αντιμικροβιακό παράγοντα ανιχνεύεται από τη συνεργική δράση του τελευταίου με την κλοξακιλίνη (Corvec *et al*, 2003).

### **β-λακταμάσες τάξης D σύμφωνα με τη μοριακή ταξινόμηση κατά Ambler**

Στο *A. baumannii* έχουν χαρακτηριστεί τέσσερις ομάδες οξακιλινασών που προσδίδουν έστω και μερική αντοχή στις καρβαπενέμες. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τις OXA-23 και OXA-27 που παρουσιάζουν 99% αμινοξική ομοιότητα μεταξύ τους ενώ ομοιάζουν κατά 60% με τη δεύτερη ομάδα των OXA-24, OXA-25, OXA-26 και OXA-40 οξακιλινασών (Afzal-Shah *et al*, 2001, Bou *et al*, 2000b, Heritier *et al*, 2003). Τα μέλη της δεύτερης ομάδας διαφέρουν σε μερικά μόνο αμινοξέα και ομοιάζουν μεταξύ τους κατά 98% (Afzal-Shah *et al*, 2001). Η OXA-58 αποτελεί από μόνη της την τρίτη

ομάδα και ομοιάζει κατά 48% και 47% με τις OXA-23 και OXA-24 αντίστοιχα (**Poirel et al, 2005b**) ενώ η πρόσφατα χαρακτηρισμένη OXA-51 μοιράζεται 62% και 56% αμινοξική ομοιότητα με τις OXA-40 και OXA-23 αντίστοιχα (**Brown et al, 2005a**). Πειράματα αδρανοποίησης των παραπάνω οξακιλινασών και μετασχηματισμού πρότυπων στελεχών τόσο με φυσικά όσο και με ανασυνδυασμένα πλασμίδια (**Heritier et al, 2005a**) έδειξαν ότι οι OXA-23 και OXA-40 μπορούν να προσδώσουν υψηλή αντοχή ( $MIC > 16 \mu\text{g/ml}$ ) στις καρβαπενέμες σε αντίθεση με την OXA-58 ( $MIC \leq 2 \mu\text{g/ml}$ ). Ωστόσο ο μετασχηματισμός με φυσικά πλασμίδια που φέρουν τις OXA-23 και OXA-58 είχε ως αποτέλεσμα υψηλότερη αντοχή των μικροβίων απ' ότι ο μετασχηματισμός με ανασυνδυασμένους φορείς που έφεραν τα ίδια γονίδια μόνα. Πιθανή εξήγηση του φαινοτύπου αυτού είναι η ύπαρξη αλληλουχιών εισδοχής στα φυσικά πλασμίδια που επάγουν την υπερέκφραση των κατά το κατάρρουν οξακιλινασών.

Αρχικά η OXA-23 απομονώθηκε αρχικά από ένα κλινικό στέλεχος *A. baumannii* στο Εδιμβούργο της Μ.Βρετανίας το 1985 και χαρακτηρίστηκε γενετικά το 2000 (**Donald et al, 2000**) με την επωνυμία ARI-1. Έκτοτε έχουν δημοσιευτεί επιδημικές εξάρσεις *A. baumannii* που είναι φορείς OXA-23 ανά τον κόσμο με παραδείγματα τη Βραζιλία (**Dalla-Costa et al, 2003**), τη Κορέα (**Jeon et al, 2005**) και την Ταϊτή (**Naas et al, 2005**). Η φορεία του γονιδίου είναι πλασμιδιακή και το αναγνωστικό του πλαίσιο (822bp) κωδικοποιεί 273 αμινοξέα με pI 6.65 (η OXA-27 έχει λίγο μεγαλύτερο - pI = 6.8 (**Afzal-Shah et al, 2001**) - που συμφωνεί με τη μετάλλαξη Asn247Lys), μέσα στα οποία εντοπίζονται τα συντηρημένα μοτίβα σερινο-β-λακταμασών S-T-F-K και K-T-G καθώς και F-G-N (η τυροσίνη στο μοτίβο Y-G-N έχει υποκατασταθεί από φαινυλαλανίνη) (**Donald et al, 2000**). Εκατέρωθεν του γονιδίου εντοπίστηκαν αλληλουχίες που δημιουργούν την εικόνα μιας γονιδιακής κασέτας που ενσωματώθηκε κατά το κατάρρουν ενός ενεργού υποκινητή αν και ο ακριβής μηχανισμός ανασυνδυασμού του γονιδίου στο χρωμόσωμα παραμένει αδιευκρίνιστος.

Η OXA-24 χαρακτηρίστηκε το 2000 (**Bou et al, 2000b**) από ένα κλινικό στέλεχος *A. baumannii* στην Ισπανία ως χρωμοσωμική καρβαπενεμάση της ομάδας D κατά Ambler και σε αντίθεση με τις άλλες οξακιλινάσες δεν υδρολύει την οξακιλίνη, τη κλοξακιλίνη και τη μεθικιλίνη. Το γονίδιο (825bp) κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη 274 αμινοξέων με pI 9.0 (η OXA-25 και η OXA-26 έχουν χαμηλότερα pI - 7.9 και 8.0 αντίστοιχα (**Afzal-Shah et al, 2001**) - που εξηγείται από τη παρουσία επιπρόσθετων



γλουταμικών στις δομές τους) που διατηρεί το μοτίβο S-T-F-K. Ωστόσο τα μοτίβα Y-G-N και K-T-G έχουν αντικατασταθεί με τα αντίστοιχα F-G-N και K-S-G. Η περιοχή εκατέρωθεν του γονιδίου δεν υποδεικνύει κάποιο μεταθετό στοιχείο και έτσι η εντόπιση του *bla*<sub>OXA-24</sub> στο χρωμόσωμα παραμένει αδιευκρίνιστη. Η OXA-24 υδρολύει τις καρβαπενέμες και παραδόξως αναστέλλεται από το NaCl (**Bou et al, 2000b**). Με αυτό τον τρόπο η παρουσία της με τη συνεργική δράση αναστολέα και αντιβιοτικού γίνεται αισθητή λόγω της μείωσης της MIC.

Η OXA-40 β-λακταμάση χαρακτηρίστηκε γενετικά και βιοχημικά το 2003 (**Heritier et al, 2003**). Ανιχνεύθηκε σε κλινικό πολυανθεκτικό στέλεχος *A. baumannii* στην Πορτογαλία και είναι χρωμοσωμική τάξης D β-λακταμάση που ανήκει στην ίδια ομάδα με τις OXA-24, OXA-25 και OXA-26 και από τις οποίες διαφέρει σε ένα ή δυο αμινοξέα. Ένα χρόνο νωρίτερα είχε δημοσιευτεί επιδημική έξαρση του γονιδίου στην Ισπανία (**Lopez-Otsoa et al, 2002**) ενώ το 2004 (**Da Silva et al, 2004**) η αντοχή του *A. baumannii* στις καρβαπενέμες στην Ιβηρική Χερσόνησο συσχετίστηκε με τη διασπορά ενός κλώνου που έφερε το *bla*<sub>OXA-40</sub>. Το γονίδιο (828bp) έχει G+C περιεκτικότητα 35% (μη αναμενόμενο για το *A. baumannii* που έχει αντίστοιχη περιεκτικότητα 39-47%) και κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη 275 αμινοξέων που διαθέτει τα μοτίβα S-T-F-K, K-S-G αντί του K-T-G και F-G-N αντί του Y-G-N. Επίσης, 500bp κατά το ανάρρουν του γονιδίου βρέθηκε ομοιότητα με τμήμα του γονιδίου που κωδικοποιεί για το 16SrRNA στο *A. baumannii*. Αυτό υποδεικνύει τη χρωμοσωμική εντόπιση του *bla*<sub>OXA-40</sub>. Η OXA-40 έχει στενό φάσμα δράσης που περιλαμβάνει κυρίως πενικιλίνες. Υδρολύει την οξακιλίνη και μερικώς την ιμιπενέμη, ενώ δεν υδρολύει τη μεροπενέμη. Επίσης υδρολύει μερικώς τη κεφταζιδίμη. Το ένζυμο αναστέλλεται μερικώς από το κλαβουλανικό οξύ, τη ταζομπακτάμη και τη σουλμπακτάμη αλλά όχι από το NaCl. Στη συγκεκριμένη καρβαπενεμάση μελετήθηκε και ο ρόλος της τυροσίνης στη θέση 144 (στο μοτίβο F-G-N). Πειράματα μεταλλαξιγένεσης και μετασχηματισμού με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια (**Heritier et al, 2003**) έδειξαν ότι το ένζυμο με τυροσίνη στη θέση 144 αντί για φαινυλαλανίνη έχει μεγαλύτερη δραστηριότητα σε όλα τα υποστρώματα (μέχρι 24 φορές μεγαλύτερη για την ιμιπενέμη) εκτός της κεφαλοθίνης και της κεφταζιδίμης. Επίσης ενώ η αναστολή από την ταζομπακτάμη και τη σουλμπακτάμη είναι ίδια, η αναστολή από το κλαβουλανικό οξύ είναι τρεις φορές μεγαλύτερη για το ένζυμο που διαθέτει τη τυροσίνη. Τέλος, η αντικατάσταση της τυροσίνης από τη φαινυλαλανίνη αποκατέστησε και την αναστολή από το NaCl.

Μόλις το 2005 (**Brown et al, 2005a**) χαρακτηρίστηκε η OXA-51 από κλινικά στελέχη *A. baumannii* στην Αργεντινή. Το αντίστοιχο γονίδιο φαίνεται να είναι χρωμοσωμικό και δεν υπάρχουν ευρήματα που να το συσχετίζουν με δομή ιντεγκρονίου. Το *bla*<sub>OXA-51</sub> (825bp) κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη 274 αμινοξέων με pI 7.0 που διαθέτει τα μοτίβα S-T-F-K, K-S-G αντί του K-T-G, και Y-G-N. Σε αντίθεση με τις άλλες καρβαπενεμάσες τάξης D που διαθέτουν το μοτίβο S-X-V, η OXA-51 έχει ισολευκίνη στη θέση της βαλίνης. Το ένζυμο υδρολύει βραδέως την οξακιλίνη και την κλοξακιλίνη καθώς και την ιμιπενέμη παρά τη μεγάλη συγγένεια που έχει για το υπόστρωμα αυτό, ενώ δεν υδρολύει τη μεροπενέμη. Αναστολείς της OXA-51 είναι το κλαβουλανικό οξύ, η σουλμπακτάμη και το NaCl. Ειδικά για το *bla*<sub>OXA-51</sub> γονίδιο, αυτό φαίνεται να είναι ενδογενές στο είδος *A. baumannii* (**Turton et al, 2006a**) και πλέον η ανίχνευσή του με PCR επιτρέπει και τη ταυτοποίηση του είδους. Το μοναδικό μειονέκτημα στην τεχνική αυτή ταυτοποίησης είναι ο συνεχώς αυξανόμενος αριθμός αλληλομόρφων. Το 2005 (**Brown et al, 2005b**) μία διηπειρωτική μελέτη σε κλινικά στελέχη *A. baumannii* αποκάλυψε την ύπαρξη επτά ακόμα καρβαπενεμασών τάξης D (OXA-64, OXA-65, OXA-66, OXA-68, OXA-69, OXA-70 και OXA-71) που ανήκαν στην ομάδα της OXA-51 και διαφέρουν από αυτή σε τρία έως οκτώ αμινοξέα. Όλες οι νέες πρωτεΐνες είχαν το μοτίβο S-X-I (όπως η OXA-51) αντί του S-X-V καθώς και διατηρημένα τα μοτίβα Y-G-N και K-S-G. Με τα παραπάνω ευρήματα, η ομάδα της OXA-51 αξιολογήθηκε ως αυτή με τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία στο *A. baumannii*. Μία πρόσφατη έρευνα στον Ελληνικό χώρο έδειξε την επικράτηση του *bla*<sub>OXA-66</sub> αλληλομόρφου (**Ikonomidis et al, 2007**).

Η OXA-58 β-λακταμάση περιγράφηκε το 2005 (**Poirel et al, 2005b**) σε ένα κλινικό στέλεχος *A. baumannii* της Γαλλίας ως πλασμιδιακή καρβαπενεμάση της μοριακής τάξης D κατά Ambler. Μία άλλη μελέτη (**Marque et al, 2005**) έδειξε την πανευρωπαϊκή εξάπλωση αυτής της καρβαπενεμάσης ενώ έχουν δημοσιευτεί επιδημικές εξάρσεις της OXA-58 στη Γαλλία (**Heritier et al, 2005b**) και την Ελλάδα (**Pournaras et al, 2006**). Το *bla*<sub>OXA-58</sub> (843bp) κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη 280 αμινοξέων με pI 7.2 που διαθέτει τα μοτίβα S-T-F-K, K-S-G αντί του K-T-G και Y-G-N. Κατά το κατάρρουν του γονιδίου βρέθηκε ένα IS στοιχείο (*ISAb<sub>a3</sub>*) 800 βάσεων που διαθέτει ανεστραμμένες επαναλήψεις 21bp σε μήκος και κωδικοποιεί για μία τρανσποζάση 145 αμινοξέων. Παρόμοιο *ISAb<sub>a3</sub>* στοιχείο βρέθηκε και κατά το ανάρρουν του *bla*<sub>OXA-58</sub> στο οποίο η αριστερή ανεστραμμένη επαναλαμβανόμενη αλληλουχία είναι 17 βάσεις μακριά από το εναρκτήριο κωδικόνιο του γονιδίου. Από τα

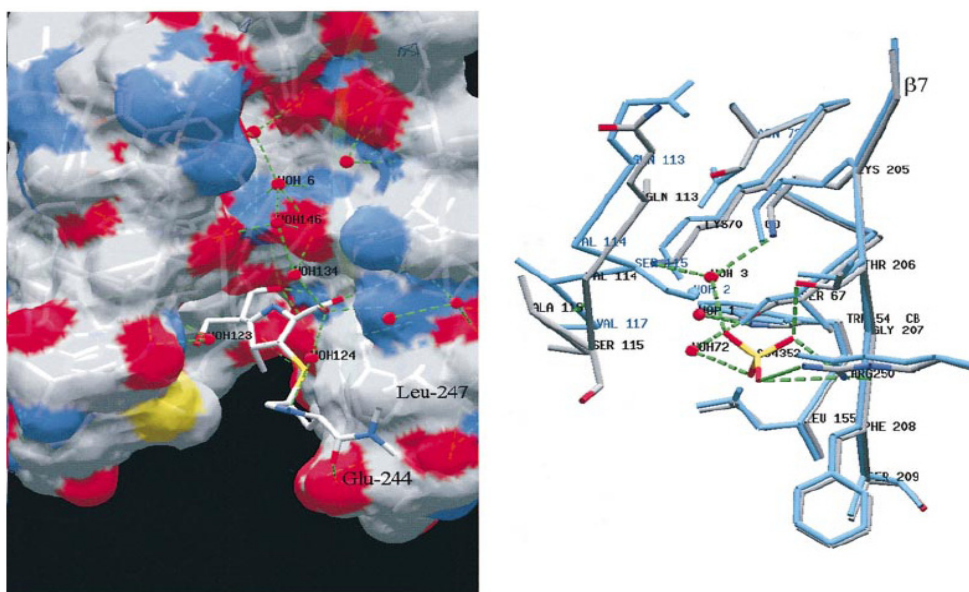
ευρήματα αυτά φάνηκε πως το  $bla_{OXA-58}$  είναι μέρος ενός σύνθετου τρανσποζονίου. Η OXA-58 είναι στενού φάσματος β-λακταμάση που υδρολύει κυρίως πενικιλίνες. Η υδρόλυση της ιμιπενέμης είναι μικρή ενώ η OXA-58 δεν υδρολύει τη μεροπενέμη, εάν και η συγγένεια του ενζύμου είναι μεγάλη για το υπόστρωμα αυτό. Το ένζυμο αναστέλλεται μερικώς από το κλαβουλανικό οξύ, την ταζομπακτάμη και τη σουλμπακτάμη αλλά η αναστολή είναι ισχυρή από το NaCl.

Αντιβιοτικό	OXA-40		OXA-58		OXA-69	
	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\mu M^{-1}s^{-1}$ )	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\mu M^{-1}s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\mu M^{-1}s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\mu M^{-1}s^{-1}$ )
Πενικιλίνη	5	220	5.5	110	0.2	0.28
Αμπικιλίνη	5	20	1	8	0.06	0.25
Πιπερακιλίνη	1	50	2.5	50	0.2	0.11
Τικαρσιλίνη	1	20	1	4	0.3	0.05
Κεφαλοθίνη	3	50	0.1	1	0.004	0.02
Κεφαλοριδίνη	5	5	-	-	0.05	0.02
Οξακιλίνη	2	0.03	1.5	2	0.2	0.06
Κεφοταξίμη	-	-	-	-	-	-
Κεφταζιδίμη	20	10	-	-	-	-
Ιμιπενέμη	0.1	15	0.1	13.5	0.1	0.03
Μεροπενέμη	-	-	<0.01	<0.15	0.06	0.01

**Πίνακας 6:** Ενδεικτικός πίνακας κινητικών τιμών  $k_{cat}$ ,  $k_{cat}/K_m$  των OXA-40, OXA-58 και OXA-69 β-λακταμασών για εύρος αντιμικροβιακών υποστρωμάτων (Walther-Rasmussen *et al*, 2006).

Το 2001 περιγράφηκε η κρυσταλλική μορφή της OXA-13 (Pernot *et al*, 2001) στο *P. aeruginosa* στη φυσική της μορφή και προσδεδεμένη στη μεροπενέμη. Η OXA-13 είναι διμερής πρωτεΐνη και τα μονομερή της συγκρατούνται με δεσμούς υδρογόνου και ιονικούς δεσμούς μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων συμμετρικών αμινοξικών καταλοίπων (π.χ. Glu86 και Lys182, Glu86 και Asn176, Glu190 και His203). Μόρια νερού σταθεροποιούν το διμερές μέσω δεσμών υδρογόνου. Η πρωτεΐνη χωρίζεται σε δύο περιοχές από τις οποίες η μία περιλαμβάνει πέντε α-έλικες ( $\alpha 3$ , -4, -5, -6 και -8) και η άλλη διαθέτει επτά β-πτυχωτά φύλλα ( $\beta 1$ , -2, -3, -6, -7, -8 και -9) ενώ

καλύπτεται από τις N- και C-τελικές έλικες ( $\alpha 1$  και  $\alpha 9$ ) καθώς επίσης και από τη μία εκ των δύο ελίκων που φέρει τον  $\Omega$  βρόγχο ( $\alpha 7$ ). Στην OXA-13 έχει εντοπιστεί ένας δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ των καταλοίπων κυστεΐνης στις θέσεις 44 και 51. Ο ηλεκτρονιακός χάρτης ωστόσο διαφέρει μεταξύ του φυσικού ενζύμου και του συμπλέγμάτος του με τη μεροπενέμη. Οι σημαντικότερες διαφορές αναφέρονται στη μετατόπιση των τριών βρόγχων που σχηματίζονται από τις έλικες  $\alpha 3$  και  $\alpha 4$  (κατάλοιπα 90-105), τις έλικες  $\alpha 4$  και  $\alpha 5$  (όπου περιλαμβάνεται η σερίνη 115 που συμμετέχει στο ενεργό κέντρο) και από τα φύλλα  $\beta 7$  και  $\beta 8$  (κατάλοιπα 212-217).

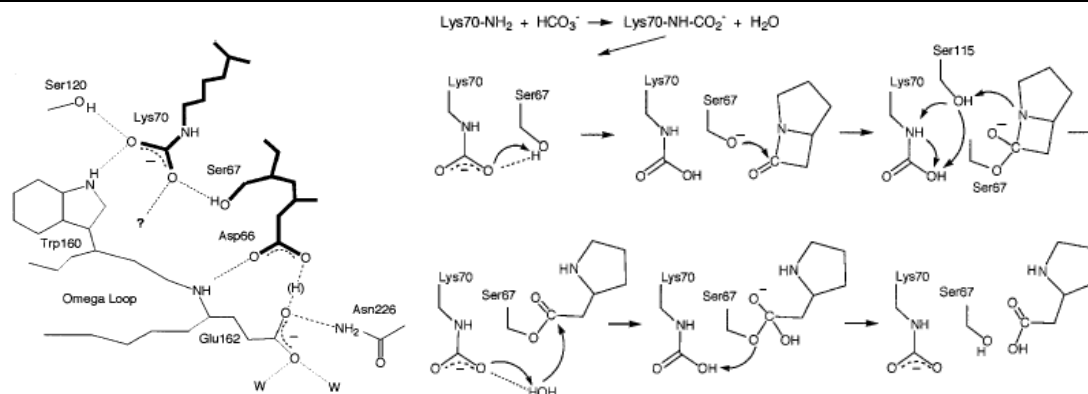


**Εικόνα 14:** Αριστερά: Άποψη του συμπλέγματος της OXA-13 με τη μεροπενέμη όπου διακρίνεται η κοιλότητα πρόσδεσης της  $\beta$ -λακτάμης (C – άσπρο, O – κόκκινο, N – μπλε, S – θείο). Το μόριο της μεροπενέμης ξεχωρίζει με το μοντέλο της ράβδου, οι δεσμοί υδρογόνου έχουν απεικονιστεί με στικτές πράσινες γραμμές και τα μόρια του νερού αντιπροσωπεύονται από κόκκινες σφαίρες (Pernot *et al*, 2001). Δεξιά: Υπερθέση των ενεργών κέντρων της OXA-13 (CPK χρώματα: C – άσπρο, O – κόκκινο, N – μπλε) και της OXA-10 (μπλε χρώμα). Διακρίνεται ο πρωτεϊνικός σκελετός και τα κρίσιμα αμινοξικά κατάλοιπα. Οι δεσμοί υδρογόνου φαίνονται ως στικτές πράσινες γραμμές. Τα μόρια του νερού διακρίνονται με κόκκινες και μπλε σφαίρες στην OXA-13 και OXA-10 αντίστοιχα. Η θειϊκή ρίζα ξεχωρίζει με κίτρινο και κόκκινο χρώμα (Pernot *et al*, 2001).

Όσον αφορά στο σημείο πρόσδεσης της  $\beta$ -λακτάμης, αυτό είναι μία αύλακα που σχηματίζεται από τα κατάλοιπα Lys205-Ser209 του φύλλου  $\beta 7$  και τα κατάλοιπα Gln113-Val117 του βρόγχου που σχηματίζεται από τις έλικες  $\alpha 4$  και  $\alpha 5$  και η οποία αντικρύζει το φύλλο  $\beta 7$ . Το ενεργό κέντρο απαρτίζεται κυρίως από τις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξικών καταλοίπων Ser67, Lys70 και Leu155. Όταν απουσιάζει το υπόστρωμα, το ενεργό κέντρο καταλαμβάνεται από μόρια νερού, τρία εκ των οποίων

σχετίζονται με μία θειϊκή ρίζα (SO<sub>4</sub>-352). Το ιόν αυτό είναι προσδεμένο με δεσμούς υδρογόνου στην ομάδα γουανιδίου της αργινίνης 250 και στην υδροξυλική ομάδα της θρεονίνης 206. Με τη πρόσδεση του υποστρώματος η καρβοξυλική και η υδροξυαιθυλική ομάδα της μεροπενέμης εσωκλείονται σε δύο ξεχωριστές κοιλότητες του ενζύμου ενώ ταυτόχρονα εκτοπίζεται η θειϊκή ρίζα. Το άτομο οξυγόνου της ακυλομάδας τελικά εγκαθίσταται σε απόσταση δεσμού υδρογόνου από τα άτομα αζώτου της κύριας αλυσίδας των καταλοίπων Ser67 και Phe208. Επιπρόσθετα του ομοιοπολικού αυτού δεσμού, ιονικοί δεσμοί μεταξύ της καρβοξυλικής ομάδας της μεροπενέμης και της ομάδας γουανιδίου του καταλοίπου Arg250 σταθεροποιούν τη πρόσδεση του υποστρώματος. Κατά τη δημιουργία του συμπλόκου παρατηρείται επίσης μία στερεοδομική αλλαγή που περιλαμβάνει τα κατάλοιπα 114-116. Αυτή η αλλαγή έχει ως αποτέλεσμα η υδροξυλική ομάδα της Ser115 να πλησιάζει τη πλευρική αλυσίδα της Lys205 τόσο ώστε να σχηματίζεται δεσμός υδρογόνου καθώς και τη στροφή της πλευρικής αλυσίδας της Lys70 προς το μόριο H<sub>2</sub>O<sub>1</sub> του νερού (που συγκρατείται με δεσμό υδρογόνου από τη τρυπτοφάνη 154 και που φαίνεται να καταλύει την αποακετυλίωση) έτσι ώστε το N<sup>5</sup> άτομο της λυσίνης να βρίσκεται πολύ κοντά στην ακυλομάδα. Για το λόγο αυτό το κατάλοιπο Lys70 θεωρείται ικανό να επάγει τη πυρηνόφιλη προσβολή της ακυλομάδας μέσω του H<sub>2</sub>O<sub>1</sub>.

Πρέπει να τονιστεί ο ρόλος της λυσίνης 70 η οποία μετά από κρυσταλλογραφικές παρατηρήσεις στην OXA-1 (**Sun et al, 2003**) βρέθηκε ότι καρβοξυλιώνεται σε pH > 6.0. Κατόπιν δημιουργείται ένας δεσμός υδρογόνου μεταξύ αυτής της καρβοξυλικής ομάδας και της αμιδικής ομάδας της πλευρικής αλυσίδας της συντηρημένης τρυπτοφάνης 160 (ανήκει στον Ω βρόγχο). Ο δεσμός αυτός είναι κοινό χαρακτηριστικό όλων των καρβαμυλιωμένων οξακιλινασών και έχει πιθανό ρόλο τη σταθεροποίηση της αποπρωτονιωμένης καρβοξυλικής ομάδας. Το καρβοξύλιο δημιουργεί άλλους δύο δεσμούς υδρογόνου, έναν με το κατάλοιπο Ser67 και ένα με το Ser120 αφήνοντας έτσι κενή τη τέταρτη θέση δημιουργίας τέτοιου δεσμού. Έχει προταθεί πως η δραστηριότητα της οξακιλινάσης απαιτεί μία αποπρωτονιωμένη καρβοξυλική ομάδα (**Golemi et al, 2001**) η οποία αποπρωτονιώνει τη σερίνη 67 πριν τη προσβολή της καρβονυλικής ομάδας της β-λακτάμης. Μία συντηρημένη σερίνη (Ser115) μπορεί να συμβάλλει στη μεταφορά των πρωτονίων στο άτομο αζώτου της θειαζολικής ομάδας που απομένει. Σε pH < 5.5 η λυσίνη 70 δεν καρβοξυλιώνεται και αντί αυτού προσδέεται στο κατάλοιπο αυτό ένα μόριο νερού που διαδραματίζει το ρόλο της αποακετυλίωσης (όπως περιγράφηκε παραπάνω για την OXA-13).



**Εικόνα 15:** Αριστερά διακρίνονται οι δεσμοί υδρογόνου (στικτές γραμμές) που σχηματίζονται στο σημείο πρόσδεσης του υποστρώματος στην OXA-1. Δεξιά φαίνεται η καρβοξυλίωση του Lys70 και προτείνεται ο μηχανισμός υδρόλυσης του β-λακταμικού δακτυλίου από τις τάξης D β-λακταμάσες. Η μεταφορά του πρωτονίου στην θειαζολική ομάδα μέσω του Ser115 μπορεί να πραγματοποιηθεί από οποιοδήποτε από τα δύο προτεινόμενα μονοπάτια (Sun *et al*, 2003).

## II.2. ΜΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΤΟΙΧΩΜΑΤΟΣ: ΠΟΡΙΝΕΣ

Η διηλεκτρική σταθερά της λιπιδικής κυτταροπλασματικής μεμβράνης είναι χαμηλότερη από αυτή του υδατικού περιβάλλοντος και για το λόγο αυτό οι μεμβρανικές πρωτεΐνες διαθέτουν μία υδρόφοβη επιφάνεια ενσωματωμένη στη μεμβράνη του κυττάρου. Πριν ακόμα την αποκάλυψη δομών μεμβρανικών πρωτεϊνών με κρυσταλλογραφία ακτίνων X, υπήρχε η υπόθεση ότι στο μεμβρανικό τμήμα αυτών των πρωτεϊνών κυριαρχούσαν οι δομές α-έλικας και β-πτυχωτού φύλλου ώστε να εξασφαλιστεί ο μέγιστος δυνατός αριθμός δεσμών υδρογόνου που θα σταθεροποιούσε την όλη δομή. Οι μελέτες των τελευταίων χρόνων έχουν αποδείξει αυτή την υπόθεση και έχουν διαχωρίσει τις μεμβρανικές πρωτεΐνες σε αυτές που είναι πλούσιες σε δομές α-έλικας (κυτταροπλασματική μεμβράνη βακτηρίων) και σε αυτές που επικρατούν τα β-πτυχωτά φύλλα δημιουργώντας μία δομή κενού βαρελιού (γνωστή ως β-βαρέλι) (Koebnik *et al*, 2000). Η δομή αυτή είναι χαρακτηριστική για τις πορίνες της εξωτερικής μεμβράνης των βακτηρίων και διακρίνονται περαιτέρω σε τριμερείς και μονομερείς ανάλογα με τον τρόπο που συγκροτούνται στη μεμβράνη, ενώ παρουσιάζουν διαφορετικό βαθμό ελευθερίας για την εισροή των β-λακταμών ανάλογα με το φορτίο και το μοριακό τους βάρος (Nitzan *et al*, 2002).

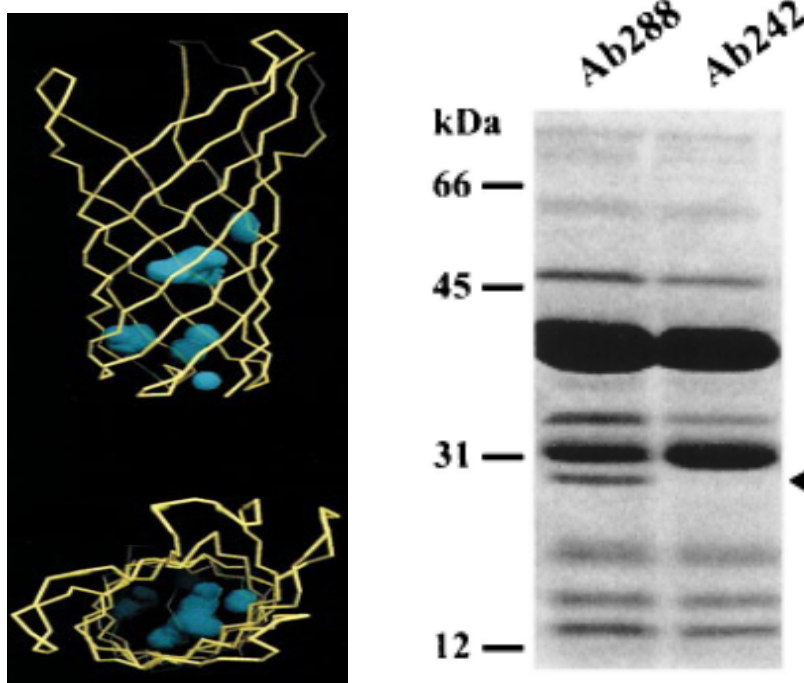
Οι πορίνες, σχηματίζοντας κανάλια στην εξωτερική μεμβράνη των Gram αρνητικών βακτηρίων, εξυπηρετούν διάφορους σκοπούς όπως τη διακυτταρική προσκόλληση και την πρόσδεση βακτηριοκτόνων ουσιών. Ιδιαίτερα για τον τελευταίο λόγο, τα βακτήρια έχουν αναπτύξει ρυθμιστικούς μηχανισμούς που στοχεύουν στη

μειωμένη έκφραση των πορινών ώστε να αποφύγουν τη πίεση των αντιμικροβιακών παραγόντων. Μέχρι σήμερα μόνο ένας μικρός αριθμός πορινών έχει αναφερθεί στο *A. baumannii* (Marti *et al*, 2006a) ενώ ο ακριβής τους ρόλος και ο μηχανισμός δράσης παραμένουν αδιευκρίνιστοι. Έχει προταθεί ωστόσο πως τόσο ο μικρός αριθμός τους όσο και το μικρό μέγεθος των πορινών αρκούν για να προσδώσουν ελατωμένη διαπερατότητα κυτταρικής μεμβράνης στο είδος σε σχέση με άλλα Gram αρνητικά βακτηρίδια (Obara *et al*, 1991) και επομένως αντιμικροβιακή αντοχή.

Σε περιορισμένες αναφορές υπάρχουν συγκεκριμένες πορίνες που έχουν χαρακτηριστεί και συσχετιστεί με την αντοχή στο *A. baumannii*. Πιο χαρακτηριστική είναι η θερμοευαίσθητη πρωτεΐνη HMP-AB (Gribun *et al*, 2003) που έχει μήκος 346aa και κινητικότητα σε ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης περίπου 37 kDa. Μετά από θέρμανση στους 95 °C για 10 λεπτά η κινητικότητά της μετατοπίζεται περίπου στα 43 kDa. Στοιχίση της αμινοξικής της αλληλουχίας έδειξε ομολογία με τις μονομερείς OmpA (Enterobacteriaceae) και OmpF (*P. aeruginosa*). Ανάλυση της δευτεροταγούς δομής της HMP-AB αποκάλυψε μία N-τελική περιοχή μήκους 172aa που διαπερνά τη μεμβράνη με οκτώ αμφιπαθή β-πτυχωτά φύλλα δημιουργώντας τη δομή καναλιού και μία C-τελική περιοχή που εικάζεται ότι εξυπηρετεί τη πρόσδεση στη πεπτιδογλυκάνη. Η HMP-AB επιτρέπει την εισροή β-λακταμών και σακχάρων μέχρι 800 Da.

Άλλες πορίνες που έχουν χαρακτηριστεί στο *A. baumannii* είναι αυτές με μοριακό βάρος 33-36 kDa (Clark, 1996, del Mar Tomas *et al*, 2005) για την οποία υπάρχουν στοιχεία που την ενοχοποιούν για την αντοχή του *A. buamannii* στις καρβαπενέμες, 29 kDa που ονομάστηκε CarO (Limansky *et al*, 2002, Mussi *et al*, 2005) και 43 kDa (Dupont *et al*, 2005) και παρουσιάζει ομολογία με την OprD στην *P. aeruginosa* που συμμετέχει στην εισροή των καρβαπενεμών. Ιδιαίτερα για την CarO, οι Siroy *et al* (Siroy *et al*, 2005) αποκάλυψαν και μία δεύτερη πρωτεΐνη 25 kDa και έδειξαν πως οι δύο πρωτεΐνες των 25/29 kDa αν και σχημάτιζαν τυπική δομή β-βαρελιού ωστόσο μόνο η CarO είχε χαρακτηριστικά πορίνης. Επίσης, αν και στην αλληλουχία της δεν βρέθηκαν σημεία πρόσδεσης της ιμιπενέμης, η CarO θεωρείται ως πορίνη μη ειδική για τις καρβαπενέμες. Ενδεικτικό στοιχείο που ενισχύει την υπόθεση αυτή είναι ότι σε ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *A. baumannii* το *carO* γονίδιο έχει βρεθεί απενεργοποιημένο από την εισδοχή μίας αλληλουχίας 975bp με χαρακτηριστικά IS στοιχείου (Mussi *et al*, 2005). Τέλος, η OmpW μελετήθηκε πρόσφατα και παρουσιάζει υψηλή ομολογία με την OmpW στο *E.coli* και την

*P. aeruginosa*. Αν και η λειτουργία της παραμένει άγνωστη φαίνεται να σχετίζεται με την αντοχή του *A. baumannii* στη κολιστίνη (Vila *et al*, 2007).



**Εικόνα 16:** Αριστερά: Δομή β-βαρελιού της βακτηριακής πορίνης OmpA (Koebnik *et al*, 2000). Δεξιά: Ανάλυση πορινών σε κλωνικά στελέχη *A. baumannii*. Με το βέλος επισημαίνεται η έλλειψη της πρωτεΐνης με κινητικότητα 29 kDa στο ανθεκτικό στην ιμιπενέμη στέλεχος (Ab242) σε σχέση με το ευαίσθητο (Ab288) (Limansky *et al*, 2002).

### II.3. ΕΝΕΡΓΟΣ ΕΚΡΟΗ: ΑΝΤΑΙΕΣ

Στα Gram αρνητικά βακτήρια παράγονται διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που λειτουργούν ως αντλίες εκροής για την ενεργό αποβολή τοξικών ουσιών και μεταβολικών προϊόντων από το κύτταρο. Τέτοιες αντλίες σχετίζονται και με την εκροή αντιμικροβιακών παραγόντων από το κύτταρο (κυρίως των μακρολιδών, των τετρακυκλινών και των κινολονών - Barker, 1999 -) με αποτέλεσμα τη μείωση της ενδοκυτταρικής τους συγκέντρωσης και την αύξηση της ελάχιστης ανασταλτικής τους συγκέντρωσης για το βακτήριο. Έξι οικογένειες αντλιών έχουν χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα με βάση κυρίως την ομοιότητα στην αμινοξική τους αλληλουχία (Poole, 2002). Αυτές είναι η οικογένεια των ATP δεσμευτικών αντλιών (ABC – ATP Binding Cassette οικογένεια), η MFS (Major Facilitator Superfamily) υπεροικογένεια, η RND (Resistance Nodulation Division) οικογένεια, η MATE (Multidrug and Toxic Compound



Extrusion) οικογένεια, η **SMR** (**S**mall **M**ultidrug **R**esistance) οικογένεια και η **DMT** (**D**rug/**M**etabolite **T**ransporter) υπερ-οικογένεια. Τα ένζυμα της ABC οικογένειας καταναλώνουν ATP για να καταλύσουν την εκροή ενώ σπάνια σχετίζονται με τη μικροβιακή αντοχή. Αντίθετα, οι υπόλοιπες οικογένειες αντλιών λειτουργούν ως αντιμεταφορείς και επιτυγχάνουν την εκροή των ουσιών μέσω της εισροής κατιόντων  $H^+$ . Ιδιαίτερα οι οικογένειες RND και MFS ενοχοποιούνται για την ενεργό εκροή συγκεκριμένων κλάσεων αντιμικροβιακών παραγόντων στο *A. baumannii* (Vila *et al*, 2007).

Η AdeABC αντλία ανήκει στην RND οικογένεια και όπως όλα τα μέλη αυτής της οικογένειας αποτελείται από τρία δομικά στοιχεία: μία μεμβρανική πρωτεΐνη που εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη, μία πορίνη που βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη και μία πρωτεΐνη που ενώνει τις δύο προηγούμενες και εντοπίζεται στον περιπλασματικό χώρο. Εξαιτίας αυτής της οργάνωσης, ο αντιμικροβιακός παράγοντας εκτοπίζεται από το βακτήριο χωρίς να συσσωρεύεται στον περιπλασματικό χώρο. Τα γονίδια *adeA*, *adeB* και *adeC* κωδικοποιούν κατά την αναγραφόμενη σειρά τις παραπάνω πρωτεΐνες και οργανώνονται σε δομή οπερονίου στο χρωμόσωμα του βακτηρίου (Magnet *et al*, 2001, Marchand *et al*, 2004). Κατά την αντίθετη φορά του γονιδίου *adeA*, μεταγράφονται τα γονίδια *adeS* και *adeR* που ρυθμίζουν την εκφράση του οπερονίου. Το *adeS* κωδικοποιεί για μία κινάση η οποία, σε σχέση με τις περιβαλλοντικές συνθήκες του βακτηρίου, ενεργοποιεί ή απενεργοποιεί το γονίδιο *adeR* που κωδικοποιεί για μία ρυθμιστική πρωτεΐνη (Marchand *et al*, 2004) και ρυθμίζει την μεταγραφή του οπερονίου *adeABC*. Υπερέκφραση της αντλίας AdeABC προκαλεί αντοχή σε αμινογλυκοσίδες, β-λακτάμες, χλωραμφαινικόλη, ερυθρομυκίνη, τετρακυκλίνες και βρωμιούχο αιθίδιο (Magnet *et al*, 2001, Marchand *et al*, 2004, Nemeč *et al*, 2007).

Άλλες αντλίες εκροής που έχουν χαρακτηριστεί στο *A. baumannii* είναι η AbeM (Su *et al*, 2005) που ανήκει στη MATE οικογένεια και συμμετέχει στην αντοχή σε κινολόνες, γενταμικίνη, καναμυκίνη, ερυθρομυκίνη και χλωραμφαινικόλη. Επίσης τα γονίδια *tet(A)* και *tet(B)* κωδικοποιούν για αντλίες της MFS υπεροικογένειας (Marti *et al*, 2006b) που εκρέουν τετρακυκλίνη και τετρακυκλίνη μαζί με μινοκυκλίνη, αντίστοιχα. Οι CmlA (Fournier *et al*, 2006) και MdfA (Vila *et al*, 2007) είναι MFS αντλίες που σχετίζονται με αντοχή στη χλωραμφαινικόλη και έχουν εντοπιστεί πολύ πρόσφατα στο γένωμα του *A. baumannii*. Γενικότερα, η παρουσία αντλιών εκροής που επηρεάζουν την ευαισθησία σε αντιμικροβιακούς παράγοντες στο εν λόγω είδος

μελετάται φαινοτυπικά με τη συνεργική δράση αναστολέων και αντιμικροβιακών, όπως το MC 207,10 με το ναλιδιξικό οξύ (**Ribera *et al*, 2002**) και η ρεσερπίνη με τη σιπροφλοξασίνη (**Vila *et al*, 2002**). Η μείωση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης του αντιμικροβιακού παράγοντα είναι ενδεικτική της ύπαρξης αντλίας εκροής που επηρεάζει τη δραστικότητά του.

#### **Π.4. ΑΔΥΝΑΜΙΑ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΤΟΙΧΩΜΑ: ΠΕΝΙΚΙΛΙΝΟ-ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ**

Το κυτταρικό τοίχωμα των Gram αρνητικών βακτηρίων καλύπτεται από ένα λεπτό στρώμα που ονομάζεται πεπτιδογλυκάνη, το οποίο καθορίζει τη μορφολογία του κυττάρου, του παρέχει ωσμωτική προστασία και συμμετέχει στο κυτταρικό μεταβολισμό. Η σύσταση της πεπτιδογλυκάνης βασίζεται σε πολυμερείς αλύσους των διασακχαριδικών υπομονάδων GlcNAc (N-ακετυλογλυκοζαμίνη) και MurNAc (N-ακετυλομουραμικό οξύ). Οι πολυμερείς αυτές αλυσίδες συνδέονται μέσω πενταπεπτιδίων, των οποίων η αλληλουχία αν και μπορεί να διαφέρει μεταξύ των ειδών, τερματίζει πάντοτε σε μία D-αλανίνη. Η αλληλουχία των γεγονότων για τη σύνθεση των μονομερών, τον πολυμερισμό τους και τη διασύνδεση των πενταπεπτιδίων είναι αρκετά πολύπλοκη και περιλαμβάνει αρκετά ένζυμα που φέρουν διαφορετικά ονόματα από είδος σε είδος (**Macheboeuf *et al*, 2006**). Γενικά, αρχικά το πενταπεπτίδιο προσδένεται σε ένα (UDP)-MurNAc μόριο και η όλη δομή προσδένεται στη μεμβράνη (λιπίδιο I). Στη συνέχεια μία τρανσφεράση προσδένει στο λιπίδιο I μία (UDP)-GlcNAc ομάδα δημιουργώντας το λιπίδιο II το οποίο παραμένει ενδοκυτταρικά. Μόλις το λιπίδιο II εκτεθεί στο περιπλασματικό χώρο με τη δράση μίας φλιπάσης, δρουν σε αυτό οι πενικιλίνο-δεσμευτικές πρωτεΐνες (**PBPs – Penicillin Binding Proteins**) καταλύοντας τον πολυμερισμό του καθώς και τη διασύνδεση των πενταπεπτιδίων μεταξύ των διαφορετικών πολυσακχαριδικών αλύσεων.

Οι PBPs διακρίνονται σε αυτές που έχουν δράση γλυκοζυλτρανσφεράσης (GT) για τον πολυμερισμό του λιπιδίου II και ταυτόχρονη δράση τρανσπεπτιδάσης (TP) για τη σύνδεση των πενταπεπτιδίων (τάξης A PBPs) και σε εκείνες που καταλύουν μόνη την τρανσπεπτιδίωση (τάξης B PBPs). Αναστολή οποιασδήποτε από τις δύο δραστηριότητες αυτών των ενζύμων προκαλεί εξασθένηση της πεπτιδογλυκάνης και κυτταρικό θάνατο. Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά παρουσιάζουν συγγένεια για το ενεργό κέντρο σερίνης των PBPs στο οποίο και προσδένονται ομοιοπολικά. Το ακυλοένζυμο

που παράγεται υδρολύεται με πολύ χαμηλό ρυθμό παρεμποδίζοντας έτσι τη δράση των PBPs επί της πεπτιδογλυκάνης (Gordon *et al*, 2000). Σε αντίθεση με τους κόκκους όπου η βιβλιογραφία αναφέρει σαφή συσχέτιση της αντοχής σε αντιμικροβιακούς παράγοντες με συγκεκριμένες PBPs, στο *A. baumannii* παραμένει ακόμα αδιερεύνητο το πεδίο των πενικιλινο-δεσμευτικών πρωτεϊνών. Παρόλο που ενδείξεις για ενδεχόμενη συμμετοχή των PBPs στην αντοχή των *Acinetobacter* στην ιμιπενέμη υπάρχουν ήδη από το 1991 (Gehrlein *et al*, 1991), οι σχετικές αναφορές παραμένουν ελάχιστες. Μόλις πρόσφατα δημοσιεύτηκαν δύο συναφή άρθρα που παρουσίαζαν μειωμένη έκφραση της PBP2 (Fernandez-Cuenca *et al*, 2003a) και της PBP1b (Siroy *et al*, 2006) σε ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *A. baumannii*.



## ***ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ***

## I. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών αντοχής στις καρβαπενέμες πολυανθεκτικών κλινικών στελεχών *A. baumannii*. Την περίοδο έναρξης της έρευνας τα σχετικά επιδημιολογικά ευρήματα για τον ελλαδικό χώρο ήταν περιορισμένα, ενώ σε παγκόσμιο επίπεδο οι αντίστοιχες βιβλιογραφικές αναφορές μοριακής μελέτης των μηχανισμών αντοχής ήταν σχετικά λίγες. Για αυτούς τους λόγους, κύριος στόχος της διατριβής ήταν να διερευνηθεί επιδημιολογικά μεγάλο τμήμα της ελληνικής επικράτειας και να μελετήσει προκαταρκτικά τη σχετική συνεισφορά καθενός από τους αναζητούμενους μοριακούς μηχανισμούς αντοχής, ώστε να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα για την ενδεδειγμένη θεραπευτική αγωγή.

## II. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

### II.1. ΣΤΕΛΕΧΗ – ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

Στη μελέτη συμπεριλήφθησαν 318 κλινικά στελέχη *A. baumannii* που απομονώθηκαν από ξεχωριστούς ασθενείς ή το περιβάλλον τριών ελληνικών νοσοκομείων. Συγκεκριμένα: 270 στελέχη απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια Απρίλιος 2002 – Μάιος 2006 από το Περιφερειακό Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας (ΠΠΓΝΛ), δυναμικότητας 700 κλινών που εξυπηρετεί τον πληθυσμό της ευρύτερης περιφέρειας της Θεσσαλίας, 17 στελέχη κατά τη διάρκεια Μάρτιος – Οκτώβριος 2002 από το Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών Κοργιαλένιο – Μπενάκειο (Ελληνικός Ερυθρός Σταυρός – ΕΕΣ), δυναμικότητας 400 κλινών που εξυπηρετεί τον πληθυσμό της ευρύτερης περιφέρειας του νομού Αττικής και 31 στελέχη κατά τη διάρκεια Απρίλιος 2005 – Μάρτιος 2007 από το Γενικό Νοσοκομείο Σερρών, δυναμικότητας 400 κλινών που εξυπηρετεί πληθυσμό 200000 κατοίκων. Στο σύνολο των στελεχών (N=318), τα 192 (60.4%) προήλθαν από ΜΕΘ, τα 54 (17%) από χειρουργικές κλινικές (συμπεριλαμβανομένων γενικής χειρουργικής, νευροχειρουργικής και θωρακοχειρουργικής), τα 45 (14.2%) από παθολογικές κλινικές, τα 18 (5.6%) από ουρολογικές κλινικές και τα 9 (2.8%) από πνευμονολογικές κλινικές. Όσον αφορά στο κλινικό δείγμα από το οποίο απομονώθηκε κάθε στέλεχος, 54 (17%) στελέχη προήλθαν από αίμα, 35 (11%) από ούρα, 150 (47.2%) από βρογχικό έκκριμα, 35 (11%) από τραύμα, 14 (4.4%) από εγκεφαλονωτιαίο υγρό, 28 (8.8%) από καθετήρες και 2 (0.6%) από το περιβάλλοντα χώρο (κρεβάτι ασθενούς και

χέρια νοσηλευτικού προσωπικού). Στους πίνακες 7 και 8 παρουσιάζεται το υλικό της μελέτης σε σχέση με την κλινική και το δείγμα προέλευσης. Όλα τα στελέχη συντηρήθηκαν σε δύο ή περισσότερα αντίγραφα σε θρεπτικό ζωμό Mueller Hinton Broth (Biolife, Milano, Italy) με περιεκτικότητα γλυκερόλης (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 16% w/v στους – 80 °C.

Η ταυτοποίηση των στελεχών έγινε με το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK® 2 (bioMerieux, Inc.) χρησιμοποιώντας τη κάρτα GN και ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ταυτοποίηση του είδους επιβεβαιώθηκε με PCR για το ενδογενές γονίδιο *bla<sub>OXA-51</sub>* (Turton *et al*, 2006a) χρησιμοποιώντας εκκινητές και συνθήκες που έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία (Πίνακας 9).

Νοσοκομείο	Δείγμα							Σύνολο
	Αίμα	Ούρα	Βρογχικό έκκριμα	Τραύμα	ENY	Καθετήρες	Περιβάλλον	
<b>ΠΠΓΝΑ</b>	42	31	123	32	14	28	-	<b>270</b>
<b>ΕΕΣ</b>	5	2	8	-	-	-	2	<b>17</b>
<b>Σερρών</b>	7	2	19	3	-	-	-	<b>31</b>
<b>Σύνολο</b>	<b>54</b>	<b>35</b>	<b>150</b>	<b>35</b>	<b>14</b>	<b>28</b>	<b>2</b>	<b>318</b>

**Πίνακας 7:** Κλινικά δείγματα από τα οποία απομονώθηκαν τα στελέχη της μελέτης.

Νοσοκομείο	Κλινική					Σύνολο
	ΜΕΘ	Χ/ΚΗ	ΠΑΘ/ΚΗ	ΟΥΡ/ΚΗ	ΠΝ/ΚΗ	
<b>ΠΠΓΝΑ</b>	144	54	45	18	9	<b>270</b>
<b>ΕΕΣ</b>	17	-	-	-	-	<b>17</b>
<b>Σερρών</b>	31	-	-	-	-	<b>31</b>
<b>Σύνολο</b>	<b>192</b>	<b>54</b>	<b>45</b>	<b>18</b>	<b>9</b>	<b>318</b>

**Πίνακας 8:** Κλινικές από τις οποίες απομονώθηκαν τα στελέχη της μελέτης.

## II.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ

Η ευαισθησία των στελεχών στα αντιβιοτικά (β-λακταμικά, αμινογλυκοσίδες, κινολόνες) προσδιορίστηκε αρχικά με το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK® 2 (bioMérieux, Inc.) χρησιμοποιώντας τις κάρτες AST-GN13 και AST-EXN3 και ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ειδικά για τις καρβαπενέμες (ιμιπενέμη και μεροπενέμη), η MIC καθορίστηκε με τη μέθοδο των αραιώσεων του αντιβιοτικού σε άγαρ ακολουθώντας διεθνή κριτήρια αξιολόγησης (CLSI 2005). Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν τρυβλία Mueller Hinton Agar (Biolife) που περιείχαν υποδιπλάσιες συγκεντρώσεις καρβαπενέμης από 512 έως 0.25 mg/L. Στα τρυβλία ενοφθαλμίστηκε εναιώρημα που περιείχε περίπου  $10^4$  CFUs από κάθε μικροβιακό στέλεχος (10μl από αραιώση 1:100 αρχικού εναιωρήματος με πυκνότητα 0.5 της κλίμακας McFarland). Τα τρυβλία επώασθησαν στους 37 °C για 18 ώρες και ως MIC καθορίστηκε η μικρότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που δεν επέτρεψε την ορατή ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Το πρότυπο στέλεχος *P. aeruginosa* ATCC 27853 χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας.

## II.3. ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ

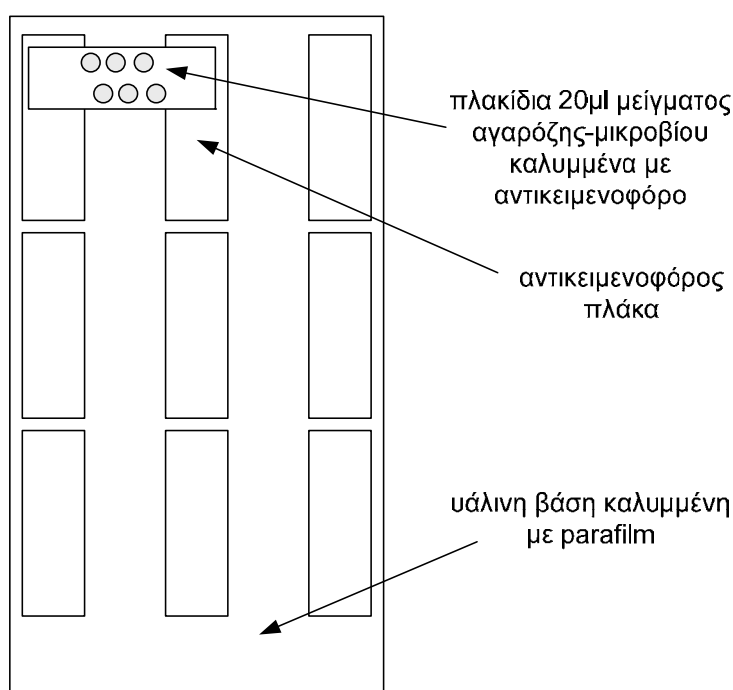
Η τυποποίηση των στελεχών της μελέτης έγινε με μακροπεριοριστική πέψη του γενωμικού DNA με το περιοριστικό ένζυμο *ApaI* (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Germany) και την ακόλουθη ανάλυση των νουκλεϊνικών τμημάτων με ηλεκτροφόρηση σε μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είχε ως εξής:

- Τα στελέχη επώασθησαν σε Tryptic Soy Broth (Biolife) στους 37 °C για 18 ώρες και τα εναιωρήματα φωτομετρήθηκαν για να αραιωθούν με τον αντίστοιχο όγκο νερού και να αποκτήσουν πυκνότητα ίση με 4.0 της κλίμακας McFarland.
- Όγκος 500 μl φυγοκεντρήθηκε στις 13000 rpm για 2 λεπτά και το ίζημα εναιωρήθηκε σε 100 μl διαλύματος PIV (0.01 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M NaCl).
- Παρασκευάστηκε 2% αγαρόζη χαμηλού σημείου τήξεως (LMT - Low Melting Temperature Agarose - Cambrex Bio Science Rockland Inc., ME, USA) σε 10 ml διαλύματος PIV, και διατηρήθηκε μαζί με τα εναιωρημένα στελέχη στους 42 °C για 10 λεπτά.
- Όγκος 100 μl αγαρόζης αναμείχθηκε με το δείγμα και ετοιμάστηκαν 7 πλακίδια μείγματος αγαρόζης-μικροβίου (από 20 μl) για κάθε στέλεχος, ανάμεσα σε υάλινες

επιφάνειες με τη κατασκευή που φαίνεται στην εικόνα 17. Τα πλακίδια έμειναν στους  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 5 λεπτά αυστηρά και στη συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.

- Τα πλακίδια επώστηκαν μέσα σε 500 μl διαλύματος EC (6 mM Tris pH 8.0, 1 M NaCl, 100 mM EDTA pH 8.0, 0.2% Na deoxycholate, 0.5% Na laurylsarcosine) που περιείχαν 100 μg/ml λυσοζύμης (Sigma-Aldrich) και 50 μg/ml RNaseA (Sigma-Aldrich) στους  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  για τουλάχιστον 6 ώρες.

- Το EC διάλυμα αντικαταστάθηκε από 500 μl ES (0.5 M EDTA pH 9.0, 1% sarcosyl) διαλύματος που περιείχε 1 mg/ml πρωτεΐνωση K (Sigma-Aldrich) και τα πλακίδια επώστηκαν ολονύκτια στους  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



**Εικόνα 17:** Δημιουργία των πλακιδίων μείγματος αγαρόζης-μικροβίου.

- Ακολούθησε πλύσιμο των πλακιδίων 5 φορές για 30 λεπτά κάθε φορά με 2 ml διαλύματος TE (10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA pH 8.0).

- Έγινε πέψη ενός πλακιδίου από κάθε στέλεχος μέσα σε 40 μl  $B^+$  buffer 1X με 40U *ApaI* (Fementas) στους  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  για τουλάχιστον 6 ώρες.

- Έγινε ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη 1% ειδική για ηλεκτροφόρηση σε μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Agarose for Pulsed Field Gel Electrophoresis: Running Gel - Sigma-Aldrich) που παρασκευάστηκε σε διάλυμα 0.5X TBE (BioRad, Hercules, CA, USA) και σε συσκευή CHEF-DRIII (BioRad) με 2 lt 0.5X TBE και τις εξής συνθήκες: initial



switch time 5 sec, final switch time 35 sec, total time 18 hours, volts/cm 6, angle 160°, temperature 11.3 °C. Ως μάρτυρας μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύασμα PULSE MARKER™ 50–1,000 kb (Sigma-Aldrich) που περιέχει τεμάχια γενώματος λ φάγου γνωστού μεγέθους.

Τα κριτήρια που εφαρμόστηκαν για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων είναι αυτά που πρότειναν οι Tenover *et al* (Tenover *et al*, 1995). Η ψηφιακή ανάλυση και η εξαγωγή της φυλογενετικής σχέσης των στελεχών έγινε με το λογισμικό Quantity One (BioRad). Η τυποποίηση επιδημιολογικά σχετιζόμενων στελεχών (κριτήριο υπήρξε η προέλευση από την ίδια κλινική του ίδιου νοσοκομείου) έγινε εναλλακτικά με PCR χρησιμοποιώντας τον ERIC-2 εκκινητή (Πίνακας 9) (Grundmann *et al*, 1997).

#### II.4. ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΩΝ

Η ύπαρξη μεταλλο-β-λακταμασών μελετήθηκε φαινοτυπικά με το Etest MBL (AB Biodisk, Solna, Sweden) ακολουθώντας τα κριτήρια του κατασκευαστή. Για τον ίδιο σκοπό εφαρμόστηκε σε όλα τα στελέχη το φαινοτυπικό τεστ των δύο δισκίων, σε απόσταση 20mm μεταξύ τους, εκ των οποίων το ένα περιέχει ιμιπενέμη (10 µg) και το άλλο 10 µl από διάλυμα 0.1 M EDTA (Sigma-Aldrich) (Franklin *et al*, 2006). Επίσης εφαρμόστηκε το ίδιο τεστ αλλά με τη χρήση δύο δισκίων ιμιπενέμης (10 µg) εκ των οποίων το ένα είχε επίσης 10 µl από διάλυμα 0.1 M EDTA (Sigma-Aldrich) (Franklin *et al*, 2006). Στην πρώτη περίπτωση αναζητήθηκε συνέργεια στην άλω αναστολής των δύο δισκίων και στη δεύτερη, ενδεικτική παρουσίας μεταλλο-β-λακταμάσης θεωρήθηκε η διαφορά > 4mm στην άλω αναστολής για το δισκίο με ιμιπενέμη-EDTA σε σχέση με το δισκίο που είχε μόνο ιμιπενέμη. Έγινε PCR για γονίδια που κωδικοποιούν γνωστές καρβαπενεμάσες (*bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>SIM</sub>) χρησιμοποιώντας εκκινητές και συνθήκες PCR από τη βιβλιογραφία (Πίνακας 9). Η αλληλουχία των προϊόντων της PCR προσδιορίστηκε από εταιρεία παροχής αντίστοιχων υπηρεσιών (Lark Technologies, Essex, UK) για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων και την ανεύρεση τυχόν μεταλλάξεων.

## II.5. ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΚΑΙ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΕΙΣΔΟΧΗΣ ΜΕ PCR

Η δομή ιντεγκρονίων που σχετίζονται με τα γονίδια καρβαπενεμασών που αναγράφονται παραπάνω, μελετήθηκε με εκκινητές και συνθήκες PCR από τη βιβλιογραφία (Πίνακας 9). Συγκεκριμένα, η χαρτογράφηση των εν λόγω δομών έγινε με δύο αντιδράσεις PCR για κάθε στέλεχος όπου χρησιμοποιήθηκαν ο 5'-CS εκκινητής με τον αντίστοιχο reverse εκκινητή του γονιδίου που κωδικοποιεί για την καρβαπενεμάση στη μία αντίδραση και ο 3'-CS εκκινητής με τον αντίστοιχο forward εκκινητή του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη καρβαπενεμάση στην άλλη. Αλληλουχίες εισδοχής που σχετίζονται με β-λακταμάσες στο *A. baumannii* (ISAbal και ISAbas) μελετήθηκαν επίσης με PCR (Πίνακας 9). Η χαρτογράφηση της σχετικής τους θέσης ως προς τα γονίδια των β-λακταμασών έγινε με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται παραπάνω, χρησιμοποιώντας τον forward εκκινητή για το στοιχείο εισδοχής με τον reverse εκκινητή για το γονίδιο που κωδικοποιεί για τη β-λακταμάση. Η αλληλουχία των προϊόντων της PCR προσδιορίστηκε από εταιρεία παροχής αντίστοιχων υπηρεσιών (Lark Technologies, Essex, UK) για τη χαρτογράφηση των μεταθετών στοιχείων και την ανεύρεση τυχόν μεταλλάξεων. Ειδικά για τις αντιδράσεις χαρτογράφησης των μεταθετών στοιχείων χρησιμοποιήθηκε ειδική πολυμεράση για αντίστοιχες εφαρμογές (Elongase Enzyme Mix, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) και οι συνθήκες της PCR ήταν οι προτεινόμενες από τη παρασκευάστρια εταιρεία.

## II.6. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ ΜΕ ΠΟΣΟΤΙΚΗ PCR

Για την ποσοτική μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *bla*<sub>AmpC</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub> και *bla*<sub>VIM</sub> έγινε αρχικά εξαγωγή του ολικού RNA με το εμπορικό αντιδραστήριο TRI Reagent (Ambion, Derbyshire, UK) σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή, το οποίο ποσοτικοποιήθηκε με φασματοφωτομετρία στα. 260 nm. Οι ενδεχόμενες επιμολύνσεις από γενωμικό DNA απομακρύνθηκαν με τη δράση DNaseI (Fermentas). Η αντίστροφη μεταγραφή 1 μg του ολικού RNA έγινε με το εμπορικό kit ThermoScipt RT-PCR System (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (QRT-PCR – Quantitative Real Time PCR) έγινε σε συσκευή MX3005P (Stratagene, La Jolla, CA, USA) χρησιμοποιώντας τη χρωστική SYBR

Green (Qiagen, Hilden, Germany). Το ενδογενές γονίδιο *recA* χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο (Pournaras *et al*, 2006) σταθερής έκφρασης για την ποσοτικοποίηση και οι συνθήκες της PCR ήταν: ένας κύκλος στους 95 °C για 10 min και 40 κύκλοι από 95 °C για 30 sec, 55 °C για 60 sec και 72 °C για 90 sec. Για την ανίχνευση μη ειδικών προϊόντων, οι αντιδράσεις QRT-PCR επαναλήφθηκαν χωρίς χρωστική SYBR Green και τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης.

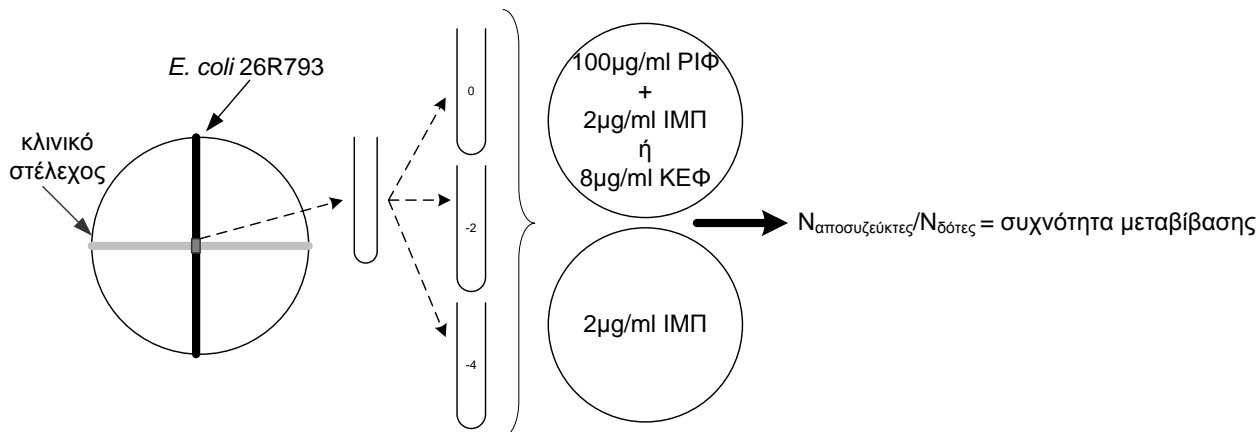
## II.7. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ

Για να διαπιστωθεί η ενδεχόμενη συμμετοχή των β-λακταμασών τύπου AmpC και OXA στην αντοχή στις καρβαπενέμες, έγιναν πειράματα αναστολής της δραστηριότητας αυτών των ενζύμων με τη χρήση 200 mg/L cloxacillin (Pournaras *et al*, 2006) και 200 mM NaCl αντίστοιχα (Poirel *et al*, 2005b). Έγινε σύγκριση της MIC των στελεχών της μελέτης για τις καρβαπενέμες, όπως αυτή μετρήθηκε με Etest (AB Biodisk) σε Mueller Hinton Agar (Biolife), με ή χωρίς την παρουσία αυτών των αναστολέων.

## II.8. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΙΒΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΦΟΡΕΙΑΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ

Η ικανότητα των στελεχών της μελέτης να μεταβιβάζουν τα γονίδια που σχετίζονται με την αντοχή στις καρβαπενέμες μελετήθηκε αντιπροσωπευτικά σε ένα στέλεχος από κάθε κλώνο ακολουθώντας τη μέθοδο κοινής επώασης δότη και λήπτη σε επιφάνεια άγαρ (Cross-Streak μέθοδος). Ως λήπτης χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο στέλεχος *Escherichia coli* 26R793 ( $lac^- rif^R$ ). Συγκεκριμένα, με βαμβακοφόρο στυλεό συλλέχθηκε ποσότητα από αρχικό εναιώρημα 0.5 της κλίμακας McFarland προερχόμενο από καλλιέργεια του δότη και του λήπτη. Οι ποσότητες ενοφθαλμίστηκαν σε ευθεία γραμμή κατά μήκος δύο διαμέτρων με γωνία 90° (η γραμμή του δότη κάθετα σε αυτή του λήπτη) σε κοινό τρυβλίο Mueller Hinton Agar (Biolife) όπως φαίνεται στην εικόνα 18. Τα τρυβλία επώασθηκαν στους 37 °C για 18 ώρες. Ολόκληρη η επιφάνεια επαφής της καλλιέργειας του δότη και του λήπτη συλλέχθηκε με κρίκο και εναιωρήθηκε σε 2 ml PBS (Phosphate Buffer Saline 1X: 137 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2.7 mM KCl, pH 7.4). Έγινε σειρά υποδεκαπλάσιων αραιώσεων του εναιωρήματος αυτού μέχρι και 10<sup>-4</sup> και 100 μl από κάθε αραιώση (10<sup>0</sup> έως και 10<sup>-4</sup>) καλλιεργήθηκαν

σε εκλεκτικό υλικό MacConkey Agar (Biolife) που περιείχε 2 mg/L ιμιπενέμης ή 8 mg/L κεφταζιδίμη, στα οποία είναι ανθεκτικός ο δότης και ευαίσθητος ο λήπτης, και 100 mg/L ριφαμπικίνης, στα οποία είναι ανθεκτικός ο λήπτης και ευαίσθητος ο δότης. Τα μικροβιακά κύτταρα που θα αναπτύσσονταν σε αυτό το συνδυασμό των αντιβιοτικών αναμενόταν να αντιστοιχούν στους αποσυζεύκτες. Στο ίδιο εκλεκτικό υλικό καλλιεργήθηκαν επίσης ξεχωριστά ο δότης και ο λήπτης, των οποίων η ανάπτυξη έπρεπε να ανασταλεί πλήρως, για να εξακριβωθεί η σωστή σύστασή του. Επίσης, για τον αδρό υπολογισμό αριθμού των δοτών που περιείχε το αρχικό πυκνό εναιώρημα δότη-λήπτη, ενοφθαλμίσθηκαν 100μl από το εναιώρημα αυτό σε τρυβλίο που περιείχε μόνο 2 mg/L ιμιπενέμη ή 8 mg/L κεφταζιδίμη ώστε να μην επιβιώσει ο λήπτης, αλλά να αναπτυχθεί κυρίως ο δότης και τα λίγα αναμενόμενα κύτταρα των αποσυζευκτών. Τα τρυβλία επώασθησαν στους 37 °C για 18 ώρες. Η συχνότητα της μεταβίβασης της αντοχής υπολογίστηκε από το λόγο: αριθμός αποσυζευκτών προς αριθμό δοτών. Η μελέτη της φορείας πλασμιδίων έγινε με τη χρήση του εμπορικού κιτ ChargeSwitch Plasmid ER Mini Kit (Invitrogen) και το πρότυπο στέλεχος *E. coli* 39R861.



**Εικόνα 18:** Ενδεικτική απεικόνιση της μεθόδου cross-streak που εφαρμόστηκε (ΡΙΦ: ριφαμπικίνη, ΙΜΠ: ιμιπενέμη, ΚΕΦ: κεφταζιδίμη).

## II.9. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΕΞΩΤΕΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

Η μελέτη των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης (**OMPs – Outer Membrane Proteins**) έγινε ακολουθώντας δημοσιευμένα πρωτόκολλα (**Fernandez-Cuenca *et al*, 2003b**) για την ανεύρεση διαφορών που θα μπορούσαν να εξηγήσουν ενδοκλωνικές μεταβολές στην ευαισθησία στις καρβαπενέμες. Για το λόγο αυτό η διερεύνηση των προτύπων των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης έγινε σε στελέχη που ανήκαν στον ίδιο κλώνο και παρουσίαζαν διαφορετικό επίπεδο ευαισθησίας στις καρβαπενέμες. Συγκεκριμένα, τα βακτήρια επώασθησαν σε Mueller Hinton Broth (Biolife) στους 37 °C για 18 ώρες και ακολούθησε φυγοκέντρωση σε 3700 g για 15 λεπτά και στους 4 °C. Το ίζημα των κυττάρων εναιωρήθηκε σε 3 ml διαλύματος 10 mM PB (7.2 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2) και το εναιώρημα εκτέθηκε σε υπερήχους 8 φορές για 2 λεπτά την καθεμιά, με ενδιάμεση παύση 2 λεπτών. Η όλη διαδικασία διεξήχθη σε πάγο. Για την απομάκρυνση κυττάρων που δεν υπέστησαν λύση έγινε φυγοκέντρωση σε 3700 g για 15 λεπτά στους 4 °C και το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε σε 22200 g για 45 λεπτά στους 4 °C. Το ίζημα εναιωρήθηκε σε 1 ml διαλύματος 2% sodium lauryl sarcosinate σε 10 mM PB (pH 7.2) και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά. Μετά από φυγοκέντρωση σε 10000 g για 60 λεπτά στους 4 °C, το ίζημα εναιωρήθηκε σε 200 µl διαλύματος 62.5 mM Tris–HCl buffer, pH 6.8. Έγινε ηλεκτροφόρηση 10 µl από το προηγούμενο εναιώρημα σε γέλη πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιώντας το εμπορικό κιτ NUPAGE™ 4% - 12% Bis–Tris Gel 1.0 mm Kit (Invitrogen) και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η χρώση των πρωτεϊνών έγινε χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen). Για μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα έγινε χρώση αργύρου με το εμπορικό κιτ SilverQuest™ Silver Staining Kit (Invitrogen).

## II.10. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΛΙΩΝ ΕΚΡΟΗΣ

Για να διαπιστωθεί η ενδεχόμενη συμμετοχή αντλιών εκροής στην αντοχή στις καρβαπενέμες, έγιναν πειράματα αναστολής με τη χρήση 12.5 µM carbonyl cyanide chlorophenylhydrazone (CCCP) (**Quale *et al*, 2003**), που είναι γενικός αναστολέας αντλιών που λειτουργούν ως αντιμεταφορείς πρωτονίων. Έγινε σύγκριση της MIC των καρβαπενεμών όπως αυτή προσδιορίστηκε με Etest (AB Biodisk) στα στελέχη της μελέτης, χωρίς ή με τη παρουσία του αναστολέα σε Mueller Hinton Agar (Biolife).

## II.11. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ AdeABC ΑΝΤΛΙΑΣ

Η ύπαρξη και η σχετική έκφραση της AdeABC αντλίας εκροής στα στελέχη της μελέτης ανιχνεύθηκε με PCR και QRT-PCR χρησιμοποιώντας γνωστούς εκκινητές για το *adeB* γονίδιο (Πίνακας 9). Το πρωτόκολλο της ποσοτικοποίησης με QRT-PCR είναι αυτό που αναφέρεται παραπάνω.

## II.12. ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΓΕΝΟΥΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα στελέχη που επιλέχθηκαν τυχαία από τη συλλογή της μελέτης μεταξύ αυτών που ήταν ευαίσθητα στις καρβαπενέμες αλλά εμφάνιζαν διακριτές αποικίες μέσα στην άλω αναστολής των αντιβιοτικών στο Etest (AB Biodisk) και στο δισκίο που χρησιμοποιήθηκε στη μέθοδο διαχύσεως σε άγαρ. Η φαινοτυπική μελέτη της ετερογένειας της αντοχής έγινε βάσει δημοσιευμένων πρωτοκόλλων πληθυσμιακής ανάλυσης (**Hiramatsu et al, 1997**) και κινητικής της ιμιπενέμης (**Sakoulas et al, 2004**). Για λόγους σύγκρισης χρησιμοποιήθηκαν επίσης ένα στέλεχος με υψηλή αντοχή στις καρβαπενέμες (MIC > 32 mg/L για ιμιπενέμη και μεροπενέμη), ένα ευαίσθητο στέλεχος (MIC < 1 mg/L για ιμιπενέμη και μεροπενέμη) χωρίς αποικίες μέσα στην άλω αναστολής των καρβαπενεμών καθώς και το πρότυπο στέλεχος *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Για την ανάλυση των ετεροάντοχων υποπληθυσμών 10 μl από αρχικό εναιώρημα 0.5 της κλίμακας McFarland ενοφθαλμίσθηκαν σε τρυβλία Mueller Hinton Agar (Biolife) που περιείχαν καρβαπενέμη (ιμιπενέμη ή μεροπενέμη) σε υποδιπλάσιες αραιώσεις από 128 έως 0.5 mg/L. Τα τρυβλία επώασθηκαν στους 37 °C για 48 ώρες. Οι ενδιάμεσες συγκεντρώσεις της καρβαπενέμης από 16 έως 2 mg/L έγιναν με βαθμίδωση 2 mg/L και από 16 έως 32 mg/L με βαθμίδωση 8 mg/L ώστε να εντοπιστούν με μεγαλύτερη ακρίβεια οι αλλαγές στην ευαισθησία των υποπληθυσμών. Εκτιμήθηκε η συχνότητα εμφάνισης των ετεροάντοχων κυττάρων στη μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιβιοτικού της πληθυσμιακής ανάλυσης από το λόγο του αριθμού των κυττάρων που αναπτύχθηκαν προς τον αριθμό των κυττάρων που αναπτύχθηκαν σε τρυβλίο χωρίς αντιβιοτικό και που προήλθαν από το ίδιο αρχικό εναιώρημα. Επίσης, η σταθερότητα της ετεροαντοχής αυτών των αποικιών ελέγχθηκε με μέλετη της MIC με Etest (AB Biodisk) αφού ανακαλλιεργήθηκαν σε Mueller Hinton Agar (Biolife) χωρίς

αντιβιοτικό για τουλάχιστον επτά ημέρες. Στα πειράματα κινητικής-επιβίωσης του μικροβίου σχέση με το χρόνο έκθεσης στην ιμιπενέμη, περίπου  $10^7$  CFUs (100 µl από αρχικό εναιώρημα 0.5 της κλίμακας McFarland) ενοφθαλμίσθηκαν σε 5 ml Mueller-Hinton Broth (Biolife) που περιείχαν ιμιπενέμη σε συγκέντρωση από 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, έως και 32 φορές την MIC του πατρικού πληθυσμού όπως αυτή είχε αρχικά εκτιμηθεί με τη μέθοδο των αραιώσεων του αντιβιοτικού σε άγαρ. Στη συνέχεια, 100µl από τις υγρές καλλιέργειες ενοφθαλμίσθηκαν σε τρυβλία με Muller Hinton Agar (Biolife) σε 0, 20, 40, και 60 λεπτά επώασης καθώς και σε 2, 3, 4, 6, 9, 18 και 24 ώρες, ώστε να καταμετρηθούν τα κύτταρα που επιβίωσαν.

Για τη διερεύνηση του υποκείμενου μοριακού μηχανισμού έγινε σύγκριση της έκφρασης του γονιδίου *bla<sub>OXA-58</sub>* καθώς και του προτύπου των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης μεταξύ των ετερογενών υποπληθυσμών και των πατρικών πληθυσμών ενός από τα τέσσερα στελέχη το οποίο εμφάνισε σταθερή ετερογένεια. Τα πρωτόκολλα της ποσοτικοποίησης με QRT-PCR και της μελέτης των OMPs είναι αυτά που περιγράφονται παραπάνω. Επίσης, διερευνήθηκε ο σχετικός ρόλος της OXA-58 μελετώντας την MIC των καρβαπενεμών παρουσία 200 mM NaCl.

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή (5' → 3')		Μέγεθος Προϊόντος PCR (bp)	Συνθήκες PCR	Αναφορά				
<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	F	tga aca tta aaI cac tct t	825	94 °C 2 min 94 °C 1 min 53 °C 1 min (x 35) 72 °C 1 min 72 °C 10 min	Pournaras <i>et al</i> , 2006				
	R	cta taa aat acc taa ttg tt							
<i>bla</i> <sub>OXA-58</sub>	F	cga tca gaa tgt tca agc gc	528			Heritier <i>et al</i> , 2005b			
	R	acg att ctc ccc tct gcg c							
<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	F	gat gtg tca tag tat tcg tcg	1062				Afzal-Shah <i>et al</i> , 2001		
	R	tca caa caa cta aaa gca ctg							
<i>bla</i> <sub>OXA-24</sub>	F	gta cta atc aaa gtt gtg aa	1023					Senda <i>et al</i> , 1996	
	R	ttc ccc taa cat gaa ttt gt							
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	F	cta ccg cag cag agt ett tg	587						Nordmann <i>et al</i> , 2002
	R	aac cag ttt tgc ctt acc at							
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	F	atg gtg ttt ggt cgc ata tc	510						
	R	tgg gcc att cag cca gat c							
<i>bla</i> <sub>SPM</sub>	F	cct aca atc taa egg cga cc	649						
	R	tcg ccg tgt cca ggt ata ac							
<i>bla</i> <sub>GIM</sub>	F	aga acc ttg acc gaa cgc ag							
	R	act cat gac tcc tca cga gg							
<i>bla</i> <sub>SIM</sub>	F	tac aag gga ttc ggc atc g	552						
	R	taa tgg cct gtt ccc atg tg							
*5-CS	F	ggc atc caa gca gca ag							
*3-CS	R	aag cag act tga cct ga							
*ISAbal	F	cac gaa tgc aga agt tg							
*ISAb3	F	ttt tgg tgggtgc ttc aaa aag							
<i>ampC</i>	F	act tac ttc aac tcg cga cg	663						94 °C 2 min 94 °C 1 min 53 °C 1 min (x 35) 72 °C 1 min 72 °C 10 min
	R	taa aca cca cat atg ttc cg							
<i>adeB</i>	F	gga tta tgg cga cag aag ga	105						
	R	aat act gcc gcc aat acc ag							
<i>recA</i>	F	cct gaa tct tcY ggt aaa ac	426						
	R	gtt tct ggg ctg cca aac att ac							
ERIC-2	F/R	aag taa gtg act ggg gtg agc g				94 °C 2 min 94 °C 1 min 25 °C 1 min (x 40) 72 °C 1 min 72 °C 10 min			

\*Χρησιμοποιήθηκαν στις αντίστοιχες αντιδράσεις χαρτογράφησης που αναγράφονται παραπάνω.

**Πίνακας 9:** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη.



### III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### III.1. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Στη πλειοψηφία τους τα στελέχη της μελέτης επιλέχθηκαν ανθεκτικά τουλάχιστον σε τρεις κατηγορίες αντιμικροβιακών και συγκεκριμένα στα β-λακταμικά, στις αμινογλυκοσίδες και στις κινολόνες. Για τις καρβαπενέμες ειδικότερα, το ποσοστό των στελεχών που ήταν ευαίσθητα στη μεροπενέμη ήταν σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με το αντίστοιχο των ευαίσθητων στην ιμιπενέμη (59.4% και 32.2% αντίστοιχα) όπως φάνηκε από τον καθορισμό της MIC κάθε αντιμικροβιακού παράγοντα με τη μέθοδο των αραιώσεων του αντιβιοτικού σε άγαρ (MIC<sub>50/90</sub> 4/8 µg/mL και 8/64 µg/mL, για τη μεροπενέμη και την ιμιπενέμη αντίστοιχα). Επίσης, όλα τα στελέχη της μελέτης ήταν ευαίσθητα στη κολιστίνη.

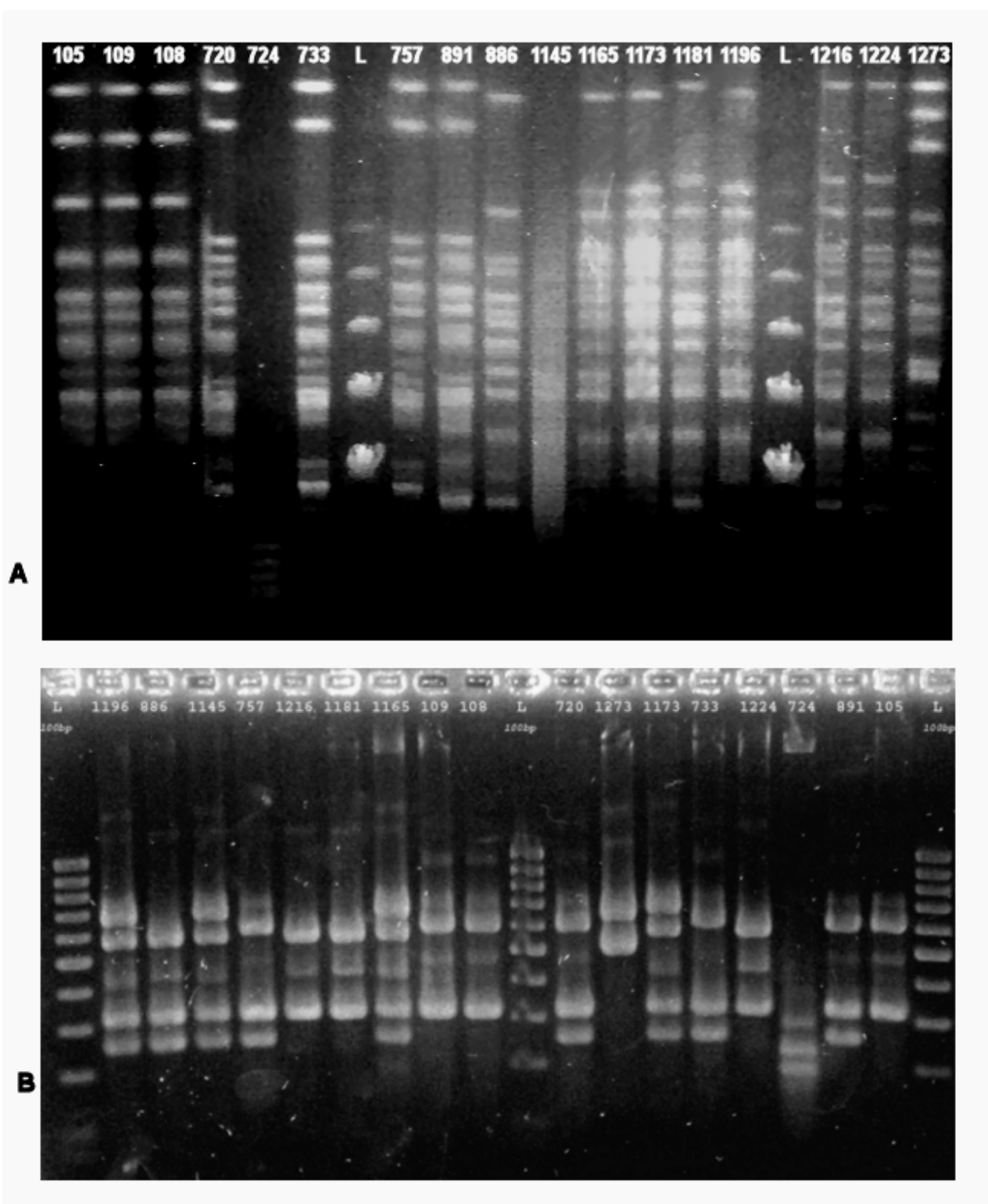
	SAM	IMP	MEM	TET	NN	GM	NET	OFX	CIP	LVX
<b>ΠΗΓΝΑ</b> (n=270)	263 (97.4%)	256 (94.8%)	197 (72.9%)	268 (99.2%)	267 (98.8%)	270 (100%)	267 (98.8%)	268 (99.2%)	268 (99.2%)	268 (99.2%)
<b>ΕΕΣ</b> (n=17)	6 (35.2%)	11 (64.7%)	12 (70.5%)	10 (58.8%)	10 (58.8%)	13 (76.4%)	10 (58.8%)	15 (88.2%)	15 (88.2%)	15 (88.2%)
<b>ΓΝ</b> <b>Σερρών</b> (n=31)	26 (83.8%)	25 (80.6%)	26 (83.8%)	31 (100%)	29 (93.5%)	30 (96.7%)	29 (93.5%)	31 (100%)	31 (100%)	31 (100%)

SAM: αμπικιλίνη/σουλμπακτάμη, IMP: ιμιπενέμη, MEM: μεροπενέμη, TET: τετρακυκλίνη, NN: τομπραμυκίνη, GM: γενταμυκίνη, NET: νετιμυκίνη, OFX: οφλοξασίνη, CIP: σιπροφλοξασίνη, LVX: λεβοφλοξασίνη, COL: κολιστίνη.

**Πίνακας 10:** Σύνολο των ανθεκτικών στελεχών της μελέτης στα κυριότερα αντιμικροβιακά φάρμακα που χρησιμοποιούνται σε λοιμώξεις από *A. baumannii*.

#### III.2. ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

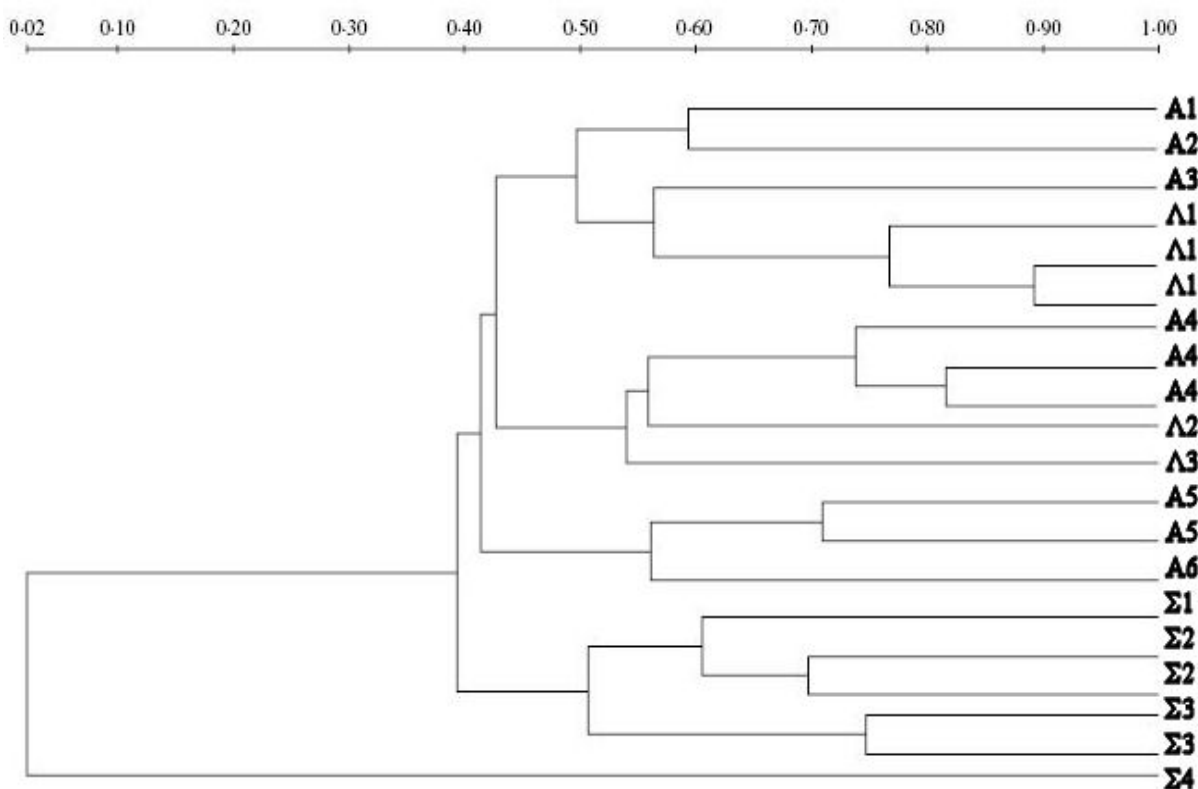
Τα στελέχη της μελέτης ανήκαν σε τουλάχιστον 13 διακριτούς γονότυπους. Συγκεκριμένα, τρεις γονότυποι απομονώθηκαν στο Γενικό Περιφερειακό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας, 6 γονότυποι στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών Κοργιαλένιο – Μπενάκειο και 4 γονότυποι στο Γενικό Νοσοκομείο Σερρών. Ανάμεσα στις δύο τεχνικές τυποποίησης που χρησιμοποιήθηκαν (RFLP-PFGE και ERIC-PCR) παρατηρήθηκε μερική συμφωνία όπως φαίνεται στην εικόνα 19.



**Εικόνα 19:** Συγκριτική απεικόνιση τυποποίησης των στελεχών από το Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών Κοργιαλένιο – Μπενάκειο με μακροπεριοστική πέψη και ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (RFLP-PFGE) (A) και ERIC-PCR (B).

*PFGE types:* I (105, 108, 109), II (720, 733, 757, 891), III (724), IV (886, 1165, 1173, 1181, 1196, 1145), V (1216, 1224), VI (1273).

*ERIC types:* I (1196, 1145, 1165, 1173), II (886, 757, 720, 733, 891), III (1216, 1181, 109, 108, 105, 1224), IV (724), V (1273).

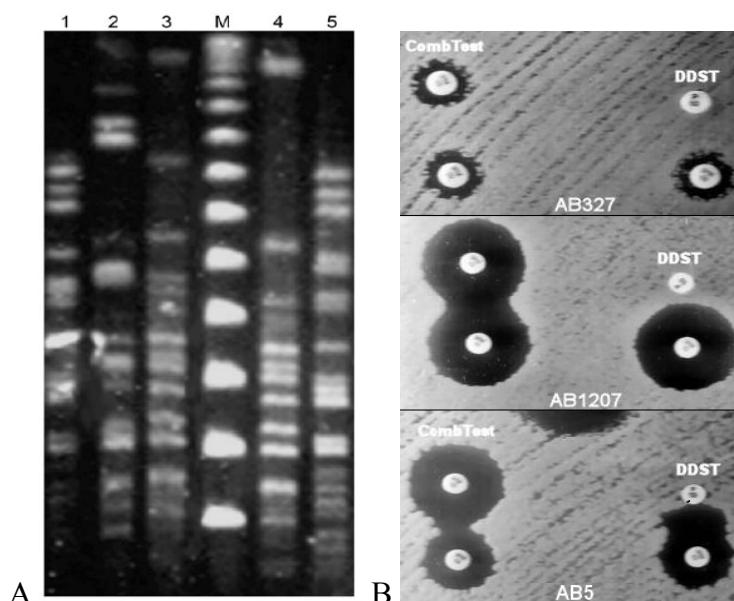


**Εικόνα 20:** Φυλογενετική σχέση αντιπροσωπευτικών στελεχών της μελέτης που ανήκαν και στους 13 γονοτύπους που απομονώθηκαν από τα νοσοκομεία της μελέτης. Τα στελέχη με ομοιότητα  $\geq 70\%$  στο πρότυπο των ζωνών της PFGE θεωρήθηκαν πιθανώς σχετιζόμενα. Η αρίθμηση δίπλα σε κάθε κλάδο αντιστοιχεί στη προέλευση (Α: Αθήνα, Λ: Λάρισα, Σ: Σέρρες) και στο γονότυπο.

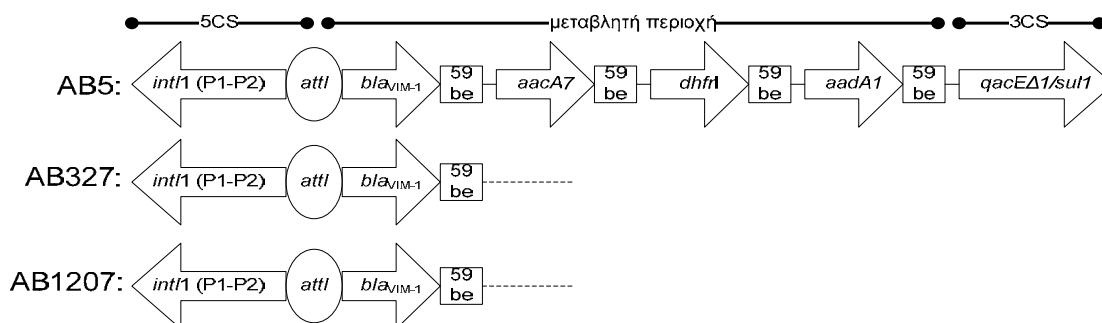
### III.3. ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΓΙΑ ΤΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΦΟΡΕΙΑΣ ΜΕΤΑΛΛΟ-Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΩΝ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ

Στο σύνολο των 318 στελεχών, η φαινοτυπική μελέτη ανέδειξε τρία στελέχη θετικά για παραγωγή μεταλλο-β-λακταμάσης και η μοριακή διερεύνηση με PCR έδωσε δύο ακόμα στελέχη θετικά για το *bla<sub>VIM</sub>* γονίδιο χωρίς όμως αυτά να επιδεικνύουν τυπικά θετικό φαινότυπο για MBL. Τα τρία πρώτα στελέχη ήταν επίσης θετικά για το *bla<sub>VIM</sub>* γονίδιο ενώ η χαρτογράφηση με PCR των σχετιζόμενων με αυτό μεταθετών στοιχείων έδειξε ότι σε όλα τα στελέχη το *bla<sub>VIM</sub>* γονίδιο σχετιζόταν με τύπου 1 ιντεγκρόνιο. Συγκεκριμένα, στα τρία στελέχη με θετικό φαινότυπο το ιντεγκρόνιο αποτελούσαν κατά σειρά 5' → 3' οι κασέτες των γονιδίων *bla<sub>VIM-1</sub>* (αντοχή στις β-λακτάμες), *aacA7* (αντοχή στις αμινογλυκοσίδες), *dhfrI* (αντοχή στην τριμεθοπρίμη)

και *aadA1* (αντοχή στις αμινογλυκοσίδες). Οι P1 και P2 υποκινητές στην 5'-CS περιοχή του ιντεγκρονίου ήταν ισχυρός και ανενεργός (χωρίς την εισδοχή τριών βάσεων γουανίνης) αντίστοιχα (GenBank Accession Number: DQ112355). Τα 2 στελέχη με αρνητικό φαινότυπο έφεραν επίσης το αλληλόμορφο *bla<sub>VIM-1</sub>* και είχαν αντίστοιχα ισχυρό P1 και ανενεργό P2 το πρώτο, και ασθενή P1 και ανενεργό P2 το δεύτερο. Η 3'-CS περιοχή των ιντεγκρονίων αυτών των στελεχών δεν ήταν δυνατόν να τυποποιηθεί. Τα 5 στελέχη ανήκαν σε διαφορετικούς κλώνους και είχαν απομονωθεί από νοσηλευόμενους των νοσοκομείων της Λάρισας και των Σερρών.



**Εικόνα 21:** A) Ανάλυση των γονοτύπων των 5 στελεχών που βρέθηκαν θετικά για το *bla<sub>VIM-1</sub>* γονίδιο με RFLP-PFGE (M: τεμάχια λ φάγου γνωστού μεγέθους). B) Φαινοτυπικά τεστ δύο δισκίων (CombTest: ιμιπενέμη-ιμιπενέμη+EDTA, DDST: ιμιπενέμη-EDTA,) για τα 2 στελέχη που επέδειξαν αρνητικό φαινότυπο (AB327, AB1207) αλλά ήταν θετικά για το *bla<sub>VIM-1</sub>* γονίδιο με PCR σε σύγκριση με ένα από τα στελέχη (AB5) με τυπικά θετικό για MBL φαινότυπο.



59be: 59 base-element

**Εικόνα 22:** Δομή των ιντεγκρονίων που σχετίζονταν με το *bla<sub>VIM-1</sub>* γονίδιο στα 5 στελέχη που βρέθηκαν θετικά για MBL. Τα βέλη υποδηλώνουν τη φορά μεταγραφής των γονιδίων.

```

        ← intI1 γονίδιο          -35box P1 υποκινητής -10box
AB5          GTGGAACCGGATGAAGGCACGAACCCAGTTGACAΤΑΑΓCCTGTTCGGTTCGTAAACTGTA
AB1207      -----GGATGAAGGCACGAACCCAGTTGACAΤΑΑΓCCTGTTCGGTTCGTAAACTGTA
AB327      -----GGATGAAGGCACGAACCCAGTTGACAΤΑΑΓCCTGTTCGGTTCGTAAAGCTGTA
                *****

AB5          ATGCAAGTAGCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCCTTGACCGAACGCAGCGGTGG
AB1207      ATGCAAGTAGCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCCTTGACCGAACGCAGCGGTGG
AB327      ATGCAAGTAGCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCCTTGACCGAACGCAGCGGTGG
                *****

                -10box P2 υποκινητής -35box
AB5          TAACGGCGCAGTGGCGGTTTTTCATGGCTTGTTATGACTGTTTTTTTGTACAGTCTATGCC
AB1207      TAACGGCGCAGTGGCGGTTTTTCATGGCTTGTTATGACTGTTTTTTTGTACAGTCTATGCC
AB327      TAACGGCGCAGTGGCGGTTTTTCATGGCTTGTTATGACTGTTTTTTTGTACAGTCTATGCC
                *****

AB5          TCGGGCATCCAAGCAGCAAGCGCGTTACGCCGTGGGTCGATGTTTGATGTTATGGAGCAG
AB1207      TCGGGCATCCAAGCAGCAAGCGCGTTACGCCGTGGGTCGATGTTTGATGTTATGGAGCAG
AB327      TCGGGCATCCAAGCAGCAAGCGCGTTACGCCGTGGGTCGATGTTTGATGTTATGGAGCAG
                *****

                aatI σημείο ανασυνδυασμού
AB5          CAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTTCGCCCTAAAACAAAAGTTATGCCGCACCCACCCCTA
AB1207      CAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTTCGCCCTAAAACAAAAGTTATGCCGCACCCACCCCTA
AB327      CAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTTCGCCCTAAAACAAAAGTTATGCCGCACCCACCCCTA
                *****

                blaVIM γονίδιο →
AB5          TGGAGTCTTGATGTTAAAAGTTATTAGTAGTTTATTGGTCTACATGACCGCGTCTGTCA
AB1207      TGGAGTCTTGATGTTAAAAGTTATTAGTAGTTTATTGGTCTACATGACCGCGTCTGTCA
AB327      TGGAGTCTTGATGTTAAAAGTTATTAGTAGTTTATTGGTCTACATGACCGCGTCTGTCA
                *****

AB5          GGCTGTGCAAGTCCGTTAGCCCATTCGGGGGAGCCGAGTGGTGAGTATCCGACAGTCAA
AB1207      GGCTGTGCAAGTCCGTTAGCCCATTCGGGGGAGCCGAGTGGTGAGTATCCGACAGTCAA
AB327      GGCTGTGCAAGTCCGTTAGCCCATTCGGGGGAGCCGAGTGGTGAGTATCCGACAGTCAA
                *****

AB5          CGAAATTCCGGTCCGAGAGGTCCGACTTTACCAGATTGCCGATGGTGTGTTGGTCCGATAT
AB1207      CGAAATTCCGGTCCGAGAGGTCCGACTTTACCAGATTGCCGATGGTGTGTTGGTCCGATAT
AB327      CGAAATTCCGGTCCGAGAGGTCCGACTTTACCAGATTGCCGATGGTGTGTTGGTCCGATAT
                *****

AB5          CGCAACGCAGTCGTTTGATGGCGCGGTCTACCCGTCCAATGGTCTCATGTGCCGTGATGG
AB1207      CGCAACGCAGTCGTTTGATGGCGCGGTCTACCCGTCCAATGGTCTCATGTGCCGTGATGG
AB327      CGCAACGCAGTCGTTTGATGGCGCGGTCTACCCGTCCAATGGTCTCATGTGCCGTGATGG
                *****

AB5          TGATGAGTTGCTTTTGATTGATACAGCGTGGGGTGCGAAAAACACAGCGGCACCTTCTCGC
AB1207      TGATGAGTTGCTTTTGATTGATACAGCGTGGGGTGCGAAAAACACAGCGGCACCTTCTCGC
AB327      TGATGAGTTGCTTTTGATTGATACAGCGTGGGGTGCGAAAAACACAGCGGCACCTTCTCGC
                *****

AB5          GGAGATTGAAAAGCAAATTGGACTTCCCCTAACCGTGCAGTCTCCACGCACCTTTCATGA
AB1207      GGAGATTGAAAAGCAAATTGGACTTCCCCTAACCGTGCAGTCTCCACGCACCTTTCATGA
AB327      GGAGATTGAAAAGCAAATTGGACTTCCCCTAACCGTGCAGTCTCCACGCACCTTTCATGA
                *****

AB5          CGACCGGTCCGGCGCGTGGTGTGCTTTCGGGGCGGCTGGGGTGGCAACGTACGCATCACC
AB1207      CGACCGGTCCGGCGCGTGGTGTGCTTTCGGGGCGGCTGGGGTGGCAACGTACGCATCACC
AB327      CGACCGGTCCGGCGCGTGGTGTGCTTTCGGGGCGGCTGGGGTGGCAACGTACGCATCACC
                *****

AB5          GTCGACACGCCGGCTAGCCGAGGCAGAGGGGAACGAGATTCCCACCCATTCTCTAGAAGG
AB1207      GTCGACACGCCGGCTAGCCGAGGCAGAGGGGAACGAGATTCCCACCCATTCTCTAGAAGG
AB327      GTCGACACGCCGGCTAGCCGAGGCAGAGGGGAACGAGATTCCCACCCATTCTCTAGAAGG
                *****
    
```

```

AB5          ACTCTCATCGAGCGGGGACGCAGTGCCTTCGGTCCAGTAGAGCTCTTCTATCCTGGTGC
AB1207      ACTCTCATCGAGCGGGGACGCAGTGCCTTCGGTCCAGTAGAGCTCTTCTATCCTGGTGC
AB327      ACTCTCATCGAGCGGGGACGCAGTGCCTTCGGTCCAGTAGAGCTCTTCTATCCTGGTGC
*****

AB5          TGCGCATTTCGACCGACAATCTGGTTGTATACGTCCCCTCAGCGAACGTGCTATACGGTGG
AB1207      TGCGCATTTCGACCGACAATCTGGTTGTATACGTCCCCTCAGCGAACGTGCTATACGGTGG
AB327      TGCGCATTTCGACCGACAATCTGGTTGTATACGTCCCCTCAGCGAACGTGCTATACGGTGG
*****

AB5          TTGTGCCGTTTCATGAGTTGTCAAGCACGTCTGCGGGGAACGTGGCCGATGCCGATCTGGC
AB1207      TTGTGCCGTTTCATGAGTTGTCAAGCACGTCTGCGGGGAACGTGGCCGATGCCGATCTGGC
AB327      TTGTGCCGTTTCATGAGTTGTCAAGCACGTCTGCGGGGAACGTGGCCGATGCCGATCTGGC
*****

AB5          TGAATGGCCACCTCCGTTGAGCGGATTCAAAAACACTACCCGGAAGCAGAGGTCGTCAT
AB1207      TGAATGGCCACCTCCGTTGAGCGGATTCAAAAACACTACCCGGAAGCAGAGGTCGTCAT
AB327      TGAATGGCCACCTCCGTTGAGCGGATTCAAAAACACTACCCGGAAGCAGAGGTCGTCAT
*****

AB5          TCCCGGGCACGGTCTACCGGGCGGTCTAGACTTGCTCCAGCACACAGCGAACGTTGTCAA
AB1207      TCCCGGGCACGGTCTACCGGGCGGTCTAGACTTGCTCCAGCACACAGCGAACGTTGTCAA
AB327      TCCCGGGCACGGTCTACCGGGCGGTCTAGACTTGCTCCAGCACACAGCGAACGTTGTCAA
*****
                                     inversed core site
AB5          AGCACACAAAAATCGCTCAGTCGCCGAGTAGCAGATGCGGCATAACAAATCGTTGGAGCG
AB1207      AGCACACAAAAATCGCTCAGTCGCCGAGTAGCAGATGCGGCATAACAAATCGTTGGAG--
AB327      AGCACACAAAAATCGCTCAGTCGCCGAGTAGCAGATGCGGCATAACAAATCG-----
*****
                                     59be                                     core site
AB5          GGACTTTTGCTACGCAGGCTGCGCCTACTCCGCAAAAAGCCCCTCAACTCAGGC GTTAGGC
AB1207      -----
AB327      -----

AB5          ACCAATGGATAGTTCGCCGC
AB1207      -----
AB327      -----
    
```

**Εικόνα 23:** Πολλαπλή στοίχιση (ClustalW v.1.81) των αλληλουχιών των P1 και P2 υποκινητών, των *bla<sub>VIM-1</sub>* γονιδίων και των στοιχείων 59be από τα 5 θετικά για MBL στελέχη της μελέτης.

α/α	Περιοχή	Υλικό	Γονότυπος PFGE	MIC (µg/ml)		Φαινοτυπικά Τεστ				Υποκινητές	
				IMP	MEM	CombTest		DDST	Etest MBL	P1	P2
						IMP	IMP + EDTA				
1	Λάρισα	Βρογχικό	II	32	4	11mm	1mm	+	+	Ισχυρός	Ανενεργός
1207	Σέρρες	Αίμα	Ib	2	1	26mm	26mm	-	-	Ισχυρός	Ανενεργός
3	Λάρισα	Αίμα	IV	128	32	10mm	16mm	+	+	Ισχυρός	Ανενεργός
327	Σέρρες	Αίμα	Ia	64	16	11mm	11mm	-	-	Ασθενής	Ανενεργός
5	Λάρισα	ENY	III	4	2	17mm	25mm	+	+	Ισχυρός	Ανενεργός

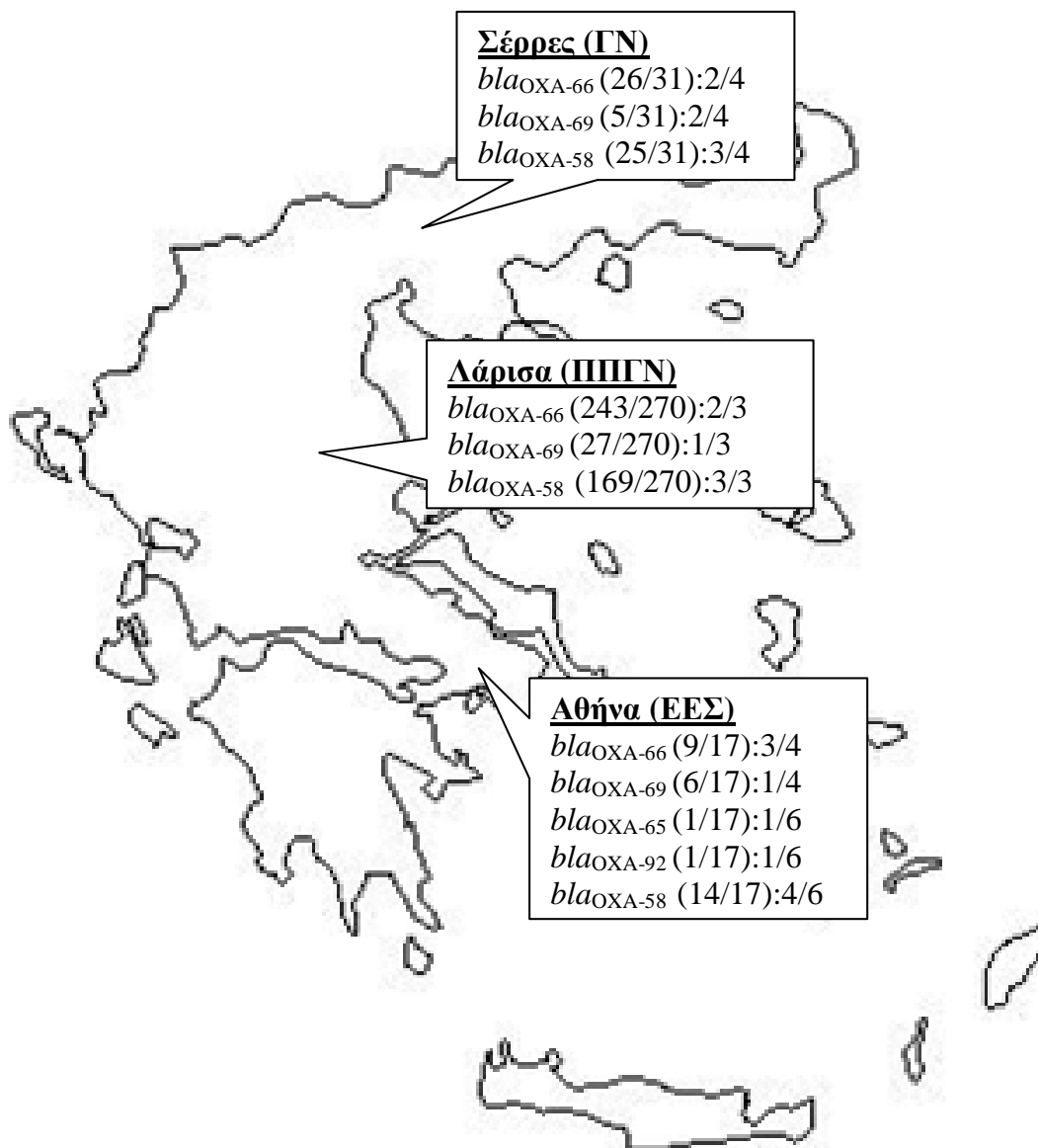
**Πίνακας 11:** Χαρακτηριστικά των 5 στελεχών που βρέθηκαν θετικά για MBL.

### III.4. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΟΞΑΚΙΛΙΝΑΣΩΝ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΕΙΣΔΟΧΗΣ

Όλα τα στελέχη της μελέτης ήταν θετικά για το ενδογενές *bla*<sub>OXA-51</sub> γονίδιο. Ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου και στους 13 γονότυπους ανέδειξε την υπεροχή των *bla*<sub>OXA-66</sub> και *bla*<sub>OXA-69</sub> αλληλομόρφων στις τρεις γεωγραφικές περιοχές που κάλυψε η παρούσα μελέτη. Σε στελέχη από το Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών Κοργιαλένιο – Μπενάκειο βρέθηκε επίσης το αλληλόμορφο *bla*<sub>OXA-65</sub> και ένα νέο αλληλομόρφο, το *bla*<sub>OXA-92</sub>, που παρουσιάζει 99% νουκλεοτιδική και αμινοξική ομοιότητα με το *bla*<sub>OXA-69</sub>, 98% με το *bla*<sub>OXA-65</sub> και το *bla*<sub>OXA-66</sub> και 97% με το *bla*<sub>OXA-51</sub>. Το *bla*<sub>OXA-92</sub> διαθέτει τη μεταστροφή G701C σε σχέση με το αλληλόμορφο *bla*<sub>OXA-69</sub>. Η μεταστροφή αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση της τρυπτοφάνης στη θέση 234 από σερίνη (η αριθμηση αντιστοιχεί στο OXA-69 ένζυμο, GenBank Accession Number: AY859527). Η μετάλλαξη αυτή εντοπίζεται εξωτερικά των κρίσιμων για τη δραστηριότητα του ενζύμου μοτίβων S-T-F-K, S-X-I, Y-G-N και K-S-G και πιθανώς δεν επηρεάζει τη δραστηριότητα του ενζύμου. Η αλληλουχία εισδοχής *ISAbal* βρέθηκε σε 189 από τα 318 στελέχη της μελέτης, αλλά σε κανένα από αυτά δεν συσχετίστηκε με το *bla*<sub>OXA-51</sub> αλληλόμορφο. Σε αυτά τα στελέχη ενδέχεται να συσχετίζεται με το *bla*<sub>AmpC</sub> γονίδιο όπως έχει ήδη αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία (Heritier *et al*, 2006).

Όσον αφορά στο *bla*<sub>OXA-58</sub> γονίδιο, από τα 318 στελέχη βρέθηκαν θετικά τα 208 χωρίς να παρουσιάζεται σημαντική ποσοστιαία διαφοροποίηση μεταξύ των αρνητικών και των θετικών στελεχών ανάμεσα στις τρεις γεωγραφικές περιοχές. Ιδιαίτερης σημασίας ήταν η συσχέτιση που παρατηρήθηκε ανάμεσα στην αντοχή στις καρβαπενέμες (ιμιπενέμη ή μεροπενέμη) και στη φορεία του εν λόγω γονιδίου. Συγκεκριμένα, τα ποσοστά των στελεχών που ήταν θετικά για το *bla*<sub>OXA-58</sub> γονίδιο και ταυτόχρονα ήταν ανθεκτικά στην ιμιπενέμη ή τη μεροπενέμη ήταν στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερα από το αντίστοιχα ποσοστά των στελεχών που ήταν θετικά μόνο για το ενδογενές *bla*<sub>OXA-51</sub> γονίδιο ( $P < 0.01$  και στις δύο περιπτώσεις). Η *ISAbal3* αλληλουχία εισδοχής βρέθηκε να εντοπίζεται κατά το ανάρρουν του *bla*<sub>OXA-58</sub> γονιδίου σε όλα τα στελέχη που ήταν θετικά για το εν λόγω γονίδιο. Ενδεικτικό της ευρείας διασποράς του *bla*<sub>OXA-58</sub> γονιδίου στο *A. baumannii* ήταν ότι στα στελέχη από το Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών Κοργιαλένιο – Μπενάκειο, το εν λόγω γονίδιο ήταν θετικό στους 4 από τους 6 γονότυπους που απομονώθηκαν από τη ΜΕΘ του νοσοκομείου. Η ευρεία

διασπορά του *bla*<sub>OXA-58</sub> γονιδίου επιβεβαιώθηκε με παρόμοιες παρατηρήσεις και από τα άλλα δύο νοσοκομεία της μελέτης όπως φαίνεται στην εικόνα 24.



**Εικόνα 24:** Επιπολασμός των *bla*<sub>OXA-51</sub> αλληλομόρφων και του *bla*<sub>OXA-58</sub> γονιδίου στα νοσοκομεία της μελέτης. Στις ετικέτες οι αριθμοί αντιστοιχούν στα εξής: *bla*<sub>OXA-X</sub> γονίδιο (σύνολο στελεχών που βρέθηκαν φορείς του *bla*<sub>OXA-X</sub> γονιδίου/σύνολο στελεχών από το συγκεκριμένο νοσοκομείο): σύνολο γονοτύπων που ανήκαν οι φορείς του *bla*<sub>OXA-X</sub> γονιδίου/σύνολο γονοτύπων από το συγκεκριμένο νοσοκομείο.

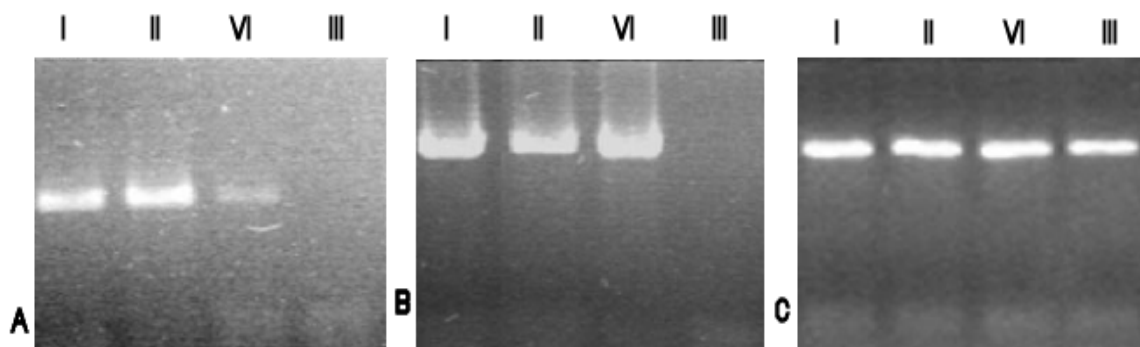


### III.5. ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΑΝ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΟ ΕΠΙΠΕΔΟ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ

Μεταξύ των 6 γονοτύπων που απομονώθηκαν στη ΜΕΘ του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών Κοργιαλέναιο – Μπενάκειο, παρατηρήθηκαν ενδεικτικές διαφορές στην έκφραση των γονιδίων *bla<sub>AmpC</sub>*, *bla<sub>OXA-51</sub>* και *bla<sub>OXA-58</sub>*. Συγκεκριμένα, οι 3 από τους 5 γονοτύπους που ήταν θετικοί για το *AmpC* γονίδιο έκφραζαν το γονίδιο και ήταν θετικοί για το *ISAbal* στοιχείο εισδοχής. Ένας γονότυπος έφερε το *AmpC* και το *ISAbal* αλλά δεν ήταν θετικός στο mRNA του γονιδίου. Ο άλλος αρνητικός στην έκφραση γονότυπος, έφερε το γονίδιο αλλά ήταν αρνητικός για την αλληλουχία εισδοχής. Όσον αφορά στο ενδογενές *bla<sub>OXA-51</sub>* γονίδιο, εάν και κανένας γονότυπος δεν έφερε την *ISAbal* αλληλουχία κατά το ανάρρουν του γονιδίου αυτού όπως αναφέρεται παραπάνω, 5 από τους 6 γονότυπους ήταν θετικοί στο mRNA. Επίσης, από τους 4 γονότυπους που έφεραν το *bla<sub>OXA-58</sub>* γονίδιο κατά το κατάρρουν του *ISAbal3* στοιχείου, οι 3 έκφραζαν το γονίδιο.

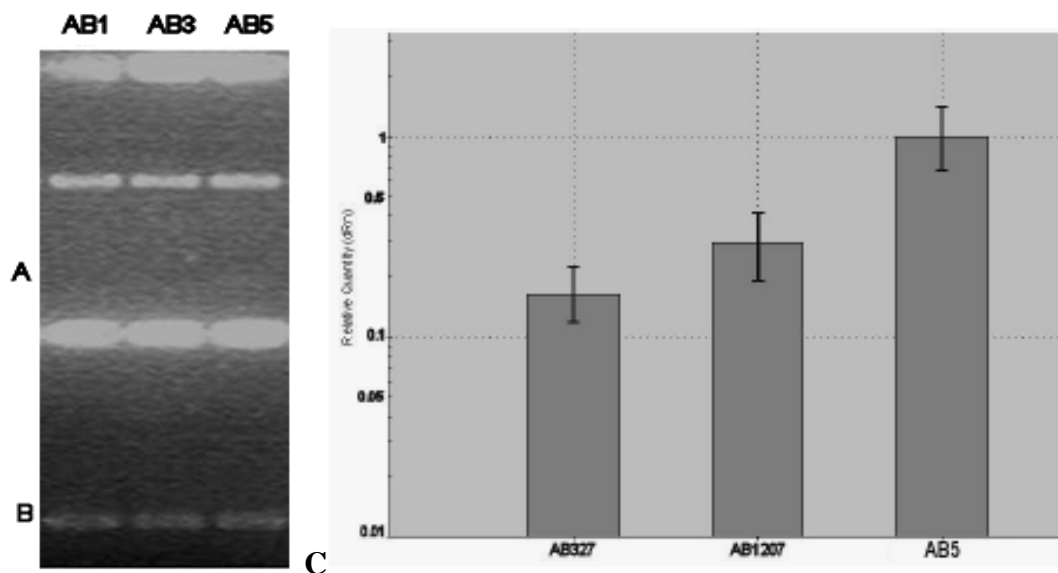
Γονότυπος	PCR				QRT-PCR		
	<i>bla<sub>AmpC</sub></i>	<i>bla<sub>OXA-58</sub></i>	<i>ISAbal</i>	<i>ISAbal3</i>	<i>bla<sub>ampC</sub></i>	<i>bla<sub>OXA-51</sub></i>	<i>bla<sub>OXA-58</sub></i>
I	+	+	+	+	-	+	+
II	+	+	+	+	+	+	+
III	+	+	+	+	+	-	-
IV	-	-	-	-	-	+	-
V	+	-	+	-	+	+	-
VI	+	+	-	+	-	+	+

**Πίνακας 12:** Εντόπιση με PCR και μελέτη της έκφρασης με QRT-PCR των γονιδίων *bla<sub>AmpC</sub>*, *bla<sub>OXA-51</sub>* και *bla<sub>OXA-58</sub>* στους γονοτύπους των στελεχών που απομονώθηκαν στη ΜΕΘ του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών Κοργιαλέναιο – Μπενάκειο.



**Εικόνα 25:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων QRT-PCR για τα γονίδια *bla*<sub>OXA-51</sub> (A), *bla*<sub>OXA-58</sub> (B) και *recA* (C) στους 4 θετικούς με PCR για το *bla*<sub>OXA-58</sub> γονίδιο γονοτύπους.

Τα τρία στελέχη από το Περιφερειακό Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας που ήταν θετικά για το *bla*<sub>VIM-1</sub> γονίδιο δεν παρουσίασαν ποσοτικές διαφορές στο επίπεδο μεταγραφής του γονιδίου. Ωστόσο, διαφορές παρουσιάστηκαν μεταξύ αυτών των στελεχών και των δύο στελεχών από το Γενικό Νοσοκομείο Σερρών. Συγκεκριμένα, το στέλεχος AB327 (ΓΝ Σερρών) παρουσίασε περίπου 2.5 φορές ( $2.62 \pm 0.05$ ) μικρότερο ποσοστό μεταγραφής του *bla*<sub>VIM-1</sub> γονιδίου σε σχέση με το AB5 στέλεχος (ΠΠΓΝ Λάρισας). Αντίστοιχα, το AB1207 παρουσίασε περίπου 1.5 φορές ( $1.76 \pm 0.09$ ) μικρότερο ποσοστό μεταγραφής του *bla*<sub>VIM-1</sub> γονιδίου σε σχέση με το AB5 στέλεχος.



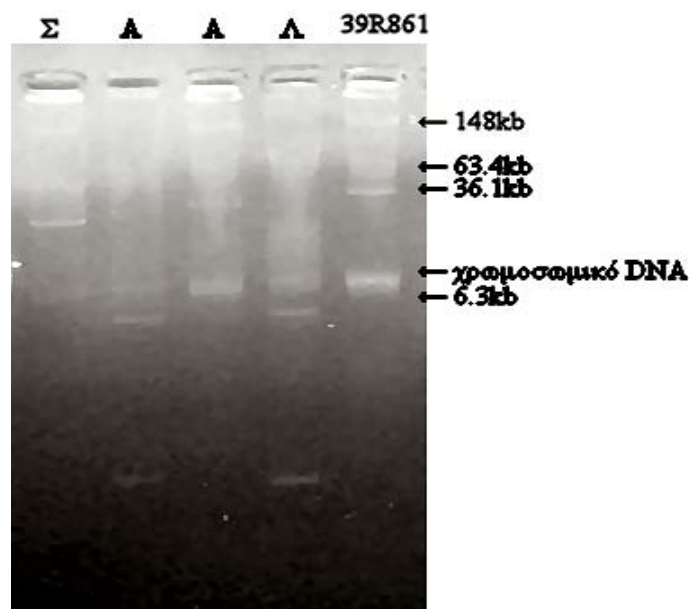
**Εικόνα 26:** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων QRT-PCR για τα γονίδια *bla*<sub>VIM-1</sub> (A) και *recA* (B) στα τρία στελέχη που απομονώθηκαν στο Περιφερειακό Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας. (C) Αποτελέσματα QRT-PCR για τα γονίδια *bla*<sub>VIM-1</sub> στα στελέχη που απομονώθηκαν στο Γενικό Νοσοκομείο Σερρών (AB327, AB1207) σε σύγκριση με ένα *bla*<sub>VIM-1</sub> θετικό στέλεχος από το Περιφερειακό Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας (AB5).

### III.6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ

Κανένα από τα 318 στελέχη της μελέτης δεν παρουσίασε σημαντική πτώση της MIC (η μείωση που παρατηρήθηκε ήταν μικρότερη ή ίση της μίας αραίωσης) στις καρβαπενέμες παρουσία cloxacillin ενώ η παρουσία NaCl μείωσε την MIC έως και 4 φορές. Συγκεκριμένα, 37 στελέχη (11.6%) επέδειξαν μία φορά μείωση της MIC της ιμιπενέμης κατά μία αραίωση παρουσία 200 mg/L cloxacillin. Αντίστοιχα, από τα 208 στελέχη που βρέθηκαν θετικά για το *bla*<sub>OXA-58</sub> γονίδιο, τα 153 (73.5%) επέδειξαν έως και τέσσερις φορές μείωση της MIC της ιμιπενέμης παρουσία 200 mM NaCl.

### III.7. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΙΒΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΦΟΡΕΙΑΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ

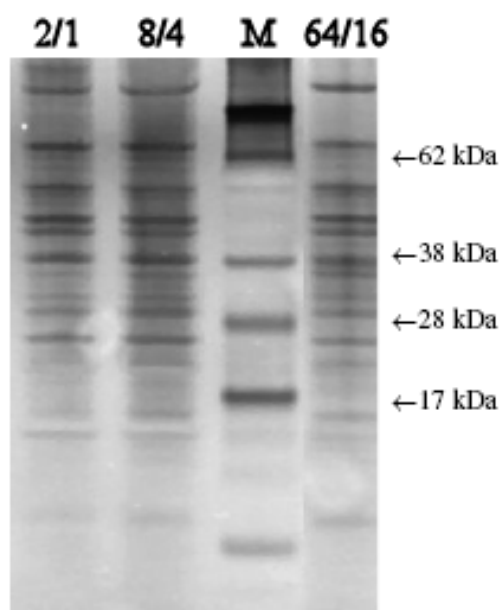
Κανένα αντιπροσωπευτικό στέλεχος από τους 13 γονοτύπους της μελέτης δεν έδωσε αποσυζεύκτες με το πρότυπο στέλεχος *Escherichia coli* 26R793. Ωστόσο, τα στελέχη αυτά βρέθηκαν να φέρουν πλασμίδια με μοριακό βάρος να κυμαίνεται από < 5kb έως 150kb.



**Εικόνα 27:** Ηλεκτροφόρηση πλασμιδιακού DNA από αντιπροσωπευτικά στελέχη του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (Λ), του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών Κοργιαλένιο – Μπενάκειο (Α) και του Γενικού Νοσοκομείου Σερρών (Σ). Τα μοριακά βάρη που αναγράφονται δεξιά της εικόνας αναφέρονται στα πλασμίδια του πρότυπου στελέχους *E. coli* 39R861.

### III.8. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΕΞΩΤΕΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΛΙΩΝ ΕΚΡΟΗΣ (ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ AdeABC ΑΝΤΛΙΑΣ)

Η μελέτη των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης σε στελέχη που ανήκαν στον ίδιο κλώνο αλλά παρουσίαζαν διαφορετική ευαισθησία στις καρβαπενέμες δεν έδειξε διαφορές στα πρότυπα ηλεκτροφόρησης. Ιδιαίτερα, ζώνες που αντιστοιχούν στις ήδη εμπλεκόμενες με την αντοχή στις καρβαπενέμες πορίνες (π.χ. HMP-AB: 37 kDa, CarO: 29 kDa) ανιχνεύθηκαν τόσο σε ευαίσθητα όσο και σε ανθεκτικά στελέχη του ίδιου κλώνου με παρόμοια ένταση. Επίσης, ούτε η χρώση αργύρου ανέδειξε διαφορές στην ένταση για τις εν λόγω ζώνες. Όσον αφορά τις αντλίες εκροής, όλα τα στελέχη της μελέτης βρέθηκαν θετικά για το *adeB* γονίδιο και το έκφραζαν σε ποικίλο βαθμό. Ωστόσο, πειράματα αναστολής των αντλιών εκροής τύπου RND με 12.5μM CCCP δεν επέφεραν μείωση της MIC της μιπενέμης ή της μεροπενέμης.



**Εικόνα 28:** Αντιπροσωπευτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών εξωτερικής μεμβράνης σε τρία στελέχη της μελέτης που ανήκαν στον ίδιο κλώνο αλλά παρουσίαζαν διαφορετική ευαισθησία στις καρβαπενέμες. Πάνω από κάθε στέλεχος αναγράφεται η MIC της μιπενέμης και της μεροπενέμης (M: Prestained Ladder, Invitrogen).

### III.9. ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΓΕΝΟΥΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ

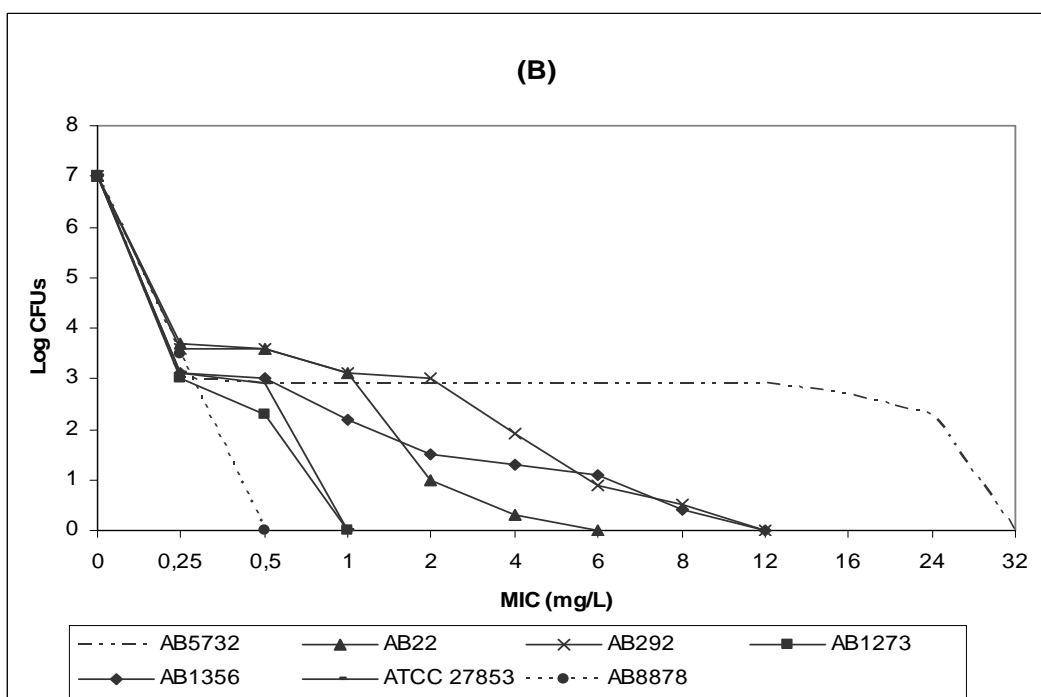
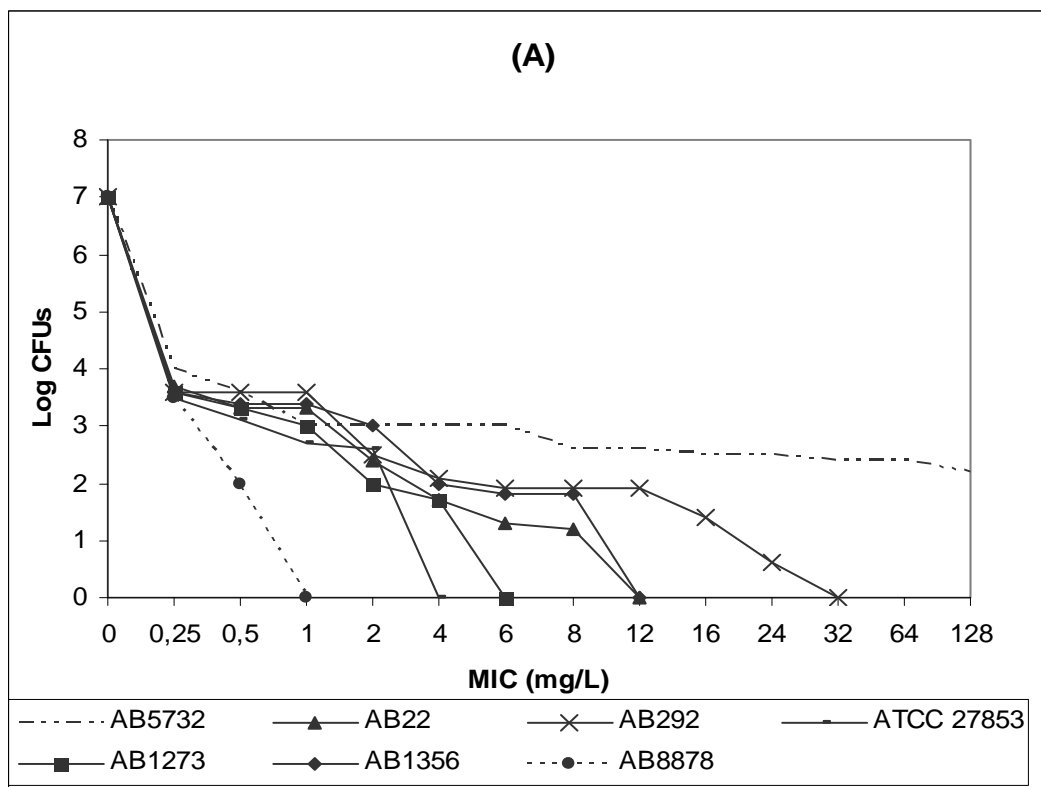
Η πληθυσμιακή ανάλυση αποκάλυψε ετεροάντοχους υποπληθυσμούς και στις δύο καρβαπενέμες για τα τέσσερα στελέχη που μελετήθηκαν. Η MIC των καρβαπενεμών των υποπληθυσμών αυτών ήταν τουλάχιστον τέσσερις φορές υψηλότερη από την αντίστοιχη του πατρικού πληθυσμού. Συγκεκριμένα, ενώ η MIC των πατρικών πληθυσμών κυμάνθηκε από 0.5 έως 2 mg/L για την ιμιπενέμη και από 0.25 έως 2 mg/L για τη μεροπενέμη, οι αντίστοιχες MIC των ετεροάντοχων υποπληθυσμών κυμάνθηκαν από 4 έως 24 mg/L και από 0.5 έως 8 mg/L. Η συχνότητα εμφάνισης ετεροάντοχων κυττάρων κυμάνθηκε από  $4.2 \times 10^{-6}$  έως  $7 \times 10^{-5}$  για την ιμιπενέμη και από  $2.4 \times 10^{-6}$  έως  $2.1 \times 10^{-4}$  για τη μεροπενέμη. Από τα τέσσερα στελέχη που μελετήθηκαν τα τρία επέδειξαν ασταθή ετεροάντοχο φαινότυπο και μετά από ανακαλλιέργειες επτά ημερών σε θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς αντιβιοτικό οι ετεροάντοχοι υποπληθυσμοί επανήλθαν στο πατρικό φαινότυπο με χαμηλή MIC και ετερογενείς αποικίες στις άλω αναστολής. Μόνο σε ένα στέλεχος οι υψηλές MIC των καρβαπενεμών διατηρήθηκαν σταθερές. Στις μελέτες κινητικής της ιμιπενέμης, τα τρία στελέχη με τον ασταθή ετεροάντοχο φαινότυπο αναπτύχθηκαν παρουσία ιμιπενέμης σε συγκέντρωση μέχρι και 4 φορές της πατρικής MIC, για περισσότερες από 24 ώρες και 8 φορές της πατρικής MIC για τουλάχιστον 9 ώρες. Το στέλεχος με το σταθερό φαινότυπο δεν αναπτύχθηκε μετά τις 9 ώρες παρουσία ιμιπενέμης σε συγκέντρωση 4 φορές της πατρικής MIC και μετά τις 3 ώρες σε συγκέντρωση 8 φορές της πατρικής MIC. Ωστόσο, μετά τις 24 ώρες επώασης παρατηρήθηκε ανάπτυξη του μικροβίου σε συγκέντρωση 4 φορές της πατρικής MIC αλλά όχι στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.

Οι ετερογενείς υποπληθυσμοί του στελέχους με το σταθερό ετεροάντοχο φαινότυπο έδειξαν να υπερεκφράζουν το *bla*<sub>OXA-58</sub> γονίδιο από 7 φορές στη μεροπενέμη ( $7.01 \pm 0.13$ ) έως και 9 φορές στην ιμιπενέμη ( $9.02 \pm 0.28$ ) σε σχέση με το πατρικό πληθυσμό. Η αναστολή της OXA-58 με 200 mM NaCl μείωσε την MIC της ιμιπενέμης από 64 σε 8 mg/L και της μεροπενέμης από 16 σε 4 mg/L για τους ετεροάντοχους υποπληθυσμούς του στελέχους. Η συγκέντρωση του NaCl που χρησιμοποιήθηκε δε φάνηκε να δρα βακτηριοκτόνα διότι δεν επέφερε μείωση της MIC των καρβαπενεμών στο πατρικό πληθυσμό. Τα πρότυπα ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης δεν έδειξαν διαφορές μεταξύ του πατρικού πληθυσμού και των ετεροάντοχων υποπληθυσμών.

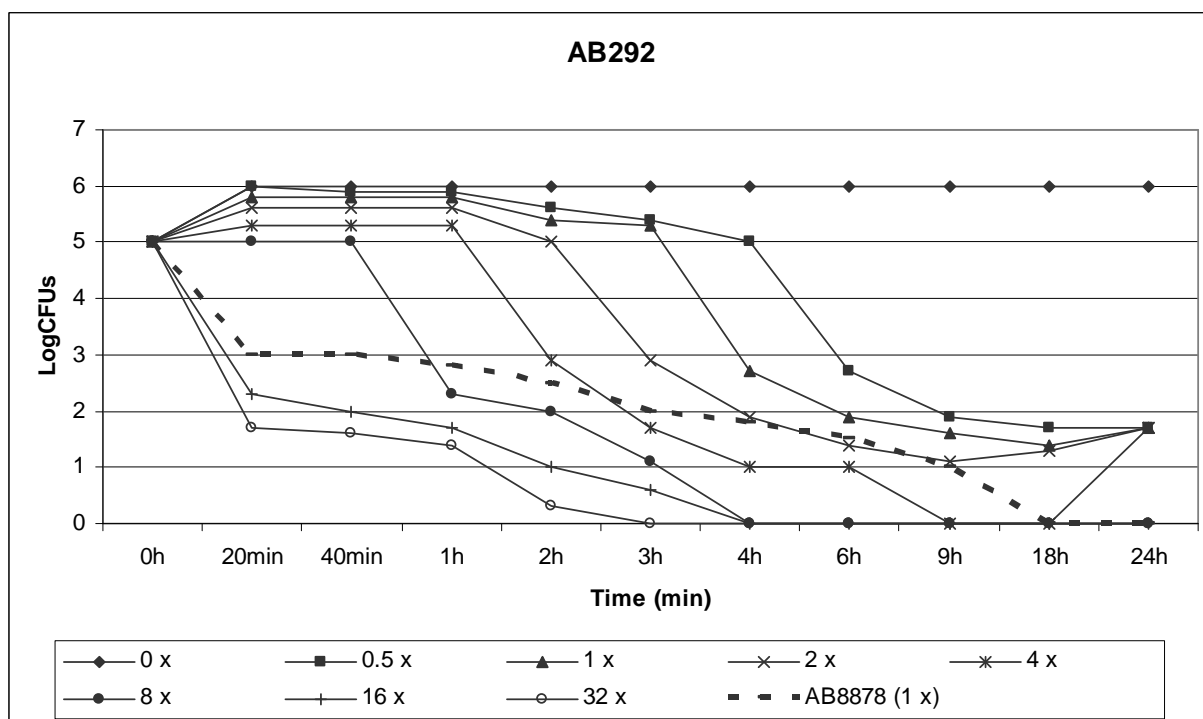
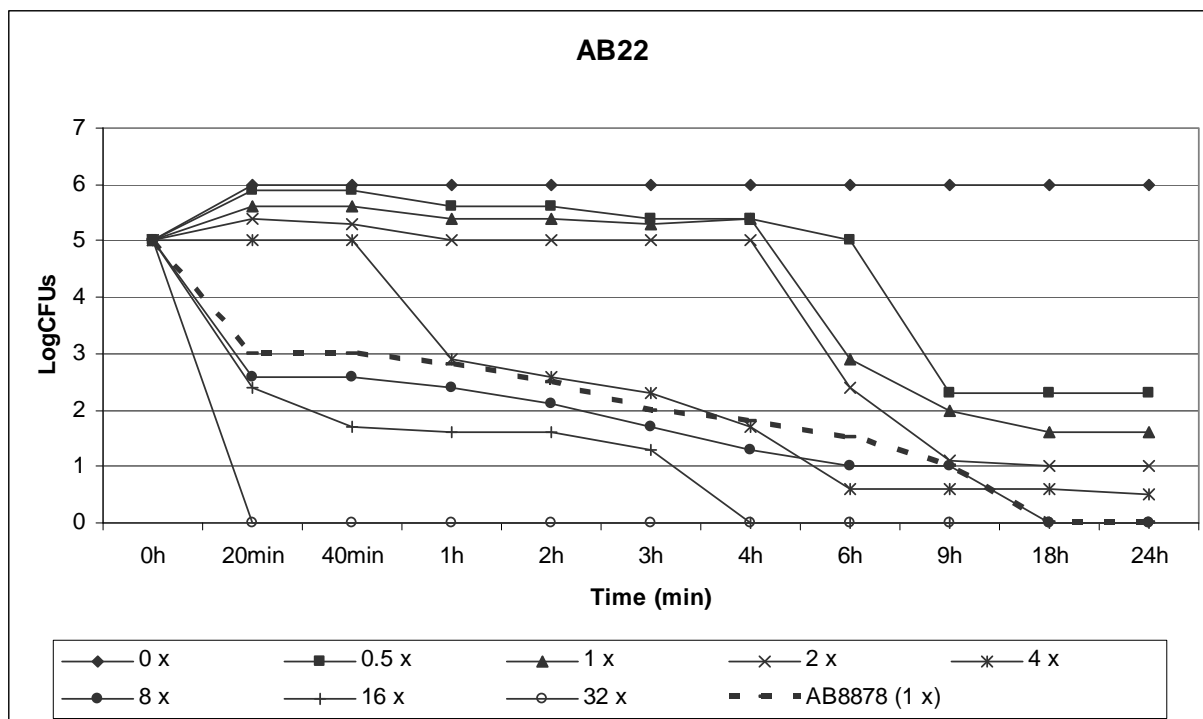
Στέλεχος	PCR				MIC (µg/ml) πατρικού πληθυσμού		Μέγιστη συγκέντρωση καρβαπενέμης (µg/ml) όπου παρατηρήθηκε ανάπτυξη ετεροάντοχου υποπληθυσμού		MIC (µg/ml) ετεροάντοχου υποπληθυσμού μετά από ανακαλλιέργεια χωρίς αντιβιοτικό		Συχνότητα ετεροαντοχής	
	<i>bla<sub>OXA51</sub></i>	<i>bla<sub>OXA58</sub></i>	<i>ISAbal</i>	<i>ISAbal3</i>	IMP*	MEM	IMP	MEM	IMP	MEM	IMP	MEM
	AB22	+	+	-	+	0.5	0.25	8	4	1	0.5	1.7 x 10 <sup>-5</sup>
AB292	+	+	-	+	2	2	24	8	64	16	4.2 x 10 <sup>-6</sup>	3 x 10 <sup>-6</sup>
AB1273	+	-	-	-	0.5	0.25	4	0.5	0.5	0.5	5.5 x 10 <sup>-5</sup>	2.1 x 10 <sup>-4</sup>
AB1356	+	-	-	-	0.5	0.5	8	6	0.5	0.25	7 x 10 <sup>-5</sup>	1.6 x 10 <sup>-5</sup>

\*IMP: μιπενέμη, MEM: μεροπενέμη

**Πίνακας 13:** Συγκεντρωτικά στοιχεία των στελεχών που μελετήθηκαν για ετεροαντοχή στις καρβαπενέμες.



**Εικόνα 29:** Αποτελέσματα της πληθυσμιακής ανάλυσης στην μιπενέμη (A) και τη μεροπενέμη (B) για τα τέσσερα στελέχη που ήταν ευαίσθητα στις καρβαπενέμες αλλά παρουσίαζαν ετερογενείς αποικίες στην άλω αναστολής των αντιβιοτικών (AB22, AB292, AB1273, AB1356) σε σχέση με ένα στέλεχος ανθεκτικό στις καρβαπενέμες (AB5732), ένα στέλεχος ευαίσθητο στις καρβαπενέμες αλλά χωρίς ετερογενείς αποικίες στην άλω αναστολής των αντιβιοτικών (AB8878) και το πρότυπο στέλεχος *P. aeruginosa* ATCC 27853.



**Εικόνα 30:** Αποτελέσματα της κινητικής της μιπενέμης για συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού από 0 έως 32 φορές της πατρικής MIC σε ένα στέλεχος με ασταθή ετεροάντοχο φαινότυπο (AB22) και στο στέλεχος με το σταθερό ετεροάντοχο φαινότυπο (AB292) σε σχέση με το ευαίσθητο στις καρβαπενέμες στέλεχος (AB8878).



#### IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα στελέχη της μελέτης επιλέχθηκαν στην πλειοψηφία τους με πανανθεκτικό χαρακτήρα και ιδιαίτερα για τις καρβαπενέμες, τα παρατηρούμενα ποσοστά αντοχής (67.8% για την ιμιπενέμη και 40.6% για τη μεροπενέμη αντίστοιχα) ήταν αρκετά υψηλά. Ωστόσο, σε αντίθεση με προηγούμενη αναφορά από το Βορειοελλαδικό χώρο (**Tsakris et al, 2003**), η μεροπενέμη φαίνεται να υπερέχει έναντι της ιμιπενέμης σε αντιμικροβιακή δράση έναντι των *A. baumannii* (**Ikonomidis et al, 2006**). Το μεγαλύτερο ποσοστό αντοχής στην ιμιπενέμη ενδέχεται να οφείλεται στην ευρεία χρήση του αντιμικροβιακού στις ΜΕΘ σε σχέση με τη μεροπενέμη. Επίσης, η παρατηρούμενη υπεροχή της μεροπενέμης έρχεται σε αντίθεση με την αντίστροφη κατάσταση που έχει παρατηρηθεί στην υπόλοιπη Ευρώπη και τη Β. Αμερική (**Jones et al, 2006**). Εξίσου υψηλό ποσοστό αντοχής (92.7%) τα στελέχη της μελέτης είχαν στην αμπικιλίνη σε συνδυασμό με τη σουλπακτάμη ενώ στις υπόλοιπες κατηγορίες αντιμικροβιακών τα ποσοστά ξεπέρασαν το 95%.

Η πολυκλωνικότητα των στελεχών που ενδημούν στα ελληνικά νοσοκομεία φάνηκε από τους τουλάχιστον 13 γονοτύπους που απομονώθηκαν από τις τρεις γεωγραφικές περιοχές της μελέτης (**Ikonomidis et al, 2007, Pournaras et al, 2006**). Εξαιτίας της μεγάλης χρονικής διάρκειας της συλλογής των στελεχών της μελέτης (5 έτη), ως ελάχιστο ποσοστό ομοιότητας που θα διέκρινε δύο επιδημιολογικά πιθανώς σχετιζόμενα στελέχη ορίστηκε το 70%. Το ποσοστό αυτό χρησιμοποιήθηκε έναντι του 80% (**Fillaux et al, 2006**) ώστε να αποφευχθεί η απώλεια της φυλογενετικής πληροφορίας από τις τυχαίες μεταλλάξεις που συσσωρεύονται ενδοκλωνικά (**Sader et al, 1993**). Εάν και δε μελετήθηκε η συσχέτιση των γονοτύπων που ανευρεθήκαν με τους Ευρωπαϊκούς κλώνους I και II, ωστόσο αναμένεται η αντιστοιχία ορισμένων από αυτούς εξαιτίας της γεωγραφικής συσχέτισης των νοσοκομείων της μελέτης με τα υπόλοιπα ευρωπαϊκά κέντρα. Για τις δύο τεχνικές τυποποίησης που χρησιμοποιήθηκαν (μακροπεριοστική πέψη γενωμικού DNA με ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο και ERIC-PCR) παρατηρήθηκε μερική συμφωνία στην ομαδοποίηση των στελεχών όπως αναμενόταν από αντίστοιχες μελέτες (**Dr. Alex van Belkum, προσωπική επικοινωνία**).

Όσον αφορά στους μοριακούς μηχανισμούς αντοχής στις καρβαπενέμες και ειδικότερα στις β-λακταμάσες, τα ευρήματα της μελέτης ήταν πρωτότυπα για τον ευρωπαϊκό χώρο. Ειδικότερα για τη τύπου OXA-51 οξακιλινάση, παρόλο που η διεθνής

βιβλιογραφία έχει δείξει την επικρατούσα ποικιλομορφία του ενδογενούς *bla*<sub>OXA-51</sub> γονιδίου και έχουν κατατεθεί τουλάχιστον 39 αλληλόμορφα (Evans *et al*, 2007, Tsakris *et al*, 2007), ωστόσο στην Ελλάδα παρατηρήθηκε η επικράτηση των *bla*<sub>OXA-66</sub> και *bla*<sub>OXA-69</sub> αλληλομόρφων (Ikonomidis *et al*, 2007) σε σύνολο 318 στελεχών. Η παρατήρηση αυτή δημιουργεί τις εξής δύο υποθέσεις: πρώτον, τα στελέχη *A. baumannii* που ενδημούν στον ελλαδικό χώρο έχουν προέλθει από έναν κοινό πρόγονο, ο οποίος με τη πάροδο του χρόνου συσσώρευσε μεταλλάξεις και διαφοροποιήθηκε σε διακριτούς γονότυπους ή δεύτερον, αυτά τα δύο αλληλόμορφα του *bla*<sub>OXA-51</sub> γονιδίου είναι ευρέως διαδεδομένα στους συγκεκριμένους κλώνους που ενδημούν στα ελληνικά νοσοκομεία. Είναι επίσης σημαντικό να τονιστεί ότι σε κανένα από τα στελέχη της μελέτης το γονίδιο αυτό δε βρέθηκε να σχετίζεται με την *ISAbal* αλληλουχία εισδοχής που έχει αναφερθεί να προκαλεί επαγωγή της έκφρασής του (Turton *et al*, 2006c). Συνεπώς το ένζυμο αυτό, λόγω του ήδη περιορισμένου φάσματος υδρόλυσης που το χαρακτηρίζει και της απουσίας αλληλουχιών εισδοχής που θα του παρείχαν ισχυρούς υποκινητές, θεωρήθηκε ότι δεν είχε ιδιαίτερο ρόλο στην αντοχή στις καρβαπενέμες που επέδειξαν τα στελέχη της μελέτης. Η OXA-58 οξακιλινάση ανιχνεύθηκε στην πλειοψηφία των στελεχών (65.4%) ενώ σε όλα αυτά τα στελέχη το *bla*<sub>OXA-58</sub> γονίδιο βρέθηκε να σχετίζεται με την *ISAbaz* αλληλουχία εισδοχής. Στους ισχυρούς υποκινητές που παρείχε το στοιχείο αυτό στο εν λόγω γονίδιο ενδέχεται να οφείλεται η θετική συσχέτιση που βρέθηκε μεταξύ της φορείας του *bla*<sub>OXA-58</sub> γονιδίου και της υψηλότερης αντοχής στις καρβαπενέμες σε σχέση με τα στελέχη που έφεραν μόνο το *bla*<sub>OXA-51</sub> γονίδιο (Tsakris *et al*, 2006b). Από τις πρώτες επίσης αναφορές, σε ευρωπαϊκό επίπεδο, έξαρσης κρουσμάτων λοίμωξης από *A. baumannii* σε ΜΕΘ, που ήταν θετικά για την OXA-58, αποτέλεσαν τα στελέχη που απομονώθηκαν από το Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών Κοργιαλένιο – Μπενάκειο (Pournaras *et al*, 2006). Ενδεικτικό του ρόλου που διαδραματίζει το επιμολυσμένο νοσοκομειακό περιβάλλον για τον αποικισμό και την ακόλουθη μόλυνση και λοίμωξη από *A. baumannii* ήταν ότι ένα από τα περιβαλλοντικά στελέχη που συλλέχθηκε από τη ΜΕΘ αυτού του νοσοκομείου ανήκε σε κλώνο που απομονώθηκε από διαφορετικούς νοσηλεύομενους στη ΜΕΘ. Στα πλαίσια περιορισμού της διασποράς αυτών των κλώνων μέσα στη ΜΕΘ αναφέρθηκε ότι εφαρμόστηκαν αυστηρώς μέτρα αντισηψίας των χεριών του νοσηλευτικού και ιατρικού προσωπικού. Επίσης, παρά το ότι η υπερέκφραση του *bla*<sub>OXA-58</sub> γονιδίου υπό τον έλεγχο του *ISAbaz* έχει αναφερθεί να συμβάλλει σε υψηλά επίπεδα αντοχής στις καρβαπενέμες (Poirel *et al*, 2006a), δεν

ανιχνεύθηκαν ποσοτικές διαφορές στην έκφραση του γονιδίου μεταξύ στελεχών που ανήκαν στον ίδιο κλώνο και εμφάνιζαν διαφορετικό επίπεδο αντοχής. Επομένως, φαίνεται πιθανό η OXA-58 οξακιλλινάση να μην ευθύνεται για τις ενδοκλωνικές διαφορές στην ευαισθησία στις καρβαπενέμες που παρουσιάζει το είδος. Η ανίχνευση ενός κλώνου (κλώνος III) από το Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών Κοργιαλένιο – Μπενάκειο, ο οποίος ήταν θετικός για το *bla*<sub>OXA-58</sub> γονίδιο αλλά ήταν αρνητικός στο mRNA του γονιδίου ενισχύει ακόμα περισσότερο την υπόθεση ότι η OXA-58 δεν ευθύνεται για την υψηλή αντοχή στις καρβαπενέμες (MIC: ιμιπενέμης > 64 mg/L, μεροπενέμης > 16 mg/L για τα στελέχη του κλώνου III) εάν και πειράματα αναστολής με 200 mM NaCl έδειξαν ότι τα ένζυμα που αναστέλλονται από αυτό το παράγοντα πιθανόν να συνεισφέρουν στην παρατηρούμενη αντοχή.

Μεταλλο-β-λακταμάσες τύπου VIM-1 στο *A. baumannii* απομονώθηκαν επίσης για πρώτη φορά από 5 στελέχη της μελέτης (Tsakris *et al*, 2006a, Ikonomidis *et al*, **J Clin Microbiol in press**). Στα στελέχη αυτά το *bla*<sub>VIM</sub> γονίδιο βρέθηκε να είναι μέρος ενός ιντεγκρονίου τύπου 1 και σε τρεις περιπτώσεις η γενετική του σύσταση ήταν παρόμοια με την ευρέως διαδεδομένη δομή που ανευρίσκεται στα Gram αρνητικά παθογόνα στα ελληνικά νοσοκομεία και που περιλαμβάνει κατά σειρά τις κασέτες των *bla*<sub>VIM</sub>, *aacA7*, *dhfrI* και *aadA1* γονιδίων (Giakkoupi *et al*, 2003, Miriagou *et al*, 2003). Στα άλλα δύο στελέχη η 3'-CS περιοχή δεν ήταν δυνατόν να τυποποιηθεί αλλά η ομοιότητα των 59bp των *bla*<sub>VIM</sub> γονιδιακών κασετών με τα ήδη δημοσιευμένα για την Ελλάδα δεδομένα υπαγορεύει τη διασπορά αυτών των γονιδίων ανάμεσα στη νοσοκομειακή χλωρίδα με τη διαμεσολάβηση μεταθετών στοιχείων (Miriagou *et al*, 2003). Σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης, τα *bla*<sub>VIM</sub> αλληλόμορφα της μελέτης δεν επέδειξαν σημαντικές διαφορές όταν εντοπίζονταν κατά το κατάρρουν ισχυρού P1 υποκινητή. Ωστόσο, υπό τον έλεγχο ασθενή P1 υποκινητή ανιχνεύθηκε τουλάχιστον 2.5 φορές μειωμένη έκφραση του γονιδίου (AB327) σε σχέση με τον ισχυρό P1. Το εύρημα αυτό μπορεί εν μέρει να δικαιολογήσει την αποτυχία φαινοτυπικής ανίχνευσης της VIM-1 λακταμάσης στο AB327 στέλεχος αν και άλλοι μηχανισμοί δεν μπορούν να αποκλειστούν. Για παράδειγμα, παράγοντες του κυτταρικού τοιχώματος που διατηρούν την αντοχή του στελέχους υψηλή ενδέχεται να καλύπτουν φαινοτυπικά τη συνέργεια του EDTA με την ιμιπενέμη στις αντίστοιχες δοκιμασίες. Σημαντική επίσης παρατήρηση είναι η ύπαρξη στελεχών, όπως το AB5 και το AB1207, τα οποία παρά τη φορεία και την έκφραση *bla*<sub>VIM-1</sub> γονιδίων παραμένουν ευαίσθητα στις καρβαπενέμες υποδηλώνοντας την αδυναμία αυτών των γονιδίων να προσδώσουν υψηλή αντοχή

ανεξάρτητα από το ευρύ υδρολυτικό τους φάσμα. Για το λόγο αυτό επίσης, το Etest MBL (AB Biodisk) αδυνατεί να ανιχνεύσει τη φορεία MBL σε ευαίσθητα στελέχη και σε αυτές τις περιπτώσεις έχει αντικατασταθεί από άλλες πιο ευαίσθητες φαινοτυπικές δοκιμασίες (Franklin *et al*, 2006). Σημειώνεται ότι η αποτυχία ανίχνευσης φορέων MBL δε φαίνεται να είναι σημαντική για ένα ήδη πανανθεκτικό είδος όπως το *A. baumannii* στο οποίο επιπροσθέτως ενδέχεται η κατηγορία αυτή των γονιδίων να μην προσδίδει υψηλή αντοχή σε αντιμικροβιακά εκλογής (όπως οι καρβαπενέμες). Όμως, η ανεπάρκεια του ελέγχου της διασποράς τέτοιων παραγόντων, λόγω του αποτυχημένου σχεδιασμού ανίχνευσής των, ελλοχεύει τον κίνδυνο μεταφοράς τους σε στελέχη Gram αρνητικών βακτηριδίων που παραμένουν ακόμα ευαίσθητα σε β-λακταμικά αντιβιοτικά στα οποία οι VIM τύπου λακταμάσες παρουσιάζουν ισχυρό υδρολυτικό φάσμα. Επιδημιολογικοί λοιπόν λόγοι ελέγχου της μικροβιακής αντοχής επιβάλλουν τη μοριακή εξέταση στελεχών που έχουν μεγάλη πιθανότητα να φέρουν MBL ανεξάρτητα από το φαινότυπό τους.

Σχετικά με το κυτταρικό τοίχωμα, δεν βρέθηκαν διαφορές στο πρωτεϊνικό προφίλ της εξωτερικής μεμβράνης ανάμεσα σε στελέχη που ανήκαν στον ίδιο κλώνο αλλά παρουσίαζαν διαφορετικό επίπεδο αντοχής στις καρβαπενέμες. Επίσης, δεν ανιχνεύθηκαν διαφορές μεταξύ των διαφορετικών γονοτύπων. Ιδιαίτερα οι ζώνες που σχετίζονται με γνωστές για τη συμμετοχή τους στην αντοχή στις καρβαπενέμες OMPs, όπως η HMP-AB (37 kDa) και η CarO (29 kDa), ανιχνεύθηκαν σε όλα τα στελέχη με παρόμοια ένταση στην SDS ηλεκτροφόρηση. Επιπλέον, αναστολή των τύπου RND αντλιών εκροής με CCCP δεν επέφερε μείωση της MIC των καρβαπενέμων σε κανένα από τα στελέχη της μελέτης. Τα δεδομένα αυτά αποκλείουν για τη παρούσα μελέτη τη συμμετοχή είτε κάποιας OMPs είτε κάποιας αντλίας εκροής τύπου RND στη παρατηρούμενη αντοχή. Παραμένει ωστόσο πιθανό να υπάρχει κάποιος άγνωστος ακόμα παράγοντας του κυτταρικού τοιχώματος στον οποίο να οφείλεται η υψηλή αντοχή που επιδεικνύουν τα περισσότερα στελέχη. Ένας τέτοιος παράγοντας θα μπορούσε να επηρεάζει τη πρόσδεση του β-λακταμικού αντιβιοτικού (πενικιλινο-δεσμευτικές πρωτεΐνες) και το πεδίο αυτό παραμένει ακόμα αδιερεύνητο.

Η ετεροαντοχή στις καρβαπενέμες που καταγράφηκε ενδεικτικά στα τέσσερα ευαίσθητα στελέχη της μελέτης είναι ίσως το σημαντικότερο εύρημα αυτής της μελέτης από θεραπευτική άποψη. Το φαινόμενο αυτό αν και ήταν προ 20ετίας γνωστό για τα β-λακταμικά (Kayser *et al*, 1989) και είχε μελετηθεί εξαντλητικά σε στελέχη *Staphylococcus aureus* σχετικά με τη βανκομυκίνη (Hiramatsu *et al*, 1997), ωστόσο

παρέμενε μέχρι πρόσφατα αδιερεύνητο στα Gram αρνητικά βακτηρίδια. Αρχικά ο ετερογενής φαινότυπος αποκαλύφθηκε από την ανάπτυξη διακριτών αποικιών μέσα στην άλω αναστολής των καρβαπενεμών είτε στο Etest (AB Biodisk) είτε στο δισκίο (Pournaras *et al*, 2005, Pascual *et al*, 1997). Η ετερογένεια αυτή επαληθεύθηκε στα ευαίσθητα κλινικά στελέχη της παρούσας μελέτης με πρωτόκολλα πληθυσμιακής ανάλυσης που αποκάλυψαν ετερογενείς υποπληθυσμούς με MIC στις καρβαπενέμες έως και 16 φορές μεγαλύτερη από το πατρικό πληθυσμό. Εάν και οι ετερογενείς υποπληθυσμοί σε τρία από τα τέσσερα στελέχη επέστρεψαν στο πατρικό φαινότυπο και δεν διατήρησαν την υψηλή αντοχή μετά από συνεχείς ανακαλλιέργειες, παραμένει ακόμα άγνωστη η θεραπευτική δράση των καρβαπενεμών σε ασθενείς με λοίμωξη από τέτοια στελέχη. Πειράματα κινητικής της ιμιπενέμης που προσομοιώνουν έως ένα βαθμό τις *in vivo* συνθήκες έδειξαν την ελαττωμένη δραστηριότητα του αντιμικροβιακού έναντι αυτών των στελεχών σε σχέση με ένα ευαίσθητο στέλεχος που δεν παρουσίασε ετερογενή φαινότυπο. Αξιοσημείωτο επίσης είναι το στέλεχος που εμφάνισε σταθερή ετερογένεια (AB292) στην οποία φάνηκε να συμβάλλει η υπερέκφραση της OXA-58 οξακιλινάσης. Ο ετερογενής πληθυσμός που παράγει το στέλεχος AB292 είναι ενδεικτικός μεταλλακτών μέσα στον πατρικό πληθυσμό λόγω της σταθερότητας του φαινοτύπου του, όπως έχει αναφερθεί και σε στελέχη *P. aeruginosa* (Pournaras *et al*, 2007). Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός είναι ακόμα υπό μελέτη και παραμένει άγνωστο αν ένας τέτοιος υποπληθυσμός είναι πιο λοιμογόνος σε σχέση με το πατρικό του. Τα υπόλοιπα στελέχη λόγω της ασταθούς ετερογένειας που εμφανίζουν φαίνεται πως παράγουν τους ονομαζόμενους «εμμένοντες» πληθυσμούς (persisters) οι οποίοι επανέρχονται στον πατρικό φαινότυπο μετά την απομάκρυνση του αντιμικροβιακού και οι οποίοι είχαν αναφερθεί και στις αρχικές παρατηρήσεις για τα στελέχη *S. aureus* (Hiramatsu *et al*, 1997). Τέτοιοι πληθυσμοί έχουν μελετηθεί ευρέως και ο ρόλος τους σε ενδεχόμενη θεραπευτική αποτυχία είναι αμφισβητούμενος (Balaban *et al*, 2004). Όσον αφορά στη φαινοτυπική ανίχνευση της ετερογένειας, η επώαση για 24 ώρες των ευρέως εφαρμοσμένων δοκιμασιών του Etest (AB Biodisk) και των δισκίων αρκεί για να αποκαλύψει τους ετερογενείς υποπληθυσμούς μέσα στην άλω αναστολής. Παράταση του χρόνου επώασης μέχρι τις 48 ώρες, όπως έχει αναφερθεί για τα στελέχη *P. aeruginosa* (Pournaras *et al*, 2007), θεωρείται σκόπιμη για την αποκάλυψη ετερογενών υποπληθυσμών με χαμηλή συχνότητα εμφάνισης ώστε τελικά να αποφευχθεί υποεκτίμηση της ευαισθησίας του κλινικού στελεχούς στις καρβαπενέμες και ενδεχόμενη θεραπευτική αποτυχία.

Συνοπτικά, η παρούσα μελέτη κάλυψε ευρύ γεωγραφικό τμήμα της Ελλάδας συλλέγοντας κλινικά στελέχη από τρία απομακρυσμένα μεταξύ τους νοσοκομεία (νότια, κεντρική και βόρεια Ελλάδα) από τα οποία απομόνωσε τουλάχιστον 13 γονοτύπους αποδεικνύοντας έτσι την πολυκλωνικότητα των στελεχών *A. baumannii* που ενδημούν στη χώρα μας. Η ευαισθησία των στελεχών σε αντιμικροβιακούς παράγοντες ήταν ιδιαίτερα περιορισμένη με τη μεροπενέμη να επιδεικνύει τη καλύτερη δραστηριότητα. Σε επίπεδο μοριακών μηχανισμών αντοχής, οι λακταμάσες που ανιχνεύθηκαν (τύπου OXA-51, OXA-58 και VIM) δε φαίνεται να συμβάλλουν σε υψηλά επίπεδα αντοχής στις καρβαπενέμες αλλά η επιτήρηση της διασποράς τους κρίνεται αναγκαία για τον έλεγχο της μικροβιακής αντοχής. Υπεύθυνοι μηχανισμοί για την εν λόγω αντοχή φαίνεται να εντοπίζονται στο κυτταρικό τοίχωμα αλλά παραμένουν ακόμα αδιευκρίνιστοι. Άμεσο θεραπευτικό δίλημμα τίθεται από την ανάπτυξη ετεροάντοχων στις καρβαπενέμες υποπληθυσμών από φαινομενικά ευαίσθητα κλινικά στελέχη. Η ποικιλομορφία στη σταθερότητα του ετερογενούς φαινοτύπου και οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί πρέπει να μελετηθούν σε μεγάλο δείγμα στελεχών ώστε να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για τη συχνότητα του φαινομένου. Επίσης, *in vivo* μελέτες σε πειραματόζωα θα αναδείξουν το θεραπευτικό δυναμικό των καρβαπενέμων έναντι αυτών των μικροβιακών πληθυσμών και θα εξυπηρετήσουν την πιο ορθολογική θεραπεία των αντίστοιχων λοιμώξεων.



## V. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο έλεγχος των νοσοκομειακών λοιμώξεων που προκαλούνται από Gram αρνητικά βακτήρια απασχολεί τα τελευταία χρόνια όλες τις ανεπτυγμένες χώρες ιδιαίτερα μετά την εισαγωγή νέων, ευρέως φάσματος αντιβιοτικών. Από τα βακτήρια αυτά, το γένος *Acinetobacter* πρωταγωνιστεί στον αποικισμό και στις λοιμώξεις των νοσηλευόμενων στα νοσοκομεία. Κυρίαρχο ρόλο διαδραματίζει στη νοσοκομειακή πνευμονία ενώ είδη του γένους αυτού ενοχοποιούνται για ένα εύρος νοσοκομειακών λοιμώξεων όπως βακτηριαίμια, ουρολοίμωξη και δευτερογενής μηνιγγίτιδα. Τέτοιου είδους λοιμώξεις είναι συχνά εξαιρετικά δύσκολες στη θεραπευτική τους αντιμετώπιση λόγω του ότι τα μικροβιακά στελέχη που εμπλέκονται εμφανίζουν πολυανθεκτικό φαινότυπο αντοχής στις κυριότερες κατηγορίες των αντιβιοτικών. Το γεγονός αυτό επιβαρύνεται ακόμα περισσότερο από το ότι τα μικρόβια αυτά μπορούν να επιβιώσουν για μεγάλο διάστημα στο νοσοκομειακό περιβάλλον και έχουν τη δυνατότητα διασποράς τόσο μέσω του ανθρώπινου δυναμικού όσο και του νοσοκομειακού υλικού.

Η πρώτη εμφάνιση ανθεκτικών στην ιμιπενέμη στελεχών *A. baumannii* αναφέρθηκε στη Νέα Υόρκη των ΗΠΑ το 1994 και έκτοτε οι σχετικές αναφορές άρχισαν να πληθαίνουν παγκοσμίως. Μέχρι και σήμερα όμως, οι υποκείμενοι μοριακοί μηχανισμοί παραμένουν άγνωστοι παρά τη συστηματική μελέτη τους. Οι περισσότερες μελέτες αναφέρονται στη παραγωγή β-λακταμασών (π.χ. τύπου AmpC, OXA-51, OXA-58, VIM και IMP) αλλά κανένα από τα γονίδια που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα δεν κωδικοποιεί για ένζυμο με τόσο ισχυρή δραστηριότητα καρβαπενεμάσης ώστε να δικαιολογεί υψηλά επίπεδα αντοχής. Άλλοι μηχανισμοί όπως η μειωμένη διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος λόγω μειωμένης έκφρασης πορινών (π.χ. η CarO πορίνη) φαίνεται να δρουν συνεργικά με τις β-λακταμάσες και να προσδίδουν υψηλά επίπεδα αντοχής. Επίσης, η ύπαρξη αντλιών ενεργού εκροής καθώς και η μειωμένη έκφραση πενικιλινο-δεσμευτικών πρωτεϊνών στο τοίχωμα της πεπτιδογλυκάνης διερευνάται συστηματικά σε σχέση με το πολυανθεκτικό φαινότυπο του είδους.

Αρχικός σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η επιδημιολογική διερεύνηση της διασποράς στον ελλαδικό χώρο πολυανθεκτικών γονοτύπων *A. baumannii*. Για το λόγο αυτό τα κλινικά στελέχη της μελέτης συλλέχθηκαν από κλινικές τριών γεωγραφικά απομακρυσμένων ελληνικών νοσοκομείων. Επίσης, για καθέναν από τους γονοτύπους της μελέτης, ελέγχθηκε η φορεία και η έκφραση γνωστών καρβαπενεμασών καθώς και

το πρότυπο των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης όπως και η ύπαρξη αντλιών εκροής, με στόχο τη προκαταρκτική διερεύνηση της σχετικής συνεισφοράς στην αντοχή καθενός από τους αναζητούμενους μοριακούς μηχανισμούς.

Τα στελέχη της μελέτης επιλέχθηκαν στην πλειοψηφία τους πανθεκτικά και ιδιαίτερα για τις καρβαπενέμες, τα παρατηρούμενα ποσοστά αντοχής (67.8% για την ιμιπενέμη και 40.6% για τη μεροπενέμη αντίστοιχα) ήταν αρκετά υψηλά. Ωστόσο, η μεροπενέμη βρέθηκε να υπερέχει θεραπευτικά της ιμιπενέμης. Η πολυκλωνικότητα των στελεχών που ενδημούν στα ελληνικά νοσοκομεία φάνηκε από τους τουλάχιστον 13 γονοτύπους που απομονώθηκαν από τις τρεις γεωγραφικές περιοχές της μελέτης. Εάν και δε μελετήθηκε η συσχέτιση των γονοτύπων που ανευρεθήκαν με τους Ευρωπαϊκούς κλώνους I και II, ωστόσο αναμένεται η αντιστοιχία ορισμένων από αυτούς εξαιτίας της γεωγραφικής συσχέτισης των νοσοκομείων της μελέτης με τα υπόλοιπα ευρωπαϊκά κέντρα.

Όσον αφορά στους μοριακούς μηχανισμούς αντοχής στις καρβαπενέμες, για τη τύπου OXA-51 οξακιλίναση παρατηρήθηκε η επικράτηση των *bla*<sub>OXA-66</sub> και *bla*<sub>OXA-69</sub> αλληλομόρφων ενώ σε κανένα από τα στελέχη της μελέτης το γονίδιο αυτό δε βρέθηκε να σχετίζεται με την *ISAbal* αλληλουχία εισδοχής. Η OXA-58 οξακιλίναση ανιχνεύθηκε στη πλειοψηφία των στελεχών (65.4%) και σε όλα αυτά τα στελέχη το *bla*<sub>OXA-58</sub> γονίδιο βρέθηκε να σχετίζεται με την *ISAbaz* αλληλουχία εισδοχής. Στους ισχυρούς υποκινητές που παρείχε το *ISAbaz* στο εν λόγω γονίδιο ενδέχεται να οφείλεται η θετική συσχέτιση που βρέθηκε μεταξύ της φορείας του *bla*<sub>OXA-58</sub> γονιδίου και της υψηλότερης αντοχής στις καρβαπενέμες σε σχέση με τα στελέχη που έφεραν μόνο το *bla*<sub>OXA-51</sub> γονίδιο. Επίσης, δεν ανιχνεύθηκαν ποσοτικές διαφορές στην έκφραση του γονιδίου μεταξύ στελεχών που ανήκαν στον ίδιο κλώνο και εμφάνιζαν διαφορετικό επίπεδο αντοχής. Επομένως, φαίνεται πιθανό η OXA-58 οξακιλίναση να μην ευθύνεται για τις ενδοκλωνικές διαφορές στην ευαισθησία στις καρβαπενέμες που παρουσιάζει το είδος. Στα θετικά στελέχη για τη τύπου VIM-1 μεταλλο-β-λακταμάση, το *bla*<sub>VIM</sub> γονίδιο βρέθηκε να είναι μέρος ενός ιντεγκρονίου τύπου 1 και σε τρεις περιπτώσεις η γενετική του σύσταση ήταν παρόμοια με την ευρέως διαδεδομένη δομή που ανευρίσκεται στα Gram αρνητικά παθογόνα στα ελληνικά νοσοκομεία. Σε δύο στελέχη ήταν αδύνατη η φαινοτυπική ανίχνευση του VIM ενζύμου εν μέρει λόγω της υποέκφρασης του *bla*<sub>VIM-1</sub> γονιδίου σε σχέση με τα τρία παραπάνω στελέχη. Σχετικά με το κυτταρικό τοίχωμα, δεν βρέθηκαν διαφορές στο πρωτεϊνικό προφίλ της εξωτερικής μεμβράνης ή παρουσία αντλιών εκροής που να δικαιολογεί υψηλή αντοχή στις



καρβαπενέμες. Τέλος, η ετεροαντοχή στις καρβαπενέμες φαινομενικά ευαίσθητων στελεχών *A. baumannii* είναι ίσως το σημαντικότερο εύρημα αυτής της μελέτης από θεραπευτική άποψη. Πρωτόκολλα πληθυσμιακής ανάλυσης αποκάλυψαν ετερογενείς υποπληθυσμούς με MIC στις καρβαπενέμες έως και 16 φορές μεγαλύτερη από το πατρικό πληθυσμό. Πειράματα κινητικής της μιπενέμης έδειξαν την ελαττωμένη δραστηριότητα του αντιμικροβιακού έναντι αυτών των στελεχών αν και παραμένει ακόμα άγνωστη η θεραπευτική δράση των καρβαπενεμών σε ασθενείς που έχουν λοίμωξη οφειλούμενη σε τέτοιους πληθυσμούς.



## VI. SUMMARY

Surveillance and control of hospital infections caused by Gram negative bacteria has been a major concern over the last few years for the developed countries, especially after the introduction of wide-spectrum antibiotics. Among Gram negative genera, *Acinetobacter* has the lead in colonization and infection of hospitalized patients. Besides causing bacteremia, urinary tract infection and secondary meningitis, the genus is highly associated with nosocomial pneumonia. Such infections are usually difficult to treat due to the pandrug phenotype that the clinical isolates of genus *Acinetobacter* exhibit. In addition, these isolates have the potency to survive for long period within the nosocomial settings and thus might spread not only via the healthcare workers but also the inanimate material.

The first report of imipenem-resistant *A. baumannii* was from New York of the United States in 1994 and ever since several relative studies have been published worldwide. To date, however, the underlying molecular mechanisms of carbapenem-resistance in that species remain unknown. Most studies focus on the production of b-lactamases (e.x. AmpC, OXA-51, OXA-58, VIM and IMP type) but none of the characterized genes code for an enzyme with strong hydrolytic activity capable of causing high level carbapenem resistance. Other mechanisms such as low permeability of outer membrane due to repression of porins (e.x. porin CarO) seem to act in synergy with b-lactamases and contribute to high level carbapenem resistance. Also, the presence of efflux pumps or the repression of penicillin-binding proteins in the cell wall is a field yet poorly studied.

The initiative of this study was the epidemiological report on the dissemination of pandrug *A. baumannii* genotypes among clinical isolates. In that term, the study included isolates of several wards of three different and distant Greek hospitals. For each one of the recovered genotypes, the presence and expression of genes coding for known carbapenemases was examined. Also, outer membrane protein profiles as well as the presence of efflux pumps was tested in order to postulate on the relative contribution of the identified molecular mechanisms to the resistant phenotype of the genotypes.

The majority of the isolates of the study were pandrug resistant and particularly for the carbapenems, resistance rates were high (67.8% for imipenem and 40.6% for meropenem respectively) but meropenem appeared to be more effective than imipenem. The isolates belonged at least to 13 genotypes which is indicative of the multiclonality

of the endemic isolates of *A. baumannii* in Greece. Eventhough the relation of the recovered genotypes to the European Clones I and II was not investigated, this is anticipated due to the geographical location of the hospitals of the study relatively to other european healthcare settings.

As for the molecular mechanisms of carbapenem resistance, the prevalence of alleles *bla*<sub>OXA-66</sub> and *bla*<sub>OXA-69</sub> coding for type OXA-51 oxacillinases was detected while no association with insertion sequence *ISAbal* was found in any of the isolates of the study. Type OXA-58 oxacillinase was found in most of the isolates (65.4%) and in all of them was adjacent to insertion sequence *ISAbas3*. That might explain the positive correlation of gene *bla*<sub>OXA-58</sub> with higher level of carbapenem reistance relatively to the isolates that were positive only for gene *bla*<sub>OXA-51</sub>. Also, no variation in gene *bla*<sub>OXA-58</sub> expression was detected among isolates of the same genotype exhibiting different susceptibilty status to carbapenems. It is plausible that OXA-58 might not contribute to intragenotypic discrepancies of carbapenem resistance. In type VIM-1 metallo-b-lactamase positive isolates, gene *bla*<sub>VIM</sub> was found to be part of a class 1 integron and in three cases the variable region was similar to that widely disseminated among Gram negative pathogens in Greek hospitals. Two isolates were negative for metallo-b-lactamase production by phenotypic assays but positive for VIM-1 by PCR. That discripancy was partially due to the lower expression of gene *bla*<sub>VIM-1</sub> in these two cases relatively to the first three cases. Particularly for the cell wall related mechanisms, no differences were found in the outer membrane protein profile or no presence of efflux pump was detected that could explain carbapenem resistance. Finally, the detected heteroresistance of carbapenem susceptible *A. baumannii* clinical isolates is of major concern. Population analysis revealed heteroresistant subpopulations exhibiting carbapenem MIC as far as 16-fold greater than the native's population. Bactericidal assays utilizing imipenem showed low effect of the antimicrobial against these heteroresistant isolates. However, the *in vivo* efficacy of the carbapenems for the treatment of infections caused by such isolates is yet unknown.



## **ΑΝΑΦΟΡΕΣ**

1. **Abbo A**, Navon-Venezia S, Hammer-Muntz O, Krichali T, Siegman-Igra Y, Carmeli Y. 2005. Mutidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 11: 22-29.
2. **Afzal-Shah M**, Livermore DM. 1998. Worldwide emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemother* 41: 576-577.
3. **Afzal-Shah M**, Woodford N, Livermore DM. 2001. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 583-588.
4. **Allardet-Servent A**, Bouziges N, Carles-Nurit MJ, Bourg G, Gouby A, Ramuz M. 1989. Use of low-frequency-cleavage restriction endonucleases for DNA analysis in epidemiological investigations of nosocomial bacterial infections. *J Clin Microbiol* 27: 2057-2061.
5. **Ambler RP**. 1980. The structure of b-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond (Biol)* 289: 321-331.
6. **Ambler RP**, Coulson AF, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, Levesque RC, Tiraby G, Waley SG. 1991. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J* 276: 269-270.
7. **Aygun G**, Demirkiran O, Utku T, Mete B, Urkmez S, Yilmaz M, Yasar H, Dikmen Y, Ozturk R. 2002. Environmental contamination during a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in an intensive care unit. *J Hosp Infect* 52: 259-262.
8. **Balaban NQ**, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S. 2004. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* 305: 1622-1625.
9. **Barker KF**. 1999. Antibiotic resistance: a current perspective. *Br J Clin Pharmacol* 48: 109-124.
10. **Bartual SG**, Seifert H, Hippler C, Luzon MAD, Wisplinghoff H, Rodriguez-Valera F. 2005. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 43: 4382-4390.
11. **Beachy EH**. 1981. Bacterial adherence: Adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J Infect Dis* 143: 325-345.
12. **Bennett PM**. 1999. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J Antimicrob Chemother* 43:1-4.

13. **Bergogne-Berezin E**, Towner KJ. 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 9: 148-165.
14. **Berlau J**, Aucken H, Malnick H, Pitt T. 1999. Distribution of *Acinetobacter* species on skin of healthy humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18: 179-183.
15. **Bernards AT**, Harinck HIJ, Dijkshoorn L, van der Reijden TJK, van den Broek PJ. 2004. Persistent *Acinetobacter baumannii*? Look inside your medical equipment. *Infect Control Hosp Epidemiol* 25: 1002-1004.
16. **Bou G**, Martinez-Beltran J. 2000a. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 428-432.
17. **Bou G**, Oliver A, Martinez-Beltran J. 2000b. OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1556-1561.
18. **Bounaga S**, Laws AP, Galleni M, Page MI. 1998. The mechanism of catalysis and the inhibition of the *Bacillus cereus* zinc-dependent b-lactamase. *Biochem J* 331: 703-711.
19. **Bouvet PJM**, Grimont PAD. 1987. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 138: 569-578.
20. **Bouvet PJM**, Jeanjean S. 1989. Delineation of new proteolytic genospecies in the genus *Acinetobacter*. *Res Microbiol* 140: 291-299.
21. **Bouvet PJ**, Jeanjean S, Vieu JF, Dijkshoorn L. 1990. Species, biotype, and bacteriophage type determinations compared with cell envelope protein profiles for typing *Acinetobacter* strains. *J Clin Microbiol* 28: 170-176.
22. **Brisse S**, Milatovic D, Fluit CA, Kusters K, Toelstra A, Verhoef J, Schmitz JF. 2000. Molecular surveillance of European quinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. using automated ribotyping. *J Clin Microbiol* 38: 3636-3645.
23. **Brown S**, Young HK, Amyes SG. 2005a. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clin Microbiol Infect* 11: 15-23.
24. **Brown S**, Amyes SG. 2005b. The sequences of seven class D beta-lactamases isolated from carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from four continents. *Clin Microbiol Infect* 11: 326-329.

25. **Bush K.** 1989a. Characterization of b-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 259–263.
26. **Bush K.** 1989b. Classification of b-lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b9. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 264–270.
27. **Bush K.** 1989c. Classification of b-lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 271–276.
28. **Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA.** 1995. A functional classification scheme for b-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1211–1233.
29. **Carbonne A, Naas T, Blanckaert K, Couzigou C, Cattoen C, Chagnon JL, Nordmann P, Astagneau P.** 2005. Investigation of a nosocomial outbreak of extended-spectrum β-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a hospital setting. *J Hosp Infect* 60: 14-18.
30. **Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR.** 2004. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 4654-4661.
31. **Chang CH, Wei YF, Dijkshoorn L, Vaneechoutte M, Tang CT, Chang TC.** 2005. Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. *J Clin Microbiol* 43: 1632-1639.
32. **Chastre J, Fagon JY.** 2002. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 867-903.
33. **Choi CH, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ, Hyun SH, Kim SA, Lee SK, Lee JC.** 2005. Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell Microbiol* 7: 1127-1138.
34. **Chu YW, Afzal-Shah M, Houang ET, Palepou MI, Lyon DJ, Woodford N, Livermore DM.** 2001. IMP-4, a novel metallo-beta-lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 45:710-714.
35. **Cisneros JM, Rodriguez-Bano J.** 2002. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clin Microbiol Infect* 8: 687-693.
36. **Cisneros JM, Rodriguez-Bano J, Fernandez-Cuenca F, Ribera A, Vila J, Pascual A, Martinez-Martinez L, Bou G, Pachon J.** 2005. Risk-factors for the acquisition of

- imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Spain : a nationwide study. Clin Microbiol Infect 11: 874-879.
37. **Clark RB.** 1996. Imipenem resistance among *Acinetobacter baumannii*: association with reduced expression of a 33-36 kDa outer membrane protein. J Antimicrob Chemother 38: 245-251.
  38. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2005. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 15th informational supplement. M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
  39. **Cornaglia G,** Riccio ML, Mazzariol A, Lauretti L, Fontana R, Rossolini GM. 1999. Appearance of IMP-1 metallo-beta-lactamase in Europe. Lancet 353: 899-900.
  40. **Corvec S,** Caroff N, Espaze E, Giraudeau C, Drugeon H, Reynaud A. 2003. AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. J Antimicrob Chemother 52: 629-635.
  41. **D' Agata EMC,** Thayer V, Schaffner W. 2000. An outbreak of *Acinetobacter baumannii*: the importance of cross-transmission. Infect Control Hosp Epidemiol 21: 588-591.
  42. **Dalla-Costa LM,** Coelho JM, Souza HA, Castro ME, Stier CJ, Bragagnolo KL, Rea-Neto A, Pentead-Filho SR, Livermore DM, Woodford N. 2003. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. J Clin Microbiol 41: 3403-3406.
  43. **Da Silva GJ,** Correia M, Vital C, Ribeiro G, Sousa JC, Leitao R, Peixe L, Duarte A. 2002. Molecular characterization of bla(IMP-5), a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. FEMS Microbiol Lett 215: 33-39.
  44. **Da Silva GJ,** Quinteira S, Bértolo E, Sousa JC, Gallego L, Duarte A, Peixe L; Portugese Resistance Study Group. 2004. Long-term dissemination of an OXA-40 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clone in the Iberian Peninsula. J Antimicrob Chemother 54: 255-258.
  45. **del Mar Tomas M,** Beceiro A, Perez A, Velasco D, Moure R, Villanueva R, Martinez-Beltran J, Bou G. 2005. Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 49: 5172-5175.
  46. **Dijkshoorn L,** Aucken H, Gerner-Smidt P, Janssen P, Kaufmann ME, Garaizar J, Ursing J, Pitt TL. 1996. Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter*



- baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. J Clinical Microbiol 34: 1519-1525.
47. **Donald HM**, Scaife W, Amyes SG, Young HK. 2000. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. Antimicrob Agents Chemother 44:196-199.
48. **Dorsey CW**, Tomaras AP, Actis LA. 2002. Genetic and phenotypic analysis of *Acinetobacter baumannii* insertion derivatives generated with a transposome system. Appl Environ Microbiol 68: 6353-6360.
49. **Dupont M**, Pages JM, Lafitte D, Siroy A, Bollet C. 2005. Identification of an OprD homologue in *Acinetobacter baumannii*. J Proteome Res 4: 2386-2390.
50. **Evans BA**, Brown S, Hamouda A, Findlay J, Amyes SG. 2007. Eleven novel OXA-51-like enzymes from clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect 13: 1137-1138.
51. **Fernandez-Cuenca F**, Martinez-Martinez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A. 2003a. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 51: 565-574.
52. **Fernandez-Cuenca F**, Pascual A, Martinez Martinez L, Conejo MC, Perea EJ. 2003b. Evaluation of SDS-polyacrylamide gel systems for the study of outer membrane protein profiles of clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. J Basic Microbiol 43: 194-201.
53. **Ferrara AM**. 2006. Potentially multidrug-resistant non-fermentative gram-negative pathogens causing nosocomial pneumonia. Int J Antimicrob Agents 27: 183-195.
54. **Ferrer R**, Artigas A. 2002. Clinical review: non-antibiotic strategies for preventing ventilator-associated pneumonia. Crit Care 6: 45-51.
55. **Fillaux J**, Dubouix A, Conil JM, Laguerre J, Marty N. 2006. Retrospective analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated during a 4-year period in a university hospital. Infect Control Hosp Epidemiol 27: 647-653.
56. **Fournier PE**, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, Richet H, Robert C, Mangenot S, Abergel C, Nordmann P, Weissenbach J, Raoult D, Claverie JM. 2006. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. PLoS Genet 2: e7.

57. **Franklin C**, Liolios L, Peleg AY. 2006. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 44: 3139-3144.
58. **Gales CA**, Jones RN, Forward KR, Linares J, Sader HS, Verhoef J. 2001. Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–1999). *Clin Infect Dis* 32: S104-S113.
59. **Gales AC**, Tognim MC, Reis AO, Jones RN, Sader HS. 2003. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 45: 77-79.
60. **Galleni M**, Lamotte-Brasseur J, Rossolini GM, Spencer J, Dideberg O, Frere J-M, The metallo-b-lactamase working group. 2001. Standard numbering scheme for class B b-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 660–663.
61. **Garcia A**, Salgado F, Solar H, Gonzalez CL, Zemelman R, Onate A. 1999. Some immunological properties of lipopolysaccharide from *Acinetobacter baumannii*. *J Med Microbiol* 48: 479-483.
62. **Garcia-Arata MI**, Gerner-Smidt P, Baquero F, Ibrahim A. 1997. PCR-amplified 16S and 23S rDNA restriction analysis for the identification of *Acinetobacter* strains at the DNA group level. *Res Microbiol* 148: 777-784.
63. **Garrouste-Orgeas M**, Chevret S, Arlet G, Marie O, Rouveau M, Popoff N, Schlemmer B. 1997. Oropharyngeal or gastric colonization and nosocomial pneumonia in adult intensive care unit patients. A prospective study based on genomic DNA analysis. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 1647-1655.
64. **Gehrlein M**, Leying H, Cullmann W, Wendt S, Opferkuch W. 1991. Imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* is due to altered penicillin-binding proteins. *Chemotherapy* 37: 405-412.
65. **Gerner-Smidt P**, Tjernberg I, Ursing J. 1991. Reliability of phenotypic tests for *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol* 29: 277-282.
66. **Gerner-Smidt P**. 1992. Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii* complex. *J Clin Microbiol* 30: 2680-2685.
67. **Giakkoupi P**, Xanthaki A, Kanelopoulou M, Vlahaki A, Miriagou V, Kontou S, Papafraggas E, Malamou-Lada H, Tzouveleakis LS, Legakis NJ, Vatopoulos AC.

2003. VIM-1 Metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. *J Clin Microbiol* 41:3893-3896.
68. **Go ES**, Urban C, Burns J, Kreiswirth B, Eisner W, Mariano N, Mosinka-Snipas K, Rahal JJ. 1994. Clinical and molecular epidemiology of *Acinetobacter* infections sensitive only to polymyxin B and sulbactam. *Lancet* 344: 1329-1332.
69. **Golemi D**, Maveyraud L, Vakulenko S, Samama JP, Mobashery S. 2001. Critical involvement of a carbamylated lysine in catalytic function of class D beta-lactamases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14280-14285.
70. **Gordon E**, Mouz N, Duee E, Dideberg O. 2000. The crystal structure of the penicillin-binding protein 2x from *Streptococcus pneumoniae* and its acyl-enzyme form: implication in drug resistance. *J Mol Biol* 299: 501-509.
71. **Gouby A**, Carles-Nurit MJ, Bouziges N, Bourg G, Mesnard R, Bouvet PJM. 1992. Use of pulsed-field gel electrophoresis for investigation of hospital outbreaks of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 30: 1588-1591.
72. **Graser Y**, Klare I, Halle E, Gantenberg R, Buchholz P, Jacobi DH, Presber W, Schonian G. 1993. Epidemiological study of an *Acinetobacter baumannii* outbreak by using polymerase chain reaction fingerprinting. *J Clin Microbiol* 31: 2417-2420.
73. **Grehn M**, Graevenitz A. 1978. Search for *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratius*: enrichment of fecal samples. *J Clin Microbiol* 8: 342-343.
74. **Gribun A**, Nitzan Y, Pechatnikov I, Hershkovits G, Katcoff DJ. 2003. Molecular and structural characterization of the HMP-AB gene encoding a pore-forming protein from a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Curr Microbiol* 47: 434-443.
75. **Grundmann HJ**, Towner KJ, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Maher M, Seifert H, Vaneechoutte M. 1997. Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation or reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 35: 3071-3077.
76. **Hall BG**, Barlow M. 2005. Revised Ambler classification of {beta}-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 55:1050-1051.
77. **Heritier C**, Poirel L, Aubert D, Nordmann P. 2003. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 268-273.

78. **Heritier C**, Poirel L, Lambert T, Nordmann P. 2005a. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 3198-3202.
79. **Heritier C**, Dubouix A, Poirel L, Marty N, Nordmann P. 2005b. A nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the carbapenem-hydrolysing oxacillinase OXA-58. *J Antimicrob Chemother* 55: 115-118.
80. **Heritier C**, Poirel L, Nordmann P. 2006. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAbal in *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 12: 123-130.
81. **Hermann JC**, Hensen C, Ridder L, Mulholland AJ, Holtje HD. 2005. Mechanisms of antibiotic resistance: QM/MM modeling of the acylation reaction of a class A  $\beta$ -lactamase with benzylpenicillin. *J Am Chem Soc* 127: 4454-4465.
82. **Higgins PG**, Wisplinghoff H, Stefanik D, Seifert H. 2004. Selection of topoisomerase mutations and overexpression of *adeB* mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 54: 821-823.
83. **Hiramatsu K**, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, Fukuchi Y, Kobayashi I. 1997. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 350:1670-1673.
84. **Holton J**. 1983. A note on the preparation and use of a selective and differential medium for the isolation of the *Acinetobacter* spp. from clinical sources. *J Appl Bacteriol* 54: 141-142.
85. **Huys G**, Cnockaert M, Nemeč A, Swings J. 2005. Sequence-based typing of *adeB* as a potential tool to identify intraspecific groups among clinical strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 43: 5327-5331.
86. **Ibrahim A**, Gerner-Smidt P, Liesack W. 1997. Phylogenetic relationship of the twenty-one DNA groups of the genus *Acinetobacter* as revealed by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol*. 47: 837-841.
87. **Ikonomidis A**, Pournaras S, Maniatis AN, Legakis NJ, Tsakris A. 2006. Discordance of meropenem versus imipenem activity against *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 28: 376-377.
88. **Ikonomidis A**, Pournaras S, Markogiannakis A, Maniatis AN, Manolis EN, Tsakris A. 2007. Low genetic diversity of the intrinsic OXA-51-like class D carbapenemases among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Greece. *Epidemiol Infect* 135: 877-881.

89. **Ikonomidis A**, Ntokou E, Maniatis AN, Tsakris A, Pournaras S. Hidden VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase phenotypes among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. J Clin Microbiol [in press]
90. **Insa R**, Cercenado E, Goyanes MJ, Morente A, Bouza E. 2007. In vitro activity of tigecycline against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia*. J Antimicrob Chemother 59: 583-585.
91. **Jaurin B**, Grundstrom T. 1981. ampC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of  $\beta$ -lactamases of the penicillinase type. Proc Natl Acad Sci USA 78: 4897-4901.
92. **Jawad A**, Hawkey PM, Heritage J, Snelling AM. 1994. Description of Leeds *Acinetobacter* medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp., and comparison with *Herellea* agar and Holton's agar. J Clin Microbiol 32: 2353-2358.
93. **Jawad A**, Heritage J, Snelling AM, Gascoyne-Binzi DM, Hawkey PM. 1996. Influence of relative humidity and suspending menstrua on survival of *Acinetobacter* spp. on dry surfaces. J Clin Microbiol 34: 2881-2887.
94. **Jawad A**, Seifert H, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM. 1998. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. J Clin Microbiol 36: 1938-1941.
95. **Jain R**, Danziger LH. 2004. Multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: an emerging challenge to clinicians. Ann Pharmacother 38: 1449-1459.
96. **Jeon BC**, Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee K, Young D, Lee JH, Song JS, Lee SH. 2005. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 beta-lactamase in Korea. J Clin Microbiol 43: 2241-2245.
97. **Johnson JL**, Anderson RS, Ordal EJ. 1970. Nucleic acid homologies among oxidase-negative *Moraxella* species. J Bacteriol 101: 568-573.
98. **Jolly-Guillou ML**, Bergogne-Berezin E, Vieu JF. 1990. A study of the relationships between antibiotic resistance phenotypes, phage-typing and biotyping of 117 clinical isolates of *Acinetobacter* spp. J Hosp Infect 16: 49-58.
99. **Jones RN**, Sader HS, Fritsche TR, Rhomberg PR. 2006. Carbapenem susceptibility discords among *Acinetobacter* isolates. Clin Infect Dis 42: 158.
100. **Kayser FH**, Morenzoni G, Strässle A, Hadorn K. 1989. Activity of meropenem, against gram-positive bacteria. J Antimicrob Chemother 24 Suppl A: 101-112.

101. **Keum KC**, Yoo SM, Lee SY, Chang KH, Yoo NC, Yoo WM, Kim JM, Choi JY, Kim JS, Lee G. 2006. DNA microarray-based detection of nosocomial pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Mol Cell Probes* 20: 42-50.
102. **Koebnik R**, Locher KP, Van Gelder P. 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* 37: 239-253.
103. **Kontou M**, Pournaras S, Kristo I, Ikonomidis A, Maniatis AN, Stathopoulos C. 2007. Molecular cloning and biochemical characterization of VIM-12, a novel hybrid VIM-1/VIM-2 metallo-beta-lactamase from a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate, reveal atypical substrate specificity. *Biochemistry* 46: 13170-13178.
104. **Krawczyk B**, Lewandowski K, Kur J. 2002. Comparative studies of the *Acinetobacter* genus and the species identification method based on the *recA* sequences. *Mol Cell Probes* 16: 1-11.
105. **La Scola B**, Gundi VAKB, Khamis A, Raoult D. 2006. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol* 44: 827-832.
106. **Lee JC**, Koerten H, van den Broek P, Beekhuizen H, Wolterbeek R, van den Barselaar M, van der Reijden T, van der Meer J, van de Gevel J, Dijkshoorn L. 2006. Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. *Res Microbiol* 157: 360 – 366.
107. **Lee K**, Lee WG, Uh Y, Ha GY, Cho J, Chong Y; Korean Nationwide Surveillance of Antimicrobial Resistance Group. 2003. VIM- and IMP-type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. *Emerg Infect Dis* 9: 868-871.
108. **Lee K**, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y. 2005. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 4485-4491.
109. **Lessel EF**. 1971. Minutes of the Subcommittee on the Taxonomy of *Moraxella* and Allied Bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 21: 213-214.
110. **Levesque C**, Piche L, Larose C, Roy PH. 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 185-191.

111. **Li J**, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K. 2005. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 25: 11-25.
112. **Liu PY**, Wu WL. 1997. Use of different PCR-based DNA fingerprinting techniques and pulsed-field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii* complex. *Diagn Microbiol Infect Dis* 28: 19-28.
113. **Liu Y**, Han JX, Huang HY, Zhu B. 2005. Development and evaluation of 16S rDNA microarray for detecting bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *Exp Biol Med* 230: 587-591.
114. **Limansky AS**, Mussi MA, Viale AM. 2002. Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. *J Clin Microbiol* 40:4776-4778.
115. **Ling KWT**, Tam PC, Liu ZK, Cheng AFB. 2001. Evaluation of VITEK 2 rapid identification and susceptibility testing system against gram-negative clinical isolates. *J Clin Microbiol* 39: 2964-2966.
116. **Loli A**, Tzouveleki LS, Tzelepi E, Carattoli A, Vatopoulos AC, Tassios PT, Miriagou V. 2006. Sources of diversity of carbapenem resistance levels in *Klebsiella pneumoniae* carrying blaVIM-1. *J Antimicrob Chemother* 58: 669-672.
117. **Lopez-Otsoa F**, Gallego L, Towner KJ, Tysall L, Woodford N, Livermore DM. 2002. Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital in northern Spain. *J Clin Microbiol* 40: 4741-4743.
118. **Macheboeuf P**, Contreras-Martel C, Job V, Dideberg O, Dessen A. 2006. Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol Rev* 30:673-691.
119. **Magnet S**, Courvalin P, Lambert T. 2001. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 3375-3380.
120. **Mahgoub S**, Ahmed J, Glatt AE. 2002. Completely resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Infect Control Hosp Epidemiol* 23: 477-479.
121. **Mandel AD**, Wright K, McKinnon JM. 1964. Selective medium for isolation of *Mima* and *Herellea* organisms. *J Bacteriol* 88: 1524-1525.

122. **Maniatis AN**, Pournaras S, Orkopoulou S, Tassios PT, Legakis NJ and the bacterial resistance study group. 2003. Multiresistant *Acinetobacter baumannii* isolates in intensive care units in Greece. *Clin Microbiol Infect* 9: 547-553.
123. **Marchand I**, Damier-Piolle L, Courvalin P, Lambert T. 2004. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 3298-3304.
124. **Marque S**, Poirel L, Heritier C, Brisse S, Blasco MD, Filip R, Coman G, Naas T, Nordmann P. 2005. Regional occurrence of plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter* spp. in Europe. *J Clin Microbiol* 43: 4885-4888.
125. **Martí S**, Sánchez-Céspedes J, Oliveira E, Bellido D, Giralt E, Vila J. Proteomic analysis of a fraction enriched in cell envelope proteins of *Acinetobacter baumannii*. 2006a. *Proteomics* 6: S82-S87.
126. **Marti S**, Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Ribera A, Rodriguez-Bano J, Bou G, Miguel Cisneros J, Pachon J, Martinez-Martinez L, Vila J; Grupo de Estudio de Infeccion Hospitalaria (GEIH). 2006b. Prevalence of the tetA and tetB genes as mechanisms of resistance to tetracycline and minocycline in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 24: 77-80.
127. **Massonet C**, De Baere T, Van Eldere J. 2006. Direct identification of bacteria in clinical respiratory samples using fluorescent amplicon length analysis of 16S-23S rRNA spacer-region. *J Microbiol Methods* 66: 369–379.
128. **McDonald LC**, Banerjee SN, Jarvis WR, the National Nosocomial Infections Surveillance System. 1999. Seasonal variation of *Acinetobacter* infections: 1987-1996. *Clin Infect Dis* 29: 1133-1137.
129. **Melino S**, Capo C, Dragani B, Aceto A, Petruzzelli R. 1998. A zinc-binding motif conserved in glyoxalase II,  $\beta$ -lactamase and arylsulfatases. *Trends Biochem Sci* 23: 381-382.
130. **Miriagou V**, Tzelepi E, Gianneli D, Tzouvelekis LS. 2003. *Escherichia coli* with a self-transferable, multiresistant plasmid coding for metallo-beta-lactamase VIM-1. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 395-397.
131. **Montero A**, Ariza J, Corbella X, Domenech A, Cabellos C, Ayats J, Tubau F, Borraz C, Gudiol F. 2004. Antibiotic combinations for serious infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a mouse pneumonia model. *J Antimicrob Chemother* 54: 1085-1091.



132. **Musa EK**, Desai N, Casewell MW. 1990. The survival of *Acinetobacter calcoaceticus* inoculated on fingertips and on formica. *J Hosp Infect* 15:219-227.
133. **Mussi MA**, Limansky AS, Viale AM. 2005. Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins. *Antimicrob Agents Chemother* 49:1432-1440.
134. **Naas T**, Levy M, Hirschauer C, Marchandin H, Nordmann P. 2005. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia. *J Clin Microbiol* 43: 4826-4829.
135. **Naas T**, Coignard B, Carbonne A, Blanckaert K, Bajolet O, Bernet C, Verdeil X, Astagneau P, Desenclos JC, Nordmann P, on behalf of the French Nosocomial Infection Early Warning, Investigation and Surveillance Network. 2006. VEB-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*, France. *Emerg Infect Dis* 12: 1214-1222.
136. **Nemec A**, Dijkshoorn L, van der Reijden TJK. 2004. Long-term predominance of two pan-European clones among multi-resistant *Acinetobacter buamannii* in the Czech Republic. *J Med Microbiol* 53: 147-153.
137. **Nemec A**, Maixnerova M, van der Reijden TJ, van den Broek PJ, Dijkshoorn L. 2007. Relationship between the AdeABC efflux system gene content, netilmicin susceptibility and multidrug resistance in a genotypically diverse collection of *Acinetobacter baumannii* strains. *J Antimicrob Chemother* 60: 483-489.
138. **Nishimura Y**, Ino T, Iizuka H. 1988. *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. isolated from cotton and soil. *Int J Syst Bacteriol* 38: 209-211.
139. **Nishio H**, Komatsu M, Shibata N, Shimakawa K, Sueyoshi N, Ura T, Satoh K, Toyokawa M, Nakamura T, Wada Y, Orita T, Kofuku T, Yamasaki K, Sakamoto M, Kinoshita S, Aihara M, Arakawa Y. 2004. Metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli: laboratory-based surveillance in cooperation with 13 clinical laboratories in the Kinki region of Japan. *J Clin Microbiol* 42: 5256-5263.
140. **Nitzan Y**, Deutsch EB, Pechatnikov I. 2002. Diffusion of beta-lactam antibiotics through oligomeric or monomeric porin channels of some gram-negative bacteria. *Curr Microbiol* 45: 446-455.

141. **Nordmann P**, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R. 1993. Characterization of a novel extended-spectrum  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 962-969.
142. **Nordmann P**, Nass T. 1994. Sequence analysis of PER-1 Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 104-114.
143. **Nordmann P**, Poirel L. 2002. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 8: 321-331.
144. **Obara M**, Nakae T. 1991. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Antimicrob Chemother* 28: 791-800.
145. **Ochman H**, Lerat E, Daubin V. 2005. Examining bacterial species under the specter of gene transfer and exchange. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 6595-6599.
146. **Ofori-Darko E**, Zavros Y, Rieder G, Tarle SA, van Antwerp M, Merchant JL. 2000. An OmpA-like protein from *Acinetobacter* spp. stimulates gastrin and interleukin-8 promoters. *Infect Immun* 68: 3657-3666.
147. **Olut AI**, Erkek E. 2005. Early prosthetic valve endocarditis due to *Acinetobacter baumannii*: a case report and brief review of the literature. *Scand J Infect Dis* 37: 912-921.
148. **Ouellette M**, Bissonnette L, Roy PH. 1987. Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1  $\beta$ -lactamase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7378-7382.
149. **Pagel JE**, Seyfried PL. 1976. Numerical taxonomy of aquatic acinetobacter isolates. *J Gen Microbiol* 95: 220-232.
150. **Pantophlet R**, Nemeč A, Brade L, Brade H, Dijkshoorn L. 2001. O-antigen diversity among *Acinetobacter baumannii* strains from the Czech Republic and northwestern Europe, as determined by lipopolysaccharide-specific monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 39: 2576-2580.
151. **Pantophlet R**, Severin AJ, Nemeč A, Brade L, Dijkshoorn L, Brade H. 2002. Identification of *Acinetobacter* isolates from species belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii* complex with monoclonal antibodies specific for O antigens of their lipopolysaccharides. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 60-65.
152. **Pascual A**, Martínez-Martínez L, Clavijo MJ, García-Perea MD, Perea EJ. 1997. Comparison of three methods of determining the in-vitro susceptibilities of

- Acinetobacter baumannii* isolates to imipenem. J Antimicrob Chemother 40: 742-743.
153. **Paterson DL**, Bonomo RA. 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev 18: 657-686.
154. **Pernot L**, Frénois F, Rybkine T, L'Hermite G, Petrella S, Delettré J, Jarlier V, Collatz E, Sougakoff W. 2001. Crystal structures of the class D beta-lactamase OXA-13 in the native form and in complex with meropenem. J Mol Biol 310: 859-874.
155. **Petti CA**, Polage CR, Schreckenberger P. 2005. The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. J Clin Microbiol 43: 6123-6125.
156. **Poirel L**, Naas T, Guibert M, Chaibi El B, Labia R, Nordmann P. 1999. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel Class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. Antimicrob Agents Chemother 43: 573-581.
157. **Poirel L**, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P. 2003. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. J Clin Microbiol 41: 3542-3547.
158. **Poirel L**, Cabanne L, Vahaboglu H, Nordmann P. 2005a. Genetic environment and expression of the extended-spectrum beta-lactamase *bla*<sub>PER-1</sub> gene in gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother 49: 1708-1713.
159. **Poirel L**, Marque S, Heritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. 2005b. OXA-58, a novel class D beta-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 49: 202-208.
160. **Poirel L**, Nordmann P. 2006a. Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*OXA-58 in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 50:1442-1448.
161. **Poirel L**, Nordmann P. 2006b. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. Clin Microbiol Infect 12: 826-836.
162. **Poole K**. 2002. Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in Gram-negative bacteria. Curr Pharm Biotechnol 3: 77-98.
163. **Pournaras S**, Ikonomidis A, Markogiannakis A, Maniatis AN, Tsakris A. 2005. Heteroresistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 55: 1055-1056.

164. **Pournaras S**, Markogiannakis A, Ikonomidis A, Kondyli L, Bethimouti K, Maniatis AN, Legakis NJ, Tsakris A. 2006. Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 57: 557-561.
165. **Pournaras S**, Ikonomidis A, Markogiannakis A, Spanakis N, Maniatis AN, Tsakris A. 2007. Characterization of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* heterogeneously resistant to carbapenems. *J Med Microbiol* 56:66-70.
166. **Quale J**, Bratu S, Landman D, Heddurshetti R. 2003. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City. *Clin Infect Dis* 37:214-220.
167. **Rahal JJ**. 2006. Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clinical Infectious Diseases* 43: S95-S99.
168. **Ribera A**, Ruiz J, Jiminez de Anta MT, Vila J. 2002. Effect of an efflux pump inhibitor on the MIC of nalidixic acid for *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 49: 697-698.
169. **Riccio ML**, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R, Amicosante G, Rossolini GM. 2000. Characterization of the metallo-beta-lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of bla(IMP) allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1229-1235.
170. **Rossau R**, van Landschoot A, Gillis M, De Ley J. 1991. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. *Int J Syst Bacteriol* 41: 310-319.
171. **Sader HS**, Pignatari AC, Leme IL, Burattini MN, Tancredi R, Hollis RJ, Jones RN. 1993. Epidemiologic typing of multiply drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from an outbreak in an intensive care unit. *Diagn Microbiol Infect Dis* 17: 13-18.
172. **Sakoulas G**, Moise-Broder PA, Schentag J, Forrest A, Moellering RC Jr, Eliopoulos GM. 2004. Relationship of MIC and bactericidal activity to efficacy of vancomycin for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Clin Microbiol* 42: 2398-2402.

173. **Segal H**, Nelson EC, Elisha BG. 2004. Genetic environment and transcription of ampC in an *Acinetobacter baumannii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 612-614.
174. **Segal H**, Garny S, Elisha BG. 2005a. Is IS(ABA-1) customized for *Acinetobacter*? *FEMS Microbiol Lett* 243: 425-429.
175. **Segal H**, Elisha BG. 2005b. Use of Etest MBL strips for the detection of carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 56: 598.
176. **Seifert H**, Baginski R, Schulze A, Pulverer G. 1993. The distribution of *Acinetobacter* species in clinical culture materials. *Zentralbl Bakteriol* 279: 544-552.
177. **Seifert H**, Schulze A, Baginski R, Pulverer G. 1994. Plasmid DNA fingerprinting of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 32: 82-86.
178. **Seifert H**, Gerner-Smidt P. 1995. Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Acinetobacter* isolates. *J Clin Microbiol* 33: 1402-1407.
179. **Seifert H**, Dolzani L, Bressan R, van der Reijden T, van Strijen B, Stefanik D, Heersma H, Dijkshoorn L. 2005. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 43: 4328-4335.
180. **Senda K**, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, Shimokata K, Kato N, Ohta M. 1996. PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *J Clin Microbiol* 34: 2909-2913.
181. **Shibata N**, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, Kato H, Kai K, Arakawa Y. 2003. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol* 41: 5407-5413.
182. **Siroy A**, Molle V, Lemaitre-Guillier C, Vallenet D, Pestel-Caron M, Cozzone AJ, Jouenne T, De E. 2005. Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 4876-4883.
183. **Siroy A**, Cosette P, Seyer D, Lemaitre-Guillier C, Vallenet D, Van Dorsselaer A, Boyer-Mariotte S, Jouenne T, De E. 2006. Global comparison of the membrane subproteomes between a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain and a reference strain. *J Proteome Res* 5: 3385-3398.

184. **Stoodley P**, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56: 187-209.
185. **Su XZ**, Chen J, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T. 2005. AbeM, an H<sup>+</sup>-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 4362-4364.
186. **Sun T**, Nukaga M, Mayama K, Braswell EH, Knox JR. 2003. Comparison of beta-lactamases of classes A and D: 1.5-A crystallographic structure of the class D OXA-1 oxacillinase. *Protein Sci* 12: 82-91.
187. **Taplin D**, Rebell G, Zaias N. 1963. The human skin as a source of Mima-Herellea infections. *JAMA* 186: 952-954.
188. **Tenover FC**, Arbeit RD, Coering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33: 2233-2239.
189. **Thanassi DG**, Saulino ET, Hultgren SJ. 1998. The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway. *Curr Opin Microbiol* 1: 223-231.
190. **Tjernberg I**, Ursing J. 1989. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 97: 596-605.
191. **Tomaras AP**, Dorsey CW, Edelman RE, Actis LA. 2003. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: Involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology* 49: 3473-3484.
192. **Traub WH**. 1989. *Acinetobacter baumannii* serotyping for delineation of outbreaks of nosocomial cross-infection. *J Clin Microbiol* 27: 2713-2716.
193. **Tsakris A**, Tsioni C, Pournaras S, Polyzos S, Maniatis AN, Sofianou D. 2003. Spread of low-level carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones in a tertiary care Greek hospital. *J Antimicrob Chemother* 52:1046-1047.
194. **Tsakris A**, Ikonomidis A, Pournaras S, Tzouvelekis LS, Sofianou D, Legakis NJ, Maniatis AN. 2006a. VIM-1 metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 12: 981-983.
195. **Tsakris A**, Ikonomidis A, Pournaras S, Spanakis N, Markogiannakis A. 2006b. Carriage of OXA-58 but not of OXA-51 beta-lactamase gene correlates with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 58: 1097-1099.

196. **Tsakris A**, Ikonomidis A, Spanakis N, Pournaras S, Bethimouti K. 2007. Identification of a novel bla(OXA-51) variant, bla(OXA-92), from a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect 13:348-349.
197. **Turner PJ**, Greenhalgh JM. 2003. The activity of meropenem and comparators against *Acinetobacter* strains isolated from European hospitals, 1997-2000. Clin Microbiol Infect 9: 563-567.
198. **Turton JF**, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. 2006a. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the bla<sub>OXA-51-like</sub> carbapenemase gene intrinsic to this species. J Clin Microbiol 44: 2974-2976.
199. **Turton JF**, Kaufmann ME, Gill MJ, Pike R, Scott PT, Fishbain J, Craft D, Deye G, Riddell S, Lindler LE, Pitt TL. 2006b. Comparison of *Acinetobacter baumannii* isolates from the United Kingdom and the United States that were associated with repatriated casualties of the Iraq conflict. J Clin Microbiol 44: 2630-2634.
200. **Turton JF**, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, Pitt TL. 2006c. The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiol Lett 258: 72-77.
201. **Vahaboglu H**, Ozturk R, Aygun G, Coskuncan F, Yaman A, Kaygusuz A, Leblebicioglu H, Balik I, Aydin K, Otkun M. 1997. Widespread detection of PER-1 type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. Antimicrob Agents Chemother 41: 2265-2269.
202. **Vahaboglu H**, Coskuncan F, Tansel O, Ozturk R, Sahin N, Koksali I, Kocazeybek B, Tatman-Otkun M, Leblebicioglu H, Ozinel MA, Akalin H, Kocagoz S, Korten V. 2001. Clinical importance of extended-spectrum beta-lactamase (PER-1-type)-producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains. J Med Microbiol 50: 642-645.
203. **Vanechoutte M**, Dijkshoorn L, Tjernberg I, Elaichouni A, De Vos P, Clays G, Verschraegen G. 1995. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. J Clin Microbiol 33: 11-15.
204. **Vidal R**, Dominguez M, Urrutia H, Bello H, Gonzalez G, Garcia A, Zemelman R. 1996. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii*. Microbios 86: 49-58.
205. **Vila J**, Ribera A, Marco F, Ruiz J, Mensa J, Chaves J, Hernandez G, Jimenez De Anta MT. 2002. Activity of clinafloxacin, compared with six other quinolones, against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. J Antimicrob Chemother 49: 471-477.

206. **Vila J**, Marti S, Sanchez-Céspedes J. 2007. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 59: 1210-1215.
207. **Walsh TR**, Bolmstrom A, Qvarnstrom A, Gales A. 2002. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* 40: 2755-2759.
208. **Walsh TR**, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. 2005. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 18: 306-325.
209. **Walther-Rasmussen J**, Hoiby N. 2006. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 57: 373-383.
210. **Wang Z**, Fast W, Valentine AM, Benkovic SJ. 1998. Metallo- $\beta$ -lactamase: structure and mechanism. *Curr Opin Chem Biol* 3: 614-622.
211. **Wayne LG**, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Moore WEC, Murray RGE, Stackebrandt E, Starr MP, Truper HG. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* 37: 463-464.
212. **Weernink A**, Severin WPJ, Tjernberg I, Dijkshoorn L. 1995. Pillows, an unexpected source of *Acinetobacter*. *J Hosp Infect* 29:189-199.
213. **Yamamoto S**, Bouvet P, Harayama S. 1999. Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization. *Int J Syst Bacteriol* 49: 87-95.
214. **Yong D**, Shin JH, Kim S, Lim Y, Yum JH, Lee K, Chong Y, Bauernfeind A. 2003. High prevalence of PER-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Acinetobacter* spp. in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 1749-1751.
215. **Zavascki AP**, Gaspareto PB, Martins AF, Gonçalves AL, Barth AL. 2005. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. *J Antimicrob Chemother* 56: 1148-1151.
216. **Zeana C**, Larson E, Sahni J, Bayuga SJ, Wu F, Della-Lata P. 2003. The epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: does the community represent a reservoir? *Infect Control Hosp Epidemiol* 24: 275-279.