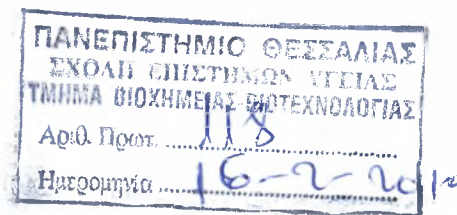


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ – ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΑΝΤΟΧΗΣ
ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ**

Pseudomonas aeruginosa

ΣΑΚΕΛΛΑΡΗΣ ΒΙΚΤΩΡ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

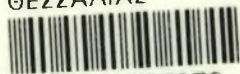
ΛΑΡΙΣΑ 2010



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

Αριθ. Εισ.: 8172/1
Ημερ. Εισ.: 28-04-2010
Δωρεά:
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2010
ΣΑΚ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087079



Κωνσταντίνος Σταθόπουλος
Αναπληρωτής Καθηγητής
Τηλ: 30-2610-997 932
Fax: 30-2610-969 167
E-mail: cstath@med.upatras.gr

Πάτρα 12-1-2010

Προς την
Γραμματεία του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΘΕΜΑ: «Πτυχιακή εργασία του κου Β. Σακελλάρη»

Με την παρούσα επιστολή σας ενημερώνω ότι έχω λάβει γνώση σχετικά με την πρόοδο και την περάτωση της πτυχιακής εργασίας από τον κο Β. Σακελλάρη, με επιβλέποντα τον Λέκτορα κο Δ. Μόσιαλο και συναινώ στην κατάθεσή της προς εξέταση και έγκρισή της από αρμόδια Τριμελή Επιτροπή όπως αυτή έχει ορισθεί από το Τμήμα σας.

Με εκτίμηση

Κ. Σταθόπουλος
Αναπλ. Καθηγητής

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας και στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

Υπεύθυνος Καθηγητής:

Μόσιαλος Δημήτριος, Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, ΠΘ

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

❖ Μόσιαλος Δημήτριος, Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, ΠΘ

❖ Πουρνάρας Σπυρίδων, Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΠΘ

❖ Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, ΠΠ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	5
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	9
Abstract	10
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1.1. Ταξινόμηση και χαρακτηριστικά της <i>P. aeruginosa</i>	11
1.2. Επιδημιολογία της <i>P. aeruginosa</i>	12
1.3. Αντιβιοτικά κατά της <i>P. aeruginosa</i>	13
1.3.1. Β-λακτάμες	13
1.3.2. Αμινογλυκοσίδια	15
1.3.3. Κινολόνες	16
1.3.4. Πολυμυξίνες	17
1.4. Μηχανισμοί αντοχής στην <i>P. aeruginosa</i>	18
1.4.1. Ενδογενής αντοχή	19
1.4.2. Επίκτητη αντοχή	19
1.4.2. α) Μειωμένη διαπερατότητα εξωτερικής μεμβράνης	19
1.4.2. β) Απορύθμιση αντλιών ενεργητικής εκροής	19
1.4.2. γ) Παραγωγή αδρανοποιητικών ενζύμων	20
1.4.3. Οι ομάδες και οι μοριακές τάξεις των αδρανοποιητικών ενζύμων	20
1.4.3.α). Κεφαλοσπορινάσες (group 1, class C)	20
1.4.3.β). Πενικιλινάσες και οι ευρέως φάσματος β-λακταμάσες που αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ (group 2, class A & D)	20
1.4.3.γ). Μεταλλο-β- λακταμάσες (group 3, class B)	21
1.5. Ιντεγκρόνια	27

1.5.1. Δομή και Μηχανισμός δράσης ιντεγκρονίων	27
1.5.2. Κατηγορίες Ιντεγκρονίων	28
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	30
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
3.1.1. Βακτηριακά στελέχη.....	30
3.1.2. Έλεγχος της ευαισθησίας σε αντιβιοτικά.....	31
3.1.3. Απομόνωση γενωμικού DNA από τα κλινικά στελέχη	33
3.1.4. Απομόνωση <i>bla_{IMP}</i> γονιδίου.....	33
3.2. Απομόνωση γονιδίου <i>bla_{IMP}</i> μέσω κλωνοποίησης τυχαίας προσπέλασης.....	33
3.2.1. Κλωνοποίησης τυχαίας προσπέλασης, με χρήση του πλασμίδιου pUC18 σε κύτταρα DH5a <i>E. coli</i>	35
3.2.1.1. Απομόνωση πλασμίδιου pUC18.....	35
3.2.1.2. Παρασκευή δεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> DH5a.....	35
3.2.1.3. Πέψη χρωμοσωμικού DNA του κλινικού στελέχους 1767 και του πλασμίδιου pUC18, με BamH1.....	36
3.2.1.4. Αντίδραση λιγκάσης κομμένου χρωμοσωμικού DNA με το κομμένο πλασμίδιο pUC18 και autoligation κομμένου πλασμίδιου pUC18.....	36
3.2.1.5 Βακτηριακός μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση του ligation χρωμοσωμικού DNA με το πλασμίδιο pUC18 και του autoligation του πλασμίδιου pUC18 με δεκτικά κύτταρα DH5a <i>E. coli</i>	37
3.2.2. Κλωνοποίηση τυχαίας προσπέλασης, με χρήση του πλασμίδιου pUCP20 σε δεκτικά κύτταρα PAO ₁ <i>P. aeruginosa</i>	38
3.2.2.1. Απομόνωση πλασμίδιου pUCP20.....	38
3.2.2.2. Πέψη πλασμίδιου pUCP20 με BamH1	38
3.2.2.3. Αντίδραση λιγκάσης κομμένου χρωμοσωμικού DNA με το κομμένο πλασμίδιο pUCP20 και autoligation κομμένου πλασμίδιου pUCP20 ..	39
3.2.2.4. Παρασκευή δεκτικών κυττάρων PAO ₁ σε διάλυμα σουκρόζης.....	39

3.2.2.5. Βακτηριακός μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση του ligation χρωμοσωμικού DNA με το πλασμίδιο pUCP20 και του autoligation του πλασμιδίου pUCP20 με δεκτικά κύτταρα <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO ₁ .40	
3.3. Έλεγχος και μελέτη ανθεκτικών αποικιών <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO ₁ που πήραμε μετά τη κλωνοποίηση τυχαίας προσπέλασης..... 41	
3.3.1. MIC των ανθεκτικών αποικιών PAO ₁ σε β-λακταμικά αντιβιοτικά 41	
3.3.2. Απομόνωση πλασμιδίου pUCP20 από τις ανθεκτικές PAO ₁ αποικίες και PCR για το <i>IMP</i> γονίδιο 42	
3.3.3. Πείραμα υδρόλυσης της ιμιπενέμης 43	
3.3.4. Δοκιμασία DDST 44	
3.3.5. Δοκιμασία αναστολής αντλιών ενεργητικής εκροής με προσθήκη CCCP..44	
3.4. Πρόβλεψη τριτοταγούς δομής της νέας πρωτεΐνης <i>IMP</i> 48	
3.5. Φυλογενετική ανάλυση της νέας <i>IMP</i> πρωτεΐνης..... 49	
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 50	
4.1. Έλεγχος της ευαισθησίας σε αντιβιοτικά των Κλινικών στελεχών <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 50	
4.2. Απομόνωση του γονιδίου <i>bla_{IMP}</i> μέσω κλωνοποίησης τυχαίας προσπέλασης 51	
4.2.1. Κλωνοποίηση τυχαίας προσπέλασης, με χρήση του πλασμιδίου pUC18 σε δεκτικά κύτταρα DH5a <i>E. coli</i> 51	
4.2.2. Κλωνοποίηση τυχαίας προσπέλασης, με χρήση του πλασμιδίου pUCP20 σε δεκτικά κύτταρα PAO ₁ <i>P. aeruginosa</i> 52	
4.3. Έλεγχος και μελέτη ανθεκτικών αποικιών PAO ₁ που πήραμε μετά την κλωνοποίηση τυχαίας προσπέλασης..... 52	
4.3.1. MIC των ανθεκτικών αποικιών PAO ₁ σε β-λακταμικά αντιβιοτικά 52	
4.3.2. Απομόνωση πλασμιδίου pUCP20 από τις ανθεκτικές PAO ₁ αποικίες και PCR για το γονίδιο <i>bla_{IMP}</i> 53	
4.3.3. Πείραμα υδρόλυσης της ιμιπενέμης 55	
4.3.4. Δοκιμασία DDST 57	
4.3.5. Δοκιμασία αναστολής αντλιών ενεργητικής εκροής με προσθήκη CCCP 57	

4.3.6. Συμπεράσματα της απομόνωσης του γονιδίου <i>bla_{IMP}</i> μέσω κλωνοποίησης, τυχαίας προσπέλασης με χρήση του πλασμιδίου pUCP20 σε κύτταρα ΡΑΟ ₁ <i>P. aeruginosa</i>	58
4.4. Απομόνωση του γονιδίου <i>bla_{IMP}</i> μέσω PCR.....	58
4.5. Πρόβλεψη τριτοταγούς δομής της νέας πρωτεΐνης IMP.....	65
4.6. Φυλογενετική ανάλυση της νέας IMP πρωτεΐνης.....	69
4.7. Χαρτογράφηση του ιντεγκρονίου που περιέχει τη νέα <i>IMP MBL</i>	70
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	71
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	72

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι από τα πιο κοινά Gram⁻ αρνητικά νοσοκομειακά παθογόνα βακτήρια. Αυτός ο οργανισμός παρουσιάζει μια απίστευτη αντοχή στα αντιβιοτικά, εξαιτίας κυρίως της απόκτησης γονιδίων αντοχής, όπως για παράδειγμα γονίδια για β-λακταμάσες, σε συνδυασμό με υπερέκφραση αντλιών ενεργητικής εκροής και/ή μειωμένη έκφραση πορινών. Οι πιο κοινές β-λακταμάσες είναι οι τύπου IMP και VIM μέταλλο-β-λακταμάσες (MBL), καθώς και οι ευρέως φάσματος β-λακταμάσες τύπου OXA (OXA-ESBLs) που προσδίδουν στα βακτήρια υψηλή αντοχή σε β-λακταμικά αντιβιοτικά και κυρίως στις καρβαπενέμες. Τα γονίδια για τις VIM και IMP MBLs, καθώς και για τις OXA-ESBLs, είναι μεταφερόμενα καθώς ανευρίσκονται κυρίως σαν γονιδιακές κασέτες πάνω σε ιντεγκρόνια, τα οποία πολλές φορές είναι μέσα σε τρανσποζόνια ή πλασμίδια, επιτρέποντας έτσι την έκφραση και την διάδοσή τους σε άλλα Gram⁻ αρνητικά βακτήρια. Από την ανακάλυψη της πρώτης μέταλλο-β-λακταμάσης, της IMP₁, σε ένα κλινικό στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa* στην Ιαπωνία το 1988, τα IMP τύπου ένζυμα έχουν εξαπλωθεί παγκοσμίως, αυξάνοντας μέσα σε δύο δεκαετίες το ποσοστό των κλινικών στελεχών *P. aeruginosa* που εμφανίζουν αντοχή στην ιμιπενέμη, εξαιτίας αυτών των IMP τύπου MBLs, από 13% σε 20%. Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί 26 καρβαπενεμάσες τύπου IMP.

Σε αυτή τη μελέτη παρουσιάζουμε την απομόνωση μιας νέας IMP-MBL από 6 κλινικά στελέχη *P. aeruginosa*. Αυτή η νέα IMP_{MBL} παρουσιάζει μεγάλη απόκλιση από την IMP₁, διαφέροντας κατά 44 αμινοξέα, σε αντίθεση με την πιο αποκλίνουσα μέχρι τώρα IMP-MBL, την IMP₁₂, που έχει 36 διαφορετικά αμινοξέα σε σχέση με την IMP₁. Αυτή η νέα IMP-MBL βρέθηκε πάνω σε ένα ιντεγκρόνιο τάξης 1, δίπλα σε ένα γονίδιο OXA₃₅. Επόμενος στόχος θα είναι ο πλήρης βιοχημικός χαρακτηρισμός αυτής της νέας IMP μέταλλο-β-λακταμάσης.

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is one of the most common gram-negative hospital-acquired pathogens. This organism shows a remarkable resistance to antibiotics, mostly because of acquisition of resistance genes e.g., genes for beta-lactamases, combined with over-expression of efflux pumps and/or decreased expression of porins. The most common beta-lactamases are IMP and VIM type MBL, as well as OXA-ESBLs and give to the bacteria high resistance to b-lactam antibiotics, especially carbapenems. The genes for VIM and IMP enzymes, like those for OXA-ESBLs, are transferable as most are found as gene cassettes located primarily on integrons, sometimes within transposons or on plasmids, a condition that provides a wide potential for expression and dissemination in gram-negative pathogens. Since the first finding of IMP₁ metallo-β-lactamase in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in Japan in 1988, IMP-type enzymes are spread worldwide, increasing in two decades the proportion of *P. aeruginosa* isolates demonstrating resistance to imipenem, due to IMP_{MBLs}, from 13% to 20%. Currently have indentified 26 carbapenem-hydrolyzing enzymes of the IMP-type.

In this study we present the discovery of a new IMP type MBL from 6 *P. aeruginosa* clinical strains. This novel IMP-type MBL is highly divergent from IMP₁, possessing 44 different amino acids, whereas the most divergent till now IMP-type MBL, IMP₁₂, has only 36 different amino acids from IMP₁. This new IMP-MBLs was found in a class 1 integron next to *OXA*₃₅ gene. The next objective will be the biochemical characterization of this new IMP metallo-β-lactamase.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ταξινόμηση και χαρακτηριστικά της *P. aeruginosa*

Το γένος των *Pseudomonas* (Ψευδομονάδων) περιγράφηκε από τον Migula το 1894. Τα είδη του γένους αυτού καθορίζονται με βάση τη φυλογενετική τους προέλευση και διάφορα χαρακτηριστικά της φυσιολογίας τους. Φυλογενετικά, το γένος των Ψευδομονάδων ανήκει στα γ-πρωτεοβακτήρια. Ορισμένα είδη του γένους είναι πολύ γνωστά παθογόνα των φυτών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η *P. syringae*, που απομονώνεται από φύλλα που εμφανίζουν κιτρινωπές αλλοιώσεις, ενώ το *P. marginalis* είναι τυπικό παθογόνο μαλακών σήψεων, το οποίο μολύνει μίσχους και βλαστούς, αλλά σπανίως φύλλα. Σήμερα, περισσότερα από 160 είδη ψευδομονάδων έχουν ταυτοποιηθεί αλλά λίγα, όπως είναι η *P. aeruginosa*, η *P. fluorescens*, η *P. maltophilia*, η *P. stutzeri* και η *Burkholderia Pseudomallei* ενδιαφέρουν την Κλινική Μικροβιολογία ως αποικιστές του ανθρώπινου σώματος, ως συμπαραγόντες νόσων ή ως καθαρά παθογόνοι παράγοντες. Από αυτά, το μεγαλύτερο κλινικό ενδιαφέρον έχει η *P. aeruginosa*. (Madigan et al., 2005)

Η *P. aeruginosa* είναι αποκλειστικά αερόβιο Gram⁻ αρνητικό ραβδόμορφο βακτήριο, με ελαφρά κάμψη του σώματος. Διατάσσεται κατά μόνας ή κατά ζεύγη ή σε βραχείες αλυσίδες. Δεν έχει έλυτρο, ούτε σχηματίζει σπόρια. Έχει διαστάσεις 1.5-3μm μήκος και 0.5μm πλάτος. Παρουσιάζει κίνηση μέσω πολικών μαστιγίων. Το κυτταρικό τοίχωμα της *P. aeruginosa* είναι αυτό των Gram⁻ αρνητικών βακτηρίων και αποτελείται από λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης. Εξωτερικά από το στρώμα πεπτιδογλυκάνης υπάρχουν δύο αλληπάλληλες στοιβάδες: μια στοιβάδα λιποπρωτεΐνης και μια στοιβάδα λιποπολυσακχαριτών (LPS), γνωστή και ως στοιβάδα της εξωτερικής μεμβράνης. Η λιποπρωτεΐνη λειτουργεί σαν άγκυρα μεταξύ της στοιβάδας της πεπτιδογλυκάνης και της εξωτερικής μεμβράνης. Η εξωτερική μεμβράνη έχει δύο στοιβάδες και αποτελείται από λιποπολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες. Η εξωτερική στοιβάδα έχει πόρους που σχηματίζονται από πρωτεΐνες και ονομάζονται πορίνες. Οι πόροι αυτοί επιτρέπουν τη δίοδο διαφόρων μορίων μικρού μοριακού βάρους σακχάρων, αμινοξέων και άλλων ουσιών. Τη στοιβάδα των λιποπολυσακχαριτών αποτελεί ο Ο-πολυσακχαρίτης και το λιπίδιο Α στο οποίο είναι

προσκολλημένος ο Ο-πολυσακχαρίτης. Οι μονάδες αυτές είναι γραμμικοί τρισακχαρίτες ή διακλαδούμενοι τετρα- ή πεντα- σακχαρίτες και καθορίζουν την αντιγονική ειδικότητα του μικροβίου. (Madigan et al., 2005)

Οι τροφικές απαιτήσεις της *P. aeruginosa* είναι μικρές και αναπτύσσεται εύκολα σε κοινά πεπτονούχα θρεπτικά υλικά, όπως ο θρεπτικός ζωμός και το θρεπτικό άγαρ. Στο αιματούχο άγαρ μερικά στελέχη προκαλούν αιμόλυση. Αναπτύσσεται επίσης στα εκλεκτικά θρεπτικά υλικά των εντεροβακτηρίων όπως το MacConkey, όπου παράγει άχρωμες αποικίες διότι δεν διασπά τη λακτόζη. Επίσης χαρακτηριστική είναι η αρωματική οσμή τριμεθυλαμίνης κατά το άνοιγμα του τρυβλίου. Είναι αερόβιο βακτηρίδιο και αναπτύσσεται σε ευρέα όρια θερμοκρασίας από 4°C-42°C. Αριστη, όμως, θερμοκρασία ανάπτυξής της είναι στους 37°C. Από τις χαρακτηριστικότερες ιδιότητες της *P. aeruginosa* είναι η παραγωγή μιας ή περισσότερων χρωστικών. Οι χρωστικές αυτές δεν χρωματίζουν τις αποικίες, αλλά διαχέονται στο θρεπτικό υλικό διότι είναι υδατοδιαλυτές. Οι χρωστικές οι οποίες παράγονται είναι κυρίως η πυοκυανίνη (pyocyanin) η οποία έχει χρώμα κυανοπράσινο. Δεν παράγεται όμως πυοκυανίνη από όλα τα στελέχη της *P. aeruginosa*. Σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου παράγουν την πυοβερδίνη ένα σιδεροφόρο που δίνει στο άγαρ χρώμα κιτρινοπράσινο. (Kaysner, 2005)

1.2. Επιδημιολογία της *P. aeruginosa*

Η *P. aeruginosa* είναι ευρέως διαδεδομένη στη φύση και μπορεί να βρεθεί στο έδαφος, στο νερό, στα φυτά και στα ζώα. Γενικά, προτιμά τα περιβάλλοντα με υγρασία. Ενίοτε αποικίζει το δέρμα, το εξωτερικό τμήμα του αυτιού, τις ανώτερες αναπνευστικές οδούς και το παχύ έντερο ή πιο συχνά το ουροποιητικό σύστημα υγιών ανθρώπων. Όμως οι περισσότερες λοιμώξεις από *P. aeruginosa* αποκτώνται μέσα στο νοσοκομείο, όπου αυτή είναι υπεύθυνη για μεγάλο ποσοστό νοσοκομειακών λοιμώξεων. Πιστεύεται ότι ο μικροοργανισμός μεταδίδεται στους ασθενείς με τα χέρια του νοσηλευτικού προσωπικού ή με μολυσμένα αντικείμενα. Συνήθως βρίσκεται σε ιατρικά όργανα όπως αναπνευστήρες και ενδοσκόπια, ενώ μπορεί να βρεθεί σε κολλύρια και διαλύματα καθαρισμού χώρων, καθώς σε νεροχύτες ή πισίνες φυσιοθεραπείας. Η *P. aeruginosa* ευθύνεται για το 10% όλων των Gram⁻ αρνητικών σχετιζόμενων λοιμώξεων και συνδέεται με το 50% της θνητότητας. Επομένως η *P. aeruginosa* είναι ένα θανατηφόρο

παθογόνο βακτήριο που προκαλεί λοιμώξεις με ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας σε νοσοκομειακούς ασθενείς. (Owens et al., 2008)

Η αυξημένη θνησιμότητα αποδίδεται: α) στην παραγωγή βλεννώδους εξωπολυσακχαρίτη που παρέχει προστασία στο βακτήριο από τους ανοσιακούς μηχανισμούς του ξενιστή, β) στην παραγωγή από το βακτήριο μεγάλης ποικιλίας ενζύμων και τοξινών που είναι υπεύθυνα για την καταστροφή των ιστών του ξενιστή γ) στην εν γένη ευπάθεια των ανοσοκατεσταλμένων ασθενών, όπως αυτών με εγκαύματα, κυστική ίνωση, AIDS, προσθετικές καρδιακές βαλβίδες, και διάφορα υποκείμενα νοσήματα, και δ) στην παγκόσμια εμφάνιση πολυανθεκτικών νοσοκομειακών επιδημικών κλώνων. (Kaysner, 2005)

1.3. Αντιβιοτικά κατά της *P. aeruginosa*

Αντιβιοτικά με δράση κατά της *P.aeruginosa* βρίσκουμε στις β-λακτάμες (πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, μονοβακτάμες, καρβαπενέμες), στα αμινογλυκοσίδια, στις κινολόνες και στις πολυμυξίνες (Owens et al. 2008).

1.3.1. Β-λακτάμες

Τα αντιβιοτικά β-λακτάμης διαθέτουν ένα τετραμελή δακτύλιο που περιέχει άζωτο και παρεμβαίνουν στη σύνθεση του βακτηριακού τοιχώματος, αναστέλλοντας κυρίως τις σταυρο-συνδέσεις των πλαγίων πεπτιδικών αλυσίδων του κυτταρικού τοιχώματος (Page et al., 2000).

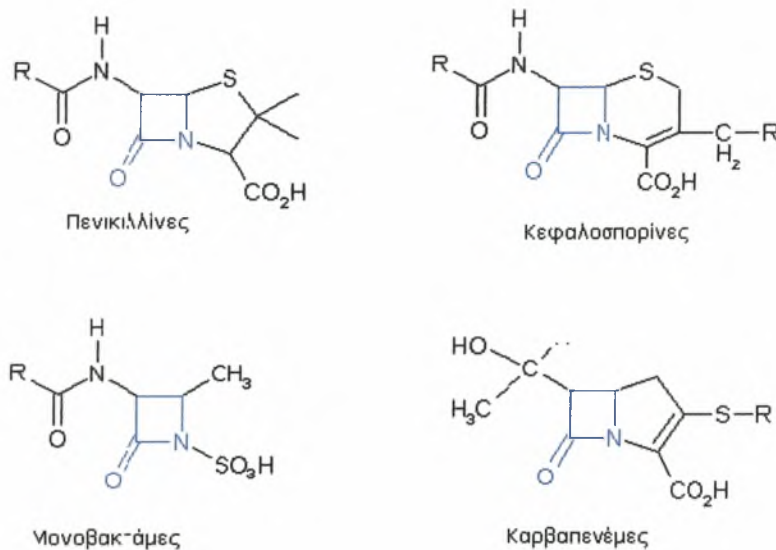
Πενικιλίνες: Οι πενικιλίνες αποτελούνται από ένα β-λακταμικό δακτύλιο, συμπυκνωμένο με ένα πενταμελή θειαζολιδινικό δακτύλιο (Page et al., 2000). Στις πενικιλίνες κατά των ψευδομονάδων διακρίνουμε δύο βασικές ομάδες, οι οποίες έχουν μελετηθεί και εφαρμοστεί θεραπευτικά, τις καρβοξυπενικιλίνες, που περιλαμβάνουν την καρμπενικιλίνη και την τικαρκιλίνη, και τις ουρεΐδοπενικιλίνες, που περιλαμβάνουν την μεζλοκιλίνη, την αζλοκιλίνη και την πιπερακιλίνη. (Owens et al., 2008 και Mesaros et al., 2007)

Κεφαλοσπορίνες: Οι κεφαλοσπορίνες αποτελούνται από ένα β-λακταμικό δακτύλιο συμπυκνωμένο με ένα εξαμελή διυδροθειαζινικό δακτύλιο. Οι διάφορες κεφαλοσπορίνες προκύπτουν από υποκαταστάσεις πλευρικών αλυσίδων στη θέση 7 του β-λακταμικού δακτυλίου και στη θέση 3 του διυδροθειαζινικού δακτυλίου (Page et al., 2000). Έχουν αναπτυχθεί τρεις ομάδες κεφαλοσπορινών με αντιψευδομοναδική δράση. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι κεφαλοσπορίνες 3ης γενιάς, όπως η κεφταζιδίμη και η κεφοπεραζόνη. Η κεφταζιδίμη είναι η πιο δραστική κεφαλοσπορίνη έναντι της *P. aeruginosa*. Στην δεύτερη ομάδα ανήκουν οι κεφαλοσπορίνες 4ης γενιάς, όπως η κεφεπίμη. Στην τρίτη ομάδα ανήκουν οι ονομαζόμενες κατεχολικές κεφαλοσπορίνες, οι οποίες όμως δεν έχουν χρησιμοποιηθεί ακόμη στην κλινική πράξη. (Owens et al., 2008)

Μονοβακτάμες: Το όνομα μονοβακτάμη είναι σύντμηση της μονοκυκλικής β-λακτάμης. Οι μονοβακτάμες αποτελούνται από ένα β-λακταμικό δακτύλιο ενωμένο με μια σουλφονική ομάδα (Page et al., 2000). Η αζτρεονάμη είναι η μόνη διαθέσιμη μονοβακτάμη με δράση ενάντια των ψευδομονάδων. Χορηγείται εναλλακτικά σε ασθενείς με γνωστή αλλεργία σε β-λακτάμες, καθώς η αζτρεονάμη δεν είναι ποτέ αλλεργιογόνος. (Owens et al., 2008)

Καρβαπενέμες: Οι καρβαπενέμες αποτελούνται από ένα β-λακταμικό δακτύλιο, συμπυκνωμένο με ένα πενταμελή πενεμικό δακτύλιο. Οι καρβαπενέμες κατέχουν το ευρύτερο φάσμα αντιμικροβιακής δράσης μεταξύ των β-λακταμικών αντιβιοτικών. Συνήθως δεν υπάρχει διασταυρούμενη αντοχή μεταξύ των καρβαπενεμών και των υπολοίπων ομάδων αντιμικροβιακών. Σε αντίθεση με τα άλλα β-λακταμικά αντιβιοτικά οι καρβαπενέμες, ιμιπενέμη και μεροπενέμη, προκαλούν την ταχεία λύση του βακτηριακού κυττάρου. Η ιμιπενέμη και η μεροπενέμη έχουν παρόμοια φαρμακοκινητική με σχεδόν ίδιες συγκεντρώσεις σε διάφορους ιστούς και υγρά του οργανισμού. Μοναδική, αλλά σημαντική εξαίρεση αποτελεί η διάσπαση της ιμιπενέμης στους νεφρούς από μια ανθρώπινη β-λακταμάση, τη δεϋδροπεπτιδάση -1, σε ένα νεφροτοξικό μεταβολίτη. Γι' αυτό χορηγείται πάντα με το φάρμακο σιλοστατίνη, η οποία είναι εκλεκτικός αναστολέας της νεφρικής β-λακταμάσης. Το εμπορικό σκεύασμα περιέχει καθορισμένη αναλογία ιμιπενέμης:σιλοστατίνης. Η μεροπενέμη δεν διασπάται από την νεφρική δεϋδροπεπτιδάση-1 και δεν χρειάζεται ταυτόχρονη χορήγηση σιλοστατίνης (Page et al., 2000). Νεότερες καρβαπενέμες, όπως η πανιπενέμη, έχουν

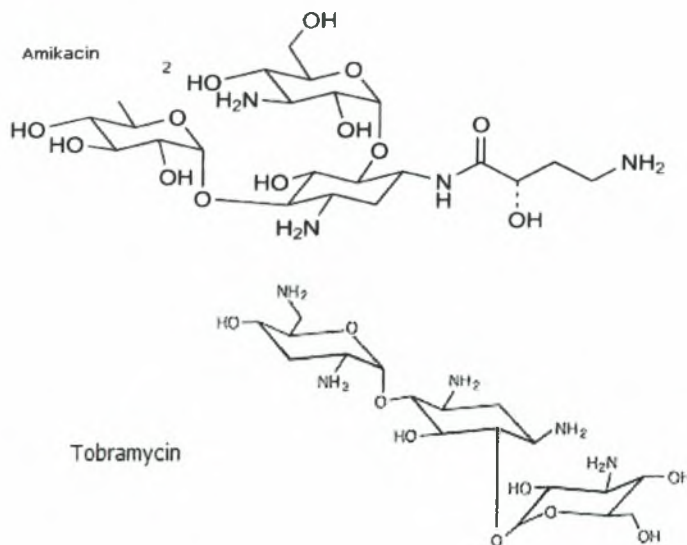
ισχυρότερη *in vitro* δραστηριότητα έναντι της *P. aeruginosa*, συμπεριλαμβάνοντας και στελέχη ανθεκτικά στην ιμιπενέμη και τη μεροπενέμη. (Katou *et al.*, 2005)



Εικόνα 1. Βασική δομή των τεσσάρων κύριων κατηγοριών αντιβιοτικών β-λακτάμης.

1.3.2. Αμινογλυκοσίδια

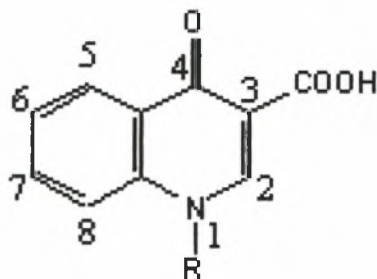
Τα αμινογλυκοσίδια αποτελούνται από δύο ή περισσότερα αμινοσάκχαρα ενωμένα μέσω γλυκοσιδικών δεσμών με ένα δακτύλιο αμινοκυκλιτόλης. Εισέρχονται στα βακτηριακά κύτταρα και δεσμεύονται μη αντιστρεπτά σε κάποια σημεία του ριβοσώματος αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση. Αποτελούν σημαντικό όπλο για την αντιμετώπιση των ψευδομοναδικών λοιμώξεων γιατί έχουν βασικά πλεονεκτήματα, όπως η εξαιρετική και ταχεία βακτηριοκτόνος δράση τους, που εξαρτάται όμως από τη συγκέντρωσή τους. Τα πλέον χρησιμοποιούμενα είναι η αμικασίνη και η τομπραμυκίνη. Έχουν συνεργική δράση όταν συνδυάζονται με αντιψευδομοναδικές πενικιλίνες και κεφαλοσπορίνες *in vitro* και *in vivo*. Όλα τα αμινογλυκοσίδια, όμως, μοιράζονται τα ίδια μειονεκτήματα, όπως νεφροτοξικότητα, ωτοτοξικότητα, φτωχή κινητικότητα στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, σε τμήματα του οφθαλμού και στον προστάτη. (Page *et al.*, 2000)



Εικόνα 2. Χημική δομή των αμινογλυκοσιδών αμικασίνη και τομπραμυκίνη.

1.3.3. Κινολόνες

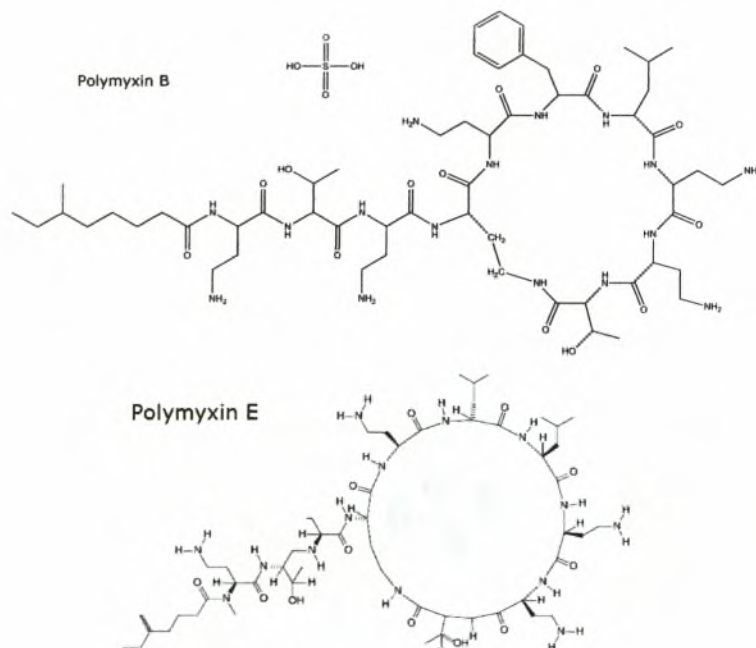
Οι κινολόνες είναι συνθετικά αντιβιοτικά που αποτελούνται από ένα βασικό σκελετό δύο συμπυκνωμένων εξαμελών δακτυλίων. Αναστέλλουν τη γυράση του βακτηριακού DNA, υπεύθυνο για την υπερέλικωση, το κόψιμο και την επανασύνδεση του βακτηριακού DNA. Η σιπροφλοξασίνη είναι η πιο δραστική έναντι της *P. aeruginosa*. (Page et al., 2000 και MacGowan et al., 1999)



Εικόνα 3. Βασική δομή των κινολονών.

1.3.4. Πολυμυξίνες

Οι πολυμυξίνες είναι μία ομάδα πολυπεπτιδικών αντιβιοτικών, που περιλαμβάνει 5 διαφορετικές χημικές ενώσεις (πολυμυξίνες Α-Ε). Είναι οκταπεπτίδια μεγάλου μοριακού βάρους, τα οποία καταστρέφουν τις κυτταρικές μεμβράνες των Gram⁻ βακτηρίων και έχουν έτσι βακτηριοκτόνο δράση. Μόνο η πολυμυξίνη Β και η πολυμυξίνη Ε (κολιστίνη ή κολιστιμεθάτη) έχουν χρησιμοποιηθεί στην κλινική πράξη. Η κολιστίνη έχει εξαιρετική βακτηριοκτόνο δράση έναντι της *P. aeruginosa*, όμως εξαιτίας της τοξικότητάς της μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο σε δύσκολες περιπτώσεις και με ιδιαίτερη προσοχή. (Page et al., 2000)



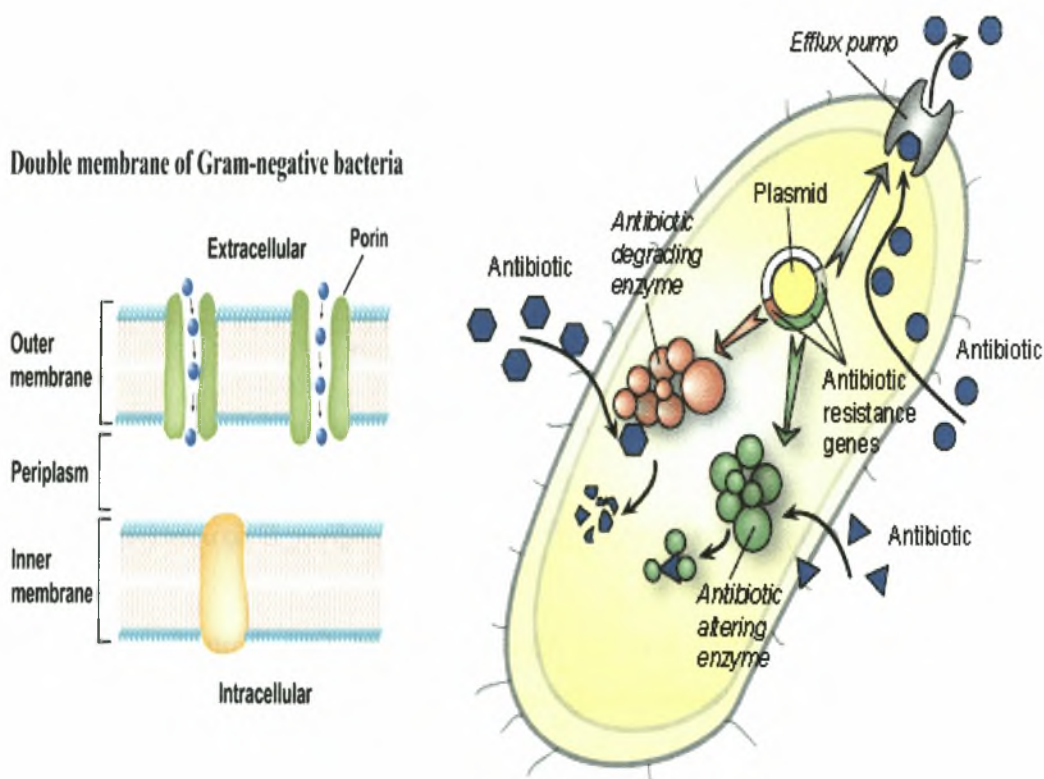
Εικόνα4. Χημική δομή της πολυμυξίνης Β και της πολυμυξίνης Ε (κολιστίνη).

Στις περισσότερες σοβαρές και απειλητικές για τη ζωή λοιμώξεις από *P. aeruginosa* πρέπει να χορηγούνται συγχρόνως δύο αντιβιοτικά, στα οποία το μολυσματικό στέλεχος είναι ή μπορεί να είναι ευαίσθητο. Συνήθως είναι κατάλληλος ο συνδυασμός αμινογλυκοσιδίου και β-λακταμικού αντιβιοτικού. Στόχοι της συνδυασμένης θεραπείας είναι να επιτευχθεί αθροιστική ή συνεργική βακτηριοκτόνος δράση, να γίνει εκμετάλλευση των φαρμακολογικών δυνατοτήτων και αντιστάθμιση των φαρμακολογικών περιορισμών του κάθε φαρμάκου και να προληφθεί η εμφάνιση

αντοχής στα αντιβιοτικά (Kayser, 2005 και Mesaros et al., 2007). Η συνεχώς όμως αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισης πολυανθεκτικών στελεχών *P. aeruginosa* στις νοσοκομειακές λοιμώξεις δημιούργησε την ανάγκη εφαρμογής νέων συνδυασμών δύο ή και περισσότερων αντιβιοτικών. Συνδυασμοί που εφαρμόστηκαν στην κλινική πράξη με θετικά αποτελέσματα σε πολυανθεκτικά στελέχη είναι η κεφτιπίμη με την αμικασίνη και η πολυμυξίνη Β με ένα ή περισσότερα αντιβιοτικά από τις αμινογλυκοσίδες, κινολόνες και β-λακτάμες (Owens et al., 2008). Όλες οι λοιμώξεις που προκαλεί η *P. aeruginosa* είναι αντιμετωπίσιμες και δυννητικά ιάσιμες, με την πιθανή εξαίρεση των λοιμώξεων του πνεύμονα σε ασθενείς με κυστική ίνωση.

1.4. Μηχανισμοί αντοχής στην *P. aeruginosa*

Η αντοχή της *P. aeruginosa* στα αντιβιοτικά διακρίνεται σε ενδογενή και επίκτητη.



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση των κυριότερων μηχανισμών αντοχής στα στελέχη *Pseudomonas aeruginosa*. Διακρίνονται η δράση των αδρανοποιητικών ενζύμων (π.χ. β-λακταμασών), πορινών και αντλιών ενεργητικής εκροής.

1.4.1. Ενδογενής αντοχή

Η ενδογενή αντοχή αφορά σε αντιβιοτικά όπως η αμπικιλίνη, η αμοξυκιλλίνη / κλαβουλανικό οξύ, οι κεφαλοσπορίνες α', β' και γ' γενιάς, πλην της κεφταζιδίμης, και οφείλεται σε μηχανισμούς όπως η μειωμένη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης και η παραγωγή β-λακταμασών τάξης AmpC. Επίσης, αφορά σε αντιβιοτικά όπως η τετρακυκλίνη, και οφείλεται στη δράση αντλίας ενεργητικής εκροής. (Owens *et al.*, 2008)

1.4.2. Επίκτητη αντοχή

Η επίκτητη αντοχή προκαλείται από οριζόντια γονιδιακή μεταφορά εξωγενούς γενετικού υλικού μέσω πλασμιδίων, ιντεγκρονίων (ενσωματονίων) κτλ. ή σε μεταλλάξεις γονιδίων του βακτηρίου και αφορά στα β-λακταμικά, στις αμινογλυκοσίδες, στις κινολόνες και στις πολυμυξίνες. Οι μηχανισμοί που υποστηρίζουν την επίκτητη αντοχή της *P. aeruginosa* διακρίνονται σε μειωμένη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης, σε απορύθμιση των αντλιών ενεργητικής εκροής και τέλος σε παραγωγή αδρανοποιητικών ενζύμων. (Owens *et al.*, 2008)

1.4.2. α) Μειωμένη διαπερατότητα εξωτερικής μεμβράνης

Η διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης στα μικροβιακά κύτταρα καθορίζεται από πρωτεΐνες που ονομάζονται πορίνες. Ο πιο συνηθισμένος μηχανισμός που παρέχει αντοχή της *P. aeruginosa* στην ιμιπενέμη είναι η απώλεια την OprD πορίνης. Πρόκειται για πρωτεΐνη της οποίας ο φυσιολογικός ρόλος είναι ο σχηματισμός πόρων στην εξωτερική μεμβράνη επιτρέποντας έτσι την είσοδο αντιβιοτικών, κυρίως των καρβαπενεμών, αλλά όχι των πενικιλινών και των κεφαλοσπορινών. Η απώλεια της πορίνης παρέχει αντοχή στην ιμιπενέμη και μείωση της ευαισθησίας στην μεροπενέμη. (Thilo *et al.*, 1999 και Pirnay *et al.*, 2002)

1.4.2. β) Απορύθμιση αντλιών ενεργητικής εκροής

Η απορύθμιση των αντλιών ενεργητικής εκροής φαρμάκων από το βακτηριακό κύτταρο αποτελεί ένα συχνό μηχανισμό αντοχής στην *P. aeruginosa*. Η συχνότερη αντλία ενεργητικής εξώθησης MexAB-OprM, που περιγράφεται σε στελέχη *P. aeruginosa* παρέχει αντοχή σε κινολόνες, πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, στην μεροπενέμη, αλλά όχι στην ιμιπενέμη. (Boutoille *et al.*, 2009)

1.4.2. γ) Παραγωγή αδρανοποιητικών ενζύμων

Οι β-λακταμάσες αποτελούν το σημαντικότερο αίτιο αντοχής των Gram-αρνητικών μικροβίων στα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Η ενζυμική τους δράση αδρανοποιεί τα β-λακταμικά αντιβιοτικά υδρολύοντας τον δακτύλιο της β-λακτάμης. Έχουν ταξινομηθεί από τους Bush, Jacoby και Medeiros σε τρεις λειτουργικές ομάδες (groups) και από τον Ambler σε μοριακές τάξεις (molecular classes) C, A, D και B. Οι κεφαλοσπορινάσες (group 1, class C), οι πενικιλινάσες και οι ευρέως φάσματος β-λακταμάσες που αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ (group 2, class A και D), οι μεταλλο-β-λακταμάσες (group 3, class B) και οι αταξινόμητες β-λακταμάσες (group 4). (*Bush et al., 1995*)

1.4.3. Οι ομάδες και οι μοριακές τάξεις των αδρανοποιητικών ενζύμων**1.4.3.α). Κεφαλοσπορινάσες (group 1, class C)**

Ορισμένα στελέχη *P. aeruginosa* παράγουν κεφαλοσπορινάσες, οι οποίες είναι ανθεκτικές στους αναστολείς των β-λακταμασών και κωδικοποιούνται από το γονίδιο *ampC*, που βρίσκεται στο χρωμοσωμικό DNA. Στα στελέχη *P. aeruginosa* υπάρχει το *ampR* γονίδιο το οποίο ρυθμίζει την έκφραση του *ampC* γονιδίου. Αυτό εκφράζεται όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε αντιβιοτικά που επάγουν την έκφραση β-λακταμασών. Οι κεφαμυκίνες και η κεφοξιτίνη, επάγουν την έκφραση της β-λακταμάσης με αποτέλεσμα την υδρόλυση του ίδιου του φαρμάκου. Το κλαβουλανικό οξύ είναι επίσης πολύ καλός επαγωγέας. Οι σουλφόνες (σουλμπακτάμη, ταζομπακτάμη) επάγουν ελάχιστα ενώ η μιπενέμη είναι πολύ καλός επαγωγέας, αλλά φτωχό υπόστρωμα για τις *ampC* β-λακταμάσες με αποτέλεσμα να διατηρεί τη δραστηριότητά της. (*Beceiro et al., 2004* και *Lister et al., 1999*)

1.4.3.β). Πενικιλινάσες και οι ευρέως φάσματος β-λακταμάσες που αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ (group 2, class A & D)

Στην ομάδα 2 κατά Bush ανήκει ο μεγαλύτερος αριθμός β-λακταμασών, που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα. Στην ομάδα αυτή ανήκουν οι πενικιλινάσες, ευρέως φάσματος β-λακταμάσες (ΕΦΒΛς), καρμπενικιλινάσες, καρβαπενεμάσες,

κεφαλοσπορινάσες που αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ και ταξινομούνται στην τάξη A κατά Ambler, όπως επίσης και οι οξακιλλινάσες, οι οποίες ταξινομούνται στην τάξη D κατά Ambler. Οι β-λακταμάσες της ομάδας 2 προσδίδουν ανοχή στις πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες 1ης, 2ης (πλην της κεφοξιτίνης) και 3^{ης} γενεάς. Τα παραπάνω ένζυμα, εκτός των καρβαπενεμασών, δεν επηρεάζουν τις καρβαπενέμες και είναι ευαίσθητα στους β-αναστολείς. Ορισμένα, όμως στελέχη βακτηρίων, λόγω υπερπαραγωγής μεγάλων ποσοτήτων β-λακταμάσης, είναι ανθεκτικά στο συνδυασμό β-λακταμών και αναστολέων. Έχουν περιγραφεί στελέχη *P. aeruginosa* να παράγουν ευρέως φάσματος β-λακταμάσες τύπου TEM και SHV. Πρόκειται για β-λακταμάσες που κωδικοποιούνται από γονίδια τα οποία προέρχονται από μεταλλάξεις γονιδίων που εκφράζουν περιορισμένου φάσματος ένζυμα, όπως τα TEM₁, TEM₂ (Knox, 1995) και SHV₁.

Τέλος, όσον αφορά στις β-λακταμάσες της τάξης A κατά Ambler, έχουν περιγραφεί στελέχη *P. aeruginosa* τα οποία παράγουν καρμπενικιλινάσες τύπου PSE. Τα ένζυμα αυτά υδρολύουν τις πενικιλίνες, αλλά δεν αδρανοποιούν τις δραστικές ενάντια σε Ψευδομονάδα κεφαλοσπορίνες, τις καρβαπενέμες και την αζτρεονάμη. Η τάξη D κατά Ambler των β-λακταμασών αντιστοιχεί σχεδόν πλήρως με τα ένζυμα που υδρολύουν την οξακιλλίνη και ταξινομούνται φαινοτυπικά ως OXA τύποι. Οι συνηθέστερες είναι οι OXA₁, OXA₂ και OXA₁₀. Από μεταλλάξεις των αρχικών OXA β-λακταμασών έχουν προκύψει νέοι τύποι OXA με ευρύ φάσμα δράσης, παρόμοιο με αυτό των ευρέως φάσματος β-λακταμασών. Μετάλλαξη της OXA₁₀ έχει ευρύ φάσμα δράσης και μπορεί να υδρολύει κεφαλοσπορίνες 3ης γενεάς και την αζτρεονάμη. Οι OXA₂₃ έως OXA₂₇ εμφανίζουν δράση έναντι και των καρβαπενεμών. (Walther-Rasmussen *et al.*, 2007, Héritier *et al.*, 2005, και Jacoby, 2009)

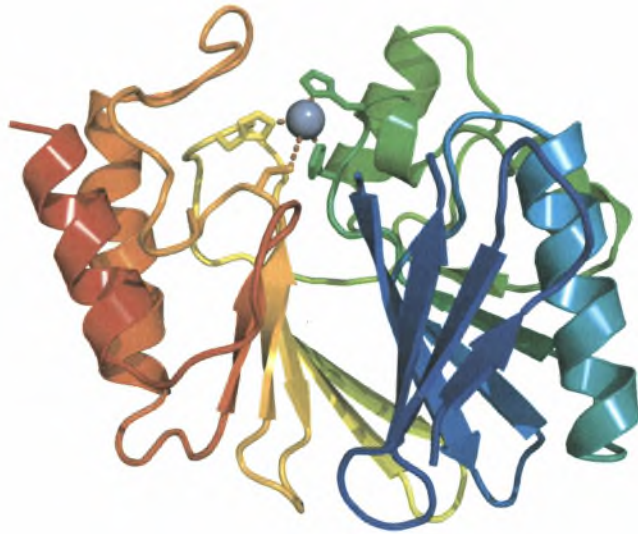
1.4.3.γ). Μεταλλο-β- λακταμάσες (group 3, class B)

Οι μεταλλο-β-λακταμάσες συνιστούν την ομάδα 3 κατά Bush (Τάξη B κατά Ambler). Έως και σήμερα έχουν περιγραφεί 5 υποτάξεις επίκτητων μεταλλο-β-λακταμασών, που ονομάζονται IMP, VIM, SPM, GIM και SIM. Οι υποτάξεις SPM, GIM και SIM περιλαμβάνουν μόνο έναν τύπο ενζύμου και έχουν περιγραφεί στην Αμερική, τη Γερμανία και την Κορέα, αντίστοιχα. Αντίθετα, οι υποτάξεις VIM και IMP

περιλαμβάνουν 22 και 26 ένζυμα, αντίστοιχα και παρουσιάζουν παγκόσμια διασπορά. Η πρώτη IMP μεταλλο-β-λακταμάση έχει περιγραφεί σε στελέχη *Serratia marcescens* και *P. aeruginosa*, ενώ η πρώτη VIM μεταλλο-β-λακταμάση έχει περιγραφεί σε στελέχη *P. aeruginosa*. Η παραγωγή μεταλλο-β-λακταμασών από στελέχη *P. aeruginosa* παρέχει αντοχή στις καρβαπενέμες (ιμιπενέμη και μεροπενέμη), στις αντιψευδομοναδικές κεφαλοσπορίνες, συμπεριλαμβανομένης και της κεφεπίμης και στις αντιψευδομοναδικές πενικιλίνες. Αυτές οι β-λακταμάσες δεν καταστρέφουν την αζτρεονάμη και δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ. Οι μεταλλο-β-λακταμάσες χρειάζονται μεταλλικά κατιόντα, συνήθως ψευδαργύρου, ως συμπαράγοντα για να μπορέσουν να δράσουν. (*Walsh et al., 2005*)

Οι μέταλλο-β-λακταμάσες έχουν μια ξεχωριστή ακολουθία αμινοξέων που καθορίζει την αρχιτεκτονική του ενεργού κέντρου που συντονίζει τα ιόντα ψευδάργυρου. Το μοτίβο δέσμευσης του ψευδαργύρου HXHXD (όπου X οποιοδήποτε αμινοξύ και H η Ιστιδίνη) διατηρείται συντηρημένο σε όλες τις μεταλλο-β-λακταμάσες ενώ η υπόλοιπη αμινοξική τους αλληλουχία ποικίλλει σημαντικά, με ποσοστό ομοιότητας της τάξης 25%-30%.

Μέσω κρυσταλλογραφικών μελετών, παρά την χαμηλή τους αμινοξική ομοιότητα, όλες οι μεταλλο-β-λακταμάσες έχουν παρόμοια τρισδιάστατη διαμόρφωση που αντιπροσωπεύεται από μία αββα δομή με δύο επιφάνειες β-πτυχωτών φύλλων 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. Όμως παρά τα κοινά χαρακτηριστικά αναδίπλωσης και αρχιτεκτονικής του ενεργού τους κέντρου, η δεσμευτική και η υδρολυτική ικανότητα μεταξύ των μέταλλο-β-λακταμασών, ποικίλει σημαντικά. (*Bebrone et al., 2007, Page et al., 2008 και Gilson et al., 1999*)



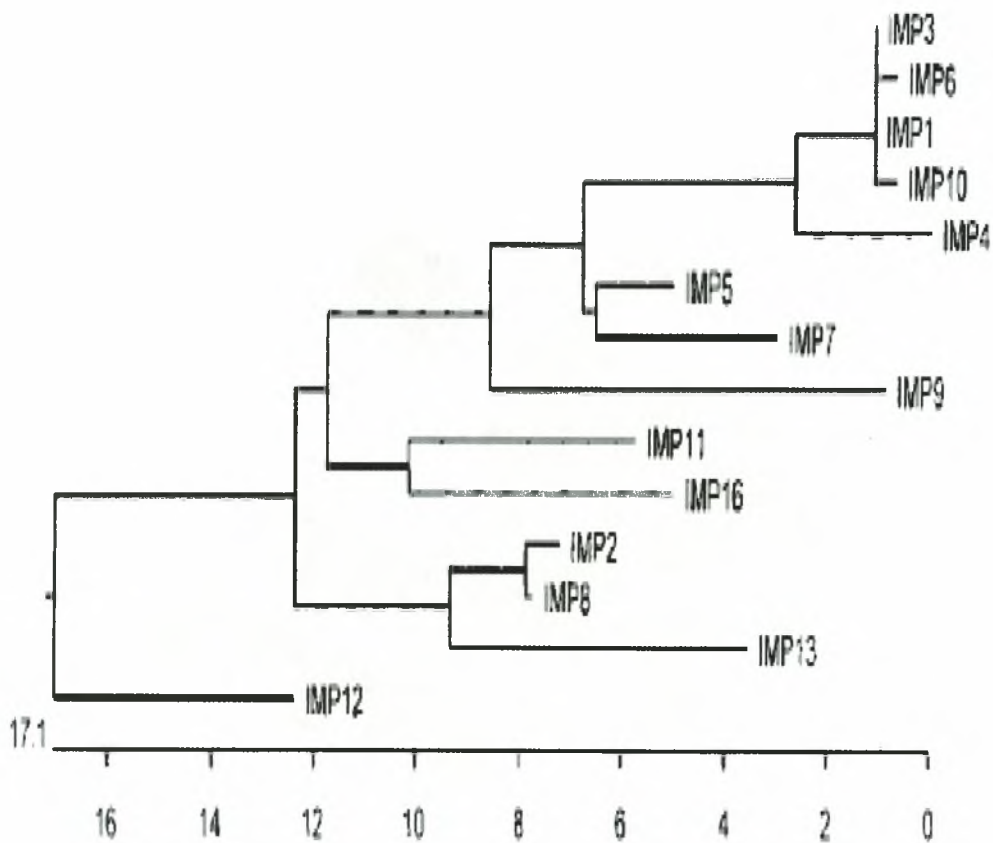
Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση κρυσταλλογραφικής δομής μέταλλο-β-λακταμάσης από το βακτήριο *Bacteroides fragilis*. Το ιόν Zn συμβολίζεται σαν μια γκρι σφαίρα (Wang et al., 1999).



Εικόνα 7. Σχηματική αναπαράσταση της τριτοταγής δομής της μέταλλο-β-λακταμάσης IMP_1 απομονωμένη από *P. aeruginosa* (Concha et al., 2000).

Παρατηρείται εκτεταμένη διάδοση των bla_{VIM} και bla_{IMP} γονιδίων μεταξύ κλινικά σημαντικών Gram⁻ αρνητικών βακτηρίων σε ολόκληρο τον κόσμο, με τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια να εντοπίζονται σε ιντεγκρόνια τάξης 1 σε συνδυασμό με άλλα

γονίδια αντοχής. Οι παραλλαγές του γονιδίου τύπου *IMP* μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τέσσερις ομάδες που αντιπροσωπεύονται από το *IMP*₁, *IMP*₂, *IMP*₅ και *IMP*₁₁ αντίστοιχα. Η ομάδα *IMP*₁ περιλαμβάνει τα *IMP*₃, *IMP*₄, *IMP*₆, *IMP*₁₀ και το *IMP*₂₆, η ομάδα *IMP*₂ περιλαμβάνει τα *IMP*₈, *IMP*₁₃, *IMP*₁₉, *IMP*₂₀ και *IMP*₁₄, η ομάδα *IMP*₅ περιλαμβάνει τα *IMP*₇, *IMP*₉, *IMP*₁₅ και *IMP*₂₅, ενώ η ομάδα *IMP*₁₁ περιλαμβάνει τα *IMP*₁₆, *IMP*₂₁ και *IMP*₂₂. Τα *IMP*₁₄ και *IMP*₁₈ μπορούν να θεωρηθούν μια ακόμα ξεχωριστή ομάδα. Το *IMP*₁₂ αποκλίνει φανερά από τους υπόλοιπους τύπους *IMP*, καθώς διαφέρει σε 36 αμινοξέα σε σχέση με το *IMP*₁. (Walsh *et al.*, 2005).



Εικόνα 8. Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ μέταλλο-β-λακταμασών τύπου *IMP* (Walsh *et al.*, 2005)

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	?
		Japan	Class 3?
		Japan	Class 1
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Japan	?
		Korea	?
		Japan	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	Class 1
	<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	Class 1	
	Japan	?	
<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	
<i>Acinetobacter spp.</i>	England	?	
	Italy	Class 1	
	Japan	Class 1	
IMP-2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Japan	Class 1
		Japan	Class 1
		Japan	Class 1
IMP-3	<i>Shigella flexneri</i>	Japan	Class 1
		Japan	Class 1
		Japan	Class 1
IMP-4	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Hong Kong	Class 1
		Hong Kong	Class 1
		Hong Kong	Class 1
IMP-5	<i>Citrobacter freundii</i>	Australia	Class 1
		Australia	Class 1
		Australia	Class 1
IMP-6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	China	Class 1
		Australia	?
		Australia	?
IMP-7	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Portugal	Class 1
		Brazil	?
		Japan	Class 1
IMP-8	<i>Serratia marcescens</i>	Canada	Class 1
		Malaysia	Class 1
		Malaysia	Class 1
IMP-9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Taiwan	Class 1
		Taiwan	Class 1
		Taiwan	Class 1
IMP-10	<i>Enterobacter cloacae</i>	Taiwan	Class 1
		Taiwan	Class 1
		Taiwan	Class 1
IMP-11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Taiwan	Class 1
		Taiwan	Class 1
		Taiwan	Class 1
IMP-12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	China	Class 1
		China	Class 1
		China	Class 1
IMP-13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japan	Class 1
		Japan	Class 1
		Japan	Class 1
IMP-14	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	Japan	?
		Japan	?
		Japan	?
IMP-15	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Japan	?
		Japan	?
		Japan	?
IMP-16	<i>Pseudomonas putida</i>	Italy	Class 1
		Italy	Class 1
		Italy	Class 1
IMP-17	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Italy	Class 1
		Italy	Class 1
		Italy	Class 1
IMP-18	?	?	?
		?	?
		?	?
IMP-19	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Brazil	Class 1
		Brazil	Class 1
		Brazil	Class 1
IMP-20	?	?	?
		?	?
		?	?
IMP-21	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	USA	?
		USA	?
		USA	?

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Προέλευση MBLs τύπου IMP και βακτήρια στα οποία πρωτοαπομονώθηκαν (Walsh et al., 2005).

Τέλος, αξίζει να αναφέρουμε και μία διαφορετική ομάδα αδρανοποιητικών ενζύμων, που μπορούν να παραχθούν από στελέχη *P. aeruginosa*, είναι τα αμινογλυκοσιδο-τροποποιητικά ένζυμα, τα οποία παρέχουν αντοχή στις αμινογλυκοσίδες. Τρεις τάξεις ενζύμων ανήκουν στην ομάδα αυτή: οι φωσφοροτρανσφεράσες (APH), οι νουκλεοτιδυλοτρανσφεράσες (ANT) και οι ακετυλοτρανσφεράσες (AAC). Οι δύο πρώτες καταλύουν τη φωσφορυλίωση και τη νουκλεοτιδυλίωση των υδροξυλικών ομάδων (OH), ενώ η τελευταία καταλύει την ακετυλίωση των αμινικών ομάδων. Η γενετική προέλευση αυτών των ενζύμων όπως και των μέταλλο-β-λακταμασών είναι συχνά πλασμιδιακή, σχετιζόμενη ή όχι με τρανσποζόνια, γεγονός που εξηγεί τη σημαντική μερικές φορές διασπορά τους μέσα σε πολυάριθμα είδη. Η διασπορά αυτή μπορεί να είναι, επίσης, αποτέλεσμα ύπαρξης ιντεγκρονίων (ενσωματονίων) μέσα στα τρανσποζόνια ή στα πλασμίδια. (*Owens et al., 2008, Shaw et al., 1989, Wu et al., 2009, και Lingzli et al., 2009*).

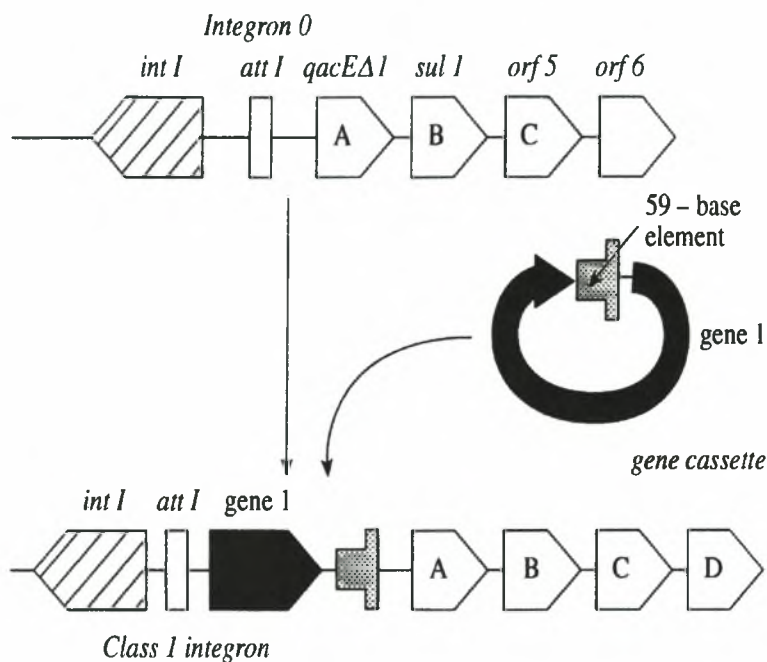
Είδος αμινογλυκοσιδο-τροποποιητικού ενζύμου	Φαινότυπος Αντοχής
AAC(6')-I	T, N, A
AAC(6')-II	G, T, N
AAC(3)-I	G
AAC(3)-II	G, T, N
AAC(3)-III ή ANT(2')	G, T
AAC(3)-IV	G, T, N
AAC(3')-?	G, N
ANT(2'')-I	G, T
ANT(4')-II	T, A, I
APH(3')-VI	A, I

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Τα αμινογλυκοσιδο-τροποποιητικά ένζυμα που έχουν απομονωθεί μέχρι σήμερα και τα αντιβιοτικά στα οποία εμφανίζουν αντοχή. T: τομπραμυκίνη, N: νετιμικίνη, A: αμικασίνη, G: γενταμικίνη, I: ισεπαμικίνη.

1.5. Ιντεγκρόνια

1.5.1. Δομή και Μηχανισμός δράσης ιντεγκρονίων

Τα ιντεγκρόνια (ενσωματόνια) είναι δυνητικά κινητά γενετικά στοιχεία, που διακρίνονται σε τρεις τάξεις και αποτελούνται στα άκρα τους από σταθερές αλληλουχίες. Το 5' άκρο, μεγέθους περίπου 1,5kb, περιλαμβάνει ένα γονίδιο ιντεγκράσης (ενσωματάσης) (*intI1*), ένζυμο που καταλύει τον τοποειδικό ανασυνδυασμό γονιδιακών κασετών στη συντηρημένη αλληλουχία *attI*, που βρίσκεται μερικές βάσεις ανοδικά (upstream) των γονιδίων αντοχής. Το σταθερό τμήμα στο 3' άκρο του ιντεγκρονίου, μεγέθους περίπου 2kb, περιλαμβάνει το ελλίπες γονίδιο αντοχής στο αντισηπτικό τεταρτοταγές αμμώνιο (*qacEΔ1*), που είναι συντηγμένο μαζί με ένα γονίδιο αντοχής στην σουλφοναμίδη (*sulI*), ενώ μετά υπάρχουν δύο αναγνωστικά πλαίσια *orf5* και *orf6* που κωδικοποιούν πρωτεΐνες αγνώστου λειτουργίας. Στο ενδιάμεσο μεταβλητό τμήμα μπορούν να ενσωματωθούν γονιδιακές κασέτες, οι οποίες περιλαμβάνουν ένα γονίδιο αντοχής έναντι κάποιου αντιμικροβιακού παράγοντα και ένα τμήμα ανασυνδυασμού στο 3' άκρο τους. Το γονίδιο ιντεγκράσης διαθέτει εκκινητή, ενώ οι γονιδιακές κασέτες δεν διαθέτουν δικούς τους εκκινητές και το γονίδιο τους μπορεί να εκφραστεί όταν βρεθεί μεταξύ του *attI*, το οποίο βρίσκεται στο 3' άκρο του γονιδίου ιντεγκράσης, και του *attC* ή 59 base element (συντηρημένο στοιχείο 59 βάσεων). Ο υποκινητής του ιντεγκρονίου επιτρέπει την έκφραση αυτών των γονιδίων παρέχοντας το υψηλότερο επίπεδο έκφρασης στο γονίδιο που βρίσκεται πλησιέστερα σ' αυτόν. Συνεπώς, η έκφραση των γονιδίων εξαρτάται από τον κατάλληλο προσανατολισμό και τη θέση εισχώρησής τους στο ιντεγκρόνιο. Όσο πιο κοντά στον υποκινητή βρίσκονται, εξασφαλίζουν σταθερή και υψηλού βαθμού έκφραση, ενώ τα πιο απομακρυσμένα έχουν ασθενέστερη ή και ανύπαρκτη έκφραση. Οι γονιδιακές κασέτες σε ένα ιντεγκρόνιο μπορούν να επανατοποθετηθούν με αποκοπή και επανενσωμάτωση, έτσι ώστε τα γονίδια που κωδικοποιούν την παραγωγή ενζύμων για αντοχή στα αντιμικροβιακά και είναι απαραίτητα για την επιβίωση του μικροοργανισμού να βρεθούν κοντά στον εκκινητή και να εξασφαλίσουν το υψηλότερο επίπεδο έκφρασής τους (Bennett, 1999).



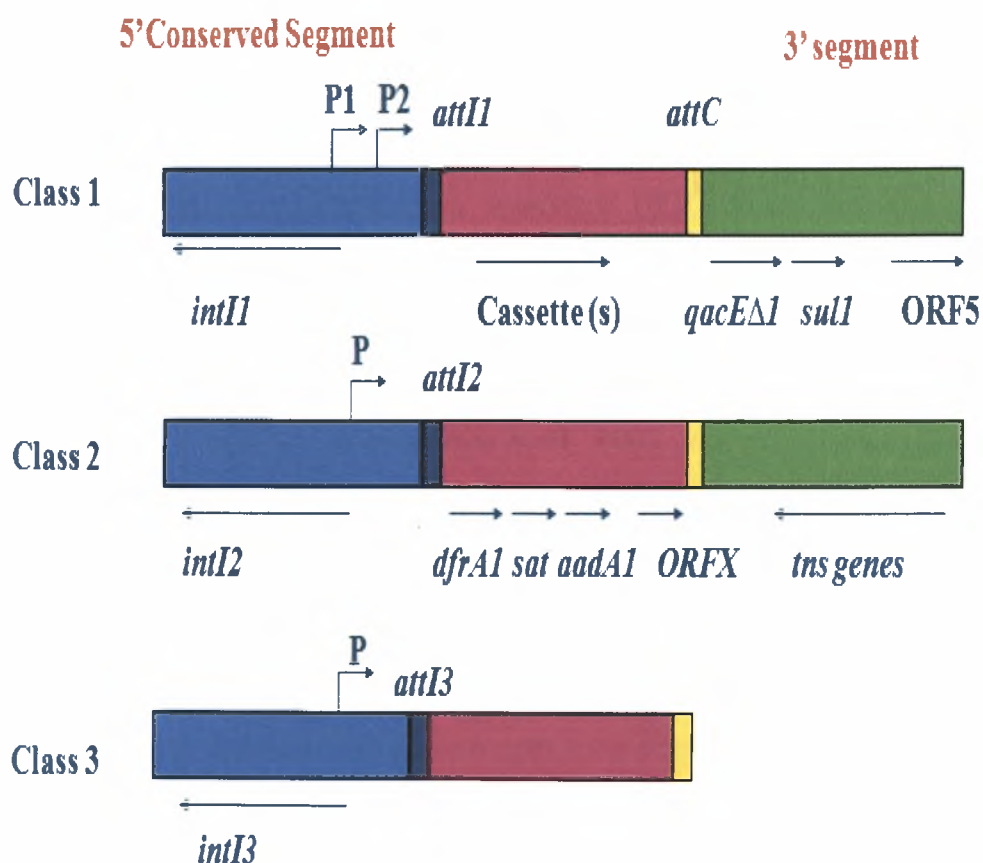
Εικόνα 8. Δομή ιντεγκρονίου τάξης 1 και σχηματική αναπαράσταση της ενσωμάτωσης γονιδιακών κασετών σε ιντεγκρονικές δομές. Διακρίνονται η 5'-CR (*intI*) και η 3'-CR (*qacEΔ1/sulI*) περιοχή καθώς και τα απαραίτητα *cis*-στοιχεία (*attI* και 59-base element) για τον ανασυνδυασμό (Benett, et al., 1999) .

1.5.2. Κατηγορίες Ιντεγκρονίων

Τα ιντεγκρόνια μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κύριες ομάδες. Τα ιντεγκρόνια αντοχής (RI – Resistance Integrons) και τα υπέρ-ιντεγκρόνια (SI – Super Integrons) (Fluit et al., 2004).

- Τα RI περιέχουν κυρίως γονιδιακές κασέτες που κωδικοποιούν αντοχή έναντι αντιβιοτικών. Τα ιντεγκρόνια αυτά μπορούν να ενσωματωθούν είτε στο βακτηριακό χρωμόσωμα είτε σε πλασμίδια και τρανσποζόνια.
- Τα SI, υπέρ-ιντεγκρόνια είναι ουσιαστικά μεγάλα ιντεγκρόνια που ενσωματώνονται στο βακτηριακό χρωμόσωμα και περιέχουν γονιδιακές κασέτες ποικίλων λειτουργιών, συνήθως περισσότερες από 100 γονιδιακές κασέτες.

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. Το ιντεγκρόνιο τάξης 2 χαρακτηρίστηκε στο τρανσποζόνιο Tn7 και περιλαμβάνει τρεις γονιδιακές κασέτες δίπλα σε ένα ελαττωματικό γονίδιο ιντεγκράσης, ενώ δεν έχει 3' άκρο. Όσον αφορά τα ιντεγκρόνια τάξης 3, η δομή τους είναι παρόμοια με αυτή των τάξης 2 ιντεγκρονίων, και ανευρίσκονται πιο σπάνια. (Benett, 1999)



Εικόνα 9. Σχηματικές δομές των ιντεγκρονίων τάξης 1, τάξης 2 και τάξης 3.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός αυτής της εργασίας ήταν η διερεύνηση της γενετικής δομής του γονιδίου αντοχής στις καρβαπενέμες τύπου IMP (μέταλλο-β-λακταμάση), 6 γενετικά συγγενικών κλινικών στελεχών *P. aeruginosa* από 6 ασθενείς νοσοκομείου της Γερμανίας, που εμφάνιζαν υψηλά επίπεδα αντοχής στις καρβαπενέμες (ιμιπενέμη - μεροπενέμη). Πρωταρχικός σκοπός ήταν η απομόνωση ολόκληρου του *IMP* γονιδίου, το οποίο δεν είχε καταστεί δυνατόν με προηγούμενες προσπάθειες, αλλά τα αποτελέσματα έδειχναν ότι πιθανόν να πρόκειται για ένα καινούργιο ένζυμο τύπου bla_{IMP}. Επίσης, η διερεύνηση τυχόν σημειακών μεταλλάξεων στο γονίδιο της *IMP* β-λακταμάσης, ανάμεσα στις αλληλουχίες των κλινικών στελεχών, καθώς και μια χαρτογράφηση του ιντεγκρονίου στο οποίο είναι το γονίδιο του bla_{IMP}. Τέλος, διερεύνηση πιθανών νέων αμινοξικών αλλαγών στην αλληλουχία της νέας αυτής πρωτεΐνης IMP σε σχέση με την πρωτεϊνική αλληλουχία των μέχρι τώρα απομονωμένων bla_{IMP} πρωτεϊνών.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1.1. Βακτηριακά στελέχη

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 6 κλινικά στελέχη *Pseudomonas aeruginosa*, που απομονώθηκαν από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της πόλης Muenster της Γερμανίας, το έτος 2005. Τα 6 αυτά κλινικά στελέχη: στέλεχος 1747, στέλεχος 1766, στέλεχος 1773, στέλεχος 1766, στέλεχος 1836 και στέλεχος 1876, παρουσίαζαν υψηλή αντοχή σε ιμιπενέμη και μεροπενέμη, ενώ είχαν θετικό φαινότυπο για παραγωγή μέταλλο-β-λακταμάσης μέσω του E-test MBL (AB Biodisk, Solna Sweden). Επίσης, μέσω ηλεκτροφόρησης εναλλασσόμενου πεδίου (Pulsed Field Electrophoresis), βρέθηκε ότι τα έξι αυτά κλινικά στελέχη προέρχονται από τον ίδιο επιδημικό κλώνο.

Αρχή της ηλεκτροφόρησης εναλλασσόμενου πεδίου

Η ηλεκτροφόρηση εναλλασσόμενου πεδίου είναι μια τεχνική ηλεκτροφόρησης, υψηλής διαχωριστικής ικανότητας, για το διαχωρισμό πολύ μεγάλων κλασμάτων DNA (megabase) που προκύπτουν από πέψη του χρωμοσώματος των υπό μελέτη

μικροοργανισμών με περιοριστικές ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν «σπάνιες» θέσεις του χρωμοσώματος (*Lai et al. 1989*). Ηλεκτρικά πεδία που απέχουν μεταξύ τους κατά 120° (η γωνία μπορεί να ποικίλει) εφαρμόζονται εναλλάξ στη πηκτή διαχωρισμού. Η συνεχής αλλαγή κατεύθυνσης παρεμποδίζει τον ευθυγραμμισμό των μορίων σε ένα ηλεκτρικό πεδίο και βελτιώνει σημαντικά τον διαχωρισμό κατά μήκος του άξονα μεταξύ των δύο πεδίων. Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της PFGE έχουν θεσπιστεί κριτήρια, με βάση των οποίων συγκρίνονται οι διαφορές στα πρότυπα πέψεων μεταξύ διαφορετικών βακτηρίων που απομονώνονται και του πιθανού επιδημικού στελέχους και εκτιμάται η πιθανότητα να προέρχονται τα βακτήρια αυτά από τον ίδιο επιδημικό κλώνο.

3.1.2. Έλεγχος της ευαισθησίας σε αντιβιοτικά

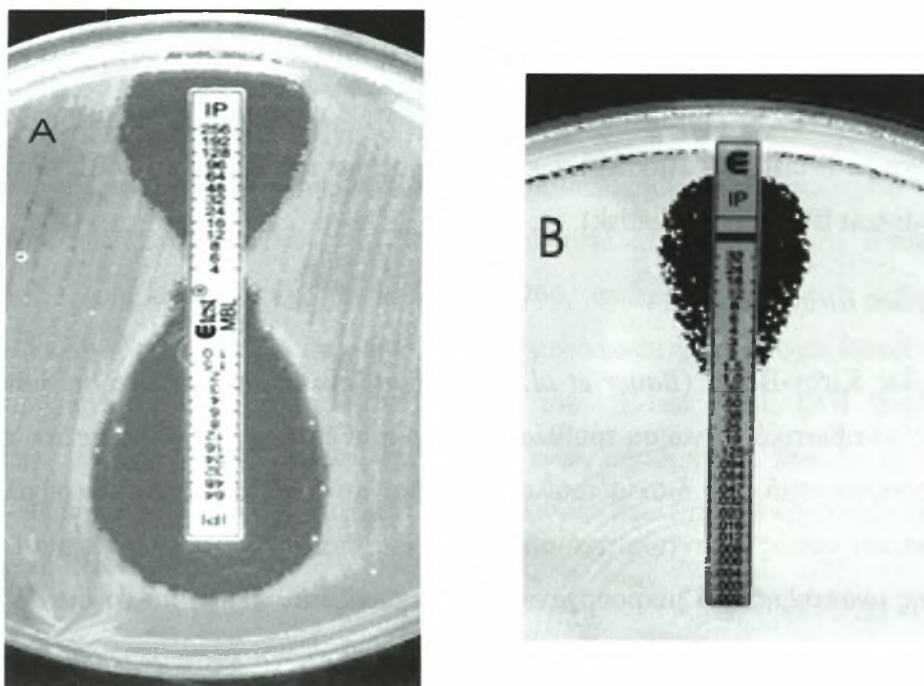
Ο έλεγχος της ευαισθησίας των έξι αυτών στελεχών έγινε σε ένα εύρος β-λακταμικών αντιβιοτικών με τη μέθοδο Kirby-Bauer. Ανάμεσα στα β-λακταμικά που εξετάστηκαν ήταν οι καρβαπενέμες, ιμιπενέμη (IP) και μεροπενέμη (MEM), το αμινογλυκοσίδιο, γενταμικίνη (GM) και η πενικιλίνη, πιπερακιλλίνη (PIP). Επίσης, η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) για την ιμιπενέμη και μεροπενέμη, προσδιορίστηκε με E-test (AB Biodisk), ενώ ο έλεγχος για την παρουσία MBL έγινε με E-test MBL (E-test IP/IPI, AB Biodisk).

Αρχή της μεθόδου Kirby-Bauer

Η μέθοδος Kirby-Bauer (*Bauer et al. 1966*) βασίζεται στην τοποθέτηση δισκίων που περιέχουν αντιβιοτικό, πάνω σε τρυβλία με άγαρ που έχουν επιστρωθεί με τον προς εξέταση μικροοργανισμό. Τα δισκία απελευθερώνουν το αντιβιοτικό στο περιβάλλον θρεπτικό μέσο και καθώς το αντιβιοτικό αρχίζει να διαχέεται μέσα στο άγαρ, μία ζώνη αναστολής της ανάπτυξης του μικροοργανισμού σχηματίζεται γύρω από το δισκίο του αντιβιοτικού στην περίπτωση που οργανισμός είναι ευαίσθητος σε αυτό. Η μέθοδος αυτή είναι μια ποιοτική μέθοδος για τον κατά προσέγγιση υπολογισμό της επίδρασης του αντιβιοτικού στην αύξηση του μικροοργανισμού.

Αρχή της μεθόδου E-test και της μεθόδου E-test MBL

Η μέθοδος E-test (*Sader et al., 1994*) βασίζεται στην τοποθέτηση ταινιών εμβαπτισμένες με αντιβιοτικό, πάνω σε τρυβλία με άγαρ που έχουν επιστρωθεί με τον προς εξέταση μικροοργανισμό. Κατά τη διάρκεια της επώασης, το αντιβιοτικό διαχέεται στο άγαρ διαμορφώνοντας έτσι μια ζώνη αναστολής. Υπάρχει μια διαβαθμισμένη συγκέντρωση του αντιβιοτικού 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 τέμνει την ταινία E-test. Όσον αφορά τη μέθοδο E-test IP/IPI (E-test MBL) για την ανίχνευση MBL, βασίζεται στη συνύπαρξη σε μία ταινία E-test, μιας διαβαθμισμένης συγκέντρωσης της ιμιπενέμης (IP) και μιας διαβαθμισμένης συγκέντρωσης της ιμιπενέμης παρουσία EDTA (IPI), το οποίο αναστέλλει τη δράση των β-λακταμασών. Στη συνέχεια υπολογίζεται ο λόγος των MIC IP/IPI ή η διαφορά τους και αν ο λόγος $IP/IPI \geq 8$ ή η διαφορά ≥ 3 τότε είναι θετική η παρουσία μέταλλο-β-λακταμασών.



Εικόνα 10. Στην εικόνα A παρουσιάζεται η τυπική εικόνα ενός E-test MBL (IP/IPI) και στην εικόνα B, η εικόνα ενός E-test IP.

3.1.3. Απομόνωση γενωμικού DNA από τα κλινικά στελέχη

Πιθανότατα το νέο γονίδιο *IMP* να βρίσκεται στο χρωμοσωμικό DNA των κλινικών στελεχών. Η απομόνωση γενωμικού DNA έγινε από 6ml O/N (overnight) υγρής καλλιέργειας κυττάρων των 6 κλινικών στελεχών, σε TSB (Tryptic Soy Broth της Whatman) στους 37⁰C, χρησιμοποιώντας το kit της Qiagen DNA Extraction Blood Mini Kit, σύμφωνα με το πρωτόκολλο απομόνωσης βακτηριακού DNA.

3.1.4. Απομόνωση *bla_{IMP}* γονιδίου

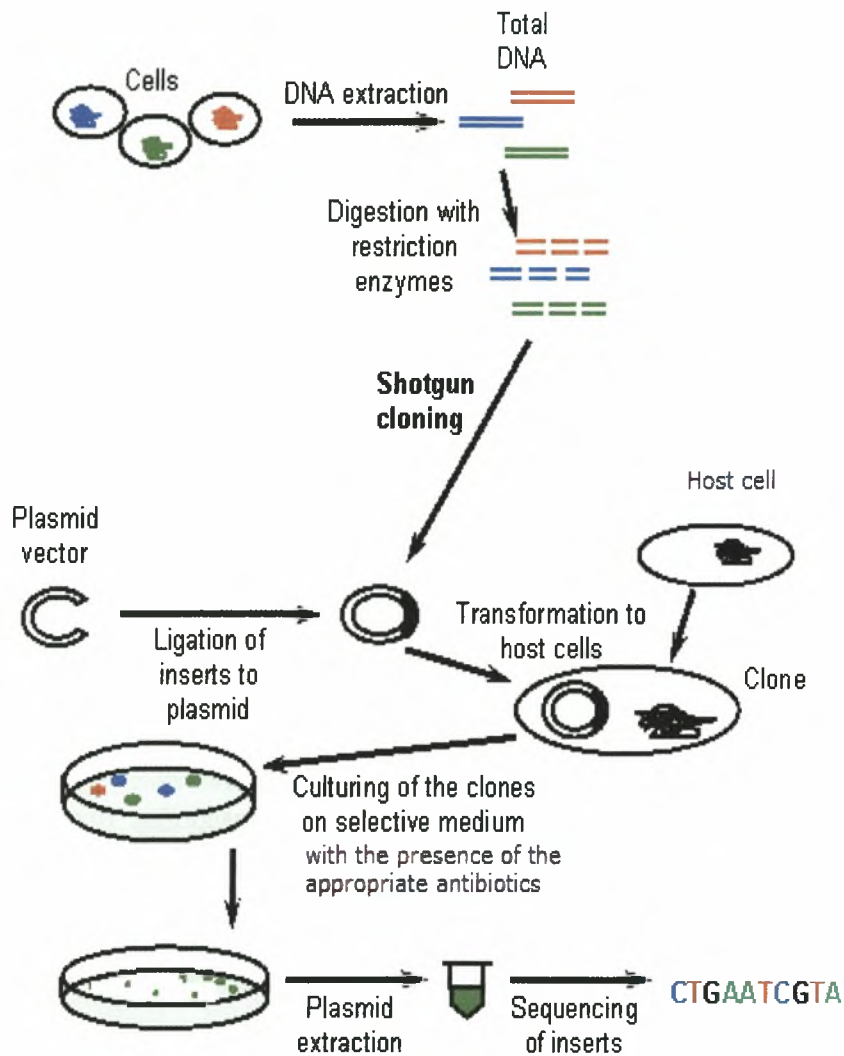
Ήδη με προηγούμενες προσπάθειες είχε απομονωθεί μέρος του *bla_{IMP}* γονιδίου περίπου 580 βάσεις από τις 741 που βρήκαμε τελικά ότι είχε. Για την απομόνωση ολόκληρου του γονιδίου ακολουθήσαμε δύο στρατηγικές, η μία μέσω κλωνοποίησης τυχαίας προσπέλασης (shotgun cloning) και η άλλη μέσω PCR (Polymerase Chain Reaction PCR) ή Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

3.2. Απομόνωση γονιδίου *bla_{IMP}* μέσω κλωνοποίησης τυχαίας προσπέλασης

Αρχή της μεθόδου Κλωνοποίησης τυχαίας προσπέλασης

Η πρώτη στρατηγική που ακολουθήσαμε, για να απομονώσουμε όλο το γονίδιο *bla_{IMP}* από τα στελέχη, είναι μέσω shotgun cloning ή αλλιώς κλωνοποίηση τυχαίας προσπέλασης (Watson et al., 2006). Η μέθοδος αυτή αναλύεται ως εξής, πέψη του χρωμοσωμικού DNA των 6 στελεχών με ένα ένζυμο περιορισμού, έπειτα πέψη κατάλληλου πλασμιδίου με το ίδιο ένζυμο περιορισμού και το οποίο να κόβει μόνο μια φορά το πλασμίδιο, στη συνέχεια αντίδραση λιγκάσης (ligation) κομμένου χρωμοσωμικού DNA με το κομμένο πλασμίδιο και τέλος εισαγωγή του πλασμιδίου μαζί με το ένθεμα σε κατάλληλα δεκτικά βακτηριακά κύτταρα (competent cells). Η είσοδος πλασμιδίου σε κύτταρα μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους, ένας τρόπος και αυτός που χρησιμοποιήσαμε, είναι μέσω ηλεκτροδιάτρησης. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι παρουσία ηλεκτρικού πεδίου, δημιουργούνται παροδικές οπές στα βακτήρια επιτρέποντας έτσι την είσοδο μέσα σε αυτά ξένων μορίων όπως πλασμίδια. Η επιλογή των κυττάρων που έχουν το πλασμίδιο μαζί με το ένθεμα γίνεται σε τρυβλία που περιέχουν 2 αντιβιοτικά. Το πρώτο αντιβιοτικό θα είναι ίδιο με αυτό στο οποίο προσδίδει αντοχή το γονίδιο αντοχής του πλασμιδίου ενώ το δεύτερο αντιβιοτικό θα είναι ίδιο με

αυτό που προσδίδει αντοχή το γονίδιο *bla_{IMP}* που θέλουμε να απομονώσουμε. Τα παραπάνω φαίνονται στην εικόνα που ακολουθεί, εικόνα 11.

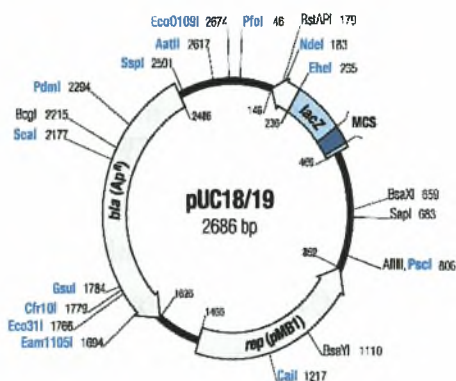


Εικόνα 11. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας *shotgun cloning* που ακολουθήθηκε για την απομόνωση του *bla_{IMP}* γονιδίου. (Η εικόνα είναι από το δικτυακό τόπο <http://www.campus.skelleftea.se/> και μερικώς τροποποιημένη).

3.2.1. Κλωνοποίησης τυχαίας προσέλασης, με χρήση του πλασμιδίου pUC18 σε κύτταρα DH5a *E. coli*

3.2.1.1. Απομόνωση πλασμιδίου pUC18

Η απομόνωση του πλασμιδίου pUC18 (West et al., 1994), μεγέθους 2686bp, έγινε από 6ml O/N (overnight) υγρής καλλιέργειας κυττάρων *E. coli* που το περιείχαν, σε LB broth (Luria-Bertani Broth, Sigma-Aldrich) στους 37°C, χρησιμοποιώντας το kit της Qiagen, Plasmid Miniprep, σύμφωνα με το πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA.



Εικόνα 12. Ο φορέας pUC18. Περιλαμβάνει το γονίδιο που προσδίδει αντοχή στην αμπικιλίνη και το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης.

3.2.1.2. Παρασκευή δεκτικών κυττάρων *E. coli* DH5a

Ανακαλλιεργήσαμε μια αποικία κυττάρων DH5a *E. coli*, σε 5ml LB broth (Luria-Bertani Broth, Sigma-Aldrich) και την αφήσαμε να αναπτυχθεί overnight στους 37°C, υπό ήπια ανάδευση. Τα κύτταρα DH5a που χρησιμοποιήσαμε για ανακαλλιέργεια ήταν μια ευγενική προσφορά των φοιτητών του εργαστηρίου του κ. Σταθόπουλου.

- Βάλαμε από 1,5ml της overnight υγρής καλλιέργειας των κυττάρων *E. coli* DH5a σε δύο φλάσκες με 150ml θρεπτικού υλικού LB broth. Ακολούθησε επώαση στους 37°C υπό ήπια ανάδευση, μέχρι η οπτική πυκνότητα στα 600nm έφτασε τα 0,7. Στη συνέχεια οι φλάσκες με τις υγρές καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε πάγο για 20 λεπτά.
- Μοιράσαμε το περιεχόμενο της κάθε φλάσκας σε παγωμένα falcon tubes των 50ml. Φυγοκεντρήσαμε για 10 λεπτά στις μέγιστες στροφές και στους 4°C. Αποχύσαμε το

υπερκείμενο και βάλουμε σε κάθε falcon 50 ml απιονισμένο νερό (4°C). Φυγοκεντρήσαμε για 15 λεπτά στις μέγιστες στροφές και στους 4°C. Αποχύσαμε το υπερκείμενο και βάλουμε σε κάθε falcon 25 ml απιονισμένο νερό (4°C). Φυγοκεντρήσαμε για 15 λεπτά στις μέγιστες στροφές και στους 4°C. Αποχύσαμε το υπερκείμενο και βάλουμε σε κάθε falcon από 5ml απιονισμένο νερό με 15% γλυκερόλη (-20°C). Φυγοκεντρήσαμε για 15 λεπτά στις μέγιστες στροφές και στους 4°C. Αποχύσαμε το υπερκείμενο.

- Βάλουμε από 400μl απιονισμένο νερό με 15% γλυκερόλη (-20°C) στα falcon tubes. Αναμίξαμε ελαφρά με την πιπέτα και βάλουμε από 200μl σε παγωμένα erendrofs των 1,5ml. Αποθηκεύσαμε τα erendrofs στους -80°C.

3.2.1.3. Πέψη χρωμοσωμικού DNA του κλινικού στελέχους 1767 και του πλασμιδίου pUC18, με BamHI

Κάναμε πέψη με το ένζυμο περιορισμού BamHI (New England Biolabs), που κόβει μόνο μια φορά το πλασμίδιο pUC18 και πέψη και το χρωμοσωμικό DNA από ένα στέλεχος (1767) με το BamHI επίσης. Προηγουμένως, είχαμε ελέγξει ότι το ένζυμο αυτό δεν κόβει στις 580 ήδη γνωστές βάσεις του νέου γονιδίου IMP, επομένως η πιθανότητα να κόβει στις επόμενες βάσεις του γονιδίου ήταν μικρή. Κάναμε πέψη 50μl χρωμοσωμικού DNA και 30μl πλασμιδίου pUC18 σε τελικό όγκο 60μl. Η πέψη έγινε στους 37°C για τρεις ώρες. Ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων της πέψης, με το kit QIA quick PCR product purification της QIAGEN.

3.2.1.4. Αντίδραση λιγκάσης κομμένου χρωμοσωμικού DNA με το κομμένο πλασμίδιο pUC18 και autoligation κομμένου πλασμιδίου pUC18

Κάναμε αντίδραση λιγκάσης (ligation) το κομμένο χρωμοσωμικό DNA του στελέχους 1767, με το κομμένο πλασμίδιο pUC18, σε δύο διαφορετικές αναλογίες 1:1 και 1:2,5. Για την αναλογία 1:1 βάλουμε 3μl πλασμιδίου, 4μl χρωμοσωμικού, 2μl Buffer (10x) και 1μl λιγκάσης, (ligase), σε τελικό όγκο 10μl. Για την αναλογία 1:2,5 βάλουμε 2μl πλασμιδίου, 5μl χρωμοσωμικού, 2μl Buffer (10x) και 1μl ligase, σε τελικό όγκο πάλι 10μl. Για το autoligation βάλουμε 5μl πλασμιδίου, 3μl νερό, 2μl Buffer (10x) και 1μl ligase, σε τελικό όγκο 10μl. Η αντίδραση λιγκάσης έγινε στους 4°C overnight, ενώ η λιγκάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η T4 DNA ligase της Takara Bio Inc.

3.2.1.5 Βακτηριακός μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση του ligation χρωμοσωμικού DNA με το πλασμίδιο pUC18 και του autoligation του πλασμιδίου pUC18 με δεκτικά κύτταρα DH5a *E. coli*

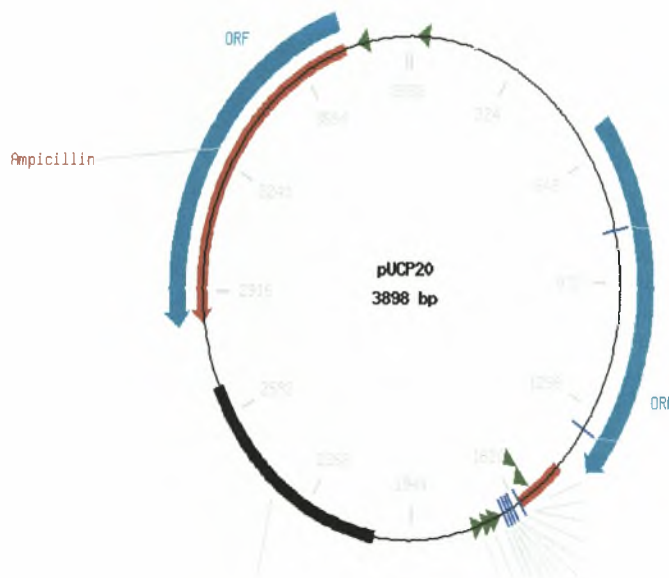
Για την ηλεκτροδιάτρηση χρησιμοποιήσαμε το μηχάνημα Gene Pulser, της BIORAD. Ρυθμίσαμε το μηχάνημα στο EC2 και στο BACTERIA. Έπειτα αφήσαμε να ξεπαγώσουν σε πάγο τρία tubes με DH5a *E. coli*. Έπειτα βάλουμε στο πρώτο tube 5μl από το autoligation, στο δεύτερο 10μl από το ligation 1:1 και στο τρίτο 10μl από το ligation 1:2,5. Σε 3 ειδικές κυψελίδες ηλεκτροδιάτρησης των 0,2cm βάλουμε τα παραπάνω, με ήπια ανάδευση με την μύτη της πιπέτας, ώστε να είναι το περιεχόμενό τους ανάμεσα στα δύο μεταλλικά φύλλα της κυψελίδας. Βάλουμε την κυψελίδα στην ειδική θήκη και πατήσαμε PULSE (1.5kV και 4.2msec). Αμέσως την βγάλαμε και προσθέσαμε 600μl θρεπτικού μέσου SOC, κάναμε ανάδευση με την πιπέτα και βάλουμε το περιεχόμενο της κυψελίδας σε ένα νέο tube των 2ml. Τα αφήσαμε για 1 ώρα στους 37°C, υπό ήπια ανάδευση.

Από τα DH5a με το autoligation, βάλουμε όλο το περιεχόμενο σε τρυβλία LB agar που περιείχαν 100μg/ml αμπικιλίνη και από τα DH5a με το ligation 1:1 και 1:2,5, βάλουμε όλο το περιεχόμενο σε τρυβλία LB agar με 100μg/ml αμπικιλίνη και 1μg/ml ιμιπενέμη. Προηγουμένως με E-test (AB Biodisk) είχαμε ελέγξει ότι η MIC των DH5a στην ιμιπενέμη ήταν κάτω από 1μg/ml. Αφήσαμε τα τρυβλία στους 37°C overnight. Τα τρυβλία με τα αντιβιοτικά τα παρασκευάσαμε την ίδια μέρα που πραγματοποιήσαμε την ηλεκτροδιάτρηση, χρησιμοποιώντας το LB agar της Sigma-Aldrich και προσθέτοντας τα αντιβιοτικά αμπικιλίνη (PENTREXYL) και ιμιπενέμη (PRIMAXIN, imipenem+ cilastatin).

3.2.2. Κλωνοποίηση τυχαίας προσπέλασης, με χρήση του πλασμιδίου pUCP20 σε δεκτικά κύτταρα PAO₁ *P.aeruginosa*.

3.2.2.1. Απομόνωση πλασμιδίου pUCP20

Η απομόνωση του πλασμιδίου pUCP20 (West et al., 1994), μεγέθους 3898bp, έγινε από 6ml O/N (overnight) υγρής καλλιέργειας κυττάρων *E. coli* που το περιείχαν, σε LB broth (Luria-Bertani Broth, Sigma-Aldrich) στους 37°C, χρησιμοποιώντας το kit της Nucleospin, NucleoSpin Plasmid QuickPure, σύμφωνα με το πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA.



3.2.2.3. Αντίδραση λιγκάσης κομμένου χρωμοσωμικού DNA με το κομμένο πλασμίδιο pUCP20 και autoligation κομμένου πλασμιδίου pUCP20

Κάναμε αντίδραση λιγκάσης (ligation) το κομμένο χρωμοσωμικό DNA του στελέχους 1767, με το κομμένο πλασμίδιο pUCP20, σε δύο διαφορετικές αναλογίες 1:1 και 1:2,5. Για την αναλογία 1:1 βάλουμε 3μl πλασμιδίου, 4μl χρωμοσωμικού, 2μl Buffer (10x) και 1μl ligase, σε τελικό όγκο 10μl. Για την αναλογία 1:2,5 βάλουμε 2μl πλασμιδίου, 5μl χρωμοσωμικού, 2μl Buffer (10x) και 1μl ligase, σε τελικό όγκο πάλι 10μl. Για το autoligation βάλουμε 5μl πλασμιδίου, 3μl νερό, 2μl Buffer (10x) και 1μl ligase, σε τελικό όγκο 10μl. Η αντίδραση λιγκάσης έγινε στους 4°C overnight, ενώ η λιγκάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η T4 DNA ligase της New England Biolabs.

3.2.2.4. Παρασκευή δεκτικών κυττάρων PAO₁ σε διάλυμα σουκρόζης

Ανακαλλιεργήσαμε μια αποικία του εργαστηριακού στελέχους *Pseudomonas aeruginosa*, PAO₁, σε ένα falcon tube των 50ml με 30ml LB broth (Sigma-Aldrich) και το αφήσαμε να αναπτυχθεί overnight στους 37°C, υπό ήπια ανάδευση.

- Την επόμενη μέρα μοιράσαμε 30ml από τις overnight καλλιέργειες σε 20 tubes από 1,5ml.
- Φυγοκεντρήσαμε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά στις 14.000 στροφές. Αποχύσαμε το υπερκείμενο.
- Βάλουμε 1ml διαλύματος σουκρόζης 300mM σε κάθε tube των 1,5ml.
- Φυγοκεντρήσαμε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά στις 14.000 στροφές. Αποχύσαμε το υπερκείμενο. (επανάληψη αυτού του σταδίου)
- Επαναδιαλύσαμε το ίζημα και ενώσαμε τα ο ίζημα από τα 4 tubes σε ένα, με τελικό όγκο περίπου 200μl.

Συνολικά φτιάξαμε 5 tubes με δεκτικά κύτταρα PAO₁ και τα βάλουμε στον πάγο, καθώς τα χρησιμοποιήσαμε την ίδια μέρα, επειδή δεν γίνεται να κάνουμε δεκτικά κύτταρα *Pseudomonas aeruginosa* stock σε γλυκερόλη και να τα αποθηκεύσουμε στους -80°C, όπως κάναμε με τα κύτταρα DH5a *E. coli* (Choi et al., 2006).

3.2.2.5. Βακτηριακός μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση του ligation χρωμοσωμικού DNA με το πλασμίδιο pUCP20 και του autoligation του πλασμιδίου pUCP20 με δεκτικά κύτταρα *Pseudomonas aeruginosa* PAO₁

Για την ηλεκτροδιάτρηση σε κύτταρα PAO₁ (Diver et al., 1990) χρησιμοποιήσαμε το μηχάνημα Gene Pulser, της BIORAD. Ρυθμίσαμε το μηχάνημα στο EC2 και στο BACTERIA. Έπειτα αφήσαμε να ξεπαγώσουν σε πάγο τρία tubes με PAO₁. Έπειτα βάλουμε στο πρώτο tube 5μl από το autoligation, στο δεύτερο 10μl από το ligation 1:1 και στο τρίτο 10μl από το ligation 1:2,5. Σε 3 ειδικές κυψελίδες ηλεκτροδιάτρησης των 0,2cm βάλουμε τα παραπάνω με ήπια ανάδευση με την μύτη της πιπέτας, ώστε να είναι το περιεχόμενό τους ανάμεσα στα δύο μεταλλικά φύλλα της κυψελίδας. Βάλουμε την κυψελίδα στην ειδική θήκη και πατήσαμε PULSE (1.5kV και 4.2msec). Αμέσως την βγάλαμε και προσθέσαμε 600μl θρεπτικού μέσου LB broth (Sigma-Aldrich), κάναμε ανάδευση με την πιπέτα και βάλουμε το περιεχόμενο της κυψελίδας σε ένα νέο tube των 2ml. Τα αφήσαμε για 1 ώρα στους 37°C, υπό ήπια ανάδευση.

Από τα PAO₁ με το autoligation, βάλουμε όλο το περιεχόμενο σε τρυβλία LB agar που περιείχαν 200μg/ml αμπικιλίνη και από τα PAO₁ με το ligation 1:1 και 1:2,5, βάλουμε όλο το περιεχόμενο σε τρυβλία LB agar με 200μg/ml αμπικιλίνη και 2μg/ml ιμιπενέμη. Προηγουμένως με E-test (AB Biodisk) είχαμε ελέγξει ότι η MIC του PAO₁ στην ιμιπενέμη ήταν κάτω από 1μg/ml και στην αμπικιλίνη 150μg/ml. Αφήσαμε τα τρυβλία στους 37°C overnight. Τα τρυβλία με τα αντιβιοτικά τα παρασκευάσαμε την ίδια μέρα που πραγματοποιήσαμε την ηλεκτροδιάτρηση, χρησιμοποιώντας το LB agar της Sigma-Aldrich και προσθέτοντας τα αντιβιοτικά αμπικιλίνη (PENTREXYL) και ιμιπενέμη (PRIMAXIN, imipenem+ cilastatin).

3.3. Έλεγχος και μελέτη ανθεκτικών αποικιών *Pseudomonas aeruginosa* PAO₁ που πήραμε μετά τη κλωνοποίηση τυχαίας προσπέλασης

3.3.1. MIC των ανθεκτικών αποικιών PAO₁ σε β-λακταμικά αντιβιοτικά

Κάναμε ανακαλλιέργεια σε δύο τρυβλία LB agar (Sigma-Aldrich) με αμπικιλίνη 200μg/ml και ιμιπενέμη 2μg/ml, δεκαοκτώ διαφορετικών και τυχαίων αποικιών που πήραμε μετά το electroporation με τα ligation 1:1 και 1:2,5 σε PAO₁. Κάναμε E-test (AB Biodisk) στις δεκαοκτώ αυτές αποικίες σε τρία β-λακταμικά αντιβιοτικά, μια καρβαπενέμη την ιμιπενέμη (IP), μια κεφαλοσπορίνη την κεφταδιζίνη (TZ) και μια μονοβακτάμη την αζτρονάμη (AT) για να ελέγξουμε την MIC αυτών των αποικιών σε αυτά τα τρία β-λακταμικά αντιβιοτικά. Λίγο πιο αναλυτικά η διαδικασία προσδιορισμού της MIC μέσω E-test που ακολουθήσαμε, συνοψίζεται παρακάτω.

- Με ένα βαμβακοφόρο στυλεό, πήραμε λίγες αποικίες από κάθε καλλιέργεια των δεκαοκτώ ανθεκτικών αποικιών
- Διαλύσαμε αυτές τις αποικίες σε διάλυμα εναιώρησης, Suspension Buffer. Τοποθετήσαμε το σωλήνα με το διάλυμα εναιώρησης και τις αποικίες στη συσκευή μέτρησης θολερότητας και θα πρέπει η θολερότητα να είναι στα 0,5McFarland ή 1.5×10^8 CFU/mL (CFU είναι η συντόμευση των colony forming units). Σε περίπτωση που η θολερότητα είναι κάτω των 0,5McFarland προσθέτουμε και άλλες αποικίες, ενώ αν η θολερότητα είναι πάνω των 0,5McFarland, τότε αραιώνουμε με αποστειρωμένο νερό.
- Πήραμε ένα καθαρό βαμβακοφόρο στυλεό, το βάλαμε στο εναιώρημα 0,5 McFarland και στρώσαμε τις αποικίες σε ένα νέο τρυβλίο Muller Hinton.
- Τέλος με μια μεταλλική λαβίδα, την οποία αποστειρώσαμε περνώντας την πάνω από την μπλε φλόγα του λύχνου Bunsen, τοποθετήσαμε τις τρεις λωρίδες E-test σε κάθε τρυβλίο, διατηρώντας κάποια απόσταση μεταξύ τους.
- Βάλαμε τα τρυβλία για επώαση στους 37°C και μετά από 24 ώρες παρατηρήσαμε τα αποτελέσματα.

3.3.2. Απομόνωση πλασμιδίου pUCP20 από τις ανθεκτικές ΡΑΟ₁ αποικίες και PCR για το *IMP* γονίδιο

Η απομόνωση του πλασμιδίου pUCP20 από τις ανθεκτικές αποικίες ΡΑΟ₁ έγινε με δύο τρόπους από 5ml overnight υγρής καλλιέργειας αυτών των αποικιών σε LB broth, παρουσία 200μg/ml αμικικιλίνης και 2μg/ml ιμιπενέμης. Η μία προσπάθεια έγινε μέσω του kit miniprep Plasmid Extraction της Nucleospin, σύμφωνα με το πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA και μια μέσω του μηχανήματος Magtration System 12GC, plasmid DNA tranfection grade, με βάση το πρόγραμμα απομόνωσης πλασμιδιακού DNA.

Πραγματοποιήθηκε PCR για το *IMP* γονίδιο στις δεκαοκτώ αυτές αποικίες με απλή λύση των κυττάρων. Η λύση των κυττάρων έγινε μια φορά με προσθήκη μιας αποικίας σε 200μl νερού και θέρμανση στους 95°C για 15 λεπτά, φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές για 2 λεπτά και χρήση 1,5μl του υπερκείμενου σαν DNA μήτρα στην PCR και τη δεύτερη φορά με προσθήκη μιας αποικίας σε 20μl lysis buffer (0,25%v/v SDS και 0,05N NaOH) και θέρμανση στους 95°C για 15 λεπτά, φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές για 2 λεπτά και χρήση 1,5μl του υπερκείμενου σαν DNA μήτρα στην PCR. Οι συνθήκες της PCR για το *IMP* γονίδιο φαίνονται στον Πίνακα 3 και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν στο Πίνακα 4.

Επίσης έγινε και PCR με ελονγκάση (elongase της Invitrogen) και χρήση των εκκινητών M13 (οι οποίοι είναι ειδικοί για το pUCP20 πλασμίδιο, έτσι ώστε να παίρνεις το ένθεμα που έχεις βάλει μέσα στο πλασμίδιο) σε τέσσερες αποικίες στις οποίες είχαμε απομονώσει ολικό DNA. Το ολικό DNA απομονώθηκε από 5ml overnight υγρής καλλιέργειας αυτών των αποικιών σε LB broth (Sigma-Aldrich), παρουσία 200μg/ml αμικικιλίνης και 2μg/ml ιμιπενέμης, μέσω του μηχανήματος Magtration System 12GC, DNA tranfection grade βάση του προγράμματος απομόνωσης ολικού DNA. Οι συνθήκες της Long-PCR με τους M13 εκκινητές φαίνονται στον Πίνακα 3 και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν στο Πίνακα 4.

3.3.3. Πείραμα υδρόλυσης της ιμιπενέμης

Πραγματοποιήσαμε πειράματα υδρόλυσης της ιμιπενέμης για να διαπιστώσουμε εάν αυτές σε αυτές τις ανθεκτικές αποικίες ΡΑΟ₁ παρατηρείται υδρόλυση της ιμιπενέμης, η οποία το ποίο πιθανόν είναι να οφείλεται στη δράση μιας IMP β-λακταμάσης. Το πείραμα της υδρόλυσης συνοψίζεται ως εξής: υγρή καλλιέργεια του μικροβίου παρουσία αντιβιοτικού, σπάσιμο των κυττάρων και μέτρηση της απορρόφησης του εκχυλίσματος παρουσία γνωστής συγκέντρωσης αντιβιοτικού στη μονάδα του χρόνου (*Kontou et al., 2007*). Το πείραμα της υδρόλυσης έγινε χρησιμοποιώντας μια ανθεκτική αποικία στην οποία υποψιαζόμαστε την παρουσία IMP λακταμάσης (ΡΑΟ₁₋₆), το εργαστηριακό στέλεχος ΡΑΟ₁ το οποίο μέσω του κλωνοποίησης τυχαίας προσπέλασης κάναμε ανθεκτικό και ένα από τα αρχικά κλινικά μας στελέχη στο οποίο ξέρουμε ήδη ότι υπάρχει (strain 1773).

Κάναμε 20ml υγρές καλλιέργειες των τριών αυτών στελεχών παρουσία 5μg/ml ιμιπενέμης, στο ανθεκτικό ΡΑΟ₁ και στο κλινικό στέλεχος, και τις αφήσαμε overnight στους 37°C υπό ήπια ανάδευση. Την επόμενη μέρα φυγοκεντρήσαμε τις overnight υγρές καλλιέργειες στις 4.000 στροφές, για 5 λεπτά και σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημά τους το αναδιαλύσαμε σε 2ml διαλύματος ομογενοποίησης. Το διάλυμα ομογενοποίησης αποτελείται από ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 50mM, pH 7 και PMSF 1mM. Ακολούθησε θραύση των κυττάρων με υπερήχους και στη συνέχεια φυγοκέντρηση του εναιωρήματος στα 13.000g για 20 λεπτά, στους 4°C. Το υπερκείμενο φυλάχτηκε σε πάγο και ακολούθησε η φωτομέτρησή του στα 299nm, μήκος κύματος στο οποίο απορροφά η ιμιπενέμη.

Ο έλεγχος της υδρόλυσης έγινε σε γνωστής συγκέντρωσης διαλύματα ιμιπενέμης 50μM και 100μM. Προσθέταμε 100μl από το υπερκείμενο των καλλιεργειών σε 1000μl διαλύματος γνωστής συγκέντρωσης της ιμιπενέμης και παρατηρούσαμε την απορρόφηση σε τακτά χρονικά διαστήματα. Σαν τυφλό χρησιμοποιήσαμε νερό. Επίσης το πείραμα έγινε χωρίς και παρουσία EDTA (50mM), το οποίο αναστέλλει τη δράση των μέταλλο-β-λακταμασών.

3.3.4. Δοκιμασία DDST

Κάναμε και πείραμα ανίχνευσης της παρουσίας μέταλλο-β-λακταμάσης στις ανθεκτικές αποικίες PAO₁. Επειδή δεν είχαμε τα ειδικά E-test strip ανίχνευσης μέταλλο-β-λακταμασών, MBL E-test, κάναμε μια παραλλαγή αυτού του test, την δοκιμασία DDST (Double Disk Synergy Test) (Lee et al., 2002 και U et al. 2009). Σε δύο τρυβλία Muller Hinton κάναμε επίστρωση το ένα μια από αυτές τις ανθεκτικές αποικίες, την PAO₁₋₆ και στο άλλο με ένα από τα κλινικά στελέχη, το στέλεχος 1773, στο οποίο ξέρουμε ότι υπάρχει η IMP μέταλλο-β-λακταμάση. Έπειτα βάλουμε σε κάθε τρυβλίο από ένα δισκίο ιμιπενέμης (AB Biodisk) και σε μικρή απόσταση περίπου 2cm ένα δισκίο πενικιλίνης (AB Biodisk) με 10μl EDTA 0,5M και τα επώασαμε στους 37°C για 24 ώρες. Σε περίπτωση παρουσίας μέταλλο-β-λακταμάσης, το EDTA θα αναστείλει την δράση της μέταλλο-β-λακταμάσης, οπότε θα παρουσιαστεί συνέργεια μεταξύ των δύο αντιβιοτικών, η οποία θα είναι ορατή με επέκταση της ζώνης αναστολής της ιμιπενέμης δίπλα στον δισκίο με EDTA.

3.3.5. Δοκιμασία αναστολής αντλιών ενεργητικής εκροής με προσθήκη CCCP

Για να ελέγξουμε το ενδεχόμενο αυτή η υψηλή αντοχή στις ανθεκτικές αποικίες PAO₁ να οφείλεται λόγω αντλιών ενεργητικής εκροής, κάναμε το test με τον αναστολέα αντλιών ενεργητικής εκροής, Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) (Ikonomidis et al., 2007). Σε αυτό το test κάναμε δύο σειρές τρυβλίων LB agar υποδιπλάσιων συγκεντρώσεων αντιβιοτικού ιμιπενέμης, δηλαδή 265 - 128 - 64 - 32 - 16 - 8 - 4 - 2 - 1 (μg/ml), και στη μία σειρά βάλουμε τον αναστολέα CCCP (στην περίπτωση μας βάλουμε 12,5 μM) και στην άλλη σειρά δεν βάλουμε τον αναστολέα. Ο αναστολέας CCCP διαλύεται σε οργανικό διαλύτη, στην περίπτωση μας χρησιμοποιήσαμε μεθανόλη. Στη συνέχεια σποτάραμε πάνω στα τρυβλία, 5μl από 0,5 McF των αποικιών που θέλαμε να ελέγξουμε, ενώ και στις δύο σειρές σποτάραμε και ένα πρότυπο στέλεχος, το *P. aeruginosa* ATCC 27853. Περιμένουμε αν δεν υπάρχουν αντλίες εκροής τα αποτελέσματα και στις δύο σειρές τρυβλίων να είναι τα ίδια, ενώ αν υπάρχουν αντλίες ενεργητικής εκροής στη σειρά με τον αναστολέα CCCP, να εμφανιστεί συνέργεια μεταξύ του αναστολέα και του αντιβιοτικού και μια βαθμιαία μείωση της ορίου του αντιβιοτικού στο οποίο αναπτύσσονται οι ανθεκτικές αποικίες PAO₁.

3.4. Απομόνωση του γονιδίου *bla_{IMP}* μέσω PCR

Για την απομόνωση του νέου γονιδίου *bla_{IMP}* μέσω PCR χρησιμοποιήθηκαν συνδυασμοί του forward εκκινητή του *IMP* γονιδίου (*Senda et al. 1996*) με reverse εκκινητές διαφορετικών γονιδιακών κασετών, όπως τύπου *OXA* (*Haluk et al., 1998*) και *ACC(6')* (*παρούσα μελέτη*), με χρήση Long-PCR με elongase.. Με βάση τις αλληλουχίες από αυτές τις Long-PCR ήταν δυνατή η δημιουργία ενός reverse εσωτερικού εκκινητή που να αναγνωρίζει το στοιχείο των 59 βάσεων αμέσως μετά το *IMP* γονίδιο, του *bla_{IMPR} 59be* (*παρούσα μελέτη*), ενώ αλλάζοντας μερικές βάσεις στον forward εκκινητή του *IMP*, *bla_{IMPF} new* (*παρούσα μελέτη*), τον κάναμε πιο ειδικό για την αλληλουχία μας.

Πιο αναλυτικά ο συνδυασμός των εκκινητών που έδωσαν προϊόντα, καθώς και τα γονίδια ή ο συνδυασμός γονιδίων που απομονώνονται με αυτούς τους εκκινητές φαίνονται παρακάτω στο Πίνακα 3 που ακολουθεί. Επίσης στο Πίνακα 4 αναγράφονται οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων PCR που χρησιμοποιήθηκαν. Να σημειωθεί ότι χρησιμοποιήθηκαν και άλλοι συνδυασμοί εκκινητών για άλλες γονιδιακές κασέτες, όμως δεν αναγράφονται στο Πίνακα 4, καθώς δεν έδωσαν κάποιο προϊόν.

Όλα τα προϊόντα των PCR, ελέχθησαν μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης. Για το πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε η UltraPure Agarose, της Invitrogen. Η συγκέντρωση της αγαρόζης ποίκιλε, από 1,8%-1%, ανάλογα με το μέγεθος των PCR προϊόντων που θέλαμε να ηλεκτροφορήσουμε, ενώ η συγκέντρωση του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) ήταν σταθερή (15μL EtBr 1% σε 150ml αγαρόζης). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιούνταν συνήθως στα 120V ή στα 140V. Οι ladder που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο 100bp DNA Gene Ruler της Fermentas, για μέγεθος προϊόντων κάτω από 1000bp και ο λ-Hind III της Fermentas, για μέγεθος πάνω από 1000bp. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης ελέγχονταν αρχικά σε συσκευή UV και στη συνέχεια τα φωτογραφίζαμε με τη συσκευή Gel Doc 2000, Gel Documentation System της Bio-Rad.

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')		Μέγεθος Προϊόντος PCR (bp)	Συνθήκες PCR
<i>bla_{IMP}</i>	F	CTACCCCAGCAGAGTCTTTG (Senda et al. 1996)	580	<u>Taq DNA polymerase</u> 94°C 3min 94°C 50sec 53°C 1min 72°C 1min 72°C 10min } 35 cycles
	R	AACCAGTTTTTGCCTTACCAT		
	F(new)	CTACCGCAGGAGAGTCTTTG (παρούσα μελέτη)	850	
	R (59be)	CATATGCGGCAAATGTTTTTCAT		
<i>bla_{OXA}</i>	F	GTCTTTTCGAGTACGGCATT (Haluk et al., 1998)	800	
	R	ATTTCTTAGCGGCAACTTAC		
<i>Integrase</i> and <i>Bla_{IMP}</i>	5CS F	CTTCTAGAAAACCGAGGATGC (Jianhui et al. 2006)	1200	
	R	AACCAGTTTTTGCCTTACCAT		
<i>bla_{IMP}</i> and <i>bla_{OXA}</i>	F	CTACCCCAGCAGAGTCTTTG	1600	<u>Elongase</u>
	R	GTCTTTTCGAGTACGGCATT		
<i>bla_{OXA}</i> and <i>ACC(6')</i>	F	CTACCCCAGCAGAGTCTTTG (παρούσα μελέτη)	1800	
	R	TCCGTCACTCCATACATTGC		
<i>M13 pUC</i>	F	CCCAGTCACGACGTTGTTAAAAG (Universal primers)	1500	
	R	AGCGGATAACAATTTACACAG		

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Παρουσιάζεται ο συνδυασμός των εκκινητών F και R (Forward και Reverse), η αλληλουχία τους, το μέγεθος των προϊόντων και οι συνθήκες της PCR. Επίσης φαίνονται και οι εκκινητές M13 pUC που χρησιμοποιήθηκαν στην προσπάθεια απομόνωσης του πιθανού ενθέματος στις ανθεκτικές PΑΟ₁ αποικίες.

MIX Invitrogen Platimun Taq DNA polymerase (Invitrogen)	Ποσότητα (μl)	MIX A & B Invitrogen Elongase Enzyme (Invitrogen)	Ποσότητα (μl)
H ₂ O	39,85	H ₂ O	35
10XPCR Buffer	5	5XBuffer A	4
MgCl ₂ 50mM	1,5	5XBuffer B	6
dNTPs 10mM each	1,25	dNTPs 10mM each	1
Εκκινητής (forward) 100pmol/μL	0,2	Εκκινητής (forward) 100pmol/μL	1
Εκκινητής (reverse) 100pmol/μL	0,2	Εκκινητής (reverse) 100pmol/μL	1
Taq DNA Polymerase 5U/μL	0,5	Elongase Enzyme Mix	1
DNA template	1,5	DNA template	1

ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων PCR που χρησιμοποιήθηκαν.

Όλα τα προϊόντα αυτών των PCR καθαρίστηκαν με το kit PCR Purification της Invitrogen και στάλθηκαν για αλληλούχηση στη LARK Technologies, Essex, UK και στη Macrogen, Seoul, Korea. Σε περίπτωση εμφάνισης μη ειδικών προϊόντων κόβαμε την μπάντα ή μπάντες, και πραγματοποιούσαμε εξαγωγή της μπάντας με kit PureLink Quick Gel Extraction της Invitrogen Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης ταυτοποιήθηκαν μέσω του προγράμματος BLAST.

3.4. Πρόβλεψη τριτοταγούς δομής της νέας πρωτεΐνης IMP

Η πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής (Homology modeling) έγινε με χρήση του SWISS-MODEL, ενός προγράμματος που εκτελεί αυτοματοποιημένες συγκρίσεις ακολουθιών δομών (*Guex et al, 1997*) και είναι μια διαδικασία δύο σταδίων. Ο πρώτος τρόπος προσέγγισης χρησιμοποιείται για να καθορίσει εάν μια ακολουθία μπορεί να μοντελοποιηθεί. Όταν υποβληθεί μια ακολουθία, το SWISS-MODEL τη συγκρίνει με την κρυσταλλογραφική βάση δεδομένων (ExPdb) και η μοντελοποίηση επιχειρείται μόνο εάν υπάρχει μια πρωτεΐνη ομόλογη της πρωτεΐνης επερώτησης στην ExPdb. Οι δομές-οδηγοί (template) επιλέγονται εάν υπάρχει τουλάχιστον 25% ομοιότητα ακολουθίας σε μια περιοχή μήκους μεγαλύτερου από 20 κατάλοιπα. Εάν η πρώτη προσέγγιση βρει μία ή περισσότερες καταχωρήσεις στην ExPdb, τότε δημιουργούνται τα ατομικά μοντέλα και γίνεται ελαχιστοποίηση ενέργειας για να φτιαχτεί το καλύτερο μοντέλο. Οι ατομικές συντεταγμένες του μοντέλου, καθώς επίσης και οι στοιχίσεις των δομών, επιστρέφονται με μήνυμα ηλεκτρονικού ταχυδρομείου (*Baxevanis et. al, 2003*).

Στο δικτυακό τόπο <http://swissmodel.expasy.org/> (*Arnold et al., 2006, Schwede et al., 2003 και Guex et al, 1997*) στο automatic modelling mode, εισάγαμε την πρωτεϊνική ακολουθία της νέας IMP πρωτεΐνης, καθώς και τη διεύθυνση του ηλεκτρονικού μας ταχυδρομίου. Η δομή οδηγός (template) ήταν η κρυσταλλογραφημένη IMP₁ πρωτεΐνη από *Pseudomonas aeruginosa*, PDB [1ije](#) Chain: B (*Toney et. al, 2001*). Τα αποτελέσματα τα λάβαμε με μήνυμα μέσω ηλεκτρονικού ταχυδρομείου.

Επίσης επαληθεύσαμε τα αποτελέσματα της τριτοταγούς δομής που πήραμε μέσω του SWISS-MODEL και με χρήση του προγράμματος SPDB (*Khar et. Al, 2005*) για την προσαρμογή της ακολουθίας στόχου, νέα IMP, στην δομή πρότυπο, IMP₁, PDB [1ije](#) Chain: B (*Toney et. al, 2001*). Τέλος βελτιστοποιήσαμε το μοντέλο της νέας μας πρωτεΐνης μέσω Ελαχιστοποίησης της Ενέργειας, Μοριακή Δυναμική.

3.5. Φυλογενετική ανάλυση της νέας IMP πρωτεΐνης

Η φυλογενετική ανάλυση της IMP πρωτεΐνης έγινε κάνοντας χρήση του δικτυακού τόπου <http://www.phylogeny.fr/> (Dereeper *et al.*, 2008). Πιο αναλυτικά, συλλέχθηκαν οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες από όλες σχεδόν τις γνωστές IMP πρωτεΐνες από την βάση GenBank, η πολλαπλή ομοπαράθεση έγινε μέσω CLUSTALW (Larkin *et al.* 2007) , η κατασκευή του δέντρου έγινε με τη μέθοδο Neighbor-joining, η οποία βασίζεται στην απόσταση των στοιχισμένων ακολουθιών, ενώ χρησιμοποιήθηκε ο πίνακας PAM350, ο οποίος είναι ένας πίνακας που καθορίζει τις τιμές για κάθε μια από τις 210 πιθανές αντικαταστάσεις των αμινοξέων και ο συγκεκριμένος πίνακας χρησιμοποιείται για ακολουθίες που δεν διαφέρουν πολύ. Τέλος ο αριθμός των Bootstraps οριστικό στα 100.



4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Έλεγχος της ευαισθησίας σε αντιβιοτικά των Κλινικών στελεχών *Pseudomonas aeruginosa*

Ο έλεγχος της ευαισθησίας των 6 κλινικών στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* προηγήθηκε της παρούσης μελέτης. Παρόλα αυτά για να υπάρχει μια εικόνα της αντοχής των κλινικών στελεχών, παραθέτω ορισμένα από τα αποτελέσματα του έλεγχου της ευαισθησίας σε αντιβιοτικά που πραγματοποίησαν, στο πίνακα 5 που ακολουθεί.

Strains	E-test MIC IP/IPI	E-test MIC MEM	Disc diffusion			
			IMP	MEM	GM	PIP
1747	32/12	>32	R	R	R	S
1766	16/4	>32	R	R	R	R
1773	192/12	>32	R	R	R	S
1766	>256/12	>32	R	R	R	R
1836	256/24	>32	R	R	R	S
1876	256/16	>32	R	R	R	S

ΠΙΝΑΚΑΣ 5. Παρουσιάζεται αρχικά ο λόγος του E-test IP/IPI και τα αποτελέσματα στο E-test μεροπενέμης για τα έξι κλινικά στελέχη. Επίσης στη συνέχεια παρουσιάζεται η φαινοτυπική αντοχή των έξι κλινικών στελεχών στις καρβαπενέμες, ιμιπενέμη (IMP) και μεροπενέμη (MEM), στο αμινογλυκοσίδιο, γενταμικίνη (GM) και στη πενικιλίνη, πιπερακιλλίνη (PIP), με τη μέθοδο Kirby-Bauer. (R = resistant, ανθεκτικό και S = sensitive ευαίσθητο).

4.2. Απομόνωση του γονιδίου *bla_{IMP}* μέσω κλωνοποίησης τυχαίας προσπέλασης

4.2.1. Κλωνοποίηση τυχαίας προσπέλασης, με χρήση του πλασμιδίου pUC18 σε δεκτικά κύτταρα DH5a *E. coli*

Σε κανένα τρυβλίο δεν υπήρξε ανάπτυξη, μόνο στα τρυβλία με το autoligation, που σημαίνει ότι το ligation είχε πραγματοποιηθεί. Ακολούθησαν και μερικές ακόμα προσπάθειες, χωρίς όμως να πάρουμε κάποιο αποτέλεσμα στα τρυβλία με το ligation του pUC18 με το χρωμοσωμικό DNA του κλινικού στελέχους.

Επίσης να σημειωθεί ότι αρχικά η κλωνοποίηση τυχαίας προσπέλασης πραγματοποιήθηκε με χρήση ενός διαφορετικού πλασμιδίου, του PNQ 705-I, μεγέθους 4.4kb. Το πλασμίδιο αυτό περιέχει ένα γονίδιο που προσδίδει αντοχή στην χλωραμφαινικόλη, οπότε στα τρυβλία περιέχονταν αντί αμπικιλίνης, χλωραμφαινικόλη τελικής συγκέντρωσης 25μg/ml. Η κλωνοποίηση τυχαίας προσπέλασης με τον PNQ 705-I πραγματοποιήθηκε και αυτή σε κύτταρα DH5a *E. coli*, δεν έδωσε όμως κάποιο αποτέλεσμα ούτε στα τρυβλία με το autoligation του PNQ 705-I, ούτε στα τρυβλία με το ligation του PNQ 705-I με το χρωμοσωμικό DNA του κλινικού στελέχους. Ο λόγος ήταν ότι δεν δούλεψε η λιγκάση που χρησιμοποιήσαμε, αν και αντικαθιστώντας την λιγκάση (η λιγκάση που χρησιμοποιήσαμε για τα πειράματα με το pUC18 πλασμίδιο), συνεχίσαμε να μην παίρνουμε κάποιο αποτέλεσμα τόσο στο autoligation του PNQ 705-I, όσο και στα τρυβλία με το ligation του PNQ 705-I με το χρωμοσωμικό DNA του κλινικού στελέχους.

Η απομόνωση του γονιδίου μέσω του πλασμιδίου pUC18 σε κύτταρα DH5a *E. coli*, δεν κατέστη δυνατή. Η αποτελεσματικότητα που είχαμε με την εισαγωγή μέσω ηλεκτροδιάτρησης, autoligation και άκοπου pUC18 σε κύτταρα DH5a, ήταν πολύ υψηλή, που μας αποκλείει το ενδεχόμενο ύπαρξης κάποιου προβλήματος με το ligation, τα δεκτικά κύτταρα ή της μεθόδου μέσου ηλεκτροδιάτρησης. Αν και ηλεκτροδιάτρηση γονιδίου *IMP* σε κύτταρα DH5a έχει πραγματοποιηθεί (*Toleman et al., 2005*), μόνο που ήταν PCR cloning και όχι shotgun cloning. Ίσως, απλά να μην σταθήκαμε «τυχεροί» στις προσπάθειες που πραγματοποιήσαμε και να μην παράχθηκε τεμάχιο με τέτοιο μέγεθος που να επιτρέπει την τυχαία κλωνοποίησή του.

4.2.2. Κλωνοποίηση τυχαίας προσπέλασης, με χρήση του πλασμιδίου pUCP20 σε δεκτικά κύτταρα PAO₁ *P.aeruginosa*

Σε όλα τα τρυβλία πήραμε αποικίες. Τόσο στα τρυβλία με PAO₁ και το άκοπο πλασμίδιο και όσο σε αυτά με autoligation, η αποτελεσματικότητα ήταν πολύ υψηλή, πήραμε τόσες πολλές αποικίες που δεν μπορούσαμε να ξεχωρίσουμε μεμονωμένες, καθώς ολόκληρη η επιφάνεια των τρυβλίων ήταν πράσινη εξαιτίας της πυοκυανίνης. Στα τρυβλία με ligation του pUCP20 και του χρωμοσωμικού DNA του κλινικού στελέχους με αναλογίες 1:1 και 1:2,5, πήραμε πάρα πολλές αποικίες μεμονωμένες.

4.3. Έλεγχος και μελέτη ανθεκτικών αποικιών PAO₁ που πήραμε μετά την κλωνοποίηση τυχαίας προσπέλασης

4.3.1. MIC των ανθεκτικών αποικιών PAO₁ σε β-λακταμικά αντιβιοτικά

Όλες αυτές οι αποικίες παρουσίαζαν υψηλή αντοχή στην ιμιπενέμη, όμοια με αυτή των 6 κλινικών στελεχών *P. aeruginosa*, ενώ το φαινόμενο αυτό της αντοχής δεν ήταν παροδικό αλλά συνέχιζε να υφίσταται μετά από πολλές ανακαλλιέργειες. Δεν παρουσίαζαν όμως αντοχή σε άλλα λακταμικά αντιβιοτικά, όπως κεφταδιζίνη και αζτρονάμη. Η αντοχή ήταν συγκεκριμένη για τις καρβαπενέμες. Παράλληλα παρουσίαζαν αντοχή στην αμπικιλίνη που οφείλονταν στη παρουσία του γονιδίου αντοχής στην αμπικιλίνη που περιέχει το pUCP20 πλασμίδιο, καθώς για το εργαστηριακό στέλεχος PAO₁ που χρησιμοποιήθηκε, η MIC μέσω E-test για την αμπικιλίνη ήταν κάτω από 128μg/ml, ενώ για τις ανθεκτικές αποικίες PAO₁ που πήραμε μετά την ηλεκτροδιάτρηση η MIC ήταν πάνω από 256μg/ml. Πιθανόν λοιπόν να είχαμε εισάγει σε αυτά τα κύτταρα PAO₁, το πλασμίδιο pUCP20 με ένθεμα το γονίδιο *bla_{IMP}*.

Στον Πίνακα 6 που ακολουθεί, παρουσιάζεται η MIC που προσδιορίστηκε με E-test για τρία β-λακταμικά αντιβιοτικά, μια καρβαπενέμη (ιμιπενέμη -IMP), μια κεφαλοσπορίνη (κεφταδιζίνη - TZ) και μια μονοβακτάμη (αζτρονάμη - AT),σε δεκαοκτώ τυχαίες και ανθεκτικές αποικίες PAO₁ που πήραμε μετά την κλωνοποίηση τυχαίας προσπέλασης.

σ/αποικίας	IP mg/l	TZ mg/l	AT mg/l
ΡΑΟ1	0,75	3-4	2
1	Ανθεκτικό (>32)	2	2
4	Ανθεκτικό	1,5-2	1,5
5	Ανθεκτικό	2	2
6	Ανθεκτικό	3	3
7	8	2	2
8	24	3	2
9	Ανθεκτικό	2	2
10	Ανθεκτικό	2	2
11	Ανθεκτικό	1,5-2	1,5
12	24	1,5	2
13	6	3	3
14	Ανθεκτικό	2	3
15	16	1,5	2
16	Ανθεκτικό	1,5	2
17	Ανθεκτικό	1,5	2
18	Ανθεκτικό	8-12	3
19	6	4	6
20	Ανθεκτικό	1,5	3

ΠΙΝΑΚΑΣ 6. Η MIC αυτών των αποικιών στα τρία αυτά λακταμικά αντιβιοτικά.

4.3.2. Απομόνωση πλασμιδίου pUCP20 από τις ανθεκτικές ΡΑΟ₁ αποικίες και PCR για το γονίδιο *bla_{IMP}*

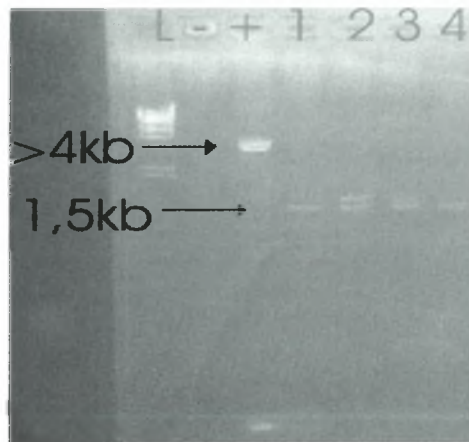
Η απομόνωση του πλασμιδίου pUCP20 που είχαμε εισάγει δεν ήταν δυνατή. Ας σημειωθεί ότι είναι ένα πλασμίδιο πολλών αντιγράφων, οπότε αναμέναμε και την ευχερή απομόνωσή του.

Η PCR για το γονίδιο *bla_{IMP}* στις 16 ανθεκτικές αποικίες, του πίνακα 6, δεν έδωσε κάποιο προϊόν, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα 14.



Εικόνα 14. Παρουσιάζεται τα αποτελέσματα της PCR για το IMP γονίδιο στις 16 ανθεκτικές αποικίες PAO₁ του Πίνακα 6, χρησιμοποιώντας σαν DNA μήτρα το υπερκείμενο από την λύση των κυττάρων με προσθήκη νερού και θέρμανση. Για το θετικό μάρτυρα χρησιμοποιήσαμε ως μήτρα, το DNA ενός κλινικού στελέχους, ενώ ο ladder που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο 100 bp DNA.

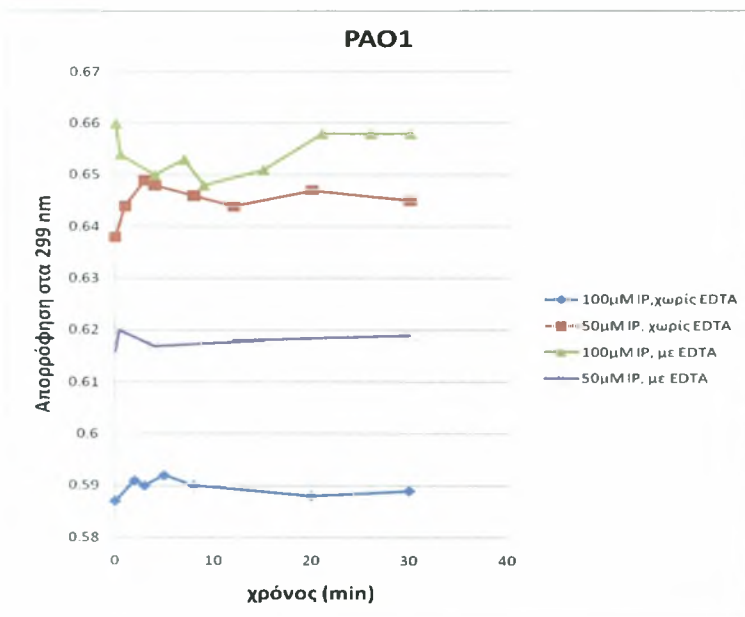
Η Long-PCR με τους M13 εκκινητές, ειδικούς για να ενισχύουμε το ένθεμα που έχουμε εισάγει, έδωσε προϊόν μεγέθους 1.5 kb και τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 15 που ακολουθεί. Στην εικόνα αυτή φαίνεται ότι οι εκκινητές μέσω της Long PCR ενίσχυσαν στο θετικό μάρτυρα, άκοπο pUCP20, τόσο το Multi Cloning Site (MCS), όσο και ολόκληρο το πλασμίδιο pUCP20, μεγέθους πάνω από 4 kb περίπου. Τα προϊόντα της Long PCR στάλθηκαν για αλληλούχιση στη Lark technologies, ενώ για τα προϊόντα 2 και 3, με τις διπλές μπάντες έγινε Gel extraction της μπάντας με τα ίδιο μέγεθος με αυτό των προϊόντων 1 και 4 και στη συνέχεια στάλθηκε για αλληλούχιση. Όμως δεν κατέστη δυνατή η αλληλούχιση αυτών των προϊόντων.



Εικόνα 15. Αποτελέσματα PCR με τους εκκινητές M13, ο ladder είναι ο λ Hind III, σαν θετικό control είναι άκοπο. Τα δείγματα 1, 2, 3 και 4 είναι από τις αποικίες 5, 6, 7 και 13 του Πίνακα 6.

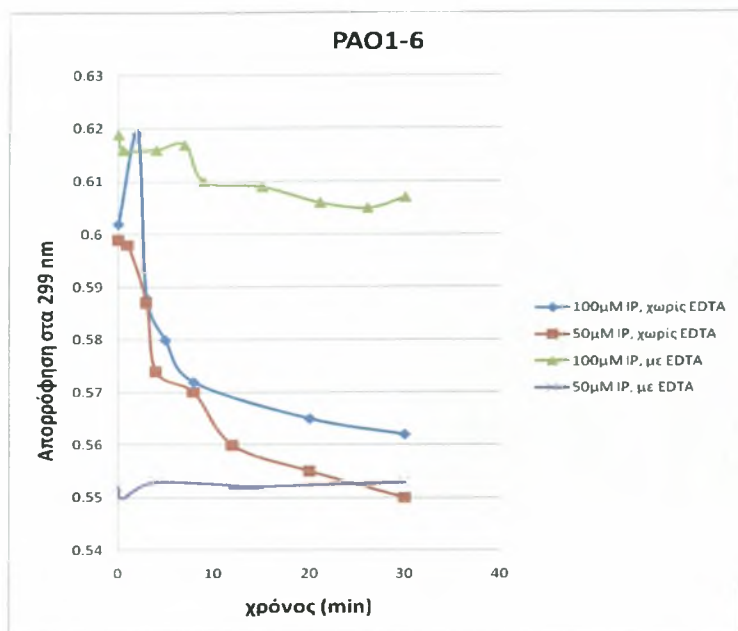
4.3.3. Πείραμα υδρόλυσης της ιμιπενέμης

Τα αποτελέσματα του πειράματος της υδρόλυσης της ιμιπενέμης παρουσιάζονται στα ακόλουθα διαγράμματα. Τα διαγράμματα αυτά παρουσιάζουν την τιμή της οπτικής απορρόφησης στα 299 nm και την μεταβολή της κατά την πάροδο του χρόνου σε 100 μM και 50 μM διαλύματος IMP, παρουσία ή όχι 50 mM EDTA.

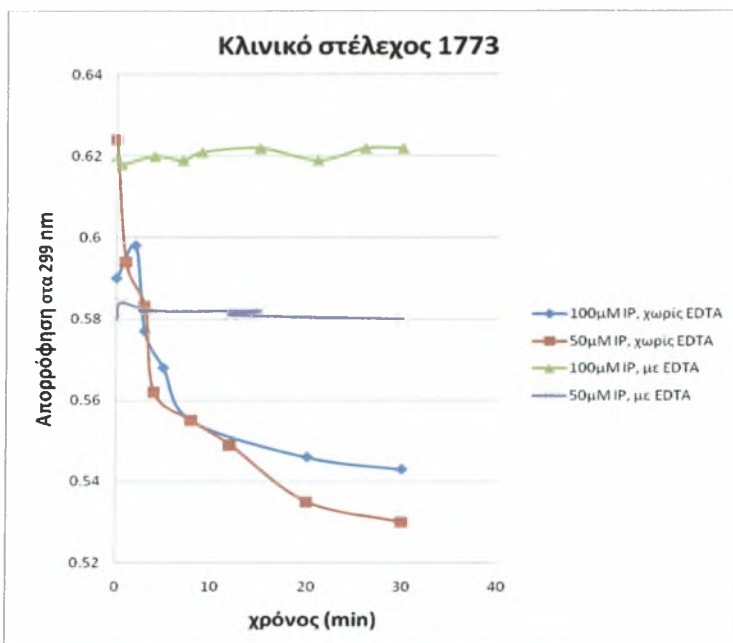


Διάγραμμα 1.

Διάγραμμα υδρόλυσης της ιμιπενέμης του μη ανθεκτικού εργαστηριακού στελέχους PAO₁, το οποίο χρησιμοποιήσαμε ως δεκτικό κύτταρο στην τυχαία κλωνοποίηση.

**Διάγραμμα 2.**

Διάγραμμα υδρόλυσης της ιμιπενέμης του ανθεκτικής αποικίας ΡΑΟ₁₋₆ που πήραμε μετά τη κλωνοποίηση τυχαίας προσπέλασης.

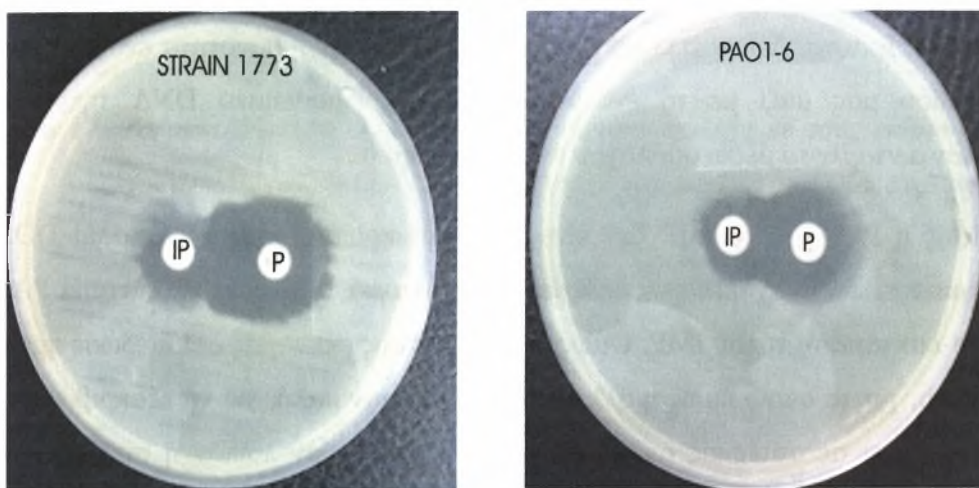
**Διάγραμμα 3.**

Διάγραμμα υδρόλυσης της ιμιπενέμης του κλινικού στελέχους *P.aeruginosa*, στο οποίο η ύπαρξη του γονιδίου *bla_{IMP}* είναι επιβεβαιωμένη.

Στο 1^ο διάγραμμα του εργαστηριακού στέλεχος ΡΑΟ₁ δεν παρατηρείται υδρόλυση της ιμιπενέμης, καθώς το στέλεχος αυτό δεν είναι ανθεκτικό στην ιμιπενέμη. Στο 2^ο διάγραμμα της ανθεκτικής αποικίας ΡΑΟ₁₋₆ παρατηρείται υδρόλυση της ιμιπενέμης απουσία EDTA, ενώ παρουσία EDTA η υδρόλυση της ιμιπενέμης φαίνεται να αναστέλλεται, όπως συμβαίνει και με το κλινικό στέλεχος 1773, 3^ο διάγραμμα, στο οποίο η παρουσία της *bla_{IMP}* είναι επιβεβαιωμένη. Η εικόνα του διαγράμματος 2 μοιάζει πολύ με την εικόνα του διαγράμματος 3, επομένως στην αποικία ΡΑΟ₁₋₆ μπορεί να υπάρχει το γονίδιο της *bla_{IMP}*, καθώς φαίνεται να παρατηρείται υδρόλυση της ιμιπενέμης.

4.3.4. Δοκιμασία DDST

Στο τρυβλίο με το κλινικό στέλεχος η συνέργεια ήταν εμφανής, όμως στο ανθεκτικό παράγωγο του PAO₁, PAO₁₋₆, δεν ήταν διακριτή η παρουσία συνέργειας όπως φαίνεται και στην ακόλουθη εικόνα 16. Επομένως η υψηλή αντοχή στην ιμιπενέμη σε αυτές τις ανθεκτικές αποικίες PAO₁ δεν πρέπει να οφείλεται στην παρουσία μέταλλο-β-λακταμάσης τύπου IMP.



Εικόνα 16. Τα αποτελέσματα του DDST, Strain 1773 είναι το κλινικό στέλεχος και PAO₁₋₆, η αποικία 6 από τις 18 τυχαίες ανθεκτικές αποικίες

4.3.5. Δοκιμασία αναστολής αντλιών ενεργητικής εκροής με προσθήκη CCCP

Ο έλεγχος της ευαισθησίας στην ιμιπενέμη και στις δύο σειρές τρυβλίων ήταν ίδιος, με ή χωρίς την παρουσία του CCCP, δηλαδή δεν εμφανίστηκε συνέργεια μεταξύ του αναστολέα και του αντιβιοτικού στις ανθεκτικές αποικίες PAO. Επομένως αποκλείουμε το ενδεχόμενο η αντοχή σε αυτές τις αποικίες PAO₁ να οφείλεται σε υπερέκφραση αντλιών ενεργητικής εκροής.

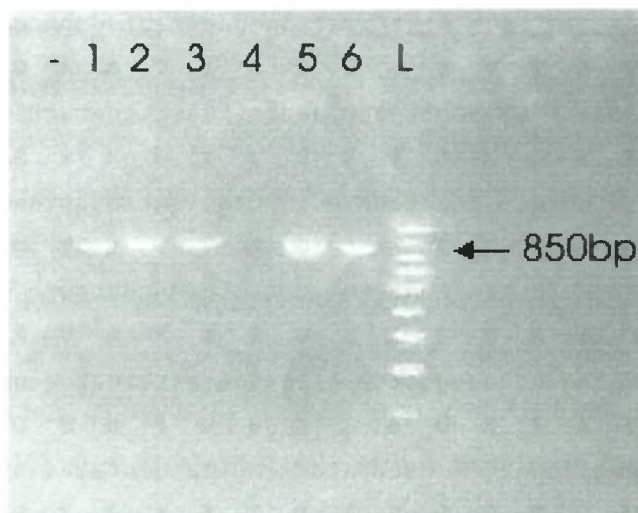
4.3.6. Συμπεράσματα της απομόνωσης του γονιδίου *bla_{IMP}* μέσω κλωνοποίησης, τυχαίας προσπέλασης με χρήση του πλασμιδίου ρUCP20 σε κύτταρα PAO₁ *P.aeruginosa*

Η απομόνωση του γονιδίου δεν κατέστη δυνατή μέσω αυτής της προσέγγισης. Η υψηλή αντοχή στην ιμιπενέμη των αποικιών PAO₁ που πήραμε μετά την κλωνοποίηση τυχαίας προσπέλασης, καθώς και το ότι φαίνονταν να υδρολύουν την ιμιπενέμη, ενίσχυαν την πεποίθησή μας ότι πιθανόν να είχαμε εισάγει το γονίδιο *IMP* στα κύτταρα PAO₁. Όμως δεν ήταν δυνατή η απομόνωση του πλασμιδίου που εισάγαμε, αν και η απομόνωση πλασμιδίου από κύτταρα *Pseudomonas aeruginosa* είναι γενικά πιο δύσκολη σε σχέση με άλλα βακτήρια. Επίσης, δεν πρέπει να απορρίπτουμε και την πιθανότητα ενσωμάτωσης του πλασμιδίου μας μαζί με το ένθεμά του, στο χρωμοσωμικό DNA της PAO₁ *Pseudomonas aeruginosa* μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού.

Επίσης η PCR για το *IMP* δεν έδωσε κάποιο προϊόν, ενώ η δοκιμασία DDST απέκλισε οριστικά το ενδεχόμενο να υπάρχει μέσα σε αυτά τα ανθεκτικά κύτταρα PAO₁ μια μέταλλο-λακταμάση τύπου IMP. Όμως η PCR με τους εκκινητές M13, έδωσε προϊόν περίπου 1.5 kb, για το οποίο όμως η αλληλούχιση δεν ήταν καλή, για να εξακριβώσουμε τι πιθανόν υπάρχει σε αυτές τις ανθεκτικές αποικίες. Πιθανόν λοιπόν η συγκεκριμένη αυτή αντοχή στην ιμιπενέμη και η υδρόλυσή της να οφείλεται όχι στην εισαγωγή του *IMP* γονιδίου αλλά κάποιου άλλου γονιδίου, όπως τύπου *OXA*. Όμως η υψηλή αυτή αντοχή μπορεί να οφείλεται στην εισαγωγή, εκτός του γονιδίου *OXA* ή κάποιου άλλου γονιδίου και στην ταυτόχρονη ολική ή μερική απώλεια της *OprD* πορίνης, χωρίς όμως να έχουμε ελέγξει για αυτό το ενδεχόμενο. Συνήθως υψηλή αντοχή μόνο σε ιμιπενέμη, οφείλεται στην παρουσία *OXA* γονιδίου και μερική ή ολική απώλεια της *OprD* πορίνης.

4.4. Απομόνωση του γονιδίου *bla_{IMP}* μέσω PCR

Η απομόνωση του γονιδίου *bla_{IMP}* τελικά κατέστη δυνατή μέσω PCR. Στην παρακάτω εικόνα 17, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της PCR με τους εκκινητές *bla_{IMP-F, new}* και *bla_{IMP-R, 59be}*, που σχεδιάστηκαν από εμάς και χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά στην παρούσα μελέτη.



Εικόνα 17. Τα αποτελέσματα της PCR στα 6 κλινικά στελέχη με τους εκκινητές *bla_{IMP}^{new}* και *bla_{IMP}^R* (59bp). Διακρίνεται ο ladder 100 bp DNA, ενώ τα προϊόντα 1, 2, 3, 4, 5 και 6 ανήκουν στα στελέχη 1876, 1836, 1773, 1766, 1836 και 1747 αντίστοιχα. Στην περίπτωση του στελέχους 1766 δεν υπήρχε προϊόν των 850 βάσεων.

Με την αλληλούχιση του προϊόντος, φάνηκε ότι στο νέο αυτό γονίδιο τύπου *IMP* διαφέρει κατά πολύ από τα ήδη υπάρχοντα *IMP* γονίδια τόσο σε επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας όσο και σε επίπεδο αμινοξέων. Σε επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας διαφέρει κατά 116 νουκλεοτίδια σε σχέση με το *IMP₁*, (84,35 % ομοιότητα). Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται η αλληλουχία των 741 νουκλεοτιδίων καθώς και η πρωτεΐνη των 246 αμινοξέων της νέας *IMP* MBL. Επίσης, παρουσιάζεται με κεφαλαία και πλάγια γραφή η αλληλουχία του attC ή 59 base element που βρέθηκε μετά το γονίδιο *IMP*.

Το στέλεχος 1766 πιθανόν να μην περιέχει και το γονίδιο *bla_{IMP}*, καθώς και με προηγούμενες PCR δεν ήταν δυνατή η απομόνωσή του, ενώ όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 5, αν και παρουσιάζει αντοχή στις καρβαπενέμες, με το E-test IP/IP1 δεν φαίνεται καθαρά να υπάρχει μέταλλο-β-λακταμάση. Πιθανόν η αντοχή να οφείλετε σε άλλο λόγο και όχι στην παρουσία μέταλλο-β-λακταμάσης.

ATGaaaaaaatatttgtgttatttgtatTTTTgttttgagcagtattactgccgccggagag 60
M K K I F V L F V F L F C S I T A A G E
tctttgcctgatataaaaaattgagaaacttgacgaagatgtttatgttcatacttctttt 120
S L P D I K I E K L D E D V Y V H T S F
gaagaagataacggctgggggtgttattactaaacacggcttgggtggttcttgtaaatact 180
E E D N G W G V I T K H G L V V L V N T
gatgcctatataaattgacactccatttacagctaaagatactgaaaaattagtccgctgg 240
D A Y I I D T P F T A K D T E K L V R W
tttgtggggcgtggttataaaatcaaaggcagatatttccctcacattttcatagcgatagc 300
F V G R G Y K I K G S I S S H F H S D S
gcaggtggaattgagtggttaattctcaatctatccccacatatgcatctaaattaaca 360
A G G I E W L N S Q S I P T Y A S K L T
aatgagcttcttaaaaagaacggtaatgcgcaagccgaaaactcatttagtggcgttagc 420
N E L L K K N G N A Q A E N S F S G V S
tattggctagttaaacataaaaattgaagttttctatccaggaccagggcacactcaggat 480
Y W L V K H K I E V F Y P G P G H T Q D
aatgtagtggtttggttgcctgaaaagaaaattttatttggcgggttgtttattaagccg 540
N V V V W L P E K K I L F G G C F I K P
gacggtcttggttatttgggagacgcaaactctagaagcatggcctaagtccgcagaaaca 600
D G L G Y L G D A N L E A W P K S A E T
Taatgtctaagtatggttaatgcaaaactggttgtttcgagtcatagtgaaattgggggc 660
L M S K Y G N A K L V V S S H S E I G G
gcatcactattgaagcgcacttgggagcaggctgttaaggggctaaaagaaagtaaaaaa 720
A S L L K R T W E Q A V K G L K E S K K
ccatcacagccaaataacTAATTTTCTAACAAGTCTCTCAAGCGGGACTGCCCAACCGG 780
P S Q P N N *
CGCTGCTTTCAGCATAGCGCCGGTTGCGTACGTTTCGCGCTGCGCGCTCCACTCAGCCCC 840
TTAGCTCTGCGTTAGCCACCAAGGAGGTGCC 871

Εικόνα 18. Η αλληλουχία του νέο γονιδίου *IMP* και η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί. Με πλάγια γραφή η αλληλουχία του *attC* (59 base element).

Να σημειωθεί ότι η νουκλεοτιδική αλληλουχία δεν διέφερε καθόλου και δεν υπήρχαν σημειακές μεταλλάξεις μεταξύ των πέντε κλινικών στελεχών 1836, 1773, 1747, 1876 και 1786, από τα οποία απομονώθηκε το γονίδιο *IMP*. Δεν ήταν δυνατή η απομόνωση μέσω PCR του γονιδίου του στελέχους 1766.

Όσον αφορά την πρωτεΐνη για την οποία κωδικοποιεί το νέο αυτό γονίδιο *IMP*, διαφέρει κατά 44 αμινοξέα έναντι της IMP_1 , που αντιστοιχεί σε ομολογία 82 %. Μέχρι τώρα το πιο διαφοροποιημένο *IMP* είναι το IMP_{12} , που διαφέρει κατά 36 αμινοξέα με το IMP_1 . Την μεγαλύτερη ομοιότητα το παρόν ένζυμο φαίνεται να την έχει με το IMP_8 , με το οποίο διαφέρουν σε 33 αμινοξέα, έχουν δηλαδή ομοιότητα περίπου 86 %. Πραγματοποιήθηκε πολλαπλή αντιστοίχιση (ομοπαράθεση) της νέας πρωτεΐνης *IMP*, την ονομάζουμε IMP_X , με σχεδόν όλες τις γνωστές *IMP*, συγκεκριμένα 23 από τις 26, των οποίων την αμινοξική αλληλουχία πήραμε από την GenBank. Στην εικόνα που ακολουθεί, (εικόνα 19), παρουσιάζεται η πολλαπλή αντιστοίχιση της IMP_X με τις 23 ήδη γνωστές *IMP*. Για την εικόνα αυτή έγινε η χρήση της γνωστής δευτεροταγούς δομής της IMP_1 (Docquier et al., 2003), με κίτρινο παρουσιάζονται τα β-φύλλα (strands) και με κυανό οι α-έλικες (helices), ενώ με γκρι και αστερίσκο παρουσιάζονται τα αμινοξέα που παίζουν ρόλο στην δέσμευση των ιόντων ψευδαργύρου στις MBL τύπου *IMP* και βρίσκονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Η νέα αυτή πρωτεΐνη παρουσιάζει ορισμένα αμινοξέα (τουλάχιστον 14) στα β-φύλλα και οι α-έλικες, που είναι διαφορετικά σε σχέση με όλα τα *IMP* ένζυμα. Αρχικά στο β-φύλλο 1, η Leu_{25} που υπάρχει σε όλες τις άλλες *IMP* πρωτεΐνες, έχει αντικατασταθεί στη νέα *IMP* από Ile . Επίσης στο β-φύλλο 2, η Gly_{33} που υπάρχει σε όλες τις άλλες *IMP* πρωτεΐνες, έχει αντικατασταθεί στη νέα *IMP* από Ala . Ομοίως στο φύλλο 2, η Leu_{64} έχει αντικατασταθεί από Ile . Νέο αμινοξύ παρατηρείται και σε στο κατάλοιπο 79 στην α-έλικας 1, όπου αντί για Asx ή Thr , έχουμε στη νέα *IMP*, Arg . Όμοια στο κατάλοιπο 118 της α-έλικας 3, αντί για Glu ή Val έχουμε Lys . Παρομοίως, στο κατάλοιπο 133 του β-φύλλου 6, αντί για Lys ή Thr έχουμε Glu , ενώ στο κατάλοιπο 146 του β-φύλλου 8, αντί για Asx ή Lys έχουμε His . Τέλος στο κατάλοιπο 200 της α-έλικας 4, έχουμε Thr αντί για Leu , Ile ή Lys , ενώ στο κατάλοιπο 220 του β-φύλλου 11, έχουμε Gly αντί Asx ή Asp . Επίσης σημαντική είναι και η αλλαγή στο κατάλοιπο 101, όπου αντί Thr ή Ser , έχουμε στη νέα *IMP*, Ala , μια αλλαγή που βρίσκεται πολύ κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Τέλος νέα αμινοξέα παρατηρούνται και στα κατάλοιπα 129 και 130, όπου αντί Lys και Val , έχουμε στη νέα *IMP*, Asn και Ala αντίστοιχα. Τα παραπάνω φαίνονται και στην εικόνα 19 που ακολουθεί.

ΣΤΕΛΕΧΗ *Pseudomonas aeruginosa*

	H3	S6	S7	S8	*	S9	*
	+						+
	130	140	150	160	170	180	
IMP_X	WELK...GNAQAENSFSGVSYWLVKHKIEVFYPGPGHTQDNVVVWLPEKKILFGGC	FIKP					
IMP_1	D.KV..T.....N.....N.....P.....R...Y.....						
IMP_2	D.KV..K.....N.....N.....P.....R.....V..						
IMP_4	D.KV..K..G..N.....N.....P..L.....R.....						
IMP_5	D.KV..K.....A.....K.....P.....NRV.....V..						
IMP_6	D.KV..T.....N.....N.....P.....R.....V..						
IMP_7	D.KV..K.....A.....K..I.....P.....HRV.....V..						
IMP_8	D.KV..K.....N.....N.....P.....R.....V..						
IMP_9	D.KV..KY.....K.....AP.....NRV.....V..						
IMP_10	D.KV..T.....N.....N.....P.....R.....						
IMP_11	D.KV..K.....N.....N.....KN.....V..						
IMP_12	KV..T.....N.....I.....N.....V..						
IMP_13	S.KV..KY.....N.....L.....SE.....						
IMP_14	DNKV..KH..N...S.I.N.....V..						
IMP_15	D.KV..K.....G...NN.....P.....NRV.....V..						
IMP_16	KV..K.....L.N..I.....V..						
IMP_18	DNKV..T.....S.I.N.....V..						
IMP_19	D.KV..K.....N.....V..						
IMP_20	D.KV..K.....N.....V..						
IMP_21	D.KV..K.....N.....KN.....V..						
IMP_22	D..Q..KV..K.....N.....V..						
IMP_24	D.KV..K.....N.....V..						
IMP_25	D.KV..KY.....K.....AP.....NRV.....V..						
IMP_26	D.KV..T.....N.....N.....P.....R.....						

	H4	S10	*	S11	H5	
	+					
	190	200	210	220	230	240
IMP_X	DGLGYLGDANLEA...PKSAETLMS...GNAKLVVSSHSEIGGAS...LKRTWEQAVKGLKE...KK					
IMP_1	Y..N....I.....KL.K...K...P...V.D...L.L...N...					
IMP_2	..N.....KI...VK.....D.....N...					
IMP_4	Y..N....V.....KL.I...K...P...A.D...L.L...N...					
IMP_5	Y..N....I.....KL.K...K...P...V.D...L.L...N...					
IMP_6	Y..N....V.....KL.K...K...PA..V.D...L.L...N...					
IMP_7	Y..N....I.....KL.V...K...P...V.D...L.L...N...					
IMP_8	..N.....KI...K.....D.....N...					
IMP_9	Y..N....I.....KL...SK...P..D..DS...L...T..FN...					
IMP_10	Y..N....V.....KL.K...K...P...V.D...L.L...N...					
IMP_11	Y..N.D...V...H...K.I.....P..D..D...L.....N...					
IMP_12	..N.D...K.....KI...K.....G...N...L.....					
IMP_13	H..N.....KI...K.....K.D...M.....L.....					
IMP_14	..N.....KI...K.....D..DV.....N...					
IMP_15	Y..N....V...H...I...R.....P..DV.D...L.....					
IMP_16	Y..N.D...V...H...I...R.....P..DV.D...L.....					
IMP_18	..N.....KI...K.....N...Q.....N...					
IMP_19	..N.....KI...VK.....D.....N...					
IMP_20	..N.....KI...VK.....D.....N...					
IMP_21	Y..N.D...V...H...K.I.....P..D..D...L.....N...					
IMP_22	Y..N.D...V...H...I...R.....P..D..D...L.....					
IMP_24	..N.....KI...K.....D.....N..R.					
IMP_25	Y..N....I.....KL...SK...PG..D..DS...L...T..FN...					
IMP_26	Y..N.S...I.....KL.K...K...PG..V.D...L.L...N...					

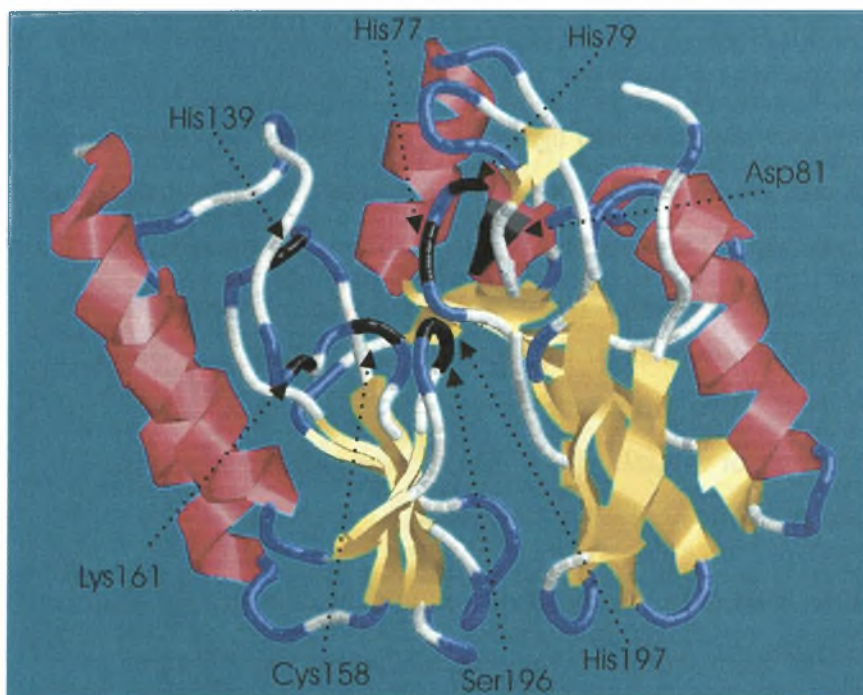
IMP_X	PSQPNN
IMP_1	..K.S.
IMP_2S.
IMP_4	..KLS.
IMP_5	..K.S.
IMP_6	..K.S.
IMP_7	L.K.S.
IMP_8S.
IMP_9	STTAH-
IMP_10	..K.S.
IMP_11	SNTVH-
IMP_12	.LL.S.
IMP_13	T.S.S.
IMP_14	S...SD
IMP_15	..L.S.
IMP_16S.
IMP_18	.L..SS
IMP_19S.
IMP_20S.
IMP_21	SNTVH-
IMP_22	..E.S.
IMP_24S.
IMP_25	STTAH-
IMP_26	..K.S.

Εικόνα 19. Αμινοξική αντιστοίχιση της αλληλουχίας της νέας πρωτεΐνης IMP, εδώ συμβολίζεται ως IMP_x , με τις μέχρι τώρα γνωστές IMP πρωτεΐνες. Δευτεροταγείς δομές (H, έλικες, S, φύλλα) παρουσιάζονται επίσης, ενώ με αστερίσκο παρουσιάζονται τα κατάλοιπα που παίζουν ρόλο στο δέσμευση των ιόντων ψευδαργύρου.

Όμως αυτές οι μοναδικές αλλαγές σε αμινοξέα που παρατηρούνται στην νέα IMP, είναι λίγο δύσκολο να ερμηνευτούν γνωρίζοντας μόνο τη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης, καθώς δεν γνωρίζουμε πόσο κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου βρίσκονται, για το λόγο αυτό είναι αναγκαία η δημιουργία ενός μοντέλου της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης IMP. Σίγουρα στο κατάλοιπο 101, η παρουσία Αλανίνης αντί Θρεονίνης ή Σερίνης, είναι πολύ πιθανόν να επηρεάζει την ενεργότητα του ενζύμου καθώς βρίσκεται πολύ κοντά στο συντηρημένο μοτίβο HHD που παίζει ρόλο στη δέσμευση των ιόντων ψευδαργύρου. Τα αμινοξέα Σερίνη και Θρεονίνη είναι και τα δύο πολικά αμινοξέα (υδρόφιλα) και υπάρχουν συνήθως στα ενεργά κέντρα πολλών ενζύμων, όπου δρουν σαν δότες υδρογόνου. Στην περίπτωση μας, στη νέα IMP πρωτεΐνη, αντί αυτών των σημαντικών αμινοξέων του ενεργού κέντρου, έχουμε το αμινοξύ Αλανίνη, ένα μη πολικό (υδρόφοβο) αμινοξύ, το οποίο είναι ένα δομικό αμινοξύ, συμμετέχει μόνο στην τριτοταγή δομή πρωτεϊνών και δεν συμμετέχει στη λειτουργικότητα του ενεργού κέντρου ενζύμων. Επομένως αυτή η αλλαγή πολύ πιθανόν να επηρεάζει την ενεργότητα της νέας IMP.

4.5. Πρόβλεψη τριτοταγούς δομής της νέας πρωτεΐνης IMP

Έγινε ο σχεδιασμός της δομής της νέας πρωτεΐνης IMP με βάση την ομοιότητα της ακολουθίας της με την πρωτεΐνη IMP₁ (Homology modeling), της οποίας η τριτοταγής δομή είναι γνωστή πειραματικά μέσω κρυσταλλογραφίας. Η εικόνα του μοντέλου φαίνεται στην επόμενη εικόνα, εικόνα 20, όπου διακρίνονται με μαύρο χρώμα τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου: His₇₇, His₇₉, His₁₉₇ τα οποία βοηθούν και στη δέσμευση των ιόντων ψευδαργύρου, καθώς και τα σημαντικά αμινοξέα του ενεργού κέντρου Asp₈₁, Cys₁₅₈, Lys₁₆₁ και Ser₁₉₆. Η αρίθμηση των αμινοξέων είναι διαφορετική από αυτή της εικόνας 19, καθώς για την πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής αφαιρέθηκαν τα 18 πρώτα αμινοξέα, επειδή έλειπαν και στην γνωστή τριτοταγή δομή της IMP₁. Επομένως το μοντέλο της τριτοταγούς δομής της νέας IMP ξεκινά από τη Gly₁₉ της εικόνας 19, όπως και το μοντέλο της IMP₁ που χρησιμοποιήθηκε ξεκινά από την Ala₁₉.

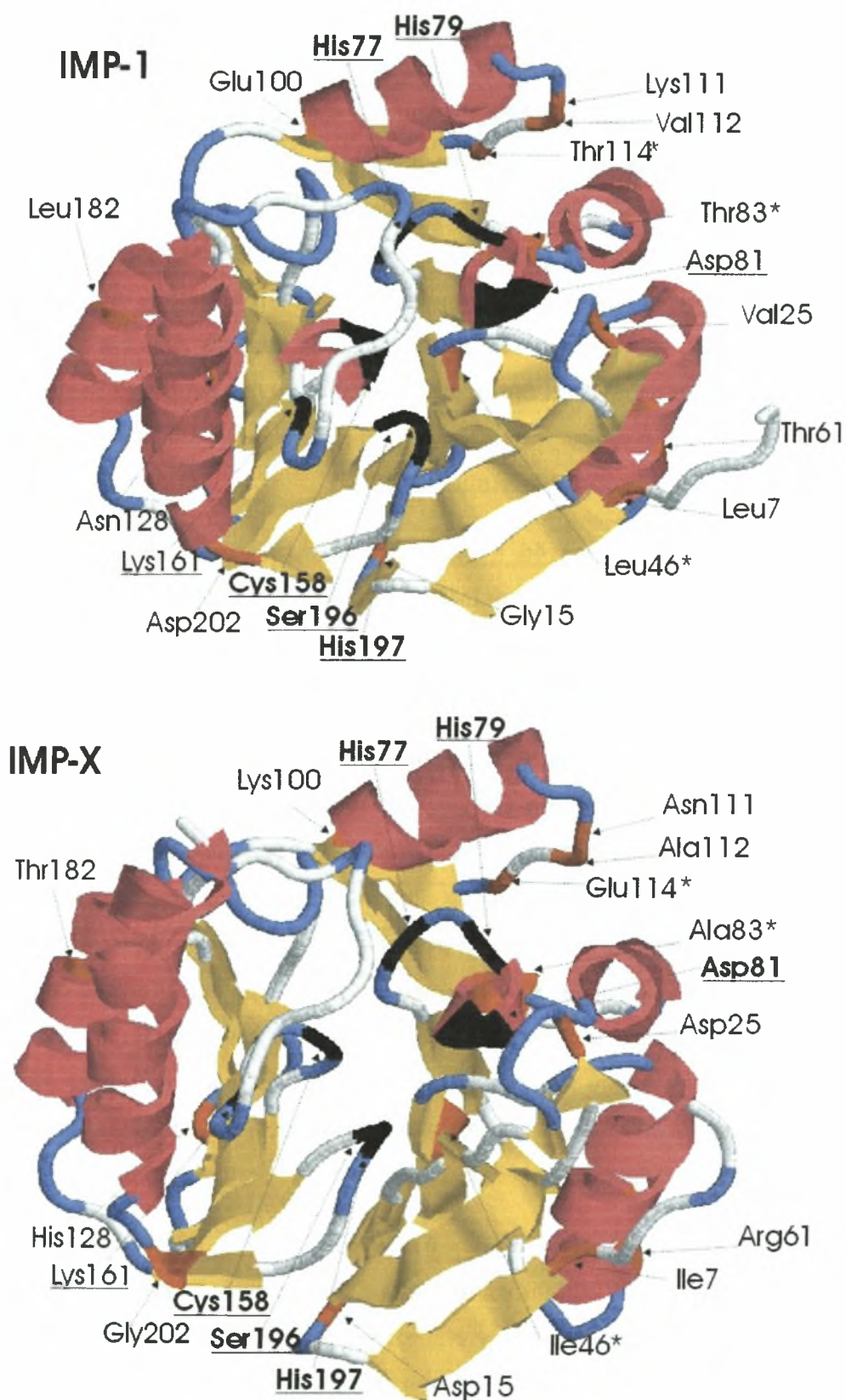


Εικόνα 20. Πιθανό μοντέλο της τριτοταγής δομής της νέας IMP. Με μαύρο χρώμα παρατηρούνται τα σημαντικότερα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της μέταλλο-β-λακταμάσης. Το ενεργό κέντρο είναι μια μεγάλη αύλακα, όπου περιέχονται τα κέντρα πρόσδεσης των κατιόντων ψευδαργύρου στα κατάλοιπα His και γίνεται η υδρόλυση του υποστρώματος.

Συγκεκριμένα κάναμε τρία μοντέλα της πιθανούς τριτοταγούς δομής της IMP. Μέσω του προγράμματος ProQ (*Cristobal et al., 2001*) του δικτυακού τόπου <http://www.sbc.su.se/~bjornw/ProQ/ProQ.cgi>, έγινε έλεγχος της ποιότητας του κάθε μοντέλου, ώστε να επιλέξουμε το πιο κατάλληλο. Το ένα από τα τρία μοντέλα (το μοντέλο νούμερο 2) είχε τις υψηλότερες τιμές σε Predicted LGscore και MaxSub. Τόσο η μέθοδος LG και η μέθοδος MaxSub ανιχνεύουν τμήματα κοινά μεταξύ της πρωτεΐνης του πιθανού μοντέλου και της «σωστής» πρωτεΐνης, της οποίας η τριτοταγής δομή είναι γνωστή μέσω κρυσταλλογραφίας (*Wallner et al., 2003*). Η τιμή του Predicted LGscore ήταν 7.106 (LGscore>4 extremely good model) και του Predicted MaxSub ήταν 0,611 (MaxSub>0.5 very good model), επιβεβαιώνοντας ότι το μοντέλο της πιθανής τριτοταγής δομής της IMP_X ήταν πάρα πολύ καλό. Αυτό το μοντέλο χρησιμοποιήσαμε και η εικόνα του φαίνεται στην εικόνα 21.

Συγκρίνοντας την τριτοταγή δομή της νέα IMP με τη γνωστή δομή της IMP₁, παρατηρήσαμε ότι η νέα IMP έχει σχεδόν παρόμοια δομή με την IMP₁ και ότι η τρισδιάστατη διαμόρφωση που έχουν όλες οι μέταλλο-β-λακταμάσες, δύο επιφάνειες β-πτυχωτών φύλλων στο πυρήνα και πέντε α-έλικες στην περιφέρεια, διατηρείται και στη δική μας νέα IMP. Ο αριθμός των β-φύλλων στη νέα πρωτεΐνη είναι ο ίδιος με την IMP₁, μόνο που η νέα μας πρωτεΐνη διαφέρει κατά μια α-έλικα που υπάρχει κοντά στην ευέλικτη αύλακα του ενεργού κέντρου, στην IMP₁ υπάρχουν δύο μικρές α-έλικες, ενώ στην νέα IMP μόνο μια. Επίσης παρατηρήσαμε πόσο κοντά στο ενεργό κέντρο βρίσκονται αυτές οι νέες αλλαγές αμινοξέων που παρουσιάζει η νέα IMP, και επομένως μπορούν να επηρεάσουν την ενεργότητά του.

Στην εικόνα 21, που ακολουθεί παρουσιάζονται οι νέες αλλαγές αμινοξέων που έχει η καινούργια IMP, IMP_X, σε σύγκριση με την IMP₁. Με σκούρα και υπογραμμισμένη γραφή παρουσιάζονται τα σημαντικότερα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της μέταλλο-β-λακταμάσης (μαύρο χρώμα), που βλέπουμε ότι διατηρούνται και στη νέα IMP_X πρωτεΐνη, ενώ παρουσιάζονται και τα νέα αμινοξέα της IMP_X (κόκκινο χρώμα), με αστερίσκο παρουσιάζονται τα νέα αμινοξέα που έχει η IMP_X σε σύγκριση με την IMP₁ που βρίσκονται αρκετά κοντά στο ενεργό κέντρο και έτσι πιθανόν να επηρεάζουν την ενεργότητά του.



Εικόνα 21. Σύγκριση της τριτοταγής δομής της IMP_1 με την IMP_X .

Από τις αλλαγές σε νέα αμινοξέα που έχει η καινούργια IMP σε σχέση με τις ήδη γνωστές IMP, όπως μπορούμε να δούμε και από την εικόνα 19, διαπιστώνουμε ότι αλλαγές στα κατάλοιπα 46, 83 και 114 είναι αυτές που βρίσκονται κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και επομένως πιθανόν επηρεάζουν την λειτουργικότητά του.

Στο κατάλοιπο 83 το αμινοξύ Ser που υπάρχει στην IMP₁, είναι ένα πολικό αμινοξύ (υδρόφιλο) που συναντάται συνήθως στα ενεργά κέντρα πολλών ενζύμων, όπου δρα σαν δότης υδρογόνου. Στην περίπτωσή μας, στη νέα IMP πρωτεΐνη, αντί αυτού του σημαντικού αμινοξέος του ενεργού κέντρου, έχουμε το αμινοξύ Ala, ένα μη πολικό (υδρόφοβο) αμινοξύ, το οποίο είναι ένα δομικό αμινοξύ και δεν μπορεί να συμμετάσχει στη λειτουργικότητα του ενεργού. Επομένως αυτή η αλλαγή πολύ πιθανόν να επηρεάζει την ενεργότητα της νέας μέταλλο-β-λακταμάσης IMP.

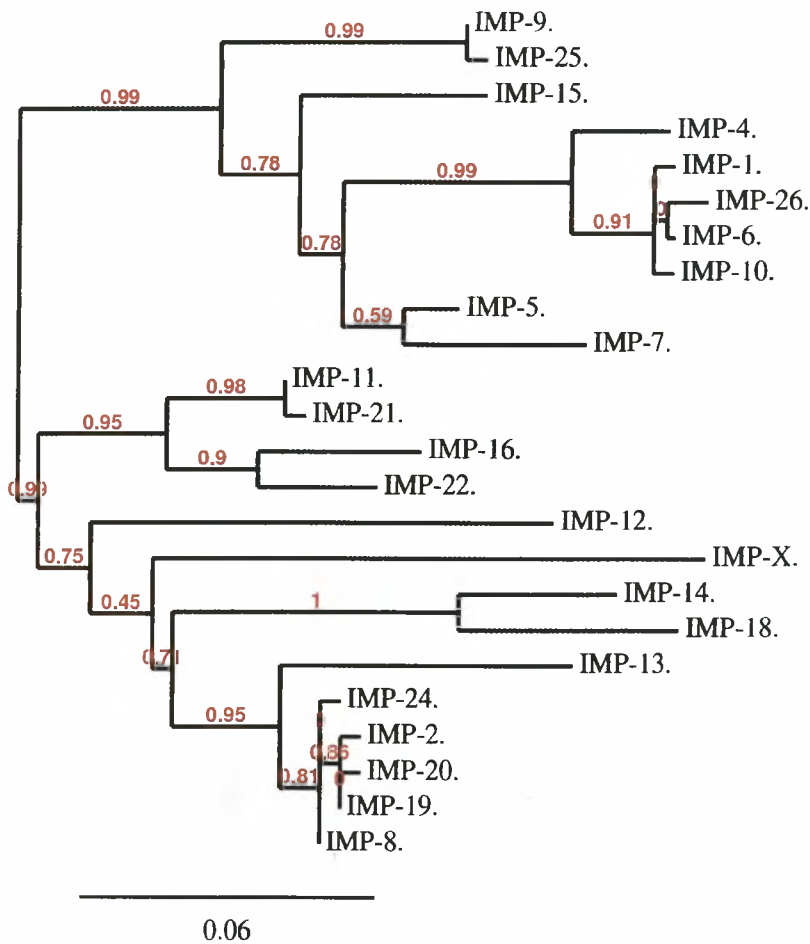
Η αλλαγή στο κατάλοιπο 46 η οποία βρίσκεται και αυτή κοντά στο ενεργό κέντρο, από Leu στην IMP₁, σε Ile στην IMP_x, το ποίο πιθανόν είναι να μην επηρεάζει καθόλου την λειτουργικότητα του ενζύμου, καθώς έχουν και τα δύο υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες και χημική τους δομή μοιάζει αρκετά

Στο κατάλοιπο 114, η αλλαγή της Thr σε Glu, πιθανότατα να επηρεάζει την ενεργότητα του ενζύμου μας. Η Thr είναι ένα πολικό αμινοξύ με αφόρτιστη πλευρική αλυσίδα, αντίθετα το Glu είναι φορτισμένο αρνητικά και έχει μεγαλύτερο pKa από το pKa της Thr. Γενικά η τιμή pKa του ενεργού κέντρου ενός ενζύμου μπορεί να αλλάξει το προφίλ του ενζύμου που εξαρτάται από το pH. Στις μέταλλο-β-λακταμάσες κύριο ρόλο στο ενεργό κέντρο διαδραματίζουν τα κατάλοιπα His και η τιμή της pKa τους κυριαρχεί στην ενζυμική δραστηριότητα. Με την ύπαρξη στο κατάλοιπο 114 ενός Glu, αυξάνεται το αρνητικό φορτίο του ενεργού κέντρου και άρα και το pKa των κατάλοιπων His του ενεργού κέντρου, που σταθεροποιεί την πρωτονιωμένη μορφή της His, αυξάνοντας έτσι την δραστηριότητα του ενζύμου (*Aslyn et al., 2006*).

Οι αλλαγές στα κατάλοιπα 7, 15, 25, 61, 100, 111, 112, 128, 182 και 202, όπως φαίνεται και από την εικόνα 19, βρίσκονται μακριά από το ενεργό κέντρο του ενζύμου και έτσι δεν μπορούν να επηρεάζουν την ενεργότητα του ενζύμου. Η μόνη αλλαγή που μπορούν να επιφέρουν είναι αλλαγές στη τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης.

4.6. Φυλογενετική ανάλυση της νέας IMP πρωτεΐνης

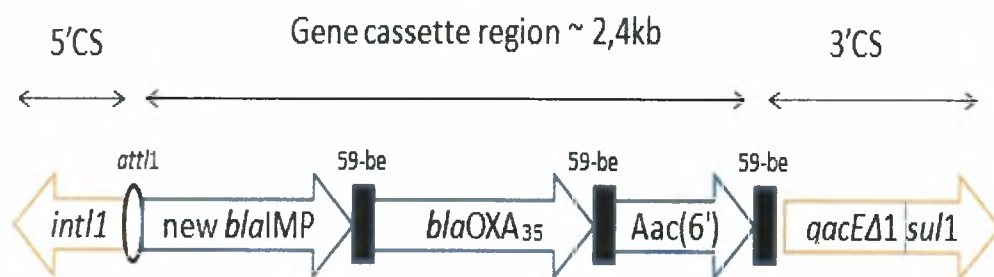
Με βάση την αμινοξική ομοπαράθεση της νέας αυτής IMP πρωτεΐνης με σχεδόν όλες τις ήδη γνωστές IMP ήταν δυνατή η κατασκευή ενός φυλογενετικού δέντρου με σχεδόν όλες της IMP πρωτεΐνες. Φυλογενετικά η νέα αυτή IMP, IMP_X, έχει κάπως μεγαλύτερη ομοιότητα με τις IMP₁₂ και τις IMP₁₄ και IMP₁₈, αν και δεν έχει ομολογία επαρκή για να τοποθετηθεί στην ίδια υποομάδα, από τις περίπου επτά που υπάρχουν, με καμία IMP λακταμάση. Το φυλογενετικό δέντρο φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί, εικόνα 20.



Εικόνα 20. Neighbor-joining δενδρόγραμμα που δείχνει την συγγένεια της νέας IMP πρωτεΐνης, με τις ήδη γνωστές IMP MBLs. Για τον υπολογισμό έγινε πολλαπλή ομοπαράθεση με το CLUSTAL W (2), με πίνακα-μήτρα το PAM350. Παρουσιάζονται και οι τιμές bootstrap (Scale bar, 0.06 υποκαταστάσεις ανά αμινοξύ).

4.7. Χαρτογράφηση του ιντεγκρονίου που περιέχει τη νέα *IMP MBL*

Μέσω της αλληλούχισης επικαλυπτόμενων τμημάτων των PCR προϊόντων, μπορέσαμε να προσδιορίσουμε την διάταξη του ιντεγκρονίου και την σειρά των γονιδιακών κασετών. Με αυτή την προσέγγιση βρήκαμε ότι το νέο γονίδιο *bla_{IMP}* είναι καθοδικά της ιντεγκράσης, του *attI1* σημείου ανασυνδυασμού και δύο υποκινητών P1 και P2. Καθοδικά του νέου γονιδίου *IMP* και του στοιχείου των 59 be υπάρχουν δύο γονίδια, το *bla_{OXA}* και το *AAC(6')* που κωδικοποιούν για την περιορισμένου φάσματος οξακιλλινάση OXA και για την AAC(6') ακετυλοτρανσφεράση αντίστοιχα. Το γονίδιο OXA είχε μεγάλη ομολογία, 97%, με το *OXA₃₅*, accession number AF315786.1, αλλά για το γονίδιο *AAC(6')* δεν ήταν δυνατή η πλήρης ταυτοποίησή του καθώς δεν ήταν καλή η αλληλούχιση. Με προηγούμενες PCR, που δεν παρουσιάζονται σε αυτή τη μελέτη, είχαν βρεθεί τα στοιχεία της 3' συντηρημένης περιοχής, *qacED1* και *sul1*, επομένως μιλάμε για ιντεγκρόνιο της τάξης 1. Επίσης, το 59be αμέσως μετά το νέο *IMP* γονίδιο είχε 81% ομοιότητα με ένα 59be καθοδικά ενός *OXA₃₇* γονιδίου, που βρέθηκε στο ιντεγκρόνιο IntAb74 του *Acinetobacter baumannii*, accession number AY007784. Η σχηματική αναπαράσταση του ιντεγκρονίου φαίνεται στην επόμενη εικόνα 21.



Εικόνα 21. Σχηματική αναπαράσταση του ιντεγκρονίου τάξης 1 μέσα στο οποίο βρέθηκε η νέα *IMP* λακταμάση, τα βέλη υποδεικνύουν την κατεύθυνση μεταγραφής του κάθε γονιδίου.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η κατανόηση της μικροβιακής αντοχής λόγω μέταλλο-β-λακταμασών έχει εξελιχθεί πάρα πολύ μέσα στα 20 χρόνια από την απομόνωση της πρώτης μέταλλο-β-λακταμάσης, την IMP₁. Μια ιδιαίτερα αυξανόμενη απειλή για το νοσοκομειακό περιβάλλον αποτελεί η εμφάνιση πολυανθεκτικών μικροβίων λόγω της ύπαρξης μέσα σε αυτά, κυρίως μέσα σε ιντεγκρόνια, γονιδίων β-λακταμασών και άλλων γονιδίων αντοχής. Για το λόγο αυτό, είναι επιτακτική η ανάγκη για κάθε δυνατή προσπάθεια για την κατανόηση αυτών των πολύπλοκων μηχανισμών της μικροβιακής αντοχής, όχι μόνο για την αντιμετώπισή τους, αλλά για την αποφυγή από την περαιτέρω εξέλιξη και διάδοσή τους μεταξύ των μικροβιακών ειδών.

Σε αυτή τη μελέτη παρουσιάσαμε την απομόνωση μιας νέας IMP τύπου μέταλλο-β-λακταμάσης. Αυτή η νέα IMP MBL, βρέθηκε σε 5 κλινικά στελέχη *Pseudomonas aeruginosa*, μέσα σε ένα ιντεγκρόνιο τάξης 1, το οποίο περιέχει καθοδικά του IMP γονιδίου, τα γονίδια *bla*_{OXA35} και *ACC(6')*. Η πρωτεΐνη της νέας αυτή IMP β-λακταμάσης παρουσιάζει σημαντικές διαφορές σε σχέση με τις ήδη γνωστές IMP πρωτεΐνες, ακόμα και σε σχέση με την ήδη πιο πολύ διαφοροποιημένη IMP₁₂. Επόμενη προσπάθεια θα είναι ο πλήρης βιοχημικός χαρακτηρισμός αυτής της νέας IMP πρωτεΐνης και η εύρεση β-λακταμικών αντιβιοτικών, εκτός των καρβαπενεμών, που υδρολύει, καθώς και των κινητικών παραμέτρων της νέας IMP για αυτά τα αντιβιοτικά. Ακόμη, η εξακρίβωση, μέσω πλασμιδιακής ανάλυσης ή Southern Blotting, ότι όντως αυτό το ιντεγκρόνιο βρίσκεται μέσα στο χρωμοσωμικό DNA των κλινικών στελεχών και όχι σε κάποιο πλασμίδιο. Επίσης ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η προσέγγιση της απομόνωσης του γονιδίου μέσω κλωνοποίησης τυχαίας προσπέλασης. Αν και στην περίπτωση μας δεν ήταν δυνατή η απομόνωση του γονιδίου IMP, θεωρητικά είναι δυνατή η απομόνωση ενός τέτοιου γονιδίου με τη μέθοδο αυτή. Ακόμη αίσθηση προκαλεί η μετατροπή του εργαστηριακού στελέχους *Pseudomonas aeruginosa* PAO₁ μέσω της κλωνοποίησης τυχαίας προσπέλασης, από ένα ευαίσθητο εργαστηριακό στέλεχος, χωρίς αντοχή σε κάποιο αντιβιοτικό, σε ένα στέλεχος υψηλής αντοχής στην ιμιπενέμη, όμοια με αυτή των κλινικών στελεχών. Για το λόγο αυτό ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εύρεση της αιτίας της υψηλής αντοχής αυτών των μετασχηματισμένων αποικιών.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Arnold K.**, Bordoli L., Kopp J., and Schwede T. *The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling*. Bioinformatics (2006), 22: 195-201.
- **Aslyn E.**, Dougherty D. *Modern physical organic chemistry*. (2006)
- **Bauer AW**, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method*. American Journal of Clinical Pathology (1966), 45:493–496.
- **Baxevanis**, Francis Ouellette, ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ, 2^Η ΕΚΔΟΣΗ, (2003).
- **Bebrone C.** *Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily*. Biochemical Pharmacology (2007) 74:1686-701.
- **Beceiro**, Alejandro; Bou, German. *Class C [beta]-Lactamases: an increasing problem worldwide*. Reviews in Medical Microbiology (2004), 15 : 141-152
- **Bennett.** *Integrans and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (1999), 43:1-4.
- BMC Bioinformatics (2005), 6: 1186
- **Boutoille D**, Jacqueline C, Le Mabecque V, Potel G, Caillon J. *In vivo impact of the MexAB-OprM efflux system on beta-lactam efficacy in an experimental model of Pseudomonas aeruginosa infection*. Int J Antimicrob Agents. (2009), 33:417-420.
- **Bush K.**, G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros. *A functional classification scheme for β-lactamases and its correlation to molecular structure*. Antimicrob. Agents Chemother. (1995), 39:1211-1233. Review.
- **Choi Kyoung-Hee** , Kumar Ayush, Schweizer Herbert P . *A 10-min method for preparation of highly electrocompetent Pseudomonas aeruginosa cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation*. Journal of Microbiological Methods (2006), 64: 391-397.
- **Cristobal S**, Zemla A, Fischer D, Rychlewski L, Elofsson A. *A study of quality measures for protein threading models*. BMC Bioinformatics (2001),1:5
- **Dereeper A.**, Guignon V., Blanc G., Audic S., Buffet S., Chevenet F., Dufayard J.F., Guindon S., Lefort V., Lescot M., Claverie J.M., Gascuel O. *Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist*. Nucleic Acids Res. (2008), 1:465-469.
- **Diver J.M.**, Bryan, L.E., Sokol, P.A.. Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. Analytical Biochemistry (1990), 189: 75-79.
- **Docquier JD**, Riccio ML, Mugnaioli C, Luzzaro F, Endimiani A, Toniolo A, Amicosante G, Rossolini GM. *IMP-12, a new plasmid-encoded metallo-beta-lactamase from a Pseudomonas putida clinical isolate*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2003), 47:1522-1528.
- **Fluit A. C.** and Schmitz F.-J. *Resistance integrons and super-integrons*. REVIEW Clinical Microbiology (2004), 10: 272–288
- **Garza-Ramos U**, Morfin-Otero R, Sader HS, Jones RN, Hernández E, Rodriguez-Noriega E, Sanchez A, Carrillo B, Esparza-Ahumada S, Silva-Sanchez J. *Metallo-beta-lactamase gene bla(IMP-15) in a class 1 integron, In95, from Pseudomonas aeruginosa clinical isolates from a hospital in Mexico*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2008), 52:2943-2946.
- **Gilson H.** and Krauss M. *Structure and Spectroscopy of Metallo-Lactamase Active Sites*. Journal of American Chemotherapy Society (1999), 121: 6984–6989.
- **Guex**, N. and Peitsch, M. C. *SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling*. Electrophoresis Bioinformatics (1997), 18: 2714-2723.
- **Haluk Vahaboglu**, Recep Ozturk, Huriye Akbal, Suat Saribas, Ozlem Tansel and Figen Coşkun. *Practical Approach for Detection and Identification of OXA-10-Derived Cefazidime-Hydrolyzing Extended-Spectrum β-Lactamases*. J Clin Microbiol (1998) 36: 827–829.

- **Héritier C.**, Poirel L., Lambert T. and Nordmann P. *Contribution of Acquired Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinases to Carbapenem Resistance in Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother (2005), 49: 3198–3202.
- **Ikonomidis A.**, Tsakris A., Kantzanou M., Spanakis N., Maniatis A. N. & Pournaras S. *Efflux system overexpression and decreased OprD contribute to the carbapenem heterogeneity in Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiology Letters (2007), 279: 36 – 39.
- **Jacoby, G.A.** *AmpC β-Lactamases..* Clinical Microbiology Review (2009), 22:161-182.
- **Jianhui Xiong**, Michael F. Hynes, Huifen Ye, Huiling Chen, Yinmei Yang, Fatima M Zali, Peter M. Hawkey. *blaIMP-9 and Its Association with Large Plasmids Carried by Pseudomonas aeruginosa Isolates from the People's Republic of China*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2006), 50: 355-358.
- **Katou K**, Nakamura A, Kato T, Tonegawa K, Kutsuna T, Niwa T, Morita H, Itoh M. *Combined effects of panipenem and aminoglycosides on methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa in vitro*. Chemotherapy (2005), 51:387-391.
- **Kayser**, Medical Microbiology, (2005).
- **Khar Heng Choo**, Tin Wee Tan and Shoba Ranganathan. *SPdb – a signal peptide database*.
- **Knox, J.R.** *Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type β-lactamases: mutation, specificity, and three-dimensional structure*. Antimicrob. Agents Chemother (1995), 39:2593-2601.
- **Kontou M**, Pournaras S, Kristo I, Ikonomidis A, Maniatis AN, Stathopoulos C. *Molecular cloning and biochemical characterization of VIM-12, a novel hybrid VIM-1/VIM-2 metallo-beta-lactamase from a Klebsiella pneumoniae clinical isolate, reveal atypical substrate specificity*. Biochemistry (2007), 46: 13170-131178.
- **Lai E**, Birren BW, Clark SM, Simon MI, Hood L. *Pulsed field gel electrophoresis*. Biotechniques. (1989), 7:34–42.
- **Larkin M.A.**, Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J. and Higgins D.G. *ClustalW and ClustalX version 2*. Bioinformatics (2007), 21: 2947-2948.
- **Lee K**, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. *Evaluation of the Imipenem and EDTA Double-Disk Synergy Test for Screening Metallo-Beta-Lactamase-Producing Isolates of Pseudomonas and Acinetobacter spp*. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2002), 42nd, abstract no. D-529.
- **Lister P**, Gardner V, and Sanders C. *Clavulanate Induces Expression of the Pseudomonas aeruginosa AmpC Cephalosporinase at Physiologically Relevant Concentrations and Antagonizes the Antibacterial Activity of Ticarcillin*. Antimicrob Agents Chemother (1999), 43: 882–889.
- **MacGowan AP**, Wootton M, Holt HA. *The antibacterial efficacy of levofloxacin and ciprofloxacin against Pseudomonas aeruginosa assessed by combining antibiotic exposure and bacterial susceptibility*. J Antimicrob Chemother (1999), 43:345-349.
- **Madigan**, Martinko, Parker. Brock Biology of Microorganisms, 10th Edition (2005).
- **Mesaros N**, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, Van Laethem Y, Jacobs F, Lebecque P, Malfroot A, Tulkens PM, Van Bambeke F. *Pseudomonas aeruginosa: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium*. Clinical Microbiology and Infections (2007), 13: 60-78.
- **Owens**, Lautenbach, Antimicrobial Resistance: Problem Pathogens and Clinical Countermeasures, (2008).
- **Pagani L**, Colinon C, Migliavacca R, Labonia M, Docquier JD, Nucleo E, Spalla M, Li Bergoli M, Rossolini GM. *Nosocomial outbreak caused by multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa producing IMP-13 metallo-beta-lactamase*. Journal of Clinical Microbiology (2005), 43:3824-3828.

- **Page M.** and Badarau A. *The Mechanisms of Catalysis by Metallo-β-Lactamases*. Bioinorganic Chemistry and Applications (2008) review.
- **Page,** Curtis, Sutter, Walker, Hoffman. Φαρμακολογία, (2000).
- **Pirnay JP,** De Vos D, Mossialos D, Vanderkelen A, Cornelis P, Zizi M. *Analysis of the Pseudomonas aeruginosa oprD gene from clinical and environmental isolates*. Environmental Microbiology. (2002),12: 872-82.
- **Pournaras S,** Ikonomidis A, Tzouveleakis L S., Tokatlidou D, Spanakis N, Maniatis A. N., Legakis N J. and Tsakris A. *VIM-12, a Novel Plasmid-Mediated Metallo-β-Lactamase from Klebsiella pneumoniae That Resembles a VIM-1/VIM-2 Hybrid*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. (2005), 49: 5153-5156.
- **Pournaras, S.,** Maniati, M., Spanakis, N., Ikonomidis, A., Tassios, P. T., Tsakris, A., Legakis, N. J., Maniatis, A. N.. *Spread of efflux pump-overexpressing, non-metallo-β-lactamase-producing, meropenem-resistant but ceftazidime-susceptible Pseudomonas aeruginosa in a region with blaVIM endemicity*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2005), 56: 761-764.
- **Rodrigo E.** Mendes, Mark A. Toleman, Julival Ribeiro, Helio S. Sader, Ronald N. Jones, and Timothy R. Walsh. *Integron Carrying a Novel Metallo-Lactamase Gene, blaIMP-16, and a Fused Form of Aminoglycoside-Resistant Gene aac(6^L)-30/aac(6^L)-Ib^L: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, (2004), 48: 4693–4702.
- **Sader HS,** Pignatari AC. *E test: a novel technique for antimicrobial susceptibility testing*. Sao Paulo Medical Journal (1994), 112:635-638. Review.
- **Schwede T,** Kopp J, Guex N, and Peitsch MC. *SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server*. Nucleic Acids Research (2003), 31: 3381-3385.
- **Senda K,** Y Arakawa, S Ichiyama, K Nakashima, H Ito, S Ohsuka, K Shimokata, N Kato and M Ohta. *PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams*. Journal of Clinical Microbiology (1996), 34: 2909-2913.
- **Shaw K J,** Cramer C A, Rizzo M, Mierzwa R, Gewain K, Miller G H, and Hare R S. *Isolation, characterization, and DNA sequence analysis of an AAC(6')-II gene from Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy (1989), 33: 2052-2062.
- **Thilo Köhler,** Mehri Michea-Hamzehpour, Simone F. Epp, and Jean-Claude Pechere. *Carbapenem Activities against Pseudomonas aeruginosa: Respective Contributions of OprD and Efflux Systems*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy (1999), 43: 424-427.
- **Toleman MA,** Biedenbach D, Bennett D, Jones RN, Walsh TR. *Genetic characterization of a novel metallo-beta-lactamase gene, blaIMP-13, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme*. J Antimicrob Chemother. (2003), 52:583-90.
- **Toney J.H.,** Hammond, G.G., Fitzgerald, P.M., Sharma, N., Balkovec, J.M., Rouen, G.P., Olson, S.H., Hammond, M.L., Greenlee, M.L., Gao, Y.D. *Succinic acids as potent inhibitors of plasmid-borne IMP-1 metallo-beta-lactamase*. J.Biol.Chem (2001), 276: 31913-31918.
- **U, T.-t.,** Zhang, J.-l., Wang, J., Tao, J., Yu, Y.-s., Chen, Y.-g., Zhou, J.-y., Li, L.-j.. *Evaluation of Phenotypic Tests for Detection of Metallo-β-Lactamase-Producing Pseudomonas aeruginosa Strains in China*. Journal of Microbiological Methods. (2009), 47: 1136-1142
- **Wallner B.** and Elofsson A. *Can correct protein models be identified?* Protein Sci. (2003), 5: 1073–1086.
- **Walsh T,** Mark A. Toleman, Laurent Poirel, and Patrice Nordmann. *Metallo-β-Lactamases: the Quiet before the Storm?* Clinical Microbiology Reviews (2005), 18: 306-325.
- **Walther-Rasmussen J** and Høiby N. *Class A carbapenemases*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2007), 60: 470–482

- **Wang Zhigang**, Fast Walter, Valentine Ann M. and Benkovic Stephen J. *Metallo-β-lactamase: structure and mechanism*. Current Opinion in Chemical Biology (1999) , 5: 614-622.
- **Watson**, Myers, Caudy and Witkowski *Recombinant DNA: Genes and Genomes - A Short Course*, Third Edition. (2006)
- **West S.E.H.** , Swcheizer H.P., Dall C., Sample A.K. and Runyen-Janechy L.j.. *Construction of improved Escherichia-Pseudomonas shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* (1994), 128: 81-86.
- **Wu L.**, Serpersu E. *Deciphering interactions of the aminoglycoside phosphotransferase(3')-IIIa with its ligands*. *Biopolymers* (2009), 91: 801-809.

