



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΤΟΜΕΑΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθύντρια: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ευθυμία ΠΕΤΕΙΝΑΚΗ

Διδακτορική Διατριβή

**" ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΗΣ ΕΠΙΔΗΜΙΚΗΣ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΤΩΝ
ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *ACINETOBACTER*
BAUMANNII ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΑ, ΜΕ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ "**

υπό

ΓΩΓΟΥ Η. ΒΑΣΙΛΙΚΗ

Ειδικευόμενης Ιατρικής Βιοπαθολογίας - 2012

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση του
Διδακτορικού Διπλώματος
Λάρισα, 2012

© 2012 Γώγου Βασιλική

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμών του συγγραφέα (Ν. 5343/32 άρθρο 202 παράγραφος 2).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (3^η/21-03-2012 ΓΣΕΣ):

- 1^{ος} Εξεταστής** Δρ. Σπυρίδων **Πουρνάρας**
(Επιβλέπων) Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2^{ος} Εξεταστής** Δρ. Αθανάσιος **Τσακρής**
Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- 3^{ος} Εξεταστής** Δρ. Χρήστος **Χατζηχριστοδούλου**
Αναπληρωτής Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 4^{ος} Εξεταστής** Δρ. Ευθυμία **Πετεινάκη**
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 5^{ος} Εξεταστής** Δρ. Παναγιώτης **Μαρκουλάτος**
Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη
Βιοτεχνολογία, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 6^{ος} Εξεταστής** Δρ. Δημήτριος **Κουρέτας**
Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 7^{ος} Εξεταστής** Δρ. Κωνσταντίνος **Σταθόπουλος**
Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Πατρών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Επίκουρο Καθηγητή Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Πουρνάρα Σπύρο. Η συμβολή του στη διεξαγωγή αυτής της έρευνας υπήρξε καθοριστική και πολύτιμη σε όλα τα στάδια. Ευχαριστώ θερμά τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή Μικροβιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Αθανάσιο Τσακρή και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Επιδημιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Χρήστο Χατζηχριστοδούλου που συνέβαλαν ουσιαστικά στο να εκπονήσω την παρούσα διδακτορική διατριβή. Θερμές ευχαριστίες οφείλω και στους κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη, Καθηγητή τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Κουρέτα Δημήτριο, Καθηγητή Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Πετεινάκη Ευθυμία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Σταθόπουλο Κωνσταντίνο Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών που με χαρά δέχθηκαν να συμμετέχουν στην επταμελή επιτροπή. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω σε όλους τους συναδέλφους από όλα τα νοσοκομεία που περιλαμβάνει η μελέτη, οι οποίοι παραχώρησαν τα επιδημικά στελέχη τους για τυποποίηση. Τέλος ευχαριστώ ιδιαίτερα τη συνάδελφο Μαρία Γιαννούλη και τον Καθηγητή του Πανεπιστημίου της Νάπολης Raffaele Zarrilli για την πολύτιμη βοήθειά τους καθώς και τον Διευθυντή του τμήματος της Μικροβιολογίας στο Γενικό Νοσοκομείο της Βέροιας Θώμογλου Βασίλειο για όλη τη συμβολή του στην εκπόνηση της διατριβής κατά τα δύο τελευταία έτη της.

Λάρισα, 2012

Γώγου Βασιλική

Ειδικευόμενη- Ιατρικής Βιοαθολογίας

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΗΣ ΕΠΙΔΗΜΙΚΗΣ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΤΩΝ
ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *ACINETOBACTER*
BAUMANNII ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΑ, ΜΕ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΓΩΓΟΥ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2012

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Δρ. Σπυρίδων Πουρνάρας**, Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας- **(Επιβλέπων)**,
2. **Δρ. Αθανάσιος Τσακρής**, Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών,
3. **Δρ. Χατζηχριστοδούλου Χρήστος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Στην οικογένεια μου.

Περιεχόμενα

Γενικό μέρος Ι.....	9
Ια ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
Ιβ. Μικροβιολογία του γένους <i>Acinetobacter</i>	13
Ιστορική αναδρομή.....	13
Γενικά χαρακτηριστικά.....	13
1.Μορφολογία:.....	13
2.Καλλιέργεια :.....	14
3.Οικολογία:	15
Ιγ. Ταξινόμηση- Φυλογενετικό δέντρο.....	15
Ιδ. Ταυτοποίηση.....	19
1. Αυτοματοποιημένες τεχνικές:.....	19
2. Μοριακές τεχνικές:.....	20
Ιε.Τυποποίηση.....	21
1. Μοριακές τεχνικές:.....	22
Ιστ. Επιδημιολογία.....	28
1. Λοιμογόννοι παράγοντες:.....	38
2. Λοιμώξεις από <i>A. baumannii</i> :.....	41
3. Κλινική έκβαση των λοιμώξεων:.....	43
Ιη. Αντιμικροβιακή θεραπεία και ανάπτυξη αντοχής.....	44
Ειδικό Μέρος ΙΙ	58
Ιια. Σκοπός της μελέτης	59
Ιιβ. Υλικά & μέθοδοι	59
1. Μελέτη ευαισθησίας στελεχών και ταυτοποίησης.....	61
2. PFGE Τυποποίηση των στελεχών.....	61
3.Μοριακή ανίχνευση καρβαπανεμασών.....	65
4.Μοριακή τυποποίηση MLST, 3-LST	66

Σχήμα Erub MLST (Bartual <i>et al.</i>)	66
Σχήμα Health Protection Agency HPA Turton <i>et al.</i>	68
Σχήμα MLST του Ινστιτούτου Pasteur.	70
eBurst.....	71
IIγ. Αποτελέσματα.....	71
1. Ευαισθησία των στελεχών στα αντιβιοτικά.....	71
2. Μοριακή ανίχνευση καρβαπανεμασών.....	72
3. PFGE τυποποίηση	73
4. Τυποποίηση ST-MLST (Σχήματα Turton <i>et al.</i> και ινστιτούτου Pasteur)	75
5. eBurst Report.....	81
6. Συσχέτιση ευαισθησίας με ST τύπο	90
IIδ. Συμπεράσματα – Συζήτηση	91
Περίληψη	100
Summary	102
Βιβλιογραφία	104
Δημοσιευμένη μελέτη	117

Γενικό μέρος Ι

Ια ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα βακτήρια του γένους *Acinetobacter* έχουν ευρεία διασπορά στη φύση και συχνά προκαλούν αποικισμό και λοιμώξεις νοσοκομειακών ασθενών, ιδιαίτερα στις μονάδες εντατικής θεραπείας. Τα στελέχη *Acinetobacter baumannii* είναι το είδος που προκαλεί συχνότερα νοσοκομειακές λοιμώξεις, όπως πνευμονία, λοιμώξεις τραυμάτων και μικροβιαίμιες. Τα στελέχη *A. baumannii* εμπλέκονται συχνά σε νοσοκομειακές επιδημίες και αυτό έχει αποδοθεί στην αυξημένη αντοχή τους στα αντιβιοτικά και την ικανότητά τους να επιβιώνουν σε ανόργανες και ξηρές επιφάνειες. Η αντοχή στις καρβαπενέμες για το *A. baumannii* γίνεται τα τελευταία χρόνια όλο και συχνότερο φαινόμενο σε παγκόσμιο επίπεδο, με την πλειονότητα των στελεχών στις ΜΕΘ να είναι ανθεκτικά σε ιμιπενέμη και μεροπενέμη και συχνά παν-ανθεκτικά. Πιο συγκεκριμένα ονομάζουμε Multidrug resistance στα *A. baumannii* (MDR) την αντοχή σε πάνω από 2 από τις ακόλουθες κατηγορίες αντιβιοτικών: αντι-ψευδομοναδικές καφαλοσπορίνες (κεφταζιδίμη ή κεφεπίμη), αντι-ψευδομοναδικές καρβαπενέμες (ιμιπενέμη, μεροπενέμη), αμπικιλίνη-σουλμπακτάμη, φλουοροκινολόνες (σιπροφλοξασίνη ή λεβοφλοξασίνη), και αμινογλυκοσίδες (γενταμικίνη, τομπραμυκίνη, ή αμικασίνη). Η παναθεκτικότητα Pandrug resistance (PDR) ορίζεται ως η ανθεκτικότητα του μικροβίου σε όλα τα αντιβιοτικά πρώτης γραμμής. Αναλυτικότερα τα στελέχη αυτά θα είναι ανθεκτικά στα β λακταμικά αντιβιοτικά συμπεριλαμβανομένων των καρβαπανεμών και της σουλμπακτάμης, στις κινολόνες, στις αμινογλυκοσίδες καθώς και στην τιγκεκυκλίνη και κολιστίνη. Στη βιβλιογραφία υπάρχει και ο όρος Extensive-Drug Resistance ο οποίος χαρακτηρίζει στελέχη τα οποία είναι ανθεκτικά σε όλα τα αντιβιοτικά εκτός από ένα ή δύο. Ειδικά στον Ελληνικό χώρο, τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *A. baumannii* ήταν σπανιότατα

μέχρι το 1998 (Maniatis *et al* 2003, μελέτη από επτά νοσοκομεία των Αθηνών, όπου δεν βρέθηκε κανένα ανθεκτικό στις καρβαπενέμες στέλεχος *A. baumannii*), ενώ κατά τα τελευταία χρόνια προσεγγίζουν το 70-90%. Αυτό αποκτά ιδιαίτερη σημασία σε αρκετές περιπτώσεις λοιμώξεων από *A. baumannii* όπου οι καρβαπενέμες αποτελούν τη μόνη θεραπευτική επιλογή.

Η μεγάλη αυτή αύξηση της συχνότητας των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *A. baumannii* μπορεί να οφείλεται σε μία σειρά παραγόντων, όπως είναι η χορήγηση μεγάλων ποσοτήτων καρβαπενεμών, η παραμονή των ασθενών στις ΜΕΘ, η νόσηση από ασθένειες που προκαλούν παρατεταμένη ανοσοκαταστολή κλπ. Σε επίπεδο μικροβίου, η αντοχή αυτή μπορεί να έχει προκληθεί μέσω μεταλλάξεων σε διακριτά μεταξύ τους στελέχη, μεταφοράς γονιδίων αντοχής από στέλεχος σε στέλεχος ή διασποράς επιδημικών στελεχών από ασθενή σε ασθενή στον ίδιο ή διαφορετικό θάλαμο, κλινική ή νοσοκομείο. Όταν οι μεταλλάξεις έχουν προκληθεί σε μεμονωμένα μικρόβια και σε μεμονωμένες περιστάσεις, τα ανθεκτικά μικρόβια θα είναι διαφορετικά μεταξύ τους, οπότε και θα υπάρχουν ποικίλοι επιδημικοί κλώνοι. Επίσης, όταν γονίδια αντοχής έχουν μεταφερθεί σε διαφορετικά στελέχη ενός μικροβιακού είδους (μέσω πλασμιδίων, τρανσποζονίων ή βακτηριακής μεταμόρφωσης), προκύπτουν διαφορετικοί επιδημικοί κλώνοι. Αντίθετα, όταν ένα συγκεκριμένο επιδημικό στέλεχος έχει μεταφερθεί σε διαφορετικούς ασθενείς και διαφορετικούς χώρους, προκύπτει ένας επιδημικός κλώνος που μπορεί και να είναι επικρατών σε πληθυσμιακό επίπεδο. Η διερεύνηση της πληθυσμιακής σύστασης των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *A. baumannii* έχει προφανές ενδιαφέρον, αφού θα παρέχει πληροφορίες ικανές να διαφωτίσουν την εξέλιξη του ανησυχητικού αυτού φαινομένου, οι οποίες μπορεί να συμβάλλουν και στον περιορισμό του. Ο σκοπός της μελέτης είναι λοιπόν η διερεύνηση της πληθυσμιακής εξέλιξης των ανθεκτικών στις

καρβαπενέμες στελεχών *A. baumannii* από διάφορες γεωγραφικές περιοχές του Ελληνικού χώρου και θα επιχειρηθεί να ιχνηλατηθεί η προέλευση των επιδημικών κλώνων. Πρέπει να σημειωθεί ότι ενώ σε αρκετές Ευρωπαϊκές χώρες έχουν πραγματοποιηθεί σχετικές μελέτες και έχουν προκύψει αντίστοιχα επιδημιολογικά δεδομένα, από τον Ελληνικό χώρο δεν υπήρχαν μέχρι την παρούσα μελέτη δεδομένα για την προέλευση των (επιδημικών ή όχι) ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *A. baumannii* και αυτό παρά τα αξιοσημείωτα υψηλά ποσοστά αντοχής στη χώρα μας.

Ιβ. Μικροβιολογία του γένους *Acinetobacter*.

Ιστορική αναδρομή.

Η ιστορία του γένους *Acinetobacter* ξεκινά για πρώτη φορά στις αρχές του 20^{ου} αιώνα όταν το 1911 ο Ολλανδός μικροβιολόγος Beijerinck περιγράφει για πρώτη φορά την ύπαρξη ενός καινούριου μικροοργανισμού, τον οποίο ονομάζει *Micrococcus calcoaceticus*.

Τις επόμενες δεκαετίες παρόμοιοι μικροοργανισμοί περιγράφονται, για τους οποίους χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 15 διαφορετικά ονόματα. Από τα πιο γνωστά είναι *Bacterium anitratum* (Schaub *et al.* 1948), *Herellea vaginicola* και *Mima polymorpha* (De Bord 1939), *Achromobacter anitratus* (Brisou, 1953.), *Alcaligenes haemolysans* (Henriksen, 1973), *Moraxella glucidolitica*, *Moraxella lowffii* (Pièchaud *et al.* 1956).

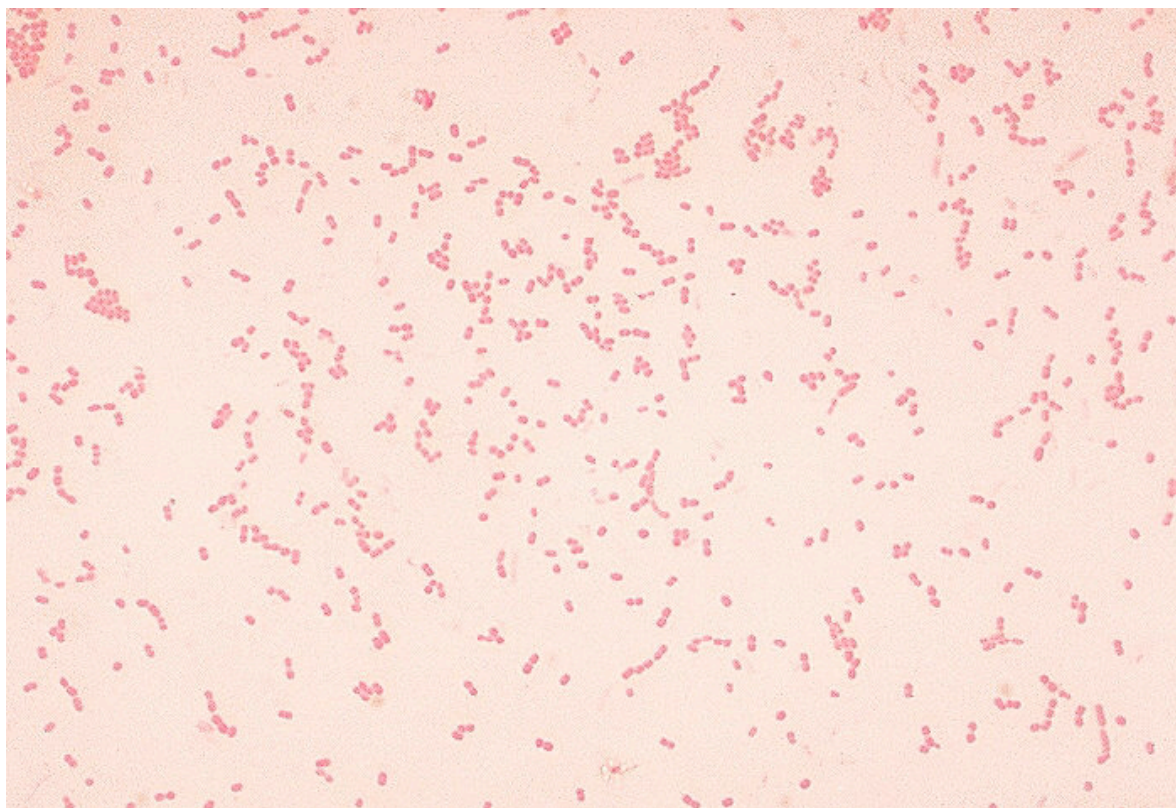
Η παρούσα ονομασία *Acinetobacter*, η οποία προκύπτει από την ελληνική λέξη ακίνητο προτάθηκε για πρώτη φορά το 1954 από τους Brisou and Prévot το 1954 για να ορίσει ένα μη κινητό μικροοργανισμό που κατατασσόταν μέχρι τότε στο *Achromobacter*. Το 1968 ήταν η πρώτη φορά που το *Acinetobacter* κατηγοριοποιείται για πρώτη φορά ως ξεχωριστό γένος από τους Baumann *et al.* 1968. Στο Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (έκδοση 1974) στο γένος *Acinetobacter* προστίθεται το είδος *A. calcoaceticus*. Το 1980 στη λίστα «Approved list of bacterial names» προστίθεται και δεύτερο είδος το *A. lwoffii*.

Γενικά χαρακτηριστικά

1.Μορφολογία:

Τα *Acinetobacter* είναι Gram αρνητικά βακτηρίδια κοντά και παχιά κατά τη φάση του πολλαπλασιασμού και διαιρέσεως αλλά κόκκοι κατά τη φάση της στασιμότητας (κοκκοβακτηρίδια). Διατάσσονται κατά ζεύγη ή κοντές αλυσίδες, είναι καταλάση θετικά, οξειδάση αρνητικά, μη κινητά, άσπορα, χωρίς βλεφαρίδες και αζυμωτικά. Είναι αυστηρά αερόβια και δεν αναπτύσσονται σε συνθήκες μικροαερόφιλες ή αναερόβιες, ενώ αρκετά στελέχη φέρουν έλκτρο. Μια τρομώδης κίνηση που παρατηρείται οφείλεται στην

παρουσία πολικών ινιδίων. Πολλές φορές μπορούν να μιμηθούν μορφολογία Gram-θετικών και Gram-αρνητικών κόκκων και από εκεί προκύπτει η παλαιότερη ονομασία τους (Mimae).



εικόνα 1: *A. baumannii* (Gram χρώση)

2. Καλλιέργεια :

Τα είδη *Acinetobacter* αναπτύσσονται το ίδιο καλά σε στερεά (sheep blood agar) και υγρά (tryptic soy broth) θρεπτικά υλικά μετά από επώαση στους 37 βαθμούς κελσίου. Οι αποικίες τους είναι λείες σπάνια βλεννώδεις, υποκίτρινες έως και γκριζόλευκες. Σε μέγεθος είναι συγκρίσιμες με αυτές των εντεροβακτηριακών ενώ πιο συγκεκριμένα οι αποικίες του συμπλέγματος *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* complex έχουν 1,5 με 3,0 mm διάμετρο μετά από 18h επώαση.

Τα υπόλοιπα είδη *Acinetobacter* συνήθως σχηματίζουν μικρότερες αποικίες σε μέγεθος. Παρόλο που όλα τα εντεροβακτηριακά αναπτύσσονται σε MacConkey Άγαρ υπάρχουν *Acinetobacter* τα οποία μπορεί να μην αναπτύσσονται σε αυτό το υλικό. Το *A. haemolyticus* και κάποια άλλα όχι τόσο καλά μελετημένα στελέχη όπως το *Acinetobacter genomic species 6*, 13BJ, 14BJ, 15BJ, 16, and 17, μπορεί να κάνουν κάποιου βαθμού αιμόλυση στο αιματούχο άγαρ, ιδιότητα που το *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* complex

δεν διαθέτει.

Δυστυχώς δεν υπάρχει κάποιο βιοχημικό τεστ, το οποίο να διαχωρίζει τα *A. baumannii* από τα άλλα αζυμωτικά Gram αρνητικά βακτηρίδια και μόνο η δοκιμασία οξειδάσης, η οποία είναι αρνητική στην περίπτωση του *Acinetobacter* διευκολύνει στην διάκρισή του από την *Pseudomonas spp.* Δεν πρέπει ωστόσο ποτέ να διαλάβει της προσοχής ότι υπάρχουν και είδη *Pseudomonas* με αρνητική οξειδάση.

Τα περισσότερα στελέχη του γένους *Acinetobacter* δεν είναι ικανά να ανάγουν τα νιτρικά άλατα σε νιτρώδη με την κλασική αναγωγική οδό, ενώ για την απομόνωσή τους από τα διάφορα υλικά που προσκομίζονται στο εργαστήριο για καλλιέργεια (βρογχικές εκκρίσεις, τραύματα κ.τ.λ.) χρειάζεται εμπλουτισμός του υλικού με πηγή άνθρακα.

3.Οικολογία:

Μέλη του γένους *Acinetobacter* υπάρχουν παντού στο φυσικό μας περιβάλλον. Βρίσκονται στο χώμα, το νερό, τα φυτά και στα διάφορα φυτικά και ζωικά μας τρόφιμα. Αποτελούν μέρος της χλωρίδας του δέρματος σε ποσοστό που φτάνει το 43% σε υγιή, εξωνοσοκομειακά άτομα, ενώ το ποσοστό αυτό αυξάνει σε νοσηλευόμενους ασθενείς έως και 75% (Seifert *et al.* 1997). Τα χέρια του ιατρικού και παραϊατρικού προσωπικού θεωρούνται φορείς μέσω των οποίων γίνεται η διασπορά του επιδημικού μικροβίου στους ασθενείς. Τέλος αξίζει να αναφερθεί και η απομόνωση του *A.baumannii* από την επιδερμίδα ζώων ως αιτιολογικός παράγοντας λοίμωξης (σκύλου, γάτας και αλόγου). Δεν υπάρχει όμως εμπεριστατωμένη μελέτη που να αφορά την φυσιολογική χλωρίδα του δέρματος των ζώων (Gillespie & Hawkey 2006) Στο νοσοκομείο δεδομένου ότι το υγρό περιβάλλον ευνοεί την ανάπτυξη του, απομονώνεται συχνά από διάφορα νοσηλευτικά και υγειονομικά υγρά. Επίσης το *A.baumannii* έχει απομονωθεί από ενδοτραχειακές συσκευές, αναπνευστήρες, οξύμετρα, λαρυγγοσκόπια, αντλίες έγχυσης, πιεσόμετρα, περιχειρίδες, ακόμα και γάζες, αντισηπτικά διαλύματα και απορρυπαντικά (Bergogne-Berezin & Towner, 1996).

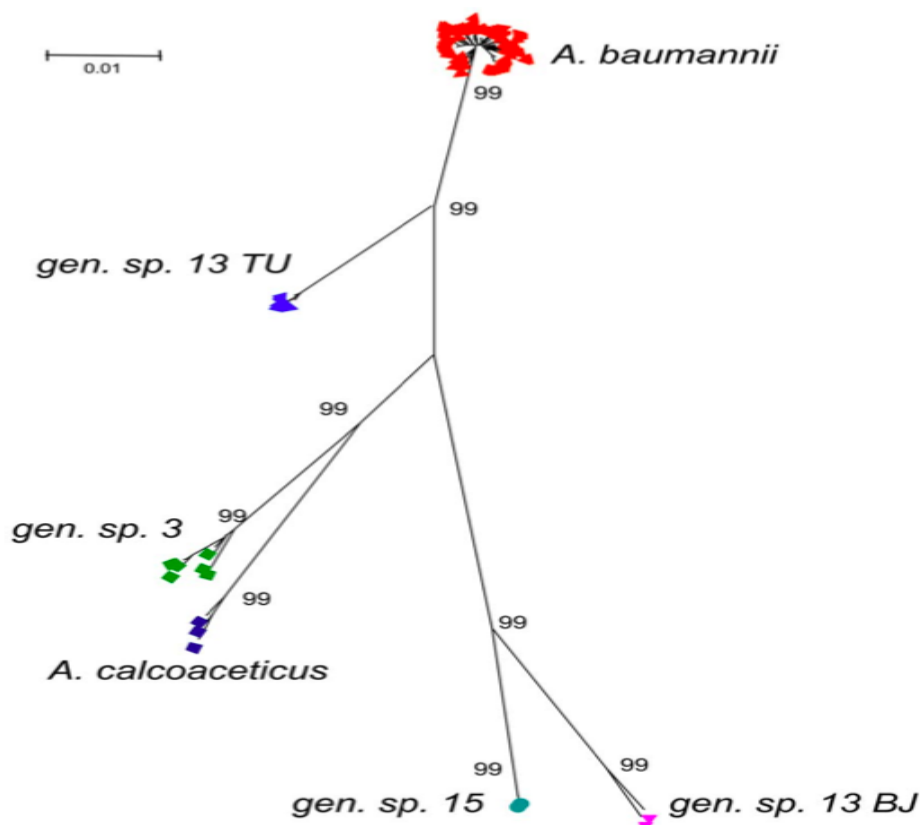
1γ. Ταξινόμηση- Φυλογενετικό δέντρο

Υπήρξε μεγάλη δυσκολία στο διαχωρισμό των ειδών με φαινοτυπικές μεθόδους (Dijkshoorn *et al.* 1993, Gerner-Smidt *et al.* 1991). Συνεπώς προτάθηκε ο μοριακός καθορισμός των ειδών, χαρτογραφώντας το γενετικό υλικό. Ως μικροβιακό είδος ορίζεται το σύνολο των στελεχών με τουλάχιστον 70% DNA-DNA ομολογία και με μέγιστη

διαφορά 5 °C στη θερμοκρασία αποδιάταξης του DNA (T_m) (Wayne *et al.* 1987).

Η μέθοδος διαχωρισμού που έγινε γενικότερα αποδεκτή είναι ο υβριδισμός των νουκλεϊνικών οξέων (DNA-DNA hybridization) (Wayne *et al.* 1987) η οποία και απέδειξε την ετερογένεια του γένους *Acinetobacter* (Johnson *et al.* 1970). Μόνο τα είδη *A. calcoaceticus* και *A. lowffii*, όπως προαναφέραμε είχαν συμπεριληφθεί στον επίσημο κατάλογο των μικροβιακών ονομάτων (*Approved Lists of Bacterial Names*) και μόνο ένα είδος είχε περιγραφεί στο *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* του 1980 (*Approved Lists of Bacterial Names*) (Skerman *et al.* 1980). Στην πρώτη ταξινόμηση που έγινε από Tjernberg και Ursing (1989), και παρά τις μικρές ασυμφωνίες μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων, ταυτοποιήθηκαν 19 DNA-DNA ομόλογες ομάδες (genomic species), εκ των οποίων 7 ονοματίστηκαν με συμβατικά ονόματα (*A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. junii*, *A. johnsonii*, *A. lowffii* και *A. radioresistens*) ενώ τα υπόλοιπα πήραν το όνομά τους από αριθμούς.

Σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 32 γενομικά είδη (genomic species) του *Acinetobacter*, από τα οποία τα 25 έχουν συμβατικά ονόματα, ενώ τα υπόλοιπα χαρακτηρίζονται από αριθμούς. Τέσσερα από τα παραπάνω είδη του πίνακα και συγκεκριμένα το *A. calcoaceticus*, το *A. baumannii*, το *Acinetobacter* genomic species 3 και το *Acinetobacter* genomic species 13TU είναι τόσο όμοια που δεν μπορούν εύκολα να διαχωριστούν με φαινοτυπικές διαδικασίες. Έχει δε προταθεί να αναφερόμαστε ομαδικά σε αυτά τα είδη ως *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* complex (Gerner-Smidt *et al.* 1991). Αξίζει να αναφερθεί ότι αυτό το group είναι υπεύθυνο για την πλειοψηφία των κλινικών εκδηλώσεων που οφείλονται στον συγκεκριμένο μικροοργανισμό.



εικόνα 2: Φυλογενετική ανάλυση 173 στελεχών *Acinetobacter* (Diancourt *et al.* 2010)

Πιο συγκεκριμένα από αυτό το group, το *A. baumannii* είναι το υπεύθυνο παθογόνο για τις περισσότερες λοιμώξεις (Bouvet *et al.*, 1987). Σε ανάλογη μελέτη (Seifert *et al.*, 1993) από τα 584 στελέχη *Acinetobacter* που απομονώθηκαν από 420 ασθενείς σε 12 διαφορετικά νοσοκομεία και σε χρονικό διάστημα 12 μηνών, τα 426 (72,9%) ήταν *A. baumannii*, εκ των οποίων τα 208 απομονώθηκαν από το αναπνευστικό, 113 από τους κεντρικούς φλεβικούς καθετήρες, τα 70 από τραύματα και τα υπόλοιπα 35 από διάφορες άλλες πηγές.

Στον Πίνακα 1 που ακολουθεί, φαίνονται τα κυριότερα είδη *Acinetobacter* με τροποποιήσεις που έχουν προταθεί για τα είδη *Acinetobacter* genomics species 3 και *Acinetobacter* genomic species 13TU:

Πίνακας 1: (Visca *et al.* 2011)

<i>Species</i>	<i>Genomic species</i>	<i>Type of reference strain</i>
<i>A. baumannii</i>	2	ATCC19606 ^T
<i>A. baylyi</i>		DSM14961 ^T
<i>A. beijerinckii</i>		NIPH 838 ^T
<i>A. bereziniae</i>	10	ATCC17924
<i>A. bouvetii</i>		DSM14964 ^T
<i>A. calcoaceticus</i>	1	ATCC23055 ^T
<i>A. gernerii</i>		DSM14967 ^T
<i>A. grimontii</i>		DSM14968 ^T
<i>A. guillouiae</i>	11	ATCC 11171 ^T
<i>A. gyllenbergii</i>		NIPH384 ^T
<i>A. haemolyticus</i>	4	ATCC17906 ^T
<i>A. johnsonii</i>	7	ATCC17909 ^T
<i>A. zunii</i>	5	ATCC17908 ^T
<i>A. lwoffii</i>	8/9	ATCC15309 ^T
<i>A. parvus</i>		NIPH384 ^T
<i>A. radioresistens</i>	12	IAM13186 ^T
<i>A. schindleri</i>		NIPH1034 ^T
<i>A. soli</i>		KCTC 22184 ^T
<i>A. tandoii</i>		DSM14970 ^T
<i>A. tjernbergiae</i>		DSM14971 ^T
<i>A. townneri</i>		DSM14962 ^T
<i>A. ursingii</i>		NIPH137 ^T
<i>A. venetianus</i>		ATCC31012
<i>A. pittii</i> ^a	3	ATCC19004
	6	ATCC17979
<i>A. nosocomialis</i>	13TU	ATCC17903
	13BJ, 14TU	ATCC17905
	14BJ	CCUG14816
	15BJ	SEIP23.78
	15TU	M 151a
	16	ATCC17988
	17	SEIPAc87.314
	Between 1 and 3	10095
	Close to 13TU	10090

(^aΗ ονομασία αυτή έχει προταθεί αλλά δεν έχει επίσημα καταταθεί στην Ταξινόμηση του μικροβίου –Μαίος 2011).

Ιδ. Ταυτοποίηση

1. Αυτοματοποιημένες τεχνικές:

Τα περισσότερα σύγχρονα εργαστήρια χρησιμοποιούν για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών αυτοματοποιημένα συστήματα. Οι αλγόριθμοι και οι βάσεις δεδομένων που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των αποτελεσμάτων στηρίζονται σε πρότυπα μικροβιακά στελέχη με γνωστές βιοχημικές ιδιότητες, υπό βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης. Ένα από τα πιο γνωστά συστήματα είναι το σύστημα VITEK[®] 2 (bioMerieux, Inc., Βόρεια Καρολίνα, ΗΠΑ). Άλλα συστήματα είναι το API 20 NE, το Phoenix και το MicroScan Walkaway system. Παρόλη την ευκολία στη χρήση τους και την αμεσότητα στο αποτέλεσμα (VITEK[®] 2 δίνει αποτέλεσμα σε λιγότερο από 10 h) η ταυτοποίηση του *Acinetobacter* από αυτά τα συστήματα παραμένει προβληματική. Αυτό εξηγείται λόγω της περιορισμένης βάσης δεδομένων των συστημάτων για το συγκεκριμένο μικροοργανισμό και δεύτερον λόγω του ότι το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση του μικροοργανισμού δεν είναι προσαρμοσμένο για τα *Acinetobacters*. Πιο συγκεκριμένα τα τρία στελέχη του *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* complex δεν μπορούν να διαχωριστούν με τα υπάρχοντα συστήματα. Έτσι το *A. baumannii*, το *Acinetobacter* genomic species 3, και το *Acinetobacter* genomic species 13TU ταυτοποιούνται από τα συστήματα αυτά ως *A. baumannii*, γεγονός που τονίζει ακόμα μια φορά τη στενή συγγένεια αυτών των στελεχών. Η ταυτοποίηση αυτών των στελεχών προτείνεται να αναφέρεται ως *A. baumannii* group. Η αναγκαιότητα της διάκρισης των ειδών του *Acinetobacter* έχει αμφισβητηθεί κατά καιρούς. Η σημασία της έγκειται στους εξής δύο λόγους. Όλα τα στελέχη του *Acinetobacter* δεν ευθύνονται στο ίδιο ποσοστό για κλινικές λοιμώξεις. Κύριοι υπεύθυνοι είναι το *A. baumannii* group, οπότε οποιοδήποτε άλλο στέλεχος απομονωθεί αποτελεί επιδημιολογικά κάτι σημαντικό. Για τους ίδιους επιδημιολογικούς λόγους αναφέρουμε ότι τα υπόλοιπα στελέχη *Acinetobacter* συνήθως είναι ευαίσθητα στα συνήθη αντιβιοτικά και μόνο το *A. baumannii* group αποτελεί θεραπευτική πρόκληση λόγω της πολυαντοχής στα αντιβιοτικά.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα ταυτοποίησης του VITEK2 έχει παρατηρηθεί υψηλή επαναληψιμότητα, σε δείγματα εντεροβακτηριακών και Gram αρνητικών στελεχών (Ling *et al.* 2001). Το VITEK2 είναι το σύστημα φαινοτυπικής ταυτοποίησης που χρησιμοποιήθηκε και για την παρούσα μελέτη. Αξίζει λοιπόν να αναφερθούν και οι περιορισμοί αυτού του συστήματος. Συγκεκριμένα το VITEK2 δεν μπορεί να

χρησιμοποιηθεί σε άμεσα κλινικά δείγματα και δείγματα που περιέχουν μικτή χλωρίδα. Επίσης, είδη που έχουν περιγραφεί πρόσφατα ή είναι σπάνια ενδέχεται να μη συμπεριλαμβάνονται στη βάση δεδομένων του συστήματος. Η κάρτα ταυτοποίησης που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση του *Acinetobacter* είναι η κάρτα που χρησιμοποιείται γενικά για τα Gram αρνητικά (GN).

2. Μοριακές τεχνικές:

Μέθοδος αναφοράς για την ακριβή ταυτοποίηση του *A. baumannii* είναι ακόμα και σήμερα ο υβριδισμός των νουκλεϊνικών οξέων (DNA-DNA hybridization) (Wayne *et al.* 1987). Αρχικά, η γενετική ταυτοποίηση του μικροβίου έγινε με πολλαπλασιασμό του γενετικού υλικού με PCR και μελέτη του γονιδίου που κωδικοποιούσε την 16S rRNA περιοχή. Χρησιμοποιούνται ειδικοί εκκινητές για συντηρημένες περιοχές έτσι ώστε να επιτευχθεί υβριδισμός τους ανεξαρτήτως μικροβιακού είδους. Στη συνέχεια γίνεται αλληλουχία του προϊόντος και ταυτοποίηση της αλληλουχίας σύμφωνα με μία βάση δεδομένων. Λόγω του ότι αυτή η περιοχή βρίσκεται υπό μεγάλη εξελικτική πίεση, πολύ συχνά παρατηρούνται διάφορες μεταλλάξεις στις αλληλουχίες.

Ειδικά για την ταυτοποίηση του *A. baumannii* γίνεται η ανίχνευση του γονιδίου *bla_{OXA-51}* που κωδικοποιεί την OXA-51 οξακιλινάση που ανήκει στη κλάση D των β-λακταμασών. Το συγκεκριμένο γονίδιο εδράζεται στο χρωμοσωμικό DNA του *A. baumannii* και η ανίχνευσή του γίνεται με απλή PCR και ειδικούς εκκινητές primers για το συγκεκριμένο γονίδιο (Turton *et al.* 2006). Για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα θεωρείτο ότι η ανίχνευσή του είναι ειδική για τα *A. baumannii* και για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η ανίχνευσή του στα στελέχη της συλλογής της μελέτης αυτής. Ωστόσο στην βιβλιογραφία υπάρχει πρόσφατη αναφορά για μικρό αριθμό στελεχών *Acinetobacter* που φέρουν το γονίδιο *bla_{OXA-51}* και δεν είναι *A. baumannii* (Lee *et al.* 2009). Για τον λόγο αυτό, η ταυτοποίηση των στελεχών της μελέτης μας ως *A. baumannii* επιβεβαιώθηκε με την ταξινόμηση σε ειδικούς για *A. baumannii* κλώνους με την μοριακή επιδημιολογική μέθοδο MLST (ειδικοί για *A. baumannii* ST-τύποι, περιγράφονται παρακάτω).

Μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για ταυτοποίηση των *A. baumannii* είναι η ανάλυση του ενισχυμένου ριβοσωμικού DNA με περιοριστικά ενζύμα (restriction analysis of amplified ribosomal DNA ή ARDRA) (Dijkshoorn *et al.* 1998, Vaneechoutte *et al.* 1995). Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει περιοριστική πέψη του ειδικού προϊόντος PCR για το γονίδιο που κωδικοποιεί το ριβοσωμικό DNA με περιοριστικά ένζυμα και σύγκριση των

προϊόντων της πέψης με ηλεκτροφόρηση. Στην τεχνική αυτή αρχικά χρησιμοποιήθηκαν δέκα διαφορετικά ένζυμα για την ταυτοποίηση 18 ειδών *Acinetobacter* και την ομαδοποίησή τους σε 20 rDNA σύνολα (Vaneechoutte *et al.* 1995). Η όλη διαδικασία εμφάνισε υψηλή επαναληψιμότητα και ειδικότητα. Ωστόσο για τη διάκριση των γενωμικών ειδών 4 (*A. haemolyticus*) και 7 (*A. johnsonii*), 5 (*A. junii*) και 17, 10 και 11 απαιτείται να συμπληρωθεί η τεχνική με τις φαινοτυπικές δοκιμασίες παραγωγής ζελατινάσης, αιμόλυσης, παραγωγής οξέος από γλυκόζη και ανάπτυξης στους 37 °C.

Τέλος, άλλη μία τεχνική ταυτοποίησης των *Acinetobacter* είναι η αλληλούχιση της περιοχής μεταξύ των γονιδίων που κωδικοποιούν για 16S rRNA και 23S rRNA (ITS – Intergenic Spacer) (Chang *et al.* 2005).

1ε.Τυποποίηση

Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για να διευκρινιστεί η κλωνικότητα των μικροβιακών στελεχών και συνεπώς η πιθανή εμπλοκή τους σε μία υπό διερεύνηση επιδημία, ορίζονται ως «*μικροβιακή τυποποίηση*». Με τη συγκεκριμένη ορολογία λοιπόν, προσδιορίζουμε μία ομάδα μικροβιολογικών τεχνικών η οποία μελέτα τη συγγένεια μεταξύ στελεχών που απομονώθηκαν από ασθενείς οι οποίοι εμπλέκονται σε μια επιδημία. Επίσης κατατάσσει τα στελέχη βάσει της συγγένειας σε κλώνους, τεκμηριώνει την τυχόν κλωνική διασπορά του μικροοργανισμού στα κρούσματα της επιδημίας και διαχωρίζει τις σποραδικές λοιμώξεις από τις επιδημικές. Η αξιολόγηση μιας τεχνικής τυποποίησης γίνεται με τα εξής κριτήρια: Πρώτον τη δυνατότητα εφαρμογής της τεχνικής σε όλα τα στελέχη. Δεύτερον την επαναληψιμότητα. Τρίτον την διακριτική ικανότητα, που εκφράζει την ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει τους μικροβιακούς κλώνους. Τεταρτον την ευκολία εφαρμογής και ερμηνείας των αποτελεσμάτων, ενώ τελικά ελέγχεται πάντα το κόστος εφαρμογής και αναπαραγωγής των αποτελεσμάτων.

Οι φαινοτυπικές μέθοδοι τυποποίησης εμφανίζουν περιορισμούς όπως η μικρή διακριτική ικανότητα. Η ανάπτυξη των μοριακών τεχνικών που αφορούν τη μελέτη του γενετικού υλικού, σε συνδυασμό με την πρόοδο της πληροφορικής (βιοπληροφορική), έχει οδηγήσει σε μια νέα προσέγγιση στην τυποποίηση και τη μελέτη των επιδημιολογικών σχέσεων των μικροοργανισμών, που βασίζεται στην ανίχνευση, την καταγραφή και την αξιολόγηση των διαφορών του γενετικού υλικού των υπό μελέτη μικροοργανισμών.

Οι μοριακές μέθοδοι τυποποίησης έχουν σαν στόχο τη σύγκριση του γενετικού υλικού των μικροβιακών στελεχών που εμπλέκονται σε μια επιδημία, ιδιαιτέρως δε του

χρωμοσώματός τους και την ανάδειξη των μεταξύ τους γενετικών σχέσεων. Επειδή στο μικροβιακό χρωμόσωμα υπάρχουν αλληλουχίες αρκετά συντηρημένες ώστε να χαρακτηρίζουν ένα μικροβιακό είδος ή και γένος, αλλά και αλληλουχίες που παρουσιάζουν αρκετά μεγάλη ποικιλομορφία, οι μέθοδοι που αναλύουν το χρωμόσωμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων αλλά και για το διαχωρισμό του είδους σε κλώνους με επιδημιολογική σημασία.

1. Μοριακές τεχνικές:

Μία τεχνική με ιδιαίτερη διακριτική ικανότητα είναι η ριβοτυπία. Εδώ γίνεται πέψη του γενωμικού DNA με περιοριστικά ένζυμα και στη συνέχεια αποτύπωση κατά Southern με ειδικούς ανιχνευτές για το ριβοσωμικό 16SRNA και 23SRNA. Με τον τρόπο αυτό αναδεικνύεται ο αριθμός των αντιγράφων των γονιδίων του ριβοσωμικού RNA, ο οποίος διαφέρει μεταξύ διαφορετικών στελεχών. Η μέθοδος φαίνεται να έχει υψηλή επαναληψιμότητα και ειδικότητα για τη διάκριση των ειδών του συμπλέγματος *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI*, *ClaI* και *SalI*. Έχει μικρότερη διακριτική ικανότητα από τις μεθόδους PFGE και τις τυποποιητικές μεθόδους που βασίζονται στην PCR (Gerner-Smidt *et al.* 1992).

Επίσης για την τυποποίηση των ειδών του γένους *Acinetobacter* έχουν χρησιμοποιηθεί και γονίδια βασικού μεταβολισμού “housekeeping genes”. Αυτά είναι γονίδια που κωδικοποιούν απαραίτητες πρωτεΐνες για το μεταβολισμό των μικροβίων. Τέτοια γονίδια είναι για το *Acinetobacter* το *recA* που κωδικοποιεί τη ρεκομπινάση A (Krawczyk *et al.* 2002), το *gyrB* που κωδικοποιεί τη γυράση B (Yamamoto *et al.* 1999), το *rpoB* που κωδικοποιεί τη β-υπομονάδα της RNA πολυμεράσης (La Scola *et al.* 2006) και το *adeB* (Huys *et al.* 2005) που κωδικοποιεί την AdeB πρωτεϊνική υπομονάδα της AdeABC αντλίας εκροής στα *Acinetobacter*. Η αλληλουχία του κάθε γονιδίου θεωρείται αντιπροσωπευτική για κάθε είδος, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα να μελετηθεί η φυλογενετική σχέση μεταξύ των γενωμικών ειδών *Acinetobacter*.

Η ταυτόχρονη μελέτη πολλών γονιδίων που κωδικοποιούν κρίσιμες μεταβολικές πρωτεΐνες “Housekeeping genes” παράγει αντικειμενικά και επαναλήψιμα αποτελέσματα (MLST- Multi Locus Sequence Typing) (Bartual *et al.* 2005.) Σε γενικές γραμμές η τεχνική περιλαμβάνει την ταυτόχρονη ενίσχυση γονιδιακών θέσεων που ελέγχουν την έκφραση σημαντικών πρωτεϊνών. Στη συνέχεια γίνεται αλληλούχιση των προϊόντων της PCR και τελικά κάθε εξεταζόμενο στέλεχος αποκτά έναν κωδικό αριθμό που υποδηλώνει

το αλληλόμορφο που διαθέτει για κάθε εξεταζόμενο γονίδιο (αριθμός ST). Τα αποτελέσματα που παράγονται από το MLST φαίνεται να συμφωνούν με αυτά που προκύπτουν από περιοριστική πέψη του μικροβιακού γενώματος σε μεγάλα τμήματα και ηλεκτροφόρηση σε μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE – Pulsed Field Gel Electrophoresis) και από την τεχνική AFLP (πολυμορφισμός μήκους πολλαπλασιασμένων κλασμάτων, Bartual *et al.* 2005). Μέχρι στιγμής έχουν περιγραφεί δύο σχήματα που εξετάζουν “Housekeeping genes”. Το σχήμα Epub-MLST (Bartual *et al.* 2005) παρουσιάζεται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2: (Bartual *et al.* 2005) Σχήμα τυποίησης *A. baumannii*. Το σχήμα μελετά 7 γονίδια βασικού μεταβολισμού “Housekeeping genes”.

<i>locus</i>	<i>Gene product</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequences(5'→3')</i>	<i>Amplicon</i>	<i>Usage</i>
				<i>Size bp</i>	
<i>gltA</i>	Citrate synthase	Citrato F1 Citrato R12	AATTTACAGTGGCACATTAGGTCCC GCAGAGATACCAGCAGAGATACACG	722	Amplification/sequencing Amplification/sequencing
<i>gyrB</i>	DNA gyrase subunit B	APRU F M13 [21] UPIE R M13 F	TGTAACACGACGGCCAGTGCNGGRTCYTT YTCYTGRCA TGTAACACGACGGCCAGT CAGGAAACAGCTATGACCAYGSNNGGNGGN AARTTYRA CAGGAAACAGCTATGACC	909	Amplification Sequencing Amplification
<i>gdhB</i>	Glucose dehydrogenase Ba	GDHB 1F GDH SEC F GDHB 775R GDH SEC R	GCTACTTTTATGCAACAGAGCC ACCACATGCTTTGTTATG GTTGAGTTGGCGTATGTTGTGC GTTGGCGTATGTTGTGC	775	Sequencing Amplification Sequencing Amplification
<i>recA</i>	Homologous recombination factor	RA1 RA2	CCTGAATCTTCYGGTAAAAC	425	Amplification/sequencing
<i>cpn60</i>	60-kDa chaperonin	CPN 3F2 CPN R2	ACTGTACTTGCTCAAGC TTCAGCGATGATAAGAAGTGG	479	Amplification/sequencing
<i>gpi</i>	Glucose-6-phosphate isomerase	GPI F1 GPI R1	AATACCGTGGTGCTACGGG AACTTGATTTTCAGGAGC	508	Amplification/sequencing
<i>rpoD</i>	RNA polymerase sigma	70F RPOD 70FS	ACGACTGACCCGGTACGCATGTAYATGMG NGARATCGCNACNCT ACGACTGACCCGGTACGCATGTA	492	Amplification Sequencing
	Factor rpoD(Sigma-70)b	70R RPOD 70RS	ATAGAAATAACCAGACGTAAGTT NACCATYTGYYTTYTT ATAGAAATAACCAGACGTAAGTT		Amplification Sequencing

Πολλές ερευνητικές ομάδες δεν μπορούσαν παρόλα αυτά να πάρουν προϊόν PCR από όλα τα στελέχη τους για όλα τα γονίδια του σχήματος αυτού, κάτι το οποίο αποδόθηκε στο ότι κάποιες αλληλουχίες δεν είναι απόλυτα συντηρημένες και δεν μπορεί να γίνει υβριδισμός με όλους τους εκκινητές. Αυτό ισχύει και για τα στελέχη που μελετήσαμε στην Ελλάδα και επίσης αποδόθηκε σε ποικιλομορφία των γονιδιακών σημείων στα οποία υβριδίζουν οι αλληλουχίες του παραπάνω σχήματος. Πρόσφατη μελέτη, παρουσιάζει τα γονίδια *gpi* και *gyrB* του σχήματος Bartual μη ειδικά για φυλογενετικές μελέτες λόγω της οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς τους (Hamounda *et al.* 2010).

Δεδομένης της ανάγκης αυτής, δημιουργήθηκε ένα δεύτερο σχήμα από το ινστιτούτο Pasteur (Institute Pasteur's MLST Website, www.Pasteur.fr/mlst) το οποίο εξετάζει τα ίδια γονίδια *cpn60* (60-Kda chaperonin), *gltA* (citrate synthase) και *recA* (homologous recombination factor) με τους ίδιους εκκινητές όπως στο σχήμα του Bartual *et al.* 2005 ενώ ταυτόχρονα εισάγει την ανίχνευση των εξής γονιδίων: *fusA* (elongation factor EF-G), *pyrG* (CTP synthase), *rplB* (50S ribosomal protein L2) και *rpoB* (RNA polymerase subunit B). Οι εκκινητές αυτών των γονιδίων έχουν σχεδιαστεί από τους Santos και Ochman.

Επίσης, από τους Turton *et al* (2007), προτείνεται ένα διαφορετικό σχήμα τυποποίησης με χρήση αλληλούχισης, το οποίο βασίζεται στην ανίχνευση και ταυτοποίηση τριών γονιδίων, τα οποία μάλιστα δεν ανήκουν στα συντηρημένα (Housekeeping) γονίδια αλλά βρίσκονται υπό εξελικτική πίεση επιλογής (selective pressure). Αυτή η τεχνική, εφόσον δίνει τη δυνατότητα να μελετηθούν περισσότεροι πολυμορφισμοί διευρύνει τη διακριτική ικανότητα της μεθόδου σε σχέση με το σχήμα που μελετά τα Housekeeping genes, ενώ ταυτόχρονα έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικές με την παθογονικότητα του μικροβίου. Τα γονίδια τα οποία μελετούνται σε αυτό το σχήμα είναι το *ompA* (το οποίο κωδικοποιεί την εξωτερική μεμβρανική πρωτεΐνη A), το *csuE* (κωδικοποιεί ινίδιο βασικό για τη δημιουργία του biofilm) και το *bla_{OXA-51-like}* που κωδικοποιεί τη χρωμοσωμική καρβαπανεμάση του *A. baumannii*. Το σχήμα αυτό είναι πιο απλό στην υλοποίηση του καθώς αφορά 3 μόλις γονίδια ενώ χαμηλώνει αισθητά και το κόστος υλοποίησης της τεχνικής και περιγράφεται ως ST (sequence typing) ή 3LST (3-loci sequence typing). Η βάση δεδομένων η οποία αφορά το σχήμα της Turton *et al.* προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες σε σχέση με το τι έχει προκύψει μέχρι σήμερα επιδημιολογικά www.hpa-bioinformatics.org.uk/AB/home.php.

Πίνακας 3: (Turton *et al.* 2007). Το σχήμα μελετά 3 γονίδια. Είναι πολύ σημαντικά και τα τρία για την ομαλή λειτουργία του μικροβιακού κυττάρου ωστόσο δεν αποτελούν Housekeeping genes.

Target	Primer sequences	Annealing Temperature (°C)	Amplicon size (bp)	Sequence compAred
<i>ompA</i>	OmpAF183, 5'-CAATTGTTATCTCTGGAG OmpAR1149, 5'-ACCTTGAGTAGACAAACGA-3' Internal primers (sequencing): OmpAF506, 5'-TCAACGGTAACTTCTAT-3' OmpAR895, 5'-CTTCAGTTAACTCTTGTGG-3'	50	966	686 bp corresponding to nucleotides 39–724 of DQ648278 (alleles variable in length)
<i>csuE</i>	CsuEF, 5'-ATGCATGTTCTCTGGACTGATGTTGAC-3' CsuER, 5'-CGACTTGTACCGTGACCGTATCTTGATAAG-3' Internal primers: CsuEconsensusF, 5'-AGACATGAGTAGCTTTACG-3' CsuEconsensusR, 5'-CTTCCCCATCGGTCATTC-3'	65 52	976 515	449 bp corresponding to nucleotides 230–678 of DQ289018; 5449–5897 of AY241696
<i>bla</i> _{OXA-51-like}	OXA-51-like-all F, 5'-ATGAACATTAAAGCACTC-3' OXA-51-like-all R, 5'-CTATAAAATACCTAATTGTTC-3' Internal primers: OXA-51-likeF, 5'-TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3' OXA-51-likeR, 5'-TGGATTGCACTTCATCTTGG-3'	46 60	825 353	693 bp corresponding to nucleotides 79–771 of AJ309734

Παρόλη την εξέλιξη των μοριακών τεχνικών MLST και ST, μέθοδος αναφοράς στην τυποποίηση των μικροβίων παραμένει η PFGE (Πέψη Χρωμοσωμικού DNA σε Μεγάλα Τμήματα και ηλεκτροφόρηση σε μεταβαλλόμενο πεδίο. Η τεχνική αυτή βοηθά στην κατανόηση της επιδημιολογίας των μικροβίων ενώ τα πλεονεκτήματά της είναι η διακριτική ικανότητα, η επαναληψιμότητα και η ειδικότητα. Μειονεκτήματα της τεχνικής αποτελούν το κόστος, ο χρόνος καθώς και η ιδιαίτερη τεχνογνωσία που απαιτεί για την εφαρμογή της. Συνοπτικά, γίνεται η λύση του κυτταρικού τοιχώματος καθώς και η πέψη του γενωμικού DNA *in situ* ενώ το μικρόβιο ενσωματώνεται σε γέλη αгарόζης. Η διαδικασία αυτή γίνεται για να μην προκληθούν μη ειδικές κατατμήσεις στο DNA. Στη συνέχεια το προϊόν που προέκυψε από την πέψη, η γέλη αгарόζης, ηλεκτροφορείται εντός

μεταβαλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Το πρότυπο των ζωνών που προκύπτει συγκρίνεται με τα υπόλοιπα στελέχη της μελέτης ώστε να βρεθεί ενδεχόμενη γενετική σχέση (Allardet-Servent *et al.* 1989). Το πρωτόκολλο RFLP-PFGE για *A. baumannii* το οποίο είναι κοινά αποδεκτό και τα αποτελέσματα είναι επαναλήψιμα και συγκρίσιμα μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων είναι αυτό που προτείνεται από τους Seifert *et al.* 2005.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων επιβάλλει και την καθιέρωση κοινών κριτηρίων έτσι ώστε η τεχνική να είναι αξιολογήσιμη από διάφορα εργαστήρια. Τα κριτήρια ανάλυσης των δεδομένων από RFLP-PFGE είναι τα κριτήρια του Tenover *et al.* 1995. Τα κριτήρια αυτά αναφέρουν:

α) Το κοινό πρότυπο των ζωνών που επιδεικνύουν τα περισσότερα από τα στελέχη της συλλογής θεωρείται το επιδημικό προφίλ. Υπάρχει μικρή πιθανότητα αυτά τα στελέχη να επιδείξουν διαφορετικό πρότυπο άλλη τεχνική τυποποίησης.

β) Στελέχη που διαφέρουν σε 2-3 ζώνες θεωρούνται στενώς σχετιζόμενα με το επιδημικό προφίλ. Οι διαφορές αυτές μπορεί να προκύψουν από: σημειακή μετάλλαξη, εισδοχή ή διαγραφή νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, που προκάλεσαν δημιουργία ή απαλοιφή ακολουθίας αναγνώρισης από το αντίστοιχο περιοριστικό ένζυμο. Μετά από επαναλαμβανόμενες ανακαλλιέργειες αναφέρεται ότι έχουν παρατηρηθεί τέτοιου είδους διαφορές στο ίδιο στέλεχος (Sader *et al.* 1993).

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

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

Δύο άλλες τεχνικές τυποποίησης που χρησιμοποιούνται τελευταία αλλά έχουν περιγραφεί αρκετό καιρό πριν είναι η μελέτη του πολυμορφισμού διαδοχικών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του γονιδιώματος (Multilocus variable number of tandem repeat analysis - MLVA) και η Diversi lab typing (ανάλυση με PCR επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών). Σε μια τυπική ανάλυση MLVA μια σειρά από καλά επιλεγμένες και συντηρημένες γενετικές θέσεις (από άποψη μεταλλάξεων και

πολυμορφίας) που περιέχουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες ενισχύονται με PCR, έτσι ώστε το μέγεθος της κάθε θέσης (τόπος, locus) να μπορεί να μετρηθεί. Από αυτό το μέγεθος, μπορεί να υπολογιστεί ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Συνεπώς και σε αυτή την περίπτωση προκύπτει ένας αριθμός ταυτότητα ο οποίος θα έχει τόσα ψηφία όσα οι γονιδιακοί τόποι των οποίων επιλέχθηκαν να μετρήσουν τον αριθμό των επαναλήψεων τους στο γονιδίωμα του στελέχους και κάθε ψηφίο θα αντανakλά τον αριθμό επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών σε κάθε τόπο. Ο κωδικός που προκύπτει μπορεί να συγκριθεί εύκολα σε βάσεις δεδομένων αναφοράς. Πιο συγκεκριμένα για το *A. baumannii* ένα σχήμα με αρκετά καλά αποστελέσματα προτείνει τον έλεγχο 8 γονιδιακών τόπων MLVA-8. Οι 4 περιοχές είναι από 26 έως 99 bp ενώ οι υπόλοιπες τέσσερις είναι από 6 έως 9 bp και ονομάζονται L(Large) και S(Small) Repeats ή επαναλήψεις αντίστοιχα (Pourcel *et al.* 2011). Τα πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής είναι το χαμηλό κόστος υλοποίησής της, η ευκολία αναπαραγωγής των αποτελεσμάτων και πρωτίστως η μεγάλη διακριτική της ικανότητα. Η τεχνική χρησιμοποιείται για τη γενετική ανάλυση παθογόνων βακτηρίων η οποία εκμεταλλεύεται τις δυνατότητες του πολυμορφισμού των παράλληλα επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών DNA. Ιδιαίτερα στις περιοχές S(small, μικρές) Repeats (9bp) που εξετάζονται, οι πολυμορφισμοί που μπορούν να παρατηρηθούν είναι πολλοί.

Το σχήμα Diversi-lab πρόκειται για μία αυτοματοποιημένη τεχνική τυποποίησης η οποία βασίζεται στην Rep PCR (repetitive-sequence-based PCR). Το πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ο χρόνος υλοποίησης, μόλις μία ημέρα, ενώ δεν χρειάζεται και υψηλά ειδικευμένο προσωπικό. Η τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετά μικρόβια χωρίς να έχει αναμενόμενα αποτελέσματα για όλα τα στελέχη. Όσον αφορά το *A. baumannii* τα αποτελέσματα της τυποποίησης που προκύπτουν είναι ικανοποιητικά σε σύγκριση με τις άλλες τεχνικές (Fluit *et al.* 2010).

Τελευταία χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο η ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος του μικροβίου και η συγκριτική ανάλυση αυτού με άλλα στελέχη (whole genome sequencing WGS). Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε αρχικά για την ανάλυση των διαφόρων γονιδιακών πολυμορφισμών, οι οποίες παρατηρούνταν ακόμα και σε στελέχη του ίδιου κλώνου ώστε να μελετηθεί ακόμα περισσότερο ο τρόπος μεταφοράς τους. Η συγκριτική ανάλυση γενωμικού DNA επιδημικών στελεχών *A. baumannii* απεκάλυψε διαφορές στην δομή του ακόμα και σε στελέχη που ανήκουν στον ίδιο PFGE ή ST τύπο ενώ καθόρισε την γονιδιακή δεξαμενή των στελεχών διακρίνοντας το core και το accessory γονιδίωμα. Για πολλά στελέχη έχει ήδη πραγματοποιηθεί αλληλούχιση του

γονιδιώματος το οποίο είναι υπεύθυνο για τους μηχανισμούς αντοχής στις διάφορες κατηγορίες αντιβιοτικών. Το γονιδίωμα αυτό ορίζεται πλέον στην διεθνή βιβλιογραφία ως Resistome. Τέλος η διενέργεια WGS σε στελέχη τα οποία ανήκουν στον ίδιο διεθνή κλώνο lineage II αποκάλυψε αρκετές διαφορές σε γονίδια τα οποία κωδικοποιούν πρωτείνες υπεύθυνες για το κυτταρικό τοίχωμα (Adams *et al.* 2010, Zarrilli *et al.* 2011, Di Nocera *et al.* 2011, Snitkin *et al.* 2011, Hornsey *et al.* 2011). Αυτές οι διαφορές οφείλονται στην οριζόντια μεταφορά γονιδίων μεταξύ επιδημικών και μη επιδημικών στελεχών. Είναι γεγονός ότι η περαιτέρω βελτίωση της συγκεκριμένης τεχνικής καθώς και η μείωση του κόστους της θα την καθιερώσει ως μέθοδο αναφοράς της μικροβιακής τυποποίησης συμβάλλοντας στην επιδημιολογική επιτήρηση των λοιμώξεων και των MDR στελεχών.

Ιστ. Επιδημιολογία

Οι λοιμώξεις από *A. baumannii* αποτελούν ένα ουσιαστικό πρόβλημα για πολλά κράτη της Ευρώπης. Μέχρι το 1980 είχαν μελετηθεί και τυποποιηθεί με τη χρήση μοριακών τεχνικών αρκετά στελέχη, σε χώρες όπως η Αγγλία, η Ολλανδία, η Γερμανία, η Ιταλία και η Ισπανία. Η μετακίνηση ασθενών, οι οποίοι είναι φορείς ανθεκτικών στελεχών, σε διάφορα νοσοκομεία μέσα στην ίδια τη χώρα ή και εκτός, φάνηκε ότι αποτελεί τον κύριο τρόπο διασποράς τους. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία. Σε 9 νοσοκομεία της Ισπανίας ταυτοποιήθηκαν στελέχη *A. baumannii* με τον ίδιο φαινότυπο αντοχής στην αμικασίνη (Vila *et al.* 1999), ενώ σε ένα σύνολο 55 ιατρικών κέντρων στη Βόρεια και Νότια Γαλλία (Naas *et al.* 2006) ταυτοποιήθηκαν στελέχη που παράγουν ένζυμα VEB-1. Σημαντικό ρόλο προς αυτήν την κατεύθυνση έχει παίξει και η αερομεταφορά ασθενών εκτός συνόρων, η οποία συνεπάγεται εισροή ανθεκτικών στελεχών από χώρες με υψηλά ποσοστά απομόνωσης σε χώρες με χαμηλά ποσοστά όπως η Γερμανία και το Βέλγιο. Όλα αυτά επισημαίνουν την αναγκαιότητα της επιδημιολογικής επιτήρησης. Τα πολυανθεκτικά στελέχη *A. baumannii* θα πρέπει να καταγράφονται, ενώ η μετακίνησή των φορέων ασθενών θα πρέπει να γίνεται σε εξειδικευμένα κέντρα υποδοχής περιορίζοντας με αυτό τον τρόπο την διασπορά των στελεχών.

Ο κύριος σκοπός της τυποποίησης των μικροβίων είναι να αποδείξει τη γενετική σχέση μεταξύ επιδημιολογικά σχετιζόμενων στελεχών. Έτσι γίνεται αντιληπτός ο τρόπος διασποράς ενός παθογόνου μικροοργανισμού και αυτό φυσικά συμβάλλει στη μελέτη περιορισμού του φαινομένου. Στελέχη τα οποία ανήκουν στον ίδιο κλώνο έχουν τον ίδιο

γονότυπο, ενώ στελέχη μη σχετιζόμενα έχουν συνήθως διαφορετικό.

Οι πιο σημαντικές τεχνικές τυποποίησης σήμερα είναι οι μοριακές τεχνικές. Προσφέρουν επαναληψιμότητα και δυνατότητα σύγκρισης των αποτελεσμάτων με άλλα εργαστήρια, ενώ προσδίδουν ακρίβεια και καλή διακριτική ικανότητα.

Στην Ευρώπη η τυποποίηση των *A. baumannii* με μοριακές τεχνικές AFLP, ριβοτυπία PFGE και πρόσφατα MLST, έχει αναδείξει την ύπαρξη τριών κύριων Ευρωπαϊκών κλώνων (EU I, II και III) (Dijkshoorn *et al.* 1996). Μέχρι σήμερα δεν έχει ανευρεθεί κάποια χρονολογική ή επιδημιολογική συσχέτιση στο χώρο που να επεξηγεί την επικράτηση των τριών αυτών ευρωπαϊκών κλώνων (Peleg *et al.* 2008). Συνεπώς η συμβολή τους στο γενικό φορτίο των επιδημικών στελεχών είναι κάτι που χρήζει περεταίρω διερεύνησης. Οι Ευρωπαϊκοί κλώνοι, λόγω της επιδημικής διασποράς τους και της συσχέτισής τους με λοιμώξεις, όχι μόνο στην Ευρώπη αλλά και σε ολόκληρο τον κόσμο έχουν πλέον μετονομαστεί σε διεθνείς κλώνους («international clones» ή αλλιώς clonal complexes, CC). Έτσι οι Ευρωπαϊκοί κλώνοι (EU) I, II και III ορίζονται πλέον ως CC 1, 2 και 3 αντίστοιχα. Δεδομένης της συνεχούς αναβάθμισης των δεδομένων της τυποποίησης αξίζει να αναφέρουμε και την ύπαρξη άλλων όχι τόσο συχνά συναντούμενων κλώνων όπως οι CC 10 και 32 (Diancourt *et al.* 2010). Σε κάθε κλώνο αντιστοιχούν και συγκεκριμένοι ST τύποι. Ο ST αριθμός είναι αριθμός-ταυτότητα για κάθε στέλεχος. Κάθε αριθμητικό ψηφίο του ST αντιστοιχεί στον αριθμό του αλληλίου που διαθέτει το συγκεκριμένο στέλεχος για το συγκεκριμένο γονίδιο (κάθε αλληλίο που κατατίθεται στη βάση δεδομένων του συστήματος παίρνει έναν αριθμό). Συνεπώς κάθε αριθμός ST διαθέτει 7 νούμερα, ο συνδυασμός των οποίων αντιστοιχεί στον αριθμό-ταυτότητα ST. Όταν η τυποποίηση γίνεται με το σχήμα της Turton *et al.* 2007 αυτό σημαίνει ότι ο αριθμός ST θα αποτελείται από τρία νούμερα, ισάριθμα με τα γονίδια που εξετάζει το συγκεκριμένο σχήμα. Στην βιβλιογραφία είχε επικρατήσει να αναφέρουμε τον αριθμό ταυτότητα από το σχήμα της Turton ως 3ST, ώστε να είναι σαφής η διάκριση με τα άλλα σχήματα. Πλέον όμως η αναθεωρημένη βάση δεδομένων της Turton προτείνει επίσης ο αριθμός ταυτότητα να αναφέρεται ως ST ορίζοντας διαφορετικό τρόπο αρίθμησης των τύπων (τριψήφιο- με το πρώτο ψηφίο να προσδιορίζει το ST group). Είναι γεγονός ότι μπορεί να προκληθεί σύγχυση στις αριθμήσεις ST ειδικά με τα δύο σχήματα των 7 γονιδίων. Μέχρι στιγμής, σύμφωνα με το σχήμα του Pasteur έχουν τυποποιηθεί 193 ST τύποι ενώ με το σχήμα του Bartual *et al.* 301. Από τη βάση δεδομένων της Turton και το 3ST σχήμα αυτό που προκύπτει από την επίσημη βάση δεδομένων είναι η αναγνώριση 7 sequence groups, ενώ στελέχη που δεν έχουν σχηματίσει επιδημικούς κλώνους

χαρκτηρίζονται μόνο από τον αριθμό-ταυτότητάς τους.

Αναλυτικότερα, όσον αφορά το σχήμα Pasteur το CC1 περιλαμβάνει τους ST 1, 7, 8 και 19, το CC2 τους ST 2, 45 και 47, το CC3 τους ST 3 και 14, το CC10 τους ST 10 και 23 και το CC32 τους ST 32, 28 και 53. Τα στοιχεία αυτά συνεχώς ανανεώνονται, δεδομένης της γενετικής ποικιλομορφίας των στελεχών. Ενώ η διασπορά των CC1, CC2 και CC3 είναι ευρεία και παγκόσμια το CC32 εντοπίζεται προς το παρόν στις Σκανδιναβικές χώρες Δανία και Σουηδία, το CC10 στην Τσεχία, Ολλανδία και Αυστραλία και ο ST15 Αργεντινή, Τσεχία και Ολλανδία (Diancourt *et al.* 2010).

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι πιο σημαντικοί κλώνοι που κυριαρχούν σε παγκόσμιο επίπεδο, καθώς και η αντιστοίχισή τους στις διάφορες τεχνικές τυποποίησης.

Clonal lineage			
AFLP	Pasteur's MLST**	PubMLST	3LST*
I	CC1	CC109 (18)	SG2
II	CC2	CC92 (45)	SG1
III	CC3	CC110 (8)	SG3
	ST25		SG4
Cluster A	CC15	CC103 (6)	SG5
	ST78		SG6
			SG7
Cluster B	CC10		Allelic profile 3/2/8
Cluster 6	CC32		
Cluster C	ST52		
	CC79 (11)	CC113 (18)	

CC: clonal complex, ST: sequence type, SG: sequence group, WW: world wide clone

*SG (Sequence Group)

To Sequence Group 1 αντιστοιχεί στους ST τύπους από 100 έως 199 .

To Sequence Group 2 αντιστοιχεί στους ST τύπους από 200 έως 299.

To Sequence Group 3 αντιστοιχεί στους ST τύπους από 300 έως 399.

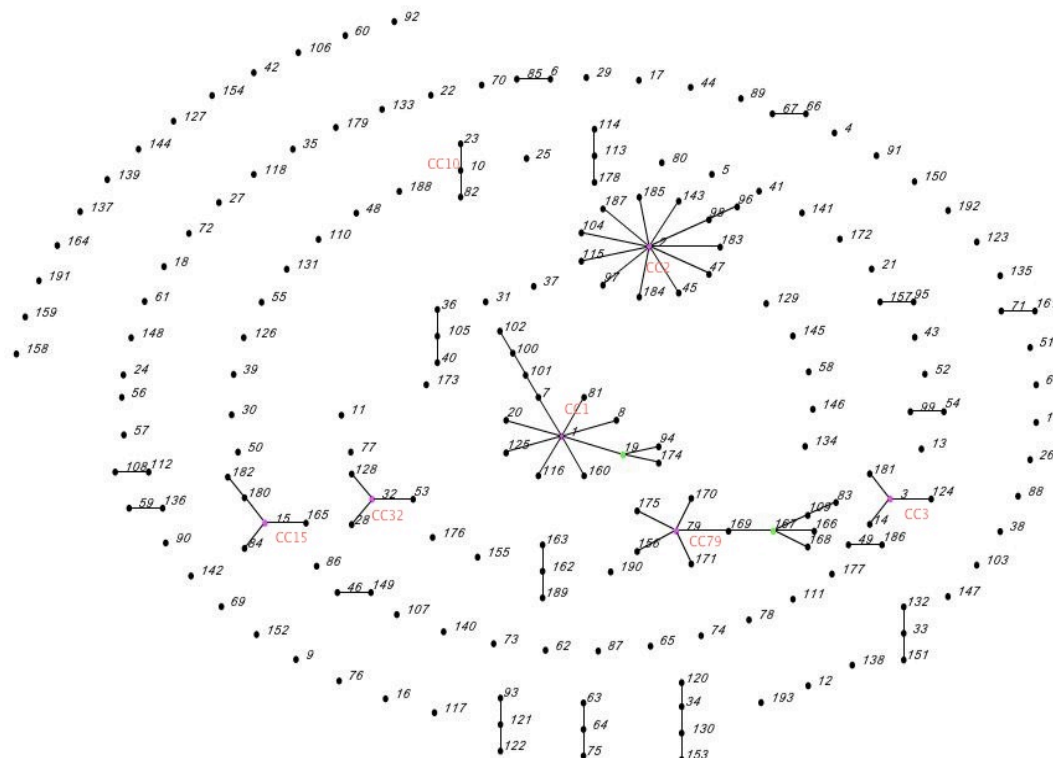
To Sequence Group 4 αντιστοιχεί στους ST τύπους από 400 έως 499

To Sequence Group 5 αντιστοιχεί στους ST τύπους από 500 έως 599

To Sequence Group 6 αντιστοιχεί στους ST τύπους από 600 έως 699

To Sequence Group 7 αντιστοιχεί στους ST τύπους από 700 έως 799

Στο παρακάτω Eburst διάγραμμα φαίνονται αναλυτικά οι ST τύποι οι οποίοι περικλείονται σε κάθε σε κάθε CC κλώνο, σύμφωνα με το σχήμα του Pasteur.

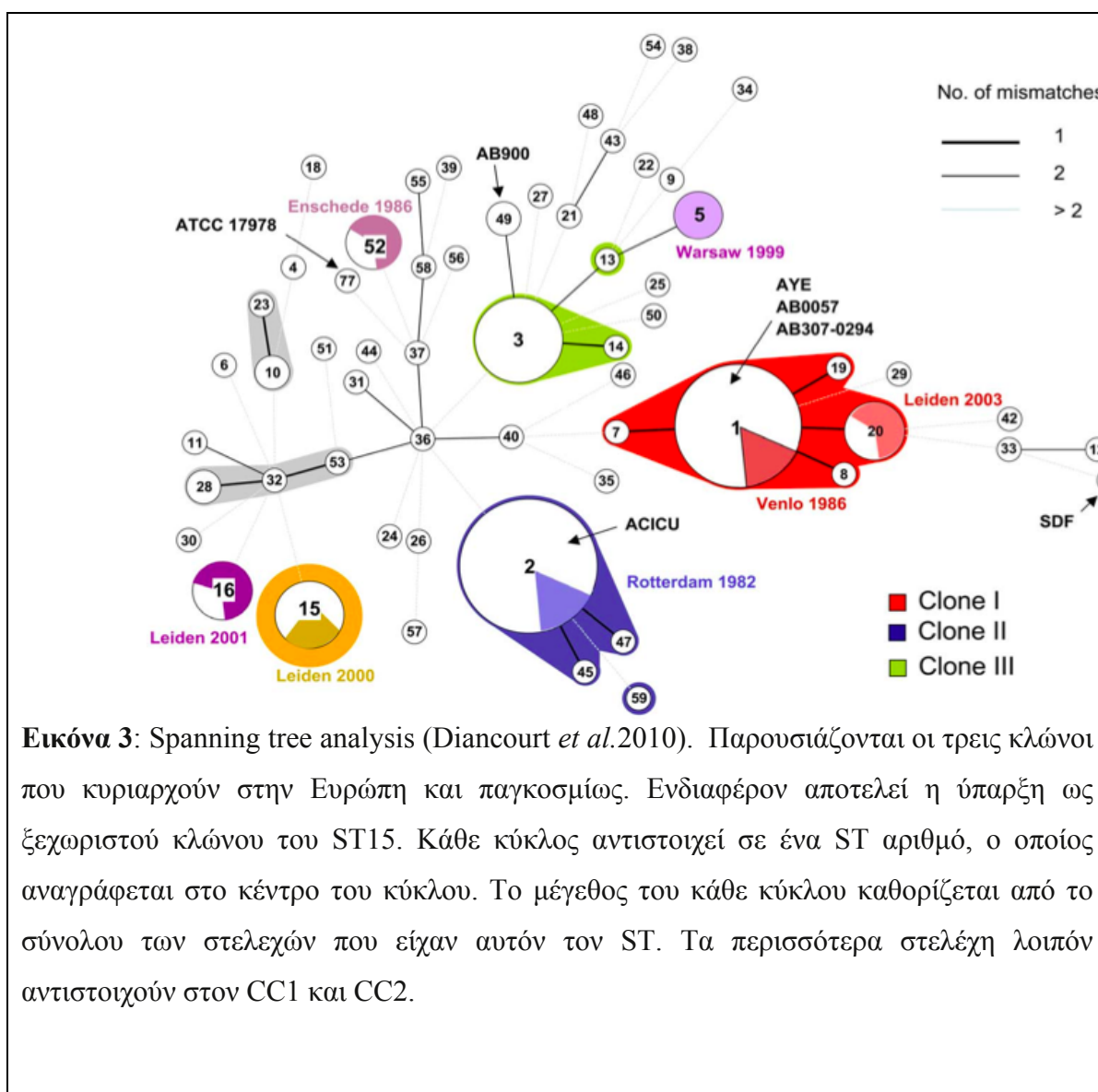


Τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *A. baumannii* είναι ένα πολύ σημαντικό ζήτημα παγκοσμίως και είναι αρκετά δύσκολο ακόμα και σήμερα να υπολογιστεί το ποσοστό απομόνωσής τους σε ορισμένα κράτη. Σε ευρωπαϊκό επίπεδο, η Τουρκία, η Ελλάδα, η Ισπανία και η Ιταλία κατέχουν τα υψηλότερα ποσοστά απομόνωσης ανθεκτικών στελεχών, ενώ αντίθετα χαμηλά ποσοστά έχουν η Γερμανία και η Ολλανδία. Στην ανατολική Ευρώπη φαίνεται πως τα ποσοστά αυτά αυξάνονται ενώ χαμηλά διατηρούνται στις Σκανδιναβικές χώρες, παρόλο που και εκεί πλέον έχουμε την δήλωση σποραδικών κρουσμάτων κυρίως λόγω της μεταφοράς ασθενών από περιοχές υψηλής ενδημικότητας (Peleg *et al.* 2008). Σε μία μελέτη, η οποία περιλαμβάνει στοιχεία από 48 Ευρωπαϊκές χώρες και αφορά την περίοδο 2002 με 2004, αναφέρεται πως 73,1% των απομονωθέντων *A. baumannii* ήταν ευαίσθητα στη μεροπενέμη και 69,8% ευαίσθητα στην ιμιπενέμη (Unal *et al.* 2005). Τα ποσοστά ευαισθησίας στα υπόλοιπα αντιβιοτικά παρουσιάζονται εξαιρετικά χαμηλά (32,4%, 34%, 47,6% σε κεφταζιδίμη, σιπροφλοξασίνη και γενταμικίνη αντίστοιχα). Αξίζει να αναφερθεί επίσης η ύπαρξη ανθεκτικών στελεχών στην πολυμυξίνη, τα ποσοστά των οποίων παραμένουν χαμηλά. Τα περισσότερα

πολυανθεκτικά στελέχη και κατ' επέκταση η πλειοψηφία των στελεχών ανήκουν στους τρεις διεθνείς κλώνους CC 1, 2 και 3 (Diancourt *et al.* 2010). Ωστόσο η γενετική ποικιλομορφία που έχει παρατηρηθεί σε στελέχη ακόμα και του ιδίου κλώνου, υποδηλώνει σαφώς την ανάγκη διεύρυνσης των κατηγοριών αυτών και την δημιουργία νέων υποτύπων. Η τεχνική MLST χρησιμοποιείται για την τυποποίηση *A. baumannii*, δεν μπορεί όμως να εκτιμήσει την γενετική δομή των ειδών γενικότερα και των διεθνών κλώνων ειδικότερα (Diancourt *et al.* 2010).

Τα υψηλότερα ποσοστά απομόνωσης ανθεκτικών στις καρβαπενέμες *A. baumannii* εντοπίζονται στις χώρες της Λατινικής Αμερικής, ενώ ελλιπή παρουσιάζονται τα δεδομένα από την Αφρικανική ήπειρο, λόγω περιορισμένης χρήσης μοριακών τεχνικών και έλλειψης συγκροτημένου προγράμματος επιδημιολογικής επιτήρησης. Αναπτυσσόμενες χώρες όπως το Μαρόκο, η Ταϊλάνδη, η Ινδία και η Ινδονησία παρουσιάζουν επίσης περιστατικά λοιμώξεων από ανθεκτικά στις καρβαπενέμες *A. baumannii* (Zarrilli *et al.* 2009). Η Κίνα σε μία πολύ ενδιαφέρουσα μελέτη σε βάθος δεκαετίας, με στελέχη από 11 πανεπιστημιακά νοσοκομεία επιβεβαιώνει την κλωνική διασπορά του μικροβίου και την παρουσία της OXA-23 ως της επικρατέστερης καρβαπανεμάσης. Η έρευνα αφορά 221 ιμιπενέμη-ανθεκτικά στελέχη (Wang *et al.* 2007). Σε αντίστοιχη μελέτη στην Αυστραλία μελετώντας την εξελικτική πορεία των στελεχών *A. baumannii*, επισημαίνεται η επικράτηση του ST92 τον οποίο ορίζει και ως CC92 (ταυτοποίηση με βάση το σχήμα Bartual). Το ST92 ή CC92 ανήκει ουσιαστικά στον EU clone II. Αντίστοιχα, δεκαετής μελέτη από την Πορτογαλία η οποία αφορά ανθεκτικά τις καρβαπενέμες στελέχη από το 1998 έως το 2009, παρουσιάζει την επικράτηση του EU II (DaSilva *et al.* 2010), η οποία επιβεβαιώνεται και σε ποσοστό 47,5% από δεκαετή μελέτη των Ισπανών (Villalon *et al.* 2011). Όλες αυτές οι μελέτες επισφραγίζουν ουσιαστικά το αποτέλεσμα της μελέτης του 2009 που αφορά στελέχη από ολόκληρη την μεσόγειο, η οποία εκτός την επικράτηση του CC2 παρουσιάζει και την OXA-58 ως επικρατέστερη καρβαπανεμάση στα ανθεκτικά στελέχη (Giannouli *et al.* 2009). Στη γειτονική Βουλγαρία κυριότερη καρβαπανεμάση στα ανθεκτικά στελέχη είναι η OXA-58 και η OXA-23 με την τελευταία να επικρατεί (Stoeva *et al.* 2011), ενώ μελέτη επιβεβαιώνει την ύπαρξη OXA-72 στην Κροατία (Goic-Barisic *et al.* 2011). Στην Πολωνία η αντοχή των στελεχών *A. baumannii* στις καρβαπενέμες φαίνεται να οφείλεται στην επικράτηση του ευρωπαϊκού κλώνου CC2 (Izdebski R *et al.* 2012). Μελέτη από τη Νορβηγία επιβεβαιώνει τα χαμηλά ποσοστά απομόνωσης πολυανθεκτικών στελεχών. Από το 2004-2009 απομονώθηκαν στην Νορβηγία 11 ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη.

Είναι αξιοσημείωτο ότι όλοι οι ασθενείς από τους οποίους απομονώθηκαν τα στελέχη είχαν στο ατομικό τους ιστορικό νοσηλεία σε νοσοκομεία εκτός της χώρας. Στα στελέχη αυτά έγινε μοριακός έλεγχος με MLST, PFGE, multiplex PCR και τυποποίηση του *bla*_{OXA-51-like}. Όλα τα στελέχη ήταν φορείς μιας οξακιλινάσης *bla*_{OXA-23-like} (n=9), *bla*_{OXA-24-like} (n=1) and *bla*_{OXA-58-like} (n=1). Από την επιδημιολογική ανάλυση προκύπτει ότι επτά στελέχη ανήκουν στο κλώνο CC2 σύμφωνα με το σχήμα Pasteur (P), CC92 σύμφωνα με το σχήμα Bartual (B) δηλαδή στον international clone II. Ένα εκ των στελεχών ανήκε στον CC1 (P) και CC109 (B) δηλαδή international clone I. Τα υπόλοιπα στελέχη ανήκουν σε σποραδικούς κλώνους (Karah *et al.* 2010). Σε παγκόσμια κλίμακα η επικράτηση πλέον του EU II *A. baumannii* έρχεται από τη μελέτη των Higgins *et al.* το 2009.



Τη δεκαετία 1990-2000 δεν υπάρχουν στην Ελλάδα αναφορές για ανθεκτικά στις καρβαπενέμες *A. baumannii*. Από τις αρχές του 2000 αρχίζουν να εμφανίζονται στελέχη με μειωμένη ευαισθησία (Tsakris *et al.* 2003). Σταδιακά από το 2006 και μετά αυτά τα στελέχη επικρατούν στα ελληνικά νοσοκομεία (Pournaras *et al.* 2006). Τα ποσοστά αντοχής στις καρβαπενέμες για το 2010 ανέρχονται στο 67,7% για τις διάφορες κλινικές των νοσοκομείων στην ελληνική επικράτεια ενώ φτάνουν το 93,2% για τα στελέχη που απομονώνονται από τις μονάδες εντατικής θεραπείας. Αξίζει εδώ να αναφέρουμε κάποια στοιχεία και από τον αντίστοιχο φορέα επιδημιολογικής επιτήρησης του Ηνωμένου Βασιλείου. Τα ποσοστά αντοχής εκεί είναι σαφώς χαμηλότερα 23% και 27% για μεροπενέμη και ιμιπενέμη αντίστοιχα. Αυτό που προκαλεί έκπληξη σε αυτά τα στοιχεία είναι ότι τα ποσοστά αυτά το 2006 κυμαίνονταν στο 35% και 21% αντίστοιχα. Έχουμε λοιπόν μια πτώση πάνω από 10 μονάδες στα ποσοστά αντοχής στη μεροπενέμη ενώ αύξηση κατά 6 μονάδες στην ιμιπενέμη (πηγή: www.hpa.org.uk). Τα στοιχεία αυτά παρατίθενται για να γίνει κατανοητή η έκταση του προβλήματος των ανθεκτικών στελεχών *A. baumannii* στην Ελλάδα αλλά και για να αναδείξουμε την προσφορά ενός οργανωμένου προγράμματος επιδημιολογικής επιτήρησης. Ένα αντίστοιχο επιδημιολογικό πρόγραμμα έχει αρχίσει να εφαρμόζεται και στην Ελλάδα από το Νοέμβριο του 2010. Το πρόγραμμα αυτό ονομάζεται Προκρούστης. Υπό την εποπτεία του ΚΕΕΛΠΝΟ έχει οριστεί μία επιχειρησιακή ομάδα η οποία διαχειρίζεται τα δεδομένα τα οποία φτάνουν στο ΚΕΕΛΠΝΟ από όλα τα Νοσοκομεία της Ελλάδας. Κύριοι στόχοι του προγράμματος είναι η συστηματική επιτήρηση των λοιμώξεων από τρία πολυανθεκτικά Gram – αρνητικά βακτήρια (*Klebsiella* spp, *Acinetobacter* spp, *Pseudomonas* spp), με αντοχή στις καρβαπενέμες, μέσω της υποχρεωτικής δήλωσής τους στο ΚΕΕΛΠΝΟ, για τον υπολογισμό και τη διαχρονική παρακολούθηση της επίπτωσης των λοιμώξεων αυτών στα ελληνικά νοσοκομεία. Ακόμα σημαντικότερος στόχος είναι η εφαρμογή μέτρων ελέγχου λοιμώξεων, με έμφαση στην τήρηση των αρχών νοσηλείας σε συνθήκες μόνωσης (μονόκλινοι θάλαμοι ή συν-νοσηλεία) και στη συστηματική εφαρμογή της υγιεινής των χεριών και των προφυλάξεων επαφής. Στο πλαίσιο της εφαρμογής του σχεδίου δράσης «Προκρούστης», τα νοσοκομεία αποστέλλουν σε εβδομαδιαία βάση τέσσερις κατηγορίες λοιμώξεων: μικροβιαίμιες (πρωτοπαθείς και ενδαγγειακών καθετήρων), πνευμονίες (κοινότητας, ιδρυμάτων παροχής ιατρικής φροντίδας, νοσοκομειακές σε μη διασωληνωμένους ασθενείς και συνδεδεμένες με τον αναπνευστήρα), λοιμώξεις ουροποιητικού συστήματος και λοιμώξεις χειρουργικού πεδίου, που οφείλονται στα τρία πολυανθεκτικά Gram – αρνητικά παθογόνα (*Klebsiella* spp., *Acinetobacter* spp.,

Pseudomonas spp.) με αντοχή στις καρβαπενέμες. Παράλληλα, στις 28 ημέρες μετά την πρώτη θετική καλλιέργεια αναζητείται και καταγράφεται η έκβαση της συγκεκριμένης λοίμωξης. Όταν δεν καταγράφεται κάποια από τις παραπάνω λοιμώξεις, τα νοσοκομεία αποστέλλουν μηδενική δήλωση. Τα πρώτα αποτελέσματα του σχεδίου “Προκρούστης” ανακοινώθηκαν το Δεκέμβριο του 2011 από την Ιστοσελίδα του ΚΕΛΠΝΟ και έχουν ως εξής: Οι περισσότερες λοιμώξεις καταγράφηκαν στις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) (54,9%) και ακολούθησαν οι κλινικές του παθολογικού τομέα (27,4%) και τέλος του χειρουργικού τομέα (17,7%). Αναφορικά με το είδος της λοίμωξης που καταγράφηκε, οι μικροβιαιμίες και οι πνευμονίες ήταν οι συχνότερες και ανήλθαν σε ποσοστά 34,8% και 29,8% αντίστοιχα, ενώ ακολούθησαν οι ουρολοιμώξεις (21%) και οι λοιμώξεις χειρουργικού πεδίου (14,4%). Ο συχνότερος τύπος πνευμονίας που καταγράφηκε ήταν η πνευμονία σχετιζόμενη με τον αναπνευστήρα (73,9%). Από το σύνολο των απομονωθέντων στελεχών, η *Klebsiella* ήταν το συχνότερο παθογόνο (43,2%), με το *Acinetobacter* (35,9%) και την *Pseudomonas* (20,9%) να ακολουθούν. Όσο αφορά τα *A. baumannii* η συνολική αδρή θνητότητα στις 28 ημέρες μετά την 1η θετική καλλιέργεια ανήλθε σε ποσοστό 35,7%. Η υψηλότερη θνητότητα καταγράφηκε μεταξύ των περιπτώσεων πνευμονίας και μικροβιαιμίας (44,9% και 40% αντίστοιχα). Στις ΜΕΘ η θνητότητα των λοιμώξεων που καταγράφηκε ανήλθε σε ποσοστό 43,6%, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά για τον παθολογικό και το χειρουργικό τομέα ήταν 30,2% και 19,5% αντίστοιχα. Τα ποσοστά MDR στελεχών *A. baumannii* που απομονώθηκαν στην Ελλάδα το χρονικό διάστημα Ιουλίου - Δεκεμβρίου 2011 και καταγράφηκαν από το ΚΕΛΠΝΟ είναι 81,5%, 65,7%, και 58,7% για τις κλινικές Μ.Ε.Θ, χειρουργικές και παθολογικές αντίστοιχα. Τα στελέχη αυτά ορίζονται ως MDR με δεδομένη την αντοχή τους τουλάχιστον σε ceftazidime, ciproxin και amikan. Η αντοχή στην Ιμιπενέμη, το ίδιο διάστημα ανέρχεται στο 94% στις μονάδες εντατικές θεραπείας ενώ στις παθολογικές και χειρουργικές κλινικές το ποσοστό φτάνει στο 58,7% και 65,7% αντίστοιχα.

Στόχος του συγκεκριμένου προγράμματος είναι να δοθεί έμφαση στην παρέμβαση και στην επιτήρηση της εφαρμογής των μέτρων ελέγχου λοιμώξεων δηλαδή να εξασφαλίζονται συνθήκες μόνωσης για τη νοσηλεία ασθενών με λοίμωξη ή αποικισμό από πολυανθεκτικά παθογόνα, καθώς και να τηρούνται οι προφυλάξεις επαφής και οι κανόνες υγιεινής των χεριών. Δείκτης αποτελεσματικότητας αυτό του προγράμματος θα είναι η μείωση της επίπτωσης των συγκεκριμένων λοιμώξεων όπως συμβαίνει και σε άλλα ευρωπαϊκά κράτη που είδαμε ότι έχουν ήδη εφαρμοστεί αντίστοιχα προγράμματα.



Εικόνα 4: Παρουσιάζονται οι χώρες στις οποίες ταυτοποιήθηκαν ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *A. baumannii*. Με κόκκινο επισημαίνονται οι χώρες στις οποίες έχουμε καταγραφή στελεχών πριν το 2006 και με κίτρινο οι χώρες μετά το 2006 (Peleg *et al.* 2008).

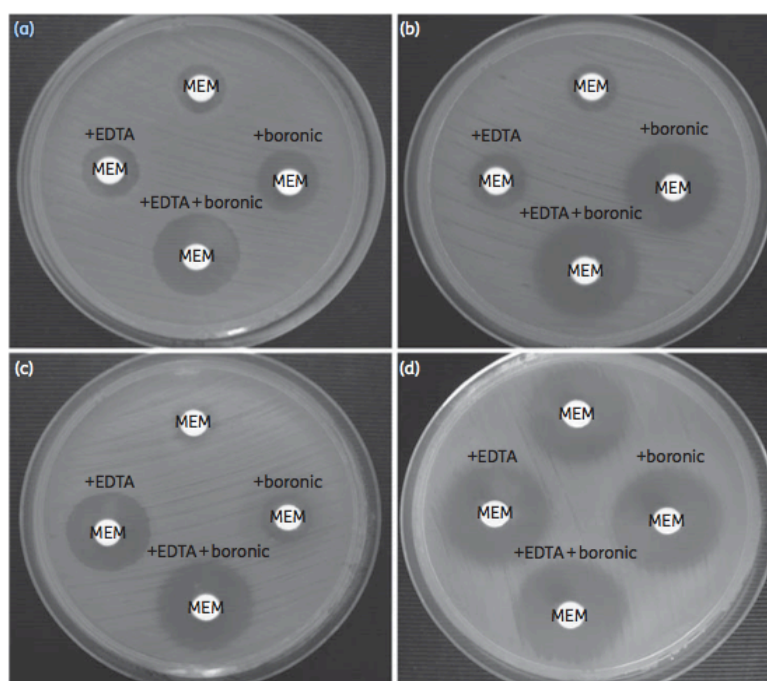
Ο μοριακός έλεγχος όλων των ύποπτων στελεχών, δεδομένου του υψηλού κόστους και της τεχνογνωσίας που χρειάζεται, είναι αδύνατο να συμβαίνει σε κάθε νοσοκομείο της περιφέρειας. Δεδομένης της ανάγκης αυτής, δημιουργήθηκε ένα φαινοτυπικό test, το οποίο με ιδιαίτερη ακρίβεια μπορεί να διαχωρίσει τα εντεροβακτηριακά που παράγουν KPC, δηλαδή τάξης A β –λακταμάση από αυτά που παράγουν MBLs καθώς και να διακρίνει την ταυτόχρονη έκφραση τους (Tsakris *et al.* 2010). Συνοπτικά σε ένα τρυβλίο MH (Mueller-Hinton) επιστρώνεται 0,5 MF μικροβίου και τοποθετούνται σε απόσταση 30 mm το ένα από το άλλο 4 δισκία μεροπενέμης. Το ένα δισκίο παραμένει αυτούσιο ενώ στο δεύτερο προστίθεται EDTA, στο τρίτο βορονικό οξύ (PBA) και στο τέταρτο και τα δύο μαζί. Διάμετρος άλου πάνω από 5 mm από την άλω που παρατηρούμε στο σκέτο δισκίο μεροπενέμης αξιολογείται και ορίζει την παραγωγή MBLs όταν την παρατηρούμε στο EDTA και τύπου KPC όταν την παρατηρούμε στο Βορονικό οξύ. Όταν παρατηρείται διευρυμένη άλως στο δισκίο που βρίσκονται και οι δύο ενώσεις, υπονοείται η συνύπαρξη

και των δύο ενζύμων. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου φαίνονται στο παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4 (Tsakris *et al.* 2010) Ειδικότητα και ευαισθησία φαινοτυπικής μεθόδου ανίχνευσης καρβαπενεμασών.

Combined-disc test	β-lactamase detected	Sensitivity	Specificity
PBA positive EDTA negative PBA/EDTA positive	KPC	100%	98,8%
PBA negative EDTA positive PBA/EDTA positive	MBL	100%	100%
PBA negative EDTA negative PBA/EDTA positive	MBL/KPC	96,8%	100%

Η έρευνα που αφορά αυτό το τεστ, έγινε σε στελέχη *Klebsiella*, ωστόσο προκύπτουν ικανοποιητικά αποτελέσματα και από τα άλλα δύο πολυανθεκτικά παθογόνα την *Pseudomonas* και το *Acinetobacter*. Έτσι κάθε πολυανθεκτικό στέλεχος πριν καταγραφεί για το σχέδιο Προκρούστης ελέγχεται αδρά φαινοτυπικά με την παραπάνω διαδικασία. Το test αυτό έχει εντάξει πλέον και τα περιφερειακά εργαστήρια που δεν έχουν τη δυνατότητα μοριακού ελέγχου στο πρόγραμμα επιδημιολογικής επιτήρησης συμβάλλοντας στον περιορισμό των στελεχών και τα κρούσματα λοιμώξεων.



Εικόνα 5: Φαινοτυπική δοκιμασία σε στέλεχος *K. pneumoniae*. Στέλεχος που παράγει KPC/VIM/ESBL(a), στέλεχος που παράγει KPC/ESBL(b), στέλεχος που παράγει μόνο VIM (c) και στέλεχος που παράγει AMPC/ESBL (d).

Ιζ. Κλινικά στοιχεία

1. Λοιμογόνοι παράγοντες:

Το *A. baumannii* είναι ένα ευκαιριακό παθογόνο του οποίου οι λοιμογόνοι παράγοντες παραμένουν υπό διερεύνηση. Τις τελευταίες δεκαετίες η ενδελεχής μελέτη της επιδημιολογίας και της αντοχής του μικροβίου στα αντιβιοτικά, περιόρισαν της πηγές και

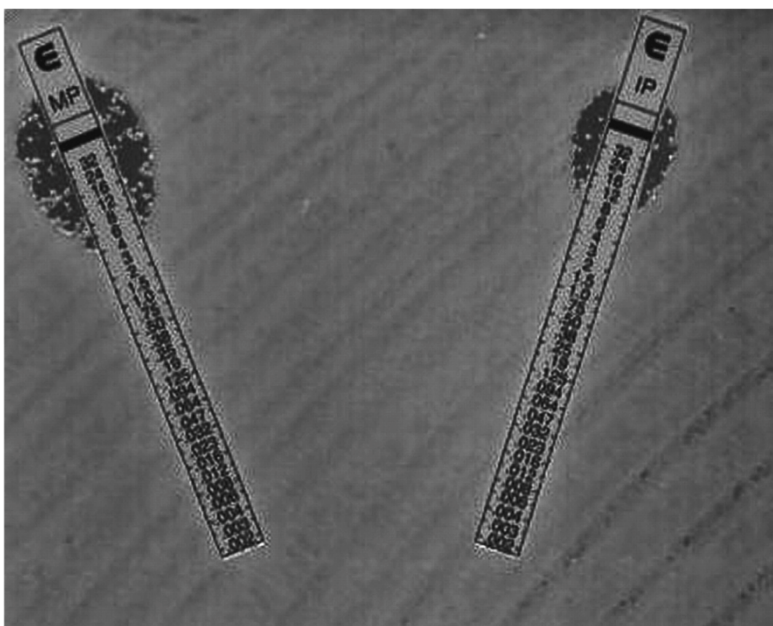
τις μελέτες για την παθογένεια του μικροβίου. Σημαντικό ρόλο στην εγκατάσταση της λοίμωξης παίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα καθώς και τα υποκείμενα νοσήματα του ασθενούς, ενώ η διασπορά του γίνεται κυρίως ιατρογενώς. Σημαντικοί παράγοντες κινδύνου για ανάπτυξη λοίμωξης από *A. baumannii* είναι η μεγάλη ηλικία του ασθενούς, η αντιμικροβιακή θεραπεία που λαμβάνει τις τελευταίες 90 μέρες, η χρήση συσκευών όπως: αιμοδιάλυσης, μηχανικός αερισμός, καθετήρες (κεντρικοί, φλεβικοί, ουρηθρικοί), το φαινοτυπικό προφίλ της χλωρίδας του νοσοκομείου, και η παρατεταμένη νοσηλεία του ασθενούς στο νοσοκομείο (κυρίως ΜΕΘ) ή σε μονάδες αυξημένης φροντίδας.

Αξιοσημείωτη είναι η ικανότητα μερικών στελεχών να παραμένουν σε ξηρές επιφάνειες πάνω από 20 μέρες σε σχέση με πρότυπα στελέχη αυξάνοντας με τον τρόπο αυτό σημαντικά τη δυνατότητα επιδημικής διασποράς (Attunes *et al.* 2011). Βασική προϋπόθεση για τον αποικισμό και τη λοίμωξη θεωρείται η ικανότητα προσκόλλησης του μικροβίου στα επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή. Αυτή επιτυγχάνεται μέσω ινιδίων καθώς και με την παρουσία ενός πολυσακχαριδικού ελύτρου, το οποίο αποτελείται από L-ραμνόζη, D-γλυκόζη, D-γλυκουρονικό οξύ και D-μανόζη και καθιστά την επιφάνεια του μικροβίου περισσότερο υδρόφιλη (Attunes *et al.* 2011). Ομοίως με τα υπόλοιπα Gram αρνητικά, σημαντικό ρόλο στη λοιμογόνο ικανότητα διαδραματίζει ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) της εξωτερικής μεμβράνης και το λιπίδιο A. Πολύ σημαντική θεωρείται η ικανότητα του μικροβίου να οργανώνεται με τη μορφή βιομεμβρανών (biofilm) πάνω σε ξένες επιφάνειες, δομή η οποία το προστατεύει από αντίξοες συνθήκες όπως η έλλειψη αυξητικών παραγόντων και η χημειοθεραπεία (Vidal *et al.* 1996). Στη δημιουργία του biofilm συμμετέχει η πρωτεΐνη ompA μία εξωτερική μεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία εφόσον προσκολληθεί στα επιθηλιακά κύτταρα συμμετέχει στην απόπτωση των κυττάρων. Ενώ τον ίδιο ακριβώς ρόλο φαίνεται πως διαδραματίζει και η φωσφολιπάση D, ευοδώνοντας τον αποικισμό του μικροβίου στα επιθηλιακά κύτταρα. Κάποια από τα στελέχη παράγουν λιπάσες που μπορεί να έχουν βλαπτική επίδραση στο λιπώδη ιστό, ενώ αρκετά έχουν τη δυνατότητα παραγωγής πρωτεολυτικών και κολλαγονολυτικών ενζύμων όπως προνάση και θρυψίνη. Στην παθογονικότητα του μικροβίου συμβάλλει και η ικανότητα του να απορροφά σίδηρο από τον ανθρώπινο οργανισμό, στερώντας το από τα μακροφάγα, τα οποία συμμετέχουν στην άμυνα του οργανισμού (Roca 2012).

Γενικότερα αυτό που προκύπτει από τη σύγχρονη βιβλιογραφία είναι ότι η παθογονικότητα του *A. baumannii* δεν οφείλεται στην ύπαρξη ισχυρών λοιμογόνων παραγόντων, αλλά οφείλεται κυρίως στις μεταβολικές του ικανότητες και την ανθεκτικότητα του μικροβίου υπό συνθήκες έντονου περιβαλλοντικού stress. Η θέση αυτή

ενισχύεται από το γεγονός ότι τα γονίδια, που κωδικοποιούν τους λοιμογόνους παράγοντες όπως η *ompA* και η φωσφολιπαση *D* ανιχνεύονται ακόμα και στο γονιδίωμα των μη λοιμογόνων στελεχών (SDF). Το SDF είναι στέλεχος *A. baumannii* ευαίσθητο σε όλα τα αντιβιοτικά που έχει απομονωθεί από ανθρώπινη ψείρα. Χρησιμοποιείται στις μελέτες παθογονικότητας του μικροβίου καθώς θεωρείται ότι δεν έχει καμία λοιμογόνο ικανότητα (Attunes *et al.* 2011).

Τέλος ένα άλλο χαρακτηριστικό πολλών μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων και του *A. baumannii* είναι η ετεροαντοχή. Ετεροαντοχή ορίζεται η ανθεκτικότητα ενός υποσυνόλου μικροβιακού πληθυσμού σε ορισμένα αντιβιοτικά, όταν γενικότερα με τις παραδοσιακές *in vitro* δοκιμασίες ευαισθησίας ο πληθυσμός αυτός θεωρείται ευαίσθητος σε αυτά τα αντιβιοτικά (Falagas *et al.* 2008). Στην βιβλιογραφία υπάρχουν τα ετερογενή κύτταρα τα οποία διατηρούν το φαινότυπο τους και τα λεγόμενα “persisters”, εμμένοντα, κύτταρα στα οποία ο φαινότυπος της ετεροαντοχής μπορεί να εξαλείφει εφόσον απομακρυνθεί ο δυσμενής περιβαλλοντικός παράγοντας δηλαδή η αντιμικροβιακή ουσία (Balaban *et al.* 2004). Το φαινόμενο της ετεροαντοχής έχει μελετηθεί περισσότερο στους σταφυλόκοκκους. Οι πρώτες αναφορές για ετεροαντοχή στο *A. baumannii* έγιναν από τους Rournaras *et al.* το 2005. Η μεγάλη πίεση που ασκούν οι καρβαπενέμες ως αντιβιοτικά εκλογής στα πολυανθεκτικά στελέχη οδήγησαν ουσιαστικά στην εμφάνιση υποπληθυσμών ανθεκτικών στα συγκεκριμένα αντιβιοτικά. Το φαινόμενο μελετήθηκε διεξοδικά και το 2009 προκύπτει μια ολοκληρωμένη έρευνα 14 στελεχών *A. baumannii*, μερικά από τα οποία έπειτα από τη διενέργεια πληθυσμιακής ανάλυσης ανέδειξαν την ύπαρξη υποπληθυσμών οι οποίες παρουσίασαν 2 έως 16 φορές υψηλότερη MIC από τον αρχικό «φυσικό» πληθυσμό (Ikonomidis *et al.* 2009). Τα στελέχη που επιλέγηκαν για την συγκεκριμένη έρευνα ήταν όλα φαινοτυπικά ευαίσθητα στις καρβαπενέμες και την κολιστίνη, ενώ όλα ελέγχθησαν με μοριακές τεχνικές MLST και PFGE. Εκτός από τις καρβαπενέμες το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί και στην κολιστίνη την τελευταία ίσως θεραπευτική επιλογή για τα MDR στελέχη *A. baumannii* (Li *et al.* 2006). Ενδιαφέρον στοιχείο, αποτελεί η συσχέτιση του φαινομένου με προηγούμενη θεραπεία με κολιστίνη (Hawley *et al.* 2008). Μέχρι και σήμερα πάντως λόγω της δυσκολίας να εντοπιστούν αυτοί οι ετεροάντοχοι πληθυσμοί, δεν μπορεί να υπολογιστεί η συχνότητά τους καθώς και το ποσοστό συμμετοχής τους στην επικράτηση και διασπορά των πολυανθεκτικών στελεχών. Αυτό που προκύπτει από την βιβλιογραφία είναι ότι το φαινόμενο της ετεροαντοχής είναι ένας καθοριστικός παράγοντας θεραπευτικής αποτυχίας των συγκεκριμένων λοιμώξεων (Moore *et al.* 2003) και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.



Εικόνα 6: Etests ιμιπενέμης και μεροπενέμης σε *A. baumannii*. Φαίνονται οι ανθεκτικοί υποπληθυσμοί (Pournaras *et al.* 2005).

2. Λοιμώξεις από *A. baumannii*:

Η πλειοψηφία στελεχών *A. baumannii* απομονώνονται από το αναπνευστικό νοσηλευόμενων ασθενών. Η νοσοκομειακή πνευμονία από *A. baumannii* και συγκεκριμένα αυτή που σχετίζεται με αναπνευστήρα (VAP, ventilator associated pneumonia) από *A. baumannii* ανέρχεται ακόμα και στο 10% των περιπτώσεων πνευμονίας σε νοσηλευόμενους ασθενείς μονάδων εντατικής θεραπείας. Σε περιοχές όπως η Αυστραλία και η Ασία έχουν αναφερθεί ακόμη και περιπτώσεις εξωνοσοκομειακής πνευμονίας, η οποία επέρχεται μετά από παρατεταμένη φορεία του μικροβίου στο ανώτερο αναπνευστικό και αφορά κυρίως ασθενείς με ιστορικό κατάχρησης αλκοόλ (Peleg *et al.* 2008).

Βακτηριαμία εμφανίζεται πολύ συχνά δευτεροπαθώς σε ασθενείς της Μ.Ε.Θ με πνευμονία ή λοιμώξεις τραυμάτων. Σε αυτές τις περιπτώσεις το *A. baumannii* ενδέχεται να απομονωθεί μόνο του ή συχνότερα σε συνδυασμό με άλλα μικρόβια (Cisneros *et al.* 2002). Ιδιαίτερη προσοχή σε περίπτωση βακτηριαμίας χρειάζεται στα νεογνά. Αρνητικοί προγνωστικοί παράγοντες στα παιδιά αποτελούν το χαμηλό βάρος γέννησης, ο τραυματισμός και οι ενδοφλέβιοι καθετήρες ενώ στους ενήλικους η προηγούμενη χρήση τρίτης γενιάς κεφαλοσπορινών, η παρουσία ενδαγγειακών συσκευών, η παραμονή στη

ΜΕΘ, η προχωρημένη ηλικία, ο μηχανικός αερισμός, η νεφρική ανεπάρκεια και η παράταση της παραμονής στο νοσοκομείο (Wareham *et al.* 2008). Αξίζει να σημειωθεί ότι η βακτηριαμία από *A. baumannii* αποτελεί ένα χρήσιμο δείκτη αληθινής λοίμωξης, ενώ η απομόνωσή του από πληγές ή από το αναπνευστικό μπορεί να δείχνει περισσότερο αποικισμό (Wareham *et al.* 2008). Η κλινική εικόνα δεν είναι ειδική και κυμαίνεται από πολύ ήπια λοίμωξη μέχρι σηπτική καταπληξία, ενώ στο μεγαλύτερο ποσοστό της συμβαίνει κατά τη δεύτερη εβδομάδα παραμονής στο νοσοκομείο (Wareham *et al.* 2008).

Οι λοιμώξεις μαλακών μορίων και δέρματος είναι πολύ συχνό φαινόμενο κυρίως σε στρατιωτικούς πληθυσμούς. Χειρότερη πρόγνωση έχουν οι λοιμώξεις δέρματος σε εγκαυματικές επιφάνειες (Trottier *et al.* 2007). Το *A. baumannii* ήταν ο πιο συχνός Gram αρνητικός βάκιλος που μόλυνε τα τραύματα των στρατιωτών στον πόλεμο του Βιετνάμ. Τη διαπύηση των τραυμάτων ακολουθούσε συνήθως βακτηριαμία 3-5 μέρες αργότερα. Ακόμη και κατά τη διάρκεια του πολέμου στο Ιράκ το 2003, το *A. baumannii* έπαιξε κυρίαρχο ρόλο στις δερματικές λοιμώξεις. Η διαφορά με το Βιετνάμ είναι ότι τα περισσότερα στελέχη πλέον ήταν πολυανθεκτικά.

Μηνιγγίτιδα συνήθως εμφανίζεται δευτεροπαθώς σε ασθενείς με κρανιακά τραύματα και μετά από νευροχειρουργικές επεμβάσεις, περιγράφονται ωστόσο και σποραδικά κρούσματα πρωτοπαθούς μηνιγγίτιδας. Παράγοντες όπως η μόνιμη επικοινωνία των κοιλιών με το εξωτερικό περιβάλλον, η κοιλιοστομία, το συρίγγιο εκροής εγκεφαλονωτιαίου υγρού και η παρουσία καθετήρων των κοιλιών για περισσότερες από 5 ημέρες αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης μηνιγγίτιδας οφειλόμενης σε *A. baumannii*. Η κλινική εικόνα μπορεί να είναι οξεία ή και ήπια. Πολλές φορές στην Gram χρώση μπορεί το *Acinetobacter* να εκληφθεί ως μηνιγγιτιδόκοκκος (Mendell *et al.* 2005) ή ως *H. influenzae* (Gillespie & Hawkey, 2006) επηρεάζοντας σημαντικά τη θεραπεία. Η θνητότητα βρίσκεται σε υψηλά ποσοστά (από 20% έως 27%) και εξαρτάται από την άμεση χορήγηση της κατάλληλης αντιμικροβιακής αγωγής.

Λιγότερο συχνές λοιμώξεις αποτελούν οι ουρολοιμώξεις ανωτέρου κυρίως ουροποιητικού οι οποίες συμβαίνουν σε καθετηριασμένους ασθενείς, κατά την πλειοψηφία τους άνδρες (Pedraza F. *et al.* 1993). Έχουν επίσης αναφερθεί σποραδικά κρούσματα ενδοκαρδίτιδας μετά από οδοντιατρικές επεμβάσεις και εγχειρήσεις ανοικτής καρδιάς (Olut *et al.* 2005), περιτονίτιδα σε ασθενείς που υπόκεινται σε συνεχή περιτοναϊκή κάθαρση, λοιμώξεις του οφθαλμού σε άτομα που φέρουν φακούς επαφής, χολαγγειίτιδα και άλλες σηπτικές επιπλοκές της διαδερμικής τρανσηπατικής χολαγγειογραφίας, κυρίως σε ηλικιωμένους ασθενείς με χολόσταση από κακήθες νόσημα ή χολολιθίαση. Ακόμη πιο

σπάνια περίπτωση λοίμωξης από *A. baumannii* είναι η οστεομυελίτιδα μετά από ατύχημα των κάτω άκρων (Dietz *et al.* 2008).

Γενικότερα, η λοίμωξη από *A. baumannii* υποδηλώνει ότι στο ιστορικό του ασθενούς συνήθως προϋπάρχει νοσηλεία σε μονάδα εντατικής θεραπείας ή γενικότερα μακροχρόνια νοσηλεία σε νοσοκομείο.

3. Κλινική έκβαση των λοιμώξεων:

Είναι δύσκολο να διευκρινιστεί το ποσοστό συμμετοχής της λοίμωξης από *A. baumannii* στην έκβαση της πορείας ενός ασθενούς, δεδομένης φυσικά της προτίμησης του συγκεκριμένου μικροβίου να αποικίζει και να προκαλεί λοίμωξη σε βαριά άρρωστους ασθενείς. Το γεγονός αυτό διερευνάται ακόμα και σήμερα, ενώ αποτελεί θέμα συζήτησης για αρκετούς μελετητές (Falagas *et al.* 2006) (Sunenshine *et al.* 2007). Σε αντίστοιχη μελέτη η οποία διενεργήθηκε για το CDC έγινε προσπάθεια ρύθμισης των εξαρτημένων μεταβλητών, έτσι ώστε να μελετηθούν δύο ομάδες ασθενών. Το πρώτο περιελάμβανε ασθενείς βαριά άρρωστους με συνυπάρχουσα λοίμωξη από *A. baumannii*, ενώ το δεύτερο ίδιας βαρύτητας ασθενείς με μακρά νοσηλεία, χωρίς όμως λοίμωξη από *A. baumannii*. Αυτό που προκύπτει από την συγκεκριμένη έρευνα είναι ότι δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά στο ποσοστό θνησιμότητας ανάμεσα στα δύο groups. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνεται από αρκετές μελέτες (Blot *et al.* 2003, Albrecht *et al.* 2006) και αντικρούεται από ακόμα περισσότερες (Abbo *et al.* 2007, Garcia-Garmendia *et al.* 1999, Grupper *et al.* 2007, Kwon *et al.* 2007). Αυτό που είναι αδιαμφισβήτητο είναι η αύξηση της θνησιμότητας ασθενών στους οποίους εκτός από ένα Gram αρνητικό όπως η *Klebsiella* απομονωθεί και *A. baumannii* (Jerass *et al.* 2006). Τέλος υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν ότι η αρχική εμπειρική αγωγή σε ασθενείς που εντέλει νοσούν από MDR στελέχη δεν συμμετέχει στην αύξηση του ποσοστού θνησιμότητας (Kwon *et al.* 2007). Για να συνοψίσουμε, αυτό που προκύπτει είναι ότι το *A. baumannii* δεν μπορεί πλέον να θεωρείται παθογόνο μικρής λοιμογόνου ικανότητας. Πρόκειται για ένα μικροοργανισμό, ο οποίος εξελίσσεται διαρκώς. Η εξέλιξη του αυτή τεκμηριώνεται από συγκριτικές μελέτες γονιδιώματος (Fournier *et al.* 2006), καθώς και από την απόκτηση καθοριστικών παραγόντων που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά.

Ιη. Αντιμικροβιακή θεραπεία και ανάπτυξη αντοχής.

Πριν το 1970 η αντιμετώπισή του *A. baumannii* περιελάμβανε ευρέως φάσματος αντιβιοτικά όπως β- λακτάμες αμινογλυκοσίδες και τετρακυκλίνες. Πλέον τα περισσότερα στελέχη έχουν αναπτύξει αντοχή σχεδόν σε όλες τις κατηγορίες αντιβιοτικών, αφήνοντας ουσιαστικά τον κλινικό γιατρό χωρίς θεραπευτικές επιλογές. Οι καρβαπενέμες μέχρι πρότινος αποτελούσαν την πρώτη θεραπευτική επιλογή. Η αύξηση ωστόσο των ανθεκτικών στελεχών *A. baumannii* σε αυτή την κατηγορία αντιβιοτικών περιορίζει αρκετά τη χρήση τους. Η σουλμπακτάμη μόνη της ή σε συνδυασμό με αμπικιλλίνη συνήθως δρα καλά απέναντι σε αυτούς τους μικροοργανισμούς (Montero *et al.* 2004), ενώ και η κολιστίνη (παράγωγο πολυμυξίνης E) αποτελεί φάρμακο εκλογής, σε περιπτώσεις πολυανθεκτικών στελεχών (MDR). Οι μόνοι περιορισμοί της κολιστίνης είναι η νεφροτοξικότητα και η πιθανή ανάπτυξη αντοχής στο αντιβιοτικό καθώς αποτελεί ένα από τα τελευταία θεραπευτικά όπλα των κλινικών. Ανθεκτικά στελέχη καθώς και στελέχη με ετεροαντοχή στην κολιστίνη έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Hawley *et al.* 2008). Η τιγκεκυκλίνη, ένα ημισυνθετικό παράγωγο της μινοκυκλίνης, παρά τις αρχικές προσδοκίες δεν κατάφερε να βοηθήσει όσο αναμενόταν στην καταπολέμηση των MDR στελεχών και ήδη έχουν εμφανιστεί στελέχη ανθεκτικά σε αυτή (Peleg *et al.* 2008). Πιο συγκεκριμένα η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου σε βακτηριαμίες κρίνεται λιγότερο αποτελεσματική σε σχέση με την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου σε λοιμώξεις αναπνευστικού, ιστών και δέρματος. Η τιγκεκυκλίνη θα πρέπει να αποφεύγεται σε περιπτώσεις που υπάρχει υποψία λοίμωξης από *Pseudomonas*, ενώ έχει αναφερθεί αύξηση της MIC κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Τελευταία, θετικές προοπτικές υπάρχουν για την μινοκυκλίνη ενώ μία καινούρια κατηγορία πεπτιδίων έχει αναπτυχθεί και φαίνεται να απαντά καλά στις λοιμώξεις από MDR *A. baumannii*. Τα μικτά θεραπευτικά σχήματα προτιμούνται πάντα στην καταπολέμηση του *A. baumannii*. Με αυτά τα σχήματα έχουμε τη δυνατότητα να μειώσουμε τις δόσεις των αντιβιοτικών που θα δίνουμε σαν μονοθεραπεία, τα αντιβιοτικά δρουν συνεργικά αυξάνοντας τα ποσοστά εκρίζωσης του μικροοργανισμού, ενώ είναι πολύ πιο δύσκολο να αναπτυχθούν μηχανισμοί αντοχής. Συνήθως τα σχήματα αυτά περιλαμβάνουν α) β-λακτάμες με αναστολείς β-λακταμασών ή σε συνδυασμό με αμινογλυκοσίδες ή φλουοροκινολόνες, β) αμπικιλίνη/σουλμπακτάμη ή σουλμπακτάμη με κεφεπίμη ή καρβαπενέμη και γ) πολυμυξίνη B, ιμιπενέμη και ριφαμπικίνη (Ferrara 2006, Rahal 2006). Τελευταία, ο συνδυασμός κολιστίνης, ριφαμπικίνης φαίνεται να έχει καλά θεραπευτικά αποτελέσματα.

Σε αντίθεση, ο συνδιασμός ριφαμπικίνης με καρβαπενέμες δε φαίνεται να προσφέρει τα αναμενόμενα θεραπευτικά αποτελέσματα στα MDR στελέχη. Οι μελέτες ωστόσο που αφορούν των συνδιασμό φαρμάκων σε MDR στελέχη *A. baumannii* είναι περιορισμένες και τα περισσότερα στοιχεία προκύπτουν από *in vitro* έρευνες (Roca *et al.* 2012).

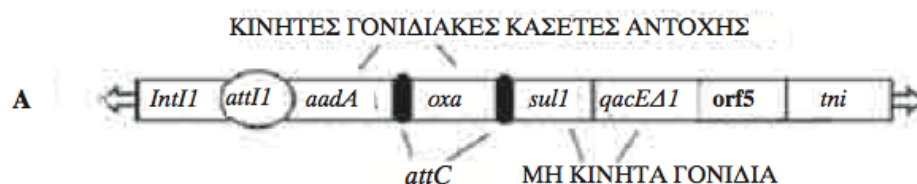
Συνεπώς όλα αυτά τα στοιχεία πρέπει να συνεκτιμηθούν καθώς πολλές φορές τα *in vitro* αποτελέσματα αντοχής δεν συχετίζονται με την *in vivo* αποτελεσματικότητα ενός φαρμάκου σε ένα ασθενή (Petrosillo *et al.* 2008).

Μηχανισμοί αντοχής στα αντιβιοτικά

Οι μηχανισμοί αντοχής του *A. baumannii*, που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα είναι αρκετοί και ανταγωνίζονται τους μηχανισμούς των άλλων αζυμωτικών Gram αρνητικών παθογόνων. Η παγκόσμια διασπορά των ανθεκτικών στελεχών, αποδεικνύει τη μοναδική ικανότητα του συγκεκριμένου μικροβίου να προσαρμόζεται σε εναλλασσόμενες και δύσκολες περιβαλλοντικές συνθήκες. Η μακρόχρονη επιβίωση του, ακόμα και σε εντελώς ξηρές επιφάνειες χωρίς τα απαιτούμενα διατροφικά στοιχεία του δίνει την ικανότητα να προσλαμβάνει γονίδια αντοχής από άλλα μικρόβια καθιστώντας το ακόμα πιο ισχυρό στην βακτηριοκτόνο δράση των αντιβιοτικών.

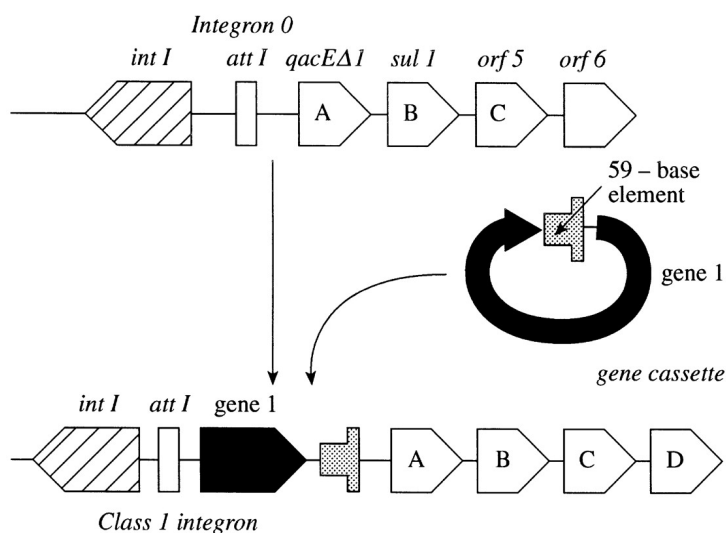
Τα **ιντεγκρόνια** είναι γενετικά στοιχεία τα οποία αναγνωρίζουν και ενσωματώνουν κινητά γονίδια τα οποία προσδίδουν στους μικροοργανισμούς ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά ή ρυθμίζουν άλλες βασικές λειτουργίες. Τα γονίδια αυτά τα οποία έχουν μία ιδιαίτερη δομή ονομάζονται **γονιδιακές κασέτες** (Recia and Hall 1995). Η δομή τους περιορίζεται στην ύπαρξη ενός γονιδίου και μίας ατελούς ανεστραμμένης επανάληψης IR στο 3' άκρο αυτού του γονιδίου που ονομάζεται attC (αλληλουχία ανασυνδιασμού ειδικής θέσης) ή στοιχείο των 59 βάσεων. Τα ιντεγκρόνια αποτελούνται από την 5' συντηρημένη περιοχή (5'-CS) μήκους περίπου 1.4kb, την 3' συντηρημένη περιοχή (3'-CS) μήκους περίπου 2kb και την ενδιάμεση μεταβλητή περιοχή (Bennet 2009). Η 5' συντηρημένη περιοχή φέρει ένα γονίδιο που κωδικοποιεί την ιντεγκράση, ένζυμο το οποίο καταλύει τον τοπο-ειδικό ανασυνδυασμό (site-specific recombination) γονιδιακών κασετών στη συντηρημένη αλληλουχία attI. Η κινητικότητα των γονιδιακών κασετών εξαρτάται από την ιντεργκάση (εκτός από την ενσωμάτωση της γονιδιακής κασέτας καταλύει και την εκτομή της, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα στις κασέτες των γονιδίων να μεταπηδούν από τον ένα γενετικό τόπο στον άλλο), την ειδική θέση ανασυνδιασμού attC και attI.

Θεωρητικά μπορεί να υπάρξουν ως ελεύθερα, κυκλικά μόρια DNA τα οποία προέκυψαν από εκτομή μέσω της ιντεγκράσης από παλαιότερα ενσωματωμένες γονιδιακές κασέτες στο ίδιο ή σε άλλο ιντεγκρόνιο. Οι γονιδιακές κασέτες δεν έχουν δικό τους υποκινητή και αντιγράφονται χρησιμοποιώντας ένα κοινό υποκινητή (Pc) που βρίσκεται στην 5' συντηρημένη περιοχή του ιντεγκρονίου. Η θέση της γονιδιακής κασέτας στο ιντεγκρόνιο καθορίζει τα επίπεδα αντοχής που εκφράζονται στο φαινότυπο και το υψηλότερο επίπεδο αντοχής εκφράζεται όταν η κασέτα είναι τοποθετημένη ακριβώς μετά την 5' συντηρημένη περιοχή του ιντεγκρονίου. Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί και η πρώτη γονιδιακή κασέτα με δικό της υποκινητή και αφορά εκείνη που καθορίζει την αντοχή στην χλωραμφενικόλη *cmlA*. Η ταξινόμηση των ιντεγκρονίων είναι βασισμένη στην ιντεγκράση και προς το παρόν έχουν δηλωθεί εννέα τάξεις. Τα μέλη της πρώτης, δεύτερης, τρίτης, τέταρτης και πέμπτης τάξης περιέχουν γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά και σχετίζονται με μεταθετά στοιχεία DNA όπως συζευκτικά πλασμίδια, τρανσποζόνια και ακολουθίες ενσωμάτωσης (IS). Τα στοιχεία αυτά παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην διασπορά γενετικού υλικού μεταξύ στελεχών του ίδιου ή διαφορετικού είδους. Τα πιο συχνά ιντεγκρόνια σε κλινικά στελέχη είναι τα ιντεγκρόνια τάξης 1 στα οποία έχουν βρεθεί πάνω από 80 γονιδιακές κασέτες αντοχής οι οποίες εμπεριέχουν γονίδια αντοχής για όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, αμινογλυκοσίδες, χλωραμφενικόλη, τριμεθοπίμη, ριφαμπικίνη, ερυθρομυκίνη, φωσφομυκίνη, λινκομυκίνη.

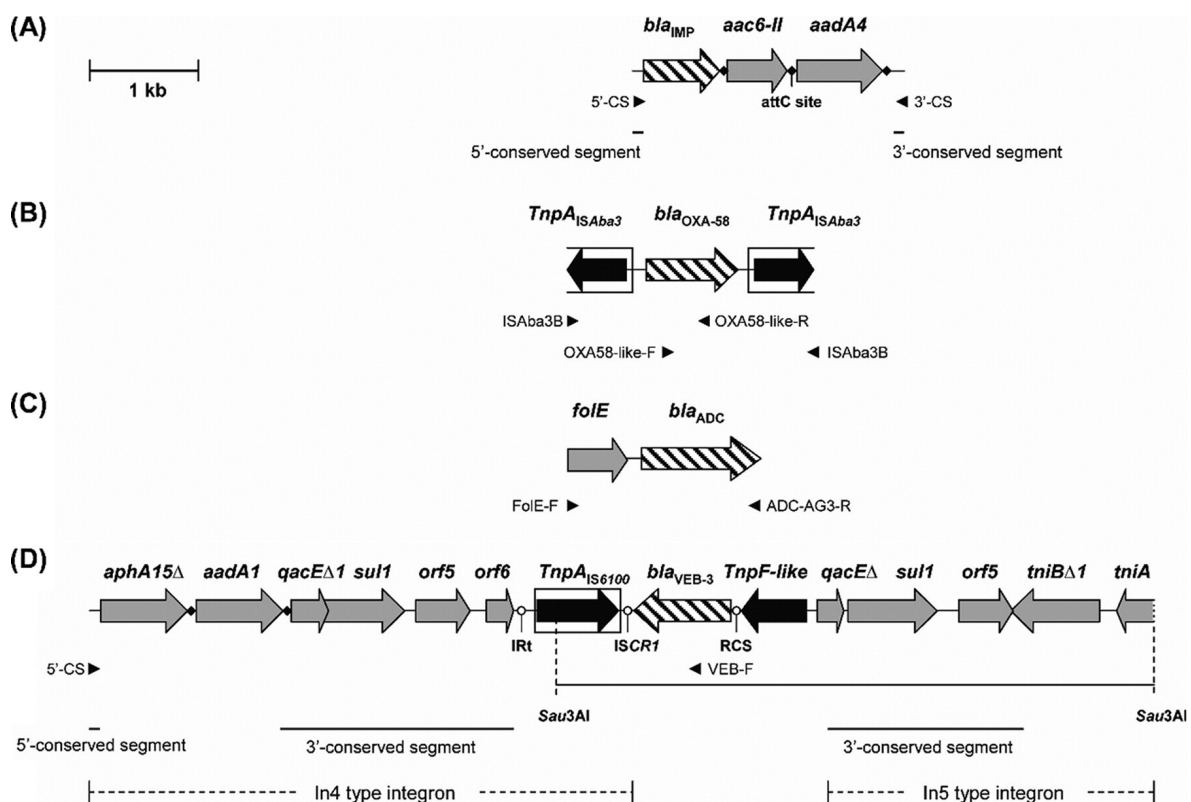


Εικόνα 7 : Α) τυπικό ιντεγκρόνιο τάξης 1.

Η επιδημιολογία των ιντεγκρονίων είναι πολύ δύσκολο να μελετηθεί διότι απαιτούνται πολύπλοκες και χρονοβόρες τεχνικές. Οι μελέτες από τις οποίες προέρχονται οι εικόνες παρουσιάζουν την ευρεία παγκόσμια διασπορά των ιντεγκρονίων όσο αφορά τα εντεροβακτηριακά διαδραματίζοντας σημαίνοντα ρόλο στο φαινότυπο αντοχής τους. Η παρουσία τους συνήθως σχετίζεται με αντοχή σε πολλαπλά αντιβιοτικά.



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της ενσωμάτωσης γονιδιακών κασετών σε ιντεγκρονικές δομές (Bennett, 1999).

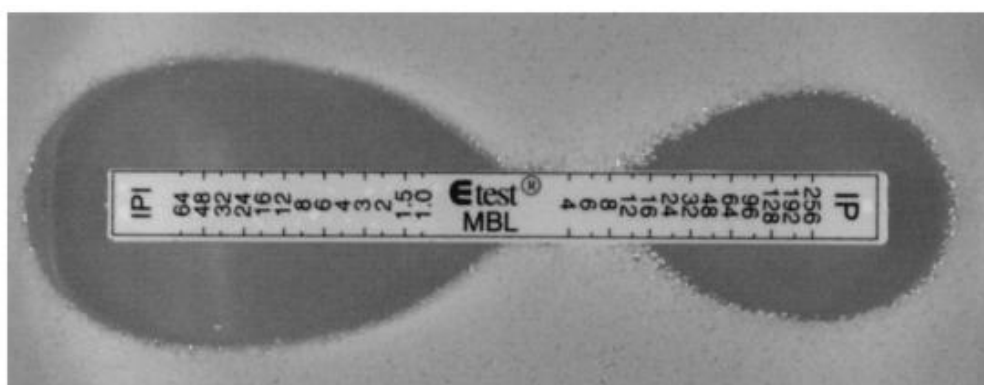


Εικόνα 9: Παρουσιάζονται οι γονιδιακές κασέτες που έχουν βρεθεί για το είδος του *Acinetobacter*. Τα γονίδια των β-λακταμασών παρουσιάζονται με τα βέλη με τις διαγώνιες ρίγες (Huang *et al.* 2010).

β-λακταμικά: Ο κυριότερος μηχανισμός αντοχής των *A. baumannii* στα β-λακταμικά αντιβιοτικά είναι η ενζυμική απενεργοποίησή τους από τις β-λακταμάσες. Οι AmpC κεφαλοσπορινάσες είναι β-λακταμάσες τάξης C σύμφωνα με τη μοριακή ταξινόμηση κατά Ambler. Τις συναντάμε σε όλα τα στελέχη *A. baumannii* καθώς το γονίδιο που τις εκφράζει είναι χρωμοσωματικό και σχετίζεται άμεσα με την αλληλουχία IS*Aba1*. Η παρουσία τους εξασφαλίζει ανθεκτικότητα των στελεχών στις κεφαλοσπορίνες ενώ αφήνει ανεπηρέαστη τη δράση της κεφεπίμης και των καρβαπενεμών.

Οι β-λακταμάσες τάξης A είναι οι εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (ESBLs, extended spectrum β-lactamases). Τα ένζυμα αυτά έχουν ανιχνευθεί στα *A. baumannii* και κατέχουν ένα μεγάλο μερίδιο ευθύνης για την ανθεκτικότητα των μικροβίων. Η VEB-1 υδρολύει την αμοξικιλίνη, την τικαρσιλίνη, την πιπερακιλίνη, την κεφοταξίμη, την κεφταζιδίμη και την αζτρεονάμη (Poirel *et al.* 1999). Το γεγονός αυτό όμως αντιστρέφεται με την παρουσία του κλαβουλανικού οξέος και έτσι η β-λακταμάση ανιχνεύεται φαινοτυπικά από την παρατηρούμενη συνέργεια αυτών των αντιβιοτικών με το κλαβουλανικό οξύ, η οποία επιτείνεται παρουσία κλοξακιλίνης που απενεργοποιεί τις ενδογενείς τύπου AmpC κεφαλοσπορινάσες στο *A. baumannii* (Poirel *et al.* 1999). Το γονίδιο που κωδικοποιεί την VEB 1 ανευρίσκεται σε ιντεγκρόνια τάξης 1. Η συγκεκριμένη β-λακταμάση ανιχνεύθηκε πρώτη φορά στη Γαλλία ενώ πλέον υπάρχουν αναφορές και από το Βέλγιο και την Αργεντινή. Η PER-1 και PER-2 υδρολύουν αποτελεσματικά την αμοξικιλίνη, τη τικαρσιλίνη, τη κεφαλοθίνη και τις ευρέος φάσματος κεφαλοσπορίνες. Η δράση τους αναστέλλεται από το κλαβουλανικό οξύ, τη σουλμπακτάμη, την ιμιπενέμη και τις κεφαμυκίνες. Το γονίδιο *bla*_{PER-1} είναι πλασμιδιακό αλλά και χρωμοσωμικό. Αναφορές για την PER-1 υπάρχουν από Γαλλία, Βέλγιο, Τουρκία, Ρουμανία, Κορέα και Η.Π.Α. Η PER-2 έχει ανιχνευθεί στην Αργεντινή. Η φορεία του *bla*_{PER-1} έχει συσχετιστεί με ιδιαίτερα λοιμογόνους κλώνους *A. baumannii* (Vahaboglu *et al.* 2001). Άλλες ESBLs που έχουν ανιχνευθεί σε αυτά τα μικρόβια είναι οι TEM-92 και -116 σε Ιταλία και Ολλανδία αντίστοιχα (Endimiani *et al.* 2007), οι SHV -12 σε Κίνα και Ολλανδία (Huang *et al.* 2004, Naiemi *et al.* 2005) και οι CTX-M-2 και CTX-M-43 σε Βολιβία και Ιαπωνία αντίστοιχα. TEM-1 και -2 στενού φάσματος (narrow spectrum β-lactamases) έχουν επίσης ανιχνευθεί, ωστόσο η κλινική τους σημασία είναι περιορισμένη, δεδομένης της μικρής συμμετοχής τους στους μηχανισμούς αντοχής. Κανένα από τα προαναφερόμενα ένζυμα δεν ευθύνεται για την ανθεκτικότητα του *A. baumannii* στις καρβαπενέμες. Αυτό οφείλεται είτε στην

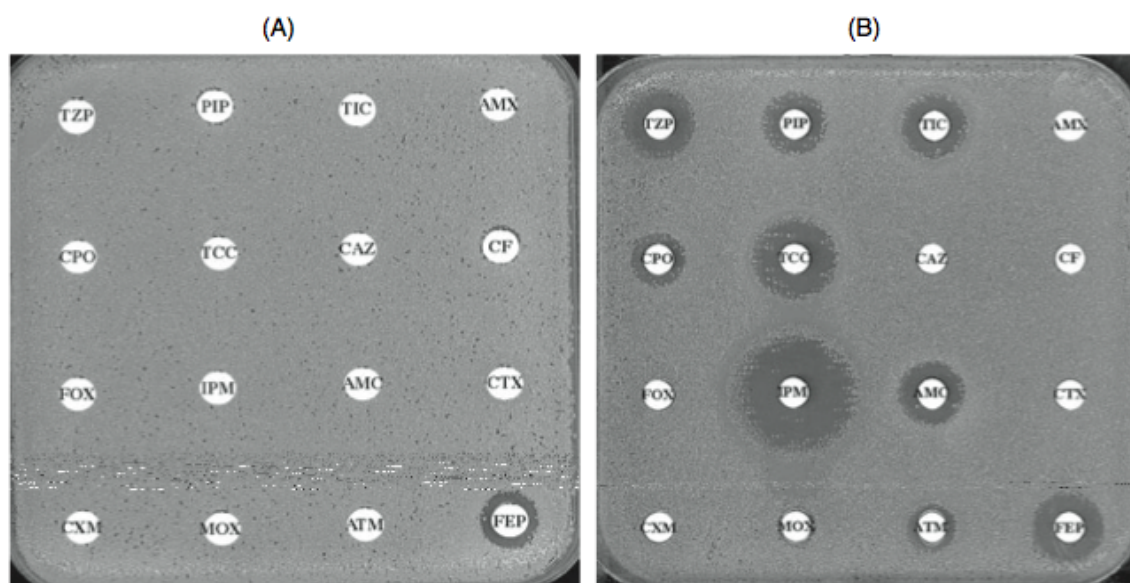
ύπαρξη ομάδας B κατά Ambler μέταλλο β-λακταμασών ή ομάδας D κατά Ambler, οξακιλινάσες. Οι μεταλλο-β-λακταμάσες (MBLs) αναστέλλονται από την ύπαρξη EDTA (χηλικός παράγοντας), ενώ οι οξακιλινάσες αναστέλλονται από την παρουσία NaCl. Αυτό βοηθά στην φαινοτυπική τους ανίχνευση στο εργαστήριο. Έτσι χρησιμοποιώντας διπλά E test ιμιπενέμης τα οποία από το ένα άκρο έχουν EDTA και από το άλλο όχι μπορούν να προσδιοριστούν τα στελέχη τα οποία παράγουν MBLs.



Εικόνα 10: Στέλεχος που παράγει IMP-1 μέταλλο β-λακταμάση. Η MIC της ιμιπενέμης μειώθηκε από 16 µg/ml σε < 1 µg/ml μετά την έκθεση σε EDTA (Walsh *et al.* 2002). Αφορά στέλεχος *Serratia marcescens*.

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί έξι group MBLs (IMP-like, VIM-like, NDM, SIM-1, SPM-1 και GIM-1 enzymes) από τις οποίες μόνο οι τέσσερις πρώτες συναντώνται στα *A. baumannii*. Έχουν ανιχνευθεί έξι υπότυποι IMP ενώ πολύ σπάνια είναι η ανίχνευση VIM. Πιο συγκεκριμένα στην περιοχή της Βόρειας Κορέας όπου επικρατεί η μέταλλο β-λακταμάση VIM στις *P. aeruginosa* και τα Εντεροβακτηριακά ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά η παρουσία VIM-2 και SIM-1 (Yum *et al.* 2002, Lee *et al.* 2003, Lee *et al.* 2005). Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα συγκεκριμένα ένζυμα *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} και *bla*_{SIM} εδράζονται σε πλασμιδιακό DNA και αυτό εξηγεί την μεταβίβασή τους στα *Acinetobacter* από αλλά μικρόβια π.χ *Pseudomonas* σε περιοχές όπως η Ιταλία και η Κορέα. Η υδρολυτική ικανότητα των MBLs απέναντι στις καρβαπενέμες είναι 100 -1000 φορές μεγαλύτερη από αυτή των οξακιλινασών ωστόσο, η ποσοτική υπεροχή των τελευταίων στο *A. baumannii*

είναι αυτό που τις καθιστά τον κύριο μηχανισμό αντοχής στις καρβαπενέμες. Γονίδιο που κωδικοποιεί οξακιλινάση ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά σε στέλεχος του 1985 στο Εδιμβούργο της Σκωτίας και ονομάστηκε ARI-1. Μετά την αλληλούχισή του ονομάστηκε bla_{OXA}-23. Το ένζυμο αυτό (OXA-23) συμβάλλει στην ανθεκτικότητα των *A. baumannii* έναντι στις καρβαπενέμες παγκοσμίως. Υποτύποι του συγκεκριμένου ενζύμου είναι οι OXA-27 και OXA-49. Άλλη ομάδα CHDLs (carbapenem-hydrolysing oxacillinases) είναι η OXA-24, η OXA-25, η OXA-26 και η OXA-40 (Peleg *et al.* 2008).



Εικόνα 11: Αντιβιογράμμα δύο στελεχών *A. baumannii*. Στο (Α) υπάρχει έκφραση της OXA-40 οξακιλινάσης, ενώ στο (Β) στέλεχος έχει γίνει απενεργοποίηση του ενζύμου.

Οι OXA-24 και OXA-25 έχουν απομονωθεί από ανθεκτικά στελέχη στην Ισπανία, ενώ η OXA-26 στο Βέλγιο. Ένα τρίτο και πολύ σημαντικό group CHDLs εμπεριέχει την OXA-58. Η OXA-58 β-λακταμάση περιγράφηκε το 2005 Poirel *et al.*, 2005b σε ένα κλινικό στέλεχος *A. baumannii* της Γαλλίας ως πλασμιδιακή καρβαπενεμάση της μοριακής τάξης D κατά Ambler. Είναι πολύ κοντά δομικά στα ένζυμα OXA-51 και OXA-69, ενώ έχει απομονωθεί σε πάρα πολλές περιοχές όπως η Ρουμανία, η Ιταλία, η Τουρκία, η Αγγλία, η Αργεντινή, το Κουβέιτ, η Αυστρία συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας. Στη χώρα μας υπάρχουν κρούσματα λοιμώξεων από τα συγκεκριμένα στελέχη σε μονάδες εντατικής θεραπείας και η διασπορά του αποτελεί σημαντικό επιδημιολογικό πρόβλημα (Roumparas *et al.* 2006). Η OXA-58 είναι στενού φάσματος β-λακταμάση που υδρολύει κυρίως πενικιλίνες. Η υδρόλυση της ιμιπενέμης είναι μικρή ενώ η OXA-58 δεν υδρολύει τη μεροπενέμη, εάν και η συγγένεια του ενζύμου είναι μεγάλη για το υπόστρωμα αυτό. Το

ένζυμο αναστέλλεται μερικώς από το κλαβουλανικό οξύ, την ταξομπακτάμη και τη σουλμπακτάμη αλλά η αναστολή είναι ισχυρή από το NaCl. Για να συνοψίσουμε, μέχρι στιγμής υπάρχουν τρεις κύριες κατηγορίες CHDLs είναι οι OXA-23-like, OXA-40-like, και OXA-58. Ωστόσο το 2009 από ένα στέλεχος που απομονώθηκε στη Βραζιλία το 2004 απομονώθηκε μία καινούρια καρβαπανεμάση η OXA-143. Το στέλεχος αυτό ήταν ανθεκτικό στις καρβαπενέμες αλλά καμία γνωστή καρβαπανεμάση δε μπορούσε να απομονωθεί από το γονιδίωμά του. Μελέτες που ακολούθησαν, αποκάλυψαν την παρουσία μίας καινούριας καρβαπανεμάσης της OXA-143, η οποία υδρολύει πενικιλίνη, την οξακιλίνη, την μεροπενέμη και την ιμιπενέμη αλλά όχι ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες. Η OXA-40 φαίνεται ότι είναι η πιο κοντινή καρβαπανεμάση στην καινούρια OXA-143 καθώς υπάρχει ομολογία στην αλληλουχία της κατά 88% (Higgins *et al.* 2009).

Το 2008 στη Σουηδία πεθαίνει ασθενής από λοίμωξη ουροποιητικού. Ο συγκεκριμένος ασθενής ανέφερε στο ιστορικό του ταξίδι στην Ινδία (Νέο-Δελχί). Το υπεύθυνο παθογόνο που απομονώθηκε ήταν μια *K. pneumoniae*. Ο μοριακός έλεγχος του στελέχους αποκάλυψε την παρουσία μίας νέας πλασμιδιακής β-λακταμάσης. Μέχρι το 2009 η νέα New Delhi metallo-β-lactamase 1 (NDM-1) είχε ταυτοποιηθεί σε 22 ανθεκτικούς στις καρβαπενέμες μικροοργανισμούς. Ειδικότερα είχε ταυτοποιηθεί σε 10 στελέχη *Klebsiella*, 9 στελέχη *E. Coli*, 2 *Enterobacter* και ένα *Morganella morganii*. Μέχρι τα τέλη του 2010 είχαν αναφερθεί όμοια στελέχη σε διάφορες περιοχές της Ινδίας, Πακιστάν, Μπαγκλαντές, Η.Π.Α, Καναδά, Κίνα, Ιαπωνία, Ηνωμένο Βασίλειο, Ισραήλ, Τουρκία, Αυστραλία, Γαλλία, Κένυα, Σιγκαπούρη. Τα περισσότερα περιστατικά εκτός Ινδίας περιορίζονταν σε ασθενείς που στο ατομικό τους ιστορικό ανέφεραν μία επίσκεψη στην συγκεκριμένη χώρα. Η μεγάλη ανησυχία για την καινούρια αυτή β-λακταμάση προκύπτει από την ικανότητα της να υδρολύει όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά συμπεριλαμβανομένων και των καρβαπενεμών. Μοιράζεται 20-33% κοινή αλληλουχία με τις άλλες μέταλλο-β-λακταμάσες, ωστόσο η κρυσταλλογραφία της NDM-1 με ακτίνες X παρουσιάζει δομικές διαφορές οι οποίες την καθιστούν πιο ενεργή και αυξάνουν την υδρολυτική της ικανότητα σε σχέση με τις προαναφερόμενες (Moellering C *et al.* 2010).

Στην Ευρώπη οι περισσότερες βιβλιογραφικές αναφορές για NDM-1 αφορούν ασθενείς οι οποίοι βρέθηκαν στις υψηλά ενδημικές περιοχές και απλά μετέφεραν το στέλεχος. Στην Τσεχία έχουμε την αναφορά και διασπορά στελέχους *A. baumannii* NDM-1 από ασθενή οποίος επαναπατρίστηκε στην Τσεχία τον Ιούλιο του 2011 από την Αίγυπτο

(Hrabák *et al.* 2012) ενώ αναφορές υπάρχουν και από το Βέλγιο (Bogaerts *et al.* 2012). Επίσης, το 2010 είχαμε την ανίχνευση KPC (β- λακταμάση τάξης A κατά Amplicon), στο Πουέρτο Ρίκο (Robledo *et al.* 2010). Η αλληλούχιση μάλιστα του γονιδίου απεκάλυψε εκτός από τα συνήθη αλλήλια (KPC-2, -3, -4) και ένα νέο το KPC -10. Τέλος στην Γαλλία ανιχνεύθηκε μία κανούρια ESBL (GES-14) η οποία διαφέρει από την GES-1 διότι φαίνεται να έχει δράση ακόμα και στην Αζτρεονάμη και στις Καρβαπενέμες (Bonnin *et al.* 2011).

Πίνακας 5: Τα γονίδια αντοχής του *Acinetobacter* στις καρβαπενέμες και περιοχές απομόνωσής τους.

Protein	Class/Family <i>Ambler</i>	Described in association with	Isolated in	Reference
IMP-1	B	Plasmid/ Integron Class I	Italy, Japan, North Korea, India	Sung JY 2008, Telang et al., 2011
IMP-2		Plasmid/ Integron Class I	Italy, Japan	Riccio et al., 2000
IMP-4		Plasmid/ Integron Class I	Hong Kong	Chu et al., 2001
IMP-5		Plasmid/ Integron Class I	Portugal	Da Silva et al., 2002 Domingues et al., 2011
IMP-6		?	Brazil	Gales et al., 2003
IMP-8		?	China	Wang et al., 2007
IMP-11		?	Japan	Yamamoto et al., 2011
IMP-19		?	Japan	
VIM-2		Plasmid/ / Integron Class I	North Korea	Yum et al., 2002
VIM-1		Plasmid/ / Integron Class I	Greece	Tsakris et al., 2006
VIM-3		Plasmid/ / Integron Class I	Taiwan	Lee et al., 2008
VIM-4		Plasmid/ / Integron Class I	Greece	Figueiredo et al., 2008
VIM-11		?	Taiwan	Lu et al., 2008
SIM-1		Plasmid/ / Integron Class I	North Korea, China	Lee et al., 2005 Zhou et al., 2011
NDM-1		Chromosomal/ Is /Tn Plasmid	India, Germany, Algeria, Belgium, Bangladesh, Czech China	Bogaerts et al., 2012, Boulanger et al., 2012, Nemec et al., 2012Islam et al., 2012; Chen et al, 2011
NDM-2		Chromosomal	Germany, Egypt Israel, Arab Emirates	Kaase et al., 2011, Espinal et al., 2011, Ghazawi et al., 2012
KPC-2	A	?	Puerto Rico	Robledo et al., 2010

KPC-3		?	Puerto Rico	
KPC-4		?	Puerto Rico	
KPC-10		?	Puerto Rico	
GES-14		Plasmid/ Integron Class 1	France, Belgium	Bonnin et al., 2011 Bogaerts et al., 2010 Moubareck et al., 2009
<i>bla</i> _{OXA23 like}	OXA-23 OXA-27 OXA-49 OXA-73	D	Chromosomal/ Plasmid/ IS /Tn/ AbaR Singapore, Italy China China	Afzal-Shah et al., 2001 D'Arezzo 2011 Brown <i>et al.</i> , 2005 Wang <i>et al.</i> , 2009
<i>bla</i> _{OXA24 like}	OXA24/40 OXA-25 OXA-26 OXA-72		Chromosomal/ Plasmid Spain Spain Belgium Spain, Portugal, Usa, China, South Korea, Taiwan, Italy, Spain France, Brazil	Bou et al., 200cWang et al., 2007Afzal-Shah et al., 2001Quinteira et al., 2007 Ruiz et al., 2007Werneck et al., 2011Zarrilli et al 2011
<i>bla</i> _{OXA58like}	OXA-58 OXA-96 OXA-97		Chromosomal / Plasmid/IS France, Spain, Italy, Greece, UK, Austria, Romania, Irak, Kuwait, Lebanon Tunisia	Poirel et al 2006 Pournaras et al., 2006Tsakris et al. 2008; Zarrilli et al 2008Giannouli et al. 2009; Gogou et al. 2011 Koh et al., 2007bPoirel et al., 2008b
OXA-143 OXA-231		Plasmid	Brazil	Higgins et al., 2009Gionco et al., 2012

IS, Insertion sequence; Tn, transposon; AbaR, resistance island

Εκτός από τα παραπάνω ένζυμα, εμπλέκονται και άλλοι μηχανισμοί στην ανθεκτικότητα του *A. baumannii* στις καρβαπενέμες, όπως η ελαττωμένη διαπερατότητα λόγω μειωμένης έκφρασης πορινών (CarO) (Mussi *et al.* 2005, Limansky *et al.* 2002,). Οι πορίνες σχηματίζουν κανάλια στην εξωτερική μεμβράνη των Gram αρνητικών βακτηρίων, εξυπηρετώντας διάφορους σκοπούς όπως τη διακυτταρική προσκόλληση και την πρόσδεση βακτηριοκτόνων ουσιών. Συνεπώς η μειωμένη έκφραση των πορινών συνεπάγεται και μειωμένη δράση των αντιβιοτικών. Άλλος μη ενζυματικός μηχανισμός είναι η ύπαρξη αντλιών ενεργητικής εκροής (Fournier *et al.* 2006) με περισσότερο μελετημένη την αντλία AdeABC. Οι αντλίες εκροής είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που

λειτουργούν ως υπεύθυνες για την ενεργό αποβολή τοξικών ουσιών και μεταβολικών προϊόντων από το κύτταρο. Πιο συγκεκριμένα η AdeABC αποτελείται από τρία δομικά στοιχεία μια μεμβρανική πρωτεΐνη που εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη, μία πορίνη που βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη και μία πρωτεΐνη που ενώνει τις δύο προηγούμενες και εντοπίζεται στον περιπλαστικό χώρο έτσι ο μικροβιακός παράγοντας εκτοπίζεται από το βακτήριο χωρίς να συσσωρεύεται στον περιπλαστικό χώρο. Υπερέκφραση της αντλίας AdeABC προκαλεί αντοχή σε αμινογλυκοσίδες, β-λακτάμες, χλωραμφαινικόλη, ερυθρομυκίνη και τετρακυκλίνες (Magnet *et al.* 2001, Marchand *et al.* 2004, Nemec *et al.* 2007). Ο τελευταίος μη ενζυμικός μηχανισμός αντοχής είναι η μειωμένη έκφραση πενικιλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών (PBPs). Το 1965, ο James Park και ο Jack Strominger ανακάλυψαν ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλον ότι η πενικιλίνη παρεμποδίζει το τελευταίο βήμα της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος, δηλαδή τη διασύνδεση των διαφορετικών αλυσίδων της πεπτιδογλυκάνης (Macheboeuf *et al.* 2006). Η πεπτιδογλυκάνη είναι ένα λεπτό στρώμα, το οποίο καθορίζει τη μορφολογία του κυττάρου, του παρέχει ωσμωτική προστασία και συμμετέχει στο κυτταρικό μεταβολισμό. Η σύσταση της βασίζεται σε πολυμερείς αλυσίδες των δισακχαριδικών υπομονάδων GlcNAc (N-ακετυλογλυκοζαμίνη) και MurNAc (N-ακετυλομουραμικό οξύ). Αυτές οι αλυσίδες συνδέονται μέσω πενταπεπτιδίων και η διασύνδεση τους είναι αρκετά πολύπλοκη και περιλαμβάνει αρκετά ένζυμα όπως οι PBPs. Οι PBPs μπορεί να έχουν δράση γλυκοζυλτρανσφεράσης (GT) και ταυτόχρονη δράση τρανσπεπτιδάσης (TP) για τη σύνδεση των πενταπεπτιδίων ή μόνο τρανσπεπτιδάσης. Αναστολή οποιασδήποτε από τις δύο δραστηριότητες αυτών των ενζύμων προκαλεί εξασθένιση της πεπτιδογλυκάνης και εν συνεχεία κυτταρικό θάνατο (Gordon *et al.* 2000). Τελικά, συμπεραίνουμε ότι η μειωμένη έκφραση αυτών των πρωτεϊνών οδηγεί σε επιβίωση του μικροβίου.

Αμινογλυκοσίδες:

Οι μηχανισμοί αντοχής που έχουν περιγραφεί για τις αμινογλυκοσίδες είναι κυρίως ενζυμικοί. Σε ιντεγκρόνια τάξης I του *A. baumannii* έχουν ταυτοποιηθεί γονίδια που εκφράζουν ένζυμα όπως ακετυλτρανσφεράσες, νουκλεοτιδυλτρανσφεράσες και φωσφοτρανσφεράσες τα οποία προσδίδουν αντοχή στα συγκεκριμένα αντιβιοτικά. Πρόσφατα (Doy *et al.* 2007) περιγράφηκε και το γονίδιο armA (aminoglycoside resistance methylase) σε στελέχη από την Ιαπωνία, την Κορέα και τις Η.Π.Α.. Το γονίδιο αυτό είναι πλασμιδιακά εδραζόμενο στο (Tn1548) τρασποζόνιο και είναι υπεύθυνο για τη για τη μεθυλίωση του 16S rRNA συμβάλλοντας στην υψηλού βαθμού αντοχή των μικροβίων σε

κλινικά σημαντικές αμινογλυκοσίδες όπως η γενταμικίνη, η τομπραμυκίνη και η αμικασίνη. Συμμετοχή στο μηχανισμό έχουν και αντλίες εκροής όπως η AdeABC και η πιο πρόσφατα μελετηθείσα AdeM (Su *et al.* 2005).

Κινολόνες:

Οι κύριοι μηχανισμοί που έχουν περιγραφεί στις κινολόνες είναι μεταλλάξεις ένζυμων, οι οποίες δυσχεραίνουν τη δράση του αντιβιοτικού. Στο *A. baumannii* έχουν περιγραφεί μεταλλάξεις στην DNA γυράση ή Τοποισομεράση IV που αφορούν τα γονίδια *gyrA* και *parC* (Hamouda *et al.* 2004). Συμμετοχή έχουν και εδώ οι αντλίες εκροής AdeABC και AdeM. Οι μηχανισμοί αντοχής στις κινολόνες οφείλονται μέχρι στιγμής σε χρωμοσωμικά επαγόμενα ένζυμα, αφού δεν έχει αναφερθεί πλασμιδιακά σχετιζόμενη αντοχή στις κινολόνες στο *A.baumannii*.

Τετρακυκλίνες και γλυκυλκυκλίνες:

Ειδικές αντλίες εκροής έχουν περιγραφεί ως ο κύριος μηχανισμός αντοχής για τις τετρακυκλίνες. Τα δύο γονίδια που έχουν περιγραφεί στο *A. Baumannii* είναι το Tet(A) και το Tet(B) (Guardabassi *et al.* 2000). Πιο συγκεκριμένα το Tet(A) είναι υπεύθυνο για την αντοχή στην τετρακυκλίνη, όχι όμως για τη μινοκυκλίνη ένα αντιβιοτικό το οποίο φαίνεται ιδιαίτερα αποτελεσματικό έναντι στο συγκεκριμένο μικρόβιο. Συμμετοχή έχει και εδώ η αντλία AdeABC η οποία αποτελεί και του κύριο μηχανισμό αντοχής που έχει αναπτύξει το *A. baumannii* στην καινούρια κατηγορία αντιβιοτικών τις γλυκυλκυκλίνες με κυριότερο εκπρόσωπο την τιγκεκυκλίνη. Μελέτες με realtime PCR παρουσιάζουν ότι η αυξημένη έκφραση του γονιδίου *adeB* υπεύθυνο για την αντλία AdeABC συνοδεύεται και από αύξηση των MIC της τιγκεκυκλίνης στα συγκεκριμένα στελέχη (Peleg *et al.* 2007). Η μεγάλη σημασία της συγκεκριμένης αντλίας εκροής στην τιγκεκυκλίνη επιβεβαιώθηκε με πειράματα απενεργοποίησης του ενζύμου *adeB* το οποίο οδήγησε σε αξιοσημείωτη πτώση της MIC της (Ruzin *et al.* 2007).

Πολυμυξίνη:

Παρόλο τα πρόσφατα δεδομένα που παρουσιάζουν αντοχή ή ετεροαντοχή του *A. baumannii* στην πολυμυκίνη ο μηχανισμός παραμένει υπό διερεύνηση. Για το *E. Coli*, την *P. aeruginosa* και τη *Salmonella spp.* η βιβλιογραφία αναφέρει μειωμένη συγγένεια με το στόχο δράσης της πολυμυκίνης το λιποπολυσακχαρίδιο (LPS) (Conrad *et al.* 1989) και αλλαγές στις OMPs (αφορά μόνο *P.aeruginosa*) (Young *et al.* 1992). Αντίστοιχα για το *A. baumannii* η ανθεκτικότητα οφείλεται κυρίως σε δύο λόγους: πρώτον μείωση του

αρνητικού φορτίου της εξωτερικής μεμβράνης του *A. baumannii* λόγω τροποποίησης του λιπιδίου A το οποίο είναι βασικό συστατικό του βακτηριακού λιποπολυσακχαριδίου (LPS) και δεύτερον αποδόμηση και αποβολή του αντιμικροβιακού παράγοντα από αντλίες εκροής. Σημειακές μεταλλάξεις και μεταθέσεις στα γονίδια *pmrA* και *pmrB* του μικροβίου συσχετίζονται με αύξηση της MIC της κολιστίνης. Το σύστημα *pmrAB* είναι σημαντικό στο βακτήριο για την αντίληψη του περιβαλλοντικού PH και την συγέντωση ιόντων (Adams *et al.* 2009). Η πολυμυκίνη παράμένει πάντως ακόμα και σήμερα η μοναδική θεραπευτική επιλογή σε MDR στελέχη *A. baumannii*.

Πίνακας 6: (Peleg *et al.* 2008). Οι κυριότεροι μηχανισμοί αντοχής των *A. baumannii* ανά κατηγορία αντιβιοτικών.

<i>Κατηγορία αντιβιοτικών και μηχανισμός αντοχής</i>	<i>Ένζυμα</i>
<u>β-λακταμικά</u>	
β-Lactamases	TEM SHV ADCs VEB PER CTX-M OXA IMP VIM SIM
OMPs	CarO (29 kDa) 47-, 44-, and 37-kDa OMPs 22- and 33-kDa OMPs HMP-AB 33- to 36-kDa OMPs 43-kDa OMP
Efflux	AdeABC
Altered penicillin-binding proteins	Altered penicillin-binding proteins
<u>αμινογλυκοσίδες</u>	
Aminoglycoside-modifying enzymes	Acetyltransferases, nucleotidyltransferases, phosphotransferases
Ribosomal (16S rRNA) methylation	
Efflux	AdeABC AdeM
<u>Κινολόνες</u>	
Modification to target binding site	GyrA, ParC
Efflux	AdeABC AdeM
<u>Τετρακυκλίνες και γλυκοπεπτίδια</u>	
Tetracycline-specific efflux	Tet(A), Tet(B)
Ribosomal protection	Tet(M)
Multidrug efflux	AdeA

Ειδικό Μέρος II

IIα. Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της πληθυσμιακής εξέλιξης των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *A. baumannii* από διάφορες γεωγραφικές περιοχές του Ελληνικού χώρου και ο προσδιορισμός της προέλευσης των επιδημικών κλώνων. Τμήμα της μελέτης αποτέλεσε και η ανίχνευση εκείνων των ενζύμων τα οποία προσδίδουν την αντοχή στις καρβαπενέμες. Την περίοδο έναρξης της έρευνας τα σχετικά επιδημιολογικά ευρήματα για τον ελλαδικό χώρο ήταν ανύπαρκτα, παρά τα αξιοσημείωτα υψηλά ποσοστά αντοχής στη χώρα μας, ενώ σε αρκετές Ευρωπαϊκές χώρες έχουν πραγματοποιηθεί σχετικές μελέτες και έχουν προκύψει αντίστοιχα επιδημιολογικά δεδομένα. Σε παγκόσμιο επίπεδο αντίστοιχες βιβλιογραφικές αναφορές αναφέρονται σε ικανοποιητικό βαθμό από τις αναπτυγμένες χώρες, υστερώντας στα αναπτυσσόμενα κράτη. Η μελέτη έγινε με σκοπό τη διερεύνηση της επιδημιολογίας του *A. baumannii* στον ελληνικό χώρο, ώστε τα ευρήματα να συμβάλλουν στην κατανόηση του προβλήματος των λοιμώξεων από ανθεκτικά στελέχη και την αντιμετώπιση αυτών. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν περισσότερο οι πιο ευρέως αποδεκτές μέθοδοι τυποποίησης MLST (Multilocus sequence typing), που από την πρόσφατη βιβλιογραφία φαίνεται ότι αποτελεί τη μέθοδο εκλογής για την διερεύνηση της πληθυσμιακής δομής των *A. baumannii* σε εθνικό και διεθνές επίπεδο.

IIβ. Υλικά & μέθοδοι

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν (652) κλινικά στελέχη *A. baumannii* τα οποία απομονώθηκαν από 8 διαφορετικά νοσοκομεία σε τέσσερις διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές στην Ελλάδα, σε βάθος δεκαετίας (2000-2009). Πιο συγκεκριμένα, 369 στελέχη απομονώθηκαν στο Περιφερειακό Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας (ΠΠΓΝΛ) δυναμικότητας 700 κλινών που εξυπηρετεί τον πληθυσμό της ευρύτερης περιφέρειας της Θεσσαλίας, 17 στελέχη στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών Κοργιαλένιο – Μπενάκειο (Ελληνικός Ερυθρός Σταυρός – ΕΕΣ) δυναμικότητας 400 κλινών, 40 στελέχη στο Γενικό Περιφερειακό Νοσοκομείο Αττικής ΚΑΤ (860 κλίνες), 60 στελέχη στο Περιφερειακό Γενικό Νοσοκομείο Πειραιά “Τζάνειο” (600 κλίνες), 70 στελέχη στο Περιφερειακό Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών Ιπποκράτειο (600 κλίνες) που εξυπηρετεί τον πληθυσμό της ευρύτερης περιφέρειας του νομού Αττικής, 31 στο Γενικό Νοσοκομείο Σερρών δυναμικότητας 400 κλινών που εξυπηρετεί πληθυσμό 200.000 κατοίκων, 30 στελέχη στο Γενικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης Ιπποκράτειο (δύναμης 910 κλινών) και 35

στελέχη στο Κεντρικό Νοσοκομείο Νοσημάτων Θώρακος “Παπανικολάου” (700 κλίνες). Στο σύνολο των στελεχών (N=652) το 60% (n=391) προήλθε από Μ.Ε.Θ, το 19% (n=124) από χειρουργικές κλινικές, το 15% (n=98) από παθολογικές κλινική και το 6% (n=39) από πνευμονολογικές κλινικές. Η πηγή απομόνωσης (source) των στελεχών ήταν 45% βρογχικό έκκριμα, 20% αίμα, 14% τραύματα και 11% καθετήρες (κεντρικούς φλεβικούς καθετήρες-περιτοναϊκοί καθετήρες), 9% ούρα και 1% διάφορα υλικά. Όλα τα στελέχη συντηρήθηκαν σε δύο ή περισσότερα αντίγραφα σε θρεπτικό ζωμό Mueller Hinton Broth (Biolife, Milano, Italy) με περιεκτικότητα γλυκερόλης 16% w/v (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) στους – 80 °C. Η αρχική φαινοτυπική ταυτοποίηση των στελεχών έγινε με το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK® 2 (bioMerieux, Inc.) χρησιμοποιώντας την κάρτα GN.

Πίνακας 7: Τα στελέχη της συλλογής ανάλογα με το υλικό απομόνωσης.

<i>Νοσοκομείο</i>	<i>Δείγματα</i>						<i>Σύνολο</i>
	Αίμα	Ούρα	Βρογχικό έκκριμα	Τραύμα	Καθετήρες	Διάφορα	
ΠΠΓΝΛ	74	33	164	53	43	2	369
ΕΕΣ	5	2	8	-	-	2	17
Γ.Π.Ν.Α ΚΑΤ	8	4	16	7	5	-	40
Π.Γ.Ν.Π Τζάνειο	12	5	27	8	7	1	60
Γ.Ν.Α Ιπποκράτειο	13	7	30	11	9	-	70
Γ.Ν.Θ. Ιπποκράτειο	5	3	14	4	4	-	30
Γ.Ν.Θ. Παπανικολάου	6	3	15	5	4	2	35
Γ.Ν.Σερρών	7	2	19	3	-	-	31
Σύνολο	130	59	293	91	72	7	652

1. Μελέτη ευαισθησίας στελεχών και ταυτοποίησης

Όλα τα στελέχη της συλλογής έχουν ελεγχθεί βάσει του αυτοματοποιημένου συστήματος VITEK[®] 2 (bioMerieux, Inc.) χρησιμοποιώντας τις κάρτες AST-GN13, AST-EXN3, AST-N117, AST-XN8 και AST-N103. Οι τελευταίες τρεις αποτελούν αναβαθμίσεις των δύο προηγούμενων καρτών. Αξίζει να αναφερθεί ότι όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα στην κολιστίνη. Το VITEK[®] 2 αποτελεί το αυτοματοποιημένο σύστημα το οποίο χρησιμοποιείται μέχρι στιγμής στην ρουτίνα για την ταυτοποίηση των μικροβίων στα περισσότερα μικροβιολογικά εργαστήρια των νοσοκομείων. Βασίζεται στην ανίχνευση όπως ήδη έχει αναφερθεί γνωστών βιοχημικών και φυσιολογικών ιδιοτήτων δίνοντας αποτέλεσμα σε λιγότερο από 10h. Ωστόσο λόγω της περιορισμένης βάσης δεδομένων και υποστρωμάτων η ταυτοποίηση του *A. baumannii* είναι προβληματική. Πιο συγκεκριμένα έχουμε ήδη αναφέρει πως το *A. baumannii*, το *Acinetobacter* genomic species 3, και το *Acinetobacter* genomic species 13TU δεν μπορούν να διακριθούν από το συγκεκριμένο σύστημα ταυτοποίησης. Συνεπώς από το Vitek η ταυτοποίηση τέτοιου μικροβίου πρέπει να ορίζεται ως *Acinetobacter baumannii* complex ενώ η ταυτοποίηση του είδους ως *A. baumannii* γίνεται με την ανίχνευση της χρωμοσωμικά επαγώγιμης οξακιλλινάσης, *bla*_{OXA51-like}.

2. PFGE Τυποποίηση των στελεχών

Στη συνέχεια επιλέγησαν 94 στελέχη, έτσι ώστε να εμπεριέχονται στην συλλογή στελέχη που επιλέχθηκαν τυχαία από κάθε υπό μελέτη περιοχή και κάθε νοσοκομείο, καλύπτοντας το χρονικό εύρος της δεκαετίας. Στην συλλογή εμπεριέχονται στελέχη ανθεκτικά αλλά και ευαίσθητα στις καρβαπενέμες. Τα επιλεγμένα στελέχη τυποποιήθηκαν με μακροπεριοριστική πέψη του γενωμικού DNA με το περιοριστικό ένζυμο *ApaI* (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Germany) και την ακόλουθη ανάλυση των νουκλεϊνικών τμημάτων με ηλεκτροφόρηση σε μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE, Pulsed Field Gel Electrophoresis). Το πρωτόκολλο που ακολουθήσαμε και εφαρμόζεται για μεγάλο χρονικό διάστημα στο εργαστήριό μας είναι το εξής:

1. Τα στελέχη επωάσθηκαν σε Tryptic Soy Broth (Biolife) στους 37 °C για 18 ώρες και τα εναιωρήματα φωτομετρήθηκαν για να αραιωθούν με τον αντίστοιχο όγκο νερού και να αποκτήσουν πυκνότητα ίση με 4.0 της κλίμακας Mc Farland.

2. Όγκος 500 μ l φυγοκεντρήθηκε στις 13000 rpm για 2 λεπτά και το ίζημα εναιωρήθηκε σε 100 μ l διαλύματος PIV (0.01 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M NaCl).

3. Παρασκευάστηκε 2% αгарόζη χαμηλού σημείου τήξεως (LMT–Low Melting Temperature Agarose–Cambrex Bio Science Rock land Inc., ME, USA) σε 10 ml διαλύματος PIV και διατηρήθηκε μαζί με τα εναιωρημένα στελέχη στους 42 °C για 10 λεπτά.

4. Όγκος 100 μ l αгарόζης αναμείχθηκε με το δείγμα και ετοιμάστηκαν 7 πλακίδια μείγματος αгарόζης-μικροβίου (από 20 μ l) για κάθε στέλεχος, ανάμεσα σε υάλινες επιφάνειες. Τα πλακίδια έμειναν στους -30 °C για 5 λεπτά αυστηρά και στη συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.

5. Τα πλακίδια επώστηκαν μέσα σε 500 μ l διαλύματος EC (6 mM Tris pH 8.0, 1 M NaCl, 100 mM EDTA pH 8.0, 0.2% Nadeoxycholate, 0.5% Nalaurylsarcosine) που περιείχαν 100 μ g/ml λυσοζύμης (Sigma-Aldrich) και 50 μ g/ml RNaseA (Sigma-Aldrich) στους 37 °C για τουλάχιστον 6 ώρες.

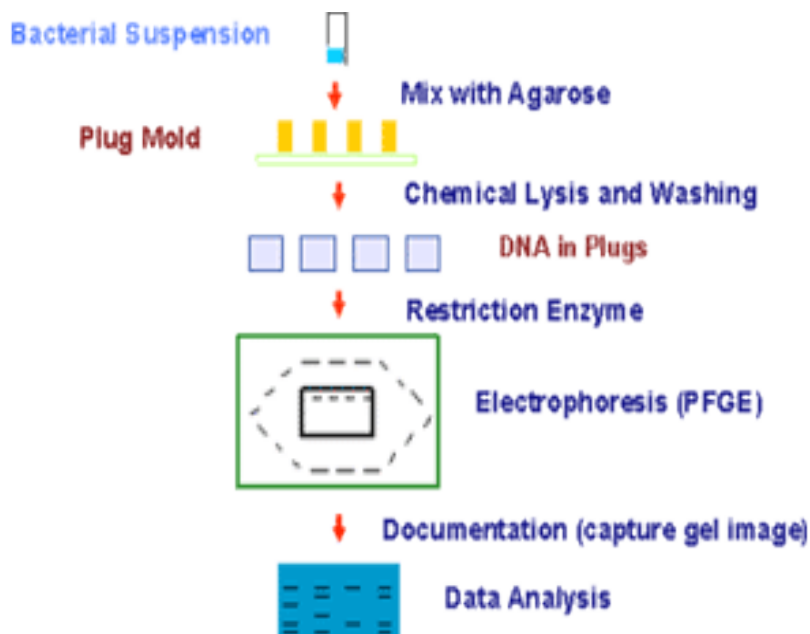
6. Το EC διάλυμα αντικαταστάθηκε από 500 μ l ES (0.5 M EDTA pH 9.0, 1% sarcosyl) διαλύματος που περιείχε 1 mg/ml πρωτεΐνάση K (Sigma-Aldrich) και τα πλακίδια επώστηκαν ολονύκτια στους 55 °C.

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

8. Έγινε πέψη ενός πλακιδίου από κάθε στέλεχος μέσα σε 40 μ lB⁺buffer 1X με 40U περιοριστικού ενζύμου *Apa*I (Fementas) στους 37 °C για τουλάχιστον 6 ώρες.

9. Έγινε ηλεκτροφόρηση σε αгарόζη 1% ειδική για ηλεκτροφόρηση σε μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Agarose for PFGE: Running Gel- Sigma-Aldrich) που παρασκευάστηκε σε διάλυμα 0.5X TBE (BioRad, Hercules, CA, USA) και σε συσκευή CHEF-DRIII (BioRad) με 2 lt 0.5X TBE και τις εξής συνθήκες: initial switch time 5 sec, final switch time 35 sec, total time 18 hours, volts/cm 6, angle 160°, temperature 11.3 °C. Ως μάρτυρας μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύασμα PULSEMARKER™ 50–1,000 kb (Sigma-Aldrich) που περιέχει τεμάχια γενώματος λ φάγου γνωστού μεγέθους.

Τα κριτήρια βάση των οποίων έγινε η αξιολόγηση της ηλεκτροφόρησης είναι όπως προαναφέραμε τα κριτήρια από τους Tenover *et al.* δημοσιευμένα το 1995.



Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής τυποποίησης PFGE.

Τα αποτελέσματα από την PFGE έδωσαν την δυνατότητα κλωνικής ταξινόμησης των στελεχών. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα 94 επιλεγμένα στελέχη.

Πίνακας 8: Τα 94 επιλεγμένα στελέχη της μελέτης, ταξινομημένα κατά ομάδες με το ίδιο PFGE πρότυπο

<i>Strain</i>	<i>Source</i>	<i>Hospital</i>	<i>Year</i>	<i>Isolates with identical PFGE profile</i>
1	Blood	RedCross/Athens	2002	4
2	Blood	RedCross/Athens	2002	6
3	Bronchial	RedCross/Athens	2002	1
4	Blood	RedCross/Athens	2002	1
5	Dequibitus ulcer	University/ Larissa	2008	2
6	Blood	University/ Larissa	2008	2
7	Blood	KAT/Athens	2001	1
8	Bronchial	KAT/Athens	2001	13
9	Drainage	Hippokration /Athens	2003	1
10	Bronchial	Tzaneion/Athens	2002	5
11	Bronchial	Tzaneion/Athens	2002	2
12	Pus	Hippokration /Athens	2003	1
13	Bronchial	Hippokration /Athens	2003	3
14	Blood	Hippokration /Athens	2003	1
15	Blood	Hippokration/Thessaloniki	2003	1
16	Blood	Hippokration/Thessaloniki	2004	1
17	Bronchial	University/ Larissa	2007	1
18	Bronchial	University/ Larissa	2007	1
19	Urine	Hippokration/Thessaloniki	2003	1
20	Blood	Tzaneion/Athens	2004	4
21	Wound	University/ Larissa	2007	3
22	Broncial	General/Serres	2005	2
23	Blood	General/Serres	2005	2
24	Dequibitus ulcer	University/ Larissa	2007	11
25	Bronchial	Papanikolaou/Thessaloniki	2007	24

Η ταυτοποίηση του είδους των στελεχών ως *A. baumannii* επιβεβαιώθηκε εκ νέου με PCR για το ενδογενές γονίδιο *bla_{OXA-51}* σε όλα τα επιλεγμένα στελέχη (Turton *et al.* 2006α) χρησιμοποιώντας εκκινητές και συνθήκες που έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία (πίνακας 9). Εν συντομία αναφέρονται οι συνθήκες της PCR: 94 °C για 2 min / 94°C 1 min, 53°C 1 min , 72°C 1 min για 35 κύκλους / 72 °C 10 min. Το προϊόν PCR που προκύπτει αναμένεται στην ηλεκτροφόρηση που ακολουθεί να έχει μέγεθος 825 bp

(Turton *et al.* 2006α). Η οριστική ταυτοποίηση των στελεχών της μελέτης μας ως *A. baumannii* επιβεβαιώθηκε μετά την ταξινόμησή τους σε ειδικούς για *A. baumannii* κλώνους με την μοριακή επιδημιολογική μέθοδο MLST (ειδικοί για *A. baumannii* ST-τύποι, περιγράφονται παρακάτω).

3.Μοριακή ανίχνευση καρβαπενεμασών

Στα 94 επιλεγμένα στελέχη διενεργήθηκε PCR για όλα τα γονίδια που κωδικοποιούν γνωστές καρβαπενεμάσες σε *A. baumannii* (*bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SIM}). Οι εκκινητές (primers) και οι συνθήκες PCR προέκυψαν από την υπάρχουσα βιβλιογραφία και καταγράφονται στον ακόλουθο πίνακα (πίνακας 9). Η αλληλουχία των προϊόντων της PCR προσδιορίστηκε από εταιρεία παροχής αντίστοιχων υπηρεσιών (Lark Technologies, Essex, UK) για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων και την ανεύρεση τυχόν μεταλλάξεων.

Πίνακας 9: Αλληλουχίες εκκινητών και συνθήκες PCR που χρησιμοποιήθηκαν για τις σημαντικότερες καρβαπενεμάσες.

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή (5' → 3')	Μέγεθος Προϊόντος PCR (bp)	Συνθήκες PCR	Αναφορά
<i>bla</i> _{OXA-51}	F tga aca tta aal cac tct t R ctataaaatacctaattgtt	825	94 °C 2 min	Pournaras et al, 2006
<i>bla</i> _{OXA-58}	F cga tca gaa tgt tca agc gc R acg att ctc ccc tct gcg c	528	94°C 1 min 53°C 1 min (x 35)	Heritier et al, 2005b
<i>bla</i> _{OXA-23}	F gat gtg tca tag tat tgg tgg R tca caa caa cta aaa gca ctg	1062	72°C 1 min 72 °C 10 min	Afzal-Shah et al, 2001
<i>bla</i> _{OXA-24}	F gta cta atc aaa gtt gtg aa R ttc ccc taa cat gaa ttt gt	1023		

<i>bla_{IMP}</i>	F	cta ccg cag cag agt ctt tg	587	Senda et al, 1996
	R	aac cag ttt tgc ctt acc at		
<i>bla_{VIM}</i>	F	atg gtg ttt ggt cgc ata tc	510	Nordmann et al, 2002
	R	tgg gcc att cag cca gat c		
<i>bla_{SIM}</i>	F	tacaagggattcggcatcg	552	Lee et al, 2005
	R	taatggcctgttcccatgtg		

4.Μοριακή τυποποίηση MLST

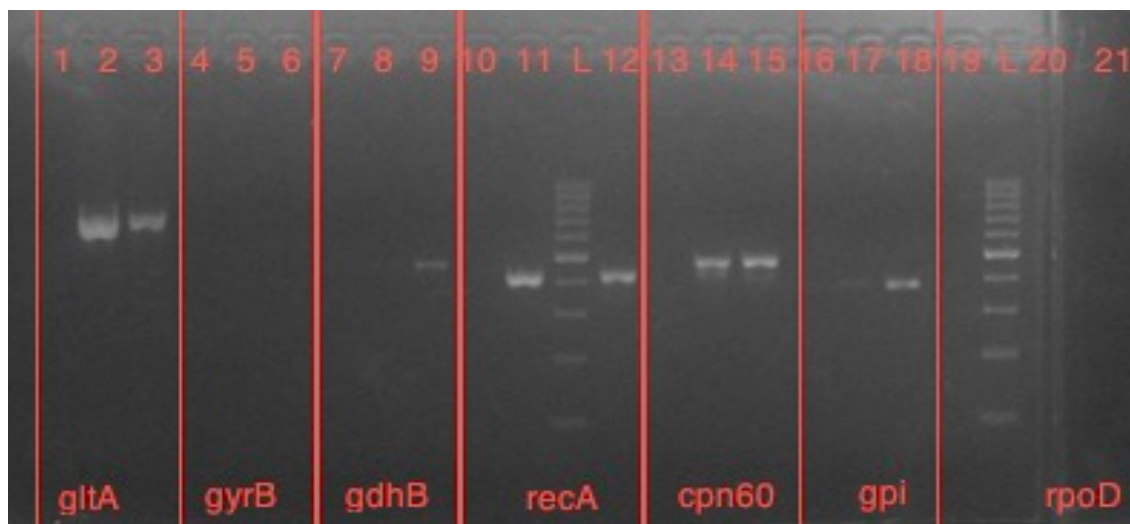
Σχήμα Epub MLST (Bartual *et al.*)

Η πρώτη προσπάθεια μοριακής τυποποίησης των στελεχών έγινε με το σχήμα του Bartual *et al.* 2005. Τα αποτελέσματα ωστόσο δεν ήταν ικανοποιητικά. Σε αρκετά στελέχη ήταν αδύνατον να απομονώσουμε προϊόν PCR για όλα τα γονίδια του σχήματος. Το γεγονός έχει αποδοθεί σε ποικιλομορφία των γονιδιακών σημείων στα οποία υβριδίζουν οι αλληλουχίες του παραπάνω σχήματος, λόγω μεταλλάξεων. Στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 14) εξετάζονται δύο τυχαία στελέχη της συλλογής το A και B για την παραγωγή των 7 γονιδίων του σχήματος Bartual. Στην πρώτη θέση ηλεκτροφορείται πάντα ένας αρνητικός μάρτυρας, στην δεύτερη το A στέλεχος και στην τρίτη το B. Στις πρώτες τρεις θέσεις εξετάζουμε εάν εκφράζεται η κιτρική συνθάση κάνοντας χρήση των εκκινητών Citrato F1 Citrato R12. Στην πρώτη θέση του αρνητικού μάρτυρα δεν παίρνουμε προϊόν ενώ στη θέση 2 και 3 βλέπουμε ότι υπάρχει προϊόν γύρω στις 750 bp. Το προϊόν αυτό αντιστοιχεί σε αυτό που αναμένουμε, διότι το γονίδιο *gltA* που κωδικοποιεί την κιτρική συνθάση κυμαίνεται στις 722 bp. Το μέγεθος του γονιδίου υπολογίζεται με βάση το Ladder (μάρτυρα 100-1000 bp). Στις επόμενες τρεις θέσεις εξετάζεται η παρουσία του γονιδίου της γυράσης ωστόσο στις θέσεις 5 και 6 δεν έχουμε προϊόν. Συνοψίζοντας, με το σχήμα του Bartual καταφέραμε σε πρώτη φάση να έχουμε ειδικό προϊόν από τα γονίδια *gltA* (722bp), *recA* (425 bp) και *cpn60* (479). Οι μπάντες που διακρίνονται στις υπόλοιπες θέσεις θεωρούνται μη ειδικά προϊόντα για τα συγκεκριμένα γονίδια διότι αντιστοιχούν σε

μπάντες διαφορετικού μεγέθους από αυτές που αναμέναμε. Για το γονίδιο *gpi* αναμέναμε προϊόν 508 bp ενώ το προϊόν που προκύπτει από την ηλεκτροφόρηση είναι σίγουρα μικρότερο από 400 bp. Ομοίως και για το γονίδιο *gdhB* το αναμενόμενο προϊόν ήταν 775 bp ενώ αυτό που προέκυψε από την ηλεκτροφόρηση είναι περίπου 450 bp. Πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι στις θέσεις 8 και 17 υπάρχουν μπάντες αντίστοιχες με αυτές στις θέσεις 9 και 18. Η επεξεργασία της εικόνας δεν αρκεί για να αποκαλυφθούν έντονα.

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και από την πρόσφατη μελέτη από τους Hamounda *et al.* 2010 η οποία παρουσιάζει τα γονίδια *gpi* και *gyrB* του σχήματος Bartual μη ειδικά για φυλογενετικές μελέτες λόγω της οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς τους. Παρόλες τις προσπάθειες (αλλαγή συνθηκών της PCR και τροποποίηση των εκκινήτων) το συγκεκριμένο πρωτόκολλο ήταν αδύνατο να τυποποιήσει τα στελέχη της συλλογής. Τέλος αξίζει να αναφερθεί η αλληλουχία όλων των προϊόντων της PCR προσδιορίστηκε από εταιρεία παροχής αντίστοιχων υπηρεσιών (Macrogen Inc., Seoul, South Korea) για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων και την ανεύρεση τυχόν μεταλλάξεων.

Εικόνα 14: Σχήμα Bartual. Για κάθε γονίδιο εξετάζονται δύο τυχαία στελέχη της συλλογής ενώ στην πρώτη θέση τρέχει πάντα αρνητικός μάρτυρας. (L= μάρτυρας διαβάθμιση 100-1000 bp)



Σχήμα Health Protection Agency HPA Turton *et al.*

Ακολούθησε μοριακή τυποποίηση με βάση το σχήμα που περιγράφεται από τους Turton *et al.*. Έχουν ήδη αναλυθεί τα πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης μεθόδου. Στη συγκεκριμένη συλλογή στελεχών το σχήμα δούλεψε άριστα. Σε όλα τα στελέχη της συλλογής καταφέραμε να ενισχύσουμε και να πάρουμε το προϊόν και για τα τρία γονίδια. Τα γονίδια τα οποία εξετάζονται σε αυτό το σχήμα είναι το *ompA* το οποίο κωδικοποιεί μια πορίνη, εξωτερική μεμβρανική πρωτεΐνη, το *csuE* το οποίο συμμετέχει στη δημιουργία του πρωτεϊνικού σωληνίσκου (pilus). Αυτή η δομή θεωρείται βασική για το biofilm. Τέλος εξετάζει το *bla*_{OXA-51-like} το οποίο κωδικοποιεί την χρωμοσωμικά εδραζόμενη καρβαπανεμάση του *A. baumannii*. Συχνά η ανίχνευση αποτελεί μερική επιβεβαίωση της ταυτοποίησης του. Οι συνθήκες της PCR καθώς και οι εκκινητές έχουν ήδη αναφερθεί. Σε κάποια στελέχη το προϊόν προέκυψε μετά από δεύτερη PCR στο προϊόν της πρώτης (nested PCR) κάνοντας χρήση των εσωτερικών εκκινητών internal primers. Πιο συγκεκριμένα σε ορισμένα στελέχη για το γονίδιο *ompA* χρησιμοποιήθηκαν οι εσωτερικοί εκκινητές Internal primers (sequencing): OmpAF506, 5'-TCAACGGTAACTTCTATG-3' OmpAR895, 5'-CTTCAGTTAACTCTTGTGG-3). Ακολούθησε καθαρισμός των PCR products σε ειδικές στήλες (Qiagen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και στην συνέχεια προσδιορισμός της αλληλουχίας όλων των προϊόντων από εταιρεία παροχής αντίστοιχων υπηρεσιών για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων και την ανεύρεση τυχόν μεταλλάξεων (Macrogen Inc., Seoul, South Korea). Η σύγκριση των αλληλουχιών γίνεται με βάσεις δεδομένων διαθέσιμες στο (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Τα αλλήλια τα οποία είχαν ταυτοποιηθεί όταν ξεκίνησε αυτή η διατριβή και βάση των οποίων γινόταν η ταξινόμηση των δικών μας προϊόντων PCR παρουσιάζονται στον επόμενο πίνακα.

Πίνακας 10: Αλληλία κατατεθειμένα στη βάση δεδομένων www.hpa-bioinformatics.org.uk/AB/home.php. Αξίζει να σημειωθεί ότι με αυτή τη βάση δεδομένων ξεκίνησε τα πειράματα της παρούσας διατριβής.

ompA

<i>Allele</i>	<i>Sequence</i>
1	39–724 of DQ648278 (686 bp)
1a	As allele 1, but T instead of C at nucleotide 638a (686 bp)
2	108–784 of DQ648279 (677 bp)
3	96–781 of DQ779967 (686 bp)
4	87–760 of DQ779966 (674 bp)

csuE

<i>Allele</i>	<i>Sequence</i>
1	230–678 of DQ289018
1a	230–678 of DQ289019
1b	As allele 1a, but T instead of C at nucleotide 427
2	230–678 of DQ289014
3	230–678 of DQ289016
4	6–454 of DQ789570
5	123–571 of DQ789571
6	99–547 of DQ789572

***bla*_{OXA-51-like}**

<i>Allele</i>	<i>Sequence</i>	<i>Corresponds to</i>
1	79–771 of AY750909	<i>bla</i> OXA-66
1a	79–771 of DQ309277	<i>bla</i> OXA-83
1a*	As allele 1, but G instead of C at nucleotide 499c	As <i>bla</i> OXA-66, but G instead of C at nucleotide 499c
1b	79–771 of DQ309276	<i>bla</i> OXA-84
2	79–771 of AY750911	<i>bla</i> OXA-69
3	79–771 of AY750913	<i>bla</i> OXA-71
4	79–771 of AY750907	<i>bla</i> OXA-64

5	Shorter sequence only determined corresponding to 254–604 of DQ491200, but A instead of T at nucleotide 503c (351 bp)	As <i>bla</i> _{OXA-67} , but A instead of T at nucleotide 503c
---	---	--

Αυτή η βάση δεδομένων έχει αναθεωρηθεί και αναθεωρείται συνεχώς. Στη σελίδα www.hpa-bioinformatics.org.uk/AB/home.php παρουσιάζονται οι επικαιροποιημένες βάσεις δεδομένων.

Σχήμα MLST του Ινστιτούτου Pasteur.

Τα γονίδια τα οποία εξετάζονται σε αυτό το σχήμα είναι το *cpn60* (60-Kda chaperonin), *gltA* (citrate synthase) και *recA* (homologous recombination factor) με τους ίδιους εκκινητές όπως στο σχήμα του Bartual *et al.* 2005 ενώ ταυτόχρονα εισάγει την ανίχνευση των εξής γονιδίων: *fusA* (elongation factor EF-G), *pyrG* (CTP synthase), *rplB* (50S ribosomal protein L2) και *rpoB* (RNA polymerase subunitB). Οι primers που χρησιμοποιήσαμε είναι οι εξής:

Πίνακας 11: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την τυποποίηση που προτείνει το σχήμα του Ινστιτούτου Pasteur.

gene	primer
cpn60	cpn60F ACTGTACTTGCTCAAGC cpn60RTTCAGCGATGATAAGAAGTGG
fusA	fusA7ATCGGTATTTCTGCKCACATYGAT fusA8CCAACATACKYTGWACACCTTTGTT
gltA	gltAF AATTTACAGTGGCACATTAGGTCCC gltAR GCAGAGATACCAGCAGAGATACACG
pyrG	pyrG7 GGTGTTGTTTCATCACTAGGWAAAGG pyrG8 ATAAATGGTAAAGAYTCGATRTCACCMA
recA	recA:F:RA1 CCTGAATCTTCYGGTAAAAC recA:R:RA2GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC
rplB	rplB:F:rplB7GTAGAGCGTATTGAATACGATCCTAC rplB:R:rplB8 CACCACCACCRGTGYGGGTGATC
rpoB	rpoB:F:Vic4 GGCGAAATGGC(AGT)GA(AG)AACCA

proB:R:Vic6 GA(AG)TC(CT)TCGAAGTTGTAACC

Οι συνθήκες για την PCR είναι κοινές για όλα τα γονίδια και είναι: (βήμα denaturation) 94°C για 2 min και ακολουθούν 30 κύκλοι επαναλήψεων με 94°C για 30 sec, 50°C για 30 sec και 72°C για 30 sec ενώ το τελικό βήμα (elongation) είναι 72°C για 5 min. Η θερμαινόμενη κεφαλή του θερμοκυκλοποιητή θα πρέπει να είναι στους 105°C. Με αυτή την τεχνική προέκυψε προϊόν PCR για όλα τα γονίδια σε όλα τα στελέχη της συλλογής.

eBurst

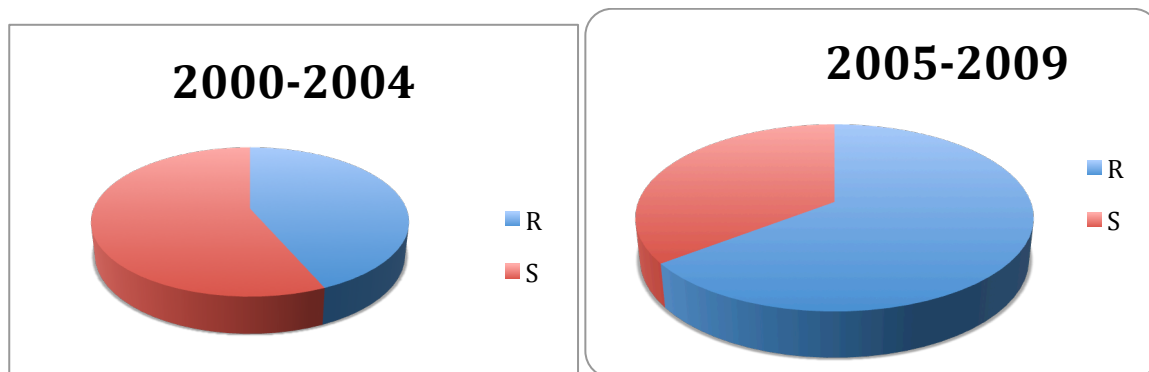
Τα δεδομένα που προέκυψαν από την MLST ανάλυση, επεξεργάστηκαν με το λογισμικό eBurst. Ο αλγόριθμος αυτός έχει κατασκευαστεί για να επεξεργάζονται στοιχεία από MLST δεδομένα αντικαθιστώντας κατά ένα τρόπο τα δένδρογράμματα. Επιχειρεί να προσδιορίσει τον ιδρυτικό γονότυπο (τύπου αλληλουχίας ή ST) της κάθε ομάδας. Ο αλγόριθμος προβλέπει στη συνέχεια την πορεία από τον υποτιθέμενο ιδρυτικό- κεντρικό γονότυπο στους άλλους γονοτύπους της ομάδας, εμφανίζοντας την πορεία ως ακτινικό διάγραμμα, με επίκεντρο τον προβλεπόμενο ως ιδρυτικό γονότυπο. Η διαδικασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε άλλες μεθόδους προσδιορισμού μοριακής δομής εκτός MLST. Το λογισμικό εφαρμόστηκε ακολουθώντας τους κανόνες που υπάρχουν στην συγκεκριμένη σελίδα <http://eburst.mlst.net/v3/instructions/>.

Πγ. Αποτελέσματα

1. Ευαισθησία των στελεχών στα αντιβιοτικά

Τα 94 επιλεγμένα στελέχη όπως και τα υπόλοιπα στελέχη της συλλογής ελέχθησαν με το σύστημα VITEK® 2 (bioMérieux, Inc.), χρησιμοποιώντας τις κάρτες AST-N117, AST-XN8 και AST-N103, προσδιορίζοντας την ευαισθησία τους. Ειδικά για τις καρβαπενέμες (ιμιπενέμη και μεροπενέμη), η MIC καθορίστηκε με τη μέθοδο των αραιώσεων του αντιβιοτικού σε άγαρ ακολουθώντας διεθνή κριτήρια αξιολόγησης (CLSI 2010) καθώς και με Etest IP (Ιμιπενέμη) και MP (Μεροπενέμη). Αξίζει να αναφερθεί ότι όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα στην κολιστίνη. Τα 46 από τα 94 στελέχη είχαν απομονωθεί την πενταετία

2000-2004, ενώ 48 στελέχη απομονώθηκαν την επόμενη πενταετία δηλαδή 2005-2009. Πενηντατέσσερα στελέχη (57,4%) ήταν ανθεκτικά στην Ιμιπενέμη (MIC>4 mg/L) ενώ 52 (55,3%) ήταν ανθεκτικά και στην μεροπενέμη (MIC>4 mg/L). Κατα τη χρονολογική περίοδο 2000-2004 (43,5%) των στελεχών ήταν ανθεκτικά στις καρβαπενέμες ενώ την επόμενη πενταετία το ποσοστό αυτό αυξήθηκε στο (64,6%).

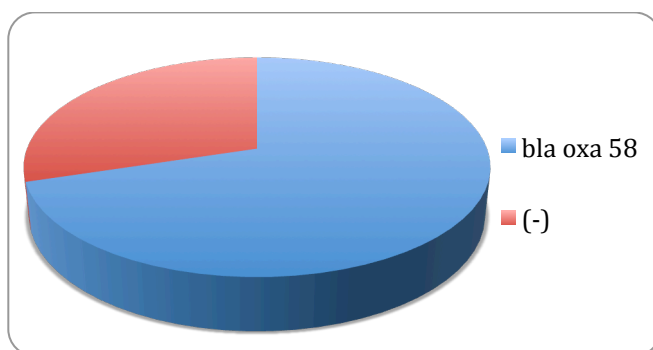


Εικόνα 15: Παρουσιάζεται η αντοχή και η ευαισθησία των στελεχών ανά πενταετία. Με μπλε χρώμα απεικονίζονται τα ανθεκτικά στελέχη στις καρβαπενέμες ενώ με κόκκινο τα ευαίσθητα.

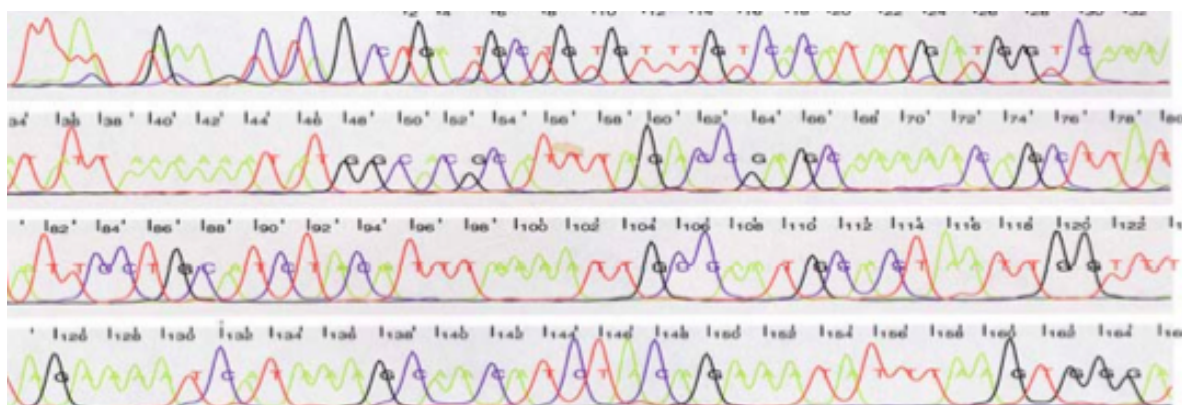
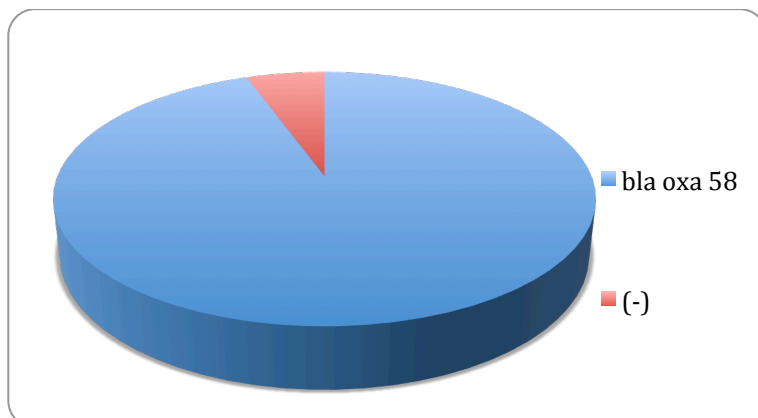
2. Μοριακή ανίχνευση καρβαπανεμασών

Η μοναδική επίκτητη καρβαπανεμάση, η οποία ανιχνεύθηκε στη συλλογή μας είναι η OXA-58. Το γονίδιο *bla*_{OXA-58} ανιχνεύθηκε σε 51 (94,4%) ανθεκτικά στελέχη στις καρβαπενέμες και σε 15 (40%) ευαίσθητα στις καρβαπενέμες.

Εικόνα 16: Ποσοστιαία παρουσίαση επί του συνόλου των στελεχών στα οποία ανιχνεύθηκε η παραγωγή της *bla*_{OXA-58}



Εικόνα 17: Ποσοστιαία παρουσίαση της παραγωγής της *bla*_{OXA-58} στα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη (51 από τα 54 στελέχη).



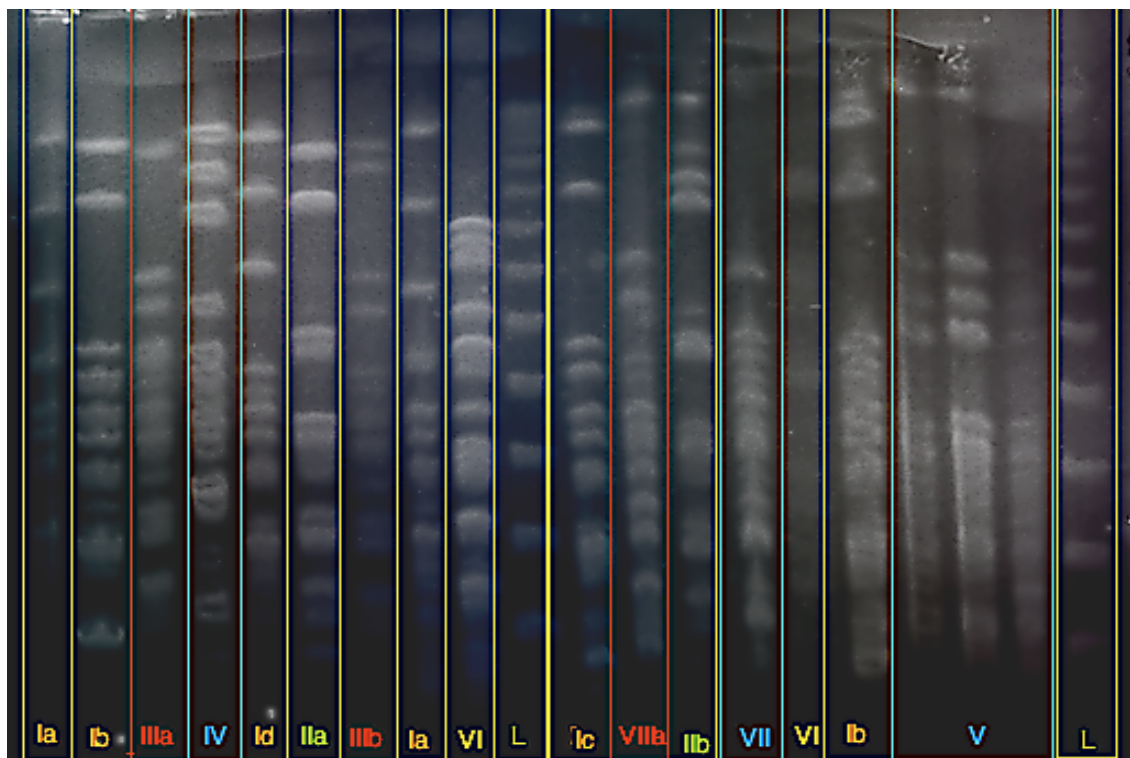
Νουκλεοτιδική αλληλουχία της οξακιλινάσης OXA -58.

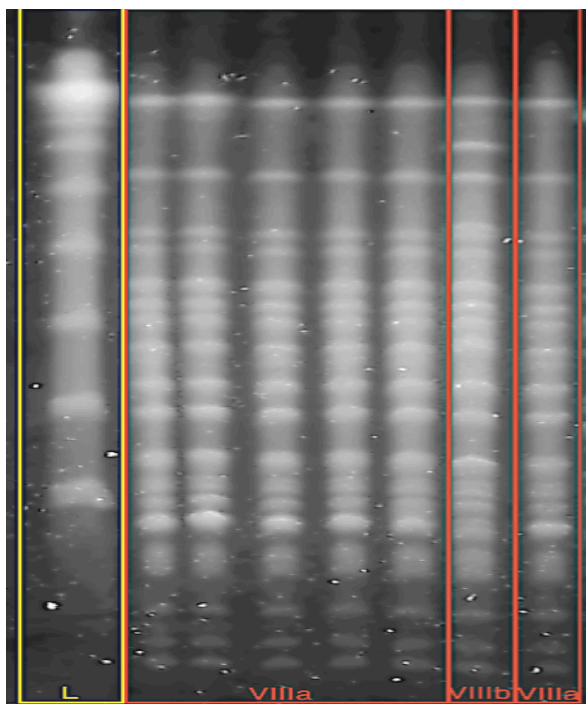
3. PFGE τυποποίηση

Η τυποποίηση με PFGE ανέδειξε την παρουσία οκτώ διαφορετικών κλώνων (I-VIII). Ο κλώνος VIII φαίνεται να είναι ο επικρατέστερος καθώς σε αυτόν ανήκουν 49 στελέχη. Οι PFGE τύποι I, II, III, και VIII περιελάμβαναν στελέχη τα οποία στην PFGE διέφεραν μεταξύ τους από μία έως τρεις μπάντες. Αυτά τα στελέχη δεν θεωρήθηκε ότι ανήκουν σε διαφορετικούς κλώνους αλλά σε υποτύπους των ήδη αναγνωρισμένων κλώνων. Πιο συγκεκριμένα οι πολυμορφισμοί του κλώνου I οδήγησαν στην διάκριση και ταυτοποίηση του Ia, Ib, Ic, Id. Για τον κλώνο II αντίστοιχα έχουμε τους υποτύπους IIa και IIb, για τον III οι IIIa και IIIb καθώς και οι VIIIa και VIIIb. Τα στελέχη τα οποία ανήκουν σε

διαφορετικούς κλώνους διαφέρουν τουλάχιστον κατά 6 μπάντες στην ηλεκτροφόρηση μεταβαλλόμενου πεδίου. Αξίζει να αναφέρουμε ότι οι κλώνοι I και VIII εντοπίστηκαν σε όλες τις περιοχές που καλύπτει η έρευνα ενώ ο κλώνος V υπήρξε μόνο στην βόρεια και κεντρική Ελλάδα.

Εικόνα 18: Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά στελέχη από όλους τους κλώνους που τυποποιήθηκαν.





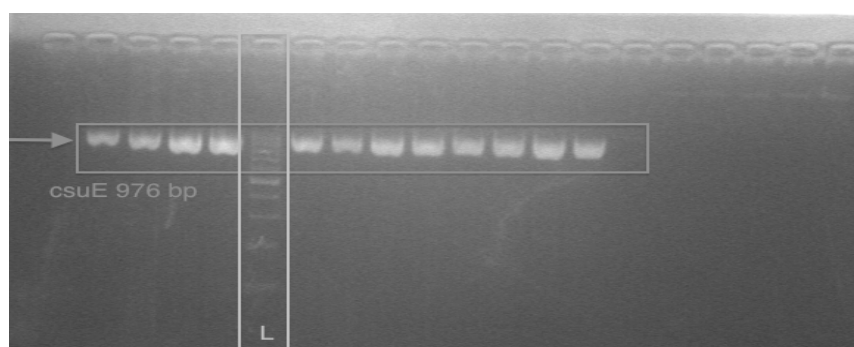
4. Τυποποίηση ST-MLST (Σχήματα Turton *et al.* και ινστιτούτου Pasteur)

Για την ολοκλήρωση της μελέτης ακολούθησε τυποποίηση των στελεχών με βάση το σχήμα της Turton και του ινστιτούτου Pasteur η οποία, όπως ήδη έχουμε αναφέρει λειτούργησε ικανοποιητικά για τα στελέχη της συλλογής μας. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζουν μεγάλο επιδημιολογικό ενδιαφέρον. Αναφέρουμε ότι η PCR πραγματοποιήθηκε με την DNA polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland) και η αλληλούχιση των προϊόντων έγινε από την (Macrogen Inc., Seoul, South Korea). Η ανάλυση των δεδομένων έγινε κάνοντας χρήση το λογισμικό της Chromas v 1.45 και MEGA v 3.1. Η τυποποίηση των στελεχών με βάση το σχήμα της Turton ανέδειξε τα ήδη υπάρχοντα groups αλληλίων (ST201, ST101, ST401) και σποραδικά στελέχη μη ταξινομημένα προς το παρόν με το σχήμα της Turton ST (1,4,1), ST (8,10,11), ST (9,12,8-1). Η καταχώρησή τους στο σχήμα της Turton δε ολοκληρώθηκε διότι τα στελέχη αυτά λόγω της περιορισμένης διασποράς τους θεωρήθηκαν μικρο-επιδημικά. Ειδικότερα η αλληλούχιση των τριών γονιδίων στα στελέχη της συλλογής αποκάλυψε την ύπαρξη 8 καινούριων αλληλίων. Για το γονίδιο *bla*_{OXA-51-like} τυποποιήθηκαν και ενσωματώθηκαν στην βάση δεδομένων της Turton τα εξής νέα αλλήλια: 2-1 στο οποίο υπάρχει μία καινούρια μετάλλαξη ενός νουκλεοτιδίου στη θέση 701 του γονιδιώματος, το αλλήλιο 10 το οποίο διαφέρει σε 5 νουκλεοτίδια σε σχέση το αλλήλιο 1, το 11 το οποίο διαφέρει σε 3 νουκλεοτίδια σε σχέση με το αλλήλιο 7 και το 12 το οποίο έχει διαφορά 3 νουκλεοτιδίων

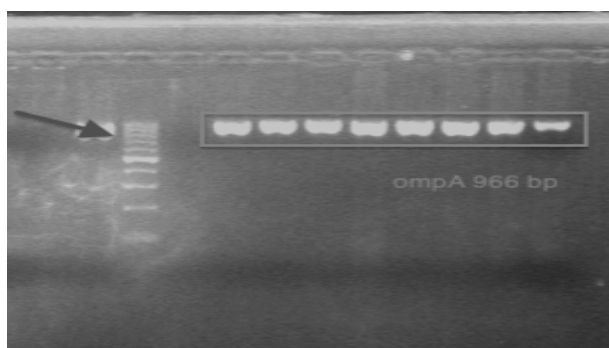
και 6 νουκλεοτιδίων με τα αλλήλια 7 και 11 αντίστοιχα. Για το γονίδιο *csuE* τυποποιήθηκαν τα εξής καινούρια αλλήλια: το αλλήλιο 11 το οποίο διαφέρει κατά 6 νουκλεοτίδια σε σχέση με το αλλήλιο 4 και το αλλήλιο 12 το οποίο διαφέρει κατά 8 νουκλεοτίδια σε σχέση με το αλλήλιο 1. Τέλος για το αλλήλιο *ompA* ταυτοποιήθηκαν και ορίστηκαν τα αλλήλια 8 και 9. Το αλλήλιο 8 διαφέρει κατά 7 νουκλεοτίδια από το πιο κοντινό αλλήλιο το οποίο είναι το 1 και το αλλήλιο 9 διαφέρει κατά 3 νουκλεοτίδια από το πιο κοντινό αλλήλιο που είναι το 5-1.

Σχήμα Turton. Εικόνες από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR

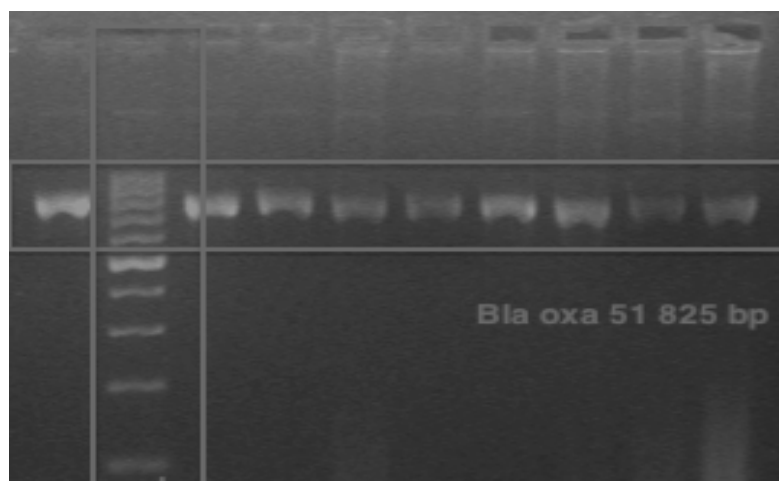
csuE



ompA



*bla*_{OXA-51-like}



Πίνακας 12: Τα νέα αλληλία που τυποποιήθηκαν και οι διαφορές νουκλεοτιδίων (nt) σε σχέση με τα υπάρχοντα αλληλία.

<i>New alleles</i>	<i>Closest match</i>
<i>bla</i> _{OXA-51-like}	
2-1	Allele 2 (1nt)
10	Allele 1 (5nt)
11	Allele 7 (3nt)
12	Allele 7 (3nt), Allele 11 (6nt)
<i>ompA</i>	
8	Allele 1 (7nt)
9	Allele 5-1(3nt)
<i>csuE</i>	
11	Allele 4 (6nt)
12	Allele 1 (8nt)

Τα στελέχη τα οποία στο γονιδιώμά τους φέρουν τις παραλλαγές των αλληλίων 2-1 και 8-1 τυποποιήθηκαν σε 3 ST Groups όπως το αλληλίο 2 και 8 αντίστοιχα. Τα στελέχη τα οποία στο γονιδιώμά τους έφεραν τα αλληλία (9,12,8-1) για τα γονίδια *ompA*, *bla*_{OXA51like} και *csuE* αντίστοιχα θεωρήθηκαν ότι ανήκουν στο Group ST (502) ή SG5. Αντίστοιχα τα στελέχη που φέρουν τα αλληλία (2,2-1,2) θεωρούμε ότι ανήκουν και αυτά στο Group ST (201). Συνεπώς σύμφωνα με το σχήμα της Turton δεν προέκυψε καινούριο STgroup πολύ σημαντική όμως είναι η ανάδειξη και καταχώρηση 8 καινούριων αλληλίων στην βάση δεδομένων της. Η σύγκριση των αλληλίων μετά την αλληλούχιση έγινε στην βάση δεδομένων BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Στη συνέχεια, παρουσιάζονται αναλυτικά οι αλληλουχίες των καινούριων αλληλίων καθώς και οι μεταλλάξεις τους.

ompA

Νέο αλληλίο: allele 8 (closest allele 1 with 7 mismatches)

```
GATGGTAACTTAACTAATTCACCTGAGTTACAAGACGATTTATTCGTTGGTGCAGCTCTTGG
TATCGAGTTAACTCCATGGTTAGGTTTCGAAGCTGAATATAACCAAGTTAAAGGCGACGTAGAC
GGCGCTTCTGCTGGTGTGCTGAATATAAACAACAAATCAACGGTAACTTCTATGTTACTTCTG
ATTTAATTACTAAAACTACGACAGCAAAATCAAGCCGTACGTATTATTAGGTGCTGGTCACTA
TAAATA GACTTTGATGGCGTAAA CGTGGTACACGTGGTA ACTC GAAGAAGGTACTTTAGGT
AACGCTGGTGTGGTGTCTTCTGGCGCTTAAACGA GCTTTATCTCTTCGTACTGAAGCTCGTGC
TACTTATAATGCTGATGAAGAGTTCTGGAACATAACAGCTCTTGCTGGCTTAAACGTAGTTCTTG
GTGGTCACTTGAAGCCTGCTGCTCCTGTAGTAGAAGTTGCTCCAGTTGAACCAACTCCAGTTGC
TCCACAACCACAAGAGTTAACTGAAGACCTTAACATGGAACCTTCGTGTGTTCTTTGATACTAAC
AAATCAAACATCAAAGACCAATACAAGCCAGAAAT GCTAAAGTTGCTGAAAAATTATCTGAA
TACCCTAACGCTACTGCACGTATCGAAGGTCACACAGATAACACTGG
```

Οι αλλαγές που σημειώθηκαν είναι σημειωμένες στην παραπάνω αλληλουχία. Αναλυτικότερα στη θέση 299 υπάρχει κυτοσίνη αντί για γουανίνη 299 C→T και εν συνεχεία έχουμε 317 C→T, 334 A→C, 335 C→T, 338 A→T, 392 T→C, 650 T→C.

Νέο αλληλίο: allele 9 (closest allele 5-1 with 3 mismatches)

```
GATGGTAACTTAACTAATGCACCTGAGTTACAAGACGATTTATTCGTTGGCGCAGCTCTTGG
TATCGAGTTAAACACCATGGTTAGGTTTCGAAGCTGAATATAACCAAGTTAAAGGCGACGTAGAC
GGCGCTTCTGCTGGTGTGCTGAATATAAACAACAAATCAACGGTAACTTCTATGTTACTTCTG
ATTTAATTACTAAAACTACGACAGCAAAATCAAGCCGTACGTATTATTAGGTGCTGGTCACTA
TAAATACGACTTTGATGGCGTAAACCGTGGTACACGTGGTACTT TTA GAAGGTACTTTAGGT
AACGCTGGTGTGGTGTCTTCTGGCGCTTAAACGACGCTTTATCTCTTCGTACTGAAGCTCGTGC
TACTTATAATGCTGATGAAGAGTTCTGGAACATAACAGCTCTTGCTGGCTTAAACGTAGTTCTTG
GTGGTCACTTGAAGCCTGCTGCTCCTGTAGTAGAAGTTGCTCCAGTTGAACCAACTCCAGTTGC
TCCACAACCACAAGAGTTAACTGAAGACCTTAACATGGAACCTTCGTGTGTTCTTTGATACTAAC
AAATCAAACATCAAAGACCAATACAAGCCAGAAATGCTAAAGTTGCTGAAAAATTATCTGAA
TACCCTAACGCTACTGCACGTATCGAAGGTCACACAGATAACACTGG
```

Οι αλλαγές είναι οι εξής θέση 299 T→C, θέση 301 T→G, θέση 303 T→A.

csuE

Νέο αλληλίο : allele 11 (όπως αλληλίο 4 με 6 αλλαγές)

```
CTTTACGCTGGTCAATCTTTTTAGCGGGCCTGATGGCAATTTACCTTTCTACATACGGCTTCC
GGCTGGGCAAAGTGTATCGCCGGGTGTTTATCGAGCCGACTCACCCTTAAAAGTAAAATGGTTC
TATTTCTGTGCCCCGAGTTGCGATTTGTGGGAATCGGTGCCTTCTTTGAGAGCCCTGGGTTTAAACG
TGGGGTATTAGGTATTGGTTTAACTGGGGAAGTGGGGCAGACTCGCTTGGTTCACCTCTCAATT
ACTGTACTGCCAGACTGCCGAATTTTA CTCAAGACGTAAACTTTGGTACGGCAGCATTTGCTT
CCAAGCTTGAGCCTGTTCAATCTTCTATGGGAATACGTTG TCT GTAAATACACCATATTATGT
AGTTTAAATAATGGACTTTCCCCGCAAAA GGCAACCAGCGAGC ATGAAGTCACAAACGGGA
A
```

Οι αλλαγές είναι οι εξής θέση 284 A→G, θέση 361 C→G, θέση 364 T→C, θέση 385 C→G, θέση 415 T→C, θέση 430 C→T.

Νέο αλληλίο: allele 12 (όπως αλληλίο 1 με 8 αλλαγές)

CTTTACGCTGGTCAATCTTTTTAGCGGGCCTGATGGCAATTTACCTTTCTACATACGGCTTCC
GGCTGGGCAAAAGTGTATCGCCGGGTGTATCAAGCCGACTCCCGTTAAAAAGTAAAAATGGTTC
TATTCTGTACCCGAGTGCGATTGTGGGAATCGGGGTGTTCTTTGAGAGTCCTGGGTTTAGAC
GCGGTGCATTGGGTATTGGTTTTAACTGGGGAAGTGGGGCAGACTCGCTTGGTTCACCTCTCAAT
TACGTACTCCAGACTGCCGAATTTTAGCTCAAGACGTAAACTTTGGTACGGCGGCGTTTGCTT
CCAAGCTTGAACCTGTTCACTCTTCTATGGGAATACGTTGCTCTGTAAATACACCATATTATGTG
AGTTTAAATAATGGACTTTCCCCGCAAAATGGCAACCAGCGAACCATGAAGTCACAAACGGGA
A

Οι αλλαγές είναι οι εξής θέση 91 G→T, θέση 106 A→G, θέση 145 C→T, θέση 259 C→T, θέση T→G, θέση 265 T→G, θέση 343 T→G, θέση 428 A→G, θέση 430 C→T.

***bla*_{OXA-51-like}**

Νέο αλλήλιο: allele 2-1 (αλλαγή ενός νουκλεοτιδίου στην θέση 701 του γονιδίου σε σχέση με το αλλήλιο 2)

TTAAAAATTTATTTAACGAAGCACACACTACGGGTGTTTTAGTTATCCATCAAGGTCAAAC
CAACAAAGCTATGGTAATGATCTTGCTCGTTCGACCGAGTATGTACCTGCTTCGACCTTCA
AAATGCTTAATGCTTTGATCGGCCTTGAGCACCATAAGGCAACCACCACAGAAGTATTTAAATG
GGATGGGGAAGGCTATTTCCAGAAATGGGAAAAGAACATGACCCTAGGCGATGCTATGAA
AGCTTCCGCTATTTCCGGTTTATCAAGATTTAGCTCGTTCGTTTGGACTTGAGCTCATGTCTAAGG
AAGTGAAGCGTGTGGTTATGGCAATGCAGATATCGGTACCCAAGTCGATAATTTTTGGCTGGT
GGGTCTCTAAAAATTAATCCTCAGCAAGAGGCACAGTTTGCTTACAAGCTAGCTAATAAAACG
CTTCCATTTAGCCAAAAAGTCCAAGATGAAGTGCAATCCATGCTATTCATAGAAGAAAAGAAT
GGAAATAAAATATACGCAAAAAGTGGTTGGGGATGGGATGTAAACCCACAAGTAGGCTGGTTA
ACTGGATGGTTGTTTCAGCCTCAAGGGAATATTGTAGCGTTCTCCCTTAAGTAAATGAAAA
AAGGAATACCTAGC

Η αλλαγή που σημειώθηκε είναι C στη θέση της G στη θέση 701.

Νέο αλλήλιο: allele 10 (όπως αλλήλιο 1, με 5 αλλαγές νουκλεοτιδίων)

CCAAATCACAGGCTTCAAAAATCTGATGAAAAAGCAGAGAAAATTTAAAAATTTATTTAACG
AAGCACACACTACGGGTGTTTTAGTTATCCAACAAGGCCAAACTCAACAAAGCTATGGTAATG
ATCTTGCTCGTTCGACCGAGTATGTACCTGCTTCGACCTTCAAAAATGCTTAATGCTTTGATC
GGCCTTGAGCACCATAAGGCAACCACCACAGAAGTATTTAAGTGGGATGGTAAAAAAAGGTTA
TTCCCAGAATGGGAAAAGGACATGACCCTAGGCGATGCCATGAAAGCTTCCGCTATTCCGTTT
ATCAAGATTTAGCTCGTTCGTTTGGACTTGAGCTCATGTCTAAGGAAGTGAAGCGTGTGGTTA
TGGCAATGCAGATATCGGTACCCAAGTCGATAATTTTTGGCTGGTGGGTCTTTAAAAATTAAT
CCTCAGCAAGAGGCACAGTTTGCTTACAAGCTAGCTAATAAAACGCTTCCATTTAGCCAAAAAG
TCCAAGATGAAGTGCAATCCATGCTATTCATAGAAGAAAAGAATGGAAAATAAATATACGCAA
AAAGTGGTTGGGATGGGATGTAAACCCACAAGTAGGCTGGTTAACTGGATGGGTTGTTTCAGC
CTCAAGGGAATATTGTAGCGTTCTCCCTTAAGTAAATGAAAAAAGGAATACCTAGC

Οι αλλαγές είναι οι εξής: θέση 12 T→C, θέση 29 A→T, θέση 312 G→A, θέση 558 T→C, θέση 659 T→A.

Νέο αλλήλιο: allele 11 (όπως αλλήλιο 7 με 3 αλλαγές νουκλεοτιδίων)

CCAAATCACAGGCTTCAAAAATCTGATGAAAAAGCAGAGAAAATTTAAAAATTTATTTAACG
AAGACACACTACGGGTGTTTTAGTTATCCAACAAGGCCAAACTCAACAAAGCTATGGTAATG

```

ATCTTGCTCGTGTTCGACCGAGTATGTACCTGCTTCGACCTTCAAAATGCTTAATGCTTTGATC
GGCCTTGAGCACCATAAGGCAACCACCACAGAAGTATTTAAGTGGGACGGGCAAAAAAGGCTA
TCCCAGAATGGGAAAAGGACATGACCCTAGGCGATGCTATGAAAGCTTCCGCTATTCCGGTTT
ATCAAGATTTAGCTCGTTCGTATTGGACTTGAACCTCATGTCTAA1GAAGTGAAGCGTGTGGTTA
TGGCAATGCAGATATCGGTACCCAAGTCGATAATTTTTGGCTGGTGGGTCCTTTAAAAATTACT
CCTCAGCAAGAGGCACAGTTTGCTTACAAGCTAGCTAATAAAAACGCTTCCATTTAGCCCCAAAAG
TCCAAGATGAAGTGCAATCCATGTTATTCATAGAAGAAAAGAATGGAAATAAAATATACGCAA
AAAGTGGTTGGGGATGGGATGTAGACCCACAAGTAGGCTGGTTAACTGGATGGGTGTTCAGC
CTCAAGGAAATATTGTAGCGTTCTCCCTTAACTTAGAAATGAAAAAAGGAATACCTAGC

```

Οι αλλαγές είναι οι εξής: θέση 12 T→C, θέση 65 C→T, θέση T→G.

Νέο αλληλίο: allele 12 (όπως αλληλίο 7 με τρεις αλλαγές ή όπως αλληλίο 11 με 6 διαφορές)

```

CCAAATCACAGCGCTTCAAAATCTGATGAAAAAGCAGAGAAAATTAAAAATTTATTTAACG
AAGTACACACTACGGGTGTTTTAGTTATCCAACAAGGCCAAACTCAACAAAGCTATGGTAATGA
TCTTGCTCGTGTTCGACCGAGTATGTACCTGCTTCGACCTTCAAAATGCTTAATGCTTTGATCG
GCCTTGAGCACCATAAGGCAACCACCACAGAAGTATTTAAGTGGGACGGGCAAAAAAGGCTAT
TCCCAGAATGGGAAAAGGACATGACCCTAGGCGATGCTATGAAAGCTTCCGCTATTCCGGTTTA
TCAAGATTTAGCTCGTTCGTATTGGACTTGAACCTCATGTCTAAGGAAGTGAAGCGTGTGGTTAT
G1TAATG1AGATATCGGTACCCAAGTCGATAATTTTTGGCTGGTGGGTCCTTTAAAAATTACTCC
TCAGCAAGAGGCACAGTTTGCTTACAAGCTAGCTAATAAAAACGCTTCCATTTAGCCCCAAAAGTC
CAAGATGAAGTGCAATCCATGTTATTCATAGAAGAAAAGAATGGAAATAAAATATACGCAAAA
AGTGGTTGGGGATGGGATGTAGACCCACAAGTAGGCTGGTTAACTGGATGGGTGTTCAGCCTC
AAGGAAATATTGTAGCGTTCTCCCTTAACTTAGAAATGAAAAAAGGAATACCTAGC

```

Οι αλλαγές είναι οι εξής : θέση 383 T→G, θέση 384 T→C, θέση 389 T→C. Η σύγκριση έγινε με το αλληλίο 7.

Η τυποποίηση με το σχήμα που χρησιμοποιεί το Institute Pasteur's (www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Abaumannii.html) ανέδειξε την παρουσία των ήδη αναγνωρισμένων ST τύπων (1,2,15,45 και 54) καθώς και δύο καινούριων ST τύπων (ST 85 και ST 86). Αξίζει να σημειωθεί ότι υπήρξε μεγάλη συμφωνία ανάμεσα στις δύο τεχνικές τυποποίησης. Αναλυτικότερα ο PFGE τύπος I φαίνεται πως αντιστοιχεί στον ST τύπο 1, οι PFGE τύποι IIa και IIb αντιστοιχούν στον ST τύπο 85, ενώ οι PFGE τύποι IV και V ταυτίζονται με τους ST τύπους 86 και 54 αντίστοιχα. Ομοίως ο PFGE τύπος VI αντιστοιχεί στον ST τύπο 15, ο PFGE τύπος VII στον ST 25 και ο τύπος VIIIa στον ST2. Εντούτοις υπάρχουν και στελέχη που προέρχονται από διαφορετικό κλώνο και έχουν τον ίδιο ST τύπο. Πιο συγκεκριμένα στελέχη τα οποία έχουν τυποποιηθεί με ST τύπο 45 φαίνεται να ανήκουν στον κλώνο VIIIb καθώς και IIIa και IIIb.

Η ανάλυση με EBurst των 7 STs που προέκυψαν σε αυτή τη μελέτη μαζί με τους υπόλοιπους MLST τύπους ανέδειξε ότι οι τύποι ST 2 και ST 45, ο τελευταίος πρώτη φορά τυποποιήθηκε στην Ελλάδα, είναι single locus variants (SLVs) και ανήκουν στον διεθνή

κλώνο CC2 (Diancourt *et al.* 2010). Αξίζει να σημειωθεί σε αυτό το σημείο ότι ST τύποι που έχουν διαφορά σε ένα μόνο αλληλίο γονιδίου από τα 7 που εξετάζουμε ορίζονται ως Single Locus Variants – SLV. Αντίστοιχα οι STς που διαφέρουν σε δύο αλληλίου γονιδίων ορίζονται ως Double Locus Variants – DLV. Ο τύπος ST1 ανήκει στο διεθνή κλώνο CC1, ο ST15 είναι SLV με τον ST84. Ανήκουν στο Group 4 στο οποίο ο ST 15 αποτελεί τον ιδρυτικό γονότυπο. Ο ST54 (12,3,18,2,17,4,5) είναι SLV του ST99 (12,3,18,2,4,4,5) Group 16, ο ST85 είναι SLV του ST6 και ανήκουν στο Group 18. Τα STs 25 και 86 αναφέρονται ως singletons και αυτό διότι διαφέρουν από τα άλλα profiles STs τουλάχιστον σε δύο γονίδια.

5. eBurst Report

Συγκριτική ανάλυση των στελεχών της μελέτης σε σχέση με τη βάση δεδομένων του *A. baumannii* (παρατίθεται για όλους τις ομάδες ST-τύπων, με κίτρινο οι τύποι που ανιχνεύθηκαν στην παρούσα μελέτη):

eBURST Report - Sat Aug 18 17:24:49 EEST 2012

No. isolates = 193 | No. STs = 193 | No. re-samplings for bootstrapping = 1000

No. loci per isolate = 7 | No. identical loci for group def = 6 | No. groups = 23

Group 1: No. Isolates = 14 | No. STs = 14 | Predicted Founder = 1

ST		FREQ	SLV	DLV	TLV	Average		ST Bootstrap	
						SAT	Distance	Group	Subgrp
1	1	8	3	1	1	1.61	98%	99%	
7		1	3	7	3	0	2.0	6%	0%
19		1	3	7	1	2	2.23	13%	23%
101		1	3	3	5	2	2.46	16%	11%
8		1	2	8	3	0	2.07	0%	0%
81		1	2	8	3	0	2.07	0%	0%
160		1	2	7	3	1	2.23	0%	0%
116		1	2	7	3	1	2.23	0%	0%
20		1	2	6	3	2	2.46	0%	0%
125		1	2	6	3	2	2.46	0%	0%
100		1	2	3	3	5	2.92	3%	0%
174		1	1	4	5	3	2.84	0%	0%
94		1	1	2	7	3	3.15	0%	0%
102		1	1	1	3	8	3.84	0%	0%

Group 2: No. Isolates = 13 | No. STs = 13 | Predicted Founder = 2

ST		FREQ	SLV	DLV	TLV	Average		ST Bootstrap	
						SAT	Distance	Group	Subgrp
2	1	11	1	0	0	1.08	100%	100%	
104		1	4	7	1	0	1.75	3%	10%
187		1	4	7	1	0	1.75	3%	9%
185		1	4	7	1	0	1.75	6%	9%

143	1	4	7	1	0	1.75	8%	10%
98	1	3	9	0	0	1.75	16%	0%
183	1	3	8	1	0	1.83	2%	0%
47	1	3	8	1	0	1.83	3%	0%
45	1	3	8	1	0	1.83	6%	0%
97	1	2	10	0	0	1.83	0%	0%
184	1	2	10	0	0	1.83	0%	0%
96	1	2	2	8	0	2.5	1%	0%
115	1	1	10	1	0	2.0	0%	0%

Group 3: No. Isolates = 11 | No. STs = 11 | Predicted Founder = 79

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average	ST Bootstrap	
						Distance	Group	Subgrp
79	1	5	1	3	1	2.0	62%	73%
167	1	4	2	4	0	2.0	31%	39%
109	1	4	2	3	1	2.1	37%	46%
170	1	3	3	4	0	2.1	4%	2%
175	1	3	3	3	1	2.2	5%	2%
166	1	3	3	3	1	2.2	4%	2%
168	1	3	2	4	1	2.3	0%	2%
171	1	3	2	4	1	2.3	1%	2%
169	1	2	7	1	0	1.9	1%	0%
156	1	1	4	2	3	2.7	0%	0%
83	1	1	3	3	3	2.8	0%	0%

Group 4: No. Isolates = 5 | No. STs = 5 | Predicted Founder = 15

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average	ST Bootstrap	
						Distance	Group	Subgrp
15	1	3	1	0	0	1.25	57%	16%
180	1	2	2	0	0	1.5	20%	0%
84	1	1	2	1	0	2.0	0%	0%
165	1	1	2	1	0	2.0	0%	0%
182	1	1	1	2	0	2.25	0%	0%

Group 5: No. Isolates = 4 | No. STs = 4 | Predicted Founder = 3

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average	ST Bootstrap	
						Distance	Group	Subgrp
3	1	3	0	0	0	1.0	61%	17%
181	1	2	1	0	0	1.33	5%	0%
124	1	2	1	0	0	1.33	9%	0%
14	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%

Group 6: No. Isolates = 4 | No. STs = 4 | Predicted Founder = 32

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average	ST Bootstrap	
						Distance	Group	Subgrp
32	1	3	0	0	0	1.0	75%	14%
53	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%
28	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%
128	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%

Group 7: No. Isolates = 4 | No. STs = 4 | Predicted Founder = Multiple Candidates

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	Average		ST Bootstrap	
					SAT	Distance	Group	Subgrp
130	1	2	1	0	0	1.33	26%	0%
34	1	2	1	0	0	1.33	26%	0%
153	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%
120	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%

Group 8: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 105

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	Average		ST Bootstrap	
					SAT	Distance	Group	Subgrp
105	1	2	0	0	0	1.0	32%	0%
40	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
36	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 9: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 121

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	Average		ST Bootstrap	
					SAT	Distance	Group	Subgrp
121	1	2	0	0	0	1.0	34%	0%
93	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
122	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 10: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 10

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	Average		ST Bootstrap	
					SAT	Distance	Group	Subgrp
10	1	2	0	0	0	1.0	30%	0%
82	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
23	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 11: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 162

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	Average		ST Bootstrap	
					SAT	Distance	Group	Subgrp
162	1	2	0	0	0	1.0	33%	0%
189	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
163	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 12: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 64

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	Average		ST Bootstrap	
					SAT	Distance	Group	Subgrp
64	1	2	0	0	0	1.0	33%	0%
75	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
63	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 13: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 113

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	Average		ST Bootstrap	
					SAT	Distance	Group	Subgrp
113	1	2	0	0	0	1.0	30%	0%
178	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
114	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 14: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 33

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	Average		ST Bootstrap	
					SAT	Distance	Group	Subgrp
33	1	2	0	0	0	1.0	35%	0%
151	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
132	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 15: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
108	1	1	0	0	0	1.0
112	1	1	0	0	0	1.0

Group 16: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
99	1	1	0	0	0	1.0
54	1	1	0	0	0	1.0

Group 17: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
95	1	1	0	0	0	1.0
157	1	1	0	0	0	1.0

Group 18: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
85	1	1	0	0	0	1.0
6	1	1	0	0	0	1.0

Group 19: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
186	1	1	0	0	0	1.0
49	1	1	0	0	0	1.0

Group 20: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
71	1	1	0	0	0	1.0
161	1	1	0	0	0	1.0

Group 21: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
67	1	1	0	0	0	1.0
66	1	1	0	0	0	1.0

Group 22: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
59	1	1	0	0	0	1.0
136	1	1	0	0	0	1.0

Group 23: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
46	1	1	0	0	0	1.0
149	1	1	0	0	0	1.0

Singletons: 99 STs (με κίτρινο οι μονήρεις τύποι της παρούσας μελέτης)

107 106 103 92 91 90 193 192 191 190 89 88 87 86 81 88 78 77 76 74 73 72 70 179
 177 176 173 172 69 68 65 62 61 60 164 58 57 56 55 52 51 50 159 158 155 154 152 150
 48 44 43 42 41 148 147 146 145 144 142 141 140 39 38 37 35 31 30 139 138 137 135 134 133
 131 29 27 26 25 24 22 21 9 129 5 127 4 126 123 18 17 16 13 12 11 119 118 117 111 110

E Burst Report της μελέτης

eBURST Report - Sat Aug 18 17:15:02 EEST 2012

No. isolates = 94 | No. STs = 8 | No. re-samplings for bootstrapping = 1000

No. loci per isolate = 7 | No. identical loci for group def = 6 | No. groups = 1

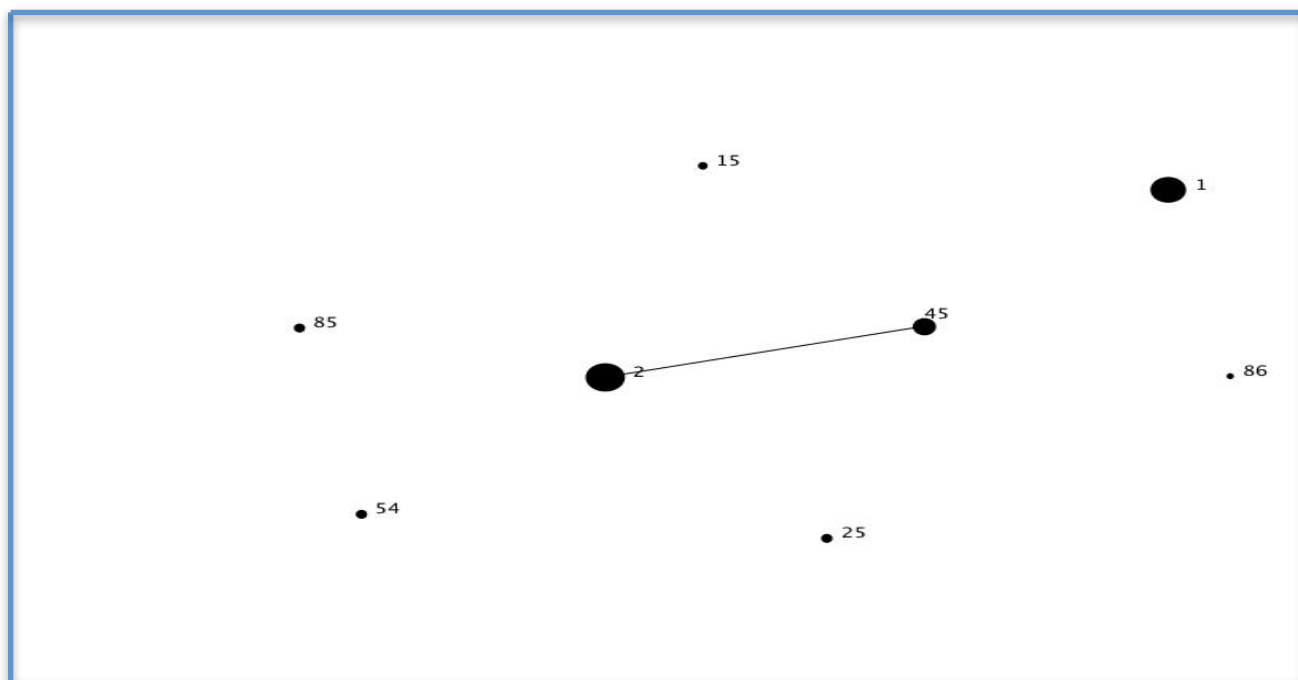
Group 1: No. Isolates = 51 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
2	38	1	0	0	0	1.0
45	13	1	0	0	0	1.0

Singletons: size 6

15
 25
 86
 85
 1
 54

Εικόνα 19: EBurst των 94 στελεχών της μελέτης



Τα αποτελέσματα από τα δύο σχήματα τυποποίησης βρίσκονται σε απόλυτη συμφωνία. Αναλυτικότερα τα στελέχη που ανήκουν στον ST τύπο 2 και ST45 (CC2) αντιστοιχούν στον τύπο ST101 κατά Turton. Ομοίως τα στελέχη που ανήκουν βάση του σχήματος Pasteur στον ST1 (CC1) στο σχήμα της Turton ανήκουν στο ST201, ενώ το ST25 και 15 ανήκουν στο ST401 και 501 της Turton αντίστοιχα. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται όλα τα αποτελέσματα από τις 3 μεθόδους τυποποίησης που εφαρμόστηκαν.

Πίνακας 13: Συγκριτικά αποτελέσματα όλων των μεθόδων τυποποίησης.

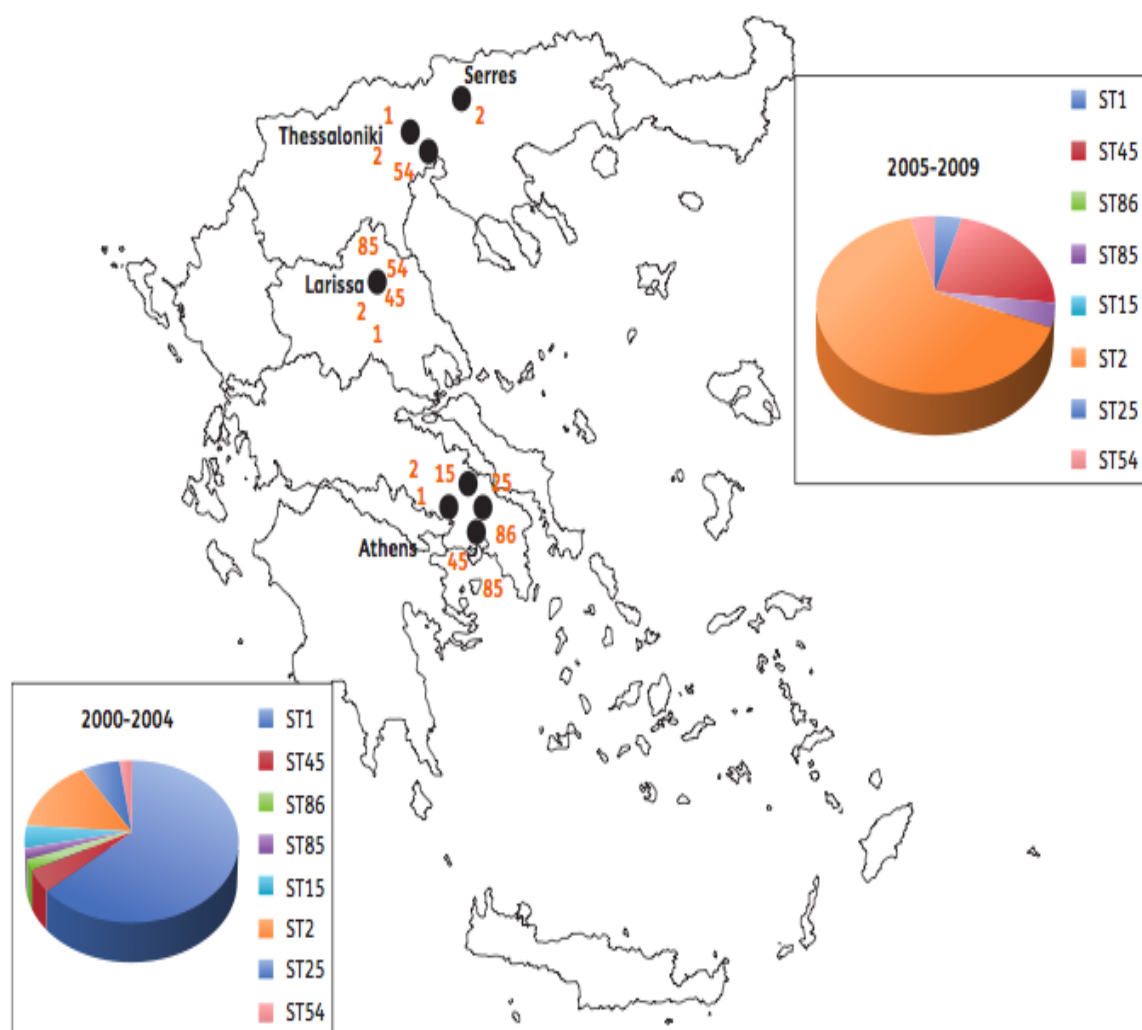
train	HOSPITAL/CITY	COUNTRY	YEAR	PFGE	3ST-group	Specific 3ST-Typing alleles			MLST	IMP MIC	MER MIC	bla _{ox}
						ompA	csuE	bla _{oxa} -51-like				
	Red Cross Hosp./Athens	Greece	2002	Ia	2	2	2	2	1	64	8	Pres
	Red Cross Hosp./Athens	Greece	2002	Ia	2	2	2	2	1	256	16	Pres
	Red Cross Hosp./Athens	Greece	2002	Ia	2	2	2	2	1	256	16	Pres
	Red Cross Hosp./Athens	Greece	2002	Ia	2	2	2	2	1	256	16	Pres
	Red Cross Hosp./Athens	Greece	2002	Ib	2	2	2	2_1	1	16	16	Pres
	Red Cross Hosp./Athens	Greece	2002	Ib	2	2	2	2_1	1	128	8	Pres
	Red Cross Hosp./Athens	Greece	2002	Ib	2	2	2	2_1	1	256	16	Pres
	Red Cross Hosp./Athens	Greece	2002	Ib	2	2	2	2_1	1	64	8	Pres
	Red Cross Hosp./Athens	Greece	2002	Ib	2	2	2	2_1	1	64	8	Pres
0	Red Cross Hosp./Athens	Greece	2002	Ib	2	2	2	2_1	1	64	8	Pres
1	Red Cross Hosp./Athens	Greece	2002	IIIa	1	1	1	1	45	16	4	Pres
2	Red Cross Hosp./Athens	Greece	2002	IV	ND	1	1	4	86	8	2	Abse
3	Univ. Hosp./Larissa	Greece	2008	Id	2	2	2	2_1	1	0.5	1	Abse
4	Univ. Hosp./Larissa	Greece	2008	Id	2	2	2	2_1	1	1	2	Abse
5	Univ. Hosp./Larissa	Greece	2008	Ila	ND	8	11	10	85	2	1	Abse
6	Univ. Hosp./Larissa	Greece	2007	Ila	ND	8	11	10	85	2	1	Abse
7	KAT/Athens	Greece	2001	IIIb	1	1	1	1	45	0,75	0,5	Abse
8	KAT/Athens	Greece	2001	Ia	2	2	2	2	1	>32	8	Pres
9	KAT/Athens	Greece	2001	Ia	2	2	2	2	1	6	2	Pres
0	KAT/Athens	Greece	2001	Ia	2	2	2	2	1	32	>32	Pres
1	KAT/Athens	Greece	2001	Ia	2	2	2	2	1	24	20	Pres
2	KAT/Athens	Greece	2001	Ia	2	2	2	2	1	32	16	Pres
3	KAT/Athens	Greece	2001	Ia	2	2	2	2	1	16	8	Pres
4	KAT/Athens	Greece	2001	Ia	2	2	2	2	1	16	8	Pres
5	KAT/Athens	Greece	2001	Ia	2	2	2	2	1	32	16	Pres
6	KAT/Athens	Greece	2001	Ia	2	2	2	2	1	32	16	Pres
7	KAT/Athens	Greece	2001	Ia	2	2	2	2	1	32	16	Pres
8	KAT/Athens	Greece	2001	Ia	2	2	2	2	1	16	8	Pres
9	KAT/Athens	Greece	2001	Ia	2	2	2	2	1	16	8	Pres
0	KAT/Athens	Greece	2001	Ia	2	2	2	2	1	16	8	Pres
1	Hippokration/Athens	Greece	2003	VI	5	9	8-1	12	15	16	8	Abse
2	Tzanion/Athens	Greece	2002	Ic	2	2	2	2	1	4	1	Pres
3	Tzanion/Athens	Greece	2002	Ic	2	2	2	2	1	2	1	Pres
4	Tzanion/Athens	Greece	2002	Ic	2	2	2	2	1	4	1	Pres
5	Tzanion/Athens	Greece	2002	Ic	2	2	2	2	1	4	1	Pres
6	Tzanion/Athens	Greece	2002	Ic	2	2	2	2	1	2	1	Pres
7	Tzanion/Athens	Greece	2002	VIIIa	1	1	1	1	2	6	2	Pres
8	Tzanion/Athens	Greece	2002	VIIIa	1	1	1	1	2	6	2	Pres
9	Hippokration/Athens	Greece	2002	Iib	ND	8	11	10	85	0,5	0,5	Abse
0	Hippokration/Athens	Greece	2003	VII	4	4	7	4	25	32	4	Pres
1	Hippokration/Athens	Greece	2003	VII	4	4	7	4	25	16	8	Pres
2	Hippokration/Athens	Greece	2003	VII	4	4	7	4	25	16	8	Pres
3	Hippokration/Athens	Greece	2003	VI	5	9	8-1	12	15	0,75	2	Abse
4	Hippokration/Thessaloniki	Greece	2003	Ic	2	2	2	2_1	1	32	4	Pres
5	Hippokration/Thessaloniki	Greece	2004	V	ND	8	12	11	54	1	1	Pres
6	Univ. Hosp./Larissa	Greece	2007	V	ND	8	12	11	54	0,25	1	Abse

7	Univ. Hosp./Larissa	Greece	2007	V	ND	8	12	11	54	2	1	Abse
8	Hippokration/Thessaloniki	Greece	2003	VIIIa	1	1	1	1	2	1	0,5	Abse
9	Tzanion/Athens	Greece	2004	VIIIa	1	1	1	1	2	2	2	Pres
0	Tzanion/Athens	Greece	2004	VIIIa	1	1	1	1	2	1	0,5	Pres
1	Tzanion/Athens	Greece	2004	VIIIa	1	1	1	1	2	1	0,5	Pres
2	Tzanion/Athens	Greece	2004	VIIIa	1	1	1	1	2	1	0,5	Pres
3	Univ. Hosp./Larissa	Greece	2007	VIIIa	1	1	1	1	2	32	8	Pres
4	Univ. Hosp./Larissa	Greece	2007	VIIIa	1	1	1	1	2	16	8	Pres
5	Univ. Hosp./Larissa	Greece	2007	VIIIa	1	1	1	1	2	32	16	Pres
6	General Serres	Greece	2005	VIIIa	1	1	1	1	2	32	16	Pres
7	General Serres	Greece	2005	VIIIa	1	1	1	1	2	32	24	Pres
8	General Serres	Greece	2005	VIIIa	1	1	1	1	2	32	24	Pres
9	General Serres	Greece	2005	VIIIa	1	1	1	1	2	32	16	Pres
0	Univ. Hosp./Larissa	Greece	2007	VIIIb	1	1	1	1	45	0,25	0,25	Abse
1	Univ. Hosp./Larissa	Greece	2007	VIIIb	1	1	1	1	45	2	2	Abse
2	Univ. Hosp./Larissa	Greece	2007	VIIIb	1	1	1	1	45	4	4	Abse
3	Univ. Hosp./Larissa	Greece	2007	VIIIb	1	1	1	1	45	2	0,5	Abse
4	Univ. Hosp./Larissa	Greece	2007	VIIIb	1	1	1	1	45	0,5	0,25	Abse
5	Univ. Hosp./Larissa	Greece	2007	VIIIb	1	1	1	1	45	1	0,5	Abse
6	Univ. Hosp./Larissa	Greece	2007	VIIIb	1	1	1	1	45	0,5	0,25	Abse
7	Univ. Hosp./Larissa	Greece	2007	VIIIb	1	1	1	1	45	0,5	0,25	Abse
8	Univ. Hosp./Larissa	Greece	2007	VIIIb	1	1	1	1	45	1	0,5	Abse
9	Univ. Hosp./Larissa	Greece	2007	VIIIb	1	1	1	1	45	1	0,25	Abse
0	Univ. Hosp./Larissa	Greece	2007	VIIIb	1	1	1	1	45	1	0,5	Abse
1	Papanikolaou/Thessaloniki	Greece	2007	VIIIa	1	1	1	1	2	16	8	Pres
2	Papanikolaou/Thessaloniki	Greece	2007	VIIIa	1	1	1	1	2	24	12	Pres
3	Papanikolaou/Thessaloniki	Greece	2007	VIIIa	1	1	1	1	2	32	24	Pres
4	Papanikolaou/Thessaloniki	Greece	2007	VIIIa	1	1	1	1	2	>256	6	Pres
5	Papanikolaou/Thessaloniki	Greece	2007	VIIIa	1	1	1	1	2	>256	>32	Pres
6	Papanikolaou/Thessaloniki	Greece	2007	VIIIa	1	1	1	1	2	>256	>32	Pres
7	Papanikolaou/Thessaloniki	Greece	2007	VIIIa	1	1	1	1	2	>256	>32	Pres
8	Papanikolaou/Thessaloniki	Greece	2007	VIIIa	1	1	1	1	2	96	12	Pres
9	Papanikolaou/Thessaloniki	Greece	2007	VIIIa	1	1	1	1	2	48	3	Pres
0	Papanikolaou/Thessaloniki	Greece	2007	VIIIa	1	1	1	1	2	48	2	Pres
1	Papanikolaou/Thessaloniki	Greece	2007	VIIIa	1	1	1	1	2	16	3	Pres
2	Papanikolaou/Thessaloniki	Greece	2007	VIIIa	1	1	1	1	2	16	8	Pres
3	Papanikolaou/Thessaloniki	Greece	2007	VIIIa	1	1	1	1	2	16	8	Pres
4	Papanikolaou/Thessaloniki	Greece	2007	VIIIa	1	1	1	1	2	>256	32	Pres
5	Papanikolaou/Thessaloniki	Greece	2007	VIIIa	1	1	1	1	2	>256	>32	Pres
6	Papanikolaou/Thessaloniki	Greece	2007	VIIIa	1	1	1	1	2	>256	>32	Pres
7	Papanikolaou/Thessaloniki	Greece	2007	VIIIa	1	1	1	1	2	32	8	Pres
8	Papanikolaou/Thessaloniki	Greece	2007	VIIIa	1	1	1	1	2	32	8	Pres
9	Papanikolaou/Thessaloniki	Greece	2007	VIIIa	1	1	1	1	2	96	12	Pres
0	Papanikolaou/Thessaloniki	Greece	2007	VIIIa	1	1	1	1	2	96	12	Pres
1	Papanikolaou/Thessaloniki	Greece	2007	VIIIa	1	1	1	1	2	18	12	Pres
2	Papanikolaou/Thessaloniki	Greece	2007	VIIIa	1	1	1	1	2	16	8	Pres
3	Papanikolaou/Thessaloniki	Greece	2007	VIIIa	1	1	1	1	2	32	16	Pres
4	Papanikolaou/Thessaloniki	Greece	2007	VIIIa	1	1	1	1	2	32	16	Pres

Η πλειοψηφία των στελεχών (52) ανήκει στο GroupST 101 (3LST Group1) και τον διεθνή κλώνο II CC2 από τα οποία 38 στελέχη ανήκουν στον ST2 και 14 στελέχη στο ST45. Τριανταένα στελέχη ανήκουν στο ST 201 και ST1 (CC1). Οι κλώνοι CC1 και CC2 περιλαμβάνουν στελέχη από όλες τις γεωγραφικές περιοχές. Η πλειοψηφία των στελεχών

που απομονώθηκαν από το 2000-2004 ανήκουν στο ST201 (29/46, 63%), ενώ αυτά που απομονώθηκαν την πενταετία 2005-2009 άνηκαν κυρίως στο ST101 (42/48, 87,5%). Τα υπόλοιπα στελέχη που απομονώθηκαν από το 2000 έως το 2004 ανήκουν στο ST101 (εννέα στελέχη), στο ST401 (3 στελέχη), ST 502 (2 στελέχη) και 3 στελέχη μη ταξινομήσιμα προς το παρόν στο σχήμα της Turton. Για τη χρονολογική περίοδο 2005-2009, δύο στελέχη ανήκουν στο ST201 και τέσσερα στελέχη είναι μη ταξινομήσιμα. Αναφορικά με τους καινούριους τύπους ST85 και ST86 που τυποποιήθηκαν με βάση το σχήμα Pasteur, αξίζει να σημειωθεί ότι ο ST85 έχει απομονωθεί ακόμα και σε απομακρυσμένες περιοχές στην Ελλάδα. Η γεωγραφική κατανομή των στελεχών στον ελληνικό χώρο φαίνεται στη παρακάτω εικόνα. Στην εικόνα επίσης παρουσιάζεται και η κατανομή των STs ανά χρονολογική περίοδο.

Εικόνα 20: Παρουσιάζεται η κατανομή ST-τύπων ανά γεωγραφική περιοχή καθώς και χρονολογική περίοδο.



6. Συσχέτιση ευαισθησίας με ST τύπο

Αναφορικά με την ευαισθησία των STs στην ιμιπενέμη αυτό που προκύπτει είναι το εξής: Από το 2000 έως το 2004 11 στελέχη που ανήκουν στον κλώνο CC1 (ST201) ήταν ιμιπενέμη-ευαίσθητα ενώ 18 ήταν ιμιπενέμη-ανθεκτικά. Τη χρονολογική περίοδο 2005-2009 11 στελέχη CC2 (ST101) ήταν ιμιπενέμη-ευαίσθητα και 31 ανθεκτικά. Έτσι είναι προφανές ότι από το 2000 μέχρι το 2004 η αντοχή στην ιμιπενέμη σε εθνικό επίπεδο οφειλόταν στην επικράτηση του κλώνου CC1 (ST201), ο οποίος επικρατούσε την περίοδο αυτή, ενώ μετέπειτα (2005-2009) οφειλόταν στην επικρατούσα παρουσία του CC2 κλώνου (ST101).

Η πολυαντοχή στα αντιβιοτικά φαίνεται να συσχετίζεται άμεσα με τους τρεις διεθνείς κλώνους και κατ'επέκταση ST τύπους, γεγονός που επεξηγεί και την εξελικτική τους επιτυχία. Η συγκεκριμένη μελέτη έρχεται να επιβεβαιώσει αυτή την παρατήρηση, καθώς όλα τα πολυανθεκτικά στελέχη της συλλογής ανήκουν στους κλώνους CC1 και CC2, με ιδρυτικούς γονοτύπους ST 1 και 2 αντίστοιχα ενώ οι υπόλοιποι κλώνοι (ST τύποι 85-86-

45-15-54) περιλαμβάνουν στελέχη ευαίσθητα ή με σχετικά χαμηλή MIC. Παραμένει λοιπόν προς διερεύνηση εάν αυτά τα ευαίσθητα στελέχη που ανήκουν στους διεθνείς κλώνους έχουν την δυνατότητα να προσλαμβάνουν με μεγαλύτερη ευκολία κινητά γενετικά στοιχεία, δηλαδή μηχανισμούς αντοχής οι οποίοι προσδίδουν αντοχή στα αντιβιοτικά ή εάν η συσχέτιση των πολυανθεκτικών στελεχών με τους επικρατούντες κλώνους απορρέει από την επιδημική διασπορά ενός σχετικά μικρού πληθυσμού πολυανθεκτικών στελεχών που προυπήρχαν.

Η αντικατάσταση ενός επιδημικού κλώνου από έναν άλλον έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία ενώ επιβεβαιώνεται και από τη συγκεκριμένη μελέτη. Πιο συγκεκριμένα όπως θα αναφέρουμε και στη συνέχεια υπάρχει στροφή από τον CC1 με κεντρικό-ιδρυτικό γονότυπο τον ST 1 στον CC2 ο οποίος έχει κεντρικό-ιδρυτικό γονότυπο τον ST2 κατά τη διάρκεια της δεκαετίας που μελετούμε. Όλο και περισσότερα στοιχεία συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι στελέχη που ανήκουν ακόμα και στον ίδιο ST τύπο μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με την παρουσία ή μη νησιδίων και γονιδίων αντοχής καθώς και κινητών γενετικών στοιχείων.

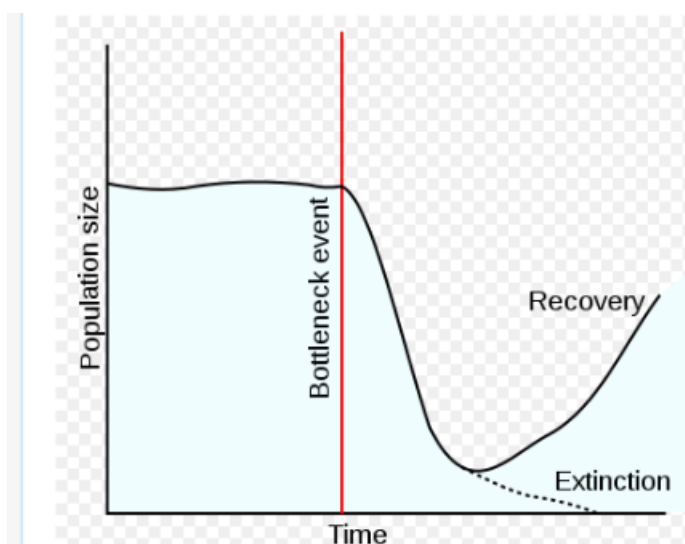
Πδ. Συμπεράσματα – Συζήτηση

Η μοριακή τυποποίηση των στελεχών *Acinetobacter baumannii* έχει αναδείξει ότι παρόλη τη γενετική ποικιλομορφία που υπάρχει σε αυτά, οι νοσοκομειακές επιδημίες που προκύπτουν από το συγκεκριμένο μικρόβιο οφείλονται σε παγκόσμιο επίπεδο στην επικράτηση ενός περιορισμένου αριθμού ευρέως διαδεδομένων κλώνων. Σταδιακά λοιπόν οι τρεις Ευρωπαϊκοί κλώνοι μετονομάστηκαν σε διεθνείς International-clones καθώς η παρουσία τους συσχετίστηκε με λοιμώξεις που αφορούν όχι μόνο την Ευρώπη αλλά και πολλά άλλα μέρη του κόσμου.

Η γενετική ποικιλομορφία των στελεχών *Acinetobacterbaumannii* συγκρινόμενη με αυτή άλλων μικροβίων χαρακτηρίζεται περιορισμένη. Η μέση γενετική απόκλιση των στελεχών υπολογίζεται στο (0,35%), ποσοστό παρόμοιο με της *Klebsiella pneumoniae* (0,37%) το οποίο αξιολογείται ως πολύ χαμηλό όταν συγκρίνεται με άλλα βακτηριακά είδη π.χ *Escherichia coli* (Jaureguay *et al.* 2008). Ακόμα και έρευνες οι οποίες εξετάζουν τη επιδημιολογία των στελεχών σε παγκόσμια κλίμακα, μελετώντας στελέχη που ανήκουν σε διαφορετικούς κλώνους από όλοκληρο τον κόσμο ορίζουν ως μέγιστη γενετική απόκλιση των *Acinetobacter baumannii* το (0,77%) (Diancourt *et al.* 2010). Το ποσοστό αυτό σε άλλα βακτήρια μπορεί να φτάνει ακόμα και το 5% (Konstantinidis *et al.* 2006).

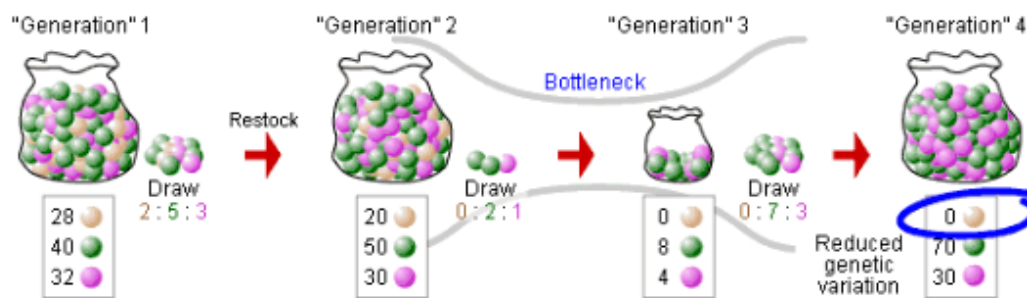
Γενικότερα, το μέγεθος ενός πληθυσμού παρουσιάζει φυσιολογικές αυξομειώσεις καθώς οι περιβαλλοντικές συνθήκες μεταβάλλονται και αλλάζουν σε βάθος χρόνου. Υπό την επίδραση όμως ακραίων συνθηκών το μέγεθος αυτό μπορεί να μειωθεί δραστικά. Εάν την θεωρία αυτή την επεκτείνουμε σε μοριακό επίπεδο, γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι οποιαδήποτε ακραία κατάσταση επιδράσει σε μία δεδομένη γονιδιακή δεξαμενή αυτό που θα προκύψει είναι η αλλαγή των αλληλόμορφων που επικρατούν. Αυτό γίνεται είτε με τον περιορισμό κάποιων αλληλόμορφων που κυριαρχούσαν μέχρι τότε και την επικράτηση άλλων, είτε με την πλήρη εξαφάνιση γονιδίων και την εγκατάσταση νέων αλληλόμορφων. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται γενετική στενωπός ή ‘Bottle neck effect’ (εικόνα 22) και μετά το πέρας του όπως είναι φυσικό επιβραδύνει την ικανότητα του πληθυσμού να ανακτήσει την αρχική του γενετική ποικιλομορφία. Δεδομένης της σημασίας της γενετικής ποικιολότητας, γίνονται εύκολα αντιληπτές οι επιπτώσεις μιας τυχαίας γενετικής παρέκλισης (genetic drift) η οποία συνήθως έπεται του φαινομένου. Αυτό σημαίνει ότι ενώ πρό του φαινομένου επικρατούσαν κάποια συγκεκριμένα αλληλία μετά το Bottleneck event ο πληθυσμός των αλληλίων μπορεί να αλλάξει ριζικά (εικόνα 22α).

Εικόνα 21: Φαινόμενο Bottleneck



Εικόνα 22: Το σχήμα παρουσιάζει την αλλαγή των αλληλίων των γονιδίων που μπορεί να προέλθει μετά τη ισχύ του φαινομένου του γενετικού στενωπού σε συγκεκριμένο

πληθυσμό.



Συνεπώς ο μικρός αριθμός πολυμορφισμών που συναντούμε στα στελέχη *A. baumannii* οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο συγκεκριμένος πληθυσμός στο πρόσφατο παρελθόν έχει υποστεί το φαινόμενο bottleneck και δεν έχει παρέλθει ακόμα το χρονικό διάστημα ώστε να ανακτήσει την χαμένη του ποικιλομορφία. Μία υπόθεση είναι ότι το φαινόμενο αυτό προήλθε ως αποτέλεσμα του περιορισμού για κάποιους λόγους της οικολογίας του *A. baumannii*. Αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός ότι το *A. baumannii* το συναντάμε σχετικά πιο σπάνια στο έδαφος ή στον άνθρωπο σε σχέση με άλλα είδη του μικροβίου (Peleg *et al* 2008). Τα υπόλοιπα είδη *Acinetobacter* είναι πανταχού παρόντα (Peleg *et al* 2008). Αυτές οι οικολογικές μεταβολές οι οποίες περιόρισαν τον βίοτο του *A. baumannii* φαίνεται πως επέδρασαν δραστικά και στη μείωση του πληθυσμού του. Μία άλλη εξήγηση των περιορισμένων πολυμορφισμών είναι ότι τα στελέχη *A. baumannii* τα οποία μελετούμε περιλαμβάνουν μόνο τα στελέχη τα οποία απομονώνονται από τον άνθρωπο. Με αυτό τον τρόπο δεν μελετάται πλήρως η ποικιλομορφία του είδους και αυτό διότι ασχολούμαστε μόνο με ένα υποσύνολο του πληθυσμού το οποίο έχει βίοτο τον άνθρωπο. Υπάρχουν ήδη βιβλιογραφικές αναφορές με *A. baumannii* τα οποία έχουν απομονωθεί από λαχανικά και ζώα. Συνεπώς θα ήταν πολύ ενδιαφέρον να εκτιμηθεί και η ποικιλομορφία στελεχών από 'non clinical sources', διότι αυτό θα βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση της επιδημιολογίας, οικολογίας και ποικιλομορφίας του πληθυσμού του είδους.

Η MLST τυποποίηση στα στελέχη *A. baumannii* χαρακτηρίζεται από υψηλή διακριτική ικανότητα γεγονός που επιβεβαιώνεται από αρκετές μελέτες (Bartual *et al.* 2005, Wisplinghoff *et al.* 2008). Οι κλώνοι, οι οποίοι τυποποιούνται με αυτή την τεχνική αντιπροσωπεύουν στελέχη με βασικές διαφορές στην επιδημιολογία και στην παθογονικότητα. Μέχρι στιγμής όσον αφορά την παγκόσμια επιδημιολογία του *A. baumannii* η MS tree ανάλυση έχει αναδείξει παγκοσμίως πέντε CCs (Clonal complexes)

(Diancourt *et al.* 2010). Τα τρία πρώτα CCs (CC1, CC2 και CC3) αντιστοιχούν στους διεθνείς κλώνους I, II και III. Κεντρικοί και ιδρυτικοί γονότυποι σε αυτούς τους κλώνους θεωρούνται αντίστοιχα οι ST1, ST2 και 3. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνονται και από άλλες μοριακές τεχνικές όπως η PFGE και η AFLP. Το γεγονός ότι ο ιδρυτικός γονότυπος κατέχει κυρίαρχη θέση μέσα σε κάθε CC (Clonal Complex) υποδηλώνει για ακόμα μία φορά το γεγονός ότι η κλωνική διασπορά πραγματοποιήθηκε σε σύντομο χρονικό διάστημα από το φαινόμενο bottleneck, περιορίζοντας με αυτό τον τρόπο την γενετική ποικιλομορφία των στελεχών. Αυτό προκύπτει και μέσα από τις μελέτες των τελευταίων δύο δεκαετιών οι οποίες παρουσιάζουν ότι η πλειοψηφία των στελεχών *A. baumannii* υπεύθυνες για κρούσματα λοιμώξεων, ανήκουν κατά αποκλειστικότητα στους διεθνείς κλώνους 1, 2 και 3 (CC1, CC2 και CC3). Εκτός από τους προαναφερόμενους κλώνους ευρεία γεωγραφική διασπορά φαίνεται ότι υπάρχει πλέον και στους CC10, CC32, ST 52, ενώ ο πιο σημαντικός μετά τους τρεις διεθνείς κλώνους είναι ο ST15.

Έχει υπολογιστεί ότι ο λόγος των ανασυνδιασμένων προς μεταλλαγμένων νουκλεοτιδίων στο *A. baumannii* είναι 1.3 (Diancourt *et al.* 2010). Εδώ θα πρέπει να τονιστεί ότι η ανίχνευση του ανασυνδιασμού είναι ούτως ή άλλως δύσκολη σε βακτηριακά είδη που παρουσιάζουν χαμηλό πολυμορφισμό. Παρόλα αυτά ο λόγος αυτός υποδηλώνει ότι οι ευρέως διαδεδομένοι τύποι ST είναι και θα είναι γενετικά σταθεροί και αναγνωρίσιμοι για αρκετά μεγάλη χρονική περίοδο πιθανότητα ακόμα και χιλίων ετών (Feil *et al.* 2001). Με αυτό τον τρόπο μπορεί να προβλεφθεί πολύ εύκολα ότι στελέχη τα οποία ανήκουν στο ίδιο ST είναι γενετικά όμοια ακόμα και αν απομονώθηκαν σε διαφορετικές χρονικές περιόδους. Η γενετική ποικιλομορφία άλλωστε των τριών κυρίαρχων κλώνων συγκρίνεται με αυτή που παρατηρούμε στην *Salmonella enterica* η παρουσία της οποίας εκτιμάται σταθερή πάνω από 50.000 χρόνια (Kidgell *et al.* 2002).

Πολύ σημαντική επίσης είναι η παρατήρηση ότι στελέχη που ανήκουν στον ίδιο κλώνο ενδέχεται να έχουν αρκετές διαφορές στο γονιδίωμα τους κυρίως όσον αφορά κινητά γονιδιακά στοιχεία όπως τρανσποζόνια νησίδια αντοχής και ιντεργκόνια. Οι συγκεκριμένες δομές λόγω της οριζόντιας μετάφοράς τους μπορούν να μεταφερθούν ακόμα και σε στελέχη που ανήκουν σε διαφορετικούς κλώνους. Έτσι τα ιντεργκόνια που ανήκουν σε στελέχη που προέρχονται από τον ίδιο κλώνο αλλά διαφορετικές περιοχές είναι σαφές ότι μπορεί να διαφέρουν. Ως εκ τούτου οι MLST γονότυποι μπορεί να θεωρηθεί ότι φέρουν ένα γονιδίωμα το οποίο παραμένει σταθερό καθόλη την εξελικτική διαδικασία (core genome) καθώς και ένα συμπληρωματικό γονιδίωμα στο οποίο συνήθως εμπεριέχονται οι περισσότεροι μηχανισμοί αντοχής και το οποίο υφίσταται μεγάλη

εξελικτική πίεση. Συνεπώς είναι μεγάλη η ανάγκη της συνεχούς τυποποίησης των κυρίαρχων κλώνων για την ανεύρεση τυχόν νέων υποτύπων με ιδιαίτερη γονιδιακή, φαινοτυπική ταυτότητα επαναπροσδιορίζοντας τη γεωγραφική τους κατανομή.

Η εξελικτική επιτυχία των διεθνών κλώνων παραμένει επί του παρόντος ανεξήγητη. Το σημαντικότερο χαρακτηριστικό αυτών των στελεχών είναι η πολυαντοχή που παρουσιάζουν στα αντιβιοτικά. Γενικότερα θα λέγαμε ότι ο πληθυσμός των *A. baumannii* διαχωρίζεται σε δύο υποσύνολα. Το πρώτο περιλαμβάνει τα στελέχη που ανήκουν στους διεθνείς κλώνους, ενώ το άλλο περιλαμβάνει στελέχη τα οποία κυρίως είναι ευαίσθητα και περιστασιακά μόνο λοιμογόνα. Το συμπέρασμα αυτό τονίζει το γεγονός ότι δεν είναι όλα τα *A.baumanii* εξ' ορισμού νοσογόνα και προβληματικά για το νοσοκομειακό περιβάλλον (Broek *et al* 2009).

Η σύγκριση συγκεκριμένων χαρακτηριστικών που θα μπορούσαν να ευνοήσουν και να αιτιολογήσουν την επικράτηση και την παθογονικότητα των συγκεκριμένων κλώνων δεν έχει δώσει μέχρι στιγμής κάποιο αποτέλεσμα. Τέτοια χαρακτηριστικά είναι η αντοχή τους στα απολυμαντικά, η επιβιωσή τους σε ξηρές συνθήκες, η δυνατότητά τους να σχηματίζουν biofilms και η δυνατότητα αποικισμού σε ανθρώπινα κύτταρα. Ως εκ τούτου, η αντοχή στα αντιβιοτικά μπορεί να αντικατοπτρίζει τον κυρίαρχο λόγο της εξελικτικής επιτυχίας των συγκεκριμένων διεθνών κλώνων. Είναι πιθανό ότι η αυξημένη τάση που έχουν οι συγκεκριμένοι κλώνοι να αποικίζουν και να προκαλούν λοιμώξεις, τους έχει εκθέσει επανηλημένως σε υψηλά και επίπεδα αντιμικροβιακών ακόμα και διαφορετικών κατηγοριών. Ακόμη είναι πολύ πιθανό οι συγκεκριμένοι κλώνοι να είναι πιο επιρρεπείς στην απόκτηση ξένου γενετικού υλικού.

Ασαφές πάντως παραμένει ακόμα το αν τα πολυανθεκτικά αυτά στελέχη που έχουν κατακλίσει τα νοσοκομεία παγκοσμίως προκύπτουν από την διασπορά των ήδη υπαρχόντων MDR στελεχών ή εάν ευαίσθητα αρχικά στελέχη συγκεκριμένων κλώνων αποκτώντας στην πορεία γονίδια αντοχής είναι υπεύθυνα για αυτά τα κρούσματα λοιμώξεων. Το προηγούμενο σενάριο θα μπορούσε να εξηγήσει επαρκώς το τι συνέβη με τα στελέχη που ανήκουν στο CC3 complex και αυτό γιατί όλα τα στελέχη τα οποία ανήκουν σε αυτόν τον κλώνο παρουσιάζουν πανομοιότυπο φαινότυπο αντοχής ενώ μόλις ένα στέλεχος παρουσιάζεται ευαίσθητο στις καρβαπενέμες. Ο κλώνος CC3 όμως είναι ένας κλώνος ο οποίος τυποποιήθηκε πρόσφατα. Είναι πολύ πιο δύσκολη η ανάλυση των CC1, CC2 και ST 15 διότι είναι πολύ παλιοί κλώνοι και έχουν υποστεί αμέτρητες γενετικές διαφοροποιήσεις οι οποίες σχετίζονται με την απόκτηση αυτού του ανθεκτικού προφίλ.

Τα στελέχη της συγκεκριμένης μελέτης επιλέχθηκαν τυχαία από μία μεγάλη δεξαμενή στελεχών σε βάθος δεκαετίας καλύπτοντας ένα ευρύ γεωγραφικό χώρο της Ελλάδας. Με αυτό τον τρόπο θέλαμε να συμπεριλάβουμε στην έρευνα όλους τους πιθανούς κλώνους και υποκλώνους στελεχών.

Η πρώτη παρατήρηση η οποία προκύπτει από αυτή τη μελέτη είναι ότι η μεροπενέμη φαίνεται να υπερέχει έναντι της ιμιπενέμης σε αντιμικροβιακή δράση έναντι των *A. baumannii* κατά τη διάρκεια όλης αυτής της δεκαετίας που μελετούμε. Το μεγαλύτερο ποσοστό αντοχής στην ιμιπενέμη ενδέχεται να οφείλεται στην ευρεία χρήση του αντιμικροβιακού στις ΜΕΘ σε σχέση με τη μεροπενέμη. Η υπεροχή της μεροπενέμης έρχεται σε αντίθεση με την αντίστροφη κατάσταση που έχει παρατηρηθεί στην υπόλοιπη Ευρώπη και τη Β. Αμερική. Αρκετά υψηλό ποσοστό αντοχής είχαν τα στελέχη της μελέτης και στην αμπικιλίνη σε συνδυασμό με τη σουλμπακτάμη.

Επιπροσθέτως, στην συγκεκριμένη διατριβή παρουσιάζεται αναλυτικά η κλωνικότητα των στελεχών *A. baumannii* που ενδημούν στα ελληνικά νοσοκομεία. Οι τρεις τεχνικές τυποποίησης που χρησιμοποιούνται φαίνεται να συμφωνούν μεταξύ τους.

Όπως ήδη αναφέραμε τα *A. baumannii* που ανήκουν στους κλώνους CC1, 2 και 3 καθώς και ST15 έχουν βιώσει την εξελικτική επιτυχία και σχεδόν παγκόσμια παρουσιάζουν MDR φαινοτύπους, γεγονός που έχει διευκολύνει την ταχεία κλωνική διασπορά τους κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών (Higgins *et al.* 2010, Diancourt *et al.* 2010). Στους κλώνους CC1 και CC2 εμπεριέχονται και ευαίσθητα στελέχη τα οποία μπορούν να θεωρηθούν παλαιότεροι κλώνοι οι οποίοι βαθμιαία απέκτησαν γονίδια αντοχής. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης υποστηρίζουν την εξής υπόθεση: Οι κλώνοι CC1 και CC2 υπήρχαν στην Ελλάδα εδώ και μία δεκαετία, ενώ αποδείξαμε ότι σε αυτούς τους κλώνους συμπεριλαμβανόταν στελέχη ανθεκτικά αλλά και ευαίσθητα στις καρβαπενέμες. Αυτό μας δείχνει ότι η μετατροπή των στελεχών από ευαίσθητα σε ανθεκτικά έγινε ουσιαστικά από μία **κοινή δεξαμενή στελεχών**. Αυτά τα στελέχη που ανήκαν στους ίδιους κλώνους CC1 και CC2 απέκτησαν σταδιακά τους κατάλληλους μηχανισμούς αντοχής εκφράζοντας τελικά αυτό τον MDR φαινότυπο. Παρόμοιες βιβλιογραφικές αναφορές έχουμε και από τη Ιταλία, την Ισπανία την Πορτογαλία (Villalon *et al.* 2011, Da Silva *et al.* 2010, Di Popolo *et al.* 2011) καθώς και από πιο απομακρυσμένες περιοχές όπως η Κίνα και η Αυστραλία (He C *et al.* 2011, Runnagar *et al.* 2010). Ο συχνότερος κλώνος στην Ελλάδα είναι ο CC2 ο οποίος περιλαμβάνει τους ST τύπους ST2 και ST45. Στελέχη τα οποία ανήκουν στον κλώνο CC3 δεν τυποποιήθηκαν

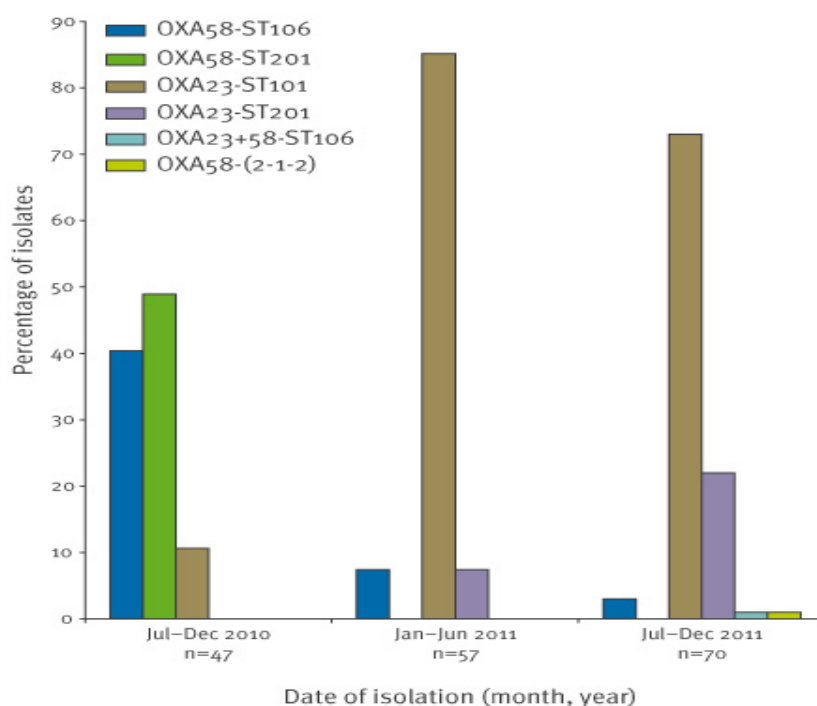
στην Ελλάδα, ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι η έλλειψη αυτού του κλώνου έχει ήδη παρατηρηθεί και από Τσέχους (Nemec *et al.* 2008) μελετητές. Αντίθετα με αυτό που συμβαίνει στην Ελλάδα και στην Τσεχία, η ύπαρξη αυτού του κλώνου, επιβεβαιώνεται από αντίστοιχες μελέτες στην Γερμανία, την Ολλανδία, την Γαλλία το Βέλγιο την Ιταλία και την Ισπανία (Diancourt *et al.* 2010). Την χρονολογική περίοδο 2005-2009 παρατηρήθηκε μια στροφή στον πληθυσμό των *A. baumannii* στην Ελλάδα προς τον κλώνο CC2. Εχουμε δηλαδή επικράτηση των στελεχών που ανήκουν στον διεθνή κλώνο CC2 ενώ την προηγούμενη πενταετία ήταν σαφής η επικράτηση του CC1 κλώνου. Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώνεται και από τη διεθνή βιβλιογραφία καθώς το συγκεκριμένο φαινόμενο αναφέρεται και σε χώρες όπως η Ιταλία, το Λίβανο και την Τσεχία (Di Porolo 2011).

Η εύρεση και τυποποίηση λιγότερο συχνών ή ακόμα και καινούριων αλληλίων καθώς και νέων ST τύπων στην Ελλάδα, υπογραμμίζει ουσιαστικά μία εξελικτική απόκλιση που συναντούμε στους εγχώριους κλώνους. Από αυτούς τους καινούριους ST τύπους ο ST15 και ο ST25 έχουν ήδη τυποποιηθεί και σε άλλα νότιο-Ευρωπαϊκά κράτη όπως Ιταλία, Τουρκία, Ισπανία και Ελλάδα (Villalon *et al.*, Di Porolo *et al.* 2011), ενώ οι ST τύποι 85 και 86 είναι η πρώτη φορά που αναφέρονται στην βιβλιογραφία.

Από το 1999 έως το 2009 η μοναδική καρβαπανεμάση η οποία ανιχνεύεται στα στελέχη *A. baumannii* της μελέτης μας, τα οποία απομονώθηκαν από μεγάλο γεωγραφικό εύρος στον Ελληνικό χώρο, είναι η *bla*_{OXA-58}. Αυτό επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες που αφορούν το χώρο της Μεσογείου (Di Porolo *et al.* 2011, Giannouli *et al.* 2009, Kulah *et al.* 2010 Carretto *et al.* 2011). Αναλυτικότερα χώρες όπως το Λίβανο, η Τουρκία και η Ιταλία έχουν ως επικρατέστερη καρβαπανεμάση την *bla*_{OXA-58}. Σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες αξίζει να αναφέρουμε ότι οι ανθεκτικοί κλώνοι των στελεχών *A. baumannii* φέρουν και άλλες οξακιλλινάσες. Σημαντικό ωστόσο είναι ότι όλες αυτές οι διαφορετικές οξακιλλινάσες που παρατηρούνται διεθνώς, μεταφέρονται και συντηρούνται μέσα στους ίδιους κλώνους οι οποίοι επικρατούν γεωγραφικά και χρονολογικά CC1 και CC2 (D'Arezzo *et al.* 2011). Αυτό φυσικά επιβεβαιώνει την υπόθεση που αναφέραμε προηγουμένως ότι ακόμα και στελέχη τα οποία ανήκουν στον ίδιο κλώνο μπορούν να έχουν διαφορετικούς μηχανισμούς αντοχής καθώς εκτός από το 'core genome', τα βακτήρια αυτά διαθέτουν και το 'accessory genome' το οποίο δέχεται μεγάλη εξελικτική πίεση. Τέλος σε ότι αφορά τις OXA καρβαπανεμάσες στην Ελλάδα, υπάρχουν πολύ πρόσφατες μελέτες οι οποίες υποδεικνύουν μια στροφή μερικών ανθεκτικών στις

καρβαπενέμες στελεχών από την OXA-58 στην OXA-23 καρβαπενεμάση (Liakopoulos *et al.* 2012). Τα στελέχη που αφορά αυτή η παρατήρηση έχουν απομονωθεί κατά το 2010-2011 (σε χρονικό διάστημα μετά το πέρας της συγκεκριμένης μελέτης) σε μία συγκεκριμένη περιοχή στην Ελλάδα (Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας). Η διεθνής βιβλιογραφία επιβεβαιώνει αυτή την παρατήρηση (D'Arezzo *et al.* 2011), ενώ μεγάλο ενδιαφέρον θα έχει η επιβεβαίωση αυτής σε μεγαλύτερη συλλογή δειγμάτων στον Ελληνικό χώρο.

Isolation frequencies of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains, University Hospital of Larissa, Thessaly, Greece, July 2010–December 2011 (n=174)



ST: sequence type.

Εικόνα 23: (Liakopoulos *et al.* 2012), μεταστροφή από *bla*_{OXA-58} σε *bla*_{OXA-23}.

Συμπερασματικά η γενετική ανάλυση των στελεχών *A. baumannii* παρέχει πολύτιμες πληροφορίες σε ότι αφορά την επιδημιολογική κατανομή τους. Τα στοιχεία αυτά είναι πολύ χρήσιμα και βοηθούν στην πρόληψη και αντιμετώπιση μελλοντικών κρουσμάτων καθώς και διασποράς στελεχών. Η παρούσα μελέτη αποδεικνύει ότι στελέχη με τον ίδιο PFGE ή ST τύπο επικρατούν σε εθνικό επίπεδο. Ακόμη, ταυτόσημοι κλώνοι στελεχών ανιχνεύονται σε απομακρυσμένα νοσοκομεία και σε διαφορετικές χρονολογικές

περιόδους. Αναλυτικότερα ο κλώνος CC2 υπήρχε καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης (βάθος δεκαετίας) σε όλα τα νοσοκομεία συνεπώς επαρχίες της Ελλάδος που μελετώνται στη συγκεκριμένη διατριβή. Αυτό φυσικά τονίζει για μία ακόμα φορά την διανοσοκομειακή διασπορά των μικροβίων. Τα συνεχώς αυξανόμενα ποσοστά τυποποίησης του κλώνου CC2 στα ελληνικά νοσοκομεία έχουν συσχετιστεί και με την αύξηση και τελικά επικράτηση των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών. Είναι ιδιαίτερως ανησυχητική η γρήγορη μετάβαση από τα ευαίσθητα στις καρβαπενέμες στελέχη την δεκαετία του 90 στα ανθεκτικά *A. baumannii* της επόμενης δεκαετίας. Η κύρια δυσκολία που προκύπτει είναι φυσικά η θεραπευτική πρόκληση που δημιουργείται από αυτούς τους πανανθεκτικούς κλώνους.

Περίληψη

Τα *A. baumannii* αποτελούν ευκαιριακά νοσοκομειακά παθογόνα τα οποία την τελευταία δεκαετία απασχολούν ιδιαίτερα την ιατρική κοινότητα. Ο λόγος για τον οποίο τα βακτήρια αυτά αποκτούν ιδιαίτερη σημασία είναι η αντοχή που έχουν αναπτύξει πλέον μέσω συγκεκριμένων μηχανισμών στις περισσότερες κατηγορίες αντιβιοτικών, μεταξύ των οποίων και οι καρβαπενέμες. Τα μικρόβια αυτά είναι υπεύθυνα για αρκετές νοσοκομειακές λοιμώξεις όπως ουρολοιμώξεις, λοιμώξεις τραύματος, βακτηριαιμία και δευτερογενή μηνιγγίτιδα. Κυρίαρχο ρόλο στις λοιμώξεις που προκαλούν έχει η νοσοκομειακή πνευμονία και συγκεκριμένα η πνευμονία σχετιζόμενη με αναπνευστήρα (VAP Ventilator associated pneumonia) η οποία προσβάλλει συνήθως ανοσοκατεταλμένους –διασωληνωμένους ασθενείς της Μονάδας Εντατικής Θεραπείας. Η θεραπευτική αντιμετώπιση αυτών των λοιμώξεων αποτελεί πρόκληση για τον κλινικό γιατρό πρώτον λόγω του πολυανθεκτικού φαινοτύπου που παρουσιάζουν οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί και δεύτερον λόγω της ιδιότητά τους να αποικίζουν και να παραμένουν ζωντανοί για μεγάλο χρονικό διάστημα (έως και 14 μέρες) ακόμα και σε συνθήκες ξηρασίας. Η διασπορά τους ενδονοσοκομειακά γίνεται μέσω του ανθρώπινου δυναμικού και του νοσοκομειακού υλικού, αφού τα *A. baumannii* έχουν τη δυνατότητα να σχηματίζουν δομή βιομεμβράνης (Biofilm).

Η πρώτη αναφορά για ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *A. baumannii* γίνεται το 1994 στις Η.Π.Α, ενώ έκτοτε τα κρούσματα πληθαίνουν συνεχώς. Στην Ευρώπη τα ποσοστά πλέον είναι ιδιαίτερα αυξημένα στις χώρες του Νότου (Ιταλία, Ισπανία, Πορτογαλία), ενώ είναι μικρότερα σε χώρες όπως η Γερμανία η Ολλανδία το Βέλγιο και οι Σκανδιναβικές Χώρες. Στην Ελλάδα τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *A. baumannii* ήταν σπανιότατα μέχρι το 1998, ενώ κατά τα τελευταία χρόνια προσεγγίζουν το 70 -90%.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της πληθυσμιακής εξέλιξης των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *A. baumannii* από διάφορες γεωγραφικές περιοχές του Ελληνικού χώρου καθώς και ο προσδιορισμός της κυριότερης καρβαπανεμάσης η οποία προσδίδει στα στελέχη τον πολυανθεκτικό αυτό φαινότυπο. Παρά τα υψηλά ποσοστά απομόνωσης τέτοιων στελεχών στην Ελλάδα είναι η πρώτη φορά που γίνεται μία μελέτη η οποία στοχεύει στην ανάλυση και τον προσδιορισμό των επικρατούντων κλώνων στην Ελλάδα. Για την διενέργεια της μελέτης επιλέχθηκαν στελέχη τα οποία καλύπτουν ένα μεγάλο τμήμα της ελληνικής επικράτειας.

Αναλυτικότερα τα στελέχη αυτά προήλθαν από τέσσερις διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές στην Ελλάδα τα οποία απομονώθηκαν από 8 διαφορετικά νοσοκομεία σε βάθος δεκαετίας. Αξιζει να αναφερθεί ότι η συλλογή περιλαμβάνει ανθεκτικά καθώς και ευαίσθητα στελέχη στις καρβαπενέμες με σκοπό να μελετηθεί η συσχέτισή τους με τους επικρατούντες κλώνους. Η κλωνικότητα των μικροβίων μελετήθηκε με τέσσερις διαφορετικές μεθόδους, τα αποτελέσματα των οποίων φαίνεται να συγκλίνουν. Ειδικότερα, στον Ελλαδικό χώρο είναι σαφής η επικράτηση των Ευρωπαϊκών και κατ' επέκταση διεθνών κλώνων (CC I και CC II) σε όλο το χρονικό διάστημα που περιλαμβάνει η μελέτη. Αναλυτικότερα κατά την πενταετία 2000-2004 στην Ελλάδα επικρατεί ο κλώνος CC1, ενώ την επόμενη πενταετία 2005-2009 υπάρχει μία στροφή και τελική επικράτηση του κλώνου CC2. Γενικότερα η παρούσα μελέτη αποδεικνύει ότι τα στελέχη που επικρατούν σε εθνικό επίπεδο προέρχονται από μία κοινή δεξαμενή. Αυτό ενισχύεται και από την παρατήρηση ότι ταυτόσημοι κλώνοι στελεχών ανιχνεύονται σε απομακρυσμένα νοσοκομεία και σε διαφορετικές χρονολογικές περιόδους. Η εύρεση και τυποποίηση λιγότερο συχνών κλώνων στην Ελλάδα, υπογραμμίζει ουσιαστικά μία πληθυσμιακή εξελίξη στους εγχώριους κλώνους. Αυτό επιβεβαιώνεται από την MLST τυποποίηση η οποία ανέδειξε καινούριους ST τύπους και νέα αλληλία. Τέλος από το 1999 έως το 2009 η επικρατέστερη καρβαπανεμάση στα ελληνικά στελέχη *A. baumannii* είναι η *bla*_{OXA-58}.

Η γενετική ανάλυση και η μοριακή τυποποίηση των στελεχών *A. baumannii* παρέχει πολύτιμες πληροφορίες σε ότι αφορά την επιδημιολογική κατανομή τους. Τα στοιχεία αυτά είναι πολύ χρήσιμα διότι βοηθούν στην πρόληψη και αντιμετώπιση μελλοντικών κρουσμάτων καθώς και διασποράς στελεχών. Τέλος, ιδιαίτερος ανησυχητική είναι η γρήγορη μετάβαση από τα ευαίσθητα στις καρβαπενέμες στελέχη την δεκαετία του 90 στα ανθεκτικά *A. baumannii* της επόμενης δεκαετίας. Η κύρια δυσκολία που προκύπτει είναι φυσικά η θεραπευτική πρόκληση που δημιουργείται από αυτούς τους πανανθεκτικούς κλώνους.

Summary

Bacteria belonging to *A. baumannii* are opportunistic and among the most problematic nosocomial pathogens that concern particularly the last decade the medical community. The main reason for which these bacteria acquire particular importance is their resistance mechanisms against most antibiotics including carbapenems.

These pathogens are responsible for many nosocomial infections, such as wound infections, bacteremia and secondary meningitis. Predominant role in these infections has VAP (Ventilator associated pneumonia), which usually affects (critically-ill) immune suppressed patients in Intensive Care Units.

The treatment of these infections constitutes challenge for the clinician mainly due to the Multy Drug Resistant phenotype that certain strains represent and secondly due to their ability to colonize human and remain alive for a long time period even in totally dry condtion. Since *A. baumannii* has the ability to form Biofilms it can easily spread into the hospitals through human resources and nosocomial materials.

The first report of carbapenem Resistant strains of *A. baumannii* was in New York in 1994 and ever since these strains multiply continuously. The rates of isolation of such strains are particularly high in countries like Italy, Spain, Portugal (Southern Europe) and remain low in countries like Germany, Belgium the Netherlands and Scandinavia. In Greece these strains were rare until 1998. The last decade in Greece the isolation rate of these bacteria is approaching 70-90%.

The main purpose of this study was to investigate the population structure of carbapenem resistant *A. baumannii* strains and to characterize the genetic diversity and distinctness of groups that come from different geographical regions of Greece. In addition we determined the main enzymatic resistant mechanism that confers this multidrug phenotype. It is the first time in Greece that a study aiming to analyze and identify prevailing clones of carbapenem resistant strain occurs.

In order to conduct the study, the strains were selected from different parts of the Greek territory. More specifically the study includes strains from four different regions of Greece, 8 different hospitals in a depth of decade. It is worth mentioning, that the collection includes both resistant and sensitive strains to carbapenems in order to investigate the association with the prevailing clones. The distribution of the clones was investigated in this study with four different methods, which all converge. In particular there is a clear predominance in Greece of International Clone I and II throughout all the period that the study comprises. More specifically in the first five years 2000-2004 in

Greece prevails clone CC1, while in the next five years 2005-2009 there is a final turn and prevalence of clone CC2. In general, this study indicates that the prevailing at national level strains derived from a common pool. This is further reinforced by the observation that identical strain clones were detected in distant hospitals and at different time periods. Also of note is the spread of less common or novel clones, underlying an evolutionary divergence in Greek *A. baumannii* clonal lineages. This is also confirmed by MLST typing, which revealed new gene alleles and ST types. Finally, from 1999 to 2009 the only carbapenemase gene harbored by the Greek *A. baumannii* strains is the *bla*_{OXA-58}.

The genetic analysis and molecular typing of *A. baumannii* provides valuable data regarding their epidemic distribution that may be helpful for containment of their further spread. These data are very useful because they prevent future outbreaks and help to control the spread of epidemic strains.

It is worrisome that the evolution of Greek *A. baumannii* isolates from carbapenem susceptible in the 1990s to carbapenem resistant in the 2000s was rapid and resulted in significant therapeutic burdens.

Βιβλιογραφία

1. Adams M, Nickel G, Bajaksouzian S *et al.* (2009) Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-componets system. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 53:3628-3634
2. Adams MD, Chan ER, Molyneaux ND *et al.* (2010) Genomewide analysis of divergence of antibiotic resistance determinants in closely related isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 54:3569-77.
3. Abbo A, Carmeli Y, Navon-Venezia S *et al.* (2007) Impact of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* on clinical outcomes. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26:793–800.
4. Allardet-Servent A, Bouziges N, Carles-Nurit MJ *et al.* (1989) Use of low-frequency-cleavage restriction endonucleases for DNA analysis in epidemiological investigations of nosocomial infections. *J Clin Microbiol.* 27:2057–61.
5. Albrecht M, Griffith M, Murray C *et al.* (2006) Impact of *Acinetobacter* infection on the mortality of burn patients. *J Am Coll Surg.* 203:546–550.
6. Antunes LCS, Imperi F, Towner KJ *et al.* (2011) Genome-assisted identification of putative iron-utilization genes in *Acinetobacter baumannii* and their distribution among a genotypically diverse collection of clinical isolates. *Res Microbiol* 162: 279–284.
7. Balaban NQ, Merrin J, Chait R *et al.* (2004) Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* 305: 1622-1625.
8. Bartual S, Seifert H, Hippler C *et al.* (2005) Development of a multilocus sequence-typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 43: 4382–4390.
9. Baumann P, Doudoroff M, Stanier R (1968) A study of the *Moraxella* group. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *J. Bacteriol.* 95:1520–1541
10. Bennett P (1999) Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J Antimicrob Chemother* 43:1-4.
11. Bergogne-Berezin, E. & Towner, K. (1996). *Acinetobacter* spp. as Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. *Clinical Microbiology Reviews*, Apr., p. 148–165.
12. Blot S, Vandewoude K, Colardyn F (2003) Nosocomial bacteremia involving

- Acinetobacter baumannii* in critically ill patients: a matched cohort study. *Intensive Care Med.* 29:471–475.
13. Brisou J (1953) Essay on the system of the genus *Achromobacter*. *Ann.379.Inst. Pasteur (Paris)* 84:812–814.
 14. Bogaerts P, Rezende de Castro R, Roisin S *et al.* (2012) Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Feb16. [Epub ahead of print]
 15. Bonnin R, Nordmann P, Potron A *et al.* (2011) Carbapenem-hydrolysing GES-type extended-spectrum β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:349-354.
 16. Bouvet P, Grimont P (1987) Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 138:569–5
 17. Broek P, Reijden T, Strijen E *et al.* (2009) Endemic and epidemic *Acinetobacter* species in a university hospital: an 8-year survey. *J Clin Microbiol* 47: 3593–3599.
 18. Carretto E, Barbarini D, Dijkshoorn L *et al.* (2011) APSI *Acinetobacter* Study Group: Widespread carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* clones in Italian hospitals revealed by a multicenter study. *Infect Genet Evol.* 11:1319–1326.
 19. Cisneros JM, Rodriguez-Bano J (2002) Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clin Microbiol Infect* 8: 687–693.
 20. Conrad R, Galanos C (1989) Fatty acid alterations and polymyxin B binding by lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa* adapted to polymyxin B resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:1724–1728.
 21. Chang H, Wei Y, Dijkshoorn L (2005) Identification of *Acinetobacter* isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. *J. Clin. Microbiol.* 43:1632-1639.
 22. Chu Y, Afzal-Shah M, Houang T *et al.* (2001). IMP-4, a novel metallo- β -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 710 – 4.
 23. D'Arezzo S, Principe L, Capone A *et al.* (2011). Changing carbapenemase gene pattern in an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* lineage causing multiple outbreaks in central Italy. *J. Antimicrob. Chemother.* 66:54–61.
 24. Da Silva, Correia G, Vital M *et al.* (2002). Molecular characterization of blaIMP-5,

- a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiol Lett* 215, 33–39.
25. Da Silva GJ, Mendonça N, Batista G *et al.* (2010) Sequence types of Portuguese carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected over 10 years. *J Antimicrob Chemother* 65: 2254 – 6.
 26. Diancourt L, Passet V, Nemec A *et al.* (2010) The Population Structure of *Acinetobacter baumannii*: Expanding Multiresistant Clones from an Ancestral Susceptible Genetic Pool. *PLoS ONE* 5(4): e10034.
 27. Dietz JA, Goodrich JA, Brown WB. *Acinetobacter calcoaceticus* foot infection secondary to high pressure injection injury: a case report. *Foot Ankle* 1988;8:216-222.
 28. Dijkshoorn L, Van Harsselaar B, Tjernberg I *et al.* (1998) Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter* genomic species. *Syst. Appl. Microbiol.* 21:33–39.
 29. Dijkshoorn L, Aucken M, Gerner-Smidt P *et al.* (1993) Correlation of typing methods for *Acinetobacter* isolates from hospital outbreaks. *J. Clin. Microbiol.* 31:702–705.
 30. Dijkshoorn L, Aucken H, Gerner-Smidt P *et al.* (1996) Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *J Clin Microbiol.* 34: 1519–1525.
 31. Di Nocera PP, Rocco F, Giannouli M *et al.* (2011) Genome organization of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains. *BMC Microbiol.* 11, 224
 32. Di Popolo A, Giannouli M, Triassi M *et al.* (2011) Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in four Mediterranean countries using a multilocus sequencing typing scheme. *Clin Microbiol Infect* 17: 197–201.
 33. Doi, Y, Adams J, Yamane K *et al.* (2007) Identification of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains in North America. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:4209–4210.
 34. Domingues S, Nielsen K, da Silva G *et al.* (2011) The *bla*_{IMP-5}-carrying integron in a clinical *Acinetobacter baumannii* strain is flanked by miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) *J. Antimicrob. Chemother.* 66: 2667-2668
 35. Endimiani A, Luzzaro F, Migliavacca R *et al.* (2007) Spread in an Italian hospital of a clonal *Acinetobacter baumannii* strain producing the TEM-92 extended-spectrum β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:2211–2214.

36. Falagas M, Kopterides P, Siempos I *et al.* (2006) Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii* infection among critically ill patients. *Clin. Infect. Dis.* 43:389.
37. Falagas M, Makris G, Dimopoulos G *et al.* (2008). Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance. *Clin Microbiol Infect* 14:101–104.
38. Feil EJ, Spratt BG (2001) Recombination and the population structures of bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol* 55:561–590.
39. Ferrara A (2006) Potentially multidrug-resistant non-fermentative gram-negative pathogens causing nosocomial pneumonia. *Int J Antimicrob Agents* 27:183-195.
40. Figueiredo S, Poirel L, Papa A *et al.* (2008). First identification of VIM-4 metallo- β -lactamase in *Acinetobacter* spp. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 289–290.
41. Fluit A, Terlingen A, Andriessen L *et al.* (2010) Evaluation of the DiversiLab
42. System for detection of hospital outbreaks of infections by different bacterial Species. *J. Clin. Microbiol.* 48: 3979–3989.
43. Fournier P, Vallenet D, Barbe V *et al.* (2006) Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet.* 2:e7.
44. Gales A, Pfaller M, Sader H *et al.* (2004). Genotypic characterization of carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter* spp. isolated in Latin America. *Microb Drug Resist* 10:286-91
45. Garmendia J, Leyba C, Montero J *et al.* (1999) Mortality and the increase in length of stay attributable to the acquisition of *Acinetobacter* in critically ill patients. *Crit. Care Med.* 27:1794–1799.
46. Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J (1991) Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol* 29: 277–282.
47. Gerner-Smidt P (1992) Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J. Clin. Microbiol.* 30:2680–2685.
48. Gerner-Smidt P, Tjernberg I (1993) *Acinetobacter* in Denmark. II. Molecular studies of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *APMIS* 101:826–832.
49. Giannouli M, Tomasone F, Agodi A *et al.* (2009) Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in intensive care units of multiple Mediterranean hospitals. *J Antimicrob Chemother* 63:828 – 30.
50. Gillespie, S. & Hawkey P, (2006) Principles and Practice of Clinical Bacteriology. 2nd Edition. John Wiley & Sons, Ltd.

51. Grupper M, Sprecher H, Mashiach T *et al.* (2007) Attributable mortality of nosocomial *Acinetobacter* bacteremia. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 28:293–298.
52. Goic-Barisic I, Towner KJ, Kovacic A *et al.* Outbreak in Croatia caused by a new carbapenem-resistant clone of *Acinetobacter baumannii* producing OXA-72 carbapenemase. *J Hosp Infect* 2011; 77: 368–369.
53. Gordon E, Mouz N, Duee E *et al.* 2000. The crystal structure of the penicillin-binding protein 2x from *Streptococcus pneumoniae* and its acyl-enzyme form: implication in drug resistance. *J Mol. Biol.* 299: 501–509.
54. Gillespie, S. & Hawkey, P. (2006). *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. 2nd Edition. John Wiley & Sons, Ltd.
55. Guardabassi L, Dijkshoorn L, Collard J *et al.* (2000) Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *J. Med. Microbiol.* 49:929–936.
56. Guillou J (2005) Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin Microbiol. Infect* 11:868–873
57. Hamouda A, Evans B, Towner K *et al.* (2010) Characterization of epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* isolates from four continents by use of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and sequence-based typing of blaOXA-51-like genes. *J Clin Microbiol* 48:2476–83.
58. Hamouda A, Amyes G (2004) Novel gyrA and parC point mutations in two strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 54:695–696.
59. Hawley J, Murray C, Jorgensen J (2008) Colistin heteroresistance in *Acinetobacter* and its association with previous colistin therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:351-352.
60. He C, Xie Y, Fan H *et al.* (2011) Spread of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* of European clone II in Western China. *Int J Antimicrob Agents*.38:257–260.
61. Henriksen S. (1973) *Moraxella*, *Acinetobacter*, and the *Mimeae*. *Bacteriol. Rev.* 37:522–561.
62. Higgins P, Poirel L, Lehmann M *et al.* (2009) OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.*53: 5035–5038.

63. Higgins P, Dammhayn C, Hackel M (2009) Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.*
64. Hornsey M, Loman N, Warheam DW *et al.* (2011) Whole-genome compArison of two *Acinetobacter baumannii* isolates from a single patient, where resistance developed during tigecycline therapy. *J Antimicrob Chemother* 66:1499-503.
65. Hrabák J, Štolbová M, Študentová V *et al* (2012) NDM-1 producing *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient repatriated to the Czech Republic from Egypt, July 2011. *Euro Surveill.* 17(7):pii=20085
66. Huang Z, Mao M, Chen Y *et al.* (2004) Study on the molecular epidemiology of SHV type beta-lactamase-encoding genes of multiple-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 25:425-427.
67. Huang L, Liang T, Chen T *et al.* (2010) Mechanisms of resistance: Molecular Characterization of β -Lactamase Genes and Their Genetic Structures in *Acinetobacter* Genospecies 3 Isolates in Taiwan *Antimicrob. Agents Chemother.* June 2010 54:2699-2703
68. Ikonomidis A, Neou E, Gogou V *et al.* (2009) Heteroresistance to Meropenem in Carbapenem-Susceptible *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 47:4055-4059.
69. Jauregui F, Landraud L, Passet V *et al.* (2008) Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* 9:560.
70. Jerassy Z, Yinnon A.M, Mazouz-Cohen S *et al.* (2006) Prospective hospital-wide studies of 505 patients with nosocomial bacteraemia in 1997 and 2002. *J. Hosp. Infect.* 62:230–236.
71. Johnson J, Anderson R., Ordal E (1970) Nucleic acid homologies among oxidase-negative *Moraxella* species. *J Bacteriol.* 101:568-573
72. Kidgell C, Reichard U, Wain J *et al.* (2002) *Salmonella typhi*, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. *Infect Genet Evol.* 2:39–45.
73. Kwon K, Oh W, Song J *et al.* (2007) Impact of imipenem resistance on mortality in patients with *Acinetobacter* bacteraemia. *J. Antimicrob. Chemother.* 59:525–530.
74. Konstantinidis K, Ramette A, Tiedje J (2006) The bacterial species definition in the genomic era. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1929–1940.

75. Kulah C, Mooij M, Comert F *et al.* (2010) Characterisation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak strain producing OXA-58 *International Journal of Antimicrobial Agents*. 36:115-118.
76. Li J, Rayner C, Nation R *et al.* (2006) Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2946-2950.
77. Ling ML, Ang A, Wee M *et al.* (2001) A nosocomial outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* originating from an intensive care unit. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 22:48-49.
78. Liakopoulos A, Miriagou V, Katsifas E *et al.* (2012) Identification of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* in Greece, 2010 to 2011. *Euro Surveill*. 17(11):pii=20117.
79. Lee K, Lee W, Uh Y *et al.* (2003) VIM- and IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. *Emerg Infect Dis* 9: 868-871.
80. Lee K, Yum J, Yong D *et al.* (2005) Novel acquired metallo- β -lactamase gene, bla (SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother*. 49: 4485-4491.
81. Lee MF, Peng CF, Hsu H *et al.* (2008) Molecular characterisation of the metallo- β -lactamase genes in imipenem-resistant Gram-negative bacteria from a university hospital in southern Taiwan. *Int J Antimicrob Agent*. 32:475 – 80.
82. Lee T, Turton J, Chen T *et al.* (2009) First identification of blaOXA-51-like in non-*baumannii* *Acinetobacter* spp. *J. Chemother*. 21:514-520.
83. Limansky AS, Mussi MA, Viale AM *et al.* (2002) Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. *J Clin Microbiol* 40:4776-4778.
84. Lu PL, Huang LY, Lian ST *et al.* (2008) How carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. established in a newly constructed hospital. *Int J Antimicrob Agents*. 31: 463-6
85. Huang L, Lu P, Chen T *et al.* (2010) Molecular characterization of β -lactamase genes and their genetic structures in *Acinetobacter* genospecies 3 isolates in Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemother*. 54, 2699-2703.
86. Macheboeuf P, Contreras-Martel C, Job V *et al.* 2006. Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol Rev* 30:673-691.

87. Magnet, S, Courvalin P, Lambert T (2001). Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:3375-3380.
88. Maniatis A, Pournaras S, Orkopoulou S *et al.* (2003) and the Bacterial Resistance Study Group. Multiresistant *Acinetobacter baumannii* isolates in intensive care units in Greece. *Clinical Microbiology and Infection.* 9:547-553.
89. Mendell (2005) Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th ed. Churchill Livingstone, An Imprint of Elsevier.
90. Moellering R. (2010) NDM-1 A Cause for Worldwide Concern *N Engl J Med* 2010; 363:2377-2379
91. Montero A, Ariza J, Corbella X *et al.* (2004) Antibiotic combinations for serious infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a mouse pneumonia model. *J. Antimicrob. Chemother.* 54:1085-1091.
92. Moore M, Perdreau-Remington F, Chambers H *et al.* (2003) Vancomycin treatment failure associated with heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a patient with endocarditis and in the rabbit model of endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* 47:1262-1266
93. Mussi M, Limansky A, Viale A (2005). Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of β -barrel outer membrane proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:1432-1440.
94. Naas T, Coignard B, Carbonne A *et al.* (2006) VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*, France. *Emerg. Infect. Dis.* 12:1214-1222.
95. Naiemi N, Duim B, Savelkoul P *et al.* (2005) Widespread transfer of resistance genes between bacterial species in an intensive care unit: implications for hospital epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 43:4862-4864.
96. Nemec A, Maixnerova M, van der Reijden T *et al.* (2007). Relationship between the AdeABC efflux system gene content, netilmicin susceptibility and multidrug resistance in a genotypically diverse collection of *Acinetobacter baumannii* strains. *J. Antimicrob. Chemother.* 60:483-489.
97. Olut A, Erkek E (2005) Early prosthetic valve endocarditis due to *Acinetobacter baumannii*: a case report and brief review of the literature. *Scand. J. Infect. Dis.* 37:919-921.

98. Pedraza F, Andreu A, Saune M, Moreno A, Ramirez R, Garcia L. A urinary outbreak of *Acinetobacter baumannii* in a spinal cord injury unit. *Ann Med Int* 1993;10:55-58.
99. Peleg A, Adams J, Paterson D (2007) Tigecycline efflux as a mechanism for nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:2065–2069.
100. Peleg A, Seifert H, Paterson D (2008) *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21: 538–582.
101. Petrosillo N, Ioannidou E, Falagas M *et al.* (2008) Colistin monotherapy vs. combination therapy: evidence from microbiological, animal and clinical studies. *Clin. Microbiol. Infect.* 14:816–827.
102. Piechaud D, Piechaud M, Second L (1951) Etude de 26 souches de *Moraxella iwoffi*. *Ann. Inst. Pasteur* 80:97–99.
103. Poirel L, Karim A, Mercat A *et al.* (1999) Extended-spectrum beta-lactamase-producing strain of *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient in France. *J. Antimicrob. Chemother.* 43:157–158.
104. Poirel L, Marqué S, Héritier C *et al.* (2005b). OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:202–208.
105. Poirel L, Mansour W, Bouallegue O *et al.* (2008b). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Tunisia producing the OXA-58-like carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-97. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:1613–1617.
106. Poirel L, Bonnin A, Nordmann P (2011) Genetic Basis of Antibiotic Resistance in Pathogenic *Acinetobacter* Species. 63: 1061-1067.
107. Pourcel C, Minandri F, Hauck Y *et al.* (2011) Identification of variable-number Tandem-repeat (VNTR) sequences in *Acinetobacter baumannii* and interlaboratory validation of an optimized multiple-locus VNTR analysis-typing scheme. *J Clin Microbiol* 49:539-548.
108. Pournaras S, Ikonomidis A, Markogiannakis A *et al.* (2005) Heteroresistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 55:1055–1056.
109. Pournaras S, Markogiannakis A, Ikonomidis A *et al.* (2006) Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58

- carbapenemase in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 57:557-559
110. Reccia G, Hall R. Gene cassetes: a new class of mobile element. *Microbiology* 1995; 141: 3015-3027.
111. Izdebski R, Fiett J, Hryniewicz W *et al.* (2012) Molecular analysis of *Acinetobacter baumannii* isolates from invasive infections in 2009 in Poland. *J Clin Microb* ahead of print.
112. Rahal J. J. (2006) Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin. Infect. Dis.* 43:95–99.
113. Roca I, Espinal P, Ferres *et al.* (2012) The *Acinetobacter baumannii* oxymoron commensal hospital dweller turned Pandrug resistant mecane. *Frontiers in Microbiology* 3: 148-151
114. Runnegar N, Sidjabat H, Goh H *et al.* (2010) Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a single institution over a 10-year period. *J Clin Microbiol.* 48:4051–4056.
115. Riccio M, Franceschini N, Boschi L *et al.* (2000) Characterization of the Metallo- β -Lactamase Determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 Reveals the Existence of *bla*IMP Allelic Variants Carried by Gene Cassettes of Different Phylogeny. *Antimicrob Agents Chemother.* 44:1229–1235.
116. Robledo I, Aquino E, Sante M *et al.* (2010) Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. In Pouerto Rico. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 1354-1357.
117. Ruzin A, Keeney D, Bradford P *et al.* (2007) AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J. Antimicrob. Chemother.* 59:1001–1004.
118. Sader S, Pignatari A, Leme I *et al.* (1993). Epidemiologic typing of multiply drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from an outbreak in an intensive care unit. *Diagn. Microbiol. Infect.* 17:13-18.
119. Schaub I, Hauber F (1948) A biochemical and serological study of a group of identical unidentifiable gram-negative bacilli from human sources. *J. Bacteriol.* 56:379–385.
120. Seifert H, Baginski R, Schulze A *et al.* (1993). The distribution of *Acinetobacter* species in clinical culture materials. *Zentralbl Bakteriол.* 279:544–552.
121. Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P *et al.* (1997) Distribution of

- Acinetobacter species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J. Clin. Microbiol.* 35:2819–2825.
122. Seifert H, Dolzani L, Bressan R *et al.* (2005) Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 43: 4328–35.
 123. Skerman V, McGowan V, Sneath P *et al.* (1980) Approved list of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30:225–420.
 124. Snitkin ES, Zelazny AM, Montero C *et al.* (2011) Comparative Sequence Program, et al. Genome-wide recombination drives diversification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108: 13758–63.
 125. Stoeva T, Higgins PG, Savov E *et al.* Nosocomial spread of OXA-23 and OXA-58 β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a Bulgarian hospital. *J Antimicrob Chemother* 63: 618–620.
 126. Su X, Chen J, Mizushima T *et al.* (2005) AbeM, an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 4362–4364.
 127. Sunenshine R, Wright M, Maragakis L *et al.* (2007) Multi- drug-resistant *Acinetobacter* infection mortality rate and length of hospitalization. *Emerg. Infect. Dis.* 13:97–103.
 128. Sung J, Kwon K, Park J *et al.* (2008) Dissemination of IMP-1 and OXA Type β -Lactamase in Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Korean J Lab Med.* 28(1):16-23.
 129. Telang N, Satpute M, Dhakephalkar P *et al.* (2011) Fulminating septicemia due to persistent pan-resistant community-acquired metallo- β -lactamase (IMP-1)-positive *Acinetobacter baumannii*. *Indian J Pathol Microbiol* 54: 180-2
 130. Trottier V, Segura P, Namias N *et al.* (2007) Outcomes of *Acinetobacter baumannii* infection in critically ill burned patients. *J. Burn Care Res.* 28:248–254.
 131. Tsakris A, Tsioni C, Pournaras S *et al.* (2003) Spread of low-level carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones in a tertiary care Greek hospital. *J Antimicrob Chemother* 52:1046–1047.
 132. Tsakris A, Ikonomidis A, Pournaras S *et al.* (2006) VIM-1 metallo- β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Emerging Infect. Dis.* 12:981–983.
 133. Tsakris A, Ikonomidis A, Pournaras S *et al.* (2006) Carriage of OXA-58 but not of

- OXA-51 beta-lactamase gene correlates with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J. Anti- microb. Chemother.* 58:1097–1099.
- 134.** Tsakris A, Poulou A, Pournaras S *et al.* (2010) A simple phenotypic method for the differentiation of metallo- β -lactamases and class-A KPC carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:1664–1671.
- 135.** Turton J, Woodford N, Glover J *et al.* (2006) Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla*_{OXA-51-like} carbapenemase gene intrinsic to this species. *J. Clin. Microbiol.* 44:2974–2976.
- 136.** Turton J, Gabriel N, Valderrey C *et al.* (2007) Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Microbiology and Infection* 13:807–815.
- 137.** Turton J, Matos J, Kaufmann M *et al.* (2009) Variable number tandem repeat loci providing discrimination within widespread genotypes of *Acinetobacter baumannii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28:499–507.
- 138.** Unal, S., and J. A. Garcia-Rodriguez. (2005) Activity of meropenem and comparators against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolated in the MYSTIC Program, 2002-2004. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 53:265-271.
- 139.** Vahaboglu H, Coskunkan F, Tansel O *et al.* (2001) Clinical importance of extended-spectrum beta-lactamase (PER-1-type)-producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomona saeruginosa* strains. *J Med Microbiol* 50:642-645.
- 140.** Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I *et al.* (1995) Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J. Clin. Microbiol.* 33:11–15.
- 141.** Vidal R, Dominguez M, Urrutia H *et al.* (1996) Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii*. *Micro-bios* 86:49–58.
- 142.** Vila J, Ruiz J, Navia M *et al.* (1999) Spread of amikacin resistance in *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain due to an epidemic strain. *J. Clin. Micro- biol.* 37:758–761.
- 143.** Villalon P, Valdezate S, Medina-Pascual M *et al.* (2011) Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain. *J Clin Microbiol* 49: 875–82.
- 144.** Visca P, Seifert H, Towner K *et al.* (2011) *Acinetobacter*- an emerging threat to Human Health. *IUBMB Life* 63: 1048-1054.
- 145.** Wareham D, Bean D, Khanna P *et al.* (2008) Bloodstream infection due to

- Acinetobacter* spp: epidemiology, risk factors and impact of multi-drug resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 27:607–612.
- 146.** Wang H, Guo P, Sun H *et al.* (2007). Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 4022–4028.
- 147.** Walsh TR, Bolmström A, Qwärnström A *et al.* (2002) Evaluation of a new Etest for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing. *Journal of Clinical Microbiology*;40(8):2755–2759.
- 148.** Wayne L, Brenner D, Colwell R *et al.* (1987) Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* 37:463-464.
- 149.** Wisplinghoff H, Hippler C, Bartual S *et al.* (2008) Molecular epidemiology of clinical *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU isolates using a multilocus sequencing typing scheme. *Clin Microbiol Infect* 14:708–715.
- 150.** Yamamoto M, Nagao M, Matsumura Y *et al.* (2011) Interspecies dissemination of a novel class 1 integron carrying *bla*_{IMP-19} among *Acinetobacter* species in Japan. *J. Antimicrob. Chemother.* 66: 2480-2483.
- 151.** Young M, Bains M, Bell A *et al.* (1992) Role of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprH in polymyxin and gentamicin resistance: isolation of an OprH-deficient mutant by gene replacement techniques. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:2566–2568.
- 152.** Yum J, Yi K, Lee H *et al.* (2002) Molecular characterization of metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the *bla*_{VIM-2} gene cassettes. *J Antimicrob Chemothe* 49:837–840.
- 153.** Zarrilli R, Giannouli M, Rocco F *et al.* (2011) Genome sequences of three *Acinetobacter baumannii* strains assigned to ST2, ST25 and ST78 multilocus sequencing typing genotypes. *J Bacteriol* 193: 2359-2360.
- 154.** Zarrilli R & Durante-Mangoni (2011) Global strength of drug resistance *Acinetobacter baumannii* molecular epidemiology and management of antimicrobial resistance 6(4), 407–422.

Δημοσιευμένη μελέτη

Evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages: a 10 year study in Greece (2000–09)

Vasiliki Gogou¹, Spyros Pournaras^{1*}, Maria Giannouli², Evangelia Voulgari³, Evangelia-Theophano Piperaki³, Raffaele Zarrilli² and Athanassios Tsakris³

¹Department of Microbiology, Medical School, University of Thessaly, Larissa, Greece; ²Department of Preventive Medical Sciences, University of Napoli Federico II, Naples, Italy; ³Department of Microbiology, Medical School, University of Athens, Athens, Greece

*Corresponding author. Tel: +30-2413-502929; Fax: +30-2413-501570; E-mail: pournaras@med.uth.gr

Received 2 July 2011; returned 24 July 2011; revised 21 August 2011; accepted 23 August 2011

Objectives: To analyse the evolution and genetic relatedness of *Acinetobacter baumannii* clonal lineages in Greece during a 10 year period.

Methods: The study included 94 randomly selected *A. baumannii* clinical isolates recovered from 2000 to 2009 in eight tertiary Greek hospitals. Carbapenem MICs were determined by agar dilution. PCR was applied for carbapenemase genes. Isolates were typed by PFGE and tri-locus sequence typing (3LST), and 25 were also typed by multilocus sequence typing (MLST) developed by the Institut Pasteur, followed by e-Burst analysis.

Results: All isolates were multidrug-resistant (MDR); 54 (57.4%) were non-susceptible to imipenem and/or meropenem. The *bla*_{OXA-58} gene was identified in 51 (94.4%) carbapenem-non-susceptible and 15 (37.5%) carbapenem-susceptible isolates; other carbapenemase genes were not detected. Eight different PFGE types were identified. Sequence typing revealed previously characterized 3LST groups (1, 2, 4 and 5) and MLST types (STs) (1, 2, 15, 45 and 54) and the novel STs 85 (in two distant hospitals) and 86. Eight novel 3LST alleles were identified. Fifty-two (55.3%) isolates were assigned to 3LST group 1 and ST2 or ST45, both corresponding to international clonal complex 2 (CC2). Thirty-one (33.0%) isolates were assigned to 3LST group 2 and ST1 (CC1). From 2000 to 2004 63% of isolates belonged to 3LST group 2, but from 2005 to 2009 87.5% of isolates belonged to 3LST group 1; this shift was accompanied by an increase in carbapenem resistance from 43.5% to 64.6% of isolates.

Conclusions: The emergence of MDR *A. baumannii* in Greece was associated with CC1 and CC2, which are disseminated worldwide, often harbouring the *bla*_{OXA-58} gene. Novel 3LST alleles and STs were also detected, underlining an evolutionary divergence in Greece.

Keywords: *A. baumannii*, PFGE, MLST, sequence types, tri-locus sequence typing

Introduction

Acinetobacter baumannii is a multidrug-resistant (MDR) nosocomial pathogen increasingly affecting severely ill patients. It is highly capable of surviving and spreading in the hospital environment and of developing resistance to antimicrobial agents. Carbapenems, such as imipenem and meropenem, have been widely used in serious MDR *A. baumannii* infections; however, infections with carbapenem-resistant isolates are increasing and are often associated with high morbidity and mortality rates.^{1–3} Outbreaks caused by MDR *A. baumannii* have been identified in several intensive care units (ICUs) worldwide, and in many instances such isolates are resistant to all available antimicrobial agents except colistin.^{2–4} The clonal study of hospital

isolates is very important in terms of understanding the epidemiology of these outbreaks; such studies usually reveal the clonal nature of *A. baumannii* isolates, not only within single institutions, but also on a global basis.^{2,3} MDR outbreak strains usually belong to a limited number of clonal lineages, which in Europe are called EU clones I, II and III; more recently the term international clonal complexes (CCs) has been used, with the EU clones corresponding to CC1, CC2 and CC3, respectively.^{5,6}

Molecular epidemiological studies are important tools to restrict the further extension of MDR *A. baumannii*. In Greece, *A. baumannii* clinical isolates frequently exhibit MDR phenotypes, but up to the 1990s they were susceptible to carbapenems.⁷ However, low-level resistance to carbapenems gradually appeared thereafter and was relatively common at the beginning

Gogou et al.

of the 2000s.⁸ Subsequently, carbapenem-resistant *A. baumannii* clinical isolates became predominant in Greek hospitals during the last decade and commonly caused hospital outbreaks.^{9,10} The aim of the present study was to analyse the genetic relatedness and evolution of clonal lineages in MDR *A. baumannii* isolates recovered from hospitalized Greek patients during a 10 year period.

Materials and methods

Bacterial strains and phenotypic assays

Ninety-four *A. baumannii* isolates were randomly selected for further study among a collection of 652 isolates recovered from clinical infections during a 10 year period (2000–09) in eight tertiary hospitals located in four distinct regions in northern (Thessaloniki, Serres), central (Larissa) and southern (broad region of Athens) Greece. Phenotypic identification and initial antibiotic susceptibility testing were performed using the Vitek 2 system (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France). Imipenem, meropenem and colistin MICs were determined by agar dilution and Etest (bioMérieux) and interpreted using the CLSI 2010 interpretative criteria.¹¹

PCR for carbapenemase genes

The phenotypic identification of all isolates as *A. baumannii* was confirmed by PCR for the intrinsic *bla*_{OXA-51-like} gene⁹ and by the fact that using the tri-locus sequence typing (3LST) protocol (described below), which is specific for *A. baumannii*, all study isolates were assigned to a 3LST group. PCR testing was also performed for the presence of common class D OXA-type carbapenemase genes (*bla*_{OXA-23-type}, *bla*_{OXA-24-type} and *bla*_{OXA-58}) and for genes encoding the class B metallo-β-lactamases *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} and *bla*_{SIM}.^{9,12,13}

PFGE

All 94 isolates were typed by PFGE using *Apa*I-digested genomic DNA⁷ and the banding patterns were compared visually using criteria proposed by Tenover et al.¹⁴

3LST and multilocus sequence typing (MLST)

All isolates were typed using the 3LST protocol developed by the UK HPA, which includes amplification and sequencing of the alleles *ompA*, *csuE* and *bla*_{OXA-51-like} that are under selective pressure.¹⁵ PCRs were performed using Phusion DNA polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland) and PCR products were sequenced in duplicate (Macrogen Inc., Seoul, South Korea). Data were analysed using Chromas v1.45 and MEGA v3.1 software.

Twenty-five isolates recovered in each of the participating institutions and selected to represent all different PFGE types were further tested by the MLST scheme developed by the Institut Pasteur⁵ and were assigned an MLST (ST) type. This protocol was performed according to instructions on the Institut Pasteur's web site (www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Abaumannii.html). By this scheme, internal fragments of seven housekeeping genes (*cpn60*, *fusA*, *gltA*, *pyrG*, *recA*, *rplB* and *rpoB*) were amplified and sequenced in duplicate for each of the 25 selected isolates. To determine the CC where isolates belong, eBURST analysis was performed using the eBURST software program (<http://eburst.mlst.net/>).

Assignment of novel 3LST alleles and STs

The nucleotide sequences of the novel *ompA*, *csuE* and *bla*_{OXA-51-like} alleles identified are available from the HPA web site on *A. baumannii*

sequence typing (<http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/AB/home.php>). Allele sequences of ST85 and ST86 are available from the Institut Pasteur's *A. baumannii* MLST web site (<http://www.pasteur.fr/mlst>).

Results

Susceptibility testing and carbapenemase genes

Forty-six of the 94 study isolates were recovered in 2000–04 and 48 in 2005–09. All isolates exhibited an MDR phenotype, being resistant to three or more antimicrobial classes. As many as 54 (57.4%) isolates were imipenem non-susceptible (MIC >4 mg/L), while 52 (55.3%) of them were also meropenem non-susceptible (MIC >4 mg/L). From 2000 to 2004, 20 isolates (43.5%) were carbapenem non-susceptible, while from 2005 to 2009, 31 isolates (64.6%) were carbapenem non-susceptible. All isolates were susceptible to colistin. The *bla*_{OXA-58} gene was detected in 51 (94.4%) of the carbapenem-non-susceptible and 15 (37.5%) of the carbapenem-susceptible *A. baumannii* isolates. Other carbapenemase genes were not detected in any of the isolates.

PFGE typing

Eight distinct PFGE types (I–VIII) were identified, with type VIII being the most common, comprising 49 isolates (Table 1). PFGE types I, II, III and VIII included isolates differing from each other by up to three bands, which were considered as subtypes (Ia–Id; IIa and IIb; IIIa and IIIb; and VIIIa and VIIIb). The isolates assigned to distinct PFGE types differed from those of other types by more than six bands. Isolates belonging to PFGE types I and VIII were detected in hospitals from all geographic regions and isolates of PFGE type V were detected in hospitals of northern and central Greece.

3LST

Sequence typing of *A. baumannii* isolates showed already identified 3LST groups (1, 2, 4 and 5) and STs (1, 2, 15, 45 and 54), but also the novel STs 85 and 86. There was good correspondence between major PFGE types and STs, with PFGE type I corresponding to ST1, type IIa–IIb to ST85, IV to ST86, V to ST54, VI to ST15, VII to ST25 and VIIIa to ST2. However, strains assigned to ST45 showed PFGE types IIIa–IIIb and VIIIb.

The sequence analysis of the amplified alleles in 3LST typing identified eight novel alleles for *bla*_{OXA-51-like}, *csuE* and *ompA* genes. In particular, the novel alleles 2-1 [single nucleotide (nt) difference with allele 2], 10 (5 nt difference with the closest match, allele 1), 11 (3 nt difference with the closest match, allele 7) and 12 (3 nt difference with the closest match, allele 7, and 6 nt difference with allele 11) were identified for the gene locus *bla*_{OXA-51-like}. Also, the novel alleles 11 (6 nt difference with the closest match, allele 4) and 12 (8 nt difference with the closest match, allele 1) were assigned for *csuE* and alleles 8 (7 nt difference with the closest match, allele 1) and 9 (3 nt difference with the closest match, allele 5-1) for *ompA*. Isolates harbouring *bla*_{OXA-51-like} allele 2-1 and *csuE* allele 8-1 were assigned to identical 3LST groups, 2 and 5, respectively, while no novel 3LST group was assigned to isolates harbouring novel alleles because they were considered micro-epidemic strains.

Table 1. Characteristics of the 25 study isolates that were subjected to all typing assays. The MIC values shown in the table correspond to each specific isolate and do not apply for all isolates with the same 3LST and PFGE type

Strain	Source	Hospital/city	Year	PFGE type	Isolates with identical 3LST-PFGE group	3LST				MLST								MEM			Carbapenemase gene, bla _{OXA-58}
						3LST	3LST allele			ST	MLST allele							IPM MIC (mg/L)	MIC (mg/L)	Carbapenemase gene, bla _{OXA-58}	
							ompA	bla _{OXA-51-like}	csuE		cpn60	fusA	gltA	pyrG	recA	rplB	rpoB				
1	blood	Red Cross/Athens	2002	Ia	4	2	2	2	2	1	1	1	1	1	5	1	1	>32	8	+	
2	blood	Red Cross/Athens	2002	Ib	6	2	2	2-1	2	1	1	1	1	1	5	1	1	16	16	+	
3	bronchial	Red Cross/Athens	2002	IIIa	1	1	1	1	1	45	2	6	2	2	2	2	2	16	4	+	
4	blood	Red Cross/Athens	2002	IV	1	NA	1	4	1	86	6	30	2	19	31	20	31	8	2	-	
5	decubitus ulcer	University/Larissa	2008	Id	2	2	2	2-1	2	1	1	1	1	1	5	1	1	0.5	1	-	
6	blood	University/Larissa	2008	IIa	2	NA	8	10	11	85	5	2	4	1	3	3	4	2	1	-	
7	blood	KAT/Athens	2001	IIIb	1	1	1	1	1	45	2	6	2	2	2	2	2	0.75	0.5	-	
8	bronchial	KAT/Athens	2001	Ia	13	2	2	2	2	1	1	1	1	1	5	1	1	>32	8	+	
9	drainage	Hippokration/Athens	2003	VI	1	5	9	12	8-1	15	6	6	8	2	3	5	4	16	8	-	
10	bronchial	Tzaneio/Athens	2002	Ic	5	2	2	2	2	1	1	1	1	1	5	1	1	4	1	+	
11	bronchial	Tzaneio/Athens	2002	VIIIa	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	6	2	+	
12	pus	Hippokration/Athens	2003	I Ib	1	NA	8	10	11	85	5	2	4	1	3	3	4	0.5	0.5	-	
13	bronchial	Hippokration/Athens	2003	VII	3	4	4	4	7	25	3	3	2	4	7	2	4	32	4	+	
14	blood	Hippokration/Athens	2003	VI	1	5	9	12	8-1	15	6	6	8	2	3	5	4	0.75	2	-	
15	blood	Hippokration/Thessaloniki	2003	Ic	1	2	2	2-1	2	1	1	1	1	1	5	1	1	>32	4	+	
16	blood	Hippokration/Thessaloniki	2004	V	1	NA	8	11	12	54	12	3	18	2	17	4	5	1	1	+	
17	bronchial	University /Larissa	2007	V	1	NA	8	11	12	54	12	3	18	2	17	4	5	0.25	1	-	
18	bronchial	University/Larissa	2007	V	1	NA	8	11	12	54	12	3	18	2	17	4	5	2	1	-	
19	urine	Hippokration/Thessaloniki	2003	VIIIa	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	0.5	-	
20	blood	Tzaneio/Athens	2004	VIIIa	4	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	+	
21	wound	University/Larissa	2007	VIIIa	3	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	32	8	+	
22	bronchial	General/Serres	2005	VIIIa	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	>32	16	+	
23	blood	General/Serres	2005	VIIIa	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	>32	24	+	
24	decubitus ulcer	University/Larissa	2007	VIIIb	11	1	1	1	1	45	2	6	2	2	2	2	2	2	0.5	-	
25	bronchial	Papanikolaou/Thessaloniki	2007	VIIIa	24	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	16	8	+	

NA, not assigned to epidemic 3LST groups; IPM, imipenem; MEM, meropenem.

Gogou et al.

MLST

eBURST analysis of the seven STs found in this study together with other profiles of the Institut Pasteur's MLST database showed that ST2 and ST45 are single locus variants (SLVs) and belong to international CC2.⁵ ST1 was grouped in CC1, ST15 is an SLV of ST84, ST54 is an SLV of ST99 and ST85 formed a novel CC with ST6, as these two STs differ by a single allelic mismatch. ST25 and ST86 were singletons, i.e. differed by at least two genes from all other profiles.

Typing results generated by MLST were concordant with 3LST data. Indeed, isolates assigned to ST2 and ST45 (CC2) corresponded to 3LST group 1, ST1 (CC1) to 3LST group 2, ST25 to 3LST group 4 and ST15 to 3LST group 5 (Table 1). The majority of isolates (52) were assigned to 3LST group 1 and CC2, within which ST2 comprised 38 isolates and ST45 14 isolates. Thirty-one isolates were assigned to 3LST group 2 and ST1 (CC1). CC1 and CC2 included isolates from all geographical regions and comprised both carbapenem-resistant and carbapenem-susceptible isolates. The majority of isolates recovered from 2000 to 2004 belonged to 3LST group 2 (29/46, 63%), while those isolated between 2005 and 2009 more commonly belonged to 3LST group 1 (42/48, 87.5%). The remaining isolates recovered from 2000 to 2004 belonged to 3LST group 1 (nine isolates), group

4 (three isolates) and group 5 (two isolates), and three isolates could not be assigned to a specific 3LST group. As far as the time period 2005–09, two isolates belonged to 3LST2 and four isolates were not assigned to a 3LST group. Of the two new STs (ST85 and ST86) identified, ST85 was present in distant geographical regions in Greece. The geographical distribution of the 25 isolates subjected to all typing assays is shown in Figure 1 and the characteristics of those isolates are shown in Table 1.

As far as the susceptibility to imipenem of the specific 3LST types, from 2000 to 2004, 11 3LST2 (CC1) isolates were imipenem susceptible and 18 were imipenem non-susceptible, while from 2005 to 2009, 11 3LST1 (CC2) isolates were susceptible and 31 were non-susceptible. It is thus apparent that from 2000 to 2004 the resistance to imipenem nationwide was mainly due to the prevalence of 3LST2 (CC1) isolates, while from 2005 to 2009 it was due to the prevalence of 3LST1 (CC2) isolates.

Discussion

A. baumannii belonging to the international CCs 1–3 and ST15 have experienced evolutionary success and almost universally exhibit MDR phenotypes, which has facilitated their rapid clonal expansion during recent years.^{2,5} It is generally not clear

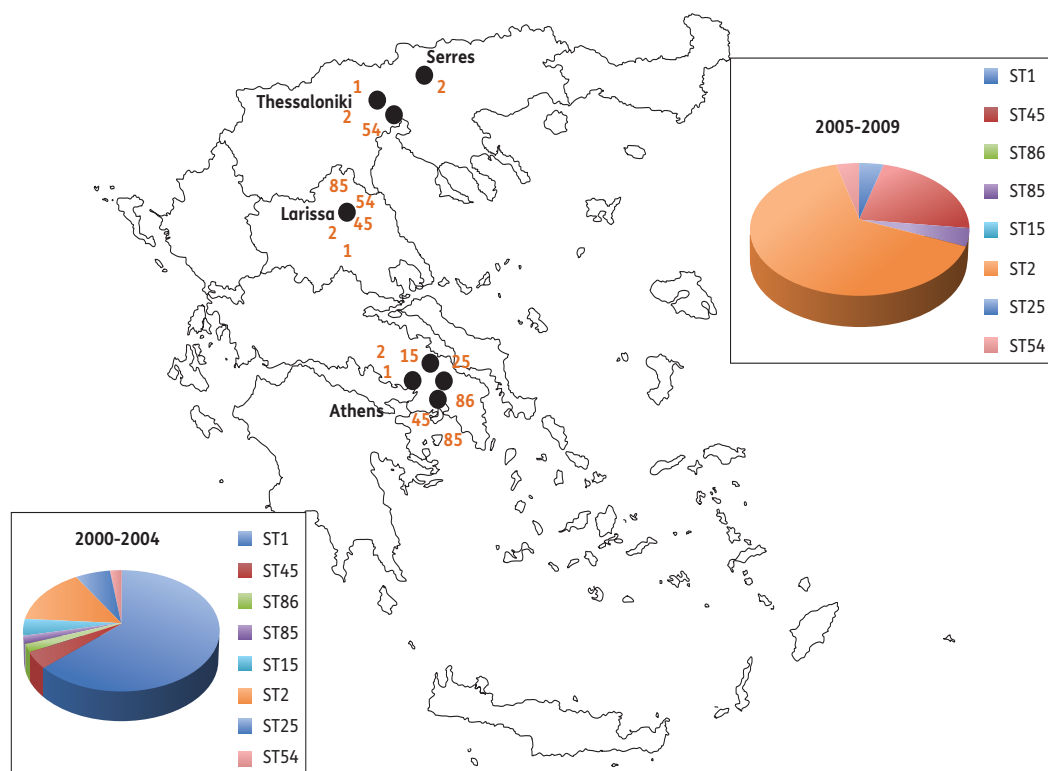


Figure 1. Geographical distribution of the identified MLST types. Black dots indicate the locations of hospitals in which *A. baumannii* isolates were recovered. Coloured pie charts indicate the prevalence of *A. baumannii* isolates assigned to different STs in each period of the study. This figure appears in colour in the online version of JAC and in black and white in the print version of JAC.

whether the expansion of MDR isolates is mainly due to the spread of already established MDR clones or because of acquisition of resistance determinants by susceptible strains that rendered them MDR.⁵ Susceptible strains are also contained within CC1 and CC2,^{16,17} which may be considered older clones that have gradually acquired multiple resistance determinants.⁵ The results of the present study support this hypothesis; CC1 and CC2 also prevailed in Greece over the past 10 years and included both carbapenem-resistant and carbapenem-susceptible isolates, indicating that the evolution of the isolates from carbapenem susceptible to carbapenem resistant^{7,8} was mainly due to the resistance development among isolates in the same CCs. Similar to reports from Italy, Spain and Portugal,^{16,18,19} as well as distant geographical regions such as China and Australia,^{20,21} CC2 (ST2 and ST45) was the more common lineage in Greece. Also, as already reported for the Czech Republic,¹⁷ a shift towards CC2 has been observed in more recent (2005–09) *A. baumannii* populations in Greece. Isolates belonging to CC3 were not observed in Greece; similar to the Czech Republic,¹⁷ but different from many other European countries, including Germany, the Netherlands, France, Italy, Spain and Belgium.⁵

Also of note is the spread of less common or novel 3LST alleles and STs, underlining an evolutionary divergence in Greek *A. baumannii* clonal lineages. Of these, ST15 and ST25 were already identified in epidemic strains isolated in several southern European countries, including Italy, Spain, Greece and Turkey,^{16,19} while ST85 and ST86 were detected for the first time in Greece. *bla*_{OXA-58} was commonly detected, being the only carbapenemase gene harboured by *A. baumannii* isolates in Greece, consistent with several studies from Mediterranean countries,^{19,22–24} but different from other reports from Europe, where different carbapenem-hydrolysing oxacillinases^{25,26} or up-regulated OXA-51-like enzymes¹⁷ are prevalent among carbapenem-resistant lineages. It should be noted that the various carbapenem-hydrolysing oxacillinases have been acquired and carried by the same clonal lineages, mainly CC1 and CC2, among isolates from different countries.^{2,25}

The genetic analysis of *A. baumannii* isolates provides valuable data regarding their epidemic distribution that may be helpful for containment of their further spread. The present study shows that isolates belonging to the same PFGE or ST type are prevalent on a nationwide scale. Also, the same lineage was detected in different time periods in remote hospitals. Characteristically, CC2 was isolated throughout the whole study period in all Greek regions, underlining an inter-hospital spread. The increased detection of CC2 isolates was paralleled by and contributed to the increased frequency of carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates, which are now predominant in Greek hospitals.²⁷ It is worrisome that the evolution of Greek *A. baumannii* isolates from carbapenem susceptible in the 1990s⁷ to carbapenem resistant in the 2000s was rapid and resulted in significant therapeutic difficulties. Further MLST studies on a larger number of isolates on a nationwide basis would be important to provide better insight into the transmission and dissemination of MDR *A. baumannii* clones.

Acknowledgements

We thank Drs Jane F. Turton (HPA, UK) and Sylvain Brisse (Institut Pasteur, France) for help in identifying the novel alleles in 3LST and MLST of

A. baumannii isolates, respectively. We also thank Dr Domenico Vitale (CEINGE Biotechnologie Avanzate, Napoli, Italy) for technical support in DNA sequencing.

Funding

This work was supported in part by grants from Agenzia Italiana del Farmaco, Italy (AIFA2007 contract no. FARM7X9F8K), Ministero dell' Istruzione, dell' Università e della Ricerca, Italy (PRIN 2008 to R. Z.) and the Research Committees of University of Thessaly and University of Athens, Greece.

Transparency declarations

None to declare.

References

- Lee NY, Lee HC, Ko NY et al. Clinical and economic impact of multidrug resistance in nosocomial *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007; **28**: 713–9.
- Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M et al. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 233–8.
- Durante-Mangoni E, Zarilli R. Global spread of drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: molecular epidemiology and management of antimicrobial resistance. *Future Microbiol* 2011; **6**: 407–22.
- Van Looveren M, Goossens H. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2004; **10**: 684–704.
- Diancourt L, Passet V, Nemec A et al. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS ONE* 2010; **5**: e10034.
- Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in the hospital: multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* 2007; **5**: 939–51.
- Maniatis AN, Pournaras S, Orkopoulou S et al. Multi-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in intensive care units in Greece. *Clin Microbiol Infect* 2003; **9**: 547–53.
- Tsakris A, Tsioni C, Pournaras S et al. Spread of low-level carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones in a tertiary care Greek hospital. *J Antimicrob Chemother* 2003; **52**: 1046–7.
- Pournaras S, Markogiannakis A, Ikonomidis A et al. Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 2006; **57**: 557–61.
- Markogiannakis A, Fildisis G, Tsiplakou S et al. Cross-transmission of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal strains causing episodes of sepsis in a trauma intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; **29**: 410–7.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth Informational Supplement M100-S20*. June 2010 Update. CLSI, Wayne, PA, USA, 2010.
- Oh EJ, Lee S, Park YJ et al. Prevalence of metallo-β-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo-β-lactamase. *J Microbiol Methods* 2003; **54**: 411–8.
- Lee K, Yum JH, Yong D et al. Novel acquired metallo-β-lactamase gene, *bla*_{SIM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii*

Gogou et al.

- clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 4485–91.
- 14** Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; **33**: 2233–9.
- 15** Turton JF, Gabriel SN, Valderrey S et al. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2007; **13**: 807–15.
- 16** Villalon P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ et al. Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 875–82.
- 17** Nemec A, Krizova L, Maixnerova M et al. Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European clone II. *J Antimicrob Chemother* 2008; **62**: 484–9.
- 18** Da Silva GJ, Mendonça N, Batista G et al. Sequence types of Portuguese carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected over 10 years. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 2254–6.
- 19** Di Popolo A, Giannouli M, Triassi M et al. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in four Mediterranean countries using a multilocus sequencing typing scheme. *Clin Microbiol Infect* 2011; **17**: 197–201.
- 20** He C, Xie Y, Fan H et al. Spread of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* of European clone II in western China. *Int J Antimicrob Agents* 2011; **38**: 257–60.
- 21** Runnegar N, Sidjabat H, Goh HMS et al. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a single institution over a 10-year period. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 4051–6.
- 22** Giannouli M, Tomasone F, Agodi A et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in intensive care units of multiple Mediterranean hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2009; **63**: 828–30.
- 23** Kulah C, Mooij MJ, Comert F et al. Characterisation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak strains producing OXA-58 in Turkey. *Int J Antimicrob Agents* 2010; **36**: 114–8.
- 24** Carretto E, Barbarini D, Dijkshoorn L et al. Widespread carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones in Italian hospitals revealed by a multicenter study. *Infect Genet Evol* 2011; **11**: 1319–26.
- 25** D'Arezzo S, Principe L, Capone A et al. Changing carbapenemase gene pattern in an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* lineage causing multiple outbreaks in central Italy. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 54–61.
- 26** Grosso F, Quinteira S, Peixe L. Understanding the dynamics of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* lineages within Portugal. *Clin Microbiol Infect* 2011; **17**: 1275–9.
- 27** Miyakis S, Pefanis A, Tsakris A. The challenges of antimicrobial drug resistance in Greece. *Clin Infect Dis* 2011; **53**: 177–84.