

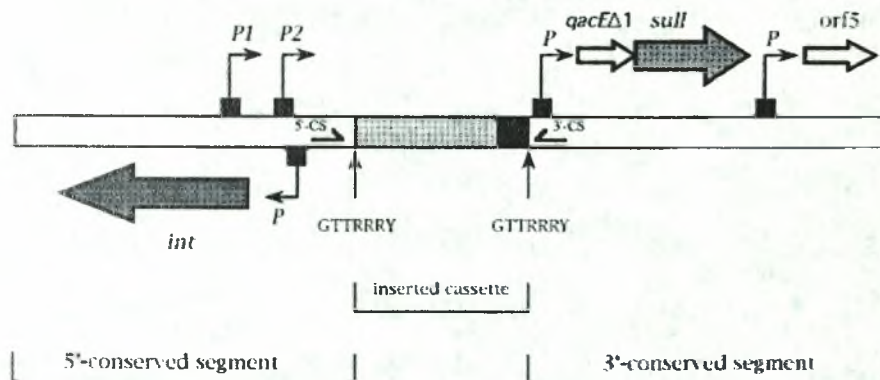


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*Απομόνωση και χαρτογράφηση ιντεγκρονίων που φέρουν
μέταλλο-β-λακταμάσες σε νοσοκομειακά στελέχη Gram-
αρνητικών βακτηριδίων*



ΛΑΜΠΡΟΥ ΜΑΡΙΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ, Οκτώβριος 2007



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

Αριθ. Εισ.: 5898/1
Ημερ. Εισ.: 04-03-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2007
ΛΑΜ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087369

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε
στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας
του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας

Υπεύθυνος Καθηγητής:

Πουρνάρας Σπυρίδων, Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, ΠΘ

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

- ❖ Πουρνάρας Σπυρίδων, Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ
- ❖ Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, ΠΘ
- ❖ Κοντού Μαρία, Λέκτορας Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας, ΠΘ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	- 3 -
ABSTRACT	- 4 -
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	- 5 -
1.1. Gram αρνητικά βακτήρια	- 6 -
1.1.1. Enterobacteriaceae.....	- 6 -
α) <i>Escherichia coli</i> (Κλινική σημασία)	- 8 -
β) <i>Proteus Mirabilis</i> (Κλινική σημασία)	- 10 -
γ) <i>Morganella morganii</i> (Κλινική σημασία)	- 12 -
1.1.2. <i>Pseudomonas</i>	- 14 -
α) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Κλινική σημασία)	- 14 -
1.2. Αντιβιοτικά και ανθεκτικότητα	- 15 -
1.2.1. Αντοχή στα αντιβιοτικά.....	- 15 -
1.2.2. β-λακταμικά αντιβιοτικά	- 16 -
1.3. Δράση β-λακταμασών και η ταξινόμησή τους.....	- 21 -
1.3.1. Σύνθεση και τρόπος μεταφοράς	- 21 -
1.3.2. Εντοπισμός	- 21 -
1.3.3. Μηχανισμοί δράσης.....	- 21 -
1.3.4. Ταξινόμηση β-λακταμασών.....	- 23 -
1.4. Μεταλλο-β-λακταμάσες	- 24 -
1.4.1. Ταξινόμηση των μεταλλο-β-λακταμασών.....	- 25 -
1.4.2. Βιοχημεία των μεταλλο-β-λακταμασών	- 27 -
1.4.3. Μεταλλο-β-λακταμάσες τύπου VIM.....	- 31 -
1.4.4. Διάγνωση των MBLs.....	- 32 -
1.5. Ιντεγκρόνια.	- 33 -
1.5.1. Γονιδιακές κασέτες, ανασυνδυασμός και έκφραση.....	- 38 -
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	- 41 -
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	- 42 -
3.1. Υλικά και Μέθοδοι	- 42 -
3.1.1. Βακτηριακά στελέχη.....	- 42 -
3.1.2. Έλεγχος της ευαισθησίας σε αντιβιοτικά	- 42 -
3.1.3. Απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα βακτηριδίων.....	- 43 -
3.1.4. PCR για γονίδια που κωδικοποιούν για γνωστές μεταλλο-β-λακταμάσες	- 43 -
3.1.5. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πηκτή αгарόζης.....	- 45 -
3.1.6. Καθαρισμός και αποστολή των PCR προϊόντων για νουκλεοτιδική	- 45 -
αλληλούχηση	- 45 -
3.1.7. Χαρτογράφηση ιντεγκρονίων.....	- 46 -
3.1.8. Φορεία των γενετικών δομών.....	- 47 -
3.1.9. Μελέτη μεταφοράς των γονιδίων	- 47 -
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	- 48 -
4.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 140	- 48 -
4.2. <i>Escherichia coli</i> 28	- 49 -
4.3. <i>Morganella morganii</i> A209	- 50 -
4.4. <i>Proteus Mirabilis</i> 1205	- 51 -
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	- 52 -
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	- 53 -
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	- 67 -

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η διάδοση γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά μεταξύ των βακτηριακών στελεχών αποτελεί αυξανόμενο πρόβλημα των μολυσματικών νόσων. Πολλά γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά βρίσκονται στα πλασμίδια και στα τρανσποζόνια, επιτρέποντας τη μεταφορά τους μεταξύ ποικίλων βακτηριακών ειδών. Τα τελευταία χρόνια, ένας τρίτος μηχανισμός της διάδοσης γονιδίων ανθεκτικότητας έχει ανακαλυφθεί. Αυτός ο μηχανισμός περιλαμβάνει ένα στοιχείο DNA που μεσολαβεί στην ενσωμάτωση των γονιδίων ανθεκτικότητας με έναν τοποειδικό τρόπο ανασυνδυασμού. Αυτό το νέο στοιχείο DNA, που ονομάζεται ιντεγκρόνιο, βρίσκεται είτε ως τμήμα των τρανσποζονίων της οικογένειας της Tn21 είτε σε διάφορες ομάδες πλασμιδίων. Τα ιντεγκρόνια έχουν δύο συντηρημένα τμήματα που χωρίζονται από μια μεταβλητή περιοχή, η οποία περιλαμβάνει ενσωματωμένα γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά ή κασέτες. Τα *blaVIM* και *blaIMP* γονίδια συνήθως μεταφέρονται ως γονιδιακές κασέτες στα ιντεγκρόνια τάξης 1, που μπορούν να διαδοθούν με οριζόντια μεταφορά μεταξύ διαφορετικών γενετικών στοιχείων και στελεχών, και έχουν αναφερθεί κυρίως στα Gram-negative είδη. Τα *blaVIM* και *blaIMP* γονίδια παράγουν μεταλλο-β-λακταμάσες (MBLs). Οι MBLs αποτελούν μια αυξανόμενη τάξη του β-λακταμασών που υδρολύουν εύκολα όλες τις β-λακτάμες εκτός από την αζτρεονάμη. Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, οι MBLs έχουν εμφανιστεί μεταξύ νοσοκομειακών απομονώσεων *Pseudomonas aeruginosa* και πιο πρόσφατα έχουν διαδοθεί αποτελεσματικά σε άλλα Gram-negative παθογόνα, που θέτουν σοβαρές συνέπειες στην αντιμικροβιακή θεραπεία.

Στην τρέχουσα μελέτη, πρόσφατα κλινικά στελέχη των μελών της οικογένειας των *Enterobacteriaceae* και *pseudomonads* χρησιμοποιήθηκαν για να μελετηθεί ο ρόλος των ιντεγκρονίων ως μέσο για τα γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Αυτά τα γενετικά στοιχεία έχουν μεταβλητές δομές μεταξύ των απομονώσεων και η διάταξη των γονιδιακών κασετών στη μεταβλητή περιοχή τους φαίνεται να απεικονίζει την ανάγκη για αντιβιοτικά στα διαφορετικά νοσοκομειακά περιβάλλοντα. Με τη χρήση της PCR, καθορίσαμε το περιεχόμενο και τη διαταγή των γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά που ενσωματώθηκαν μεταξύ των συντηρημένων τμημάτων των ιντεγκρονίων τους. Η ανάλυση των ιντεγκρονίων με PCR μας επιτρέπει να μελετήσουμε την εξέλιξη της διάδοσης των γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά.

ABSTRACT

The dissemination of antibiotic resistance genes among bacterial strains is an increasing problem in infectious diseases. Many antibiotic resistance genes are located on plasmids and on transposons, enabling their transfer among a variety of bacterial species. In recent years, a third mechanism of resistance gene dissemination has been discovered. It involves a DNA element that mediates the integration of resistance genes by a site-specific recombinational mechanism. This novel DNA element, now called an integron, is found either as part of transposons of the Tn21 family or independently on several groups of broad-host-range plasmids. Integrons possess two conserved segments separated by a variable region which includes integrated antibiotic resistance genes or cassettes. The *blaVIM* and *blaIMP*-type genes are commonly carried as gene cassettes on class 1 integrons that can spread horizontally among different genetic elements and strains, and have been mainly reported in Gram-negative species. The *blaVIM* and *blaIMP*-type genes produce metallo-β-lactamases (MBLs). Metallo-β-lactamases (MBLs) constitute a growing class of β-lactamases that readily hydrolyse all β-lactams except aztreonam. During the last decade, acquired MBLs have emerged among nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* isolates and more recently have effectively diffused into other Gram-negative pathogens posing serious consequences in antimicrobial treatment.

In the current study, recent clinical strains of members of the family *Enterobacteriaceae* and pseudomonads were used to study the role of integrons as vehicles for antibiotic resistance genes. These genetic elements have variable structures among isolates and the order of the gene cassettes in their variable region seems to reflect antibiotic pressure in different hospital environments. By using PCR, we determined the content and order of the antibiotic resistance genes inserted between the conserved segments in their integrons. PCR analysis of integrons enables us to study the evolution of antibiotic resistance gene dissemination.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αύξηση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά μεταξύ των Gram-αρνητικών βακτηριδίων είναι ένα ξεχωριστό παράδειγμα για το πώς τα βακτηρίδια μπορούν να αποκτήσουν, να διατηρήσουν, και να εκφράσουν τις νέες γενετικές πληροφορίες που μπορούν να παρέχουν ανθεκτικότητα σε ένα ή περισσότερα αντιβιοτικά. Η ανθεκτικότητα των gram-αρνητικών βακτηριδίων ενδεχομένως τώρα να εξισώνεται ή να σφετερίζεται αυτή των gram-θετικών βακτηριδίων, και έχει παροτρύνει την ανάπτυξη παρόμοιων μέτρων ελέγχου της μόλυνσης για να συγκρατηθεί η διάδοσή τους. Οι αναφορές της ανθεκτικότητας ποικίλλουν, αλλά μια γενική ομοφωνία φαίνεται να επικρατεί ότι η ανθεκτικότητα στις κινολόνες και τις ευρέως φάσματος β-λακτάμες αυξάνεται στα μέλη των οικογενειακών Enterobacteriaceae και *Acinetobacter* spp., και ότι η θεραπευτική αγωγή για την εξόντωση των μολύνσεων από *Pseudomonas aeruginosa* όλο και περισσότερο περιορίζεται.

Ενώ η εμφάνιση των καρβαπενεμών στην δεκαετία του '80 προμήνυε μια νέα επιλογή θεραπείας για τις σοβαρές βακτηριακές λοιμώξεις, τώρα παρατηρείται ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες στα Enterobacteriaceae και *Acinetobacter* spp. και γίνεται κοινότυπη στο *P. aeruginosa*.

1.1. Gram αρνητικά βακτήρια

1.1.1. *Enterobacteriaceae*¹⁻²

Η πιο σημαντική βακτηριακή οικογένεια στην Ιατρική είναι τα *Enterobacteriaceae*. Αυτή η οικογένεια περιλαμβάνει γένη και είδη που προκαλούν καλά μελετημένες νόσους με τυπικά κλινικά συμπτώματα (τυφοειδής πυρετός, δυσεντερία, πανώλη) καθώς και αρκετές ευκαιριακές λοιμώξεις (λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, πνευμονίες, μολύνσεις τραυμάτων, σηψαιμία).

Τα *Enterobacteriaceae* (εντεροβακτήρια) περιλαμβάνουν πολυάριθμα είδη (Πίνακας 1) τα οποία έχουν αρκετές κοινές ιδιότητες. Είναι αερόβιοι ή προαιρετικά αναερόβιοι gram-αρνητικοί βάκιλοι. Είναι ανεκτικοί στα χολικά άλατα (και γι' αυτό επιζούν στο ανθρώπινο εντερικό επιθήλιο), μεταβολίζουν τη γλυκόζη και παράγουν καταλάση, αλλά όχι οξειδωτικά ένζυμα. Το *Escherichia* αποτελεί το πιο κοινό γένος αυτής της οικογένειας, απ' το οποίο η *E.coli* είναι το κυρίαρχο και το καλύτερα μελετημένο είδος. Τα περισσότερα, αν όχι όλα, μέλη των *Enterobacteriaceae* είναι ευκαιριακά παθογόνα.

Τα *Enterobacteriaceae* μπορούν να αναπτυχθούν σε απλό μέσο καλλιέργειας (π.χ. θρεπτικό άγαρ χωρίς ειδικές θρεπτικές και περιβαλλοντικές απαιτήσεις). Σχηματίζουν διαφορετικές μορφολογικά αποικίες σε τρυβλία με άγαρ και αναπτύσσονται σ' ένα ευρύ φάσμα συνθηκών θερμοκρασίας και pH. Τα περισσότερα είναι (ευ)κινητά, αλλά κάποια (π.χ. *Shigella* και *Klebsiella*) είναι ακίνητα. Διαφοροποιούνται εύκολα εργαστηριακά από τις βιοχημικές, αντιγονικές και γενετικές διαφορές τους. Επίσης, ποικίλουν από άποψη ευαισθησίας σε αντιβιοτικά.

Η ικανότητα των *Enterobacteriaceae* να μεταβολίζουν διάφορους υδατάνθρακες και τις αλκοόλες αυτών, χρησιμοποιείται εργαστηριακά για την διαφοροποίηση των μελών του κάθε γένους.

Επιδημιολογία: Τα *Enterobacteriaceae* αποικίζουν το εντερικό σύστημα του ανθρώπου, των ζώων και το γεννητικό σύστημα των θήλεων. Αποτελούν φυσιολογική χλωρίδα του εντερικού συστήματος, όμως είναι επίσης παθογόνα. Κάποια γένη είναι περισσότερο παθογόνα από άλλα. Όμως, όλα έχουν παράγοντες

Απομόνωση και χαρτογράφηση ιντεγκρονίων που φέρουν μέταλλο-β-λακταμάσες σε νοσοκομειακά στελέχη Gram-αρνητικών βακτηριδίων

τοξικότητας που τα βοηθούν να επιζήσουν ακόμα και να υπερνικήσουν την ανοσολογική άμυνα του ξενιστή. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν την παρουσία κάψας, ενδοτοξίνης, στοιχεία κίνησης, πολλές εξωτοξίνες και επιφανειακά μόρια αλληλεπίδρασης με μόρια του ξενιστή. Εν τέλει, είναι αντιγονικά ασταθή και ικανά να ανταλλάξουν γενετικό υλικό.

Πίνακας 1. Αλφαβητική κατανομή των εντεροβακτηριακών γενών και τα πιο κοινά είδη αυτών.

Genus	Species	Subspecies/types	Clinical syndrome
<i>Escherichia coli</i>		Entero-pathogenic Entero-toxicogenic Entero-invasive Entero-aggregative Verocytotoxin-producing (O157) Most other <i>E. coli</i> strains	Infantile enteritis Diarrhea Dysentery (similar to <i>Shigella</i>) Chronic diarrhea Diarrhea, hemorrhagic colitis, hemolytic-uremic syndrome. UTI, GE, HAI, septicemia, meningitis (in neonates), wound infection
<i>Citrobacter</i>	<i>amalonaticus</i> , <i>freundii</i> , <i>koseri</i>		HAI
<i>Enterobacter</i>	<i>aerogenes</i> , <i>cloacae</i> <i>agglomerans</i>		UTI, HAI
<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i> , <i>pneumoniae</i>	<i>pneumoniae</i> , <i>aerogenes</i> , <i>ozaenae</i> , <i>rhinoscleromatis</i>	Most infections are due to <i>K. pneumoniae</i> ssp. UTI, HAI, pneumonia, septicemia, meningitis (in neonates), chronic URTI
<i>Morganella</i>	<i>morganii</i>		UTI, HAI
<i>Proteus</i>	<i>mirabilis</i> , <i>vulgaris</i>		
<i>Providencia</i>	<i>rettgeri</i> , <i>stuartii</i>		HAI
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	Typhi Paratyphi (A, B, C) Others: >2000 serotypes, e.g Enteritidis, Typhimurium Rare ones, e.g. Dublin, Virchow	Typhoid (enteric fever) Paratyphoid Food-poisoning (GI). Rarely cause invasive diseases GI, invasive disease, e.g. septicemia
<i>Serratia</i>	<i>liquefaciens</i> , <i>marcescens</i>		HAI
<i>Shigella</i>	<i>dysenteriae</i> , <i>flexneri</i> , <i>boydii</i> , <i>sonnei</i>		Dysentery (invasive diarrhea)
<i>Yersinia</i>	<i>pestis</i> , <i>pseudotuberculosis</i> , <i>enterocolitica</i>		Plague Ileitis, mesenteric lymphadenitis Enteritis

UTI, urinary tract infection; GE, gastroenteritis; HAI, hospital acquired infection, or nosocomial infection (this includes a variety of different clinical syndromes, such as UTI, septicemia, ventilation-associated pneumonia, wound infection and many others); URTI, upper respiratory tract infections.

α) *Escherichia coli*²⁻⁴

Το γένος *Escherichia* ανακαλύφθηκε το 1885 από τον Theodor Escherich, έναν Γερμανό παιδίατρο και βακτηριολόγο. Περιλαμβάνει gram-αρνητικούς βάκιλους που συναντώνται ως μονάδα ή σε ζεύγη. Η *Escherichia coli* είναι προαιρετικά αναερόβιος οργανισμός και αποτελεί φυσιολογική εντερική χλωρίδα του ανθρώπου και των ζώων.

Η *E. coli* είναι το πιο γνωστό και πιο σημαντικό είδος του γένους *Escherichia*, ένα από τα πιο κύρια μέλη των *Enterobacteriaceae* και το πιο κοινό ευκαιριακό παθογόνο. Οι πέντε διακριτοί τύποι του στελέχους που σχετίζονται με την γαστρεντερίτιδα είναι οι: εντεροπαθογόνο *E. coli* (EPEC), εντεροτοξικογόνο *E. coli* (ETEC), εντερο-εισβολέας *E. coli* (EIEC), εντερο-συναθροιστικό *E. coli* (EAEC) και *E. coli* 0157 που παράγει βεροκυτοτοξίνη (VTEC). Αυτοί οι τύποι επιδεικνύουν διαφορετικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά και δυνατότητες τοξικότητας.

Η *E. coli* είναι μια από τις πιο συχνές αιτίες κάποιων κοινών βακτηριακών λοιμώξεων, συμπεριλαμβανομένης της χολοκυστίτιδας, βακτηραιμίας, χολαγγειίτιδας, λοίμωξης του ουροποιητικού και διάρροιας, και άλλων κλινικών μολύνσεων όπως η νεογνική μηνιγγίτιδα και πνευμονία.

Παθοφυσιολογία:

- ❖ *Οξεία βακτηριακή μηνιγγίτιδα:* Το 28,5% των περιπτώσεων νεογνικής μηνιγγίτιδας οφείλεται στην *E. coli*. Οι έγκυες γυναίκες έχουν υψηλή επικινδυνότητα να μολυνθούν από στέλεχος *E. coli* με K1 καψικό αντιγόνο. Αυτό το στέλεχος παρατηρείται επίσης συχνά στη νεογνική σηψαιμία. Το ποσοστό θνησιμότητας είναι 8% και οι περισσότεροι επιζώντες έχουν επακόλουθες νευρολογικές και αναπτυξιακές ανωμαλίες.
- ❖ *Πνευμονία:* Λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος λόγω της *E. coli* είναι ασυνήθιστες και σχεδόν πάντα συσχετίζονται με λοιμώξεις του ουροποιητικού. Δεν εμπλέκονται παράγοντες τοξικότητας. Η πνευμονία από *E. coli* μπορεί επίσης να προκύψει από μικροαναρρόφηση εκκρίσεων του άνω αεραγωγού που στον οποίο προηγουμένως είχε αποικήσει ο μικροοργανισμός, σε σοβαρά

άρρωστους ασθενείς, γι' αυτό αποτελεί αιτία νοσοκομειακής λοίμωξης. Όμως, η πνευμονία από *E. coli* μπορεί επίσης να είναι εξωνοσοκομειακή σε ασθενείς που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη, αλκοολισμό, χρόνια παρεμποδιστική πνευμονική νόσο και λοίμωξη του ουροποιητικού από *E. coli*.

- ❖ *Λοιμώξεις του εντερικού συστήματος:* Έχουν ανακαλυφθεί 6 διαφορετικοί μηχανισμοί δράσης 6 διαφορετικών ποικιλιών *E. coli* ως αίτια εντερικών λοιμώξεων. Το εντεροτοξιγόνο (ETEC) αποτελεί αιτία διάρροιας (των ταξιδιωτών). Το εντεροπαθογόνο (EPEC) αποτελεί αιτία διάρροιας της παιδικής ηλικίας. Το εντεροεισβολέας EIEC προκαλεί δυσεντερία παρόμοια της *Shigella*. Το εντεροαιμοραγικό EHEC προκαλεί αιμορραγική κολίτιδα ή αιμολυτικό ουρεμικό σύνδρομο (HUS). Το εντεροσναθροιστικό EAaggEC είναι κυρίως συνδεδεμένο με την επίμονη διάρροια παιδιών σε αναπτυσσόμενες χώρες και το εντεροπροσκολλημένο EAEC αποτελεί αιτία διάρροιας σε παιδική ηλικία και των ταξιδιωτών στο Μεξικό και την Βόρεια Αφρική. Τα ETEC, EPEC, EAaggEC και EAEC αποικίζουν το λεπτό έντερο και τα EIEC και EHEC αποικίζουν επιλεκτικά το παχύ έντερο, πριν την πρόκληση διάρροιας.
- ❖ *Λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος:* Το ουροποιητικό αποτελεί την πιο κοινή περιοχή λοίμωξης από *E. coli*. Περισσότερο από το 90% όλων των απλών λοιμώξεων του ουροποιητικού προκαλείται από *E. coli*. Το ποσοστό επανεμφάνισης μετά την πρώτη λοίμωξη είναι 44% μέσα σε 12 μήνες. Οι λοιμώξεις του ουροποιητικού από *E. coli* προκαλούνται από το ουροπαθογόνο στέλεχος. Προκαλείται ένα ευρύ φάσμα μολύνσεων του ουροποιητικού συμπεριλαμβανομένης της απλής ουρηθρίτιδας/κυστίτιδας, συμπτωματικής κυστίτιδας, πυελονεφρίτιδας, προστατίτιδας, προστατικό απόστημα και σηπτική δηλητηρίαση από κατακράτηση και απορρόφησης ουσιών των ούρων.
- ❖ *Ενδοκοιλιακές λοιμώξεις:* Οι ενδογαστρικές λοιμώξεις από *E. coli* συχνά προκύπτουν λόγω διάτρητων σπλάχνων (π.χ. σκωληκοειδίτιδα, εκκόλπωμα) ή σχετίζονται με ενδογαστρικό απόστημα, χολοκυστίτιδα και χολαγγειίτιδα.
- ❖ *Άλλες λοιμώξεις:* Άλλες διάφορες λοιμώξεις που μπορεί να προκληθούν από *E. coli* είναι η σηπτική αρθρίτιδα, ενδοφθαλμίτιδα, πυώδης θυροειδίτιδα, ιγμορίτιδα, οστεομυελίτιδα, ενδοκαρδίτιδα ή δερματικές και υποδόριες μολύνσεις (ειδικά σε διαβητικούς ασθενείς).

β) *Proteus mirabilis*⁵⁻⁹

Οι *Proteus* αποτελούν μέρος τη οικογένειας εντεροβακτηριδίων των gram-αρνητικών βακίλων. Επίσης, αποτελούν σοβαρές αιτίες μολύνσεων στον άνθρωπο, μαζί με τα είδη των *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* και *Serratia*. Οι Πρωτεΐς βρίσκονται πολύ συχνά στο εντερικό σύστημα ως τμήμα της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας του ανθρώπου, μαζί με την *Escherichia coli* και *Klebsiella*, όπου κυριαρχεί η *E. coli*.

Το γένος *Proteus* αποτελείται από 5 είδη, τα: *P. mirabilis*, *P. penneri*, *P. vulgaris*, *P. myxofaciens* και *P. hauseri* και άλλα τρία είδη που δεν έχουν προσδιοριστεί *Proteus genomospecies* 4, 5 και 6.

Οι Πρωτεΐς είναι ευρέως διαδεδομένοι σε πολλαπλά περιβαλλοντικά ενδιαίτηματα, συμπεριλαμβανομένων των εγκαταστάσεων μακρόχρονης φροντίδας και των νοσοκομείων. Στο νοσοκομειακό περιβάλλον έχει παρατηρηθεί ανάπτυξη gram-αρνητικών βακίλων στο δέρμα και στον στοματικό βλεννογόνο υμένα των ασθενών και του προσωπικού. Όμως, οι Πρωτεΐς δεν αποτελούν την πιο κοινή αιτία των νοσοκομειακών λοιμώξεων, καθώς κατατάσσονται ως τρίτη κατά σειρά αιτία της απλής κυστίτιδας, πυελονεφρίτιδας και προστάτη, σε ενδονοσοκομειακές περιπτώσεις. Στον *P. mirabilis* οφείλεται περίπου το 3% των νοσοκομειακών λοιμώξεων στις Ηνωμένες Πολιτείες και απομονώνεται συχνά στα εργαστήρια κλινικής μικροβιολογίας.

Ο *Proteus mirabilis* είναι gram-αρνητικό αναερόβιο βακτήριο. Εμφανίζει συρροή, κινητικότητα και δραστικότητα ουρεάσης. Ο *P. mirabilis* προκαλεί το 90% των μολύνσεων από Πρωτεΐς. Ανήκει στο είδος των *Proteae*.

Ο *P. mirabilis*, μια κοινή αιτία νοσοκομειακής λοίμωξης και μόλυνσης του ουροποιητικού συστήματος λόγω χρήσης του καθετήρα, αποικίζει την κύστη και ανέρχεται στους ουρητήρες έως τα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια του νεφρού, οδηγώντας στην ανάπτυξη οξείας πυελονεφρίτιδας.

Ο *P. mirabilis*, ένα κοινό ουροπαθογόνο, προκαλεί λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος σε άτομα με δομικές ανωμαλίες στο ουροποιητικό και

συχνά απομονώνεται από ούρα ηλικιωμένων ασθενών που υποβάλλονται σε μακροπρόθεσμο καθετηριασμό. Οι επιπλοκές από την μόλυνση είναι συχνά σοβαρές και περιλαμβάνουν στον σχηματισμό πέτρας στην κύστη και στους νεφρούς, δημιουργία κρούστα και έπειτα απόφραξη του καθετήρα, οξεία πυελονεφρίτιδα και βακτηραιμία. Ο *P. mirabilis* συναντάται στους νεφρούς πιο συχνά από την *E. coli*.

Έχουν προσδιοριστεί και χαρακτηριστεί διάφοροι παράγοντες τοξικότητας του *P. mirabilis*. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν μια ισχυρή ουρεάση, η οποία καταλύει τον σχηματισμό της αμμωνίας από ουρία και οδηγεί στον σχηματισμό πέτρας στο ουροποιητικό, μια αιμολυσίνη που σχηματίζει πόρους, η ZapA μεταλλοπρωτεάση, η οποία διασπά την ανοσοσφαιρίνη G (IgG) και IgA, ένας πολυσακχαρίτης της κάψας, 4 διακριτοί τύποι ινιδίων και περίτριχα μαστίγια για μετακίνηση και κινητική συρροή.

Κατά την διάγνωση του *P. mirabilis*, ένα αλκαλικό δείγμα ούρων αποτελεί πιθανή ένδειξη ύπαρξής του. Η εργαστηριακή διάγνωση του *P. mirabilis* γίνεται μέσω της χαρακτηριστικής κινητικής συρροής και της αδυναμίας μεταβολισμού της λακτόζης (π.χ. σε MacConkey τρυβλίο). Επίσης, ο *P. mirabilis* παράγει μια πολύ ευδιάκριτη οσμή.

Νόσος: Αυτό το ραβδόμορφο βακτηρίδιο έχει την ικανότητα να παράγει υψηλά επίπεδα ουρεάσης. Η ουρεάση υδρολύει την ουρία σε αμμωνία, NH_3^+ και έτσι καθιστά τα ούρα πιο αλκαλικά. Αν δεν χορηγηθεί θεραπεία η αυξημένη αλκαλικότητα οδηγεί στον σχηματισμό κρυστάλλων $(\text{NH}_4)\text{MgPO}_4 \cdot 6(\text{H}_2\text{O})$, άλατος ανθρακικού ασβεστίου και/ή απατίτη. Τα βακτηρίδια που βρίσκονται στις πέτρες που σχηματίζονται και αυτά τα βακτηρίδια που κρύβονται σ' αυτές μπορούν να προκαλέσουν μόλυνση μετά από την χορήγηση θεραπείας με αντιβιοτικά. Καθώς οι πέτρες γίνονται αρκετά μεγάλες, κατά την διάρκεια του χρόνου, μπορούν να προκαλέσουν απόφραξη και νεφρική ανεπάρκεια. Οι Πρωτεΐς μπορούν επίσης να προκαλέσουν μολύνσεις σε πληγές, σηψαιμία και πνευμονίες, κυρίως σε νοσηλεύόμενους ασθενείς.

Θεραπεία: Ο *P. mirabilis* είναι γενικά ευαίσθητος στα περισσότερα αντιβιοτικά εκτός από την τετρακυκλίνη, όμως το 10-20% των στελεχών του *P. mirabilis* είναι ανθεκτικά στις κεφαλοσπορίνες και αμικυλίνες πρώτης γενιάς. Επίσης, έχουν

αναφερθεί για τον *P. mirabilis* υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στη σιπροφλοξασίνη, ε νοσοκομεία όπου η χρήση του είναι απεριόριστη. Η εγγενής ανθεκτικότητα του *P. mirabilis* στην τετρακυκλίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας για τον προσδιορισμό του.

γ) *Morganella morganii*^{6, 10-12}

Το γένος *Morganella* ανήκει στο ταξινομικό είδος *Proteae* της οικογένειας *Enterobacteriaceae*. Τα *Proteae*, που περιλαμβάνει επίσης τα γένη *Proteus* και *Providencia*, είναι σημαντικά ευκαιριακά παθογόνα ικανά να προκαλέσουν μια ευρεία ποικιλία νοσοκομειακών λοιμώξεων. Επί του παρόντος, το *Morganella* περιέχει μόνο ένα είδος, *Morganella morganii*, με δύο υποείδη, *morganii* και *sibonii*.

Τα περισσότερα μέλη της οικογένειας *Proteus-Providencia-Morganella* έχουν από κοινού αρκετά βιοχημικά χαρακτηριστικά. Αυτά συμπεριλαμβάνουν την θετική αντίδραση methyl red, δραστικότητα ουρεάσης, ανάπτυξη σε ζυμό με KCN και κινητικότητα, καθώς και μερικές φαινοτυπικές ιδιότητες, κυρίως την παραγωγή απαμινάση της φαινυλαλανίνης, τη διάσπαση κρυστάλλων τυροσίνης και την επεξεργασία μιας καφέ-κόκκινης χρωστικής ουσίας παρουσία της DL-τρυπτοφάνης.

Οι *Proteae* είναι σημαντικά παθογόνα του ανθρώπου που προκαλούν ποικίλες νοσοκομειακές ασθένειες συμπεριλαμβανομένης της νόσου του ουροποιητικού συστήματος, της σηψαιμίας και των μολύνσεων των πληγών. Οι *Morganellae* αρχικά εντάχθηκαν στο γένος *Proteus* μέχρι που DNA μελέτες, που πραγματοποιήθηκαν από τους Brenner et al, κατέληξαν ότι αποτελούν ξεχωριστό γένος καθώς δεν σχετίζονται περισσότερο με τους *Protei* σε σχέση με τα άλλα μέλη της οικογένειας.

Το *M. morganii* είναι ένα φαινοτυπικά σπάνιο είδος, και εμφανίζονται λίγες παραλλαγές στα βιοχημικά του χαρακτηριστικά από στέλεχος σε στέλεχος. Παρά τη γενική ομοιογένεια των φαινοτυπικών ιδιοτήτων αυτού του είδους, έχουν σημειωθεί σποραδικές αναφορές στελεχών *M. morganii* που επιδεικνύουν ασυνήθιστες βιοχημικές ιδιότητες. Μία μελέτη του Rauss και Voros το 1959 περιέγραψε 12 βιότυπους του *M. morganii* (τότε *Proteus morganii*) βασισμένη στη ζύμωση υδατανθράκων όπως γαλακτόζη, ραφινόζη και σουκρόζη. Το 1976, ο Siboni περιέγραψε δύο ξεχωριστούς βιότυπους του *M. morganii* βασισμένος στη ζύμωση

τρεχαλόζης. Σε αυτή τη μελέτη, η ζύμωση της τρεχαλόζης βρέθηκε να συνδέεται με την ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη.

Ο *Morganella morganii* είναι ένας gram-αρνητικός βάκιλος, που συναντάται συχνά στο περιβάλλον και στο εντερικό σύστημα του ανθρώπου, θηλαστικών και ερπετών, ως φυσιολογική χλωρίδα. Παρά την ευρεία κατανομή του αποτελεί ασυνήθιστη αιτία μόλυνσης και συναντάται περισσότερο σε μετεγχειρητικές και άλλες νοσοκομειακές περιπτώσεις. Οι λοιμώξεις από *M. morganii* ανταποκρίνονται καλά στην κατάλληλη θεραπευτική αγωγή με αντιβιοτικά, εντούτοις, η φυσική ανθεκτικότητά του σε αρκετά β-λακταμικά αντιβιοτικά καθυστερούν την θεραπεία.

Στο τέλος της δεκαετίας του '30, το *M. morganii* χαρακτηρίστηκε ως αιτία λοιμώξεων του ουροποιητικού. Έτσι, την δεκαετία του '50 και '60 άρχισαν να εμφανίζονται ανέκδοτες αναφορές νοσοκομειακών λοιμώξεων. Ο Tucci και Isenberg ανέφεραν το 1977 μια σειρά επιδημιών από *M. morganii* λοιμώξεις που εμφανίστηκαν σε περίοδο 3 μηνών σ'ένα γενικό νοσοκομείο. Από αυτές τις λοιμώξεις, το 61% ήταν μολύνσεις σε πληγές και το 39% ήταν λοιμώξεις του ουροποιητικού.

Το 1984, ο McDermott ανέφερε 19 επεισόδια βακτηραιμίας από *M. morganii* σε 18 νοσηλεύομενους ασθενείς, κατά τη διάρκεια χρονικής περιόδου 5,5 χρόνων. Τα 11 από αυτά τα επεισόδια συνέβησαν σε ασθενείς της χειρουργικής μονάδας. Η πιο κοινή πηγή βακτηραιμίας ήταν οι μετεγχειρητικές μολύνσεις πληγών και οι περισσότερες μολύνσεις εμφανίστηκαν σε ασθενείς στους οποίους είχε χορηγηθεί θεραπεία με β-λακταμικά αντιβιοτικά. Άλλοι σημαντικοί επιδημιολογικοί παράγοντες κινδύνου σ' αυτές τις μελέτες ήταν η παρουσία σακχαρώδη διαβήτη ή άλλες ελλοχεύουσες ασθένειες και η προχωρημένη ηλικία.

Παθοφυσιολογία: Το *Morganella morganii* έχει συνδεθεί με λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, σηψαιμία, πνευμονία, μολύνσεις πληγών, μυοσκελετικές νόσους, μολύνσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος, περικαρδίτιδα, χοριοαμνιοτίτιδα, ενδοφθαλμίτιδα, εμπύημα και βακτηριακή περιτονίτιδα.

1.1.2. *Pseudomonas*¹⁻²

Οι *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* και *Burkholderia* είναι (ευ)κινητοί, αυστηρώς αερόβιοι, gram-αρνητικοί κυλινδρικοί βάκιλοι, θετικοί σε οξειδάση. Συναντώνται ευρέως στη φύση, κυρίως στο έδαφος, νερό, φυτά, ζώα και άνθρωπο. Δεν μεταβολίζουν την λακτόζη όμως μπορούν να αναπτυχθούν με ελάχιστες πηγές άνθρακα και αζώτου σε απλό θρεπτικό μέσο και υγρές επιφάνειες. Τα σημαντικότερα είδη από αυτά τα γένη είναι ο *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. maltophilia*, *B. cepacia*, *B. mallei* και *B. pseudomallei*.

Η παθογένεση των λοιμώξεων από *Pseudomonas* είναι πολυπαραγοντική και περίπλοκη. Αυτοί οι οργανισμοί ευκαιριακά παθογόνοι και κάποιοι έχουν μεγαλύτερο δυναμικό παθογένεσης από άλλους. Επίσης, ποικίλουν αντιγονικά και έχουν μεγάλο γένωμα (χρωμοσώματα και πλασμίδια), το οποίο περιέχει πολυάριθμα μεταθετά στοιχεία ικανά να προκαλέσουν την μεταφορά γονιδίων τοξικότητας και ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά ανάμεσα στα είδη και στελέχη.

Οι παράγοντες τοξικότητας που διαθέτουν είναι η εξωτοξίνη A, εξωτοξίνη S, κυτοτοξίνη, διάφορες πρωτεάσες μετάλλων και δύο τύποι φωσφολιπάσης C. Φυσικά, παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην παθογένεση τα λιποπολυσακχαρίδια της εξωτερικής μεμβράνης τους.

α) *Pseudomonas aeruginosa*

Το πιο σημαντικό, από ιατρικής άποψης, είδος των *Pseudomonas* και το *P. aeruginosa*. Μολύνει το ενδονοσοκομειακό περιβάλλον και τα περισσότερα νοσοκομεία επιμολύνονται από στελέχη πολλαπλής ανθεκτικότητας τα οποία μεταφέρονται μεταξύ των ασθενών.

Κλινικές λοιμώξεις: Ο *P. aeruginosa* αποτελεί κύριο ευκαιριακό παθογόνο των ασθενών που βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή, προκαλώντας ποικίλες ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις. Αυτές περιλαμβάνουν λοιμώξεις εγκαυμάτων, μετεγχειρητικά τραύματα, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος (κυρίως σε ασθενείς με καθετήρα), λοιμώξεις του κάτω αναπνευστικού συστήματος (συγκεκριμένα, ασθενών με κυστική ίνωση), λοιμώξεις των ωτών, οφθαλμών και

δερματικές λοιμώξεις. Η μόλυνση από αυτόν τον μικροοργανισμό συχνά οδηγεί σε βαριά σηψαιμία και μπορεί να επέλθει θάνατος μετά από σηψαιμικό σοκ.

1.2. Αντιβιοτικά και ανθεκτικότητα ¹³⁻¹⁴

Τα αντιβακτηριακά φάρμακα περιλαμβάνονται μεταξύ των πιο σημαντικών θεραπευτικών ανακαλύψεων του εικοστού αιώνα και έχουν αλλάξει δραστικά τη θεραπευτική αγωγή πολλών ασθενειών, μειώνοντας τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα. Επιπλέον, τα αντιβιοτικά συγκαταλέγονται σήμερα ανάμεσα στα πιο συχνά συνταγογραφούμενα φάρμακα. Αυτό οφείλεται κατά ένα μέρος στο γεγονός ότι μερικά αντιβιοτικά είναι εξαιρετικά ασφαλή κατά την χρήση τους. Η υπερβολική όμως χρήση τους έχει συμβάλλει σημαντικά στην επιδείνωση του διεθνούς προβλήματος της αντοχής βακτηρίων στα αντιβιοτικά.

1.2.1. Αντοχή στα αντιβιοτικά

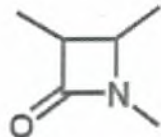
Η αντοχή στα αντιβιοτικά μπορεί να είναι συγγενής ή επίκτητη. Η συγγενής αντοχή αναφέρεται σε κάποια ενδογενής αντοχή που βασίζεται στο μηχανισμό δράσης του φαρμάκου. Η επίκτητη αντοχή αναφέρεται στην απόκτηση ενός γονιδίου αντοχής από κάποιο βακτήριο που δεν είναι συγγενώς ανθεκτικό στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό.

Οι τρεις κύριοι βιοχημικοί μηχανισμοί επίκτητης αντοχής είναι οι ακόλουθοι:

- ❖ Μειωμένη βακτηριακή διαπερατότητα που οφείλεται σε αλλαγές της εξωτερικής κυτταρικής μεμβράνης των Gram αρνητικών μικροβίων.
- ❖ Παραγωγή βακτηριακών ενζύμων που μεταβάλλουν την δομή του αντιβιοτικού. Τα ένζυμα αυτά μπορεί να είναι μη υδρολυτικά (ένζυμα που τροποποιούν τις αμινογλυκοσίδες) ή υδρολυτικά όπως στην περίπτωση των β-λακταμασών που υδρολύουν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά.
- ❖ Μετατροπή του στόχου δράσης, όπου μία απλή μετάλλαξη στο σημείο που φυσιολογικά προσδέεται το αντιβιοτικό μπορεί να είναι ικανή να προκαλέσει κλινικά σημαντική αντοχή στο φάρμακο.

1.2.2. β-λακταμικά αντιβιοτικά

Οι β-λακτάμες είναι μία κύρια κατηγορία αντιβιοτικών που διαθέτουν ένα τετραμελή β-λακταμικό δακτύλιο (Εικόνα 1) που περιέχει άζωτο και αναστέλλουν την σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος.



β-lactam

Εικόνα 1.
β-λακταμικός
δακτύλιος

Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά δρουν στα βακτήρια μέσω δύο μηχανισμών που στοχεύουν στην αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τους τοιχώματος.

- ✓ Αρχικά, ενσωματώνονται στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα και αναστέλλουν την δράση του ενζύμου τρανσπεπτιδάση, η οποία ευθύνεται για την σύνθεσή του. Έτσι, αναστέλλουν τις σταυρο-συνδέσεις των πλάγιων πεπτιδικών αλυσίδων του κυτταρικού τοιχώματος.
- ✓ Επιπλέον, συνδέονται με τις πενικιλίνο-δεσμευτικές πρωτεΐνες (PBP's), οι οποίες φυσιολογικά αναστέλλουν τις υδρολάσες του κυτταρικού τοιχώματος, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των υδρολασών, οι οποίες εν συνεχεία πραγματοποιούν την λύση του κυτταρικού τοιχώματος.

Για να μπορέσουν τα βακτήρια να παρακάμψουν αυτούς τους αντιμικροβιακούς μηχανισμούς δράσης, ενεργοποιούν την σύνθεση ενζύμων απενεργοποίησης των β-λακταμικών αντιβιοτικών (β-λακταμάσες) ή μεταλλαγμένους τύπους πενικιλίνο-δεσμευτικών πρωτεϊνών.

Οι β-λακτάμες είναι κυρίως βακτηριοκτόνες με χρονοεξαρτώμενη δράση. Έχουν μεγάλο θεραπευτικό δείκτη, με κύρια ανεπιθύμητη ενέργεια τις αλλεργικές αντιδράσεις.

Υπάρχουν τρεις κύριοι μηχανισμοί εμφάνισης αντοχής στις β-λακτάμες:

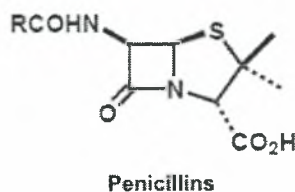
- * Ο πιο σημαντικός είναι η ενζυματική υδρόλυση του β-λακταμικού δακτυλίου από τις β-λακταμάσες. Υπάρχουν πολλές β-λακταμάσες, που διαφέρουν στην ειδικότητα για το υπόστρωμά τους.
- * Ο δεύτερος σημαντικότερος μηχανισμός αντοχής είναι η τροποποίηση των στόχων δράσης, που λέγονται πενικιλινο-δεσμευτικές πρωτεΐνες (penicillin-binding proteins, PBP's). Η μεταβολή μιας συγκεκριμένης πενικιλινο-δεσμευτικής πρωτεΐνης είναι ο κύριος μηχανισμός αντοχής στους ανθεκτικούς στη μεθικιλίνη σταφυλόκοκκους και στους ανθεκτικούς στην πενικιλίνη πνευμονιόκοκκους.
- * Ο τρίτος μηχανισμός αντοχής οφείλεται στη μειωμένη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών στα gram-αρνητικά βακτήρια.

Τα β-λακτάμες αποτελούν μια οικογένεια αντιμικροβιακών παραγόντων που περιλαμβάνει τέσσερις κύριες υποκατηγορίες:

- ♣ τις πενικιλίνες
- ♣ τις κεφαλοσπορίνες
- ♣ τις καρβαπενέμες
- ♣ τις μονοβακτάμες

Όλες αυτές οι υποκατηγορίες έχουν ένα β-λακταμικό δακτύλιο, ο οποίος μπορεί να υδρολυθεί από τις β-λακταμάσες. Η διαφοροποίησή τους έγκειται στην παρουσία επιπρόσθετων διαφορετικών δακτυλίων.

Πενικιλίνες: Η πενικιλίνη ανακαλύφθηκε από τον Alexander Fleming το 1928, σαν ένα παραπροϊόν του *Penicillium notatum*, από το οποίο προκύπτει και το όνομά της. Αποτελούνται από ένα β-λακταμικό δακτύλιο, συμπυκνωμένο με ένα πενταμελή θειαζολιδινικό δακτύλιο (Εικόνα 2). Η τροποποίηση της πλευρικής αλυσίδας στην θέση 6 του β-λακταμικού δακτυλίου καταλήγει σε φάρμακα με διαφορετικές αντιμικροβιακές και φαρμακολογικές ιδιότητες. Υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες πενικιλινών (Πίνακας 2).

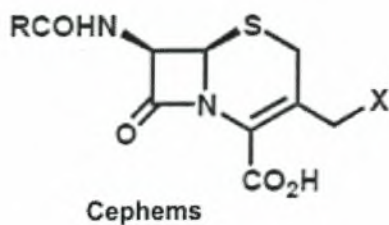


Εικόνα 2. Δομή πενικιλινών

Πίνακας 2. Κατηγορίες πενικιλινών

Κατηγορίες πενικιλινών	
Φυσικές πενικιλίνες	Πενικιλίνη G Πενικιλίνη V Υδατική προκαϊνούχος πενικιλίνη G Βενζαθινική πενικιλίνη G
Αντισταφυλοκοκκικές πενικιλίνες	Μεθικιλίνη Ναφκιλίνη Ισοξαζολικές πενικιλίνες Οξακιλίνη Κλοξακιλίνη Δικλοξακιλίνη Φλουκλοξακιλίνη
Αμινοπενικιλίνες	Αμπικιλίνη Αμοξικιλίνη
Αντιψευδομοναδικές πενικιλίνες	Καρβοξυπενικιλίνες Καρβενικιλίνη Τικαρκιλίνη Ουρεΐδοπενικιλίνες Πιτερακιλίνη Αζλοκιλίνη Μεξλοκιλίνη

Κεφαλοσπορίνες: Η πρώτη κεφαλοσπορίνη απομονώθηκε από το μύκητα *Cephalosporium acremonium*, από τον Giuseppe Brotzu το 1945. Αποτελούνται από ένα β-λακταμικό δακτύλιο συμπυκνωμένο με ένα εξαμελή διυδροθειαζινικό δακτύλιο (Εικόνα 3). Οι διάφορες κεφαλοσπορίνες προκύπτουν από υποκαταστάσεις πλευρικών αλυσίδων στην θέση 7 του β- λακταμικού δακτυλίου και στην θέση 3 του διυδροθειαζινικού δακτυλίου.



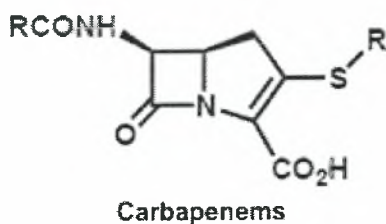
Εικόνα 3. Δομή κεφαλοσπορινών

Οι κεφαλοσπορίνες διαίρουνται σε πρώτης, δεύτερης και τρίτης γενιάς, με βάση το φάσμα δράσης τους κατά των gram αρνητικών αερόβιων βακτηρίων, το οποίο αυξάνεται από την πρώτη στην τρίτη γενιά (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Κατηγορίες κεφαλοσπορινών

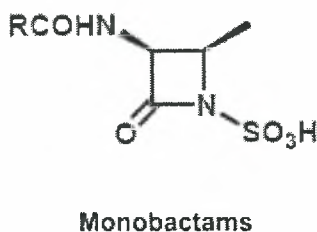
Κατηγορίες κεφαλοσπορινών	
Πρώτης γενιάς	Κεφαδροξίλη, κεφαζολίνη, κεφαλεξίνη, κεφαλοθίνη, κεφαπυρίνη, κεφραδίνη
Δεύτερης γενιάς με δράση κατά του <i>H .influenzae</i>	Κεφακλόρη, κεφμανδόλη, κεφονισίδη, κεφορανίδη, κεπροξίλη, κεφουροξίμη, κεφουροξίμη αξετίλ
Δεύτερης γενιάς με δράση κατά του <i>Bacteroides fragilis</i>	Κεφμεταζόλη, κεφοτετάνη, κεφοξιτίνη
Τρίτης γενιάς	Κεφοταξίμη, κεφτριαξόνη, κεφτριζοξίμη, κεφοπεραζόνη, μοξαλακτάμη
Τρίτης γενιάς με δράση κατά της <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Κεφταζιδίμη, κεφεπίμη
Ευρέως φάσματος από το στόμα	Κεφιξίμη, κεφοδοξίμη-προξετίλ

Καρβαπενέμες: Οι καρβαπενέμες αποτελούνται από ένα β-λακταμικό δακτύλιο, συμπυκνωμένο με ένα πενταμελή πεναμικό δακτύλιο (Εικόνα 4). Έχουν το ευρύτερο αντιμικροβιακό φάσμα από όλα τα διαθέσιμα μέχρι σήμερα αντιβιοτικά. Οι καρβαπενέμες που κυρίως κυκλοφορούν σήμερα είναι η ιμιπενέμη και η μεροπενέμη. Είναι ανθεκτικές στην υδρόλυση από τις περισσότερες β-λακταμάσες και χρησιμοποιούνται για την θεραπεία λοιμώξεων από βακτήρια ανθεκτικά σε άλλα αντιβιοτικά. Επίσης, λόγω του ευρέως αντιμικροβιακού φάσματός τους, χορηγούνται σε πολυμικροβιακές λοιμώξεις αντί να χρησιμοποιηθούν δύο ή περισσότερα άλλα αντιβιοτικά.



Εικόνα 4. Δομή καρβαπενέμης

Μονοβακτάμες: Οι μονοβακτάμες αποτελούνται από ένα β-λακταμικό δακτύλιο ενωμένο με μία σουλφονική ομάδα (Εικόνα 5). Η μόνη διαθέσιμη μονοβακτάμη είναι η αζτρεονάμη η οποία είναι δραστική μόνο κατά των Gram-αρνητικών αερόβιων βακτηρίων περιλαμβανομένης και της *P.aeruginosa*.



Εικόνα 5. Δομή μονοβακταμών

1.3. Δράση β-λακταμασών και η ταξινόμησή τους ¹⁴⁻¹⁶

1.3.1. Σύνθεση και τρόπος μεταφοράς

Η σύνθεση των β-λακταμασών είναι είτε χρωμοσωμική, όπως συμβαίνει στο *Pseudomonas aeruginosa*, είτε μέσω πλασμιδίου, όπως στο *Aeromonas hydrophila* και στο *Staphylococcus aureus*. Τα πλασμίδια αποτελούν σημαντική αιτία διάδοσης της βακτηριακής αντοχής, δεδομένου ότι μπορούν να μεταφερθούν μεταξύ των gram-αρνητικών βακτηρίων με βακτηριακή σύζευξη και μεταξύ των gram-θετικών βακτηρίων με βακτηριακούς ιούς, τους αποκαλούμενους βακτηριοφάγους μεταγωγής. Αυτή η δυνατότητα μεταβίβασης ευθύνεται για πολλά ξεσπάσματα βακτηριακής αντοχής, ειδικά όταν παρακάμπτονται τα κατάλληλα μέτρα ελέγχου μόλυνσης στο νοσοκομειακό περιβάλλον.

1.3.2. Εντοπισμός

Στα gram-θετικά βακτήρια, οι β-λακταμάσες εκκρίνονται στο εξωτερικό περιβάλλον της μεμβράνης ως εξω-ένζυμα. Στα gram-αρνητικά βακτήρια παραμένουν στον περιπλασματικό χώρο, όπου αντιδρούν με το αντιβιοτικό πριν εκείνο πλησιάσει τη θέση πρόσδεσής του.

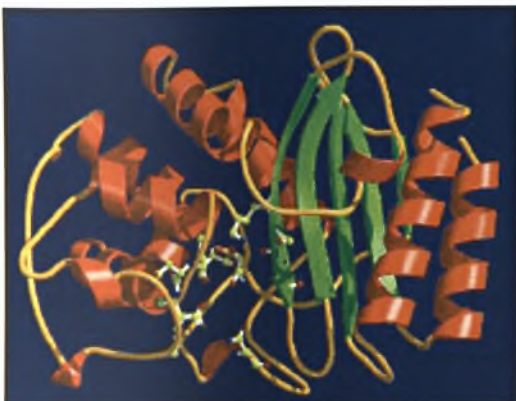
1.3.3. Μηχανισμοί δράσης

Οι β-λακταμάσες καταστρέφουν τον β-λακταμικό δακτύλιο μέσω δύο κύριων μηχανισμών δράσης.

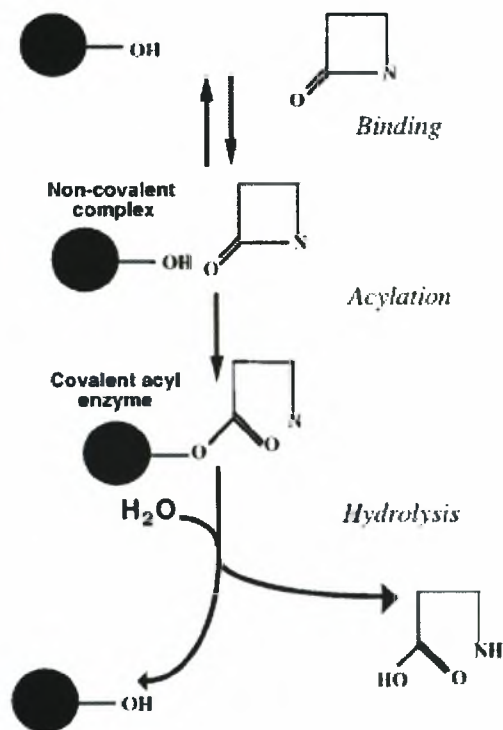
- * Πρώτον, οι περισσότερο κοινές β-λακταμάσες έχουν έναν μηχανισμό δράσης βασισμένο στη σερίνη. Χωρίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες (A, C και D) βάσει της αμινοξικής τους αλληλουχίας. Περιέχουν ένα ενεργό κέντρο που αποτελείται από μια στενή διαμήκης αύλακα, με μια κοιλότητα στον πυθμένα της (την οξυανιοντική θήκη “oxyanion pocket”), το οποίο είναι χαλαρά δομημένο προκειμένου να έχει εύκαμπτη πρωτεϊνική δομή σε σχέση με την δέσμευση υποστρώματος. (Εικόνα 6). Σε αυτό συμβάλλει η παρουσία ενός καταλοίπου σερίνης, το οποίο

αντιδρά μη αντιστρεπτά με τον καρβονυλικό άνθρακα του β-λακταμικού δακτυλίου, με αποτέλεσμα την διάσπαση του δακτυλίου (ανενεργή β-λακτάμη) και την αναγέννηση της β-λακταμάσης (Εικόνα 7). Αυτά τα ένζυμα είναι ενεργά έναντι αρκετών πενικιλινών, κεφαλοσπορινών και μονοβακταμών.

- ★ Δεύτερον, μία ομάδα β-λακταμασών που συναντάται λιγότερο συχνά είναι οι μεταλλο-β-λακταμάσες, ή τάξη B των β-λακταμασών. Αυτές χρησιμοποιούν ένα δισθενές ιόν μετάλλου, κυρίως ψευδαργύρου, συνδεδεμένο με ένα κατάλοιπο ιστιδίνης ή κυστεΐνης ή και στα δύο, για να αντιδράσει με την καρβονυλική ομάδα του αμιδικού δεσμού των περισσότερων πενικιλινών, κεφαλοσπορινών, όχι όμως των μονοβακταμών.



Εικόνα 6. Μοριακή δομή β-λακταμάσης
<http://biosafety.ihe.be/AR/betalactamase.html>



Εικόνα 7. Η δράση των β-λακταμασών με σερίνη. Αρχικά, παρατηρείται μη ομοιοπολική σύνδεση του ενζύμου με το αντιβιοτικό και την δημιουργία μη ομοιοπολικού Michaelis σύμπλοκο. Έπειτα, η ελεύθερη υδροξυλική ομάδα της πλευρικής αλυσίδας του καταλοίπου σερίνης, που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, επιτίθεται στον λακταμικό δακτύλιο και δημιουργείται ένας ομοιοπολικός ακυλικός εστέρας. Τελικά, η υδρόλυση του εστέρα ελευθερώνει το ενεργό ένζυμο και το υδρολυμένο, ανενεργό φάρμακο. Αυτός ο μηχανισμός πραγματοποιείται από τις β-λακταμάσες των μοριακών τάξεων A, C και D, αλλά η τάξη B των ενζύμων χρησιμοποιούν ένα ιόν ψευδαργύρου για να επιτίθενται στον β-λακταμικό δακτύλιο.

1.3.4. Ταξινόμηση β-λακταμασών

Μέχρι σήμερα, οι β-λακταμάσες έχουν ταξινομηθεί βάσει του υδρολυτικού φάσματός τους, της ευαισθησίας τους σε αναστολείς, και εάν κωδικοποιούνται από το χρωμόσωμα ή από πλασμίδια. Μεγάλη βαρύτητα δόθηκε στο κατά πόσον υδρολύεται πιο γρήγορα η κεφαλοσποριδίνη από την βενζυλοπενικιλίνη, ή αντίστροφα, και στο κατά πόσον ένα ένζυμο απενεργοποιείται από κλοξακιλίνη, κλαβουλανικό οξύ, αζτρεονάμη, ή p-chloromercuribenzoate. Η πρώτη τέτοια κατηγοριοποίηση προτάθηκε από τους Jack και Richmond το 1970 και επεκτάθηκε από τους Richmond και Sykes το 1973. Οι ατέλειες έγιναν εμφανείς κατά τη διάρκεια των επόμενων 15 ετών, και μια σημαντική αναδιοργάνωση προτάθηκε από τον Bush το 1989, με περαιτέρω ενημέρωση το 1995. Το αναθεωρημένο σχέδιο του Bush κατηγοριοποιεί της β-λακταμάσες βάσει της προτίμησής τους σε υποστρώματα μεταξύ της πενικιλίνης, οξακιλίνης, καρβενικιλίνης, κεφαλοριθίνης, κεφαλοσπορίνης ευρέως φάσματος και ιμιπενέμης, και βάσει της ευαισθησίας τους σε αναστολή από κλαβουλανικό οξύ (Πίνακας 4).

Οι φαινοτυπικές ταξινομήσεις αντιμετωπίζουν το πρόβλημα ότι η σημειακή μετάλλαξη μπορεί να αλλάξει σημαντικά την εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα και την ευαισθησία σε αναστολείς, μεταβάλλοντας έτσι την ομάδα στην οποία ένα ένζυμο ορίζεται. Επομένως, οι β-λακταμάσες κατηγοριοποιούνται όλο και περισσότερο βάσει της αλληλουχίας τους, όπως αρχικά προτάθηκε από Ambler. Τέτοια ταξινόμηση είναι σταθερή, δεδομένου ότι απεικονίζει τις θεμελιώδεις σχέσεις και δεν μπορεί να διαστρεβλωθεί από τις μεταλλαγές. Επιπλέον, τουλάχιστον για το παρόν, η κατηγοριοποίηση βάσει της αλληλουχίας χαρακτηρίζεται από απλότητα καθώς περιλαμβάνει μόνο τέσσερις τάξεις που ορίζονται από το Α έως το D. Οι τάξεις Α, C, και D περιλαμβάνουν εξελικτικά διακριτές ομάδες ενζύμων σερίνης, και η τάξη Β περιλαμβάνει τους τύπους ψευδαργύρου. Υποδιαιρέσεις αυτών των τάξεων μπορούν να μπορούν να απεικονιστούν μέσω δένδροδιαγραμμάτων βασιμένα στην αλληλουχική ομοιότητα. Επί του παρόντος, υπάρχει καλή συσχέτιση ανάμεσα στις τάξεις που προσδιορίστηκαν στην φαινοτυπική κατηγοριοποίηση του Bush και εκείνων που προσδιορίστηκαν στην μοριακή κατηγοριοποίηση (Πίνακας 4).

Πίνακας 4. Συσχέτιση ανάμεσα στην μοριακή κατηγοριοποίηση του Ambler και των φαινοτυπικών ομάδων του Bush.

Structural class (Ambler)	Functional group (Bush)	Activity ^b							Inhibition by clavulanate
		Penicillin	Carbencillin	Oxacillin	Cephaloridine	Cefotaxime	Aztreonam	Imipenem	
Serine β-lactamases									
A	2a	+++	+	-	±	-	-	-	++
	2b	+++	+	+	++	-	-	-	++
	2be	+++	+	+	++	++	++	-	++
	2br	+++	+	+	++	-	-	-	-
	2c	++	+++	+	+	-	-	-	+
	2e	++	++	-	++	++	++	-	++
	2f	++	+	?	+	+	++	++	+
C	1	++	±	Inhibitor	+++	+	Inhibitor	-	-
D	2d	++	+	+++	+	-	-	-	±
Undetermined ^c	4 ^c	++	++	++	V	V	-	-	-
Zinc β-lactamases									
B	3	++	++	++	++	++	-	++	-

^a Data from Ambler's classification (4, 256) and the classification of Bush et al. (37). This table includes some simplifications. In particular, (i) group 2d includes molecular class A oxacillinases from *Actinostudium* and *Streptomyces* spp., as well as class D enzymes from gram-negative rods; (ii) hydrolytic activity varies within each group, and (iii) sequences remain to be determined for many enzymes included in Bush's scheme.

^b +++, preferred substrate (highest V_{max}); ++, good substrate; +, hydrolyzed; ±, barely hydrolyzed; -, stable; V, variable within group; ?, uncertain.

^c None of Bush's group 4 enzymes has yet been sequenced; they are assumed to be serine types because they lack carbapenemase activity.

Κατά την ταξινόμηση βάσει της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, οι διάφορες τάξεις παρουσιάζουν διάφορες ιδιότητες. Συγκεκριμένα, τα ένζυμα της τάξης A είναι ισχυρά δραστικά έναντι της βενζυλοπενικιλίνης. Οι ευρέως φάσματος β-λακταμάσες (ESBLs) ανήκουν επίσης σε αυτή την τάξη. Οι ESBLs επίσης απενεργοποιούν τις βενζυλοπενικιλίνες καθώς και μερικές κεφαλοσπορίνες και/ή μονοβακτάμες. Οι β-λακταμάσες της τάξης B είναι εξίσου δραστικές έναντι των πενικιλινών και κεφαλοσπορινών, και τουλάχιστον κάποιες από αυτές μπορούν να απενεργοποιήσουν τις καρβαπενέμες. Τα γονίδια της τάξης C είναι συνήθως επηρεάσιμα, όμως οι μεταλλαγές μπορεί να οδηγήσουν σε υπερέκφραση. Η τάξη D αποτελείται από ένζυμα του τύπου OXA, τα οποία είναι μπορούν να υδρολύσουν την οξακιλλίνη.

1.4. Μεταλλο-β-λακταμάσες¹⁷⁻¹⁸

Οι μεταλλο-β-λακταμάσες (MBLs), όπως όλες οι β-λακταμάσες, μπορούν να χωριστούν σε εκείνες που φυσιολογικά βρίσκονται μέσα στο χρωμόσωμα και σε εκείνες που κωδικοποιούνται από γονίδια μεταθετών στοιχείων. Οι πρώτες μελέτες των χρωμοσωμικών MBLs στράφηκαν κυρίως στα στελέχη *Bacillus cereus* (BC II), και *Stenotrophomonas maltophilia* (LI). Εντούτοις, κυρίως λόγω της γενωμικής αλληλούχησης, ανακαλύπτονται όλο και περισσότερα γονίδια χρωμοσωμικών MBLs σε άγνωστα μη-κλινικά βακτήρια.

Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας έχουν υπάρξει διάφορα άρθρα που συνοψίζουν τα επίπεδα των MBLs στη βακτηριακή κοινότητα. Εντούτοις, στα προηγούμενα 3 έως 4 έτη έχουν μελετηθεί πολλοί νέοι μεταβιβάσιμοι τύποι των MBLs και εμφανίζονται να διαδίδουν γρήγορα. Σε μερικές χώρες, το *P. aeruginosa* που περιέχει MBLs αποτελεί σχεδόν το 20% όλων των νοσοκομειακών απομονώσεων, ενώ σε άλλες χώρες ο αριθμός είναι ακόμα συγκριτικά μικρός. Τα τελευταία χρόνια, τα γονίδια MBL έχουν εκξαπλωθεί από το *P. aeruginosa* στα εντεροβακτηρίδια, και φαίνεται να αναπτύσσεται ένα κλινικό σενάριο παγκόσμιας εξάπλωσης των ευρέως φάσματος β-λακταμασών. Επιπλέον, δεδομένου ότι οι MBLs θα υδρολύουν ουσιαστικά όλες τις κατηγορίες της β-λακτάμης και ότι απέχουμε αρκετά έτη από την εφαρμογή ενός θεραπευτικού ανασταλτικού παράγοντα, η συνεχής διάδοσή τους θα ήταν μια κλινική καταστροφή.

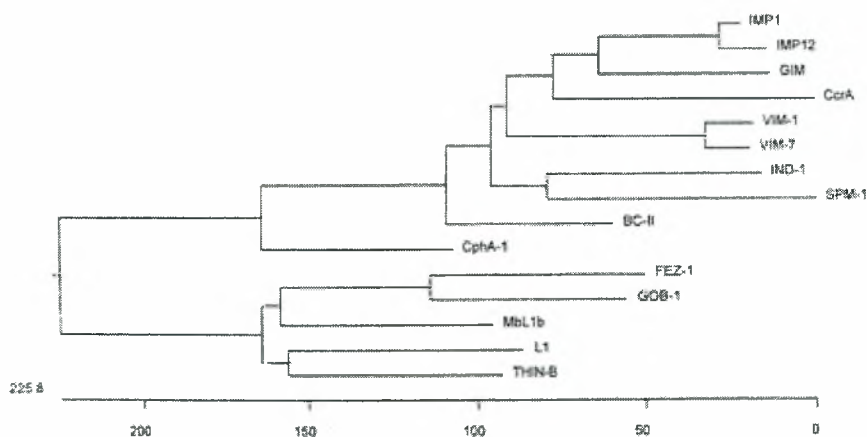
1.4.1. Ταξινόμηση των μεταλλο-β-λακταμασών

Οι MBLs αρχικά ταξινομήθηκαν από τις β-λακταμάσες σερίνης το 1980, στο σχέδιο ταξινόμησης που προτάθηκε από τον Ambler. Στο χρόνο, πολύ λίγες MBLs είχαν μελετηθεί αρκετά ώστε να μπορούν να συνυπολογιστούν. Αξιοσημείωτες εξαιρέσεις αποτέλεσαν οι L1 (από το *S. maltophilia*) και BCII (από το *B. cereus*). Το 1989, ο Bush ταξινόμησε περαιτέρω τις MBLs σε μια ξεχωριστή ομάδα (ομάδα 3) σύμφωνα με τις λειτουργικές ιδιότητές τους και παραμένει το συνιστώμενο σύστημα αναφοράς για τις β-λακταμάσες. Αυτό το σχέδιο αρχικά βασίστηκε στο φάσμα υποστρωμάτων (συγκεκριμένα στην υδρόλυση της ιμιπενέμης), στην ευαισθησία τους στον χηλικό παράγοντα EDTA, και στην έλλειψη αναστολής τους από τους ανασταλτικούς παράγοντες των β-λακταμασών σερίνης. Αυτό το σχέδιο ενημερώθηκε το 1995 και τροποποιήθηκε περαιτέρω το 1997 για να συμπεριλάβει τον αυξανόμενο αριθμό ενζύμων της ομάδας 3, που ταξινομούνται συνεχώς. Στο χρόνο, μόνο δύο μεταθετοί τύποι των MBLs είχαν μελετηθεί, ο CcrA από τον *Bacteroides fragilis* και ο IMP-1 από τον *P. aeruginosa*.

Όλες οι MBLs υδρολύουν την ιμιπενέμη, αλλά η δυνατότητά τους να το επιτύχουν αυτό ποικίλλει αρκετά και το ποσοστό υδρόλυσης μπορεί (ή όχι) να συσχετιστεί με το επίπεδο αντοχής στις καρβαπενέμες του βακτηριδίου. Συνεπώς, αυτή η ταξινόμηση διαχώρισε περαιτέρω αυτά τα ένζυμα στις υποομάδες κυρίως

βάσει της υδρόλυσης της μιπενέμης και άλλων β-λακταμών. Ουσιαστικά, τα ένζυμα της ομάδας 3a κατέχουν ένα ευρύ φάσμα της δραστηριότητας, τα ένζυμα της ομάδας 3b κατέχουν μια προνομιακή πλεονεξία για τις καρβαπενέμες και τα ένζυμα της ομάδας 3c υδρολύουν ασθενώς τις καρβαπενέμες έναντι άλλων υποστρωμάτων β-λακτάμης. Εντούτοις, αυτά τα ένζυμα κατέχουν τη ξεχωριστή χαρακτηριστική ιδιότητα να αναστέλλονται από το EDTA καθώς επίσης και από άλλους χηλικούς παράγοντες των δισθενών κατιόντων, ένα τυπικό χαρακτηριστικό γνώρισμα των MBLs που συσχετίζεται με τη μηχανιστική λειτουργία τους.

Σε μοριακό επίπεδο, οι MBLs αποτελούν διαφορετική ομάδα πρωτεϊνών που κάνουν την ταξινόμηση και την τυποποίηση των δομών τους ουσιαστικά αδύνατη (Εικόνα 8). Έχουν γίνει προσπάθειες να υποδιαιρεθούν τα ένζυμα της τάξης B βάσει της αλληλουχίας και άλλων δομικών χαρακτηριστικών. Το φυλογενετικό δέντρο (Εικόνα 8) δείχνει τη συγγένεια ενός ενζύμου με ένα άλλο, όπως εκτιμήθηκε από τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες. Η ορθολογική βάση της τάξης B1 είναι ότι τα ένζυμα κατέχουν ψευδάργυρο που είναι συντονισμένο από μία συντηρημένη τριάδα καταλοίπων ιστιδίνης και μιας ιστιδίνης, και η τάξη αυτή περιλαμβάνει τις μεταθετές MBLs IMP, VIM, GIM, και SPM-1. Η τάξη B2 περιλαμβάνει εκείνες που έχουν μια ασπαραγίνη αντί της ιστιδίνης στην πρώτη θέση του κύριου μοτίβου δέσμευσης του ψευδάργυρου, NXHXD, και προέρχονται από το *Aeromonas* spp. και το ένζυμο SFH-1 του *Serratia fonticola*. Η MBL L1 είναι η μόνη των ενζύμων της τάξης B3, δεδομένου ότι είναι η μοναδική μεταξύ όλων των β-λακταμασών που εμφανίζεται ως λειτουργικό τετραμερές.



Εικόνα 8. Φυλογενετικές σχέσεις χρωμοσωμικά κωδικοποιημένων MBLs. Οι απεικονιζόμενες αλληλουχίες των διάφορων MBLs λήφθηκαν από την GenBank. Το IMP-1 και IMP-12 (ο πιο αποκλίνων του IMP-1) και το VIM-1 και VIM-7 (ο πιο αποκλίνων του VIM-1) προστέθηκαν, επίσης, για σύγκριση.

1.4.2. Βιοχημεία των μεταλλο-β-λακταμασών

Οι μεταλλο-β-λακταμάσες χρειάζονται μεταλλικά κατιόντα, συνήθως ψευδαργύρου, ως συμπράγοντα για να μπορέσουν να δράσουν. Οι MBLs έχουν μια ξεχωριστή ακολουθία αμινοξέων που καθορίζει την αρχιτεκτονική του ενεργού κέντρου που συντονίζει τα ιόντα ψευδάργυρου. Ενώ οι περισσότερες MBLs έχουν δύο ιόντα ψευδαργύρου στο ενεργό τους κέντρο, όπως οι τάξεις B1 και B3 προσδένουν δύο τέτοια κατιόντα για να αποδώσουν τη μέγιστη δραστηρότητά τους, η τάξη B2 έχει μόνο ένα ιόν ψευδαργύρου. Ο μηχανισμός υδρόλυσης των MBLs είναι πολύπλοκος και ποικίλλει σε κάθε MBL. Η διευκρίνιση της κρυσταλλικής δομής των MBLs έχει προσφέρει ανεκτίμητη βαθιά γνώση για τους καταλυτικούς μηχανισμούς τους. Παρά το γεγονός ότι οι MBLs μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά, η αμινοξική τους αλληλουχία ποικίλλει σημαντικά, καθώς το ποσοστό ομοιότητας της αλληλουχίας αυτής είναι λιγότερο από 25%, οι MBLs διατηρούν συντηρημένο το γενικό μοτίβο δέσμευσης του υδραργύρου HXHXD (όπου X οποιοδήποτε αμινοξύ και H η ιστιδίνη), στο οποίο παρατηρούνται τα κρίσιμα αμινοξικά κατάλοιπα που προσδένουν τα κατιόντα ψευδαργύρου.

Από το 1995 άρχισαν να δημοσιεύονται αναλυτικές κρυσταλλογραφικές μελέτες για τα μεταλλο-ένζυμα BcII του *B. cereus*, CcrA του *B. fragilis* και L1 του *S. maltophilia*. Παρά τη χαμηλή αμινοξική τους ομοιότητα, τα ένζυμα αυτά έχουν παρόμοια τρισδιάστατη διαμόρφωση που αντιπροσωπεύεται από μία αββα δομή με δύο β-πτυχωτά φύλλα στο πυρήνα και πέντε α-έλικες στη περιφέρεια. Τα κέντρα πρόσδεσης των κατιόντων ψευδαργύρου βρίσκονται σε μία μεγάλη και ευέλικτη αύλακα, κάτι που εξασφαλίζει την εύκολη πρόσβαση του υποστρώματος και έτσι το μεγάλο εύρος υδρολυτικής ικανότητας, που σχηματίζεται από τα δύο β-πτυχωτά φύλλα της αββα δομής. Σε κάθε τέτοιο κέντρο βρίσκονται έως και δύο κατιόντα ψευδαργύρου. Επίσης, οι MBLs είναι ανεπηρέαστες από τα ανασταλτικά αποτελέσματα των ανασταλτικών παραγόντων των β-λακταμασών της σερίνης, όπως το κλαβουλανικό οξύ και η σουλπιακτάμη, που αντιμετωπίζονται συχνά ως αδύναμα υποστρώματα. Έχει ενδιαφέρον να αναφέρουμε ότι, καμία από τις MBLs δεν υδρολύει ιδιαίτερα καλά την αζτρεονάμη, και θεωρείται ότι θα μπορούσε να αποτελέσει θεραπευτικός ανασταλτικός παράγοντας των MBLs.

Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί οι τύπου IMP, VIM και SIM-1 μεταλλο-β-λακταμάσες. Οι τύπου IMP είναι ευρέως διαδεδομένες σε διάφορα είδη με κύριους

αντιπροσώπους τον IMP-1 στην Ιταλία, Ιαπωνία, και Ν. Κορέα, τον IMP-2 στην Ιταλία και την Ιαπωνία, τον IMP-4 στο Χονγκ Κονγκ, την Αυστραλία και την Κίνα, τον IMP-5 στη Πορτογαλία, τον IMP-6 στη Βραζιλία και την Ιαπωνία και τον IMP-11 στην Ιαπωνία (Πίνακας 5).

Οι τύποι VIM είναι ιδιαίτερα σπάνιες στα *Acinetobacter* με μοναδικούς εκπροσώπους την VIM-1 στην Ελλάδα και την VIM-2 στη Ν. Κορέα. 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 στο παρακάτω πίνακα. Το πιο αξιοσημείωτο παράδειγμα αποτελούν οι τύποι VIM-1 και VIM-2, οι οποίοι είναι πολύ όμοιοι δομικά.

Αντιβιοτικό	IMP-1			VIM-1			VIM-2		
	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\mu M^{-1}s^{-1}$)
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			
Πιπερακιλλίνη	ND	ND	0.72	1860	3500	0.53	32.7	72	0.45
Τικαρσιλίνη	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 ⁻⁵	<0.01	>1000	<1 x 10 ⁻⁵	<0.5	ND	ND
Ταζομπακτάμη	>1000	>3.98	0.0039	5.3	337	0.016			

Πίνακας 5. Πρόβλεψη και βακτηριακοί ξενιστές των MBLs τύπου IMP.

IMP-type MBL	Host	Origin	Integron
IMP-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japan	Class 1
		Japan	Class 3?
		Japan	?
	<i>Pseudomonas putida</i>	Brazil	Class 1
		Korea	?
		Japan	Class 3?
	<i>Serratia marcescens</i>	Japan	?
		Singapore	Class 3?
		Japan	Class 1
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Japan	?
		Korea	?
		England	Class 1
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	England?	?
		Singapore	?
		Japan	Class 1
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Japan	?
		Japan	Class 1
		Japan	Class 3?
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Japan	Class 1
		Japan	Class 3?
		Japan	Class 1
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Japan	Class 1
		Japan	Class 1
		Japan	Class 1
	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Japan	Class 1
		Japan	Class 1
		Japan	?
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	Japan	Class 1	
	Japan	Class 1	
	Japan	?	
<i>Citrobacter freundii</i>	Japan	Class 1	
	Japan	Class 1	
	Japan	Class 1	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Japan	Class 1	
	Japan	?	
	Japan	Class 1	
<i>Enterobacter cloacae</i>	Japan	Class 1	
	Japan	Class 1	
	Japan	Class 1	
<i>Escherichia coli</i>	Japan	Class 1	
	Japan	Class 1	
	Japan	Class 1	
<i>Proteus vulgaris</i>	Japan	Class 1	
	Japan	Class 1	
	Japan	Class 1	
<i>Providencia rettgeri</i>	Japan	Class 1	
	Japan	Class 1	
	Japan	Class 1	
IMP-2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	England	?
		Italy	Class 1
		Japan	Class 1
IMP-3	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Japan	Class 1
		Japan	Class 1
		Japan	Class 1
IMP-4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japan	Class 1
		Japan	Class 1
		Japan	Class 1
IMP-5	<i>Stigella flexneri</i>	Japan	Class 1
		Japan	Class 1
		Japan	Class 1
IMP-6	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Hong Kong	Class 1
		Hong Kong	Class 1
		Hong Kong	Class 1
IMP-7	<i>Citrobacter freundii</i>	Australia	Class 1
		Australia	Class 1
		Australia	Class 1
IMP-8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	China	Class 1
		China	Class 1
		Australia	?
IMP-9	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Portugal	Class 1
		Portugal	Class 1
		Portugal	Class 1
IMP-10	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Brazil	?
		Brazil	?
		Japan	Class 1
IMP-11	<i>Serratia marcescens</i>	Japan	Class 1
		Japan	Class 1
		Japan	Class 1
IMP-12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Canada	Class 1
		Malaysia	Class 1
		Malaysia	Class 1
IMP-13	<i>Enterobacter cloacae</i>	Taiwan	Class 1
		Taiwan	Class 1
		Taiwan	Class 1
IMP-14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Taiwan	Class 1
		Taiwan	Class 1
		Taiwan	Class 1
IMP-15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	China	Class 1
		China	Class 1
		China	Class 1
IMP-16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japan	Class 1
		Japan	Class 1
		Japan	Class 1
IMP-17	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	Japan	?
		Japan	?
		Japan	?
IMP-18	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Japan	?
		Japan	?
		Japan	?
IMP-19	<i>Pseudomonas putida</i>	Italy	Class 1
		Italy	Class 1
		Italy	Class 1
IMP-20	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Italy	Class 1
		Italy	Class 1
		Italy	Class 1
IMP-21	?	?	?
		?	?
		?	?
IMP-22	?	?	?
		?	?
		?	?
IMP-23	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Brazil	Class 1
		Brazil	Class 1
		Brazil	Class 1
IMP-24	?	?	?
		?	?
		?	?
IMP-25	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	USA	?
		USA	?
		USA	?

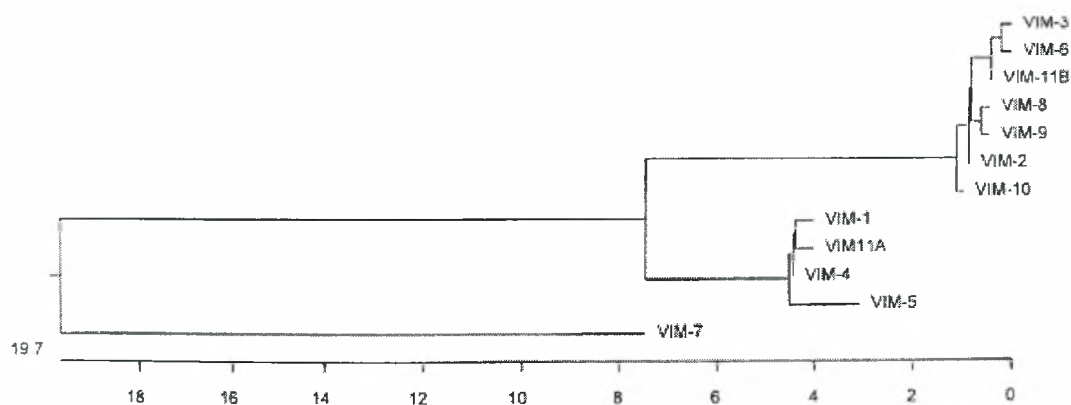
Επίσης, πρόσφατες μελέτες και σε άλλα γένη μικροβίων υποδεικνύουν ότι οι μεταλλο-β-λακταμάσες δεν επαρκούν για να προσδώσουν υψηλά επίπεδα αντοχής στις καρβαπενέμες και ότι μάλλον αυτό επιτυγχάνεται λόγω της συνύπαρξης άλλων μηχανισμών αντοχής, όπως της αδιαβατότητας τους κυτταρικού τοιχώματος. Αυτό 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. Διάφοροι τύποι VIM παρατηρούνται σε διάφορα στελέχη μικροοργανισμών, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα 6.

Πίνακας 6. Προέλευση και βακτηριακοί ξενιστές των MBLs τύπου VIM.

VIM-type MBL	Host	Origin	Integron present
VIM-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Italy	+
	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Italy	+
	<i>Pseudomonas putida</i>	Italy	+
	<i>Escherichia coli</i>	Greece	+
		France	+
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Greece	+
VIM-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	France	+
		Greece	+
		Italy	+
		Japan	+
		Korea	+
		Portugal	+
		Spain	?
		Croatia	+
		Poland	+
		Chile	+
		Venezuela	+
		Argentina	?
		USA	+
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Korea	+
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Korea	+
	<i>Serratia marcescens</i>	Korea	+
	<i>Pseudomonas putida</i>	Korea	?
	Japan	+	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Chile	+	
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Taiwan	?	
<i>Acinetobacter genomosp. 3</i>	Korea	+	
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Japan	+	
<i>Citrobacter freundii</i>	Taiwan	?	
VIM-3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Taiwan	?
VIM-4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Greece	+
		Sweden	?
		Poland	+
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Italy	?
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Italy	?
VIM-5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Turkey	+
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Turkey	+
VIM-6	<i>Pseudomonas putida</i>	Singapore	?
VIM-7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	USA	+
VIM-8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Columbia	?
VIM-9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	United Kingdom	?
VIM-10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	United Kingdom	?
VIM-11a	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Argentina	?
VIM-11b	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Italy	?

1.4.3. Μεταλλο-β-λακταμάσες τύπου VIM

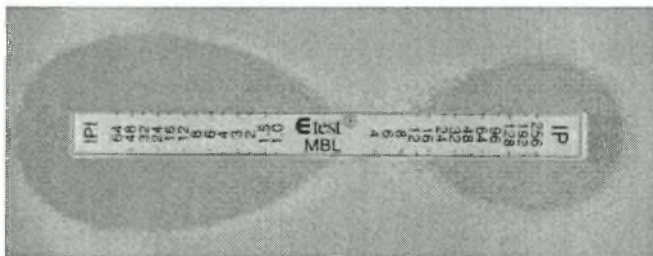
Η δεύτερη κύρια ομάδα των MBLs είναι τα ένζυμα τύπου VIM. Ο τύπος VIM-1 αρχικά ανακαλύφθηκε στην Βερόνα, σε απομόνωση *P. aeruginosa* το 1997. Τα γονίδια τύπου VIM μεταφέρονται ως γονιδιακές κασέτες από ιντεγκρόνια τάξης 1. Οι παραλλαγές του γονιδίου αυτού μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τρεις ομάδες που αντιπροσωπεύονται από τους τύπους VIM-1, VIM-2 και VIM-7 (Εικόνα 9). Η ομάδα του τύπου VIM-1 περιλαμβάνει επίσης τον VIM-4, τον VIM-5 και τον VIM-11A. Έξι παραλλαγές του τύπου VIM θεωρούνται παράγωγα του τύπου VIM-2 και είναι το VIM-3, -6, -8, -9, -10 και -11B. Ο τύπος VIM-7 αποκλίνει φανερά από τους υπόλοιπους τύπους VIM, παρουσιάζοντας μία ομοιότητα 77% με το VIM-1, ενώ τα άλλα ένζυμα διαφέρουν μεταξύ λιγότερο από 11%. Πιο συγκεκριμένα, ο τύπος VIM-2 έχει στενά συνδεδεμένος με τον τύπο VIM-1, καθώς ταυτίζονται σε ποσοστό 90%. Οι β-λακταμάσες τύπου VIM-1 και VIM-2 έχουν ίδια αμινοξική αλληλουχία που περιλαμβάνεται στο ενεργό κέντρο των ενζύμων. Ετερογένεια στην αλληλουχία παρατηρείται κυρίως στις NH₂- και καρβοξυτελικές περιοχές τους. Επίσης, η αμινοξική αλληλουχία του τύπου VIM-3 διαφέρει από εκείνη του VIM-2 σε δύο αμινοξικούς υποκαταστάτες. Ο τύπος VIM-4 διαφέρει από τον VIM-1 λόγω μιας μόνο αμινοξικής αλλαγής (Ser175Arg), η οποία υφίσταται και ανάμεσα στους τύπους VIM-2 και VIM-3. Επιπλέον, ο τύπος VIM-5 διαφέρει από τον VIM-1 εξαιτίας πέντε αμινοξικών αλλαγών. Ο τύπος VIM-6 διαφέρει από τον V-2 λόγω δύο αμινοξικών αλλαγών (γλουταμίνη/αργινίνη στη θέση 59 και ασπαραγίνη/σερίνη στη θέση 165) και από τον VIM-3 σε μόνο ένα αμινοξύ. Τέλος, ο VIM-7 παρουσιάζει 77% ομοιότητα με τον VIM-1 και 74% με τον VIM-2, γι' αυτό αποτελεί Τρίτη υποομάδα των MBLs τύπου VIM.



Εικόνα 9. Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ μεταλλο-β-λακταμασών τύπου VIM.

1.4.4. Διάγνωση των MBLs

Σε αντίθεση με τις σερινο-β-λακταμάσες, οι μεταλλο-β-λακταμάσες αναστέλλονται από χηλικούς παράγοντες όπως το EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) διότι προσδένουν 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 διαβάθμιση συγκέντρωσης ιμιπενέμης ή κεφταζιδίμης από τη μία άκρη και ιμιπενέμης ή κεφταζιδίμης με EDTA από την άλλη. Διαφορά στην ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (**MIC – Minimal Inhibitory Concentration**) ? 8 φορές θεωρείται ενδεικτική της ύπαρξης μεταλλο-β-λακταμάσης. Η συγκεκριμένη δοκιμασία φαίνεται να έχει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα όταν το βακτήριο καλλιεργείται σε Mueller Hinton agar εάν και υπάρχουν αναφορές που προτρέπουν για προσεκτική αξιολόγησή της 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 (MIC ? 4mg/L) αλλά 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 αλλά 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 ερμηνεύεται ως αύξηση στην άλω αναστολής του βακτηρίου.



Εικόνα 10. Δοκιμασία Etest MBL σε στέλεχος *Serratia marcescens* που εκφράζει την IMP-1 μεταλλο-β-λακταμάση. Η MIC της ιμιπενέμης μειώθηκε από 16μg/ml (δεξιά του Etest) σε <1μg/ml μετά την έκθεση σε EDTA (αριστερά του Etest).

1.5. Ιντεγκρόνια¹⁹⁻²⁵

Τα τελευταία χρόνια, η απειλή απόκτησης ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά πολλών παθογόνων βακτηρίων έχει αυξηθεί σημαντικά. Ο αριθμός θνησιμότητας από ενδονοσοκομιακές λοιμώξεις αυξάνεται και στελέχη από τέσσερα πιθανά θανατηφόρα παθογόνα (*Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus*) έχει παρατηρηθεί ότι είναι ανθεκτικά σε όλα τα γνωστά αντιβιοτικά. Τα βακτήρια μπορούν να αποκτήσουν ανθεκτικότητα είτε μέσω μεταλλάξεων ή οριζόντιας μεταφοράς μέσω μετασχηματισμού, μεταγωγής ή σύζευξης. Πιθανότατα, ο πιο κοινός από αυτούς τους τρόπους για μετάδοση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά είναι η σύζευξη. Με αυτό τον τρόπο, πλασμίδια και τρανσποζόνια που μεταφέρουν γονίδια ανθεκτικότητας μπορούν εύκολα να μετακινηθούν από τον ένα κύτταρο στο άλλο. Πρόσφατα έχει ανακαλυφθεί μία άλλη τάξη DNA μεταθετών στοιχείων η οποία μπορεί να μεταφέρει ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά.

Το 1986, η DNA αλληλουχία διαφόρων γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά που ομοίαζαν σχετικά ασύνδετα μεταξύ τους, προανήγγειλαν τα πρώτα στοιχεία που αφορούσαν τα ιντεγκρόνια. Παρατηρήθηκαν κοινές περιοχές ανοδικά και καθοδικά διαφόρων γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Οι περιοχές αυτές εντοπίστηκαν σε διαφορετικά σημεία πολλών πλασμιδίων, υποδηλώνοντας ότι, όπως τα τρανσποζόνια, αυτά τα στοιχεία ήταν μεταθετά. Εντούτοις, τα στοιχεία αυτά διέφεραν από τα τρανσποζόνια σε δύο σημαντικά χαρακτηριστικά:

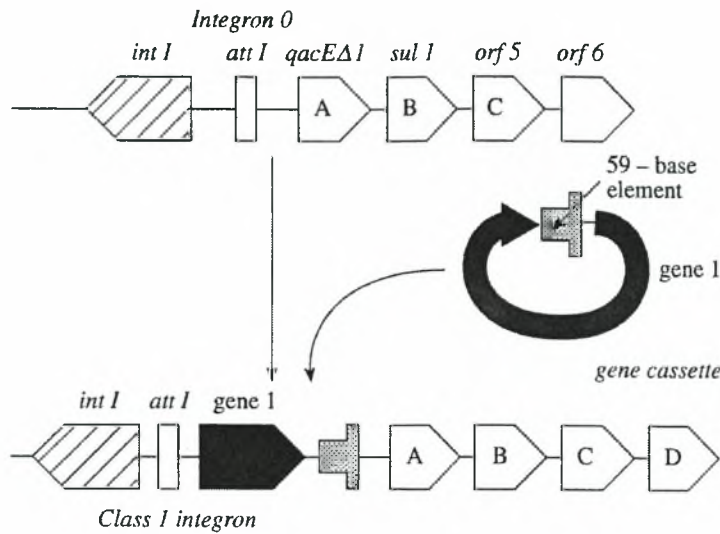
- i. Τα τρανσποζόνια έχουν direct ή indirect επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στα άκρα τους, αλλά οι περιοχές που περικλείουν τα γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά στα νέα αυτά στοιχεία δεν ήταν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, και
- ii. Τα στοιχεία περιείχαν ένα τοποειδικό γονίδιο ιντεγκράσης της ίδιας οικογένειας όπως εκείνων που έχουν βρεθεί σε φάγους, αλλά τους έλειπαν πολλά γονιδιακά προϊόντα που είχαν σχέση με την μετάθεση.

Λόγω αυτών των διαφορών, τα στοιχεία αυτά δεν κατηγοριοποιήθηκαν μαζί με τα τρανσποζόνια αλλά ονομάστηκαν ιντεγκρόνια.

Τα ιντεγκρόνια προσδιορίστηκαν από τους Hall και Collis ως στοιχεία που περιέχουν καθοριστικούς γενετικούς παράγοντες του τοποειδικού ανασυνδυασμού (site-specific recombination), ο οποίος αναγνωρίζει και συλλαμβάνει κινητές γονιδιακές κασέτες. Το ιντεγκρόνιο είναι μία γενετική δομή που περιλαμβάνει τρία διακριτά μέρη:

- ❖ την 5' συντηρημένη περιοχή (5'-CR) μήκους περίπου 1.4kb,
- ❖ την 3' συντηρημένη περιοχή (3'-CR) μήκους περίπου 2kb και
- ❖ την ενδιάμεση μεταβλητή περιοχή

Η 5' συντηρημένη περιοχή φέρει ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μία ιντεγκράση, ένζυμο που καταλύει τον τοποειδικό ανασυνδυασμό γονιδιακών κασετών στη συντηρημένη αλληλουχία *attI*, που βρίσκεται μερικές βάσεις ανοδικά (upstream) των γονιδίων ανθεκτικότητας. Οι γονιδιακές κασέτες είναι μικρά διακριτά γενετικά στοιχεία μήκους 500-1000 βάσεων, που συνήθως αποτελούν τμήμα μεγαλύτερων μορίων DNA όπως τα πλασμίδια και το βακτηριακό χρωμόσωμα. Όταν μετακινούνται από τον ένα γενετικό τόπο στον άλλο, μπορεί να υπάρξουν ως ελεύθερα, κυκλικά μόρια DNA χωρίς ωστόσο την ικανότητα αντιγραφής. Οι γονιδιακές κασέτες φυσιολογικά περιλαμβάνουν ένα μόνο γονίδιο, χωρίς τη παρουσία υποκινητή, καθώς και μία μικρή ακολουθία που ονομάζεται γενετικό στοιχείο 59 βάσεων ή *attC* περιοχή (59-base element ή 59-be) που εξυπηρετεί στον τοποειδικό γενετικό ανασυνδυασμό. Η διαδοχική τους εισροή μέσα στην ιντεγκρονική δομή συνιστά και τη μεταβλητή περιοχή αυτής. Η ιντεγκράση εκτός από την ενσωμάτωση της γονιδιακής κασέτας καταλύει και την εκτομή της, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα στις κασέτες των γονιδίων να μεταπηδούν από το ένα γενετικό τόπο στον άλλο. Τα cis-στοιχεία που αναγνωρίζει για τη δράση της είναι το *attI* στοιχείο του ιντεγκρονίου και το 59-be της γονιδιακής κασέτας. Στη 3'-CR βρίσκονται δύο γονίδια: το ελλειπές γονίδιο *qacE* (*qacEΔ1*), που προσδίδει αντοχή στα αντισηπτικά, συντηγμένο με το γονίδιο *sul1* που προσδίδει αντοχή στις σουλφοναμίδες.



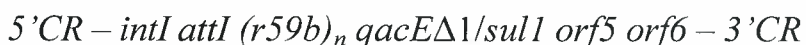
Εικόνα 11. Δομή του ιντεγκρονίου τάξης 1 και σχηματική αναπαράσταση της ενσωμάτωσης γονιδιακών κασετών σε ιντεγκρονικές δομές. Διακρίνονται η 5'-CR (*intI*) και η 3'-CR (*qacEΔ1/sulI*) περιοχή καθώς και τα απαραίτητα cis-στοιχεία για τον ανασυνδυασμό (*attI* και 59-base element).

Τα ιντεγκρόνια μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κύριες ομάδες. Τα ιντεγκρόνια ανθεκτικότητας (RI) και τα super-ιντεγκρόνια (SI). Τα RI περιέχουν κυρίως γονιδιακές κασέτες που κωδικοποιούν ανθεκτικότητα έναντι αντιβιοτικών και απολυμαντικών. Τα ιντεγκρόνια αυτά μπορούν να ενσωματωθούν είτε στο βακτηριακό χρωμόσωμα είτε σε πλασμίδια και τρανσποζόνια. Τα μεγάλα ιντεγκρόνια που ενσωματώνονται στο βακτηριακό χρωμόσωμα και περιέχουν γονιδιακές κασέτες ποικίλων λειτουργιών, ανήκουν στην ομάδα των SI. Στα SI πιθανόν να υπάρχουν περισσότερες από 100 γονιδιακές κασέτες, σε αντίθεση με τα RI στα οποία υπάρχουν λιγότερες από 10. Η αλληλουχία των περιοχών *attC* από γονιδιακές κασέτες των RI και SI υποδεικνύουν ότι οι γονιδιακές κασέτες των RI προέρχονται από τα SI.

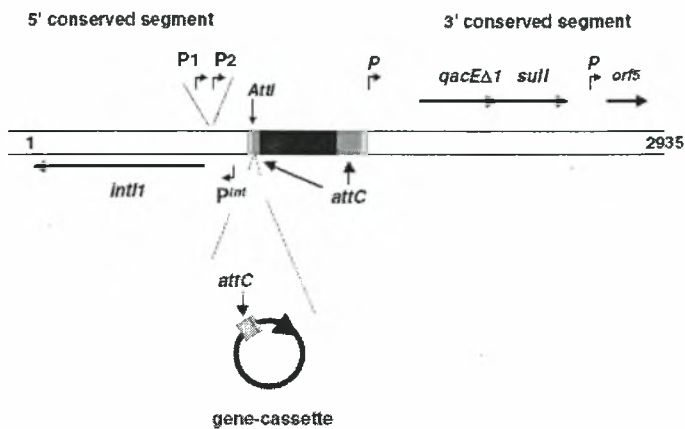
Έχουν αναφερθεί τρία διακριτά είδη ιντεγκρονίων RI, καθένα από τα οποία έχει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά ιντεγκρονίων όπως το γονίδιο της ιντεγκράσης, το γονίδιο-θέση υποδοχής των γονιδιακών κασετών και τον υποκινητή για την έκφραση των γονιδιακών κασετών. Τα ιντεγκρόνια τάξης 1 αποτελούν την πλειοψηφία των ιντεγκρονίων που ανευρίσκονται σε κλινικά στελέχη και το πρώτο ιντεγκρόνιο που ανακαλύφθηκε ανήκει σε αυτή τη κατηγορία. Αποτελούν τα περισσότερο μελετημένα ιντεγκρόνια. Έχουν βρεθεί σε πολλά Gram αρνητικά γένη συμπεριλαμβανομένων των *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*

και *Vibrio*. Έχουν επίσης βρεθεί και σε άλλα βακτήρια όπως *Corynebacterium glutamicum* και *Mycobacterium fortuitum*, και μια γονιδιακή κασέτα έχει ανακαλυφθεί σε *Enterococcus faecalis*. Το ιντεγκρόνιο τάξης 2 χαρακτηρίστηκε στο τρανσποζόνιο Tn7 και περιλαμβάνει τρεις γονιδιακές κασέτες δίπλα σε ένα ελλατωματικό γονίδιο ιντεγκράσης, ενώ δεν έχει 3'-CR. Ιντεγκρόνια τάξης 2 έχουν βρεθεί σε *Acinetobacter*, *Shigella* και *Salmonella*. Τα τάξης 3 ιντεγκρόνια έχουν απομονωθεί κλινικά σε *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Pseudomonas putida* και *Klebsiella pneumoniae* στην Ιαπωνία. Η δομή των ιντεγκρονίων αυτών είναι παρόμοια με αυτή των τάξης 2 ιντεγκρονίων, και ανευρίσκονται πιο σπάνια.

Η βασική δομή του ιντεγκρονίου (In0) που ανήκει στη τάξη 1, περιλαμβάνει τις περιοχές 5'-CR και 3'-CR χωρίς τη μεταβλητή περιοχή. Το In0 δεν έχει ενσωματωμένη γονιδιακή κασέτα. Στη 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. Στη 3' περιοχή βρίσκονται τα συντηγμένα γονίδια *qacEΔ1/sulI* καθώς και δύο αναγνωστικά πλαίσια *orf5* και *orf6* που κωδικοποιούν πρωτεΐνες αγνώστου λειτουργίας. Επομένως, ένα ιντεγκρόνιο τάξης 1 έχει την εξής δομή:



όπου *r59b* είναι η γονιδιακή κασέτα 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 ανθεκτικότητας που προσδίδει στο βακτήριο που το αποκτά και επομένως είναι αποκλειστικά θέμα φυσικής επιλογής.



Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση των ιντεγκρονίων τάξης 1. P1: εκκινητής για μεταγραφή γονιδιακών κασετών, P2: δεύτερος εκκινητής που συνήθως είναι ανενεργός, int: γονίδιο ιντεγκράσης, attI: περιοχή ενσωμάτωσης, qacE: μερικώς διεγραμμένο γονίδιο που κωδικοποιεί ανθεκτικότητα σε quaternary ammonium compound, sull: ανθεκτικότητα σε σουλφοναμίδες, orf5: άγνωστη λειτουργία, P: εκκινητής των γονιδίων qacEΔ και sull, attc: αλληλουχία της γονιδιακής κασέτας που αναγνωρίζεται από την ιντεγκράση.

Τα γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά που συλλαμβάνουν τα ιντεγκρόνια εντοπίζονται στις γονιδιακές κασέτες. Οι κασέτες αποτελούνται από ένα γονίδιο χωρίς εκκινητή και μία θέση ανασυνδυασμού (*attC*). Οι κασέτες μπορούν να υπάρχουν και σε ελεύθερη, κυκλική μορφή DNA αλλά σε αυτή την μορφή δεν μπορούν ούτε να αντιγραφούν ούτε να μεταγραφούν. Ένας ανασυνδυασμός συμβαίνει ανάμεσα στα σημεία ανασυνδυασμού *attI* και *attC*, εισάγοντας έτσι την κασέτα μέσα στο ιντεγκρόνιο. Έτσι, το γονίδιο της κασέτας περικλείεται από το σημείο *attI* στο 5' άκρο και από το σημείο *attC* στο 3' άκρο.

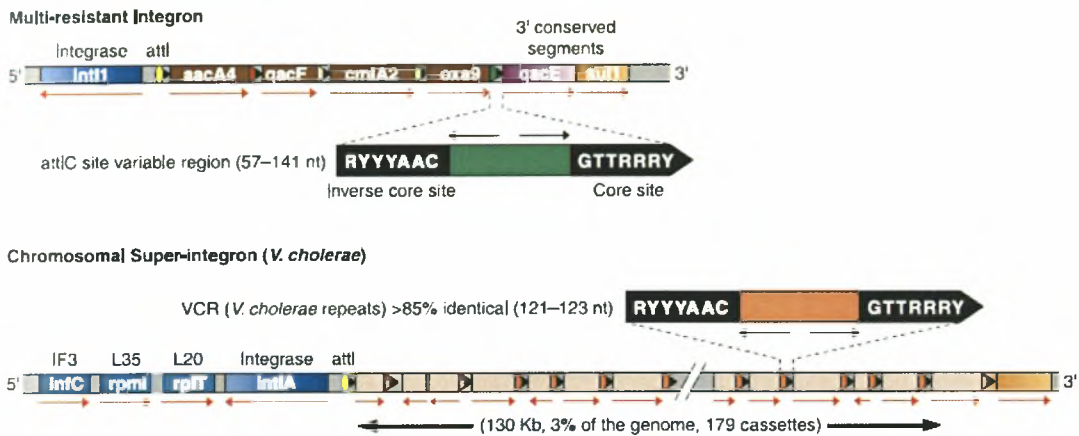
Επιπρόσθετες γονιδιακές κασέτες μπορούν να εισαχθούν στις *attI* και *attC* περιοχές, καταλήγοντας έτσι στην εισαγωγή πολλών διαφορετικών γονιδίων στη μεταβλητή περιοχή. Ο εκκινητής, *Pant*, επιτρέπει την έκφραση αυτών των γονιδίων και το γονίδιο που βρίσκεται πιο κοντά στον εκκινητή να έχει το μεγαλύτερο επίπεδο έκφρασης. Οι κασέτες μπορούν να αναδιαταχθούν (με εκτομή και επανεισαγωγή) έτσι ώστε η κασέτα που περιέχει το γονίδιο που κωδικοποιεί την ανθεκτικότητα για το αντιβιοτικό, που βρίσκεται στο περιβάλλον, να είναι πιο κοντά στον εκκινητή. Με αυτό τον τρόπο, το γονίδιο ανθεκτικότητας που είναι απαραίτητο για την επιβίωση θα εκφράζεται στο μέγιστο βαθμό.

1.5.1. Γονιδιακές κασέτες, ανασυνδυασμός και έκφραση

Οι γονιδιακές κασέτες είναι μικρά, μεταθετά στοιχεία χωρίς εκκινητή, που γενικά περιλαμβάνουν μόνο ένα γονίδιο και μία καθοδική θέση ανασυνδυασμού, που είναι γνωστή ως το στοιχείο 59 βάσεων (*59-base element, 59-be*) ή *attC*, το οποίο επιτρέπει αναγνώριση και κινητοποίηση των κασετών. Οι γονιδιακές κασέτες, όπως προαναφέραμε, βρίσκονται συνήθως συνδεδεμένες με ιντεγκρόνια. Επιπλέον, όλες αυτές οι γονιδιακές κασέτες μοιράζονται πολλά συγκεκριμένα δομικά χαρακτηριστικά, όπως ότι τα σύνορα-όρια κάθε κασέτας οριοθετούνται από δύο GTTRRRY (πυρήνας) αλληλουχίες με τον ίδιο προσανατολισμό, οι οποίες αποτελούν στόχοι της διαδικασίας του ανασυνδυασμού. Επίσης, οι ενσωματωμένες κασέτες γενικά περιέχουν ένα μόνο γονίδιο και μια ατελώς ανεστραμμένη επανάληψη που βρίσκεται στο 3' άκρο του γονιδίου και ονομάζεται περιοχή *attC*.

Τα ιντεγκρόνια κωδικοποιούν μία ρεκομπινάση (IntI ιντεγκράση) και περιέχουν μία συγκεκριμένη θέση (*attI*), που βρίσκεται δίπλα από το γονίδιο *intI*, και οι κασέτες εισέρχονται μέσα σε αυτή. Η IntI ιντεγκράση ανήκει στην καταλυτική οικογένεια των ρεκομπινασών τυροσίνης (Y). Η IntI ιντεγκράση έχει τα τρία χαρακτηριστικά αμινοξέα της οικογένειας αυτών των πρωτεϊνών, και μεταλλάξεις αυτών επιφέρουν μείωση της καταλυτικής δραστηριότητάς της. Η πιο απλή διαδρομή που οδηγεί σε ενσωμάτωση των γονιδιακών κασετών μέσα στα ιντεγκρόνια συμπεριλαμβάνει την μεσολάβηση της IntI με τοποειδικό ανασυνδυασμό ανάμεσα στη *attI* περιοχή και στο *59-be* ή *attC* της κυκλικής κασέτας.

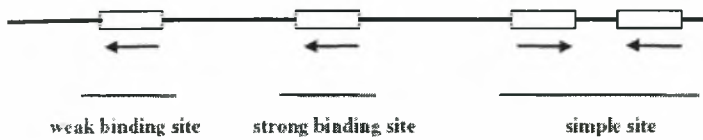
Η αρχιτεκτονική της *attI* διαφέρει από αυτή του *59-be*. Τα στοιχεία *59-be* εμφανίζουν διάφορα μήκη και αλληλουχίες στην περιοχή *attC*, καθώς η περιοχή αυτή διαφέρει σε μήκος από 57-141 βάσεις και οι ομοιότητες στην νουκλεοτιδική τους αλληλουχία περιορίζονται κυρίως στην αντίστροφη θέση πυρήνα (ICS) (inverse core site), RYYYAAC (LH) και στην θέση πυρήνα (CS) (core site) G \downarrow TTRRRY (RH) (το βέλος δηλώνει το σημείο ανασυνδυασμού) (Εικόνα 13).



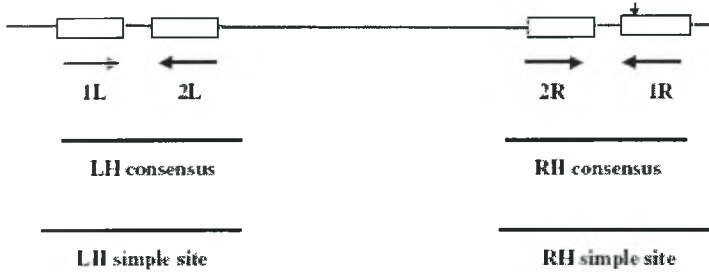
Εικόνα 13. Δομική σύγκριση ενός κλασσικού multi-resistant ιντεγκρονίου και ενός super-ιντεγκρονίου.

Όμως, οι περιοχές *attI* και *59-be* μοιράζονται ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά. Περιλαμβάνουν περίπου 25bp στο κάθε άκρο, που προσαρμόζονται σε ομόλογες αλληλουχίες που είναι ατελείς ανεστραμμένες επαναλήψεις η μία της άλλης. Η οργάνωση κάθε ομόλογης περιοχής είναι όμοια με εκείνης από μία απλή θέση που χρησιμοποιείται από άλλες ιντεγκράσες και εμπεριέχει ένα ζεύγος από αντίστροφα προσανατολισμένες περιοχές πρόσδεσης για ιντεγκράσες, που χωρίζονται από ένα διάστημα 7 ή 8 bp. Σε αντίθεση με αυτό, οι θέσεις *attI* από διαφορετικές τάξεις ιντεγκρονίων δεν μοιράζονται αυτά τα χαρακτηριστικά, αλλά ούτε έχουν αξιόλογη ομοιότητα στις αλληλουχίες τους.

Πιο συγκεκριμένα, η περιοχή *aatI1* αποτελείται από μια απλή περιοχή (simple site) με δύο ανεστραμμένες αλληλουχίες, όπου προσδένεται η ιντεγκράση, και δύο επιπρόσθετες περιοχές δέσμευσης της ιντεγκράσης που ονομάζονται δυνατή (strong) και αδύναμη (weak) (αναφέρονται επίσης και ως DR1 και DR2 αντίστοιχα). Η περιοχή *attC* αποτελείται από τέσσερις βασικές περιοχές που ονομάζονται 1R, 2R, 1L και 2L. Οι περιοχές 1R και 2R αποτελούν μέρη της RH (right-hand) ομόλογης αλληλουχίας, η οποία είναι λίγο πολύ ισοδύναμη με την απλή περιοχή LH. Οι περιοχές 1L και 2L αποτελούν μέρος την ομόλογης αλληλουχίας LH (left-hand), η οποία είναι λίγο πολύ ισοδύναμη με την απλή περιοχή LH.



Εικόνα 14. Σχηματική αναπαράσταση της aatI περιοχής.



Εικόνα 15. Σχηματική αναπαράσταση της aatC περιοχής. Το βέλος παρουσιάζει το σημείο ανασυνδυασμού

Οι γονιδιακές κασέτες, που έχουν ενσωματωθεί σε ιντεγκρόνιο, εκφράζονται από μια κοινή περιοχή εκκίνησης που βρίσκεται στην περιοχή 5'CS του ιντεγκρονίου. Η περιοχή εκκίνησης περιέχει δύο δυνητικούς εκκινητές, τον P1 (αναφέρεται και ως Pant) και τον P2. Έχουν περιγραφεί πέντε διαφορετικοί P1 εκκινητές και δύο διαφορετικοί P2, οι οποίοι ποικίλλουν σε δύναμη. Ο εκκινητής P2 είναι συχνά ανενεργός διότι υπάρχουν μόνο 14 νουκλεοτίδια ανάμεσα στις περιοχές -35 και -10 του εκκινητή, έναντι του ευνοϊκότερου αριθμού των 17 νουκλεοτιδίων. Επιπλέον, η θέση της γονιδιακής κασέτας στο ιντεγκρόνιο καθορίζει το επίπεδο της παρατηρούμενης ανθεκτικότητας. Το υψηλότερο επίπεδο ανθεκτικότητας μιας γονιδιακής κασέτας παρατηρήθηκε όταν η γονιδιακή κασέτα τοποθετήθηκε αμέσως μετά την περιοχή 5'CS.

Πίνακας 7. Πρόσφατες γονιδιακές κασέτες και οι αντίστοιχες κωδικοποιούσες πρωτεΐνες

Γονιδιακή κασέτα	Κωδικοποιούσα πρωτεΐνη
Ανθεκτικότητα σε β-λακτάμη	
<i>bla</i> _{CEF-1}	Ευρέως φάσματος β-λακταμάση
<i>bla</i> _{IMP-2}	Καρβαπενεμάση
<i>bla</i> _{IMP-3}	Καρβαπενεμάση
<i>bla</i> _{IMP-4}	Καρβαπενεμάση
<i>bla</i> _{VIM-1}	Καρβαπενεμάση
<i>bla</i> _{VIM-2}	Καρβαπενεμάση
<i>bla</i> _{VIM-3}	Καρβαπενεμάση

<i>oxa-10/aadA1</i>	Ευρέως φάσματος β-λακταμάση/ Αδενυλτρασφεράση
<i>oxa-11</i>	Ευρέως φάσματος β-λακταμάση
<i>oxa-13</i>	Ευρέως φάσματος β-λακταμάση
<i>oxa-15</i>	Ευρέως φάσματος β-λακταμάση
Ανθεκτικότητα σε αμινογλυκοσίδες	
<i>aadA4</i>	Αδενυλτρασφεράση
<i>aadA5</i>	Αδενυλτρασφεράση
<i>aadA6</i>	Αδενυλτρασφεράση
<i>aac29a</i>	Ακετυλτρασφεράση
<i>aac29b</i>	Ακετυλτρασφεράση
<i>aacA1b/orfG</i>	Ακετυλτρασφεράση
Ανθεκτικότητα σε τριμεθοπρίμη	
<i>df13</i>	Διυδροφολική ρεδοκτάση
<i>df17</i>	Διυδροφολική ρεδοκτάση
Ανθεκτικότητα σε κινολόνες	
<i>qnr</i>	άγνωστη
Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης	
<i>orfX</i>	άγνωστη

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός αυτής της εργασίας ήταν να καθοριστούν οι υποκείμενοι μηχανισμοί που προκαλούν ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες, καθώς μια απομόνωση *P. aeruginosa* από Έλληνα ασθενή εμφάνισε υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στις καρβαπενέμες και παρήγαγε μεταλλο-β-λακταμάση. Επίσης, η διερεύνηση μιας μετάδοσης εξωνοσοκομειακής μόλυνσης από *P. mirabilis* ανθεκτικό στην ιμιπενέμη, ο οποίος ήταν φαινοτυπικά MBL θετικός, και τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας αυτού. Επιπλέον, η ανάλυση της δομής ενός ιντεγκρονίου, που περιέχει γονίδιο MBL, από μια κλινική απομόνωση *M. Morgannii* ενός Έλληνα ασθενή, η οποία ήταν ανθεκτική στις καρβαπενέμες και φαινοτυπικά MBL θετική. Τέλος, η ταυτοποίηση του γονιδίου *blaVIM12* από μια κλινική απομόνωση *E. coli* που ήταν φαινοτυπικά MBL θετική.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ²⁶⁻²⁹

3.1. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1.1. Βακτηριακά στελέχη

Η μελέτη περιελάμβανε 5 κλινικά στελέχη που ανήκαν σε διαφορετικό μικροβιακό είδος. Συγκεκριμένα συμπεριληφθήκαν 1 στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa*, 1 στέλεχος *Enterobacter cloacae*, 1 στέλεχος *Escherichia coli*, 1 στέλεχος *Morganella morganii* και 1 στέλεχος *Proteus mirabilis*. Κριτήριο επιλογής αυτών των στελεχών ήταν ο θετικός φαινότυπος που επέδειξαν για παραγωγή μεταλλο-β-λακταμάσης με το τυπικό για την κλινικοεργαστηριακή ρουτίνα φαινοτυπικό τεστ Etest MBL (AB Biodisk, Solna, Sweden). Η αξιολόγηση του συγκεκριμένου τεστ έγινε βάση διεθνώς εφαρμοζόμενων κριτηρίων (CLSI 2006). Τα στελέχη απομονώθηκαν από ασθενείς που νοσηλεύτηκαν στο Περιφερειακό Γενικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας και στο Νοσοκομείο Σερρών κατά τη χρονική περίοδο Ιούλιος 2005 – Ιούλιος 2006. Τα επιδημιολογικά και δημογραφικά στοιχεία των στελεχών φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Στέλεχος	Ημερομηνία απομόνωσης (μήνας/έτος)	Νοσοκομείο/Κλινική	Δείγμα
<i>M. morganii</i> A209	05-09/05	Καρδιαγγειακή Χειρουργική	
<i>P. aeruginosa</i> 140	08/05	Γυναικολογική/ Λάρισα	Δείγμα από χειρουργικό τραύμα
<i>E. coli</i> 28	02/06	Ιπποκράτειο/ Θεσσαλονίκη	Δείγμα από αναπνευστικό σύστημα
<i>P. mirabilis</i> 1205	12/05	ΕΙ/ Σέρρες	Ούρα

3.1.2. Έλεγχος της ευαισθησίας σε αντιβιοτικά

Ο έλεγχος της ευαισθησίας των στελεχών σε εύρος αντιβιοτικών έγινε με τη γνωστή μέθοδο Kirby-Bauer (Παράρτημα, σελ. 53 και 54). Ο έλεγχος έγινε για β-λακταμικά, αμινογλυκοσίδες και κινολόνες. Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) για την ιμιπενέμη, μεροπενέμη, αζτρεονάμη, κτλ (παρουσιάζονται στα

Απομόνωση και χαρτογράφηση ιντεγκρονίων που φέρουν μέταλλο-β-λακταμάσες σε νοσοκομειακά στελέχη Gram-αρνητικών βακτηριδίων

αποτελέσματα κάθε στελέχους) προσδιορίστηκε με το Etest (AB Biodisk). Ο έλεγχος για την παρουσία MBL έγινε με ιμιπενέμη-EDTA DDST (Double Disk Synergy Test) (Παράρτημα, σελ. 58) και Etest MBL (Βλ. Διάγνωση MBLs). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο στέλεχος *P. aeruginosa* ATCC 27853.

3.1.3. Απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα βακτηριδίων

Η απομόνωση γενωμικού DNA έγινε από 1ml O/N (overnight) καλλιέργεια κυττάρων στους 37°C, χρησιμοποιώντας το Qiagen-QIAamp DNA Mini Kit, σύμφωνα με το πρωτόκολλο απομόνωσης βακτηριακού DNA (Παράρτημα, σελ. 59).

3.1.4. PCR για γονίδια που κωδικοποιούν για γνωστές μεταλλο-β-λακταμάσες

Όλα τα στελέχη ελέγχθηκαν για γονίδια που κωδικοποιούν γνωστές μεταλλο-β-λακταμάσες και ιδιαίτερα για τα γονίδια *bla_{VIM}* και *bla_{IMP}* με PCR (Παράρτημα, σελ. 60). Οι εκκινητές και οι συνθήκες της αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στο Πίνακα 8. Η χαρτογράφηση των ιντεγκρονικών δομών έγινε με εκκινητές που υβριδίζονται στις συντηρημένες αλληλουχίες 5'CS και 3'CS και τους αντίστοιχους forward και reverse εκκινητές των *bla_{VIM}* και *bla_{IMP}* γονιδίων. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές γονιδιακών κασετών σε διάφορους συνδυασμούς με τις συντηρημένες αλληλουχίες 5'CS και 3'CS, και εκκινητές των *bla_{VIM}* και *bla_{IMP}*.

Πίνακας 8. Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων PCR που χρησιμοποιήθηκαν.

MIX Invitrogen Platimun	Ποσότητα (μL)	PCR Συνθήκες
H ₂ O	36,1	94°C 3min 94°C 1min 53°C 1min 72°C 4min } 35 cycles 72°C 10min
10XPCR Buffer	5	
MgCl ₂ 50mM	1.5	
dNTPs 10mM each	1,25	
Εκκινητής 1 (forward) 100pmol/μL	0,2	
Εκκινητής 2 (reverse) 100pmol/μL	0,2	
Taq DNA Polymerase 5U/μL	0,5	

Πίνακας 9. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και η αλληλουχία τους.

Εκκινητές	Αλληλουχία (5'-3')
5CS	AAA GCA GAC TTG ACC
3CS	GGC ATC CAA GCA GCA
VIMBN	ATG GTC TTT GGT CGC ATA TC
VIMFN	TGG GCC ATT CAG CCA GAT C
INT-5CS-f	CTT CTA GAA AAC CGA CGA TGC
INT-3CS	TCC TCT AGA TTT TAA TGC GGA TG
AACA7F	ACT AGG GTT TGC CGA GCT TT
AACA7R	TGC GCT GTT GGT AAG TTG AG
DHFRIF	ATG GAG TGC CAA AGG TGA AC
AADAIF	TGA TTT GCT GGT TAC GGT GA
AADAIR	AGT TCG CGC TTA GCT GGA TA
SULF	AGG CTG GTG GTT ATG CAC TC
SULR	CCG ACT TCA GCT TTT GAA GG
IMP1A	CTA CCG CAG CAG AGT CTT TGC
IMP1B	GAA CAA CCA GTT TTG CCT TAC C
VIM1A	TCT ACA TGA CCG CGT CTG TC
VIM1B	TGT GCT TTG ACA ACG TTC GC

3.1.5. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πηκτική αγαρόζης

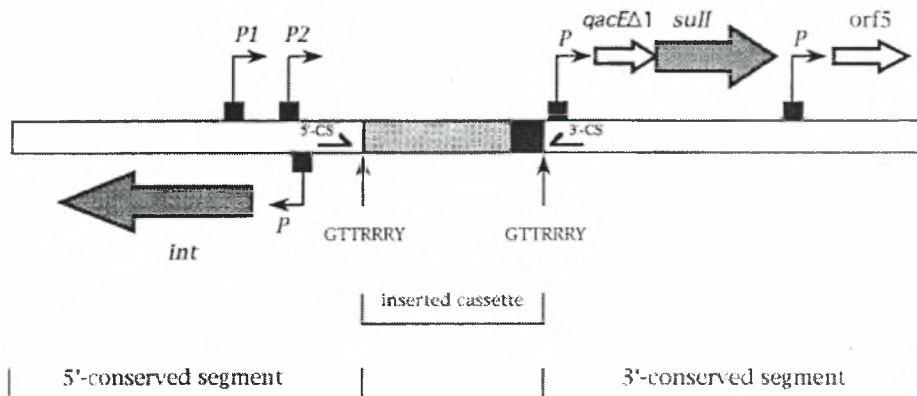
10μL από το προϊόν της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική αγαρόζης 1,8% χρησιμοποιώντας ως ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X. Επίσης, προστέθηκε διάλυμα βρωμιούχο αιθιδίου (15μL EtBr (10mg/ml) σε 150ml αγαρόζη). Το EtBr προστίθεται έτσι ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση των τμημάτων DNA στην πηκτική αγαρόζης και αυτό οφείλεται στην ιδιότητά του να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φωσφορίζει κάτω από την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 150-155V. Η συγκέντρωση της αγαρόζης για την προετοιμασία της πηκτής εξαρτάται από το μέγεθος της αλληλουχίας που πρόκειται να ενισχυθεί. Η πηκτική αγαρόζης τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X έτσι ώστε να καλύπτεται από αυτό. Στην συνέχεια, μεταφέρονται 10μL από το προϊόν της PCR, που έχουν προηγουμένως αναμιχθεί με 2μL χρωστική 6x (6x Loading Dye Solution, Fermentas), σε μία από τις θέσεις υποδοχής της πηκτής. Η χρωστική που χρησιμοποιείται βοηθάει το DNA να καθίσει στην βάση της υποδοχής και επίσης μας επιτρέπει να παρακολουθούμε την ηλεκτροφόρηση. Παράλληλα με το δείγμα ηλεκτροφορείται και ένας μάρτυρας μοριακού βάρους (GeneRuler 100bp DNA Ladder, 0.1μg/μl, Fermentas) ώστε να διευκολύνεται ο υπολογισμός του μεγέθους των τμημάτων DNA.

3.1.6. Καθαρισμός και αποστολή των PCR προϊόντων για νουκλεοτιδική αλληλούχηση

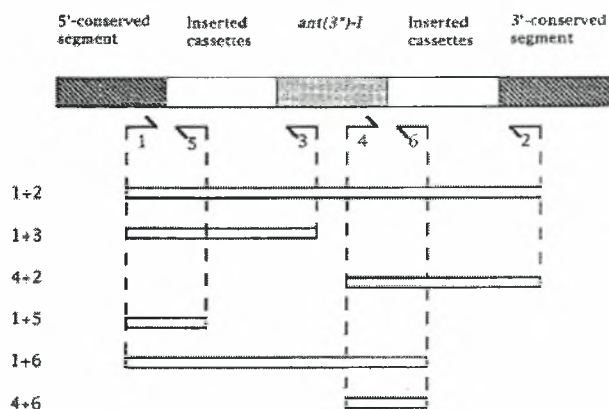
Όλα τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν με το εμπορικό kit ChargeSwitch® PCR Clean-Up Kit (Invitrogen) (Παράρτημα, σελ. 62) και αποστάλθηκαν σε εξειδικευμένο κέντρο παροχής υπηρεσιών νουκλεοτιδικής αλληλουχοποίησης (LARK Technologies, Essex, UK). Στην περίπτωση εμφάνισης μη ειδικών προϊόντων στη γέλη αγαρόζης, βρίσκουμε και κόβουμε την μάντα που επιθυμούμε, και πραγματοποιούμε εξαγωγή της μάντας με PureLink™ Quick Gel Extraction Kit της Invitrogen (Παράρτημα, σελ. 61).

3.1.7. Χαρτογράφηση ιντεγκρονίων³⁰

Βάσει της γενικής δομής των ιντεγκρονίων (Εικόνα 16), συλλέγουμε τα αποτελέσματα της νουκλεοτιδικής αλληλούχησης και μέσω του προγράμματος BLAST ταυτοποιούμε τα PCR προϊόντα που πήραμε. Ακολούθως, προσδιορίζουμε την διάταξη του ιντεγκρονίου και την σειρά των γονιδιακών κασετών, συνδυάζοντας τα επικαλυπτόμενα τμήματα των PCR προϊόντων (Εικόνα 17).



Εικόνα 16. Γενική δομή των ιντεγκρονίων. Τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση της μεταγραφής. Η αλληλουχία GTTRRRY αποτελεί το σημείο ενσωμάτωσης των γονιδιακών κασετών με ανασυνδυασμό. Παρουσιάζεται μια ενσωματωμένη γονιδιακή κασέτα με το 59-be στοιχείο της σε μαύρο ράβδο.



Εικόνα 17. Γενικό σχήμα χαρτογράφησης ιντεγκρονίων. Για να προσδιορίσουμε την διάταξη του ιντεγκρονίου χρησιμοποιήσαμε διαφορετικούς εκκινητές γονιδιακών κασετών σε συνδυασμό με εκκινητές συντηρημένων περιοχών (5'CS και 3'CS). Εκκινητής 1: 5'CS, Εκκινητής 2: 3'CS, Εκκινητής 3,4,5,6: Εκκινητές forward και reverse διαφορετικών γονιδιακών κασετών.

3.1.8. Φορεία των γενετικών δομών

Εξαγωγή του πλασμιδιακού DNA έγινε με το εμπορικό kit ChargeSwitch® Plasmid ER Mini Kit (Invitrogen Corp, Carlsbad, California) (Παράρτημα, σελ. 64). Η ηλεκτροφόρησή του έγινε σε 0,7% γέλη αγαρόζης και πραγματοποιήθηκε στα 110V για 3h (Πίνακας 10). Οι χρωμοσωμικές και οι πλασμιδιακές ζώνες αποκοπήκαν και καθαρίστηκαν από τη γέλη αγαρόζης με το εμπορικό kit PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) (Παράρτημα, σελ. 61). Το εκλουσμένο χρωμοσωμικό και πλασμιδιακό DNA χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις PCR με τους παραπάνω εκκινητές για το προσδιορισμό του γενετικού εντοπισμού των γονιδίων *bla_{VIM}* και *bla_{IMP}*. Το πλασμιδιακό DNA χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις PCR με εκκινητές ειδικούς για το γονίδιο 16SrDNA ώστε να αποκλειστεί η ενδεχόμενη επιμόλυνση από τμήματα χρωμοσωμικού DNA.

Πίνακας 10. Ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού DNA.

Ηλεκτροφορήθηκαν	Ποσότητες σε μ L
Πλασμιδιακό DNA	25
Loading Dye	4
Ladder λ /Hind III	4

3.1.9. Μελέτη της μεταφοράς των γονιδίων

Η μελέτη της μεταβιβασιμότητας των γονιδίων, που ανευρέθηκαν να κωδικοποιούν για μέταλλο-β-λακταμάσες, έγινε με τη cross-streak μέθοδο (Παράρτημα, σελ. 65).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ²⁶⁻²⁹

4.1. *P. aeruginosa* 140

Το στέλεχος ήταν ανθεκτικό σε όλα τα εξεταζόμενα αντιβιοτικά εκτός της αζτρεονάμης. Η MIC στην ιμιπενέμη και τη μεροπενέμη ήταν >32mg/L και στην αζτρεονάμη 8mg/L.

Η PCR ήταν θετική για το γονίδιο *bla*_{VIM} ενώ οι εκκινητές που είναι ειδικοί για τις 5'CS και 3'CS συντηρημένες περιοχές έδωσαν δύο ξεχωριστά προϊόντα μεγέθους περίπου 2 και 1.5 kb αντίστοιχα. Η χαρτογράφηση των προϊόντων αυτών με τους συνδυασμούς 5'CS—VIMF/N και VIMB/N—3'CS έδωσε θετικό σήμα μόνο στο προϊόν των 2kb (περίπου 800 bp και 1.8 kb αντίστοιχα). Αλληλουχοποίηση όλων των παραπάνω προϊόντων έδειξε την ύπαρξη δύο ιντεγκρονίων στο στέλεχος *P. aeruginosa* 140. Το ένα ιντεγκρόνιο, που έφερε το *bla*_{VIM} γονίδιο, περιελάμβανε το αλληλίο *bla*_{VIM-4} καθοδικά (downstream) του *attI1* σημείου ανασυνδυασμού, και αμέσως μετά το γονίδιο *bla*_{P1b} που κωδικοποιεί για την PSE-1/CARB-2 β-λακταμάση. Η γονιδιακή κασέτα του *bla*_{VIM-4} και το στοιχείο των 59 βάσεων ήταν πανομοιότυπα με αλληλουχίες που έχουν ανευρεθεί σε στελέχη *Klebsiella pneumoniae* από την Τυνησία (GenBank accession number AM181293 [GenBank]) και *P. aeruginosa* από τη Πολωνία (GenBank accession number AM087411 [GenBank]). Η γονιδιακή κασέτα του *bla*_{P1b} γονιδίου ήταν πανομοιότυπη με άλλες που έχουν ανευρεθεί σε στελέχη *Acinetobacter baumannii* από τη Κίνα (GenBank accession number DQ857723 [GenBank]) και *P. aeruginosa* από τη Πορτογαλία (GenBank accession number AY560837 [GenBank]). Το δεύτερο ιντεγκρόνιο περιλάμβανε διαδοχικά τα γονίδια *aac(6')-Ib* και *bla*_{OXA-35} που κωδικοποιούν για την AACA7 ακετυλοτρανσφεράση και για την περιορισμένου φάσματος οξακιλλινάση OXA-35. Το ιντεγκρόνιο αυτό είχε προηγουμένως αναφερθεί σε στέλεχος *P. aeruginosa* από τη Γαλλία (GenBank accession number AF315786 [GenBank]).

Η πλασμιδιακή ανάλυση δεν έδειξε πλασμίδια, γεγονός που υπαινίσσεται τη χρωμοσωμική φορεία του παραπάνω ιντεγκρονίου. Τα πειράματα της βακτηριακής σύζευξης δεν έδωσαν αποσυσζεύκτες.

4.2. *Escherichia coli* 28

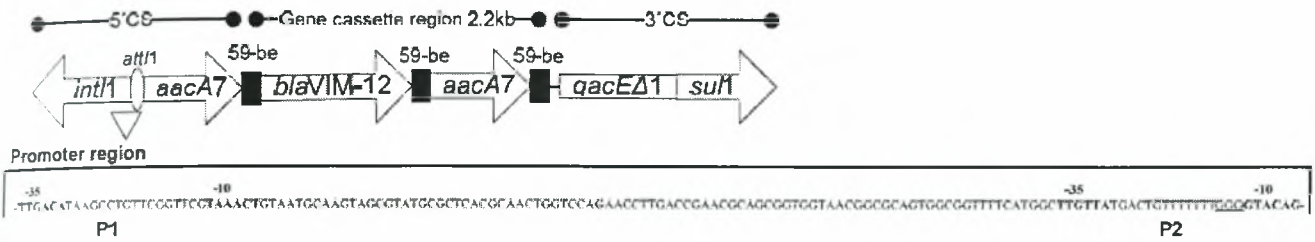
Το *E. coli* 28 ήταν ευαίσθητο στην ιμιπενέμη, τη μεροπενέμη, την αζτρεονάμη, τη σιπροφλοξασίνη και τη κοτριμοξαζόλη αλλά ανθεκτικό σε όλα τα υπόλοιπα αντιβιοτικά (Πίνακας 11). Η MIC της ιμιπενέμης, της μεροπένεμης και της αζτρεονάμης ήταν 1, 0.25 και 0.5 mg/L αντίστοιχα. Η παρουσία της MBL παρατηρήθηκε από το θετικό DDST (ιμιπενέμη-EDTA Double Disk Synergy Test) (Παράρτημα) και Etest MBL (AB Biodisk).

Πίνακας 11. Ευαισθησία του στελέχους *E. coli* 28 και του αντίστοιχου transconjugant σε αντιβιοτικά..

Antibiotic(s) ^a	MIC (μg/ml) of antibiotic(s) for:		
	<i>E. coli</i> 28 (VIM-12)	Transconjugant strain (pEC28)	<i>E. coli</i> 26R793
Imipenem	1	0.25	0.5
Meropenem	0.25	0.023	0.032
Ertapenem	0.5	0.094	0.064
Aztreonam	1	0.5	0.094
Cefotaxime	>32	8	0.094
Cefepime	12	1	0.094
Ceftazidime	>256	4	0.75
Cefoxitine	>256	32	8
Amoxicillin	>256	32	4
Amoxicillin + CLA	>256	16	4
Amikacin	128	48	2
Gentamicin	>256	32	0.75
Piperacillin + TZB	96	12	0.75
Ciprofloxacin	0.047	0.047	0.047
Tetracycline	>256	1	1
Trimethoprim-sulfamethoxazole	0.094	0.016	0.012

^a CLA, clavulanic acid (2 μg/ml); TZB, tazobactam (4 μg/ml).

Η PCR ήταν θετική για το γονίδιο *bla*_{VIM} και η χαρτογράφηση του ιντεγκρονίου καθώς και η αλληλούχηση των προϊόντων έδειξαν ότι το αλληλίο *bla*_{VIM-12} βρισκόταν ανάμεσα από δύο *aacA7* αλληλία που προσφέρουν αντοχή στις αμινογλυκοσίδες (Εικόνα 18). Το συγκεκριμένο ιντεγκρόνιο (In-h12) είχε περιγραφεί αρχικά σε στέλεχος *K. pneumoniae* (GenBank Accession Number DQ143913) και αυτό ήταν το δεύτερο είδος παγκοσμίως στο οποίο ανιχνεύθηκε.



Εικόνα 18. Δομή του In-h12 ιντεγκρονίου τάξης 1 (περίπου 4,5 kb σε μήκος), που φέρει την γονιδιακή κασέτα blaVIM-12. Τα βέλη υποδεικνύουν την κατεύθυνση μεταγραφής κάθε γονιδίου.

Η πλασμιαδική ανάλυση έδειξε ένα πλασμίδιο μεγέθους 70kb. Η PCR ήταν αρνητική για το blaVIM στο πλασμίδιο και θετική στη ζώνη του χρωμοσώματος. Η βακτηριακή σύζευξη έδωσε αποσυζευκτές με συχνότητα 1.8×10^{-2} ανά κύτταρο δότη.

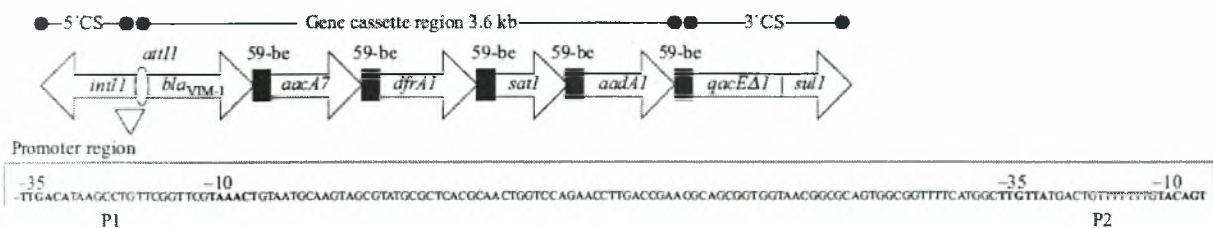
4.3. *Morganella morganii* A209

Το στέλεχος ήταν ανθεκτικό σε όλα τα αντιβιοτικά και μετρίως ευαίσθητο σε γενταμυκίνη και αμικασίνη. Η MIC της ιμιπενέμης, της μεροπενέμης και της αζτρεονάμης ήταν > 32 mg/L. Η δράση καρβαπενεμάσης που αναστέλλεται από EDTA υποδείχθηκε από Etest MBL.

Η PCR ήταν θετική για το γονίδιο blaVIM. Η χαρτογράφηση του ιντεγκρονίου έδειξε ότι το blaVIM-1 αλληλίο ήταν καθοδικά του attI1 σημείου ανασυνδυασμού και ενός ισχυρού P1 καθώς και ενός ανενεργού P2 υποκινητή. Η συναρμολόγηση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των επικαλυπτόμενων PCR προϊόντων αποκάλυψε ένα νέο ιντεγκρόνια τάξης 1 με μήκος περίπου 5950bp, το οποίο ονομάστηκε In3Mor (Εικόνα 19). Η μεταβλητή περιοχή των περίπου 3,6kb του ιντεγκρονίου περιείχε επίσης καθοδικά του blaVIM-1 αλληλίου και διαδοχικά, τις γενετικές κασέτες των γονιδίων aacA7 που προσφέρει αντοχή στις αμινογλυκοσίδες, dfrA1 που προσφέρει αντοχή στη τριμεθοπρίμη, sat1 που προσφέρει αντοχή στη στρεπτοθρισίνη και aadA1 που προσφέρει αντοχή στη στρεπτομυκίνη. Η γονιδιακή κασέτα blaVIM-1 με το στοιχείο 59-be ήταν ταυτόσημο με εκείνες που έχουν αναφερθεί σε άλλα gram-αρνητικά βακτήρια στην Ελλάδα. Όμως, η δομή της περιοχής της γονιδιακής κασέτας του In3Mor διέφερε από ιντεγκρόνια-MBL που είχαν προηγουμένως περιγραφεί.

Αυτή είναι η πρώτη περιγραφή ιντεγκρονίου τάξης 1 που κωδικοποιεί MBL, το οποίο συνδέεται με γονίδιο *sat*. Τυπικά, το γονίδιο *satI* εντοπίζεται σε ιντεγκρόνια τάξης 2. Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε συνέβη μια αποκοπή της γονιδιακής κασέτας *satI* απ' το Tn7 και έπειτα ενσωματώθηκε σε ιντεγκρόνιο τάξης 1 που ήδη περιέχει την *aadA1*.

Η πλασμιδιακή ανάλυση δεν έδειξε πλασμίδια, γεγονός που υπαινίσσεται τη χρωμοσωμική φορεία του παραπάνω ιντεγκρονίου. Τα πειράματα της βακτηριακής σύζευξης δεν έδωσαν αποσυζευκτές.



Εικόνα 19. Σχηματική αναπαράσταση της δομής του ιντεγκρονίου In3Mor στο στέλεχος *M. Morgannii* A209.

4.4. *Proteus mirabilis* 1205

Το στέλεχος ήταν ανθεκτικό στα περισσότερα αντιβιοτικά εκτός από την αμικασίνη (MIC 6mg/L), τη γενταμυκίνη (MIC 2mg/L) και την αζτρεονάμη (MIC 4mg/L). Η MIC στην ιμιπενέμη και τη μεροπενέμη ήταν 32mg/L και 2mg/L, αντίστοιχα.

Η PCR ήταν θετική για το γονίδιο *bla_{VIM}* και αλληλουχοποίηση των προϊόντων έδειξε ότι ήταν το αλληλό *bla_{VIM-1}*. Χαρτογράφηση του σχετιζόμενου ιντεγκρονίου έδειξε ότι το *bla_{VIM-1}* βρισκόταν καθοδικά του *aatI1* σημείου ανασυνδυασμού και ανοδικά των γονιδιακών κασετών των γονιδίων *aacA7*, *dfpA1* και *aadA1*. Ιντεγκρόνια με ταυτόσημη γενετική σύσταση έχουν ανευρεθεί και σε άλλα Gram αρνητικά βακτήρια στον ελλαδικό χώρο. Ο P1 και P2 υποκινητής ήταν ισχυρός και ανενεργός (δεν υπήρχε GGG εισδοχή), αντίστοιχα.

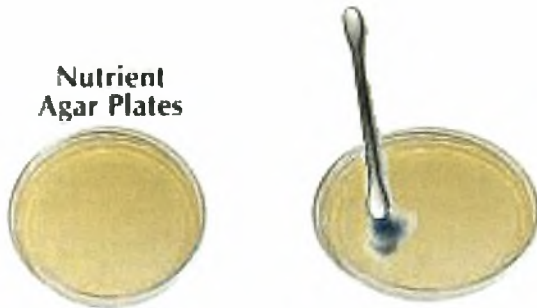
Η πλασμιδιακή ανάλυση δεν έδειξε πλασμίδια, γεγονός που υπαινίσσεται τη χρωμοσωμική φορεία του παραπάνω ιντεγκρονίου. Τα πειράματα της βακτηριακής σύζευξης δεν έδωσαν αποσυζευκτές.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Απομονώσεις που φέρουν MBL έχουν βρεθεί σχεδόν αποκλειστικά σε νοσοκομειακό περιβάλλον, προτείνοντας ενδεχομένως έναν βαθμό περιορισμού μέσα σε αυτό το περιβάλλον, όπου η αντιμικροβιακή χρήση είναι τακτικά έντονη. Δεν έχουν αναφερθεί προηγουμένως ομάδες απομονώσεων που παράγουν MBL. Η παρούσα μελέτη περιγράφει την πρώτη μετάδοση σε εξωνοσοκομειακό περιβάλλον gram αρνητικών βακτηριδίων που παράγουν MBL, που επάγουν την αρχή μιας λοίμωξης σε κοινότητες. Κατά τη διάρκεια της μελέτης, 12 MBL θετικές απομονώσεις *P. mirabilis* ανακτήθηκαν από μολύνσεις του ουροποιητικού συστήματος ασθενών. Σε όλες τις περιπτώσεις οι ασθενείς είχαν προηγουμένως νοσηλευθεί και τους χορηγήθηκε φλουοροκινολόνες και/ή αμινογλυκοσίδες και β-λακτάμες. Οι MICs της ιμιπενέμης κυμαίνεται από 32 έως 128mg/L, ενώ εκείνες της μεροπενέμης από 1 έως 8mg/L. Οι απομονώσεις προήλθαν από το ίδιο κλωνικό στέλεχος και είχε ένα *blaVIM-1* γονίδιο σε μια κοινή δομή ιντεγκρονίου. Επίσης, σε αυτή τη μελέτη παρουσιάζονται μηχανισμοί πολλαπλής ανθεκτικότητας στις καρβαπενέμες σε μια μόνο απομόνωση *P. aeruginosa*. Η απομόνωση αυτή ήταν έντονα ανθεκτική στις καρβαπενέμες (οι MICs της ιμιπενέμης και μεροπενέμης ήταν 512 και 128mg/M, αντίστοιχα) και ανθεκτική σε πολλά φάρμακα. Περιείχε τα γονίδια *blaVIM-4* και *blaP1b* σε ένα νέο ιντεγκρόνιο τάξης 1 και ένα δεύτερο ιντεγκρόνιο με τις *aac(6')-Ib* και *blaOXA-35* γονιδιακές κασέτες. Οι μηχανισμοί πολλαπλής ανθεκτικότητας δείχνουν να συνυπάρχουν και να επιφέρουν υψηλή ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες. Επιπλέον, σε αυτή τη μελέτη για πρώτη φορά παρουσιάζεται η παραγωγή μεταλλο-β-λακταμάσης τύπου VIM σε απομόνωση *M. morgani*. Το στέλεχος αυτό περιέχει ένα νέο ιντεγκρόνιο τάξης 1 (In3Mor). Τέλος, για πρώτη φορά παρουσιάζεται απομόνωση *E. coli* που φέρει ένα VIM-1/VIM-2 υβρίδιο (VIM-12) μεταλλο-β-λακταμάσης. Συνεπώς, είναι σημαντική η έρευνα απομονώσεων που φέρουν χαρακτηριστικά MBL για την αναγνώριση και εξάλειψή τους. Η επιδημιολογική έρευνα, ο περιορισμός της χρήσης των καρβαπενεμών και η ρύθμιση των μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων θα πρέπει να μελετηθούν ώστε περιοριστεί η διάδοση αυτών των καθοριστικών παραγόντων μεταξύ των gram-αρνητικών ειδών.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πρωτόκολλο Καλλιέργειας ³¹

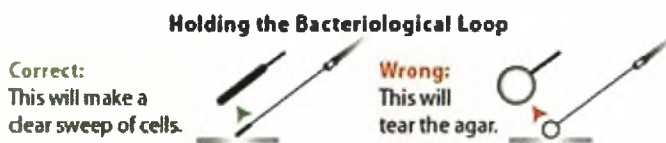


Εικόνα 20. Τρυβλία Petri με θρεπτικό υλικό άγαρ

Υλικά:

- Αποστειρωμένο βαμβάκι swab
- Βακτηριολογικό κρίκο
- Πιάτα με θρεπτικό υλικό άγαρ
- Δοχείο απόρριψης βιολογικών απορριμάτων

1. Μεταφέρουμε τα βακτήρια πάνω στο θρεπτικό υλικό που βρίσκεται μέσα στο τρυβλίο Petri ακουμπώντας το βαμβάκι σε ένα και μοναδικό σημείο. Μόλις σιγουρευτούμε ότι μία αρκετά μεγάλη ποσότητα (σταγόνα) έχει μεταφερθεί πάνω στο άγαρ, το βαμβάκι μπορεί να πεταχτεί στο δοχείο απόρριψης βιολογικών απορριμάτων.



Εικόνα 21. Σωστός και λάθος τρόπος χρήσης του βακτηριολογικού κρίκου

2. Με τον βακτηριολογικό κρίκο, συνεχίζουμε να απλώνουμε τα βακτήρια σε 2 ακόμη διαφορετικές φορές. Ουσιαστικά απλώνουμε όσο καλύτερα γίνεται τα βακτήρια για να γίνει πιο σωστή η ανάπτυξή τους. Αφού σχηματίσουμε την πρώτη γραμμή, γυρίζουμε τον βακτηριολογικό κρίκο ανάποδα (θεωρητικά

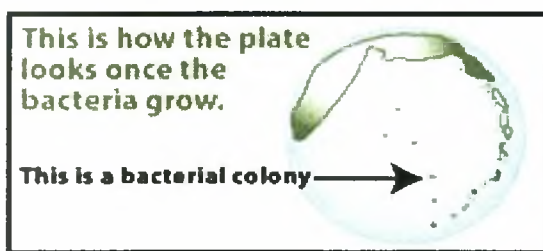
Απομόνωση και χαρτογράφηση ιντεγκρονίων που φέρουν μέταλλο-β-λακταμάσες σε νοσοκομειακά στελέχη Gram-αρνητικών βακτηριδίων

καθαρή πλευρά) ώστε η δεύτερη να περιέχει μια μικρότερη συγκέντρωση βακτηρίων και τέλος, στην τρίτη γραμμή να πάρουμε καθαρές απομονώσιμες αποικίες (όπως φαίνεται στην εικόνα).



Εικόνα 22. Απλώνουμε την αρχική σταγόνα βακτηρίων για δημιουργία καλλιέργειας.

3. Επώαση του τρυβλίου για 24 ώρες στους 37°C.

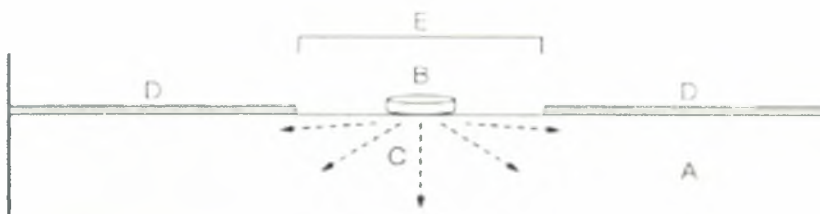


Εικόνα 23. Εμφάνιση βακτηριακής καλλιέργειας αφού έχουν αναπτυχθεί αρκετά τα βακτήρια.

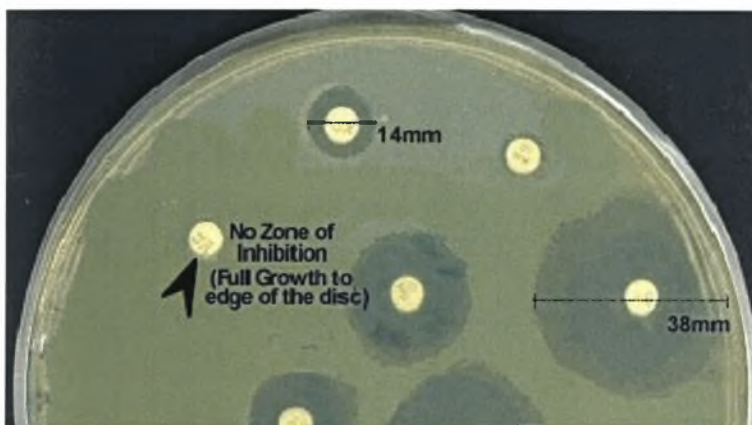
Μέθοδος Kirby – Bauer δίσκου ^{2, 31}

Μια πολύ απλή και συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η μέθοδος δίσκου Kirby – Bauer. Οι δίσκοι που φέρουν αντιβιοτικό το απελευθερώνουν στο περιβάλλον θρεπτικό μέσο όταν τοποθετούνται πάνω σε επιφάνεια στερεού άγαρ. Έτσι σε τρυβλία με άγαρ τοποθετούνται οι υπό εξέταση μικροοργανισμοί και κατόπιν δίσκοι με αντιβιοτικό πάνω στο άγαρ. Η διάχυση μέσω του δίσκου είναι μία ποιοτική μέθοδος που βασίζεται στον κατά προσέγγιση υπολογισμό της επίδρασης του αντιβιοτικού στην βακτηριακή αύξηση σε στερεό μέσο. Μία ζώνη αναστολής της ανάπτυξης σχηματίζεται γύρω από τον δίσκο του αντιβιοτικού εάν ο οργανισμός είναι ευπαθής σε αυτό. Η διάμετρος της ζώνης αναστολής εξαρτάται από διάφορους παράγοντες συμπεριλαμβανομένων των:

- ✓ Η ποσότητα του αντιβιοτικού που εμπεριέχει ο δίσκος
- ✓ Ο βαθμός ευαισθησίας του βακτηρίου στο αντιβιοτικό
- ✓ Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του αντιβιοτικού
- ✓ Το βάθος (σε mm) του άγαρ στο τρυβλίο
- ✓ Η συγκέντρωση του βακτηρίου



Εικόνα 24. Εμποτισμένος δίσκος με αντιβιοτικό. A: άγαρ, B: δίσκος, C: Το αντιβιοτικό διαχέεται στο άγαρ με βαθμίδωση, D: βακτηριακή ανάπτυξη στην επιφάνεια του άγαρ μετά από 18 ώρες, E: ζώνη αναστολής



Εικόνα 25. Τρυβλίο που φέρει δίσκους με αντιβιοτικό. Γύρω από τον δίσκο που βρίσκεται πάνω αριστερά παρατηρούμε ότι η ανάπτυξη των βακτηρίων δεν έχει ανασταλλεί από την παρουσία του αντιβιοτικού. Άρα ο κλώνος του βακτηρίου που βρίσκεται σε εκείνη την περιοχή φέρει κάποιο γονίδιο που του παρέχει ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Δεν παρατηρείται το ίδιο γύρω από τους υπόλοιπους δίσκους.

Όσο η απόσταση από τον δίσκο αυξάνεται, υπάρχει μία λογαριθμική μείωση της συγκέντρωσης του αντιβιοτικού. Αν και είναι η πιο κοινή μέθοδος για να εξετάσουμε την αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα, δεν μπορούν να εξεταστούν όλα τα βακτήρια με αυτή.

Υλικά:

- Βακτηριακές καλλιέργειες
- Αποστειρωμένοι βαμβακοφόροι στυλεοί
- Δίσκοι αντιβιοτικού ή Etest
- Τρυβλία με άγαρ
- Καυστήρας Bunsen
- Διάλυμα εναιώρησης (Suspension Medium, 5ml, BIOMERIEUX)

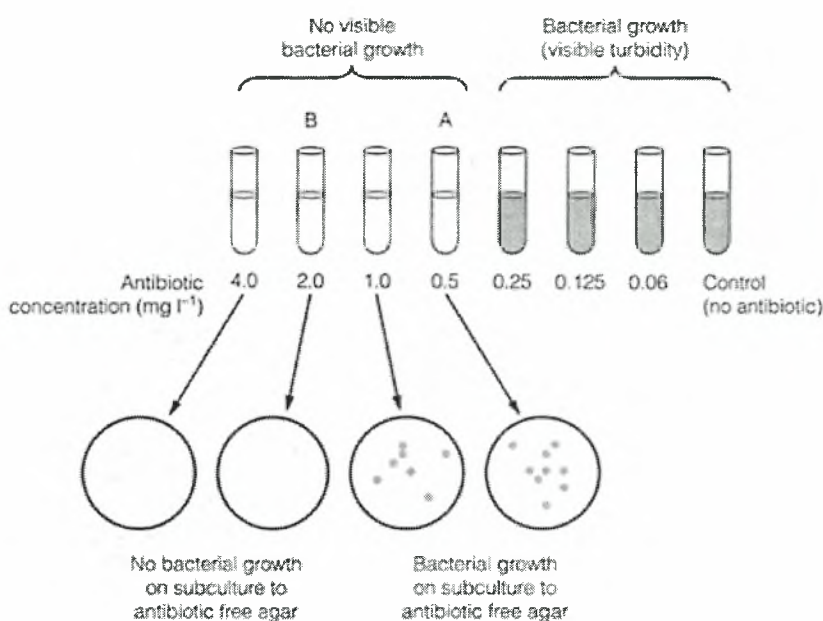
Μέθοδος:

1. Ανάβουμε τον καυστήρα Bunsen και τον αφήνουμε να καίει για πέντε λεπτά έτσι ώστε να δημιουργήσουμε ένα καθαρό περιβάλλον εργασίας.
2. Με έναν βαμβακοφόρο στυλεό , λαμβάνουμε λίγες αποικίες από την ήδη υπάρχουσα καλλιέργεια.
3. Διαλύουμε τις αποικίες αυτές στο διάλυμα εναιώρησης. Τοποθετούμε τον σωλήνα που φέρει το διάλυμα εναιώρησης και τις αποικίες στην συσκευή μέτρησης της θολότητας του. Θα πρέπει το διάλυμα εναιώρησης να έχει θολότητα 0,5 McFarland.
4. Χρησιμοποιώντας έναν διαφορετικό βαμβακοφόρο απλώνουμε τις αποικίες καλά πάνω στην επιφάνεια του νέου τρυβλίου με άγαρ Muller Hinton. Προσπαθούμε να απλώσουμε τα βακτήρια όσο καλύτερα μπορούμε. Γυρίζουμε το τρυβλίο 90° και το διαπερνάμε για άλλη μία φορά.
5. Επαναλαμβάνουμε το 4^ο βήμα μέχρι να σιγουρευτούμε ότι έχουμε διανείμει σωστά σε όλη την επιφάνεια τις αποικίες.
6. Τοποθετούμε με μία τσιμπίδα, την οποία αποστειρώσαμε αφού την περάσαμε από την μπλε φλόγα του καυστήρα Bunsen, δίσκους ή Etest πάνω στην επιφάνεια του άγαρ σε διαφορετικά σημεία κάθε φορά, διατηρώντας κάποια απόσταση μεταξύ τους. Ασκούμε πίεση πάνω στον δίσκο ή το Etest για να σιγουρευτούμε ότι έχει τοποθετηθεί σωστά.
7. Παρατηρούμε το πρότυπο της ανάπτυξης ύστερα από 24 με 48 ώρες.

Ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ²

Η MIC είναι η ελάχιστη (χαμηλότερη) συγκέντρωση ενός αντιβιοτικού που θα εμποδίσει την ανάπτυξη ενός βακτηριακού είδους.

Τυπικά, η MIC καθορίζεται χρησιμοποιώντας μια σειρά υποδιπλάσιων αραιώσεων του αντιβιοτικού σε μέσο υγρής καλλιέργειας, για να παραχθεί μια κλίμακα συγκεντρώσεων στους δοκιμαστικούς σωλήνες (macrodilution) ή σε έναν microtiter δίσκο (microdilution). Μετά από τον εμβολιασμό του εξεταζόμενου βακτηριακού είδους σε κάθε συγκέντρωση, η βακτηριακή ανάπτυξη καθορίζεται από την ορατή θολότητα μετά από 18–24 ώρες επώασης (Εικόνα 26). Η MIC είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού στην οποία δεν είναι ορατή η βακτηριακή ανάπτυξη.



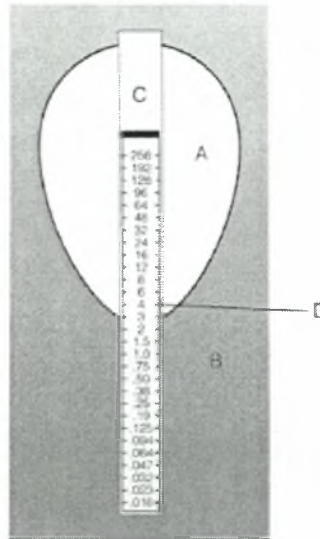
Εικόνα 26. Διαδικασία της MIC. Σε αυτό το παράδειγμα, η ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής του αντιβιοτικού είναι 0,5mg/l (Σωλήνας A).

Αυτή η μέθοδος είναι τεχνικά χρονοβόρα και σχετικά ακριβή. Μια εναλλακτική μέθοδος είναι μέσω των εμπορικά διαθέσιμων ταινιών **E-test**. Αυτές είναι εξειδικευμένες ταινίες εμβαπτισμένες με αντιβιοτικό που τοποθετούνται στην επιφάνεια των εμβολιασμένων τρυβλίων άγαρ. Κατά τη διάρκεια της επώασης, το αντιβιοτικό διαχέεται στο άγαρ διαμορφώνοντας μια ζώνη αναστολής. Υπάρχει μια

Απομόνωση και χαρτογράφηση ιντεγκρονίων που φέρουν μέταλλο-β-λακταμάσες σε νοσοκομειακά στελέχη Gram-αρνητικών βακτηριδίων

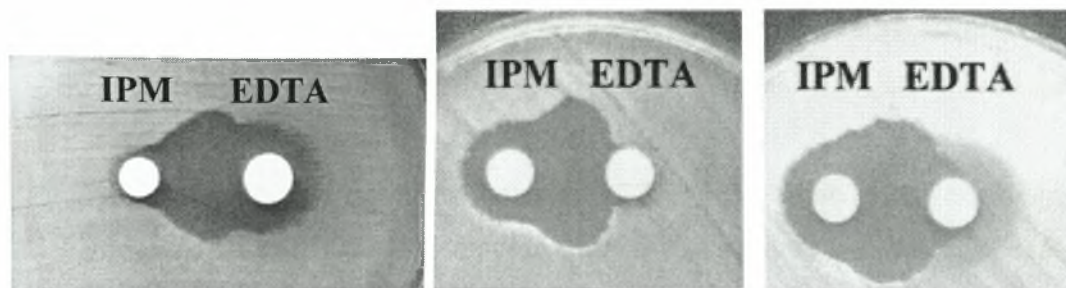
κατασκευασμένη κλίμακα συγκέντρωσης μέσα στη ταινία, και οι αριθμητικές διαβαθμίσεις είναι σημειωμένες κατά μήκος της ταινίας. Η MIC καθορίζεται με τον υπολογισμό του σημείου στο οποίο η άκρη της ζώνης αναστολής διασταυρώνει την ταινία E-test (Εικόνα 27).

Εικόνα 27. Καθορισμός της MIC με E-test. A: Ζώνη αναστολής, B: βακτηριακή ανάπτυξη, C: Ταινία E-test, D: Η MIC είναι το σημείο στο οποίο η άκρη της ζώνης αναστολής διασταυρώνει το E-test. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα η MIC είναι 3mg/l.



Δοκιμασία DDST (Double Disk Synergy Test) ³²⁻³⁵

Αρχικά, είναι απαραίτητη μια O/N (overnight) καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους που μελετάμε. Έπειτα, αναιωρούμε αποικίες τις καλλιέργειας αυτής σε διάλυμα εναιώρησης μέχρι να αποκτήσει θολότητα 0,5 MacFarland. Με τη βοήθεια ενός αποστειρωμένου βαμβακοφόρου στυλεού απλώνουμε τις αποικίες καλά πάνω στην επιφάνεια του νέου τρυβλίου με άγαρ Muller Hinton. Προσπαθούμε να απλώσουμε τα βακτήρια όσο καλύτερα μπορούμε. Γυρίζουμε το τρυβλίο 90° και το διαπερνάμε για άλλη μία φορά. Συνεχίζουμε μέχρι να είμαστε σίγουρη πως έχουμε απλώσει τα βακτήρια σε όλη την επιφάνεια. Αφού αφήσουμε το τρυβλίο να στεγνώσει λίγο, τοποθετούνται σε απόσταση 1,5-2,0cm (από κέντρο σε κέντρο) ένας δίσκος ιμιπενέμης και ένας άδειος δίσκος. Ακολουθώντας, εμβαπτίζουμε τον άδειο δίσκο με 10μl 0,52M EDTA. Μετά από O/N επώαση στους 37°C, η παρουσία μιας διευρυμένης ζώνης αναστολής ερμηνεύεται ως θετικό DDST. Συγκεκριμένα, η επέκταση ζώνης αναστολής της ιμιπενέμης δίπλα στον δίσκο με EDTA υποδηλώνει την παρουσία MBL.



Εικόνα 28. Θετικό DDST σε διαφορετικά gram-αρνητικά βακτηρίδια.

Πρωτόκολλο του DNA extraction

Η απομόνωση του γενωμικού DNA έγινε από φρέσκια overnight βακτηριακές καλλιέργειες με την χρήση του Kit της Qiagen που ονομάζεται QIAamp DNA Mini Kit (Tissue Protocol). Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

Προεργασία:

- ✓ Αφήνω το δείγμα και το AE Buffer σε θερμοκρασία δωματίου (15-25°C).
- ✓ Ανάβω τα υδατόλουτρα στους 56°C και 70°C.
- ✓ Όλες οι φυγοκεντήσεις πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Τα Buffers AW1, AW2 και η πρωτεάση πρέπει να έχουν ανασυσταθεί σύμφωνα με τις οδηγίες του Kit (p. 24). Επαναδιαλύω τυχόν ίζημα στο AL Buffer με επώαση στους 56°C.

a) Στερεές καλλιέργειες:

- Ενωιρώ καλά 1ml της καλλιέργειας σε 180μl ATL Buffer και κάνω vortex για 15sec .

b) Υγρές καλλιέργειες:

- Πιπετάρω 1ml της καλλιέργειας σε 1.5ml tube και φυγοκεντρώ για 5min στις 7500rpm (rounds per meter, στροφές).
- Αφαιρώ το υπερκείμενο και σε σχέση με την ποσότητα του pellet προσθέτω 180μl ATL Buffer και κάνω vortex για 15sec (η ομογενοποίηση του μείγματος είναι σημαντική)

1. Προσθέτω 20μl Proteinase K, κάνω vortex και επωάζω στους 56⁰C για 2h. Κάνω vortex για 15sec στο ενδιάμεσο για να επιτευχθεί η λύση (ΠΡΟΣΟΧΗ: Πρέπει να χρησιμοποιηθεί Proteinase K και όχι Protease της Qiagen διότι έχει μικρότερη δραστικότητα στο ATL Buffer).
2. Κάνω ελαφρό spin down και προσθέτω 200μl AL Buffer. Κάνω vortex για 15sec (είναι σημαντική η ομογενοποίηση του μείγματος) και επωάζω στους 70⁰C για 10min. Κάνω ελαφρό spin down.
3. Προσθέτω 200μl απόλυτης αιθανόλης και κάνω vortex για 15sec (είναι σημαντική η ομογενοποίηση του μείγματος). Κάνω ελαφρό spin down.
4. Μεταφέρω το δείγμα μαζί με το ίζημα σε μία QIAamp Spin στήλη μέσα σε 2ml collection tube. Φυγοκεντρώ για 1min στις 8000rpm. Αλλάζω collection tube.
5. Προσθέτω 500μl AW1 Buffer στη στήλη και φυγοκεντρώ για 1min στις 8000rpm. Αδειάζω το collection tube.
6. Προσθέτω 500μl AW2 Buffer στη στήλη και φυγοκεντρώ για 3min στη μέγιστη ταχύτητα. Αδειάζω το collection tube.
7. Φυγοκεντρώ για 1min στη μέγιστη ταχύτητα ώστε να αποφύγω υπολείμματα του AW2 Buffer που μπορεί να δημιουργήσουν προβλήματα σε ακόλουθες αντιδράσεις.
8. Τοποθετώ την στήλη σε 1.5ml tube και προσθέτω 200μl AE Buffer ή dH₂O (για μακροπρόθεσμη αποθήκευση του DNA συστήνεται η χρήση AE Buffer και η αποθήκευση στους -20⁰C διότι το DNA υφίσταται όξινη υδρόλυση στο dH₂O). Επωάζω σε RT (Room Temperature) για 5min και φυγοκεντρώ για 1min στις 8000rpm.
9. Αποθηκεύω το DNA στους -20⁰C.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction PCR)

Η ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης. Σύμφωνα με τη τεχνική αυτή, σε ένα πρώτο στάδιο, το DNA αποδιατάσσεται σε υψηλές θερμοκρασίες (95⁰C). Έτσι, κάθε

δίκλωνο μόριο μετατρέπεται σε δύο μονόκλωνα. Στην συνέχεια, σε ένα δεύτερο στάδιο, η θερμοκρασία κατεβαίνει ώστε να φτάσει την θερμοκρασία υβριδισμού, όπου οι εκκινητές προσδένονται πάνω στις συμπληρωματικές αλληλουχίες των μονόκλωνων μορίων. Οι εκκινητές είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, μήκους 18 – 24 νουκλεοτιδίων, συμπληρωματικά προς τα δύο άκρα της αλληλουχίας που θέλουμε να ενισχύσουμε. Για κάθε επιθυμητή αλληλουχία σχεδιάζεται ένα ζεύγος εκκινητών. Ο ένας εκκινητής έχει την αλληλουχία του 5' άκρου της κωδικοποιούσας αλληλουχίας (νοηματικός εκκινητής) και ο άλλος είναι συμπληρωματικός προς το 3' άκρο της κωδικοποιούσας αλληλουχίας (αντινοηματικός εκκινητής). Η θερμοκρασία υβριδισμού ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος και την σύσταση των εκκινητών. Τελευταίο, είναι το στάδιο του πολυμερισμού που λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία 72⁰C. Στο στάδιο αυτό η πολυμεράση προσθέτει τα δεοξυνουκλεοτίδια στο αυξανόμενο κλώνο. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος, κατάλληλο για τη δράση της πολυμεράσης, και ιόντων Mg²⁺. Τα τρία στάδια που αναφέρθηκαν αποτελούν έναν κύκλο αντιγραφής. Για να παραχθεί επαρκής ποσότητα DNA πρέπει ο κύκλος αντιγραφής του DNA να επαναληφθεί 30 – 35 φορές. Πριν τους επαναλαμβανόμενους κύκλους πραγματοποιείται μία αρχική αποδιάταξη του DNA για 5 min και στο τέλος τους ακολουθεί μία επώαση στους 72⁰ C για 10min, για την τελική επιμήκυνση των μορίων DNA.

Πρωτόκολλο Gel Extraction

Η απομόνωση μιας μπάντας DNA που επιθυμούμε, σε περίπτωση που υπάρχουν και άλλες μη ειδικές μπάντες στο gel αγαρόζης, έγινε με την χρήση του PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (for purification of DNA fragments from agarose gels) της Invitrogen. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

1. Ανάβουμε το υδατόλουτρο στους 50⁰C.
2. Βάζουμε το TE Buffer στους 65⁰C.
3. Κόβουμε το τμήμα του gel που μας ενδιαφέρει αποφεύγοντας όσο είναι δυνατόν την περιττή αγαρόζη.
4. Ζυγίζουμε κάθε κομμάτι του gel.
5. Προσθέτουμε 30μl GS1 Buffer για κάθε 10mg gel.

6. Επωάζουμε στους 50°C για 15min και κάνουμε vortex ενδιάμεσα κάθε 3min.
7. Μεταφέρουμε το μείγμα σε στήλη και φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 1min.
8. Προαιρετικό: για κομμάτια αγαρόζης>250mg προσθέτουμε 500μl GS1 και αφήνουμε σε RT για 1min. Φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 1min.
9. Προσθέτουμε 700μl W9 Buffer.
10. Αφήνουμε για 5min σε RT και φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 1min.
11. Αφαιρούμε το έκλουμα και επαναλαμβάνουμε την τελευταία φυγοκέντρηση (13000rpm για 1min).
12. Μεταφέρουμε την στήλη σε eppendorf 1.5ml και προσθέτουμε 50μl θερμό TE Buffer στο κέντρο της στήλης. Αφήνουμε σε RT για 1min.
13. Φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 2min.
14. Αποθηκεύουμε το DNA στους -20°C ή συνεχίζουμε με PCR (10μl DNA) ή sequencing.

Καθαρισμός PCR προϊόντων

Ο καθαρισμός των PCR προϊόντων, που επιθυμούμε να αποστείλουμε σε εξειδικευμένο κέντρο παροχής υπηρεσιών νουκλεοτιδικής αλληλουχοποίησης, έγινε με την χρήση του ChargeSwitch® PCR Clean-Up Kit της Invitrogen. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

Προετοιμασία

1. Αναδεύουμε με vortex τα ChargeSwitch Magnetic Beads για να ομογενοποιηθούν πλήρως.

Δέσμευση του DNA

2. Μεταφέρουμε τα 40μl (από τα 50μl ηλεκτροφορήσαμε τα 10μl) του PCR προϊόντος σε αποστειρωμένο eppendorf του 1,5ml.
3. Προσθέτουμε 40μl του Purification Buffer N5 στο eppendorf.
4. Προσθέτουμε 10μl από τα ChargeSwitch Magnetic Beads στο eppendorf και αναδεύουμε ελαφρά μέχρι να ομογενοποιηθεί το διάλυμα και προσέχοντας να μην σχηματιστούν φυσαλίδες.

5. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1min.
6. Τοποθετούμε το δείγμα-epedorf στην MagnaRack για 1min ή μέχρι να σχηματιστεί το pellet από τα beads.
7. Χωρίς να μετακινήσουμε το epedorf από την MagnaRack, προσεκτικά απομακρύνουμε και πετάμε το υπερκείμενο χωρίς να ακουμπήσουμε το pellet που σχημάτισαν τα beads.
8. Ακολουθεί το στάδιο καθαρισμού του DNA.

Καθαρισμός του DNA

1. Απομακρύνουμε το epedorf που περιέχει τα magnetic beads από την MagnaRack.
2. Προσθέτουμε 150μl Wash Buffer W12 στο epedorf και αναδεύουμε ελαφρά για να ομογενοποιηθεί το δείγμα χωρίς να σχηματιστούν φυσαλίδες.
3. Τοποθετούμε το δείγμα-epedorf στην MagnaRack για 1min ή μέχρι να σχηματιστεί το pellet από τα beads.
4. Χωρίς να μετακινήσουμε το epedorf από την MagnaRack, προσεκτικά απομακρύνουμε και πετάμε το υπερκείμενο χωρίς να ακουμπήσουμε το pellet που σχημάτισαν τα beads.
5. Επαναλαμβάνουμε μια ακόμα φορά τα βήματα 1-4.
6. Ακολουθεί το στάδιο έκλυσης του DNA.

Έκλυση του DNA

1. Απομακρύνουμε το epedorf που περιέχει τα magnetic beads από την MagnaRack.
2. Προσθέτουμε 50μl Elution Buffer E5 (10mM Tris-HCl, pH 8.5) στο epedorf και αναδεύουμε ελαφρά για να ομογενοποιηθεί το δείγμα χωρίς να σχηματιστούν φυσαλίδες.
3. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1min.
4. Τοποθετούμε το δείγμα-epedorf στην MagnaRack για 1min ή μέχρι να σχηματιστεί το pellet από τα beads.
5. Χωρίς να μετακινήσουμε το epedorf από την MagnaRack, προσεκτικά μεταφέρουμε το υπερκείμενο που περιέχει το καθαρό PCR προϊόν σε ένα αποστειρωμένο epedorf, χωρίς να ακουμπήσουμε το pellet που σχημάτισαν τα beads.
6. Αποθηκεύουμε το καθαρό PCR προϊόν στους 20°C ή το χρησιμοποιούμε (το αποστέλουμε για αλληλούχηση).

Πρωτόκολλο Απομόνωσης Πλασμιδιακού DNA

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA έγινε από φρέσκια overnight βακτηριακές καλλιέργειες με την χρήση του ChargeSwitch® Plasmid ER Mini Kit της Invitrogen. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

Προετοιμασία

1. Αφήνουμε το Buffer L9 στους 37°C μέχρι να διαλυτοποιηθεί το ίζημα που σχηματίζει.
2. Αφήνουμε το N5 στους 4°C.

Προετοιμασία του δείγματος

3. Σε 1,5 ml eppendorf βάζουμε 300μl Resuspension Buffer (στο οποίο έχει προστεθεί RNase A) και εναιωρούμε επαρκώς ικανή ποσότητα μικροβίων με κρίκο.
4. Προσθέτουμε 300μl Buffer (L9) (προθερμανσμένο) και αναδεύουμε ελαφρά.
5. Αφήνουμε για 3min σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Προσθέτουμε 300μl κρύο Buffer (N5) και αναδεύουμε ελαφρά μέχρι να σχηματιστεί ίζημα.
7. Φυγοκεντρούμε για 10min στις 10000rpm. (Στον ενδιάμεσο χρόνο ετοιμάζουμε gel αгарόζης 0,8% , στο οποίο προσθέτουμε EtBr σε συγκέντρωση από 1-2μg/ml)

Δέσμευση του DNA

8. Σε νέο eppendorf μεταφέρουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 40μl Magnetic Beads (μετά από ανάδευση με vortex). Αναδεύουμε με πιπετάρισμα με προσοχή χωρίς να σχηματιστούν φυσαλίδες. Έπειτα, προσθέτουμε 90μl ETRR (D1). Αναδεύουμε με πιπετάρισμα προσέχοντας να μην σχηματιστούν φυσαλίδες.
9. Αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 2min. Ακολούθως, τοποθετούμε στο MagnaRack για 2min.

Πλύση των Magnetic Beads

10. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και ξεπλένουμε με 1ml Buffer W11, αφού αφαιρέσουμε τα eppendorf απ' τη MagnaRack. (Ξεπλένουμε με πιπετάρισμα αποφεύγοντας τις φυσαλίδες)
11. Επαναλαμβάνουμε το βήμα 9.

12. Επαναλαμβάνω το βήμα 10 με Buffer W12.

13. Επαναλαμβάνω το βήμα 9.

Έκλυση του πλασμιδιακού DNA

14. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε (αποφεύγοντας τις φυσαλίδες) το ίζημα σε 60-100μl Elusion Buffer (E5), ανάλογα με το ίζημα.

15. Αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 2min και τοποθετούμε στη MagnaRack για 5min.

16. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καθαρό eppendorf.

Ηλεκτροφόρηση του πλασμιδιακού DNA

17. Ηλεκτροφορούμε τουλάχιστον 25μl + 5μl χρωστική στα 100V για 2h τουλάχιστον.

Την υπόλοιπη ποσότητα του πλασμιδίου την αφήνουμε στους 4°C για χρήση εντός της ημέρας.

Πειράματα βακτηριακής σύζευξης

Η μέθοδος Cross-Streak μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο σε Gram αρνητικά μικρόβια όσο και σε εντεροκόκκους. Τα μικρόβια δότες και λήπτες καλλιεργούνται αρχικά για 24 ώρες σε ξεχωριστά τρυβλία με αιματούχο θρεπτικό υλικό. Συλλέγονται με βαμβακοφόρο στυλεό αρκετές αποικίες από το καλλιέργημα του λήπτη και ενοφθαλμίζονται σε μία ευθεία γραμμή κατά μήκος μίας διάμετρο νέου τρυβλίου με αιματούχο θρεπτικό υλικό. Το τρυβλίο περιστρέφεται κατά 90° και μία γραμμή καλλιέργηματος του δότη ενοφθαλμίζεται κάθετα στη γραμμή του λήπτη. Επωάζουμε για 24 ώρες στους 37° C. Η επιφάνεια επαφής των γραμμών του δότη και του λήπτη συλλέγεται εξολοκλήρου με πλαστικό κρίκο και εναιωρείται σε 500μl ζωμού ή PBS (phosphate buffer saline).

Εκτελείται σειρά υποδεκαπλάσιων αραιώσεων του εναιωρήματος αυτού, (συνήθως από το αρχικό μέχρι 10⁻⁴). Καλλιεργείται στο κατάλληλο εκλεκτικό υλικό μία ποσότητα 100μl από το πυκνό εναιώρημα και τις αραιώσεις. Στο εκλεκτικό υλικό καλλιεργούνται επίσης, για να ελεγχθεί η σωστή σύστασή του, καλλιέργηματα τόσο του δότη όσο και του λήπτη, των οποίων η ανάπτυξη πρέπει να ανασταλεί τελείως.

Τα τρυβλία του εκλεκτικού υλικού επωάζονται στους 37° C για 48 ώρες, μετά το πέρας των οποίων συνήθως έχουν εμφανιστεί οι αποικίες. Ο αριθμός των transcojugants που έχουν προκύψει από την σύζευξη υπολογίζεται από τις αποικίες που αναπτύσσονται στις αραιώσεις.

Με τη μέθοδο αυτή δεν είναι δυνατόν να υπολογιστεί ποσοτικά ο αριθμός των μικροβίων-δοτών που συμμετέχουν στη σύζευξη. Με μία σχετική προσέγγιση όμως μπορεί να προσδιοριστεί ο αριθμός των δοτών, αν καλλιεργήσουμε συγκεκριμένη ποσότητα (π.χ. 10μl) του πυκνού μίγματος των μικροβίων που λαμβάνονται μετά τη σύζευξη και αραιώσεων αυτού, σε υλικό που περιέχει αντιβιοτικά στα οποία είναι ανθεκτικός ο δότης αλλά ευαίσθητος ο λήπτης (π.χ. 500 μg/ml gentamycin). Το υλικό αυτό θα αναστείλει την ανάπτυξη του λήπτη αλλά θα επιτρέψει την ανάπτυξη του δότη και των transcojugants. Ο αριθμός των transcojugants που προκύπτει από τη σύζευξη των εντεροκόκκων πάνω σε στερεά θρεπτικά υλικά είναι συνήθως πολύ χαμηλός (μικρότερος του ενός transcojugant ανά 10³ μικρόβια δότες), οπότε πρακτικά οι αποικίες που αναπτύσσονται αντιστοιχούν σε μικρόβια-δότες.

Η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς της αντοχής κατά τα πειράματα σύζευξης, μπορεί να είναι ενδεικτική των μηχανισμών που συντέλεσαν στην ανταλλαγή του γενετικού υλικού. Η ποσοτική εκτίμηση της αποτελεσματικότητας αυτής εκφράζεται συνήθως με τη συχνότητα μεταφοράς γενετικού υλικού, η οποία μπορεί να υπολογιστεί ως ο αριθμός των transcojugants που προκύπτουν ανά κύτταρο δότη, δηλαδή:

$$\text{συχνότητα μεταβίβασης} = \text{transcojugants} / \text{δότες που συμμετέχουν στη σύζευξη}$$

Θα πρέπει να τονιστεί ότι οι συνθήκες κάτω από τις οποίες εκτελείται η σύζευξη *in vitro* διαφέρουν σημαντικά από τις συνθήκες που υπάρχουν *in vivo*. Για το λόγο αυτό, αν και οι συχνότητες μεταβίβασης είναι ενδεικτικές της αποτελεσματικότητας των μηχανισμών που συμμετέχουν στη μεταφορά της αντοχής *in vitro*, η σχετική αποτελεσματικότητά τους στη μεταφορά αντοχής στο φυσικό περιβάλλον των μικροβίων είναι άγνωστη. Έτσι, η μεταβίβαση μιας αντοχής σε transcojugants αποδεικνύει μόνο ότι η ιδιότητα αυτή είναι δυνητικά μεταφερόμενη *in vivo*.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kayser, *Medical Microbiology* (2005)
2. Will Irving, Dlawer Ala'Aldeen, Tim Boswell, *Medical Microbiology*, BIOS Instant notes (2005)
3. http://en.wikipedia.org/wiki/E._coli
4. <http://www.emedicine.com/med/topic734.htm>
5. <http://www.emedicine.com/med/topic1929.htm>
6. Caroline Mohr O'Hara, Frances W. Brenner, and J. Michael Miller. Classification, Identification, and Clinical Significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clinical Microbiology Reviews* (2000), 13:534-546
7. <http://en.wikipedia.org/wiki/Gram-negative>
8. <http://www.emedicine.com/med/topic1929.htm>
9. <http://www.emedicine.com/med/byname/proteus-infections.htm>
10. <http://www.emedicine.com/med/topic1502.htm>
11. Vikas Gautam, Varsha Gupta, R. M. Joshi. *Morganella morganii*-Associated Arthritis in a Diabetic Patient. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* (2003), 41: 3451
12. J. Michael Janda, Sharon L. Abbott, Shideh Khaste, and Tom Robin. Biochemical Investigations of Biogroups and Subspecies of *Morganella morganii*. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* (1996), 34:108-113
13. Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman. Φαρμακολογία. (2000).
14. Joumana N Samaha-Kfoury, George F Araj (2003), Recent developments in β lactamases and extended spectrum β lactamases. *Clinical review*, BMJ327:1209-13
15. DM Livermore. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews* (1995), 8:557-584
16. Ad C. Fluit, Maarten R. Visser, and Franz-Josef Schmitz. Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* (2001), 14: 836-871
17. Timothy R. Walsh, Mark A. Toleman, Laurent Poirel, and Patrice Nordmann. Metallo- β -Lactamases: the Quiet before the Storm? *Clinical Microbiology Reviews* (2005), 18: 306-325

18. Timothy R. Walsh, Anne Bolmström, Anette Qwärnström, and Ana Gales. Evaluation of a New Etest for Detecting Metallo-β-Lactamases in Routine Clinical Testing. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY (2002), 40: 2755-2759
19. <http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/topics/transposons/integrations/integrations.html>
20. Peter M. Bennett. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria, Leading Letter. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (1999), 43:1-4
21. A. C. Fluit and F.-J. Schmitz. Resistance integrons and super-integrons, REVIEW. Clin. Microbiol. (2004), 10: 272-288
22. Sally R. Partridge, Gavin D. Recchia, Carol Scaramuzzi, Christina M. Collis, H. W. Stokes and Ruth M. Hall. Definition of the *attI1* site of class 1 integrons, Microbiology (2000), 146: 2855-2864
23. Didier Mazel. Integrons and the Origin of Antibiotic Resistance Gene Cassettes. ASM News (2004), 70: 520-525
24. Fluit AC, Schmitz FJ. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology, Review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. (1999), 18: 761-70
25. Rowe-Magnus D.A., Mazel D. Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. Current Opinion in Microbiology (2001), 4: 565-569
26. Athanassios Tsakris, Alexandros Ikonomidis, Aggeliki Poulou, Nicholas Spanakis, Spyros Pournaras and Fani Markou. Transmission in the community of clonal *Proteus mirabilis* carrying VIM-1 metallo-β-lactamase. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2007), doi:10.1093/jac/dkm138
27. Maria Maniati, Alexandros Ikonomidis, Paraskevi Mantzana, Alexandros Daponte, Antonios N. Maniatis and Spyros Pournaras. A highly carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate with a novel *bla_{VIM-4}/bla_{PIB}* integron overexpresses two efflux pumps and lacks OprD. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2006), doi:10.1093/jac/dkm126
28. Athanassios Tsakris, Alexandros Ikonomidis, Nicholas Spanakis, Aggeliki Poulou and Spyros Pournaras. Characterization of In3Mor, a new integron carrying VIM-1 metallo-β-lactamase and *sat1* gene, from *Morganella morganii*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2007) 59: 739-741
29. Alexandros Ikonomidis, Maria Labrou, Zoe Afkou, Antonios N. Maniatis, Danai Sofianou, Athanassios Tsakris, and Spyros Pournaras. First Occurrence of an *Escherichia coli* Clinical Isolate Producing the VIM-1/VIM-2 Hybrid

- Metallo-β-Lactamase VIM-12. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY (2007) 51: 3038–3039
30. C Lévesque, L Piché, C Larose, and P H Roy. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. Antimicrob Agents Chemother (1995), 39: 185–191
31. Mary T. Johnson, Ph.D, March 12, 2007, Basic Bacterial Culture and Identification.
32. K. Lee, Y. S. Lim, D. Yong, J. H. Yum, and Y. Chong. Evaluation of the Hodge Test and the Imipenem-EDTA Double-Disk Synergy Test for Differentiating Metallo-β-Lactamase-Producing Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol. (2003), 41: 4623–4629
33. K. Lee, Y. Chong H. B. Shin, Y. A. Kim, D. Yong and J. H. Yum. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. Clinical Microbiology and Infection (2001), 7: 88-91
34. Livermore, David M., Brown, Derek F. J. Detection of β-lactamase-mediated resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2001) 48: 59-64
35. Oh, E.J., S. Lee, Y.J. Park, J.J. Park, K. Park, S.I. Kim, M.W. Kang, and B.K. Kim.. Prevalence of metallo-β- lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* in Korean University hospital and comparison of screening methods for detecting metallo-β-lactamase. J. Microbiol. Method. (2003), 54: 411-418