



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

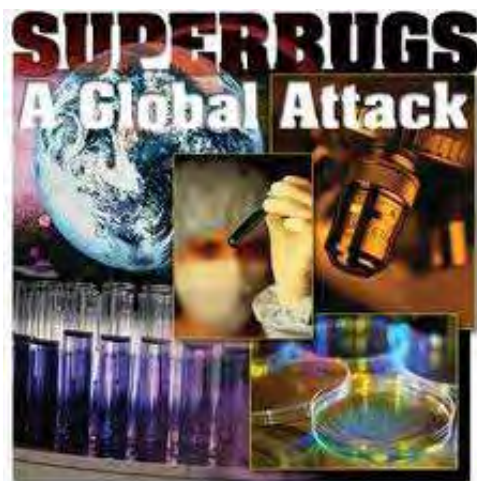


ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

**'ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ'**

με κατεύθυνση:

**«ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ»**



**ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:**

**"Αναζήτηση νέων γονιδίων αντοχής στις καρβαπενέμες σε νοσοκομειακά στελέχη GRAM αρνητικών βακτηριδίων".**

**Μπαλαούρας Γεώργιος του Θωμά  
Πτυχιούχος Ιατρικής Παν/μίου Ιωαννίνων**

**Λάρισα, Οκτώβριος 2011**



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

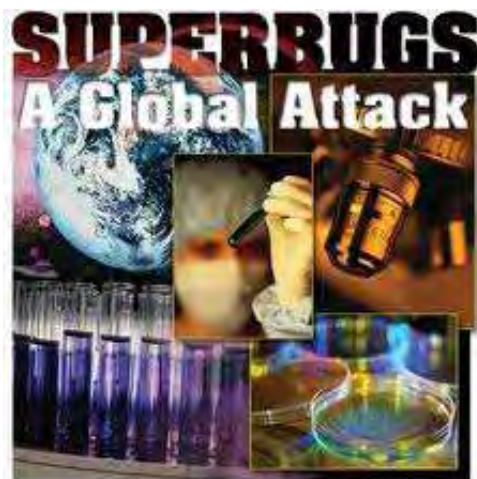


ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

**'ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ'**

με κατεύθυνση:

**«ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ»**



**ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:**

**"Αναζήτηση νέων γονιδίων αντοχής στις καρβαπενέμες σε νοσοκομειακά στελέχη GRAM αρνητικών βακτηριδίων".**

**Μπαλαούρας Γεώργιος του Θωμά  
Πτυχιούχος Ιατρικής Παν/μίου Ιωαννίνων**

**Λάρισα, Οκτώβριος 2011**

### **Η τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:**

- Σ. Πουρνάρας (Επιβλέπων), Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Β. Κρικέλης, Καθηγητής Ιολογίας, Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα (ΤΕΙ) Λάρισας
- Α.Μηνάς, Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα (ΤΕΙ) Λάρισας

## Περίληψη

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 78 κλινικά στελέχη GRAM αρνητικών βακτηριδίων που απομονώθηκαν από καλλιέργειες σωματικών υγρών ή προσθετικών υλικών, από ασθενείς που νοσηλεύθηκαν σε κλινικές του νοσοκομείου Ιπποκράτειου Θεσσαλονίκης από τον Μάρτιο του 2010 έως τον Ιανουάριο του 2011. Η αναζήτηση των νέων γονιδίων αντοχής στις καρβαπενέμες νοσοκομειακών στελεχών Gram-αρνητικών βακτηριδίων έγινε με μοριακές μεθόδους (μοριακή ανίχνευση) και συγκεκριμένα με PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης).

Σε 35 κλινικά στελέχη *K. pneumoniae* και *E. coli* αναζητήθηκε το γονίδιο *bla<sub>NDM-1</sub>*. Η NDM-1 καρβαπενεμάση δεν έχει βρεθεί ακόμη στην Ελλάδα, αν και άλλες καρβαπενεμάσες, όπως οι KPC και VIM ενδημούν. Σε 43 στελέχη *Acinetobacter baumannii* αναζητήθηκαν τα γονίδια τύπου *bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-24</sub>* και σε 20 από αυτά το γονίδιο τύπου *bla<sub>OXA-58</sub>* (*oxacillinases* 23,24,58). Κύριος στόχος ήταν τα γονίδια *bla<sub>OXA-23</sub>* και *bla<sub>OXA-24</sub>*, που είναι συχνά σε μεσογειακές χώρες, όπως Ιταλία και Ισπανία, ενώ στη χώρα μας δεν έχουν ανευρεθεί (συναντάται μόνο το γονίδιο *bla<sub>OXA-58</sub>*).

Με τη χρήση της PCR βρέθηκε ότι τα 35 στελέχη των *K. pneumoniae* και *E. coli* ήταν αρνητικά για το γονίδιο *bla<sub>NDM-1</sub>*. Από τα 43 κλινικά στελέχη του *A.baumannii* που ερευνήθηκαν για την παρουσία των γονιδίων *bla<sub>OXA-23</sub>* και *bla<sub>OXA-24</sub>* διαπιστώθηκε ότι κανένα στέλεχος δεν βρέθηκε να φέρει είτε το *bla<sub>OXA-23</sub>* είτε το *bla<sub>OXA-24</sub>* κι από τα 20 στελέχη που ερευνήθηκαν για το *bla<sub>OXA-58</sub>* διαπιστώθηκε ότι τα 15 έφεραν το γονίδιο *bla<sub>OXA-58</sub>*. Τα αποτελέσματα της μελέτης συμφωνούν με τα επιδημιολογικά δεδομένα γι' αυτά τα γονίδια (*bla<sub>NDM-1</sub>*, *bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-24</sub>* και *bla<sub>OXA-58</sub>*) στον ελληνικό χώρο.

## Summary

The current study included 78 isolates of GRAM-negative bacteria that were isolated from various clinical units of General Hospital of Thessaloniki ‘‘HIPPOKRATEION’’ during the period of March 2010 to January 2011. By the use of PCR (Polymerase Chain Reaction), 35 clinical isolates of *K. pneumoniae* and *E. coli* have been searched for the presence of the gene *bla<sub>NDM-1</sub>* (*New Delhi metallo-β-lactamase*). NDM-1 carbapenemase has not been found yet in Greece despite the fact that other carbapenemases like KPC and VIM are already endemic.

43 clinical isolates of *A. baumannii* have been searched for the presence of the genes *bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-24</sub>* and 20 of them have been searched for the gene *bla<sub>OXA-58</sub>* (*oxacillinases* 23,24,58). Our goal was to find the genes *bla<sub>OXA-23</sub>* and *bla<sub>OXA-24</sub>* that are common in Mediterranean countries like Italy and Spain, but not in Greece (only *bla<sub>OXA-58</sub>* predominantly found).

The 35 isolates of *K. pneumoniae* και *E. coli* were found negative for the gene *bla<sub>NDM-1</sub>* and from the 43 clinical isolates of *A. baumani* none was found positive for *bla<sub>OXA-23</sub>* and *bla<sub>OXA-24</sub>* genes and from the 20 isolates that have been searched for the *bla<sub>OXA-58</sub>* gene 15 isolates were found positive. Our findings were in accordance with the epidemiological data of the respective genes (*bla<sub>NDM-1</sub>*, *bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-24</sub>* και *bla<sub>OXA-58</sub>*) in Greek region.

## Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	σελ.Ι
Κατάσταση Πινάκων Διπλωματικής Εργασίας .....	σελ.ΙΙ
B-λακτάμες .....	σελ.1
Κλινική χρήση .....	σελ.2
Τρόπος δράσης.....	σελ.2
Καρβαπενέμες .....	σελ.3
Κλινική χρήση .....	σελ.5
Δομή .....	σελ.5
Σύνθεση.....	σελ.5
Χορήγηση.....	σελ.5
B-λακταμάσες .....	σελ.6
Καρβαπενεμάσες.....	σελ.8
Τύποι .....	σελ.8
NDM-1 .....	σελ.10
<i>Acinetobacter</i> .....	σελ.14
Είδη του γένους <i>Acinetobacter</i> .....	σελ.15
Γενικοί χαρακτήρες του γένους <i>Acinetobacter</i> .....	σελ.15
Μορφολογία .....	σελ.15
Καλλιέργεια .....	σελ.16
Βιοχημικές ιδιότητες .....	σελ.17
Αντιγονική δομή .....	σελ.17
Οικολογία-επιδημιολογία .....	σελ.18
Νόσοι από <i>Acinetobacter</i> .....	σελ.19
Ευαισθησία στα αντιβιοτικά .....	σελ.20
Εργαστηριακή διάγνωση.....	σελ.20
ΟΧΑ β-λακταμάσες στο <i>Acinetobacter</i> .....	σελ.21
Πειραματικό Μέρος .....	σελ.23
Μέθοδος (PCR).....	σελ.23

Η αρχή της μεθόδου.....	σελ.24
Η διαδικασία της αντίδρασης .....	σελ.24
Τα χημικά αντιδραστήρια .....	σελ.27
Η θερμοκρασία υβριδισμού των εναρκτηρίων αλληλουχιών .....	σελ.29
Η επιλογή του DNA στόχου.....	σελ.29
Η επιλογή και η επεξεργασία του κλινικού δείγματος .....	σελ.30
Η εμφάνιση και η αποτύπωση του τελικού προϊόντος .....	σελ.32
<b>Βακτηριακά στελέχη .....</b>	<b>σελ.34</b>
Καλλιέργεια-απομόνωση .....	σελ.35
Ταυτοποίηση.....	σελ.35
Προέλευση και είδος των δειγμάτων .....	σελ.35
<b>Εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) .....</b>	<b>σελ.37</b>
Εξαγωγή DNA (DNA extraction) .....	σελ.37
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> .....	σελ.37
<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-24</sub> και <i>bla</i> <sub>OXA-58</sub> .....	σελ.39
<b>Αποτελέσματα .....</b>	<b>σελ.42</b>
<b>Συμπεράσματα .....</b>	<b>σελ.45</b>
<b>Βιβλιογραφία .....</b>	<b>σελ.45</b>

## Ευχαριστίες

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας του διαγνωστικού τμήματος του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.

Η βασική εκπαίδευση, το πειραματικό μέρος και η ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης έγιναν υπό την επίβλεψη του κ. Σπύρου Πουρνάρα, Επίκουρου Καθηγητή Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπεύθυνου του εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας τον οποίο και ευχαριστώ για την άριστη συνεργασία μας, την πολύτιμη καθοδήγησή του, τις υποδείξεις και διορθώσεις του σε όλες τις φάσεις διεκπεραίωσης της συγκεκριμένης εργασίας. Τον ευχαριστώ θερμά για την καθημερινή επίβλεψη, το χρόνο που μου αφιέρωσε και την αμέριστη συμπαράστασή του όλο αυτό το διάστημα . Χωρίς τη βοήθειά του η εκπόνηση αυτής της εργασίας δε θα ήταν δυνατή.

Επίσης, η παρούσα διπλωματική εργασία δεν θα είχε ολοκληρωθεί χωρίς τη βοήθεια της κ. Σοφιανού Δανάης, Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Μικροβιολογίας της Ιατρικής σχολής του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και Διευθύντριας του Ιπποκράτειου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω για τις συμβουλές της και τη καθοδήγηση της καθώς και για την παραχώρηση δειγμάτων με στελέχη GRAM αρνητικών βακτηριδίων. Η συνεισφορά της στην εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας υπήρξε πολύτιμη και καθοριστική.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και την κυρία Κρίστο Ιουλία, βιοχημικό-βιοτεχνολόγο, του εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας για την άριστη συνεργασία μας καθ' όλη την διάρκεια τέλεσης του πειραματικού μέρους της διπλωματικής εργασίας.

## Κατάσταση Πινάκων Διπλωματικής Εργασίας

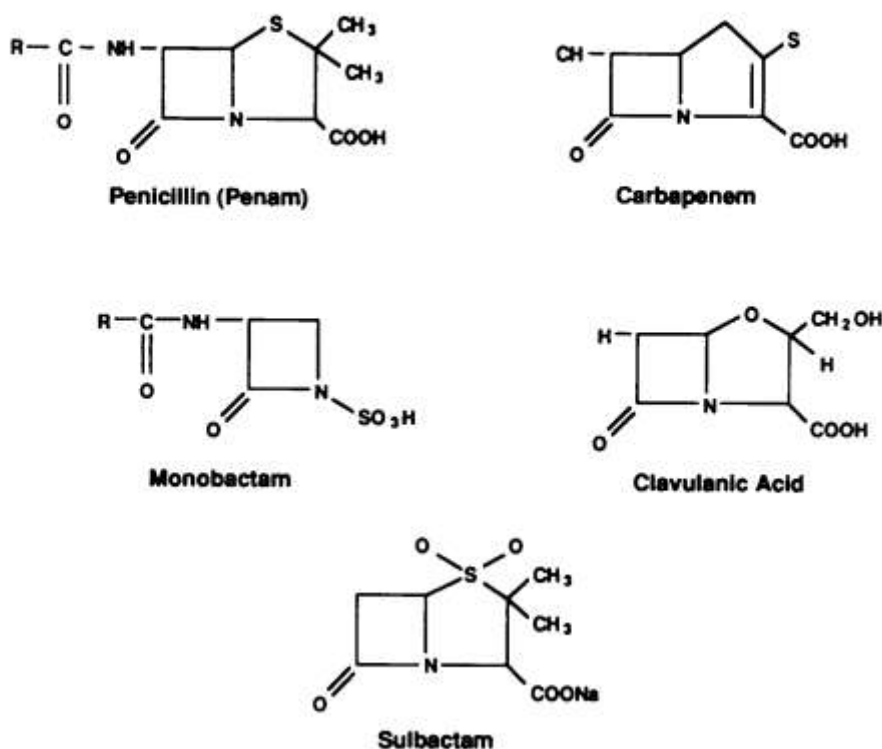
<b>Πίνακας 1.</b> Κατάταξη των β-λακταμασών που παράγονται από Gram (-) βακτήρια σε τάξεις κατά Amplicon .....	σελ.7
<b>Πίνακας 2.</b> Βιοχημικές ιδιότητες των <i>Acinetobacter</i> .....	σελ.17
<b>Πίνακας 3.</b> Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων στο διάλυμα αντίδρασης της PCR για <i>K. pneumoniae</i> και <i>E. coli</i> .....	σελ.38
<b>Πίνακας 4.</b> Αλληλουχίες των εκκινητών για <i>K. pneumoniae</i> και <i>E. coli</i> .....	σελ.38
<b>Πίνακας 5.</b> Συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων στο διάλυμα αντίδρασης της PCR για <i>A. baumannii</i> .....	σελ.40
<b>Πίνακας 6.</b> Αλληλουχίες των εκκινητών για <i>A. baumannii</i> .....	σελ.41
<b>Πίνακας 7.</b> Αποτελέσματα PCR για <i>K. pneumoniae</i> και <i>E. coli</i> .....	σελ.43
<b>Πίνακας 8.</b> Αποτελέσματα PCR για <i>A. baumannii</i> ( <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-24</sub> ) .....	σελ.44
<b>Πίνακας 9.</b> Αποτελέσματα PCR για <i>A. baumannii</i> ( <i>bla</i> <sub>OXA-58</sub> ) .....	σελ.44



## β-λακτάμες

Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει ουσίες οι οποίες στο μόριό τους περιέχουν τον πυρήνα της β-λακτάμης. Τα μέλη της ομάδας είναι: α) Οι πενικιλίνες, το μόριο των οποίων πλην του τετραμελούς δακτυλίου της β-λακτάμης περιλαμβάνει και τον πενταμελή δακτύλιο της θειαζολιδίνης, β) Οι κεφαλοσπορίνες με τον β-λακταμικό και τον εξαμελή δακτύλιο της διυδροθειαζίνης, γ) Οι μονοβακτάμες, οι οποίες στον βασικό τους πυρήνα περιέχουν μόνο τον δακτύλιο της β-λακτάμης, και δ) οι καρβαπενέμες.

Όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά αναστέλλουν την βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των μικροβίων συνδεόμενες με ειδικούς υποδοχείς, τις πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (PBPs), οι οποίες εδράζονται στο κυτταρικό τοίχωμα. Είναι η πιο διαδεδομένη ομάδα αντιβιοτικών.

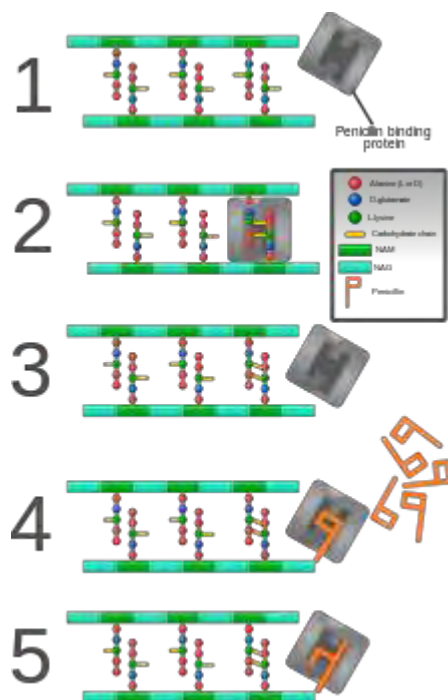


Εικ.1 Χημικές δομές από επιλεγμένα β-λακταμικά αντιβιοτικά

## Η κλινική χρήση

Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά ενδείκνυνται για την προφύλαξη και τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων. Στην αρχή, τα β-λακταμικά αντιβιοτικά χρησιμοποιήθηκαν κατά των Gram-θετικών βακτηρίων, ωστόσο η ανάπτυξη τελευταία ενός ευρέος φάσματος β-λακταμικών αντιβιοτικών επέκτεινε τη δράση τους και κατά των διαφόρων Gram-αρνητικών μικροοργανισμών.

## Τρόπος δράσης



**Εικόνα 2.** Η πενικιλίνη και άλλα β-λακταμικά αντιβιοτικά δρουν αναστέλλοντας τις πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (PBPs), οι οποίες εδράζονται στο κυτταρικό τοίχωμα και είναι υπεύθυνες για τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος.

Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά είναι βακτηριοκτόνα και δρουν αναστέλλοντας τη σύνθεση του στρώματος της πεπτιδογλυκάνης του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Το στρώμα της πεπτιδογλυκάνης είναι σημαντικό για τη δομική ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος, ιδιαίτερα στους Gram-θετικούς μικροοργανισμούς. Στη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης συμμετέχουν και τρανσπεπτιδάσες γνωστές ως πενικιλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (PBPs).

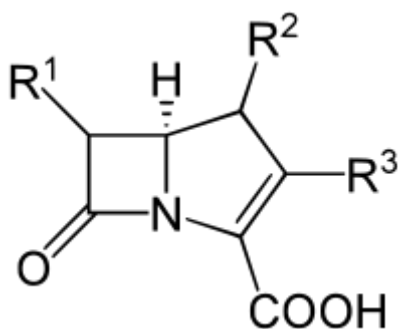
Η δομή των β-λακταμικών αντιβιοτικών προσομοιάζει με το αμινοξύ D-alanyl-D-alanine. Η δομική ομοιότητα μεταξύ των αντιβιοτικών της β-λακτάμης και της D-alanyl-

D-alanine διευκολύνει τη σύνδεση τους με την ενεργή θέση των πενικιλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών (PBPs).

Ο πυρήνας του μορίου της β-λακτάμης δεσμεύεται μη αναστρέψιμα (acylation) με το Ser<sub>403</sub> της ενεργής θέσης της πενικιλινοδεσμευτικής πρωτεΐνης (PBP). Αυτή η μη αναστρέψιμη αναστολή των PBPs εμποδίζει τη σύνδεση της μιας πολυμερικής αλυσίδας με την άλλη (transpeptidation) στο υπό ανάπτυξη στρώμα της πεπτιδογλυκάνης, διαταράσσοντας τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος.

Υπό κανονικές συνθήκες, οι πρόδρομες ουσίες της πεπτιδογλυκάνης σηματοδοτούν μια αναδιοργάνωση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος και κατά συνέπεια ενεργοποιούν τις αυτολυτικές υδρολάσες του κυτταρικού τοιχώματος. Η αναστολή σύνδεσης των αλυσίδων μεταξύ τους από τις β-λακτάμες προκαλεί συσσώρευση πρόδρομων ουσιών πεπτιδογλυκάνης, η οποία ενεργοποιεί την πέψη των υφιστάμενων στρωμάτων πεπτιδογλυκάνης από αυτολυτικές υδρολάσες χωρίς την παραγωγή νέων στρωμάτων πεπτιδογλυκάνης. Ως αποτέλεσμα, η βακτηριοκτόνος δράση των β-λακταμικών αντιβιοτικών ενισχύεται περαιτέρω.

## Καρβαπενέμες



**Εικόνα 3.**σκελετική δομή μορίου καρβαπενέμης

Οι καρβαπενέμες είναι μια κατηγορία β-λακταμικών αντιβιοτικών μ' ένα ευρύ φάσμα αντιβακτηριδιακής δράσης. Έχουν δομή που τις καθιστά εξαιρετικά ανθεκτικές στις περισσότερες β-λακταμάσες. Οι καρβαπενέμες αναπτύχθηκαν από τη θειαναμυκίνη (thienamycin), που προέρχεται από τον *Streptomyces Cattleja*.

Οι καρβαπενέμες είναι αντιβιοτικά τελευταίας άμυνας για πολλές βακτηριακές λοιμώξεις, όπως στην *Escherichia coli* και στην *Klebsiella pneumoniae*. Τελευταία, έχει σημάνει συναγερμός στην επιστημονική κοινότητα ένεκα της αναπτύξεως αντοχής από αυτά τα βακτήρια στις καρβαπενέμες. Αυτό οφείλεται στην παραγωγή ενός ενζύμου που ονομάζεται NDM-1. Μέχρι τώρα δεν υπάρχουν νέα αντιβιοτικά για την καταπολέμηση των βακτηρίων που είναι ανθεκτικά στις καρβαπενέμες και η παγκόσμια εξάπλωση του γονιδίου αντοχής είναι ένα πιθανό εφιαλτικό σενάριο.

Τα ακόλουθα φάρμακα ανήκουν στην κατηγορία των καρβαπενεμών:

- Η ιμιπενέμη (imipenem)

συχνά χορηγείται μαζί με σιλαστατίνη, γιατί η ιμιπενέμη μπορεί να υδρολυθεί στον νεφρό των θηλαστικών από ένα ένζυμο, τη διϋδροπεπτιδάση-1 και παράγεται ένας νεφροτοξικός μεταβολίτης. Γι' αυτόν τον λόγο δίνεται με έναν αναστολέα της διϋδροπεπτιδάσης, τη σιλαστατίνη που αναστέλλει τη δράση της διϋδροπεπτιδάσης-1 κι έτσι αναστέλλει τον μεταβολισμό της ιμιπενέμης με αποτέλεσμα αυξημένη συγκέντρωση του μη μεταβολισμένου φαρμάκου στα ούρα και λιγότερες παρενέργειες.

- Η μεροπενέμη (meropenem), έλαβε έγκριση από τον FDA (Food and Drugs Administration) των ΗΠΑ το 1996.
- Η ερταπενέμη (ertapenem) έλαβε έγκριση από τον FDA (Food and Drugs Administration) των ΗΠΑ τελευταία για πολλαπλές ενδείξεις.
- Η δοριπενέμη (doripenem) έλαβε έγκριση από τον FDA (Food and Drugs Administration) των ΗΠΑ το 2007.
- Η πανιπενέμη/ βηταμιπρόν (panipenem / betamipron) έλαβε ιαπωνική έγκριση το 1993.
- Η βιαπενέμη (biapenem) έλαβε ιαπωνική έγκριση το 2001.

#### **Μη εγκεκριμένες / πειραματικές καρβαπενέμες**

- Razupenem (PZ-601)

Το PZ-601 είναι μία καρβαπενέμη που δοκιμάζεται σήμερα, είναι ευρέος φάσματος και η δράση του επεκτείνεται και σε βακτήρια ανθεκτικά στις άλλες καρβαπενέμες. Παρά τα υποσχόμενα αποτελέσματα η Novartis (η οποία απέκτησε το PZ-601 σε μια

συμφωνία με την Protez Φαρμακευτική) μείωσε πρόσφατα την παρασκευή του PZ-601, ένεκα του υψηλού ποσοστού των παρενεργειών του στα πειραματόζωα στις κλινικές δοκιμές.

- Tebipenem.

## **Κλινική χρήση**

Οι καρβαπενέμες έχουν το ευρύτερο αντιβακτηριδιακό φάσμα σε σύγκριση με τις άλλες β-λακτάμες όπως τις πενικιλίνες και τις κεφαλοσπορίνες . Επιπλέον, είναι ανθεκτικά στις β-λακταμάσες, που είναι ο κύριος μηχανισμός αντοχής των μικροβίων στις β-λακτάμες. Οι καρβαπενέμες δρουν κατά των Gram-θετικών, Gram-αρνητικών βακτηρίων, και αναερόβιων , μ' εξαίρεση τα ενδοκυττάρια βακτήρια (άτυπα), όπως τα χλαμύδια. Οι καρβαπενέμες, επίσης είναι μέχρι τώρα οι μόνες β-λακτάμες ικανές να αναστείλουν τις L, D-Transpeptidases.

## **Δομή**

Όσον αφορά τη δομή, οι καρβαπενέμες είναι παρόμοιες με τις πενικιλίνες, αλλά το άτομο θείου στη θέση 1 έχει αντικατασταθεί από ένα άτομο άνθρακα, απ' όπου προκύπτει και τ' όνομα της ομάδας, καρβαπενέμες δηλαδή.

## **Σύνθεση**

Το Malonyl-CoA συνενώνεται με glutamate-5-semialdehyde απ' όπου προκύπτει ο πενταμελής δακτύλιος. Στη συνέχεια, μια συνθετάση β-λακτάμης χρησιμοποιεί ATP για τη δημιουργία της β-λακτάμης και του κορεσμένου πυρήνα της καρβαπενάμης. Η περαιτέρω οξείδωση και αναστροφή του δακτυλίου παρέχει τελικά τις βασικές καρβαπενέμες.

## **Χορήγηση**

Λόγω του ευρέος φάσματος τους και για ν' αποφευχθεί περαιτέρω αντοχή χορηγούνται ενδοφλεβίως στα νοσοκομεία για πιο σοβαρές λοιμώξεις. Επίσης έχουν περιορισμένη

από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα. Ωστόσο, η έρευνα είναι σε εξέλιξη για την παρασκευή μιας αποτελεσματικής από του στόματος καρβαπενέμης.

## **β-λακταμάσες**

Οι β-λακταμάσες είναι ένζυμα που υδρολύουν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά και τα γονίδια που κωδικοποιούν για την παραγωγή τους βρίσκονται στο χρωμόσωμα ή σε πλασμίδια. Τα χρωμοσωμιακά ένζυμα προουπήρχαν της εποχής των αντιβιοτικών, ανευρίσκονται σε στελέχη όλων των ειδών κι εκκρίνονται ιδιοσυστασιακά. Αναπτύχθηκαν για να προστατεύσουν τα βακτήρια από τα φυσικά β-λακταμικά παράγωγα μυκήτων κι άλλων βακτηρίων.

Οι πλασμιδιακές β-λακταμάσες φυλογενετικά προέρχονται από τις χρωμοσωμιακές, αλλά τα γονίδια τους εδράζονται σε πλασμίδια ή μεταθετά στοιχεία. Θεωρείται ότι τα γονίδια τους αποσπάστηκαν από το χρωμόσωμα και ενσωματώθηκαν σε μετακινούμενα στοιχεία (πλασμίδια, μεταθετά στοιχεία), με αποτέλεσμα τη διασπορά τους σε διαφορετικά είδη και γένη Gram-αρνητικών βακτηρίων.

Ο μηχανισμός δράσης των β-λακταμασών συνίσταται στην υδρόλυση του β-λακταμικού δακτυλίου που επιτυγχάνεται με η δράση εστέρα της σερίνης (ένζυμα ομάδας σερίνης, serine b-lactamases) ή με τη δράση ιόντων ψευδαργύρου, zinc b-lactamases). Η μοριακή ταξινόμηση των β-λακταμασών βασίζεται στην ακολουθία νουκλεοτιδίων κι αμινοξέων σε αυτά τα ένζυμα. Μέχρι σήμερα, τέσσερις τάξεις κατά Amplicon αναγνωρίζονται (A-D), συσχετιζόμενες και με τη λειτουργική τους ταξινόμηση. Οι τάξεις A, C, D έχουν ως βάση τη σερίνη, ενώ η τάξη B ή μέταλλο-β-λακταμάσες έχουν ως βάση το ψευδάργυρο για τη δράση τους. Οι β-λακταμάσες τουλάχιστον οι παλαιότερες, χαρακτηρίζονται από σχετική ειδικότητα υποστρώματος, δηλαδή το κάθε ένζυμο υδρολύει συνήθως μόνο ένα ή μια μικρή ομάδα αντιβιοτικών.

Η πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενη στην πράξη ταξινόμηση των β-λακταμασών τις διαχωρίζει στις εξής τέσσερις ομάδες (πίνακας 1):

(α) Τις ευρέως φάσματος(broad spectrum), όπου περιλαμβάνονται οι TEM-1 και TEM-2, SHV-1 και ορισμένες της ομάδας των OXA. Υποστρώμα των συγκεκριμένων ενζύμων είναι η πενικιλίνη G, οι αμινο- και καρβοξυ- πενικιλίνες και οι κεφαλοσπορίνες πρώτης γενεάς. Επιπλέον τα ένζυμα της ομάδας OXA υδρολύουν και τη μεθικιλίνη και

οξασιλλίνη. Τα συγκεκριμένα ένζυμα αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ (περισσότερο οι TEM και SHV και λιγότερο οι OXA) και ανήκουν στην τάξη A κατά Ambler, εκτός των OXA που ανήκουν στην τάξη D.

(β) Τις εκτεταμένου φάσματος (extended spectrum, ESBL) όπου περιλαμβάνονται ένζυμα των ομάδων TEM, SHV, CTX-M, OXA, BES, PER, GES, IBC, SFO, TLA, VEB.

(γ) Τις AmpC που περιλαμβάνουν ένζυμα των ομάδων ACC, CFE, CMY, FOX, LAT, MOX.

(δ) Τις καρβαπενεμάσες που περιλαμβάνουν ένζυμα των ομάδων VIM, IMP, KPC, CMY, MME, IMI, NMC, CcrA, NDM-1 και ορισμένα της ομάδας OXA.

**Πίνακας 1. Κατάταξη των β-λακταμασών που παράγονται από Gram (-) βακτήρια σε τάξεις κατά Ambler**

β-λακταμάση	Αντιπροσωπευτικά μέλη	Αναστολή από κλαβουλανικό	Τάξη
Ευρέος φάσματος	TEM-1 και 2 SHV-1 OXA	+++ +	A D
Εκτεταμένου φάσματος	TEM, SHV (οικογ.) CTX-M (οικογ.) OXA (οικογ.) PER, BES, GES, IBC SFO, TLA, VEB	++++ ++++ + ++++	A A D A
AmpC	ACC, ACT, CFE, CMY DHA, FOX, LAT, MIR, MOX	0	C
Καρβαπενεμάσες	IMP, VIM, GIM SMP (μεταλλοένζυμα) KPC-1, KPC-2, KPC-3 OXA-23, OXA-24 OXA-25, OXA-26 OXA-27, OXA-40, OXA-48	0 +++ +	B A D

## **Καρβαπενεμάσες (Carbapenemases)**

Οι καρβαπενεμάσες είναι μια διαφορετική ομάδα β-λακταμασών που δραστηριοποιούνται όχι μόνο κατά των κεφαλοσπορινών αλλά και κατά των καρβαπενεμών. Η αζτρεονάμη είναι ανεπηρέαστη από τη δράση των μέταλλο-β-λακταμασών, υπάρχουν όμως κάποιες που με παραγωγή IMP και VIM προσδίδουν ανοχή σε αυτήν. Οι καρβαπενεμάσες μέχρι πρόσφατα προέρχονταν μόνο από τις Μοριακές Ταξεις A, B, και D, αλλά μια κατηγορία C έχει τελευταία περιγραφεί.

## **Τύποι**

### **Καρβαπενεμάσες τύπου IMP (μέταλλο-β-λακταμάσες)**

Οι καρβαπενεμάσες τύπου IMP, στις οποίες έχουμε διαμεσολάβηση πλασμιδίου, πρωτοεντοπίστηκαν στην Ιαπωνία τη δεκαετία του 1990 τόσο σε εντερικούς Gram-αρνητικών μικροοργανισμούς όσο και στα γένη *Pseudomonas* και *Acinetobacter*. 17 ποικιλίες σήμερα είναι γνωστές. IMP καρβαπενεμάσες έχουν εξαπλωθεί και σε άλλες χώρες της Άπω Ανατολής, αναφέρθηκαν στην Ευρώπη το 1997 και έχουν βρεθεί και στον Καναδά και τη Βραζιλία.

### **VIM (Verona integron-encoded metallo-β-lactamase)**

Μια δεύτερη οικογένεια, η VIM, αναφέρθηκε στην Ιταλία το 1999 και σήμερα περιλαμβάνει 10 στελέχη, τα οποία έχουν μια ευρεία γεωγραφική κατανομή στην Ευρώπη, τη Νότια Αμερική, την Άπω Ανατολή και τελευταία έχουν βρεθεί και στις Ηνωμένες Πολιτείες. Η VIM-1 ανακαλύφθηκε στο είδος *P. aeruginosa* στην Ιταλία το 1996. Από τότε, η VIM-2 το συνηθέστερα ανευρισκόμενο στέλεχος, εντοπίστηκε επανειλημμένα στην Ευρώπη και την Άπω Ανατολή. Οι VIM-3 και VIM-4 απαντώνται σπανιότερα. Τα VIM ένζυμα που συναντώνται κυρίως στα είδη *P. aeruginosa* και *P. putida* και πολύ σπάνια στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*.



Οι παραλλαγές στην αλληλουχία αμινοξέων είναι έως και 10% στις VIM, έως και 15% στις IMP, και 70% μεταξύ VIM και IMP. Τα ένζυμα και των δύο οικογενειών ωστόσο είναι παρόμοια. Και τα δύο κωδικοποιούνται από ιντεγκρόνια και μερικές φορές με τη διαμεσολάβηση πλασμιδίου. Και τα δύο ένζυμα υδρολύουν όλες τις β-λακτάμες εντός από τις μονοβακτάμες, και είναι ανεπηρέαστα από τους αναστολείς των β-λακταμικών.

### **OXA (oxacillinases) β-λακταμάσες (Μοριακή Τάξη D κατά AmpIer)**

Οι OXA β-λακταμάσες εμφανίζονται κυρίως στο γένος *Acinetobacter* και στην *P. aeruginosa*. Οι περισσότερες προέρχονται από την OXA-10 (OXA-11, 14, 16, 17 και 19), η OXA-15 από την OXA-2 και η OXA-18 από την OXA-9. Τελευταία ανακαλύφθηκαν οι OXA-21, 20, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 51, 58. Οι περισσότερες από αυτές βρέθηκαν σε Τουρκία, Γαλλία, Ιταλία. Χωρίζονται σε δύο ομάδες, σ' αυτές που υδρολύουν τις καρβαπενέμες με αργό ρυθμό *in vitro* κι αυτές με υψηλές MIC (ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση) που συναντώνται σε κάποια είδη *Acinetobacter* (>64 mg/L) που μπορεί να οφείλονται σε άλλους μηχανισμούς, όπως μειωμένη είσοδος του αντιβιοτικού ή συστήματα αντλιών ενεργητικής εκροής. Οι OXA καρβαπενεμάσες έχουν επίσης υδρολυτική ικανότητα απέναντι στις πενικιλλίνες και στις κεφαλοσπορίνες. Με τις OXA-23, OXA-24 και OXA-58, θα ασχοληθούμε στην παρούσα μελέτη.

### **KPC ( *K. pneumoniae* carbapenemase) (Μοριακή Τάξη A)**

Οι KPC καρβαπενεμάσες, στις οποίες έχουμε διαμεσολάβηση πλασμιδίου, είναι δέκα στελέχη, συγκεκριμένα KPC-2 με KPC-11 και διαφέρουν σ' ένα ή δύο αμινοξέα. Το 2008 διαπιστώθηκε ότι η KPC-1 είναι 100% ομόλογη στις ακολουθίες των αμινοξέων της με την KPC-2. Η KPC-1 βρέθηκε στη Βόρεια Καρολίνα, η KPC-2 στη Βαλτιμόρη και η KPC-3 στη Νέα Υόρκη.

Η KPC *K. pneumoniae* carbapenemase είναι σήμερα η πιο κοινή καρβαπενεμάση, η οποία εντοπίστηκε για πρώτη φορά στη Βόρεια Καρολίνα, στις ΗΠΑ, το 1996 και από τότε έχει εξαπλωθεί σε όλο τον κόσμο. Μεταγενέστερες μελέτες δείχνουν ότι η οικογένεια *Enterobacteriaceae* που παράγει KPC γίνεται ολοένα και συχνότερη στις Ηνωμένες Πολιτείες.

## CMY (Μοριακή Τάξη C κατά Amplic)

Η πρώτη Μοριακής Τάξης C καρβαπενεμάση περιγράφηκε το 2006 και απομονώθηκε από ένα παθογόνο στέλεχος του είδους *E. aerogenes*. Μεταφέρονται μ' ένα πλασμίδιο, το pYMG-1 και συνεπώς μπορούν να μεταδοθούν και σε άλλα βακτηριακά στελέχη.

## NDM-1 (New Delhi metallo-β-lactamase)

Αρχικά περιγράφηκε στο Νέο Δελχί το 2009, αλλά αυτό το γονίδιο είναι πλέον διαδεδομένο στην *E. coli* και στην *K. pneumoniae* στην Ινδία και το Πακιστάν . Από το 2010, βακτήρια που φέρουν την NDM-1 έχουν εντοπιστεί και σε άλλες χώρες (συμπεριλαμβανομένων των ΗΠΑ και Ηνωμένο Βασίλειο ). Με την NDM-1 θ' ασχοληθούμε στην παρούσα μελέτη.

## NDM-1

Μια νέα απειλή για τη δημόσια υγεία έχει κάνει ήδη την εμφάνιση της.. Το όνομα αυτής, NDM-1, ένα ένζυμο που έχει την ιδιότητα να κάνει τα βακτήρια υπερανθεκτικά, ακόμα και στα πιο ισχυρά αντιβιοτικά. Το γονίδιο αυτό έχει διασπαρθεί από την Ασία στην Ευρώπη, στις ΗΠΑ, στην Αυστραλία και στον Καναδά και οι υγειονομικές αρχές έχουν σημάνει παγκόσμιο συναγερμό.

**Η τύπου Νέο Δελχί μέταλλο-β-λακταμάση (NDM-1)** είναι ένα ένζυμο που καθιστά τα βακτήρια ανθεκτικά στα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Αυτά περιλαμβάνουν και τις καρβαπενέμες οι οποίες χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηριακών λοιμώξεων. Το γονίδιο για το NDM-1(*bla<sub>NDM-1</sub>*) είναι ένα μέλος μιας μεγάλης οικογένειας γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα β-λακταμάσης που ονομάζονται καρβαπενεμάσες. Τα βακτήρια που παράγουν καρβαπενεμάσες αναφέρονται συχνά στα μέσα μαζικής ενημέρωσης ως "superbugs", επειδή οι λοιμώξεις που προκαλούνται από αυτά είναι δύσκολο να θεραπευτούν. Τα εν λόγω βακτήρια είναι συνήθως ευαίσθητα μόνο σε πολυμιξίνες και τιγκεκυκλίνη.

Το ένζυμο NDM-1 ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά σε *Klebsiella pneumoniae* που απομονώθηκε από Σουηδό ασθενή Ινδικής προέλευσης το 2008. Αργότερα ανιχνεύθηκε σε βακτήρια στην Ινδία, το Πακιστάν, το Ηνωμένο Βασίλειο, τις Ηνωμένες Πολιτείες, τον Καναδά, την Ιαπωνία και τη Βραζιλία.

Τα πιο συνηθισμένα βακτήρια στα οποία παρατηρείται το ένζυμο αυτό είναι Gram-αρνητικά όπως το *Escherichia coli* και *Klebsiella pneumoniae*, αλλά το γονίδιο για το NDM-1 μπορεί να μεταδοθεί από ένα στέλεχος των βακτηριδίων σ' ένα άλλο με οριζόντια γονιδιακή μεταφορά. Σύμφωνα με τα ευρήματα, το *bla<sub>NDM-1</sub>* έχει την ιδιότητα να μεταφέρεται από βακτήριο σε βακτήριο μέσω κυκλικών μορίων DNA που ονομάζονται πλασμίδια.

Το *bla<sub>NDM-1</sub>* γονίδιο παράγει NDM-1, η οποία είναι μια καρβαπενεμάση, δηλαδή ένζυμο που υδρολύει και αδρανοποιεί τις καρβαπενέμες. . Το NDM-1 ένζυμο ανήκει στις Μοριακής Τάξης B μέταλλο-β-λακταμάσες.

Το NDM-1 ένζυμο πήρε το όνομά του από το Νέο Δελχί, την πρωτεύουσα της Ινδίας. Περιγράφηκε αρχικά από τον *Yong et al.* τον Δεκέμβριο του 2009 σε Σουηδό υπήκοο, ο οποίος αρρώστησε με ανθεκτική στα αντιβιοτικά βακτηριακή μόλυνση που απέκτησε στην Ινδία. Η μόλυνση είχε ανεπιτυχώς αντιμετωπιστεί σε νοσοκομείο του Νέου Δελχί και μετά τον επαναπατρισμό του ασθενούς στη Σουηδία, ένα ανθεκτικό στη καρβαπενέμη στέλεχος της *Klebsiella pneumoniae* που έφερε το νέο γονίδιο εντοπίστηκε. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο νέος μηχανισμός αντίστασης σαφώς προέκυψε στην Ινδία, αλλά υπάρχουν λίγα στοιχεία για να διαπιστωθεί πόσο διαδεδομένη είναι. Η ακριβής γεωγραφική προέλευση ωστόσο δεν έχει οριστικά εξακριβωθεί. Τον Μάρτιο του 2010, μια μελέτη σε ένα νοσοκομείο στο Μουμπάι έδειξε ότι τα περισσότερα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες βακτήρια έχουν απομονωθεί από ασθενείς που έφεραν το *bla<sub>NDM-1</sub>* γονίδιο.

Τον Μάιο του 2010, μια περίπτωση λοίμωξης από *E. coli* που έφερε το γονίδιο *bla<sub>NDM-1</sub>* αναφέρθηκε στο Coventry στο Ηνωμένο Βασίλειο. Ο ασθενής ήταν ένας άνδρας ινδικής καταγωγής ο οποίος είχε επισκεφθεί την Ινδία 18 μήνες πριν, όπου είχε υποβληθεί σε αιμοκάθαρση. Στις αρχικές αναλύσεις τα βακτήρια ήταν πλήρως ανθεκτικά σε όλα τα αντιβιοτικά που δοκιμάστηκαν ενώ αργότερα διαπιστώθηκε ότι ήταν ευαίσθητα στην τιγκεκυκλίνη και την κολιστίνη. Οι ερευνητές προειδοποίησαν ότι τα διεθνή ταξίδια και η θεραπεία των ασθενών από τα συστήματα υγειονομικής περίθαλψης πολλών χωρών θα μπορούσε να οδηγήσει στην ταχεία εξάπλωση του NDM-1 με δυνητικά σοβαρές συνέπειες.

Τον Ιούνιο του 2010 αναφέρθηκαν τρεις νέες περιπτώσεις εντεροβακτηριακών στελεχών που έφεραν αυτόν το νέο μηχανισμό αντοχής στις ΗΠΑ. Το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDC) των ΗΠΑ ανέφερε ότι τα τρία στελέχη ήταν από

ασθενείς που είχαν λάβει τελευταία ιατρική περίθαλψη στην Ινδία. Ωστόσο οι ερευνητές των ΗΠΑ δήλωσαν ότι είναι ασαφές ακόμη εάν αυτό το στέλεχος είναι περισσότερο επικίνδυνο από τα υπάρχοντα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια, όπως ο ανθεκτικός στη μεθικιλίνη χρυσίζων σταφυλόκοκκος (MRSA) , ο οποίος είναι ήδη διαδεδομένος στις ΗΠΑ.

Τον Ιούλιο του 2010, μια ομάδα στο Νέο Δελχί ανέφερε τρεις ακόμη περιπτώσεις με *Acinetobacter baumannii* αυτή τη φορά που έφεραν το γονίδιο *bla<sub>NDM-1</sub>* σε μονάδες εντατικής θεραπείας του νοσοκομείου του Chennai στην Ινδία, τον Απρίλιο του 2010. Όπως και προηγουμένως, τα βακτήρια ήταν πλήρως ανθεκτικά σε όλα τα αμινογλυκοσιδικά αντιβιοτικά, στις β-λακτάμες και στις κινολόνες, αλλά ήταν ευαίσθητα στην τιγκεκυκλίνη και στην κολιστίνη.

Μια μελέτη από μια πολυεθνική ομάδα ερευνητών δημοσιεύθηκε τον Αύγουστο του 2010 στο "*The Lancet Infectious Diseases*". Εξετάστηκε η εμφάνιση και η εξάπλωση των βακτηρίων που φέρουν το *bla<sub>NDM-1</sub>* γονίδιο. Αναφέρθηκαν 37 περιπτώσεις στο Ηνωμένο Βασίλειο, 44 στελέχη με NDM-1 σε Chennai , 26 στη Haryana , και 73 σε διάφορες άλλες τοποθεσίες στο Πακιστάν και την Ινδία. Η ανάλυση των στελεχών έδειξε ότι έφεραν το *bla<sub>NDM-1</sub>* γονίδιο σε πλασμίδια τα οποία επέτρεπαν να μεταφέρεται με οριζόντια γονιδιακή μεταφορά μεταξύ των διαφόρων στελεχών βακτηρίων . Όλα τα στελέχη ήταν ανθεκτικά σε πολλές κατηγορίες αντιβιοτικών όπως τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, τις φθοριοκινολόνες και τις αμινογλυκοσίδες, αλλά ήταν ευαίσθητα στην κολιστίνη.

Στις 21 του Αυγούστου 2010 στο Οντάριο του Καναδά αναφέρθηκε το πρώτο επιβεβαιωμένο κρούσμα του "superbug" στο Brampton. Υπήρξαν και άλλα επιβεβαιωμένα κρούσματα στη Βρετανική Κολομβία και στην Αλμπέρτα.

Στις 6 Σεπτεμβρίου 2010, στην Ιαπωνία ανακαλύπτεται η πρώτη περίπτωση NDM-1 ενζύμου. Τον Μάιο του 2009, ένας πενήντάχρονος Ιάπωνας ο οποίος είχε πρόσφατα επιστρέψει από διακοπές στην Ινδία εμφάνισε πυρετό και νοσηλεύθηκε. Αργότερα οι αναλύσεις έδειξαν ότι ήταν θετικός για το NDM-1 ένζυμο.

Σε περιβαλλοντική μελέτη που διενεργήθηκε μεταξύ 26 Σεπτεμβρίου και 10 Οκτωβρίου 2010 βρέθηκαν βακτήρια με το *bla<sub>NDM-1</sub>* γονίδιο στο πόσιμο νερό και σε υπόγεια ύδατα στο Νέο Δελχί. Συγκεκριμένα 50 δείγματα νερού βρύσης και 171 δείγματα από υπόγεια ύδατα συλλέχτηκαν από τοποθεσίες σε απόσταση 12 χλμ από το κέντρο του Νέου Δελχί.

Από αυτά τα δείγματα, 20 στελέχη βακτηρίων βρέθηκαν να περιέχουν το *bla<sub>NDM-1</sub>* γονίδιο στα 51 από 171 δείγματα από τα υπόγεια ύδατα και στα 2 από τα 50 δείγματα νερού της βρύσης.

Το Ινδικό Υπουργείο Υγείας αμφισβήτησε το συμπέρασμα της μελέτης του Αυγούστου του 2010 στο "*Lancet*" ότι το γονίδιο προέρχεται από την Ινδία και χαρακτήρισε το συμπέρασμα αυτό ως άδικο δηλώνοντας ότι τα ινδικά νοσοκομεία είναι απολύτως ασφαλή. Ινδοί πολιτικοί περιέγραψαν ως κακόβουλη προπαγάνδα το όλο θέμα και κατηγόρησαν τις πολυεθνικές εταιρίες για αυτό. Υποστήριζαν ότι το άρθρο του περιοδικού ήταν ψεύτικο και αντιπροσώπευε μια προσπάθεια να αποτρέψουν όσους έρχονται για ιατρικές επεμβάσεις στην Ινδία. Το Ινδικό Υπουργείο Υγείας θεώρησε απαράδεκτη την ονομασία του ενζύμου ως "Νέο Δελχί". Ο κύριος συγγραφέας της μελέτης του "*Lancet*" του 2010, ο οποίος εδρεύει στο Πανεπιστήμιο της Μάντρας δήλωσε ότι δεν συμφωνεί με το τμήμα του άρθρου που συμβουλεύει τους ανθρώπους να αποφεύγουν χειρουργικές επεμβάσεις στην Ινδία.

Αντιθέτως τον Μάρτιο του 2010 ένα άρθρο του περιοδικού του *Ιατρικού Συλλόγου της Ινδίας* κατηγόρησε για την εμφάνιση αυτού του γονιδίου τη διαδεδομένη κατάχρηση των αντιβιοτικών στο ινδικό σύστημα υγειονομικής περίθαλψης, επισημαίνοντας ότι οι γιατροί δεν έχουν λάβει ακόμη το ζήτημα της αντοχής στα αντιβιοτικά σοβαρά κι ότι υπάρχει περιορισμένος έλεγχος της συνταγογράφησης των αντιβιοτικών από τους γιατρούς. Οι "*Times*" της Ινδίας ανέφεραν ότι υπάρχει γενική συμφωνία μεταξύ των ειδικών ότι η Ινδία χρειάζεται μια βελτιωμένη πολιτική για τον έλεγχο της χρήσης αντιβιοτικών και ενός κεντρικού μητρώου ανθεκτικών στα αντιβιοτικά λοιμώξεων.

Στις 12 Ιανουαρίου 2011, ο εκδότης του "*Lancet*" Richard Horton ζήτησε συγγνώμη και παραδέχθηκε ότι η ονοματοδοσία του superbug ως «Νέο Δελχί» ήταν λάθος. Μετά από αυτό ο Ajai R. Singh εκδότης του "*Mens Sana Monographs*" απαίτησε οι γεωγραφικές ονομασίες να εγκαταλειφθούν και να αντικατασταθούν από επιστημονικές ονομασίες. Πρότεινε την αλλαγή του NDM-1 σε PCM (Plasmid-encoding Carbapenemase-resistant metallo- $\beta$ -Lactamase).

Τον Αύγουστο του 2010, η πρώτη αναφορά θανάτου οφειλόμενη σε βακτήρια που εκφράζουν το NDM-1 ένζυμο ήταν ένας Βέλγος υπήκοος που μολύνθηκε ενώ υποβλήθηκε σ' επέμβαση σε νοσοκομείο στο Πακιστάν. Πέθανε παρά το γεγονός ότι του χορηγήθηκε κολιστίνη, ένα ισχυρό αντιβιοτικό. Είχε νοσηλευθεί στο νοσοκομείο

μετά από τροχαίο ατύχημα με σοβαρό τραυματισμό άκρου ποδός. Όταν επαναπατρίστηκε στο Βέλγιο ήταν αργά γιατί είχε ήδη μολυνθεί.

Οι επιστήμονες πιθανολογούν ότι η λοίμωξη μεταφέρθηκε στον δυτικό κόσμο με ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε πλαστικές κι αισθητικές επεμβάσεις στην Ινδία και στο Πακιστάν. Ο κίνδυνος εντοπίζεται και σε Έλληνες νεφροπαθείς, που καταλήγουν ύστερα από μακροχρόνια αναμονή για συμβατό μόσχευμα σε κέντρα της Ινδίας για μεταμόσχευση. Από την Ασία έχει ταξιδέψει σε Ευρώπη, ΗΠΑ, Αυστραλία και Καναδά και παρ' όλο που δεν έχει περάσει τα σύνορα της Ελλάδας, οι ειδικοί δεν αποκλείουν την πιθανότητα αυτή.

Ποιες είναι οι πιθανότητες η νέα αυτή απειλή να φτάσει και στα ελληνικά νοσοκομεία; Κανείς δεν είναι σε θέση να απαντήσει με βεβαιότητα. Πάντως το Κεντρικό Εργαστήριο Δημόσιας Υγείας του Κ.Ε.Ε.Λ.Π.ΝΟ (Κέντρο Ελέγχου Ειδικών Λοιμώξεων και Πρόληψης Νοσημάτων) έχει ήδη ενημερώσει τα Μικροβιολογικά Εργαστήρια των ελληνικών νοσοκομείων για το πρόβλημα, ώστε να είναι σε ετοιμότητα. Ο χρόνος επώασης ενός μικροβίου είναι μικρότερος από οποιοδήποτε ταξίδι, συνεπώς δεν μπορεί κανείς να αποκλείσει το ενδεχόμενο να έρθει το NDM-1 και στη χώρα μας. Ο κίνδυνος αυξάνεται λόγω του μεγάλου αριθμού των μεταναστών από τις περιοχές αυτές που βρίσκονται στην Ελλάδα και όταν νοσήσουν νοσηλεύονται σε νοσοκομεία εδώ αλλά και από το γεγονός ότι κάποιοι Έλληνες νεφροπαθείς που περιμένουν επί χρόνια συμβατό μόσχευμα, καταλήγουν σε κέντρα της Ινδίας για να υποβληθούν σε μεταμόσχευση όπως έχουμε ήδη αναφέρει.

## ***Acinetobacter***

Τα *Acinetobacter* ανήκουν στην Οικογένεια των *Neisseriaceae*. Είναι το 4ο γένος της Οικογένειας αυτής αλλά έχει διαφορετικό έναν από τους βασικούς χαρακτήρες αυτής. Είναι οξειδάση αρνητικό σε αντίθεση με όλα τα άλλα γένη που είναι οξειδάση θετικά.

Κατά το *Bergey's Manual* η ονομασία του σαν *Acinetobacter* προέρχεται από την ελληνική λέξη ακίνητος γι' αυτό και αναγράφεται και ακινητοβακτηρίδιο.

Στο γένος των ακινητοβακτηριδίων ανήκουν διάφορα είδη τα οποία μέχρι και σήμερα θεωρούνται σαν βióτυποι ενός και μόνου είδους του *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus* ή *A. anitratus*. Μεγάλη σύγχυση επικράτησε για πολλά χρόνια στην ονοματολογία των ακινητοβακτηριδίων που σήμερα πλέον έχουν διαγραφεί όπως τα

*Herella vaginicola*, *Moraxella lwoffii*, *Mima polymorpha*, *B5W Organism* κ.ά. χωρίς να έχει λυθεί το πρόβλημα της ταξινόμησης των διαφόρων στελεχών που απομονώνονται από τα κλινικά δείγματα και έχουν μεν τους βασικούς χαρακτήρες του γένους αλλά και άλλους ειδικούς χαρακτήρες.

Κατά την τελευταία προσπάθεια ταξινόμησης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του DNA/DNA υβριδισμού. Κατά την ταξινόμηση αυτή τα *Acinetobacter* διαχωρίστηκαν σε 18 είδη. Από αυτά τα 4 με ειδικά ονόματα, τα δε υπόλοιπα σαν γονο-είδη του γένους με αριθμούς όπως: *Acinetobacter* 1, 2, 3,... 11.

### **Είδη του γένους *Acinetobacter***

*Acinetobacter baumannii*

*Acinetobacter haemolyticus*

*Acinetobacter johnsonii*

*Acinetobacter junii*

*Acinetobacter* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11.

Στο είδος *Acinetobacter baumannii* συμπεριλήφθησαν τα περισσότερα στελέχη του πρώην *A. anitratus* και άλλα από αυτά στο *Acinetobacter* 3.

### **Γενικοί χαρακτήρες του γένους *Acinetobacter***

#### **Μορφολογία.**

Gram-αρνητικά βακτηρίδια, κοντά και παχιά κατά τη φάση του πολλαπλασιασμού και διαιρέσεως αλλά κόκκοι κατά της στασιμότητας. Διατάσσονται κατά ζεύγη ή κοντές αλυσίδες, (εικ.4). Στα καλλιεργήματα παρουσιάζονται ανώμαλες διογκωμένες ή νηματοειδείς μορφές όταν καλλιεργηθούν παρουσία ουσιών όπως η πενικιλίνη. Είναι άσπορα, χωρίς βλεφαρίδες, ακίνητα. Μια τρομώδης κίνηση που παρατηρείται οφείλεται

στην παρουσία πολικών ινιδίων. Αρκετά στελέχη φέρουν έλυτρο. Όλα τα είδη είναι αυστηρά *αερόβια*. Δεν αναπτύσσονται σε αναερόβιες ή μικροαερόφιλες συνθήκες.



**Εικόνα 4.**

### **Καλλιέργεια.**

Αναπτύσσεται στα συνήθη θρεπτικά υλικά του εργαστηρίου ακόμη και στο απλό θρεπτικό άγαρ. Οι αποικίες είναι μεγάλες, διαμέτρου 2-3 mm, λείες, συχνά βλεννώδεις, κολλημένες στο άγαρ. Σε ειδικά μαλακά θρεπτικά υλικά παρουσιάζουν ερπυσμό. Μερικά καλλιεργήματα μυρίζουν άσχημα. Αναπτύσσονται πολλά είδη και στο MacConkey, (εικ.5).



**Εικόνα 5.**



## Βιοχημικές ιδιότητες.

Οι δύο βασικές ιδιότητες που ισχύουν για όλα τα είδη είναι: οξείδωση αρνητική και μη αναγωγή των νιτρικών. Οι δύο άλλες ιδιότητες που επιτρέπουν το διαχωρισμό και χαρακτηρισμό ειδών είναι: δίνουν θετικές τη διάσπαση της γλυκόζης και την αιμόλυση.

Οι λοιπές ιδιότητες αναγράφονται στον πίνακα 2.

**Πίνακας 2. Βιοχημικές ιδιότητες των *Acinetobacter***

Οξείδωση	(-)	Ουρία	(-/ +)
Κατάλυση	+	Πηκτή	(-/ +)
Νιτρικά	(-)	Λυσίνη	(-)
Γλυκόζη <sup>1</sup>	(+/-)	Ορνιθίνη	(-)
Ινδόλη	(-)	Φαινυλαλαλίνη	(-)
Υδρόθειο	(-)	Αιμόλυση <sup>2</sup>	(+/-)
Ακετοΐνη (V.P)	(-)		

(1) Γλυκόζη θετική το *A. baumannii*

(2) Αιμόλυση θετική το *A. haemolyticus*

Βάσει των διαφορών στις βιοχημικές δοκιμές έχουν διαχωριστεί κατά καιρούς βιότυποι. Με δοκιμή χρησιμοποίησης σαν πηγή άνθρακα 6 διαφορετικά συνθετικά υλικά έχουν διαχωριστεί στελέχη του *A. baumannii* σε πολλούς βιότυπους.

## Αντιγονική δομή.

Έχει την ίδια δομή με τα άλλα γένη της Οικογένειας των ναϊσσεριών. Βάσει του πολυσακχαριδικού αντιγόνου του ελύτρου τα στελέχη του *Acinetobacter calcoaceticus* και ήδη τα περισσότερα του *Acinetobacter baumannii* έχουν διαχωριστεί σε 28 οροτύπους. Πιο πρόσφατος είναι ο διαχωρισμός σε τύπους βάσει του πρωτεϊνικού προφίλ των πρωτεϊνών της εξωτερικής τους μεμβράνης.

Ο διαχωρισμός αυτός έγινε με ηλεκτροφόρηση sodium-dodecyl-sulfate-πολυακρυλικής γέλης. Η τυποποίηση των στελεχών που απομονώνονται από τις νοσοκομειακές επιδημίες σε αντιγονικούς τύπους είναι ένας από τους σημαντικούς επιδημιολογικούς δείκτες.

## Οικολογία – Επιδημιολογία

Τα *Acinetobacter* είναι κοινά μικρόβια του φυσικού μας περιβάλλοντος. Βρίσκονται στο χώμα, το νερό, τα φυτά και στα διαφορά φυτικά και ζωικά μας τρόφιμα. Αποικίζουν τους βλεννογόνους του πεπτικού, του αναπνευστικού και του ουρογεννητικού συστήματος παροδικά ή μόνιμα. Η κυριότερη όμως περιοχή μόνιμης αποικίσεως είναι το δέρμα όπου παραμένει σαν μέλος της μόνιμης φυσιολογικής χλωρίδας του και σαν η κυριότερη πηγή μόλυνσεως του ανθρώπου.

Στα νοσοκομεία βρίσκεται συχνά και στα χέρια των γιατρών και νοσηλευτών σε σημαντικό ποσοστό που αυξάνει κατά τις νοσοκομειακές επιδημίες. Τα χέρια θεωρούνται σαν φορείς, μεταφορείς και διασπορείς του επιδημικού στελέχους μέσα στους νοσοκομειακούς θαλάμους. Τα ακινητοβακτηρίδια είναι ένα από τα πολλά Gram-αρνητικά βακτηρίδια τα οποία είναι αίτια νοσοκομειακών λοιμώξεων, σποραδικών και επιδημικών.

Δεν υπάρχουν δείκτες μεγαλύτερης τοξικότητας μεταξύ των επιδημικών και μη επιδημικών στελεχών. Κάθε ακινητοβακτηρίδιο μπορεί να προκαλέσει αυτολοίμωξη στον εξασθενημένο ή ανοσοκατασταλμένο με υποκείμενη νόσο ασθενή. Ενδονοσοκομειακές επιδημίες περιγράφονται πολύ συχνά σ' όλες τις χώρες.

Η μελέτη των επιδημιών αυτών γίνεται με την αναζήτηση και αναγνώριση του επιδημικού στελέχους και την ιχνηλάτηση της εστίας και των οδών της μεταδόσεως και μεταφοράς του.

Χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι επιδημιολογικοί δείκτες.

*Αντιβιογράμμα.* Είναι δείκτης περιορισμένης αποδόσεως γιατί συμβαίνει ανάπτυξη αποτοχής σε κάποια αντιβιοτικά και κατά τη διάρκεια της επιδημίας.

*Οροτυπία.* Μικρής χρησιμότητας λόγω της μεγάλης ετερογένειας των στελεχών.

*Βιοτυπία.* Είναι ο πιο χρήσιμος και εφικτός δείκτης, φθάνει να γίνει με σωστή επιλογή των δοκιμών. Μπορεί να γίνει και αυξανόγραμμα.

*Λυσιτυπία,* ήτοι ευαισθησία σε βακτηριοφάγους. Η χρησιμότητα του δείκτη αυτού εξαρτάται από το συνδυασμό των φάγων που θα χρησιμοποιηθούν και από την εξειδίκευση του εργαστηρίου στην τεχνική αυτή.

*Πυοσινοτυπία.* Κάνει πολύ λεπτούς διαχωρισμούς και εφαρμόζεται με ευχέρεια στα εργαστήρια που συντηρούν τη μέθοδο.

*Πρωτεϊνικό προφίλ.* Εφαρμόζεται με αρκετή επιτυχία προς το παρόν.

Οι νοσοκομειακές επιδημίες από το ακινητοβακτηρίδιο εμφανίζονται συχνότερα κατά το τέλος του καλοκαιριού και αρχές χειμώνα για ανεξήγητους ακόμη λόγους.

### **Νόσοι από *Acinetobacter***

Οι περισσότερες περιγραφές λοιμώξεων από ακινητοβακτηρίδια αφορούν σε ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις. Σ' αυτές υπάρχουν προδιαθεσικοί παράγοντες. Υπάρχουν όμως και λοιμώξεις σε εκτός νοσοκομείων αρρώστους. Προδιαθεσικοί παράγοντες είναι η βαριά υποκείμενη νόσος, τα κακοήθη νοσήματα, το έγκαυμα, η ανοσοκαταστολή, οι μεγάλες εγχειρήσεις και η κάθε είδους και τύπου παρεμβατική διαγνωστική ή θεραπευτική ιατρική πράξη (καθετήρες, διασωληνώσεις, παρακεντήσεις κ. ά.).

Στους εξωτερικούς εκτός νοσοκομείων ασθενείς προδιαθεσικοί παράγοντες είναι η μεγάλη ηλικία, οι χρόνιες λοιμώξεις, ο αλκοολισμός. Οι λοιμώξεις από ακινητοβακτηρίδια (εικ.6.) κατά σειρά συχνότητας είναι οι εξής:

*Νόσοι του αναπνευστικού.* Εκδηλώνονται σαν βαριά λοβώδης πνευμονία, ή τραχειοβρογχίτις με πυρετό και πυώδη πτύελα. Συχνά εκδηλώνεται σαν μετεγχειρητική λοίμωξη και προδιαθεσικοί παράγοντες είναι: η τραχειοστομία και οι ενδοτραχειακές επεμβάσεις. Το ακινητοβακτηρίδιο αναπτύσσεται σε αφθονία σαν το επικρατούν ή σαν το μοναδικό βακτήριο στις καλλιέργειες των πτυέλων. Μπορεί να αναπτυχθεί και στην αιμοκαλλιέργεια.

*Ουρολοιμώξεις.* Προδιαθεσικοί παράγοντες είναι οι μόνιμοι καθετήρες. Μπορεί να εμφανισθεί και σε εξωνοσοκομειακούς αλλά είναι σχεδόν κατά κανόνα νοσοκομειακή λοίμωξη, παρόμοια με τις άλλες από Gram αρνητικά μικρόβια ουρολοιμώξεις. Είναι συχνότερες σε περιόδους ενδονοσοκομειακής επιδημίας από ακινητοβακτηρίδιο.

*Ενδοκαρδίτιδα*, αποστήματα, τραυματικές λοιμώξεις, περιτονίτιδα, μέση ωτίτιδα από ακινητοβακτηρίδιο έχουν περιγραφεί και το μικρόβιο απομονώνεται εύκολα από τα αντίστοιχα κλινικά υλικά.



Γενικά είναι μικρόβιο ανθεκτικό σε πολλά αντιβιοτικά. Είναι ανθεκτικό στα β-λακταμικά, στις περισσότερες αμινογλυκοσίδες, ενώ είναι ευαίσθητο στην καναμυκίνη, την τομπραμυκίνη και την αμικασίνη. Ανθεκτικό στη χλωραμφαινικόλη και την κλασική τετρακυκλίνη αλλά ευαίσθητο στη μινοκυκλίνη, στη δοσυκυκλίνη, στην μιπενέμη και στην κεφταζιδίμη.

Δεν παρουσιάζει καμιά δυσκολία στην καλλιέργεια γιατί αναπτύσσεται στα κοινά υλικά των καλλιέργειών.

## ΟΧΑ β-λακταμάσες στο *Acinetobacter*

Ο έλεγχος των νοσοκομειακών λοιμώξεων που προκαλούνται από Gram-αρνητικά βακτήρια απασχολεί τα τελευταία χρόνια όλες τις ανεπτυγμένες χώρες ιδιαίτερα μετά την εισαγωγή νέων ευρέος φάσματος αντιβιοτικών. Από τα βακτήρια αυτά, το γένος *Acinetobacter* πρωταγωνιστεί στον αποικισμό και στις λοιμώξεις των νοσηλευόμενων στα νοσοκομεία. Είδη του γένους αυτού ενοχοποιούνται για ένα εύρος νοσοκομειακών λοιμώξεων όπως βακτηραιμία, ουρολοίμωξη και δευτερογενής μηνιγγίτιδα. Τέτοιου είδους λοιμώξεις είναι συχνά εξαιρετικά δύσκολες στη θεραπευτική τους αντιμετώπιση λόγω του ότι τα μικροβιακά στελέχη που εμπλέκονται εμφανίζουν πολυανθεκτικό φαινότυπο αντοχής στις κυριότερες κατηγορίες των αντιβιοτικών.

Το γεγονός αυτό επιβαρύνεται ακόμα περισσότερο από το ότι τα μικρόβια αυτά μπορούν να επιβιώσουν για μεγάλο διάστημα στο νοσοκομειακό περιβάλλον και έχουν τη δυνατότητα διασποράς τόσο μέσω του ανθρώπινου δυναμικού όσο και του νοσοκομειακού υλικού. Η εμφάνιση αντοχής στις καρβαπενέμες στο *Acinetobacter baumannii* έχει καταστεί ένα παγκόσμιο πρόβλημα δεδομένου ότι οι β-λακτάμες είναι συχνά η μόνη αποτελεσματική θεραπεία αριστερά ενάντια σε πολλά πολυανθεκτικά στελέχη. Μέχρι και σήμερα όμως, οι υποκείμενοι μοριακοί μηχανισμοί παραμένουν άγνωστοι παρά τη συστηματική μελέτη τους.

Οι περισσότερες μελέτες αναφέρονται στη παραγωγή β-λακταμασών αλλά κανένα από τα γονίδια που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα δεν κωδικοποιεί ένζυμο με τόσο ισχυρή δραστικότητα καρβαπενεμάσης ώστε να δικαιολογεί υψηλά επίπεδα αντοχής. Άλλοι μηχανισμοί όπως η μειωμένη διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος λόγω μειωμένης έκφρασης πορινών (π.χ. η CarO πορίνη) φαίνεται να δρουν συνεργικά με τις β-λακταμάσες και να προσδίδουν υψηλά επίπεδα αντοχής. Επίσης, η ύπαρξη αντλιών ενεργού εκροής καθώς και η μειωμένη έκφραση πενικιλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών στο τοίχωμα της πεπτιδογλυκάνης διερευνάται συστηματικά σε σχέση με το πολυανθεκτικό φαινότυπο του είδους.

Μια πρόσφατη εξέλιξη ήταν η ανακάλυψη μιας νέας ομάδας ΟΧΑ β-λακταμασών σε ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη, μερικά από τα οποία έχουν αποκτήσει την ικανότητα να υδρολύουν τις καρβαπενέμες. Το πρώτο από αυτά βρέθηκε σε ένα απομονωμένο στέλεχος του Εδιμβούργου πριν η ιμιπενέμη χρησιμοποιηθεί στο

νοσοκομείο. Αν αυτές οι καρβαπενεμάσες έχουν αποκτηθεί ή αν αποτελούν μέρος της γενετικής δομής του είδους αυτού αποτελεί θέμα προς διερεύνηση. Το πιο σημαντικό είναι ότι αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό στάδιο στην εξέλιξη της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά του *Acinetobacter*.

Το *Acinetobacter* και ιδίως το *Acinetobacter baumannii*, αναγνωρίζεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον αποικισμό και τη μόλυνση των ασθενών, ιδίως αυτών σε μονάδες εντατικής θεραπείας. Ένα σημαντικό πρόβλημα που αντιμετωπίζουν οι κλινικοί γιατροί είναι πώς ν' αντιμετωπίσουν αποτελεσματικά λοιμώξεις που προκαλούνται από αυτόν τον μικροοργανισμό. Οι καρβαπενέμες χρησιμοποιήθηκαν για τη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από πολυανθεκτικά στελέχη του *A. baumannii* ωστόσο η αντίσταση σε αυτά τα φάρμακα είναι πλέον ένα σύνηθες φαινόμενο και στελέχη ανθεκτικά έχουν αρχίσει να εμφανίζονται.

Οι πρώτες αναφορές για αντίσταση στην ιμιπενέμη στο *A. baumannii* άρχισαν να αναδύονται πριν από μια δεκαετία. Το 1993, η πρώτη από μια νέα ομάδα OXA τύπου β-λακταμάση ανακαλύφθηκε σ' ένα ανθεκτικό στην ιμιπενέμη *A. baumannii* στέλεχος σ' έναν ασθενή στο Βασιλικό Νοσοκομείο του Εδιμβούργου. Αυτή η β-λακταμάση βρέθηκε να υδρολύει τις καρβαπενέμες. Η αντίσταση στην ιμιπενέμη στη συνέχεια αποδείχθηκε ότι είναι μεταβιβάσιμη και η ανάλυση ακολουθίας του γονιδίου ανακάλυψε ότι κωδικοποιεί ένα ασυνήθιστο OXA τύπου ένζυμο (που ορίζεται OXA-23) μοριακής τάξης D κατά Ambler. Στην αρχή προκάλεσε προβληματισμό αλλά θεωρήθηκε μια μεμονωμένη περίπτωση. Ωστόσο, το 1997, μια άλλη OXA-23 β-λακταμάση ανακαλύφθηκε σ' ένα ανθεκτικό στην ιμιπενέμη στέλεχος που απομονώθηκε στη Γαλλία. Και το γονίδιο αυτό έδειξε να υδρολύει την ιμιπενέμη.

Μεταξύ των ετών 2000 και 2004, έξι νέα ένζυμα τύπου OXA συλλέγονται σ' όλο τον κόσμο από ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη. Το OXA-24 βρέθηκε σ' ένα ανθεκτικό στην καρβαπενέμη στέλεχος από την Ισπανία και αντιπροσώπευε μια δεύτερη υποομάδα των ενζύμων αυτών, δεδομένου ότι παρουσίαζε <60% ομοιότητα αμινοξέων με το OXA-23. Τρεις άλλες OXA- β-λακταμάσες σχετιζόμενες με την OXA-24, οι OXA-25, OXA-26 και OXA-40 προσδιορίστηκαν σε στελέχη από την Ισπανία, το Βέλγιο και την Πορτογαλία και δύο παραλλαγές της OXA-23, οι OXA-27 και OXA-49 βρέθηκαν σε ανθεκτικά στελέχη από τη Σιγκαπούρη και την Κίνα αντίστοιχα. Εντός των δύο τελευταίων χρόνων το OXA-23 έχει βρεθεί σε στελέχη *Acinetobacter* από τη

Βραζιλία, την Κίνα και τη Σιγκαπούρη και είναι πλέον ενδημικό σε πολλά νοσοκομεία στη νότια Αγγλία. Επίσης έχουν βρεθεί σε στελέχη του *Proteus mirabilis* στη Γαλλία..

Πρόσφατα, μια τρίτη υποομάδα των β-λακταμασών OXA με <63% ομοιότητα αμινοξέων με τις υποομάδες 1 και 2 έχει εντοπισθεί σε *A. baumannii*. Το OXA-51 βρέθηκε σε δύο ανθεκτικούς στην ιμιπενέμη *A. baumannii* κλώνους που απομονώθηκαν στην Αργεντινή. Επτά επιπλέον ένζυμα ανακαλύφθηκαν στη συνέχεια σε ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη σε όλο τον κόσμο, τα οποία παρουσίαζαν 98-99% ομοιότητα με OXA-51. Μια νέα OXA β-λακταμάση η OXA-58 έχει πρόσφατα βρεθεί σε ανθεκτικά στις καρβαπενέμες *A. baumannii* στελέχη στη Γαλλία. Η OXA-58 έχει <50% ομοιότητα αμινοξέων με τις άλλες β-λακταμάσες OXA κι έχει βρεθεί επίσης σε στελέχη από την Αργεντινή, το Κουβέιτ και τη Νότια Αγγλίας.

Σε αντίθεση με την πλειονότητα των OXA β-λακταμασών σε άλλα γένη, κανένα από τα γονίδια OXA στα στελέχη του *Acinetobacter* ανθεκτικά στις καρβαπενέμες δεν έχουν βρεθεί σε ιντεγκρόνια. Με εξαίρεση τις πλασμιδιακές OXA-23 και OXA-58, στα υπόλοιπα έχουμε χρωμοσωμιακή μεταβίβαση.

Αυτό που είναι σίγουρο είναι ότι η αντίσταση στις καρβαπενέμες στο *A. baumannii* γίνεται όλο και πιο διαδεδομένη, και ανθεκτικά στελέχη αναδύονται τώρα σε περιοχές που μέχρι τώρα είχαν καταφέρει να αποφύγουν το πρόβλημα. Επιπλέον, στελέχη εμφανίζονται τώρα που φιλοξενούν περισσότερα από ένα γονίδια OXA. Χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για να καθοριστεί ο ακριβής ρόλος που αυτά τα ένζυμα παίζουν στην εξέλιξη της αντοχής στις καρβαπενέμες σε αυτό το γένος.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Μέθοδος (PCR)

Στη μελέτη μας έχουμε χρησιμοποιήσει την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR). Είναι μια *in vitro* ενζυματική αντίδραση, που ανήκει στις μεθόδους ανίχνευσης του DNA μέσω πολλαπλασιασμού του στόχου. Ο τελικός σκοπός της αντίδρασης είναι ο εκθετικός πολλαπλασιασμός ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA που αποτελεί το στόχο της αντίδρασης.

Αν και τα βασικά στοιχεία μιας παρόμοιας τεχνικής είχαν περιγραφεί ήδη από το 1971, οι επιστήμονες της εταιρείας Cetus Corp., με επικεφαλής τον Kary Mullis, ήταν αυτοί που εφάρμοσαν για πρώτη φορά την τεχνική που είναι σήμερα γνωστή ως PCR. Στη συνέχεια και μέσα σε λιγότερο από μια δεκαετία, η συγκεκριμένη τεχνική έγινε μια από τις πλέον αναγνωρίσιμες και παγκοσμίως γνωστές τεχνικές μοριακής βιολογίας με δεκάδες παραλλαγές, εκατοντάδες εφαρμογές και χιλιάδες δημοσιεύσεις.

## **Η αρχή της μεθόδου**

Με τη χρήση της τεχνικής της PCR πραγματοποιείται *in vitro* η σύνθεση ενός τμήματος DNA που αποτελεί το στόχο της αντίδρασης. Στη συνέχεια ακολουθεί ο εκθετικός πολλαπλασιασμός του συγκεκριμένου τμήματος, με τελικό σκοπό την παραγωγή ενός μεγάλου αριθμού αντιγράφων και την οπτικοποίησή του. Η όλη διαδικασία διαρκεί περίπου 3-4 ώρες, λαμβάνει μέρος στο ίδιο αρχικό μείγμα αντιδραστηρίων, χωρίς προσθήκες και στο τέλος παράγεται η συγκεκριμένη περιοχή σε αριθμό αντιγράφων μεγαλύτερο από  $10^6$ .

Η *in vitro* αντίδραση εκμεταλλεύεται την *in vivo* δράση του ενζύμου DNA πολυμεράση, που αποτελεί το ένζυμο αντιγραφής του DNA σε κάθε κύτταρο κατά τη διαίρεση του. Ειδικότερα, στο διαιρούμενο κύτταρο, μετά την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, το ένζυμο πολυμεράση «διαβάζει» τον ένα κλώνο (μονόκλωνο DNA) και έχοντας τον ως πρότυπο-μήτρα (template), συνθέτει συμπληρωματική αλυσίδα DNA με κατεύθυνση από το 5' προς το 3' άκρο, παρουσία τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων. Στην αντίδραση PCR γίνεται η ίδια ενζυματική διεργασία από το ένζυμο πολυμεράση, σε συνθήκες *in vitro*.

## **Η διαδικασία της αντίδρασης**

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης απαιτούνται το ένζυμο DNA πολυμεράση, το DNA στόχος που θα πολλαπλασιαστεί, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) για τη σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσών του DNA, ένα ζευγάρι αλληλουχιών



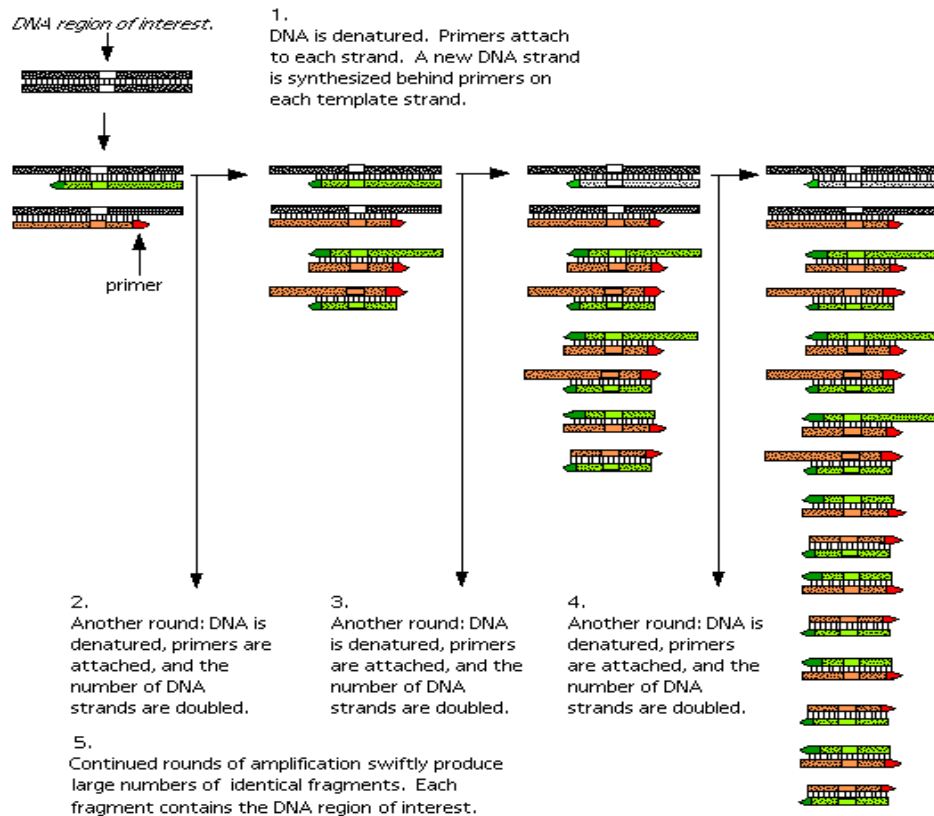
DNA μεγέθους 15-25 bp, συμπληρωματικών προς την αλληλουχία της αρχής και του τέλους του DNA στόχου που θα πολλαπλασιαστεί (εναρκτήριες αλληλουχίες) και τέλος ένα ρυθμιστικό διάλυμα ιόντων  $Mg^{++}$ .

Η αντίδραση έχει τρία στάδια, το στάδιο της αποδιάταξης του δίκλωνου DNA (denaturation), το στάδιο του υβριδισμού των εναρκτήριων αλληλουχιών (annealing) και το στάδιο της επέκτασης και σύνθεσης της συμπληρωματικής αλυσίδας (extension). Τα τρία αυτά στάδια αποτελούν ένα πλήρη κύκλο και κάθε αντίδραση PCR αποτελείται από 25-40 παρόμοιους κύκλους (εικ.7). Η διαδικασία της συνεχούς επανάληψης των τριών σταδίων ήταν αυτή που έδωσε και στην αντίδραση το όνομα της.

Το πρώτο στάδιο, δηλαδή το στάδιο της αποδιάταξης του δίκλωνου DNA, πραγματοποιείται όταν αυξηθεί η θερμοκρασία στο διάλυμα της αντίδρασης σε επίπεδα 93-95°C. Στη θερμοκρασία αυτή το δίκλωνο DNA διαχωρίζεται στους δύο συμπληρωματικούς κλώνους. Στη συνέχεια, μετά την ελάττωση της θερμοκρασίας σε επίπεδα 45-65°C (στάδιο υβριδισμού) πραγματοποιείται ο υβριδισμός, δηλαδή η ένωση των εναρκτήριων αλληλουχιών στις συμπληρωματικές θέσεις των κλώνων του DNA. Η θερμοκρασία υβριδισμού είναι ειδική του κάθε ζεύγους εναρκτήριων αλληλουχιών και εξαρτάται από τη σύνθεση και το μέγεθος των αλληλουχιών. Τέλος, μετά την εκ νέου αύξηση της θερμοκρασίας στους 72°C (στάδιο επέκτασης του DNA), το ένζυμο DNA πολυμεράση χρησιμοποιώντας ως πρότυπο-μήτρα το ήδη υπάρχον DNA συνθέτει τη συμπληρωματική αλυσίδα, προσθέτοντας δεοξυριβονουκλεοτίδια από το διάλυμα της αντίδρασης στο 3' άκρο της.

Στο τέλος του πρώτου κύκλου της αντίδρασης οι κλώνοι του στόχου DNA είναι τέσσερις (δύο αρχικοί, δύο νέοι) και αποτελούν τα πρότυπα για σύνθεση καινούριου DNA στο δεύτερο κύκλο. Στο τέλος του δεύτερου κύκλου οι κλώνοι είναι οκτώ. Με επαναλαμβανόμενους κύκλους αυξάνει εκθετικά (8, 16, 32, 64 κ.λπ.) ο αριθμός των ανατύπων του στόχου DNA, διότι οι κλώνοι που σχηματίζονται χρησιμοποιούνται ως πρότυπο στον επόμενο κύκλο. Έτσι επιτυγχάνεται μεγέθυνση  $2^n$  (όπου  $n$  είναι ο αριθμός των κύκλων) με την αντίδραση PCR.

## POLYMERASE CHAIN REACTION



Εικόνα 7.

Το κύριο προϊόν της αντίδρασης PCR είναι το τμήμα του δίκλωνου DNA που περιλαμβάνεται μεταξύ των εκκινητών ολιγονουκλεοτιδίων. Τα άκρα του καθορίζονται από το 5' άκρο των εκκινητών και το μέγεθος του είναι ίσο με το άθροισμα των βάσεων των εκκινητών και της παρεμβλλόμενης αλληλουχίας του DNA στόχου. Αυτό αποτελεί το προϊόν πολλαπλασιασμού του στόχου (βραχύ προϊόν – short product). Κατά τους πρώτους κύκλους της αντίδρασης όμως παράγονται και μακρύτερα αντίγραφα DNA, που το μέγεθος τους ξεπερνά το μεταξύ των εκκινητών τμήμα (μακρά προϊόντα – long products). Από τον τρίτο όμως κύκλο και στην συνέχεια η εκθετική αύξηση αφορά κυρίως τα προϊόντα πολλαπλασιασμού (βραχεία προϊόντα), ενώ τα μακρύτερα προϊόντα αν και παράγονται και αυτά, δεν αποτελούν παρά μικρό μόνο τμήμα του συνολικού τελικού αποτελέσματος της αντίδρασης και δεν παρεμβαίνουν στην τελική οπτικοποίηση.

Οι κυκλικές εναλλαγές της θερμοκρασίας στην αντίδραση PCR πραγματοποιούνται με αυτοματοποιημένες συσκευές, εμπορικά διαθέσιμες, που ονομάζονται θερμοκυκλοποιητές (εικ.8).



**Εικόνα 8. θερμοκυκλοποιητής**

### **Τα χημικά αντιδραστήρια**

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η αντίδραση της PCR ολοκληρώνεται στο ίδιο μείγμα αντιδραστηρίων, το οποίο περιέχει τον DNA στόχο, τις εναρκτήριες αλληλουχίες, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια,  $MgCl_2$  που παρέχει τα ιόντα  $Mg^{++}$  που είναι απαραίτητα για την ενζυματική αντίδραση, το ένζυμο DNA πολυμεράση και ρυθμιστικό διάλυμα συγκεκριμένου pH κατάλληλου για τη δράση του ενζύμου.

Οι εναρκτήριες αλληλουχίες (εκκινητές - primers) είναι τμήματα μονόκλωνου DNA μεγέθους 18-25 βάσεων, που υβριδίζουν σε συγκεκριμένο σημείο του DNA στόχου και αποτελούν τη βάση για την έναρξη της επέκτασης της συμπληρωματικής αλυσίδας. Η επέκταση γίνεται πάντα κατά την 5' προς 3' κατεύθυνση της συμπληρωματικής αλυσίδας που κατασκευάζεται.

Σε κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιούνται δύο εναρκτήριες αλληλουχίες, μια για κάθε συμπληρωματική αλυσίδα του DNA στόχου. Ο σχεδιασμός των εναρκτήριων αλληλουχιών αποτελεί μια σχετικά περίπλοκη διαδικασία, που συνήθως ολοκληρώνεται με τη χρήση προγραμμάτων ηλεκτρονικών υπολογιστών. Οι παράμετροι που λαμβάνονται υπόψη για το σωστό σχεδιασμό είναι η αλληλουχία του DNA στόχου, η περιεκτικότητα και αναλογία στις τέσσερις βάσεις (A, T, C, G), το μήκος της αλυσίδας

της εναρκτήριας αλληλουχίας (μήκος μικρότερο από 15 βάσεις ελαττώνει την ειδικότητα, ενώ μήκος μεγαλύτερο από 30 βάσεις αυξάνει το κόστος κατασκευής), η θερμοκρασία υβριδισμού (που θα πρέπει να βρίσκεται σε ένα εύρος 50-60°C και εξαρτάται από την περιεκτικότητα της κάθε βάσης), τα φυσικά χαρακτηριστικά (όπως η πιθανή συμπληρωματικότητα αρχής-τέλους της κάθε εναρκτήριας αλληλουχίας και η συμπληρωματικότητα των δύο αλληλουχιών μεταξύ τους), το επιθυμητό μήκος του προϊόντος της PCR (που δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 450-500 bp, αλλά και να μην είναι μικρότερο από 70-100 bp), κλπ.

Το ένζυμο DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται στην *in vitro* αντίδραση είναι μία μορφή θερμοάαντοχης DNA πολυμεράσης, η οποία έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq). Το βασικό χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου ενζύμου είναι ότι δεν απενεργοποιείται από τις επαναλαμβανόμενες υψηλές θερμοκρασίες (93-95°C) που απαιτούνται για την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στόχου. Έτσι η προσθήκη του ενζύμου γίνεται μια φορά στην αρχή της αντίδρασης και όχι μετά από κάθε κύκλο, όπως θα γινόταν με τη χρήση του συμβατικού, μη θερμοανθεκτικού ενζύμου.

Τα ιόντα μαγνησίου  $Mg^{++}$  παίζουν σημαντικό ρόλο στη σύνδεση των εναρκτήριων αλληλουχιών και στη συνολική ευαισθησία και ειδικότητα της αντίδρασης. Χαμηλή συγκέντρωση ιόντων έχει ως αποτέλεσμα φτωχή ευαισθησία, ενώ αντίθετα πολύ υψηλή συγκέντρωση ελαττώνει την ειδικότητα της αντίδρασης. Για τις περισσότερες αντιδράσεις μια συγκέντρωση μεταξύ 0,5 και 3,0 mM θεωρείται επαρκής, όμως η τελική συγκέντρωση θα πρέπει να καθορίζεται εμπειρικά, με δοκιμές μικρότερης και μεγαλύτερης συγκέντρωσης, έτσι ώστε να επιτευχθεί το βέλτιστο αποτέλεσμα.

Η συγκέντρωση των τριφωσφορικών δεοξυνουκλετιδίων θα πρέπει επίσης να καθορίζεται εμπειρικά, αν και σε γενικές γραμμές μια συγκέντρωση μεταξύ 20 και 200 mM θεωρείται ικανοποιητική. Ο εμπειρικός καθορισμός με έλεγχο μεγαλύτερων και μικρότερων συγκεντρώσεων θα πρέπει να διενεργείται εκ παραλλήλου με τον εμπειρικό καθορισμό της συγκέντρωσης των ιόντων μαγνησίου  $Mg^{++}$ .

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να σημειωθεί ότι πλέον υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα μείγματα αντιδραστηρίων για PCR έτοιμα προς χρήση (ready to use master mix). Αυτά τα μείγματα περιέχουν τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια,  $MgCl_2$ , DNA πολυμεράση και ρυθμιστικό διάλυμα, σε συγκεντρώσεις που ταιριάζουν στις περισσότερες εφαρμογές PCR. Ο χρήστης θα πρέπει να προσθέσει μόνο το DNA στόχο και τις εναρκτήριες αλληλουχίες για τη διενέργεια της αντίδρασης.

## **Η θερμοκρασία υβριδισμού των εναρκτήριων αλληλουχιών**

Η θερμοκρασία υβριδισμού είναι η θερμοκρασία κατά την οποία οι εναρκτήριες αλληλουχίες υβριδίζουν στην αλυσίδα του DNA στόχου, έτσι ώστε να ξεκινήσει στη συνέχεια τη δράση της η Taq-πολυμεράση για την επέκταση της συμπληρωματικής αλυσίδας. Η θερμοκρασία αυτή εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από το σωστό σχεδιασμό των εναρκτήριων αλληλουχιών και συνήθως θα πρέπει να βρίσκεται σε ένα εύρος θερμοκρασιών 50-60°C. Χαμηλότερη θερμοκρασία από 45°C μπορεί να οδηγήσει σε μη ειδικές συνδέσεις και ελαττωμένη ειδικότητα, ενώ θερμοκρασία άνω των 65°C οδηγεί σε ελαττωμένη ευαισθησία.

Η θερμοκρασία υβριδισμού μπορεί να υπολογιστεί από τη δομή των αλληλουχιών με βάση μαθηματικούς τύπους, όμως στο πλαίσιο της βελτιστοποίησης της αντίδρασης θα πρέπει να πραγματοποιείται και πρακτική δοκιμή θερμοκρασιών λίγων βαθμών πάνω και κάτω από τη θερμοκρασία που δίνει ως αποτέλεσμα ο μαθηματικός υπολογισμός.

## **Η επιλογή του DNA στόχου**

Η επιλογή του DNA στόχου αποτελεί σημαντικό παράγοντα στο σχεδιασμό του πρωτοκόλλου της PCR. Βασική παράμετρος στην επιλογή του στόχου αποτελεί η γενετική σταθερότητα του τμήματος DNA που θα επιλεγεί να πολλαπλασιασθεί. Η γενετική αυτή σταθερότητα εξασφαλίζει ότι οι θέσεις σύνδεσης των εναρκτήριων αλληλουχιών θα έχουν πάντα την ίδια σύνθεση, έτσι ώστε ο υβριδισμός να είναι ειδικός και σταθερός. Η δομή της αλληλουχίας του DNA στόχου που θα πολλαπλασιαστεί είναι δυνατό να είναι άγνωστη, όμως θα πρέπει να είναι γνωστή η αλληλουχία βάσεων των πλευρικών περιοχών του, ώστε να κατασκευαστούν συνθετικά οι εναρκτήριες αλληλουχίες.

Η διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται στην τεχνική της shotgun-PCR, όπου από μια γνωστή περιοχή κατασκευάζεται η εναρκτήρια αλληλουχία, η οποία πολλαπλασιάζει την αλυσίδα σε γειτονικό μήκος 400-500 bp με άγνωστη αλληλουχία. Στη συνέχεια με την τεχνική του DNA sequencing γίνεται γνωστή η αλληλουχία της νέας αλυσίδας, η οποία με τη σειρά της χρησιμοποιείται ως μήτρα για την κατασκευή νέας εναρκτήριας αλληλουχίας, η οποία γίνεται βάση για νέο πολλαπλασιασμό της αμέσως επόμενης γειτονικής άγνωστης αλληλουχίας, κ.ο.κ.

Η ευαισθησία του πρωτοκόλλου PCR θα είναι αυξημένη, εάν ο στόχος βρίσκεται σε πολλαπλά αντίγραφα στο γονιδίωμα του κυττάρου.

Ο συνδυασμός των πολλαπλών αντιγράφων με την επιλογή του κατάλληλου δείγματος με μεγάλο βακτηριακό φορτίο, μεταφράζεται σε ακόμη πιο αυξημένη ευαισθησία της μεθόδου.

Τα περισσότερα πρωτόκολλα PCR έχουν ως στόχο DNA. Όμως σε ορισμένες περιπτώσεις ο στόχος μπορεί να είναι το RNA, όπως στις περιπτώσεις αρκετών ιών. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιείται η τεχνική της reverse transcriptase PCR.

### **Η επιλογή και επεξεργασία του κλινικού δείγματος, η απομόνωση του DNA**

Η επιλογή και βασική επεξεργασία του κλινικού δείγματος για PCR, μέχρι του σημείου της έναρξης της εκχύλισης του DNA, δεν διαφέρει και πολύ από αυτή που καθορίζεται από τις βασικές αρχές της συμβατικής κλινικής μικροβιολογίας. Έτσι, για παράδειγμα, στη διαγνωστική της φυματίωσης, η επεξεργασία τριών δειγμάτων πτυέλων αυξάνει την ευαισθησία της μοριακής διάγνωσης, όπως ακριβώς και της συμβατικής. Επίσης ο εμπλουτισμός και η συμπύκνωση, μέσω φυγοκέντρωσης, των δειγμάτων των βιολογικών υγρών (πλευριτικό, περικαρδιακό, ασκитικό, κ.λπ.), αυξάνει επίσης την διαγνωστική ευαισθησία της μεθόδου.

Τα κλινικά δείγματα με χλωρίδα αποτελούν ένα σημαντικό πρόβλημα, όταν το υπό ανίχνευση παθογόνο μπορεί να αποτελεί μέρος της χλωρίδας της περιοχής. Η PCR δεν μπορεί εύκολα να διαχωρίσει μεταξύ αποικιστή και πραγματικού παθογόνου, αφού έχει τη δυνατότητα να πολλαπλασιάσει εξαιρετικά μικρές ποσότητες DNA.

Αντίθετα, η συμβατική Μικροβιολογία έχει καταφέρει να επιλύσει αυτό το πρόβλημα με διάφορες τεχνικές (όπως η ποσοτική καλλιέργεια, κλπ.). Για παράδειγμα, αποτέλεσμα θετικό με PCR για *Chlamydophila pneumoniae* σε δείγμα αναπνευστικού θα πρέπει να εκτιμάται με προσοχή και πάντα συνυπολογίζοντας την κλινική εικόνα του ασθενούς, λαμβάνοντας υπόψη και το γεγονός ότι σε ποσοστό μέχρι και 20% μπορεί να υπάρχει αποικισμός του ρινοφάρυγγα με *Chlamydophila pneumoniae* ειδικά σε επιλεγμένους πληθυσμούς (ασθενείς με ΧΑΠ, κλπ.).

Σε κλινικά δείγματα με χλωρίδα είναι επίσης εξαιρετικά δύσκολο να εφαρμόσουμε τεχνικές broad range PCR. Στις συγκεκριμένες περιπτώσεις, μετά τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, λαμβάνονται μικτές ηλεκτροφορήσεις, οι οποίες δεν δίνουν εύκολα τη δυνατότητα εξαγωγής συμπερασμάτων. Αντίθετα, η συμβατική μικροβιολογία έχει καταφέρει να λύσει και αυτό το πρόβλημα, χρησιμοποιώντας τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (αιμόλυση, μορφολογία αποικίας, παραγωγή χρωστικής, κ.λπ.) για να διαχωρίσει τα μικρόβια στα μικτά καλλιεργήματα των δειγμάτων με χλωρίδα.

Ενώ η επιλογή του κλινικού δείγματος δεν διαφέρει σε γενικές γραμμές από την αντίστοιχη της συμβατικής Μικροβιολογίας, ο τρόπος λήψης του δείγματος θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της PCR. Έτσι για παράδειγμα αίμα σε αντιπηκτικό ηπαρίνης μπορεί να οδηγήσει σε αναστολή της αντίδρασης, ενώ το EDTA συνήθως δεν κάνει αναστολή. Ορισμένοι βαμβακοφόροι στείλεοί του εμπορίου (που περιέχουν ασβέστιο) επίσης μπορεί να οδηγήσουν σε αναστολή της PCR, σε αντίθεση με τους στείλεους από dacron ή rayon που δεν αναστέλλουν την αντίδραση.

Η πραγματοποίηση της αντίδρασης της PCR προϋποθέτει την ύπαρξη του DNA στόχου σε καθαρή μορφή και σε επαρκή ποσότητα. Όμως το DNA βρίσκεται μέσα στον πυρήνα του κυττάρου (βακτηριακό ή ευκαρυωτικό) και η καταστροφή της κυτταρικής δομής, χωρίς όμως την παράλληλη καταστροφή του DNA, απαιτεί μια διαδικασία που, σε γενικές γραμμές, ακολουθεί τα παρακάτω βήματα:

- (1) διάσπαση της δομής του κυττάρου και αποδέσμευση του DNA
- (2) σταθεροποίηση του DNA έναντι της διάσπασης – υδρόλυσης
- (3) δέσμευση και απομάκρυνση των αναστολέων της αντίδρασης
- (4) συμπύκνωση του DNA στόχου σε μικρό όγκο διαλύματος (με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη συγκέντρωση)

Η πιο απλή μέθοδος αποδέσμευσης και παραλαβής του DNA είναι η αδρή λύση του βακτηριακού τοιχώματος με τη χρήση θερμότητας (βρασμός), επιφανειοδραστικών ουσιών (σαπώνων), υάλινων μικροσφαιριδίων με ή χωρίς θέρμανση, μειγμάτων ενζύμων (πρωτεϊνάση K), κλπ. Στη συνέχεια ακολουθεί ένα στάδιο φυγοκέντρωσης και το υπερκείμενο χρησιμοποιείται απευθείας στην αντίδραση της PCR. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η διαδικασία αυτή δεν είναι μέθοδος εκχύλισης του DNA, αφού δεν

απομακρύνονται τα συγκρίματα του κυτταρικού σκελετού και οι ενδονουκλεάσες του κυτταροπλάσματος κλπ. και έτσι το προϊόν δεν είναι κατάλληλο για εφαρμογές που απαιτείται καθαρό DNA.

Σε αντίθεση με τα ανωτέρω, οι τεχνικές εκχύλισης του DNA διαφέρουν στο γεγονός ότι απομακρύνουν όλα τα ξένα προς το DNA στοιχεία του κυττάρου και απενεργοποιούν όλα τα ένζυμα που μπορεί να ευθύνονται για πιθανή υδρόλυση του DNA. Το τελικό προϊόν αυτών των τεχνικών είναι καθαρό DNA σε υψηλή συγκέντρωση, κατάλληλο για μακροχρόνια φύλαξη σε συνθήκες  $-20^{\circ}\text{C}$  και για όλες τις εφαρμογές μοριακής βιολογίας.

Οι τεχνικές αυτές εκχύλισης βασίζονται σε διαφορετικές μεθόδους, οι πιο γνωστές εκ των οποίων είναι οι ηθμοί πυριτίου, τα μαγνητικά σφαιρίδια, η γη διατομών, κλπ. Η βασική αρχή όμως όλων αυτών των μεθόδων παραμένει η ίδια ανεξαρτήτως της διαδικασίας, δηλ. η διάσπαση της δομής του κυττάρου, η προσρόφηση του DNA σε μια στερεή φάση και η εκκαθάριση όλων των υπόλοιπων στοιχείων με αλληπάλληλες πλύσεις

.

### **Η εμφάνιση και αποτύπωση του τελικού προϊόντος πολλαπλασιασμού**

Τα προϊόντα πολλαπλασιασμού της PCR γίνονται ορατά και ελέγχονται με αρκετούς τρόπους, οι συχνότεροι των οποίων είναι:

(1) η απλή ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης μετά από σύνδεση του DNA με βρωμιούχο αιθίδιο και

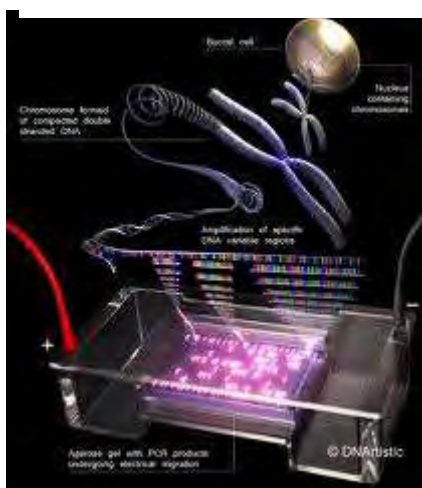
(2) ο υβριδισμός με ιχνηθέτη με φθορίζουσα, ανοσοενζυμική ή ραδιενεργό σήμανση. Η μέθοδος με πήκτωμα αγαρόζης και βρωμιούχο αιθίδιο είναι η συχνότερα χρησιμοποιούμενη, έχει όμως χαμηλότερη ευαισθησία σε σχέση με τις μεθόδους ιχνηθέτη.

Η αγαρόζη είναι ένας φυσικός πολυσακχαρίτης που παράγεται από τα φύκια. Λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας της σε θεϊκές ομάδες έχει πολύ μικρό ηλεκτρικό φορτίο, με αποτέλεσμα να βρίσκει σημαντικές εφαρμογές στην ηλεκτροφόρηση των νουκλεϊκών οξέων.



Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης είναι σχετικά απλή και σύντομη και έχει τη δυνατότητα να διαχωρίζει τα τμήματα του DNA που έχουν διαφορετικό μέγεθος. Επιπλέον, δίνεται η δυνατότητα άμεσου εντοπισμού της θέσης των τμημάτων DNA μέσα στο πήκτωμα, μετά από χρώση του DNA με αραιά διαλύματα βρωμιούχου αιθιδίου, μιας φθορίζουσας χρωστικής, που έχει τη δυνατότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA. Έτσι, τα τμήματα του DNA μπορούν εύκολα να εντοπιστούν κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης, μέσα σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα, με τη χρήση ενός ηλεκτρικού πεδίου σταθερής τάσης και κατεύθυνσης και βασίζεται στο γεγονός ότι οι φωσφορικές ομάδες του DNA (ή RNA), σε ουδέτερο ή αλκαλικό pH, αποκτούν αρνητικό φορτίο. Έτσι, στο ηλεκτρικό πεδίο της συσκευής ηλεκτροφόρησης, το DNA έχει την τάση να μετακινηθεί από την κάθοδο προς την άνοδο, με σταθερή ταχύτητα ανεξάρτητα από την νουκλεοτιδική του σύσταση. Οι όποιες διαφορές προκύπτουν στην κινητικότητα των διαφορετικών τμημάτων DNA οφείλονται στην αντίσταση που εμφανίζεται κατά τη μετακίνησή τους διαμέσου των



πόρων του πηκτώματος, αντίσταση που είναι μεγαλύτερη όσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος του προϊόντος πολλαπλασιασμού που ηλεκτροφορείται. Άρα, όσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος των μορίων DNA, τόσο πιο δύσκολη θα είναι η μετακίνησή τους, ενώ αντίθετα, τα μόρια DNA με μικρό μοριακό μέγεθος περνούν ευκολότερα μέσα από το πήκτωμα και φτάνουν γρηγορότερα στην άνοδο (εικ.9).

**Εικόνα 9**

Εκτός του μεγέθους του προϊόντος DNA, όπως αναφέρθηκε, άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την κινητικότητα του DNA κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης είναι:

(1) η συγκέντρωση της αγαρόζης (όσο πυκνότερο το πήκτωμα τόσο πιο αργή η μετακίνηση του DNA)

(2) η διαμόρφωση του DNA (η υπερελικωμένη και η γραμμική διαμόρφωση των μορίων DNA του ιδίου μοριακού βάρους θα μετακινηθούν με διαφορετικό ρυθμό στην αгарόζη)

(3) η διαφορά δυναμικού του ηλεκτρικού πεδίου

(4) η παρουσία χρωστικών (η χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της κινητικότητας του DNA έως και 10%)

(5) η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης (η απουσία ιόντων μειώνει πολύ την κινητικότητα του DNA).

Υπάρχουν διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται στην ηλεκτροφόρηση και συνήθως περιέχουν EDTA και μείγμα ιόντων σε διάφορες συγκεντρώσεις. Τα διαλύματα αυτά παρασκευάζονται συνήθως συμπυκνωμένα και φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την τελική χρήση τους, οπότε και αραιώνονται κατάλληλα.

## **Βακτηριακά στελέχη**

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 78 κλινικά στελέχη GRAM-αρνητικών βακτηριδίων που απομονώθηκαν από καλλιέργειες σωματικών υγρών ή προσθετικών υλικών, από ασθενείς που νοσηλεύθηκαν σε κλινικές του νοσοκομείου Ιπποκράτειου Θεσσαλονίκης από τον Μάρτιο του 2010 έως τον Ιανουάριο του 2011 (εικ.10). Τα στελέχη αποθηκεύτηκαν στους  $-75^{\circ}\text{C}$  σε TSB (Tryptic Soy Broth) με συμπλήρωμα 15% glycerol πριν από την περαιτέρω εξέταση τους.

**Εικόνα 10**



## Καλλιέργεια – Απομόνωση

Η απομόνωση των στελεχών έγινε στα κατάλληλα κοινά στερεά θρεπτικά υλικά και συγκεκριμένα στο MacConkey άγαρ και στο Mueller Hinton άγαρ. Η επώαση των εμβολιασθέντων θρεπτικών υλικών έγινε σε αερόβιες συνθήκες στους 37<sup>0</sup> C για 24 ώρες.

## Ταυτοποίηση

Η ταυτοποίηση των στελεχών στηρίχθηκε στη μορφολογία των αποικιών, στη χρώση κατά Gram και στον προσδιορισμό των βιοχημικών ιδιοτήτων με το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK 2 (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France), χρησιμοποιώντας την κάρτα GP και ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή (εικ.11).



**Εικόνα 11.**

Η μέθοδος ελέγχου της ευαισθησίας αυτών των στελεχών στα αντιβιοτικά γίνεται με βάση τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης αντιβιοτικού-MIC (Minimal Inhibitory Concentration) σύμφωνα με τα κριτήρια του CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE) και με το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK.

## Προέλευση και είδος των δειγμάτων

Από τα 78 κλινικά στελέχη GRAM-αρνητικών βακτηριδίων τα 35 ήταν στελέχη *K. pneumoniae*(n=34), και *E. coli*(n=1), που απομονώθηκαν από καλλιέργειες ούρων(n<sub>1</sub>=10), περιτοναϊκού υγρού(n<sub>1</sub>=3), αίματος(n<sub>1</sub>=5), βρογχικών εκκρίσεων(n<sub>1</sub>=2), τραχηλικού επιχρίσματος(n<sub>1</sub>=1), τραύματος(n<sub>1</sub>=6), υλικού φλεβοκαθετήρων(n<sub>1</sub>=7), και ουροκαθετήρων(n<sub>1</sub>=1). Τα δείγματα προέρχονταν από μονάδες εντατικής θεραπείας(n<sub>2</sub>=9) και μεταμοσχεύσεων(n<sub>2</sub>=5), χειρουργικές κλινικές(n<sub>2</sub>=8),

παθολογικές( $n_2=7$ ), νεφρολογικές ( $n_2=1$ ), γυναικολογικές και μαιευτικές( $n_2=2$ ), παιδιατρικές ( $n_2=1$ ), νευρολογικές ( $n_2=1$ ) και ουρολογικές κλινικές( $n_2=1$ ).

Τα στελέχη *K. pneumoniae* και *E. coli* ήταν ανθεκτικά (R) στις καρβαπενέμες και συγκεκριμένα στις ερταπενέμες και ιμιπενέμες και μεροπενέμες (MIC breakpoint σε mg/L για την ερταπενέμη  $R>1$   $I=1$   $S\leq 1$  και για ιμιπενέμη, μεροπενέμη  $R>8$   $I=4-8$  και  $S\leq 2$  σύμφωνα με τα κριτήρια του CLSI 2009).

Τα στελέχη αυτά έδιναν επίσης θετικό ένα φαινοτυπικό τεστ, το EDTA test. Το test αυτό το δίνουν θετικό εντεροβακτηριακά στελέχη τάξης B κατά Amplicon που παράγουν τα ένζυμα μέταλλο-β-λακταμάσες που είναι καρβαπενεμάσες και υδρολύουν, πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες και κεφαμυκίνες. Έτσι παρατηρείται αύξηση της άλω αναστολής γύρω από δίσκους ιμιπενέμης (ή κεφαταζιδίμης) παρουσία EDTA όπως φαίνεται στην εικόνα 12. Έχουν στο ενεργό τους κέντρο ιόντα  $Zn^{++}$ , γι' αυτό και αναστέλλονται από χηλικούς παράγοντες όπως είναι το EDTA. Έτσι παρατηρείται αύξηση της άλω αναστολής γύρω από δίσκους ιμιπενέμης (ή κεφαταζιδίμης) παρουσία EDTA. Τα στελέχη αυτά είναι ανθεκτικά στις πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες A,B,Γ γενιάς και στις καρβαπενέμες αλλά είναι ευαίσθητα στην αζτρεονάμη.



**Εικόνα 12. EDTA-disk synergy test**

*Escherichia coli* producing a metallo  $\beta$ -lactamase. It is resistant to cefotaxime (CTX 5), cefotetan (CTT 30) and Augmentin (AMC 60) but susceptible to aztreonam (ATM 30). Note the borderline resistance to imipenem (IPM 10) and the large inhibitory zone around the IPM disc loaded with 500  $\mu$ g EDTA. The blank disc in the centre contains 500  $\mu$ g EDTA.

Τα υπόλοιπα 43 ήταν κλινικά στελέχη του είδους *A. baumannii* που απομονώθηκαν από καλλιέργειες αίματος( $n_3=9$ ), βρογχικών εκκρίσεων( $n_3=14$ ), υλικού φλεβοκαθετήρων( $n_3=6$ ) και ουροκαθετήρων( $n_3=2$ ), τραύματος ( $n_3=8$ ), εγκεφαλονωτιαίου υγρού( $n_3=2$ ), ασκτικού υγρού( $n_3=1$ ) και ούρων( $n_3=1$ ). Η προέλευση των δειγμάτων ήταν από μονάδες εντατικής θεραπείας ενηλίκων και παιδών( $n_4=20$ ), μεταμοσχεύσεων( $n_4=3$ ), ορθοπεδικών κλινικών( $n_4=6$ ), χειρουργικών( $n_4=9$ ), παθολογικών ( $n_4=2$ ) και παιδιατρικών κλινικών( $n_4=3$ ).

Τα στελέχη του είδους *A. baumannii* ήταν ανθεκτικά (R) κι ενδιάμεσης ευαισθησίας (I) στις καρβαπενέμες και συγκεκριμένα ανθεκτικά στις ιμιπενέμες και ενδιάμεσης ευαισθησίας στις μεροπενέμες ( MIC breakpoint σε mg/L για την μεροπενέμη, ιμιπενέμη R>8 I=4-8 και S≤ 2 σύμφωνα με τα κριτήρια του CLSI 2009).

## **Εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR για την ανίχνευση των υπό μελέτη γονιδίων.**

### **Εξαγωγή DNA (DNA extraction)**

Πριν από κάθε διεξαγωγή της PCR προηγείται πάντα εξαγωγή DNA. Η απομόνωση του γενωμικού DNA έγινε από βακτηριακές καλλιέργειες με την χρήση του kit της Qiagen (**QIAGEN DNA Mini Kit**).

### ***bla<sub>NDM-1</sub>***

Στα στελέχη *K. pneumoniae* και *E. coli* αναζητήθηκε το γονίδιο *bla<sub>NDM-1</sub>*. Στην δική μας μελέτη εξετάσαμε τα 35 κλινικά στελέχη των *K. pneumoniae* και *E. coli* χρησιμοποιώντας την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)-PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *bla<sub>NDM-1</sub>*.

Ο τελικός όγκος για κάθε αντίδραση ήταν 50 μl που περιείχε 5 μl μικροβιακού DNA και 45 μl μείγματος αντιδραστηρίων. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ανά εξεταζόμενο δείγμα ήταν του οίκου Invitrogen. Inc, Carlsbad, CA, USA και αυτά ήταν: ένζυμο DNA πολυμεράση (Taq DNA polymerase), τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια dNTPs, 10XPCR ρυθμιστικό διάλυμα, MgCl<sub>2</sub> 50 mM και τα ζεύγη των εκκινητών.

Στον πίνακα 3 φαίνονται οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων στο διάλυμα αντίδρασης της PCR, ενώ στον πίνακα 4 φαίνονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι συνθήκες της αντίδρασης.

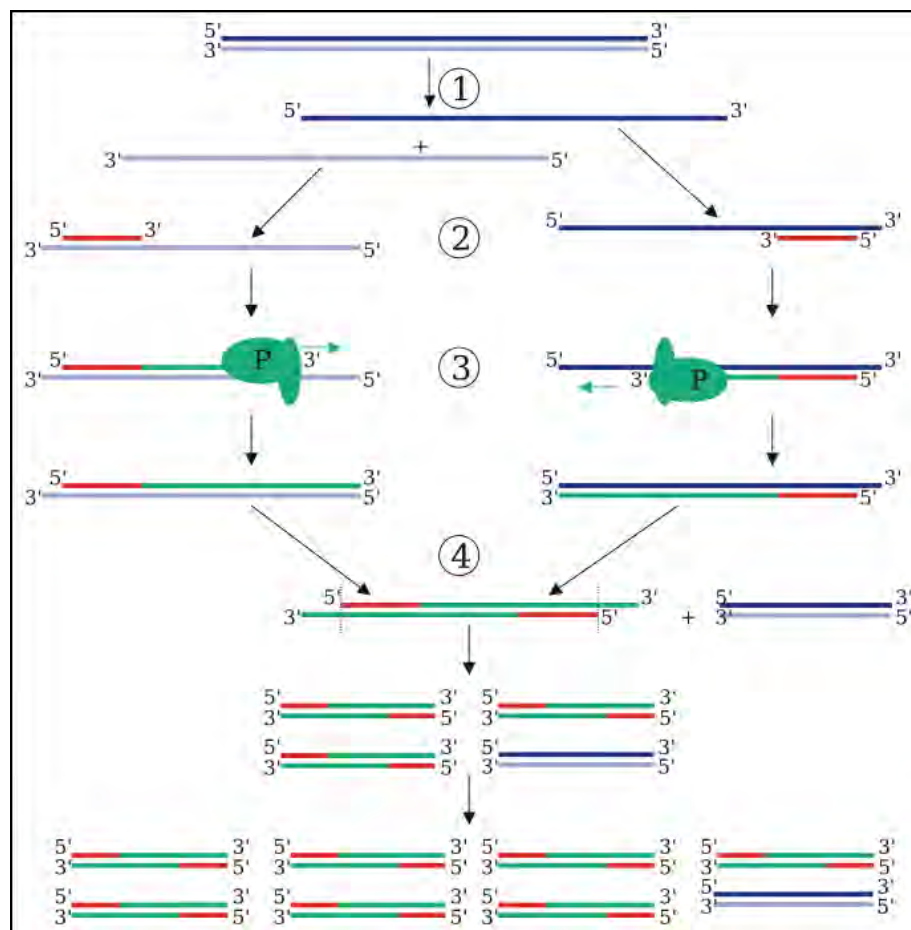
**Πίνακας 3 Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων στο διάλυμα αντίδρασης της PCR για *K. pneumoniae* και *E. coli***

<b>Σύσταση διαλύματος PCR (Master mix)</b>	<b>Ποσότητα (μl)</b>
H <sub>2</sub> O	36.35
10XPCR Buffer	5
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1.5
dNTPs 10 mM	1.25
Εκκινητής 1 (forward) 100 pmol/μl	0.2
Εκκινητής 2 (reverse) 100 pmol/μl	0.2
Taq DNA Polymerase U/μl	0.5

**Πίνακας 4 Αλληλουχίες των εκκινητών για *K. pneumoniae* και *E. coli***

<b>Primer</b>	<b>Sequence 5'→3'</b>	<b>Target</b>	<b>Μέγεθος Προϊόντος PCR (bp)</b>	<b>Συνθήκες PCR</b>
<b>NDM-1 F</b>	<b>GGT TTG GCG ATC TGG TTT TC</b>	<b>bla<sub>NDM-1</sub></b>	<b>621</b>	<b>95<sup>0</sup> C 15 min, [94<sup>0</sup> C 1min, 55<sup>0</sup> C 1min, 72<sup>0</sup> C 1min] x 35, 72<sup>0</sup> C 10min</b>
<b>NDM-1 R</b>	<b>CGG AAT GGC TCA TCA CGA TC</b>	<b>bla<sub>NDM-1</sub></b>	<b>621</b>	

Η ενίσχυση του γενετικού υλικού έγινε σε θερμοκυκλοποιητή Mini Cycler της MJ Research στις κάτωθι συνθήκες: Αρχική αποδιάταξη του DNA στους 95<sup>0</sup> C για 15'. Η PCR διεξαγόταν σε 35 κύκλους που ο καθένας περιελάμβανε αποδιάταξη (denaturation) στους 94<sup>0</sup> C για 1', πρόσδεση (annealing) των εκκινητών σε κατάλληλη θέση του γονιδίου στους 55<sup>0</sup> C για 1' και σύνθεση (extension) νέων αλυσίδων DNA στους 72<sup>0</sup> C για 1'. Η τελική φάση (elongation) μετά την ολοκλήρωση των 35 κύκλων, στους 72<sup>0</sup> C διαρκούσε 10' (εικ.13).



**Εικόνα 13.** Σχηματική απεικόνιση του κύκλου της PCR (1) Αποδιάταξη στους 94°C. (2) Υβριδισμός στους 55°C. (3) Επιμήκυνση στους 72°C (P=Polymerase=Πολυμεράση). (4) Ο πρώτος κύκλος έχει ολοκληρωθεί. Οι δύο νέοι κλώνοι θα αποτελέσουν το εκμαγείο για τον επόμενο κύκλο, διπλασιάζοντας έτσι την ποσότητα του DNA που αντιγράφεται σε κάθε νέο κύκλο.

### ***bla<sub>OXA-23</sub>/bla<sub>OXA-24</sub>/bla<sub>OXA-58</sub>***

Στα στελέχη *A. baumannii* αναζητήθηκαν τα γονίδια τύπου *bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-24</sub>* και *bla<sub>OXA-58</sub>*. Κύριος στόχος ήταν να αναζητηθούν τα γονίδια *bla<sub>OXA-23</sub>* ή *bla<sub>OXA-24</sub>*, που είναι συχνά σε μεσογειακές χώρες, όπως Ιταλία και Ισπανία, ενώ στη χώρα μας δεν έχουν ανευρεθεί (συναντάται μόνο το γονίδιο *bla<sub>OXA-58</sub>*).

Στην δική μας μελέτη εξετάσαμε τα 43 κλινικά στελέχη του είδους *A. baumannii* χρησιμοποιώντας την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)-PCR για την ενίσχυση των γονιδίων *bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-24</sub>* και *bla<sub>OXA-58</sub>*. Ο τελικός όγκος για κάθε αντίδραση ήταν 50 μl που περιείχε 5 μl μικροβιακού DNA και 45 μl μείγματος αντιδραστικών. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν

ανά εξεταζόμενο δείγμα ήταν του οίκου Invitrogen. Inc, Carlsbad, CA, USA και αυτά ήταν: ένζυμο DNA πολυμεράση (Taq DNA polymerase), τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια dNTPs, 10XPCR ρυθμιστικό διάλυμα, MgCl<sub>2</sub> 50 mM και τα ζεύγη των εκκινητών

Στον πίνακα 5 φαίνονται οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων στο διάλυμα αντίδρασης της PCR, ενώ στον πίνακα 6 φαίνονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι συνθήκες της αντίδρασης.

**Πίνακας 5 Συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων στο διάλυμα αντίδρασης της PCR για *A. baumannii***

<b>Σύσταση διαλύματος PCR (Master mix)</b>	<b>Ποσότητα (μl)</b>
H <sub>2</sub> O	36.35
10XPCR Buffer	5
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1.5
dNTPs 10 mM	1.25
Εκκινητής 1 (forward) 100 pmol/μl	0.2
Εκκινητής 2 (reverse) 100 pmol/μl	0.2
Taq DNA Polymerase U/μl	0.5



**Πίνακας 6 Αλληλουχίες των εκκινητών για *A. baumannii***

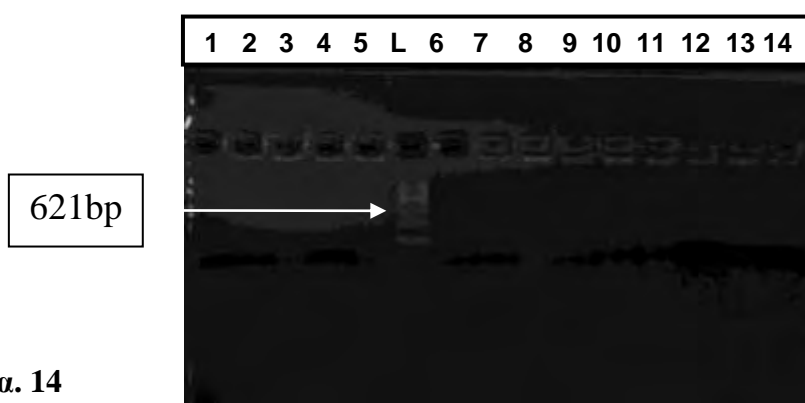
Primers	Sequence 5'→3'	Target	Μέγεθος Προϊόντος PCR (bp)	Συνθήκες PCR
<b>OXA-23-like F</b>	<b>GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA</b>	<i>blaOXA-23</i>	<b>501</b>	<b>95<sup>0</sup> C 2 min,</b> <b>[95<sup>0</sup> C 20 sec</b> <b>51<sup>0</sup> C 20 sec,</b> <b>72<sup>0</sup> C 1min] x</b> <b>30,</b> <b>72<sup>0</sup> C 5min</b>
<b>OXA-23-like R</b>	<b>ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT</b>	<i>blaOXA-23</i>	<b>501</b>	
<b>OXA-24-like F</b>	<b>GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA</b>	<i>blaOXA-24</i>	<b>246</b>	
<b>OXA-24-like R</b>	<b>AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT</b>	<i>blaOXA-24</i>	<b>246</b>	
<b>OXA-58 F</b>	<b>CGA TCA GAA TGT TCA AGC GC</b>	<i>blaOXA-58</i>	<b>599</b>	
<b>OXA-58 R</b>	<b>ACG ATT CTC CCC TCT GCG C</b>	<i>blaOXA-58</i>	<b>599</b>	

Η ενίσχυση του γενετικού υλικού έγινε σε θερμοκυκλοποιητή Mini Cycler της MJ Research. Η PCR διεξαγόταν σε 30 κύκλους που ο καθένας περιελάμβανε αποδιάταξη (denaturation) στους 95<sup>0</sup> C για 20'', πρόσδεση (annealing) των εκκινητών σε κατάλληλη θέση του γονιδίου στους 51<sup>0</sup> C για 20'' και σύνθεση (extension) νέων αλυσίδων DNA στους 72<sup>0</sup> C για 1'. Η τελική φάση (elongation) μετά την ολοκλήρωση των 30 κύκλων, στους 72<sup>0</sup> C διαρκούσε 5'.

Τέλος, τα προϊόντα της PCR χρησιμοποιήθηκαν κατευθείαν για ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 2%.

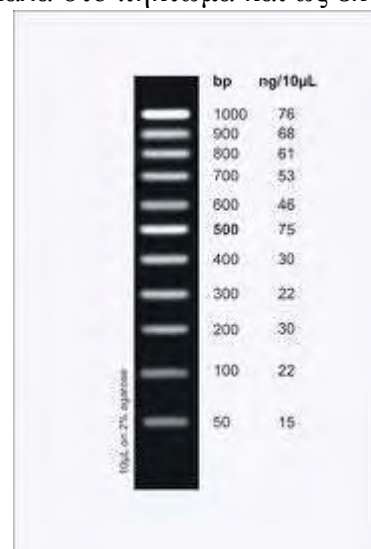
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.

Στην μελέτη μας από τα 35 κλινικά στελέχη των *K. pneumoniae* και *E. coli* που ερευνήθηκαν για την παρουσία των γονιδίων *bla<sub>NDM-1</sub>* διαπιστώθηκε ότι κανένα (n=0) δεν έφερε το γονίδιο *bla<sub>NDM-1</sub>*. Στην εικόνα 14 φαίνονται ενδεικτικά ηλεκτροφορητικά αποτύπωμα στελεχών των *K. pneumoniae*. Όπου 1-14 είναι στελέχη των *K. pneumoniae*, L είναι το DNA Ladder (1kb) κι ως αρνητικό μάρτυρα χρησιμοποιήσαμε νερό, θετικός δεν υπήρχε διαθέσιμος.



Εικόνα. 14

Το DNA ladder περιέχει συνήθως μια σειρά από γνωστά τμήματα DNA με διαφορετικά μεγέθη στα ζεύγη βάσεων (bp) ή κιλό βάσεις (KB). Αυτά τα τμήματα DNA διαχωρίζονται και τελικά απεικονίζονται ως ζώνες DNA σε πήκτωμα(gel). Αυτές οι ζώνες του DNA, η μία δίπλα στην άλλη μοιάζουν με μια σκάλα στο πήκτωμα και ως εκ τούτου καλείται σκάλα του DNA(DNA ladder). Το DNA Ladder (στη δική μας μελέτη 1kb, εικ.15) χρησιμοποιείται για να καθορίσει το μέγεθος και την ποσότητα των τμημάτων του DNA που ερευνάται με την PCR.



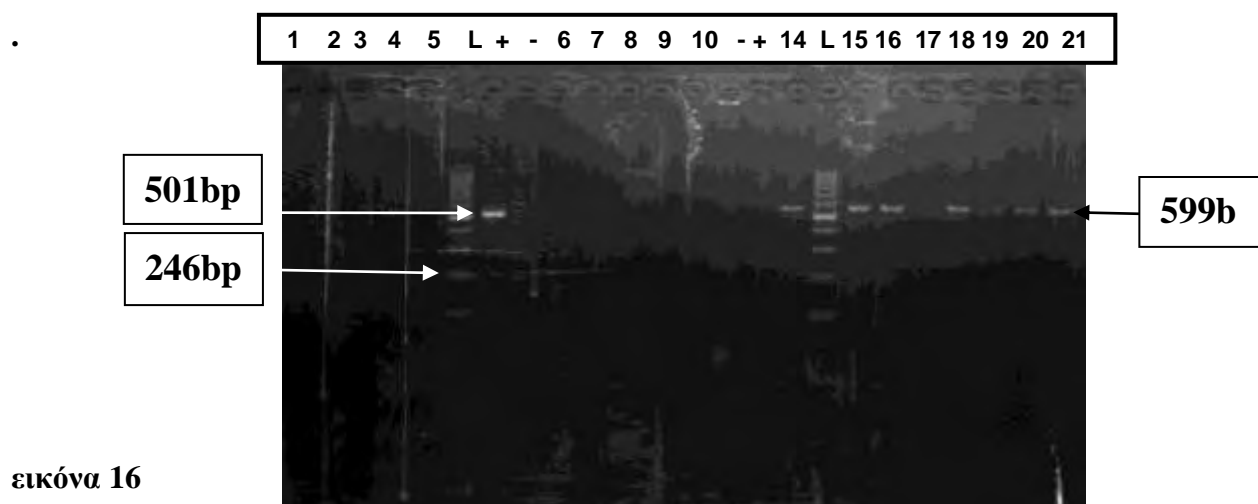
Εικόνα 15 DNA ladder

Μετά την ηλεκτροφόρηση, το μέγεθος και η ποσότητα των τμημάτων του DNA που μελετάμε μπορεί να προσδιοριστεί συγκρινόμενα με το μέγεθος και την ποσότητα των ζωνών του DNA στο DNA ladder. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη ήταν οι NDM-F (5'-GGTTTGGCGATCTGGTTTTC) και NDM-R (5'-CGGAATGGCTCATCACGATC-3), οι οποίοι ενισχύουν ένα εσωτερικό τμήμα των 621 bp του *bla<sub>NDM-1</sub>* γονιδίου. Άρα το μέγεθος της ζώνης που αναμένουμε για το *bla<sub>NDM-1</sub>* γονίδιο είναι 621bp. Κανένα στέλεχος που μελετήσαμε δεν έδωσε ζώνη του αυτού μεγέθους. Προφανώς είτε φέρουν γονίδια των υπόλοιπων μέταλλο-β-λακταμασών ή κάποια από τις άλλες καρβαπενεμάσες. Τα αποτελέσματα ταξινομήθηκαν στον πίνακα 7.

**Πίνακας 7 Αποτελέσματα PCR για *K. pneumoniae* και *E. coli***

<b>NDM-1 type</b>	<b>Αρ.δειγμάτων (n=35)</b>
<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	<b>0</b>

Από τα 43 κλινικά στελέχη του είδους *A. baumannii* που ερευνήθηκαν για την παρουσία των γονιδίων *bla<sub>OXA-23</sub>* και *bla<sub>OXA-24</sub>* διαπιστώθηκε ότι κανένα στέλεχος δεν βρέθηκε να φέρει είτε το *bla<sub>OXA-23</sub>* είτε το *bla<sub>OXA-24</sub>* κι από αυτά, 20 στελέχη που ερευνήθηκαν για το *bla<sub>OXA-58</sub>* διαπιστώθηκε ότι τα 15 έφεραν το γονίδιο *bla<sub>OXA-58</sub>*. Στην εικόνα 16 φαίνονται επίσης ενδεικτικά ηλεκτροφορητικά αποτύπωματα στελεχών του *A. baumannii*.



Όπου 1-21 είναι στελέχη του *A. baumannii* (1-5 για *bla*<sub>OXA-23</sub>, 6-10 για *bla*<sub>OXA-24</sub> και 14-21 για *bla*<sub>OXA-58</sub>) L είναι το DNA Ladder και (+) και (-) θετικός κι αρνητικός μάρτυρας αντίστοιχα. Ως θετικό μάρτυρα χρησιμοποιήσαμε στελέχη που έφεραν τα γονίδια *bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub> και *bla*<sub>OXA-58</sub> κι ως αρνητικό νερό. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη ήταν οι OXA-23-like F (5'-GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA-3') και OXA-23-like R (5'- ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT-3') οι οποίοι ενισχύουν ένα εσωτερικό τμήμα των 501 bp του *bla*<sub>OXA-23</sub> γονιδίου, οι OXA-24-like F(5'-GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA-3') και OXA-24-like R (5'- AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT-3') οι οποίοι ενισχύουν ένα εσωτερικό τμήμα των 246 bp του *bla*<sub>OXA-24</sub> γονιδίου και οι OXA-58 F(5'-CGA TCA GAA TGT TCA AGC GC-3') και OXA-58 R(5'-ACG ATT CTC CCC TCT GCG C-3') οι οποίοι με τη σειρά τους ενισχύουν ένα εσωτερικό τμήμα των 599 bp του *bla*<sub>OXA-58</sub> γονιδίου.

Άρα το μέγεθος της ζώνης που αναμένουμε για το *bla*<sub>OXA-23</sub> γονίδιο είναι 501bp, για το *bla*<sub>OXA-24</sub> γονίδιο είναι 246bp και για το *bla*<sub>OXA-58</sub> είναι 599 bp. Κανένα στέλεχος που μελετήσαμε δεν έδωσε ζώνη του αυτού μεγέθους για το *bla*<sub>OXA-23</sub> και *bla*<sub>OXA-24</sub>, σε αντίθεση με το *bla*<sub>OXA-58</sub>, που όπως φαίνεται και στην εικόνα 16 με τα ηλεκτροφορητικά αποτυπώματα (βέλη), υπήρχαν θετικά στελέχη. Στην εικόνα φαίνεται και θετικός μάρτυρας για *bla*<sub>OXA-23</sub>. Τα υπόλοιπα έφεραν προφανώς κάποια από τις υπόλοιπες oxacillinases ή καρβαπενεμάσες. Τα αποτελέσματα ταξινομήθηκαν στους πίνακες 8 και 9.

**Πίνακας 8 Αποτελέσματα PCR για *A. baumannii* (*bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub>)**

OXA type	Αρ.δειγμάτων (n=43)
<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	0
<i>bla</i> <sub>OXA-24</sub>	0

**Πίνακας 9 Αποτελέσματα PCR για *A. baumannii*(*bla*<sub>OXA-58</sub>)**

OXA type	Αρ.δειγμάτων (n=20)
<i>bla</i> <sub>OXA-58</sub>	15

## 7. Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας και στις δύο περιπτώσεις συμφωνούν με τα επιδημιολογικά δεδομένα για τα συγκεκριμένα γονίδια (*bla<sub>NDM-1</sub>*, *bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-24</sub>* και *bla<sub>OXA-58</sub>*) στον ελληνικό χώρο. Συγκεκριμένα το γονίδιο *bla<sub>NDM-1</sub>*, ενώ έχει βρεθεί όπως έχουμε ήδη πει σε Ηνωμένο Βασίλειο, ΗΠΑ, Αυστραλία και Καναδά δεν έχει ανακαλυφθεί ακόμη στην Ελλάδα. Το ίδιο ισχύει και για τα γονίδια *bla<sub>OXA-23</sub>* ή *bla<sub>OXA-24</sub>*, που ενώ είναι συχνά σε μεσογειακές χώρες, όπως Ιταλία και Ισπανία, στη χώρα μας δεν έχουν ανευρεθεί ακόμη (συναντάται μόνο το γονίδιο *bla<sub>OXA-58</sub>*).

Συνοψίζοντας, θα λέγαμε ότι πάντα υπάρχει η πιθανότητα τα γονίδια αυτά να εμφανιστούν κάποια στιγμή στα ελληνικά νοσοκομεία. Ο χρόνος επώασης ενός μικροβίου είναι μικρότερος από οποιοδήποτε ταξίδι, συνεπώς δεν μπορεί κανείς να αποκλείσει το ενδεχόμενο να έρθουν και στη χώρα μας. Ο κίνδυνος αυξάνεται και λόγω του μεγάλου αριθμού των μεταναστών από τις περιοχές όπου τα γονίδια αυτά συναντώνται και οι οποίοι όταν νοσήσουν, νοσηλεύονται σε νοσοκομεία εδώ, αλλά και από το γεγονός ότι κάποιοι Έλληνες ασθενείς, νοσηλεύονται κατά καιρούς σε νοσοκομεία του εξωτερικού για διάφορες επεμβάσεις (μεταμοσχεύσεις, πλαστικές). Γι' αυτό και τα Μικροβιολογικά Εργαστήρια των ελληνικών νοσοκομείων θα πρέπει να είναι σε ετοιμότητα και οι κλινικοί ιατροί δεν θα πρέπει να κάνουν αλόγιστη χρήση των αντιβιοτικών.

## 8. Βιβλιογραφία

### Ελληνική.

- Αρσένη Αντιγόνη. "Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων", Ιατρικές Εκδόσεις Ζήτα, Αθήνα 1994, τόμος 1, σελ. 223-227

- **Μαρσέλος Μ. και Μάλαμας Μ.** " *Ιατρική Φαρμακολογία* ", Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιατρική Σχολή, Ιωάννινα 1998, τόμος 2, σελ. 254-255
- **Παπαπαρασκευάς Ιωσήφ.** " *Αρχές PCR και υβριδισμού* ", Εφαρμοσμένη Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διαγνωστική, τόμος 14, τεύχος 2, Απρ.-Ιουν. 2009, σελ. 65-75
- **Παπαπαρασκευάς Ιωσήφ.** " *Εντεροβακτηριακά* ", Εφαρμοσμένη Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διαγνωστική, τόμος 11, τεύχος 2, Απρ.-Ιουν. 2007, σελ. 95-100
- " *Εθνικό Συνταγολόγιο και Συμπλήρωμα* ". Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων, Αθήνα 1996, σελ. 233-234 και 259-260

## Ξένη.

- **Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM.** " *Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D  $\beta$ -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii** ". **Antimicrob Agents Chemother**, Vol. 45, No. 2. Feb 2001, p. 583–588
- **Bergogne-Bérézin E, Towner KJ.** " *Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological feature* " **Clin. Microbiol. Reviews**, Vol. 9, No. 2, Apr. 1996, p. 148–165
- **Bonnet R, Marchandin H, Chanal C et al.** " *Chromosome-encoded class D  $\beta$ -lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis** ". **Antimicrob Agents Chemother**. Vol. 46, No. 6, June 2002, p. 2004–6.
- **Bou G, Cerveró G, Angeles Domínguez M et al.** " *Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of  $\beta$ -lactamases* ". **J Clin Microbiol.** . Vol. 38, No. 9, Sept. 2000, p. 3299–3305.
- **Bou G, Oliver A, Martínez-Beltrán J.** " *OXA-24, a novel class D  $\beta$ -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain* ". **Antimicrob Agents Chemother**, Vol. 44, No. 6, Jun 2000, p. 1556–1561.

- **Bradford PA.** *"Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat."* **Clin Microbiol Rev.** Vol. 14, No. 4, Oct. 2001, p. 933-951
- **Brown Susan and Sebastian Amyes.** *"OXA  $\beta$ -lactamases in Acinetobacter: the story so far"*, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Vol. 57, Iss. 1. Jan. 2006, p. 1–3
- **Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA.** *"A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure."* **Antimicrob Agents Chemother** Vol. 39, No. 6, June 1995, p. 1211-33
- **Coelho Juliana, Woodford Neil, Afzal-Shah Mariya and Livermore David** *"Occurrence of OXA-58-Like Carbapenemases in Acinetobacter spp. Collected over 10 Years in Three Continents"*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Vol. 50, No. 2, Feb. 2006, p. 756-758.
- **Dalla-Costa LM, Coelho JM, Souza HA et al.** *" Outbreak of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil"*. **J Clin Microbiol**, Vol. 40, No. 7, Jul 2003, p. 3403–3406.
- **De Champs C, Poirel L, Bonnet R et al.** *"Prospective study of  $\beta$ -lactamases produced by ceftazidime-resistant Pseudomonas aeruginosa isolated in a French hospital in 2000"*. **Antimicrob Agents Chemother** Vol. 46, No.9, Sep. 2002, p. 3031–3034.
- **Heritier C, Dubouix A, Poirel L et al.** *"A nosocomial outbreak of Acinetobacter baumannii isolates expressing the carbapenem-hydrolysing oxacillinase OXA-58"*. **J Antimicrob Chemother.** Vol. 55, No. 1, Jan. 2005, p. 115–118.
- **Héritier C, Poirel L, Aubert D et al.** *" Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of Acinetobacter baumannii"*. **Antimicrob Agents Chemother**, Vol. 47, No. 1, Jan. 2003, p. 268–273.
- **Héritier C, Poirel L, Fournier PE et al.** *"Characterization of the naturally occurring oxacillinase of Acinetobacter baumannii"*. **Antimicrob Agents Chemother.** Vol. 49, No. 10, Oct. 2005, p. 4174–4179.
- **Héritier C, Poirel L, Nordmann P.** *" Genetic and biochemical characterization of a chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing Ambler class D  $\beta$ -lactamase*

from *Shewanella algae*". **Antimicrob Agents Chemother**. Vol. 48, No. 5, May 2004, p. 1670–1675

- **Hsueh PR, Teng LJ, Chen CY et al.** "Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in a university hospital", **Emerg Infect Dis** Vol. 8, Iss. 8 Aug 2002, p. 827–832..
- **Kim JY, Jung HI, An YJ et al.** "Structural basis for the extended substrate spectrum of CMY-10, a plasmid-encoded class C beta-lactamase". **Mol Microbiol**. Vol. 60, Iss. 4, May 2006, p. 907–916.
- **Lopez-Otsoa F, Gallego L, Towner KJ et al.** "Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital in Northern Spain". **J Clin Microbiol**, Vol. 40, No. 12, Dec. 2002, p. 4741–4743.
- **Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M et al.** "Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues". **Clin. Microbiol. Infect.** Vol. 16, Iss. 2, Feb. 2010, p. 112–122.
- **Naas T, Sougakoff W, Casetta A et al.** "Molecular characterization of OXA-20, a novel class D  $\beta$ -lactamase, and its integron from *Pseudomonas aeruginosa*". **Antimicrob Agents Chemother** , Vol. 42, No. 8, Aug 1998, p. 2074–2083.
- **Poirel L, Héritier C, Nordmann P.** "Chromosome-encoded Ambler class D  $\beta$ -lactamase of *Shewanella oneidensis* as a progenitor of carbapenem-hydrolyzing oxacillinase". **Antimicrob Agents Chemother**. Vol. 48, No. 1, Jan. 2004, p. 348–351.
- **Poirel L, Lebessi E, Heritier C, Patsoura A., Foustoukou M and Nordmann P** "Nosocomial spread of OXA-58-positive carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a paediatric hospital in Greece". **Clinical Microbiology and Infection**, Vol. 12, No. 11, Nov. 2006, p. 1138-1141
- **Poirel L, Marqué S, Héritier C et al.** "OXA-58, a novel class D  $\beta$ -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*". **Antimicrob Agents Chemother.** J Vol. 49, No. 1, Jan. 2005, P. 202–208.



- **Ploy MC, Denis F, Courvalin P et al.** " *Molecular characterization of integrons in Acinetobacter baumannii: description of a hybrid class 2 integron*". **Antimicrob Agents Chemother**, Vol. 42, No. 10, Oct. 2000, p. 2684–2688.
- **Pournaras S, Markogiannakis A, Ikonomidis A, Kondyli L, Bethimouti K, Maniatis A. N, Legakis N. J and Tsakris A** " *Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant Acinetobacter baumannii isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit*". **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Vol. 57, Iss. 3, Jan. 2006, p. 557-561
- **Queenan AM, Bush K.** "Carbapenemases: the versatile beta-lactamases". **Clin. Microbiol. Rev.** Vol. 20, No. 3, July 2007, p. 440–458.
- **Ribera A, Vila J, Fernández-Cuenca F et al.** " *Type 1 integrons in epidemiologically unrelated Acinetobacter baumannii isolates collected at Spanish hospitals*". **Antimicrob Agents Chemother**, Vol. 48, No. 1, Jan. 2004, p. 364–365.
- **Rolain J. M. Parola P. Cornaglia G.** "New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemic?". **Clin. Microb. Infect.** Vol. 16, Iss. 12, p. 1699-1701
- **Sanschagrin F, Couture F, Levesque RC.** " *Primary structure of OXA-3 and phylogeny of oxacillin-hydrolyzing class D  $\beta$ -lactamases*". **Antimicrob Agents Chemother**. Vol. 39, No. 4, Apr. 1995, p. 887–93.
- **Santillana et al.** "Crystal structure of the carbapenemase OXA-24 reveals insights into the mechanism of carbapenem hydrolysis". **PNAS**, Vol. 104, No.13, March 2007, p. 5354–5359.
- **Scaife Donald HM, W, Amyes SGB et al.** "Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA  $\beta$ -lactamase, responsible for imipenem resistance in Acinetobacter baumannii 6B92" **Antimicrob Agents Chemother**, Vol. 44, No. 1, Jan 2000, p.196–199
- **Scaife W, Young HK, Paton RH et al.** " *Transferable imipenem-resistance in Acinetobacter species from a clinical source*". **J Antimicrob Chemother**, Vol. 36, Iss. 3, 1995, p. 585–587.

- **Urban C, Go E, Mariano M et al.** *"Effect of sulbactam on infections caused by imipenem-resistant Acinetobacter calcoaceticus biotype anitratus"*, **J.Infect.Dis**, Vol. 167, Iss. 2, Feb. 1993, p. 448–451
- **Vila J, Navia M, Ruiz J et al.** *"Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA-derived  $\beta$ -lactamase in Acinetobacter baumannii"*. **Antimicrob. Agents Chemother** Dec. 1997, Vol. 41, No.12, p. 2757-2759
- **Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR.** *"Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla<sub>NDM-1</sub> and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in Klebsiella pneumoniae sequence type 14 from India"*. **Antimicrob Agents Chemother** Vol. 53, No. 12, Dec. 2009, p. 5046–5054.
- **Yu YS, Yang Q, Xu XW.** *" Typing and characterization of carbapenem-resistant Acinetobacter calcoaceticus–baumannii complex in a Chinese hospital"*. **J Med Microbiol** Vol. 53, No. 7, Jul. 2004, p. 653–656.
- **Zarilli R, Crispino M, Bagattini M et al.** *" Molecular epidemiology of sequential outbreaks of Acinetobacter baumannii in an intensive care unit shows the emergence of carbapenem resistance"*. **J Clin Microbiol**, Vol. 42, No. 3. Mar. 2004, p. 946–953.
- <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5924a5.htm> όπως αναρτήθηκε στις 19/09/2011
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Carbapenem> όπως αναρτήθηκε στις 19/09/2011
- [http://en.wikipedia.org/wiki/New\\_Delhi\\_metallo-beta-lactamase](http://en.wikipedia.org/wiki/New_Delhi_metallo-beta-lactamase) όπως αναρτήθηκε στις 19/09/2011
- [http://en.wikipedia.org/wiki/Beta-lactam\\_antibiotic](http://en.wikipedia.org/wiki/Beta-lactam_antibiotic) όπως αναρτήθηκε στις 19/09/2011