



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΤΟΜΕΑΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθύντρια: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ευθυμία Πετεινάκη

Διδακτορική Διατριβή

**" ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΩΝ
ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΨΕΥΔΟΜΟΝΑΔΩΝ "**

ΟΛΓΑ ΑΝΤ. ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ

Ιατρός Βιοπαθολόγος- Μικροβιολόγος

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2015

© 2015 Όλγα Οικονόμου

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (N. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

**1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)**

Δρ. Ευθυμία **Πετεινάκη**
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

2^{ος} Εξεταστής

Δρ Γεώργιος **Νταλέκος**
Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

3^{ος} Εξεταστής

Δρ Επαμεινώνδας **Ζακυνθινός**
Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

4^{ος} Εξεταστής

Δρ. Κωνσταντίνος **Γουργουλιάνης**
Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

5^{ος} Εξεταστής

Δρ. Αναστάσιος **Γερμενής**
Καθηγητής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

6^{ος} Εξεταστής

Δρ. Χαράλαμπος **Σκουλάκης**
Επίκουρος Καθηγητής Ωτορινολαρυγγολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

7^{ος} Εξεταστής

Δρ. Στυλιανός **Χατζηπαναγιώτου**
Αναπληρωτής Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΕΚΠΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή με θέμα «*Διερεύνηση αντιμικροβιακής αντοχής και παθογονικότητας νοσοκομειακών στελεχών ψευδομονάδων*» πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας υπό την καθοδήγηση της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κ. Πετεινάκη Ευθυμίας. Μέρος των πειραμάτων που αφορούν την μελέτη της παθογονικότητας των στελεχών πραγματοποιήθηκαν στο Blizard Institute του Πανεπιστημίου Queen Mary του Λονδίνου.

Για την περάτωση της διδακτορικής μου διατριβής οφείλω να ευχαριστήσω ολόψυχα την Επιβλέπουσα Καθηγήτρια, κ. Πετεινάκη Ευθυμία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Την ευχαριστώ θερμά για την άρτια επιστημονική καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αλλά και για την κατανόηση και υποστήριξη καθόλη την διάρκεια της διατριβής. Η επιστημονική αρτιότητα, ο επαγγελματισμός και η μεθοδικότητα που την διακρίνουν αποτέλεσαν για εμένα πηγή έμπνευσης.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Παθολογίας κ. Γεώργιο Νταλέκο και τον Καθηγητή Εντατικής Θεραπείας κ. Ζακυνθινό Επαμεινώνδα οι οποίοι με τίμησαν με την συμμετοχή τους στην Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή της παρούσας διατριβής καθώς και για την επίβλεψη της και τις χρήσιμες συμβουλές τους.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του ΝΝΘΑ «Η Σωτηρία» κ. Βογιατζάκη Ευάγγελο για την συμβολή του στη διατριβή και για την άψογη συνεργασία μας. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον λέκτορα του Πανεπιστημίου Queen Mary του Λονδίνου, Wareham David για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο Blizard Institute καθώς και για την επιστημονική υποστήριξη και τη συνεργασία μας για την ολοκλήρωση της διατριβής.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω και στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής για τη συμβολή τους και τις πολύτιμες παρατηρήσεις τους, που βοήθησαν στην ολοκλήρωση της διατριβής.

Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Απόστολο Λιακόπουλο, τον κ. Κώστα Παπαγιαννίτση και τη κ. Στυλιανή Σάρρου για την άψογη συνεργασία καθώς και τις πολύτιμες συμβουλές και επιστημονικές γνώσεις που μου μετέδωσαν.

Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα, όλους τους συναδέλφους και όλο το προσωπικό του Μικροβιολογικού εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, με τους οποίους συνεργάστηκα αρμονικά όλα αυτά τα χρόνια. Τέλος, ευχαριστώ πολύ την οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση και την συνεχή υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής.

*Στον πατέρα μου που παλεύει ακόμα
και στην μητέρα μου που έφυγε νωρίς*

**" ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΩΝ
ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΨΕΥΔΟΜΟΝΑΔΩΝ "**

ΟΛΓΑ ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2015

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Δρ. Ευθυμία Πετεινάκη**, Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας-
(Επιβλέπων),
2. **Δρ. Γεώργιος Νταλέκος**, Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Δρ. Επαμεινώνδας Ζακυνθινός**, Καθηγητής Εντατικής Θεραπείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- 05/2014 : Απόκτηση τίτλου ειδικότητας Ιατρικής Βιοπαθολογίας-Μικροβιολογίας
- 2007-σήμερα : Υποψήφια διδάκτωρ Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
Θέμα διδακτορικής διατριβής:
«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΨΕΥΔΟΜΟΝΑΔΩΝ»
- 2000-2006 : Πτυχίο Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Βαθμός πτυχίου: 7,00 (επτά), «Λίαν καλώς».

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 3/2015-5/2015 : Πανεπιστημιακός Υπότροφος στον Τομέα της Μικροβιολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 4/2010-3/2014 : Ειδικευόμενη Ιατρικής Βιοπαθολογίας στο **ΓΝΝΘΑ «Η ΣΩΤΗΡΙΑ»**
- 12/2012-6/2013 : Ειδικευόμενη στο Τμήμα Λοιμώξεων του **Royal London Hospital** καθώς και στο **Queen Mary University** του Λονδίνου
- 9/2009-4/2010 : Ειδικευόμενη στο Μικροβιολογικό Τμήμα του **Γενικού Νοσοκομείου Τρικάλων**
- 1/2008 -11/2008 : Υπηρεσία Υπαίθρου στο Κ.Υ. Γόννων- Π.Ι. Καλλιπεύκης
- 10/2007-1/2008 : Τρίμηνη άσκηση Υπηρεσίας Υπαίθρου (Γ.Ν.Λάρισας)
- 3/2007-6/2007 : Εκπαιδύτρια στο ΙΕΚ ΕΚΑΒ Λάρισας
- 10/2006-2/2007 : Εκπαιδύτρια στο ΙΕΚ Λάρισας (Μάθημα Δερματολογία)
- 8/2006 : Άδεια ασκήσεως ιατρικού επαγγέλματος.

ΒΡΑΒΕΙΑ/ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

4/2015: Travel grant για την εργασία «Comparative virulence of metallo-β-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* belonging to different clones from Greece». **Olga Oikonomou**, Apostolos Liakopoulos, Eythymia Petinaki, Euaggelos Vogiatzakis, Jonathan Betts, Lynette Phee, David Wareham. 25th ECCMID, Copenhagen, Denmark, 25-28 April, 2015

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Investigation of carbapenem heteroresistance among different sequence types of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates reveals further diversity. **Olga Oikonomou**, Maria Panopoulou, Alexandros Ikonomidis. J Med Microbiol. 2011 Oct;60(Pt 10):1556-8. Epub 2011 May 19.
2. Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis assay with NH_4HCO_3 , a reliable tool for direct detection of carbapenemase activity. Costas C. Papagiannitsis,, Vendula Študentová, Radoslaw Izdebski, **Olga Oikonomou**, Yvonne Pfeifer, Efthymia Petinaki, Jaroslav Hrabak. J Clin Microbiol. 2015 May;53(5):1731-5. doi: 10.1128/JCM.03094-14. Epub 2015 Feb 18.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Comparative virulence of metallo-β-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* belonging to different clones from Greece. **Olga Oikonomou**, Apostolos Liakopoulos, Eythymia Petinaki, Euaggelos Vogiatzakis, Jonathan Betts, Lynette Phee, David Wareham. 25th ECCMID in Copenhagen, Denmark, 25-28 April, 2015
2. MALDI-TOF MS, a reliable tool for the direct detection of carbapenemase activity. Papagiannitsis Costas, Studentová Vendula, Izdebski Radoslaw, **Oikonomou Olga**, Pfeifer, Yvonne, Petinaki Efthymia, Hrabak Jaroslav. 25th ECCMID in Copenhagen, Denmark, 25-28 April, 2015.
3. Μελέτη παθογονικότητας στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* ανθεκτικών στις καρβαπενέμες. **Ο.Οικονόμου**, Α. Λιακόπουλος, D. W. Wareham, Σ. Σάρρου, Σ. Ξύτσας, Ε. Βογιατζάκης, Ε. Πετεινάκη. 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας, 25-27 Φεβρουαρίου 2015, Αθήνα

4. Αξιολόγηση αντιμικροβιακής αντοχής στελεχών *Clostridium difficile* στη Θεσσαλία.Χ. Χατεδάκη, Σ. Σάρρου, Ι. Βουλγαρίδη, **Ο. Οικονόμου**, Σ. Ξύτσας, Ε. Πετεινάκη. 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας, 25-27 Φεβρουαρίου 2015, Αθήνα
5. Αξιολόγηση της δοκιμασίας Blue-carba για τη ταχεία ανίχνευση στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* που παράγουν καρβαπενεμάσες. **Ο.Οικονόμου**, Σ. Ξύτσας, Σ.Σάρρου, Α.Λιακόπουλος, Ε. Μωραΐτου, Σ. Τριανταφύλλου, Ε. Βογιατζάκης, Ε. Πετεινάκη. 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Μάιος 2014, Αθήνα
6. Ανάδυση και διασπορά εντεροβακτηριακών και καρβαπενεμασοπαραγωγών στελεχών στη Θεσσαλία., Α. Μαυροειδή, Α. Λιακόπουλος, Σ. Σάρρου, **Ο. Οικονόμου**, Β. Μυριαγκού, Ε. Πετεινάκη. 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Μάιος 2014, Αθήνα
7. Evaluation of the Rapid CARB Screen Diatab Test against the CARBA Blue Test for the Detection of Carbapenemase Production in Gram-negative Bacteria. B Bharathan, **Ο Οικονομου**, D W Wareham, L M Phee. 24th ECCMID in Barcelona, Spain 10-14 May, 2014
8. Characterisation of lincosamide resistance among *Staphylococcus aureus* clinical isolates from Greece. Liakopoulos A, Sarrou S, Sagri E, **Οικονομου Ο**, Mathiopoulos K D, Miriagou V, Petinaki E. 24th ECCMID in Barcelona, Spain 10-14 May, 2014
9. Μελέτη μηχανισμών αντοχής στις καρβαπενέμες στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* σε ασθενείς της Παθολογικής κλινικής του Π.Γ.Ν.Λάρισας. Ξύτσας Σ, Βασδέκη Α, Κούτσικου Β, Γατσέλης Ν, Ζάχου Κ, Ντάιος Γ, Οικονόμου Ο, Πολύζος Α, Νταλέκος Γ.Ν, Πετεινάκη Ε. 6^ο Διεθνές Συνέδριο Παθολογίας Κεντρικής Ελλάδος, 27-19 Μαρτίου 2014, Λάρισα
10. Multi-drug Resistant *Providencia stuartii* Isolates from Greece. Co-carriage of Cephalosporin (SHV-5, VEB-1), Carbapenem (VIM-1) and Aminoglycosides (RmtB) Resistance Determinants. **Ο Οικονομου**, M Hornsey, L Phee, J Betts, D W Wareham. IDWeek 2013, San Francisco, CA, 2-6 October 2013
11. Διερεύνηση επιμολύνσεων καλλιέργειών για διάγνωση φυματίωσης. **Οικονόμου Ο**, Μαρίνου Ι, Καράμπελα Σ, Κωνσταντινίδου Ε, Μαργαρίτη Β, Κωλέττου Μ, Τουμπανιάρη Κ, Μπέλλου Μ, Παπαβέντσης Δ, Ιωαννίδης Π, Βογιατζάκης Ε. 5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελέγχου Λοιμώξεων, 8-9 Νοεμβρίου 2012, Αθήνα
12. Various antibiotic combination tests against MDR *A. baumannii* and *K. pneumoniae*. Η. Moraitou, , **Ο. Οικονομου**, M. Makarona, S. Bartziali, G. Tsoumanis, S. Triantafyllou, E. Vogiatzakis. 22nd ECCMID in London, United Kingdom, 31 March-3 April 2012
13. Investigation of carbapenem resistance in MDR isolates from bacteraemic patients. Η. Moraitou, S. Bartziali, I.Galani, M. Makarona, **Ο. Οικονομου**, G. Tsoumanis, E. Vogiatzakis. 22nd ECCMID in London, United Kingdom, 31 March-3 April 2012
14. Έλεγχος συνέργειας αντιβιοτικών έναντι πολυανθεκτικών στελεχών *A. baumannii* και *K. Pneumonia*. Ε. Μωραΐτου, Μ. Μακαρώνα, **Ο. Οικονόμου**, Σ. Μπαρτζιαλή, Γ. Τσουμάνης,

- E. Βογιατζάκης. 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας. Μάρτιος 2012, Αθήνα
15. Βακτηριαίμιες οφειλόμενες σε ανθεκτικά στις καρβαπενέμες *K. pneumoniae* και *A. baumannii*: μια αναδυόμενη απειλή; E. Μωραΐτου, Μ. Μακαρώνα, **Ο. Οικονόμου**, Σ. Μπαρτζιαλή, E. Γαλάνη, Γ. Τσουμάνης, Σ. Τριανταφύλλου, E. Βογιατζάκης. 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας. Μάρτιος 2012, Αθήνα
16. Βακτηριαίμιες και αποτελέσματα καλλιιεργειών άκρων καθετήρων. Κουτρομπή Χ., Διαμαντή Ι., Λεμονή Μ., **Οικονόμου Ο.**, Ήππα Β. 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας. Απρίλιος 2010, Αθήνα
17. Λοιμώξεις χοληφόρων οδών. Απομονωθέντα μικρόβια και έλεγχος ευαισθησίας τους στα αντιβιοτικά. **Οικονόμου Ο.**, Διαμαντή Ι., Λεμονή Μ., Κουτρομπή Χ., Ήππα Β. 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας. Απρίλιος 2010, Αθήνα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ψευδομονάδες είναι αζυμωτικά Gram αρνητικά βακτηρίδια, αυστηρά αερόβια και οξειδάση θετικά. Η *Pseudomonas aeruginosa* αποτελεί κυρίως αίτιο σοβαρών και ποικίλων νοσοκομειακών λοιμώξεων αλλά και λοιμώξεων της κοινότητας, οι οποίες συνήθως είναι ηπιότερες. Την τελευταία δεκαετία έχει παρατηρηθεί μεγάλη αύξηση των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *Pseudomonas aeruginosa*, γεγονός που αποτελεί σημαντικό πρόβλημα στην αντιμετώπιση αυτών των λοιμώξεων, καθώς οι θεραπευτικές επιλογές που απομένουν είναι ελάχιστες. Ο κυριότερος μηχανισμός αντοχής είναι η παραγωγή καρβαπενεμασών, ενζύμων δηλαδή που υδρολύουν τις καρβαπενέμες.

Σκοπός της εργασίας μας ήταν α) η φαινοτυπική και μοριακή ανίχνευση των μεταλλο-β-λακταμασών ως επίκτητου μηχανισμού αντοχής στις καρβαπενέμες πολυανθεκτικών στελεχών *P. aeruginosa* β) η μελέτη του γενετικού περιβάλλοντος των γονιδίων που κωδικοποιούν καρβαπενεμάση και ο χαρακτηρισμός των ιντεγκρονίων, γ) η μοριακή τυποποίηση των στελεχών αυτών και δ) η μελέτη της παθογονικότητας των επικρατούντων κλώνων.

Για το λόγο αυτό μελετήσαμε 387 στελέχη από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας και από το Νοσοκομείο «Η Σωτηρία» της Αθήνας από τα οποία τα 126 βρέθηκαν θετικά στην παραγωγή καρβαπενεμάσης τόσο φαινοτυπικά όσο και μοριακά. Συγκεκριμένα, έγινε φαινοτυπική ανίχνευση της παραγωγής καρβαπενεμασών με διάφορες μεθόδους όπως και προσδιορισμός των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή τους με μοριακές μεθόδους, ενώ παράλληλα μελετήθηκε και το γενετικό τους περιβάλλον. Ακολούθησε τυποποίηση των εν λόγω στελεχών με MLST και σύγκριση των κλώνων στα δύο νοσοκομεία. Επιπλέον, μελετήθηκε η παθογονικότητα των επικρατέστερων κλώνων, με πειράματα *in vivo*.

Κατά το χρονικό διάστημα από τον Μάρτιο έως και τον Οκτώβριο του 2011 απομονώθηκαν συνολικά 813 στελέχη *Pseudomonas aeruginosa* εκ των οποίων 387 (47,6%) παρουσίασαν αντοχή στις καρβαπενέμες (MIC>8μg/ml) σύμφωνα με τα κριτήρια του CLSI, 2012. Από τα 387 ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη, 126 (32,5%) βρέθηκαν θετικά με τις διάφορες φαινοτυπικές δοκιμασίες δηλώνοντας την παρουσία μέταλλο-β-λακταμάσης (τάξης B) ενώ ανιχνεύτηκαν διάφορα αλληλόμορφα γονίδια της καρβαπενεμάσης VIM.

Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου *bla_{VIM}*, που ακολούθησε, κατέδειξε ότι από τα 126 στελέχη, τα 80 έφεραν το αλληλόμορφο *bla_{VIM-2}*, τα 36 το αλληλόμορφο *bla_{VIM-4}*, τα 9 το αλληλόμορφο *bla_{VIM-1}* και σε 1 στέλεχος το αλληλόμορφο *bla_{VIM-17}*.

Σε όλα τα στελέχη το γονίδιο *bla_{VIM}* βρέθηκε να αποτελεί τμήμα της γονιδιακής συστοιχίας ιντεγκρονίων τάξης 1, γενετικών δομών που έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση πολυανθεκτικού φαινοτύπου, καθώς είναι ικανές να συσσωρεύουν γονίδια ανθεκτικότητας έναντι διαφόρων τάξεων αντιβιοτικών. Στη συνέχεια η τυποποίηση των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *P. aeruginosa* που διενεργήθηκε με τη μέθοδο MLST, ανέδειξε ότι τα στελέχη *P. aeruginosa* άνηκαν σε

9 διαφορετικούς STs τύπους και συγκεκριμένα στους ST-111, ST-235, ST-244, ST-253, ST-277, ST-308, ST-395, ST-773 και ST-1457.

Η μελέτη της παθογονικότητας αντιπροσωπευτικών MLST στελεχών *P. aeruginosa* πραγματοποιήθηκε στο μη σπονδυλωτό μοντέλο *Galleria mellonella*. Η *Galleria mellonella* αποτελεί ένα κατάλληλο μη θηλαστικό μοντέλο-ξενιστή για τη μελέτη του ρόλου του Type III Secretion System στη παθογένεση των ψευδομονάδων.

Όλα τα στελέχη αναδείχθηκαν θετικά για τα γονίδια *exoT* και *exoY* ενώ διαφορές υπήρχαν στα γονίδια *exoS* και *exoU*.

Τα υπό μελέτη στελέχη εμφάνισαν διαφορές στη παθογονικότητα. Συγκεκριμένα οι κλώνοι ST111 και ST235 οι οποίοι επικρατούν, αναδείχθηκαν οι λιγότερο παθογονικοί με ποσοστό επιβίωσης των προνυμφών μεγαλύτερο του 50% το πρώτο 24ωρο ενώ οι ST277, ST244 και ST773 αναδείχθηκαν οι πιο παθογονικοί με ποσοστό επιβίωσης 0% στις πρώτες 24 ώρες, παρόμοιο με αυτό των πρότυπων στελεχών.

Συνοψίζοντας, καταλήγουμε στα παρακάτω συμπεράσματα:

1. Το ποσοστό των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *P. aeruginosa* στα ελληνικά νοσοκομεία για το χρονικό διάστημα που εξετάσαμε ήταν πολύ υψηλό (47,6%), ενώ παράλληλα εμφάνιζαν πολυανθεκτικούς φαινοτύπους, περιορίζοντας τις θεραπευτικές επιλογές
2. Η ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες των στελεχών *P. aeruginosa* οφείλεται σε αρκετά μεγάλο ποσοστό (32,5%) στην παρουσία των αλληλομόρφων του γονιδίου VIM (VIM-1, VIM-2, VIM-4 και VIM-17), τα οποία διαπιστώθηκε ότι εδράζονται επί ιντεγκρονίων, γενετικών δομών με ικανότητα ενσωμάτωσης και άλλων γονιδίων που προσδίδουν αντοχή και σε άλλες τάξεις αντιβιοτικών.
3. Η πλειονότητα των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *P. aeruginosa* ανήκαν στους ST-111_{MLST} και ST-235_{MLST}
4. Αποτελεί επιτακτική ανάγκη η εύρεση μεθόδων για την άμεση ανίχνευση των στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες έτσι ώστε να εμποδίζεται η διασπορά. Ανάμεσα στις μεθόδους ανίχνευσης, η τροποποιημένη MALDI-TOF MS αποτελεί μία μέθοδο με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα στην ανίχνευση των ψευδομονάδων που παράγουν καρβαπενεμάση ενώ η δοκιμασία Blue-Carba αποτελεί μια φτηνή, γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδο για την ανίχνευση των ψευδομονάδων που παράγουν καρβαπενεμάσες, που θα μπορούσε να εφαρμοσθεί σε οποιοδήποτε εργαστήριο χωρίς ιδιαίτερο εξοπλισμό.
5. Υπάρχουν διαφορές στην παθογονικότητα των στελεχών που ανήκουν σε διαφορετικούς STs που δε σχετίζονται με την παρουσία συγκεκριμένων γονιδίων παθογονικότητας του εκκριτικού συστήματος τύπου III. Οι πιο συχνοί MLST τύποι φαίνεται να σχετίζονται με μειωμένη παθογονικότητα εύρημα που πιθανότατα συσχετίζεται με την ικανότητα τους να διασπείρονται και να επικρατούν έναντι των υπολοίπων.

ABSTRACT

Pseudomonas is a genus of Gram negative, strict aerobic and oxidase positive bacteria. *Pseudomonas aeruginosa* is a major cause of severe nosocomial and community acquired infections. The last decade, the rate of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains is high, complicating treatment. One of the most common mechanism of carbapenem resistance in *P. aeruginosa* is the production of carbapenem hydrolyzing enzymes.

The aim of our study was a) the phenotypic and molecular detection of metallo- β -lactamase as a resistance mechanism to carbapenems in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains, b) the investigation of the genetic environment of the genes responsible for the production of the carbapenemase, c) molecular typing and d) the study of virulence of those multi-drug resistant strains.

Three hundred and eighty-seven *P. aeruginosa* isolates resistant to carbapenems were collected from two different hospitals in Greece (University hospital of Larissa and General Hospital of Chest Diseases "Sotiria"). One hundred and twenty-six were positive for the production of metallo- β -lactamase according to the phenotypic and molecular screening. We undertook molecular typing to identify the clonality of carbapenemase producing *P. aeruginosa* in Greek hospitals and to assess whether there were differences between different hospitals. Virulence of representative isolates from different STs was assessed in an *in vivo* pathogenicity model.

During an eight-month period, from March to October 2011, 813 *P. aeruginosa* strains were isolated in total. 387 of these (47,6%) were resistant to carbapenems (MIC \geq 8 μ g/ml according to CLSI, 2012), while 126 (32,5%) were positive for the production of metallo- β -lactamase according to the phenotypic screening. All isolates were MBL-producers containing *bla*_{VIM} within class 1 integrons in association with other genes encoding resistance to other antimicrobial agents. The sequencing analysis revealed that 80 isolates contain the allele *bla*_{VIM-2}, 36 the allele *bla*_{VIM-4}, 9 the allele *bla*_{VIM-1} and only one the allele *bla*_{VIM-17}.

Sequence types (ST) were assigned by Multi-locus Sequence Typing (MLST) and nine STs—ST111 (n=60), ST235 (45), ST395 (7) ST244 (4), ST308 (3), ST277 (3), ST773 (2), ST253 (1) and ST 1457 (1) were found.

Virulence of representative isolates from the most prevalent STs was assessed in a *G. mellonella* – *P. aeruginosa* pathogenicity model. Isolates belonging to ST111 and ST235 were the most frequent strains and were less virulent than other carbapenem resistant isolates belonging to different STs.

In conclusion:

1. The rate of carbapenem resistance is quite high (47,6%) in Greek Hospitals
2. Major cause of resistance in carbapenems in *P. aeruginosa* isolates is the production of metallo- β -lactamases, bla_{VIM}, within integrons class I.
3. Most of the isolates belong to MLST clones ST111 and ST 235.
4. It is very important to find new methods for the detection of carbapenemase-producing isolates in order to be able to eliminate the spread. Modified MALDI-TOF MS is a method with high sensitivity and specificity for the detection of *Ps. aeruginosa*- producing carbapenemase. Blue-Carba is a very cheap and reliable phenotypic method, based on the hydrolyses of the antibiotic, that could be used in any laboratory.
5. There are differences in virulence between different clones without any correlation with the presence of virulence genes of the Type III Secretion System. Most prevalent STs revealed with attenuated virulence enhancing their capacity for colonisation and onward transmission.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Εισαγωγή.....	σελ 25
1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	σελ 27
1.2.1 Κατασκευή-Φυσιολογία.....	σελ 27
1.2.2 Αντιγονική σύσταση.....	σελ 28
1.2.3. Επιδημιολογία.....	σελ 28
1.2.4 Παθογένεια- Λοιμογόνιοι Παράγοντες.....	σελ 29
1.2.5 Κλινικές Εκδηλώσεις.....	σελ 32
1.2.6 Εργαστηριακή Διάγνωση.....	σελ 35
1.2.6.1 Φαινοτυπικές μέθοδοι.....	σελ 37
1.2.6.2 Γονοτυπικές μέθοδοι.....	σελ 38
1.2.7 Αντιμικροβιακοί Παράγοντες δραστικοί έναντι της <i>P. Aeruginosa</i>	σελ 43
1.2.7.1 Β-λακταμικά αντιβιοτικά	σελ 43
1.2.7.2. Αμινογλυκοσίδες και ψευδομονάδα.....	σελ 46
1.2.7.3 Κινολόνες και ψευδομονάδα.....	σελ 46
1.2.7.4 Πολυμυξίνες και ψευδομονάδα.....	σελ 46
1.2.7.5 Φωσφομυκίνη και ψευδομονάδα.....	σελ 46
1.2.8 Φυσική αντοχή.....	σελ 46
1.2.8.1. Ελαττωμένη κυτταρική διαπερατότητα.....	σελ 47
1.2.8.2. Ιδιοσυστασιακά συστήματα εξώθησης (efflux pumps).....	σελ 47
1.2.8.3. Ένζυμα.....	σελ 48
1.2.8.4. Βιομεμβράνες (biofilm).....	σελ 48
1.2.9 Επίκτητη αντοχή.....	σελ 49
1.2.9.1 Αντοχή στα β-λακταμικά αντιβιοτικά.....	σελ 49
1.2.9.2 Αντοχή στις αμινογλυκοσίδες.....	σελ 56
1.2.9.3 Αντοχή στις κινολόνες.....	σελ 57

1.2.9.4 Αντοχή στην κολιστίνη.....	σελ 57
1.2.10 Ανίχνευση των καρβαπενεμασών.....	σελ 57
1.2.10.1 Επίπεδα αντοχής σε καρβαπενέμες.....	σελ 57
1.2.10.2 Χρωμογόνα υλικά καλλιέργειας.....	σελ 58
1.2.10.3 Modified Hodge Test ή cloverleaf test.....	σελ 58
1.2.10.4 Μέθοδος δίσκων: Double Disc Test (DDST) και Combined Disk Test (CDT).....	σελ 59
1.2.10.5 Carba-NP-Blue Carba.....	σελ 60
1.2.10.6 Η φασματοφωτομετρική μέθοδος.....	σελ 61
1.2.10.7 Ισοηλεκτρική εστίαση.....	σελ 62
1.2.10.8 MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight)	σελ 62
1.2.10.9 Μοριακές μέθοδοι.....	σελ 63
1.2.11 Γενετικό υλικό βακτηρίων και αντοχή.....	σελ 63
1.2.12. Μεταθετά στοιχεία.....	σελ 65
1.2.12.1 Τρανσποζόνια.....	σελ 65
1.2.12.2 Αλληλουχίες εισδοχής.....	σελ 65
1.2.13 Ιντεγκρόνια τάξης 1	σελ 66
1.2.14 Γονιδιακές κασσέτες.....	σελ 67
1.3 Σκοπός της διατριβής.....	σελ 69
 ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
2. Υλικά και μέθοδοι.....	σελ 73
2.1 Μικροβιολογικό υλικό.....	σελ 73
2.2 Ταυτοποίηση του Μικροοργανισμού με Κλασικές Μεθόδους	σελ 73
2.2.1 Χρώση κατά Gram.....	σελ 73
2.2.2 Σύστημα ταυτοποίησης api 20E	σελ 73

2.3 Αντιβιόγραμμα.....	σελ 74
2.3.1 Δοκιμασία Διάχυσης των Δίσκων	σελ 74
2.3.2 Προσδιορισμός Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης (MIC).....	σελ 75
2.4 Φαινοτυπική Διερεύνηση Αντοχής έναντι Καρβαπενέμων.....	σελ 78
2.4.1 Τροποποιημένη Δοκιμασία κατά Hodge	σελ 78
2.4.2 Δοκιμασία Αναστολής με Συνδυασμό Δίσκων.....	σελ 79
2.4.3 Blue-Carba.....	σελ 80
2.4.4 MALDI-TOF MS.....	σελ 81
2.5 Μοριακές Μέθοδοι.....	σελ 83
2.5.1 Εκχύλιση Γενετικού Υλικού	σελ 83
2.5.2 Ηλεκτροφόρηση σε Πήκτωμα Αγαρόζης	σελ 84
2.5.3 Καθαρισμός Προϊόντων της PCR.....	σελ 84
2.5.4 Ανάλυση αλληλουχίας DNA (Sequencing).....	σελ 85
2.5.5 Σύγκριση Αλληλουχιών DNA.....	σελ 87
2.6 Μοριακή Ανίχνευση γονιδίων Καρβαπενεμασών.....	σελ 88
2.6.1 Ανίχνευση Γονιδίων Καρβαπενεμασών Τάξης Β.....	σελ 88
2.7 Χαρακτηρισμός του γενετικού περιβάλλοντος	σελ 89
2.7.1 Χαρτογράφηση Δομών Ιντεγκρονίου	σελ 89
2.8 Μοριακή Τυποποίηση Στελεχών	σελ 91
2.8.1 Τυποποίηση με BOX-PCR	σελ 91
2.8.2 Τυποποίηση με MLST	σελ 92
2. 9 Μελέτη παθογονικότητας.....	σελ 94
2.9.1 Ανίχνευση τοξινογόνων στελεχών.....	σελ 94

2.9.2 <i>In vivo</i> μελέτη παθογονικότητας.....	σελ 95
3. Αποτελέσματα.....	σελ 97
3.1 Επιλογή Μικροβιακών Στελεχών.....	σελ 97
3.2 Ταυτοποίηση Μικροοργανισμών με Κλασικές Μεθόδους	σελ 97
3.3 Ανθεκτικότητα Μικροβιακών Στελεχών.....	σελ 99
3.4 Φαινοτυπική Διερεύνηση Ανθεκτικότητας έναντι Καρβαπενεμών....	σελ 102
3.4.1 Παρουσία καρβαπενεμασών στα Μικροβιακά Στελέχη	σελ 102
3.5 Μελέτη Γονιδίων Καρβαπενεμασών.....	σελ 104
3.6 Γενετικό Περιβάλλον των Γονιδίων των Καρβαπενεμασών	σελ 105
3.7 Μοριακή Ταυτοποίηση Στελεχών.....	σελ 107
3.8 MALDI-TOF MS.....	σελ 109
3.9 Μελέτη παθογονικότητας	σελ 112
3.9.1 Ανίχνευση τοξινογόνων στελεχών.....	σελ 112
3.9.2 <i>In vivo</i> μελέτη παθογονικότητας.....	σελ 113
4. Συζήτηση.....	σελ 115
Συμπεράσματα.....	σελ 120
Βιβλιογραφία.....	σελ 123

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Εισαγωγή

Το γένος *Pseudomonas* περιλαμβάνει πολλά είδη από τα οποία το συχνότερο αίτιο που προκαλεί λοιμώξεις στον άνθρωπο είναι η *Pseudomonas aeruginosa*. Το βακτήριο απομονώθηκε το 1882 από τον Gessard, αποτελεί τον πιο σημαντικό εκπρόσωπο των αζυμωτικών βακτηρίων και ανήκει στο rRNA group I του γένους *Pseudomonas* (Palleroni, 1984).

Πίνακας 1: Ταξινόμηση της οικογένειας *Pseudomonadaceae*

rRNA Group I	rRNA Group III
Fluorescent Group <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas putida</i>	Acidovorans Group <i>Comamonas acidovorans</i> <i>Comamonas terrigena</i> <i>Comamonas testosterone</i>
Stutzeri Group <i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Pseudomonas mendocina</i> CDC Group Vd-3	Facilis-delafieldii Group <i>Acidovorax delafieldii</i> <i>Acidovorax facilis</i> <i>Acidovorax temperans</i>
Alcaligenes Group <i>Pseudomonas alcaligenes</i> <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> <i>Pseudomonas species group I</i>	rRNA Group IV
	Diminuta Group <i>Brevundimonas diminuta</i> <i>Brevundimonas vesicularis</i>
rRNA Group II	rRNA Group V
Pseudomallei Group <i>Burkholderia mallei</i> <i>Burkholderia pseudomallei</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Burkholderia gladioli</i> <i>Burkholderia pickettii</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> Unknown Nucleic Acid Homology <i>Chryseomonas luteola</i> <i>Flavimonas oryzihabitans</i> <i>Sphingomonas paucimobilis</i> <i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Pseudomonas –like group 2</i> CDC group WO-1

Οι ψευδομονάδες είναι κινητά, ευθεία ή ελαφρώς καμπύλα, gram-αρνητικά βακτηρίδια (0,5-1,0 × 1,5-5,0 μm), διατεταγμένα συνήθως κατά ζεύγη. Δε ζυμώνουν, χρησιμοποιούν υδατάνθρακες μέσω αναπνευστικού μεταβολισμού, με το οξυγόνο ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων. Αν και θεωρούνται υποχρεωτικά αερόβια, μπορούν να αναπτυχθούν αναερόβια χρησιμοποιώντας νιτρικά ή αργινίνη ως εναλλακτικό αποδέκτη ηλεκτρονίων.



Εικόνα 1: *Pseudomonas aeruginosa*, χρώση κατά Gram

Η *Pseudomonas aeruginosa* έχει τις ακόλουθες ιδιότητες που απαντούν σε όλα τα στελέχη του είδους:

- Παράγει καταλάση
- Παράγει οξειδάση
- Διασπά οξειδωτικώς τη γλυκόζη χωρίς την παραγωγή αερίου
- Δε ζυμώνει τη γλυκόζη
- Δε διασπά τη μαλτόζη
- Δε διασπά τη λακτόζη
- Δεν παράγει H₂ S
- Αναπτύσσεται στους 42^o C

Μεγάλος αριθμός στελεχών του είδους *Pseudomonas aeruginosa* έχει τις παρακάτω ιδιότητες:

- Είναι κινητό βακτήριο (περισσότερα από το 90% των στελεχών)
- Υδρολύει τη αργινίνη (96-98% των στελεχών)

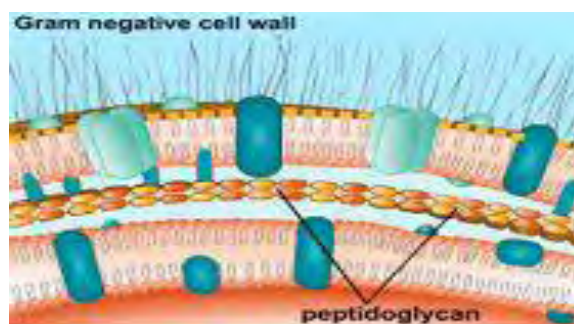
- Διασπά οξειδωτικά το γλυκονικό κάλιο
- Παράγει πυοκυανίνη (>90% των στελεχών) (Michel-Briand and Baysse, 2002)

1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

1.2.1 Κατασκευή-Φυσιολογία

Το κυτταρικό τοίχωμα της *Pseudomonas aeruginosa* είναι παρόμοιο με αυτό των Gram-αρνητικών μικροβίων αποτελούμενο από λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης πάχους μόλις 5nm. Εξωτερικά της πεπτιδογλυκάνης υπάρχουν τρεις αλληπάλληλες στοιβάδες: λιποπρωτεΐνης, εξωτερικής μεμβράνης και λιποπολυσακχαριτών. Η λιποπρωτεΐνη συνδέει τη στοιβάδα της πεπτιδογλυκάνης με τη εξωτερική μεμβράνη. Χρησιμεύει για τη σταθεροποίηση της εξωτερικής μεμβράνης και τη στήριξη της στην στοιβάδα της πεπτιδογλυκάνης. Η εξωτερική μεμβράνη έχει δύο στοιβάδες και αποτελείται από λιποπολυσακχαρίτες (LPS) και πρωτεΐνες. Διαθέτει πόρους που σχηματίζονται από πρωτεΐνες και ονομάζονται πορίνες. Οι πόροι αυτοί επιτρέπουν τη δίοδο διαφόρων μορίων μικρού μοριακού βάρους, σακχάρων αμινοξέων και άλλων ουσιών.

Το LPS αποτελείται από τρεις μοριακές δομές. Στο ένα άκρο από ένα φωσφολιπίδιο που περιέχει γλυκοσαμίνη αντί για γλυκερόλη και είναι το A-λιπίδιο του μορίου του, δηλαδή μια ουσία τοξική που είναι η ενδοτοξίνη των Gram αρνητικών μικροβίων. Είναι τόσο τοξική ώστε ακόμη και μικρή ποσότητα αυτού που απελευθερώνεται από τα μικρόβια που καταστρέφονται από τη δράση των αντιβιοτικών κατά τη χημειοθεραπεία αρκεί για να προκαλέσει ενδοτοξικό σοκ. Στο μέσο βρίσκεται ο πολυσακχαριδικός πυρήνας και στο άλλο άκρο το O-αντιγόνο του που είναι μια πλευρική σακχαριδική αλυσίδα. Το στοιχείο αυτό παρουσιάζει χημικές διαφορές στα μικρόβια του αυτού γένους και του αυτού είδους. Βάσει των αντιγονικών αυτών διαφορών τα μικρόβια διαχωρίζονται σε ορολογικές ομάδες ή σε ορολογικούς τύπους.



Εικόνα 2: Κυτταρικό τοίχωμα Gram-αρνητικού βακτηρίου

Ο μικροοργανισμός καταστρέφεται στην θερμοκρασία των 55° C σε μία ώρα. Αντέχει και ζεί

στο νερό για πολλούς μήνες. Διατηρείται και πολλαπλασιάζεται στις μικρές υγρές συλλογές και στις υγρές επιφάνειες, στα διάφορα θεραπευτικά υγρά, ακόμη και στα διαλύματα των περισσοτέρων αντισηπτικών ουσιών. Διατηρείται στη θερμοκρασία του κοινού ψυγείου. Είναι ευαίσθητη στις ενώσεις αργύρου και κατά 80% στις ενώσεις υδραργύρου, αλλά όλα τα στελέχη της είναι ανθεκτικά στο ιώδιο και αντέχουν στη φυσική βακτηριοκτόνο δράση του ορού (Αρσένη Α, 1994).

1.2.2 Αντιγονική σύσταση

Ο λιποπολυσακχαρίτης LPS αποτελεί τη βάση για την ορολογική διάκριση της *P.aeruginosa* σε 17 Ο-οροτύπους (Παπαπαναγιώτου Ι, 2001). Διάφοροι ορότυποι έχουν συνδεθεί με συγκεκριμένη παθογόνο δράση, με την ικανότητα επιβίωσης του στελέχους ή ακόμα και με την αντοχή στα αντιβιοτικά (Legakis NJ, 1982). Ο ορότυπος O12 είναι συνήθως πολυανθεκτικός στα αντιβιοτικά και είναι ο επικρατέστερος στις ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις στην Ελλάδα αλλά και σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες. Ο ορότυπος O11 είναι και αυτός συχνά ενδονοσοκομειακός και απομονώνεται κυρίως σε σηψαιμίες (Farmer JJ, 1982).

Οι πρωτείνες της εξωτερικής μεμβράνης της ψευδομονάδας, γνωστές ως πορίνες επιτρέπουν τη διέλευση των αντιμικροβιακών ουσιών δια μέσου αυτών. Στελέχη με τροποποιημένες λειτουργικά πορίνες είναι λιγότερο διαπερατά από τα β-λακταμικά αντιβιοτικά (Mutharia MI, 1982).

Η βλεφαρίδα της *P. aeruginosa* καθώς και οι βλεφαρίδες των ψευδομονάδων που ανήκουν σε άλλα είδη είναι επίσης αντιγονικές, αλλά εμφανίζουν μεγάλη αντιγονική ετερογένεια και δεν χρησιμοποιούνται για διαχωρισμό οροτύπων.

1.2.3. Επιδημιολογία

Η *P. aeruginosa* ανευρίσκεται κυρίως στο έδαφος, στο νερό, στα φυτά και στα ζώα. Προτιμά τα περιβάλλοντα με υγρασία. Ενόστε αποικίζει το δέρμα, το έξω αυτί, τις ανώτερες αναπνευστικές οδούς και το παχύ έντερο υγιών ανθρώπων. Έχει απομονωθεί από πτύελα και κόπρανα ατόμων που δεν έχουν νοσηλευτεί σε ποσοστό 5% κα 3%, αντίστοιχα. Μετά από παραμονή 72 ωρών των ασθενών σε νοσοκομείο, το ποσοστό απομόνωσης της *P. aeruginosa* στα κόπρανα ανέρχεται σε 20% (Todar, 2002). Μηχανική υποστήριξη των ασθενών αποτελεί σημαντική οδό εισόδου του μικροβίου και αποικισμού του αναπνευστικού συστήματος(Koenig and Truwit 2006).

Η μετάδοση της *P. aeruginosa* γίνεται με τους εξής τρόπους:

- Επαφή με μολυσμένο νερό
- Χρήση μολυσμένων ιατρικών συσκευών

- Εισπνοή σταγονιδίων
- Άμεση επαφή με μολυσμένες επιφάνειες
- Έμμεση επαφή με μολυσμένες επιφάνειες μέσω των χεριών των επαγγελματιών υγείας
- Έμμεσα από ασθενή σε ασθενή μέσω των χεριών των επαγγελματιών υγείας
- Ενδογενώς, μετά από αποικισμό δέρματος, αναπνευστικού ή γαστρεντερικού σωλήνα

1.2.4 Παθογένεια- Λοιμογόνοι Παράγοντες

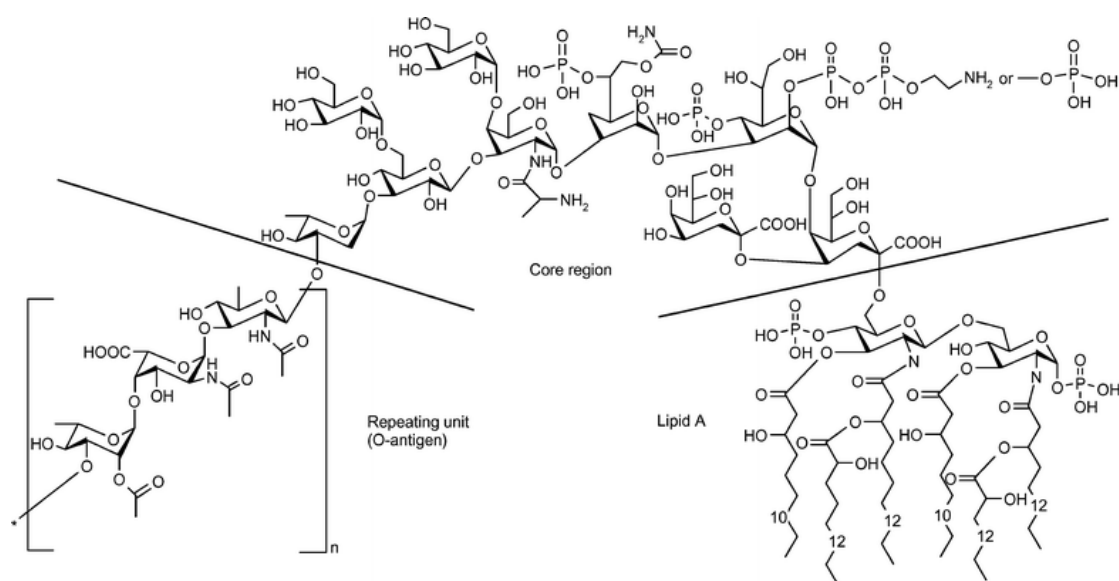
Η *P. aeruginosa* είναι ένα ευκαιριακό παθογόνο που μπορεί να προκαλέσει σοβαρές λοιμώξεις στον άνθρωπο, αλλά σπάνια προκαλεί λοίμωξη σε υγιείς ανθρώπους. Συνήθως ευνοείται από διαταραχές των ανοσολογικών αμυντικών μηχανισμών (ουδετεροπενία, υπογαμμασφαιριναιμία, κυστική ίνωση, ιατρογενής ανοσοανεπάρκεια) καθώς και από καταστροφή των φυσιολογικών φραγμών του οργανισμού (εγκαύματα, χειρουργικές επεμβάσεις, ουροκαθετήρες, ενδοτραχειακή διασωλήνωση), (Murray *et al*, 2005, Winn *et a*, 2006).

Οι λοιμώξεις συνήθως ξεκινάνε με την προσκόλληση του βακτηρίου και τον αποικισμό του δέρματος ή των βλεννογόνων. Στη συνέχεια ακολουθεί τοπική εισβολή του βακτηρίου και λοίμωξη, ενώ επέκταση της μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μπορεί να οδηγήσει σε συστηματική λοίμωξη και θάνατο. Η λοίμωξη μπορεί να παραμείνει εντοπισμένη ή να επεκταθεί στους παρακείμενους ιστούς (Pollack, 1984).

Διάφοροι παράγοντες καθορίζουν την παθογενετικότητα της *P. aeruginosa*. Αυτοί περιλαμβάνουν κυτταρικούς και εξωκυττάριους παράγοντες. Στους κυτταρικούς παράγοντες συμπεριλαμβάνονται οι φίμπριες και ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS). Οι εξωκυττάριοι παράγοντες περιλαμβάνουν ένζυμα, τοξίνες, τον εξωκυττάριο πολυσακχαρίτη (slime) και το βλεννώδη πολυσακχαρίτη (αλγινικό οξύ-alginate).

Οι φίμπριες (type 4 pili) είναι προσκολλητίνες με την βοήθεια των οποίων επιτυγχάνεται η προσκόλληση της *P. aeruginosa* στα επιθηλιακά κύτταρα ενώ παράλληλα παίζουν σημαντικό ρόλο στην κινητικότητα του μικροβίου, στο σχηματισμό βιομεμβράνης, στη πρόσληψη DNA και στη μεταφορά ηλεκτρονίων (Burrows, 2012). Επίσης η παρουσία τους σχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα πρόκλησης πνευμονίας και βακτηριαιμίας. Η *Ps. aeruginosa* παράγει επίσης μία νευραμινιδάση η οποία αφαιρεί ρίζες σιαλικού οξέος από τον υποδοχέα των προσκολλητινών, ενισχύοντας έτσι την προσκολλητικότητα των βακτηρίων στα επιθηλιακά κύτταρα (Murray *et al*, 2005), ενώ η εξωτοξίνη S και η βλεφαρίδα συμμετέχουν επίσης στη προσκόλληση του βακτηρίου στα επιθηλιακά κύτταρα.

Ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) αποτελεί το κύριο συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης. Έχει δράση ενδοτοξίνης και μπορεί να προκαλέσει πυρετό, ολιγουρία, λευκοκυττάρωση και λευκοπενία, καταπληξία, διάχυτη ενδαγγειακή πήξη και σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας των ενηλίκων (Παπαπαναγιώτου Ι, 2001). Η σύνδεση του LPS στους Toll-like receptors 4 (TLR-4) σχετίζεται με την ενεργοποίηση των μηχανισμών φυσικής ανοσίας του οργανισμού, καθώς επίσης και με την εγκατάσταση καταπληξίας (shock).



Εικόνα 3: Δομή του λιποπολυσακχαρίτη LPS

Ο εξυδαττωμένος πολυσακχαρίτης (slime) αποτελεί βακτηριακό προϊόν και η παραγωγή του είναι χαρακτηριστική ιδιότητα του είδους *P. aeruginosa*.

Ο βλεννώδης πολυσακχαρίτης (αλγινικό οξύ, alginate) απομονώνεται συνήθως από εκκρίσεις ατόμων με κυστική ίνωση δίνοντας ένα βλεννώδη φαινότυπο στα στελέχη. Συμμετέχει στο σχηματισμό βιομεμβράνης, λειτουργεί ως αντιφαγοκυτταρικός παράγοντας και επίσης είναι σημαντικός παράγοντας για την επιβίωση του βακτηρίου σε υδατικό περιβάλλον. Όλα αυτά ερμηνεύουν την κακή πρόγνωση των λοιμώξεων αυτών σε ασθενείς με κυστική ίνωση (Winn *et al*, 2006).

Καθοριστικός παράγοντας λοιμογονικότητας είναι το Type III Secretion System (TTSS) το οποίο ανευρίσκεται και σε άλλα Gram-αρνητικά βακτήρια όπως *Shigella*, *Salmonella* και *Yersinia spp.* (Galan and Collmer, 1999). Αποτελείται από περισσότερες των 20 πρωτεϊνών και αποτελεί το πολυπλοκότερο σύστημα έκκρισης πρωτεϊνών στα βακτήρια (Rosqvist *et al*, 1994). Μέσω αυτού του συστήματος η *P. aeruginosa* έχει την ικανότητα να παράγει και να εκκρίνει λοιμογόνους

παράγοντες απευθείας στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του ξενιστή. Το σύστημα αποτελείται από τρία ξεχωριστά τμήματα πρωτεϊνών: την ανεξάρτητη συσκευή έκκρισης, τη συσκευή στόχευσης ή μετατόπισης και τις δραστικές πρωτεΐνες. Η *P. aeruginosa* παράγει τέσσερις γνωστές δραστικές πρωτεΐνες μέσω του συστήματος TTSS: ExoS, ExoT, ExoU και ExoY. Οι επιμέρους πρωτεΐνες έχουν περιγραφεί και είναι πλέον γνωστό ότι τα ένζυμα ExoS και ExoT έχουν δράση ADP-ριβοζυλάσης (Frank, 1997, Frithz-Lindsten *et al*, 1997, Yahr *et al*, 1998), η ExoU είναι φωσφολιπάση και αποτελεί κυτταρολυτικό παράγοντα (Finck-Barbancon *et al*, 1997, Hauser *et al*, 1998) ενώ η ExoY έχει δράση αδενυλικής κυκλάσης (Yahr *et al*, 1998). Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες δεν απαντούν σε όλα τα στελέχη (Stover *et al*, 2000). Αν και τα γονίδια *exoT* και *exoY* είναι παρόντα σχεδόν σε όλα τα κλινικά στελέχη σε σημαντικό αριθμό υπάρχει έλλειψη στο *exoS* ή στο *exoU* (Feltman *et al*, 2001, Finck-Barbancon *et al*, 1997, Hauser *et al*, 1998). Επίσης σε στελέχη που απομονώνονται σε χρόνιες λοιμώξεις παρατηρείται καταστολή της έκφρασης του συστήματος TTSS (Roy-Burman *et al*, 2001).

Το σύστημα TTSS παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της λοίμωξης. Σε πειραματικά μοντέλα λοίμωξης από *P. aeruginosa* έχει αποδειχθεί ότι οι τοξίνες ExoS, ExoT και ExoU σχετίζονται με αυξημένη, παθογένεια και κυτταροτοξικότητα (Finck-Barbancon *et al*, 1997, Frank, 1997, Olson *et al*, 1999, Yahr *et al*, 1998), ενώ η ExoY δεν εμπλέκεται άμεσα στην κυτταροτοξικότητα (Yahr *et al*, 1998). Κλινικά στελέχη τα οποία εκκρίνουν τοξίνες μέσω του συστήματος TTSS συνδέονται με χειρότερη έκβαση της πνευμονίας σχετιζόμενης με αναπνευστήρα (Finck-Barbancon *et al*, 1997, Fleiszig *et al*, 1997), ενώ η έκκριση των τοξινών ExoS, ExoT ή ExoU σχετίζεται με εξαπλάσια θνητότητα (Roy-Burman *et al*, 2001).

Κλινικά στελέχη που εκκρίνουν ExoU *in vitro* είναι πιθανότερο να προκαλέσουν σοβαρή πνευμονία σε ασθενείς με μηχανικό αερισμό σε σχέση με στελέχη που δεν παράγουν το ένζυμο (Hauser *et al*, 2002). Η παρουσία της ExoU συσχετίζεται με οξεία κυτταροτοξικότητα και βλάβη στους πνεύμονες. Πειράματα έδειξαν ότι η εισαγωγή του γονιδίου *exoU* σε μη λοιμογόνα στελέχη *P. aeruginosa* παρέχει κυτταροτοξική ικανότητα. Πειράματα σε ποντίκια με οξεία πνευμονία και συστηματική λοίμωξη απέδειξαν ότι σε ανασυνδυασμένα στελέχη που απέκτησαν την ικανότητα να εκφράζουν ExoU αυξήθηκε αισθητά η λοιμογόνος δύναμη (Allewelt *et al*, 2000). Πειράματα σε ποντίκια με οξεία πνευμονική λοίμωξη από μεταλλαγμένα στελέχη *P. aeruginosa* που δεν παράγουν ούτε εκκρίνουν ExoU έδειξαν απώλεια της κυτταροτοξικότητας και μειωμένη λοιμογόνο δύναμη των στελεχών (Finck-Barbancon *et al*, 1997, Hauser *et al*, 1998). Η ριβοζυλοτρανσφεράση ExoS αναφέρεται ότι συμβάλλει στην προσκόλληση του βακτηρίου στα επιθηλιακά κύτταρα, στον αποπολυμερισμό των νηματίων ακτίνης και στην αποδιοργάνωση του κυτταροσκελετού (Ben Haj Khalifa *et al*, 2011). Επίσης αναφέρεται ότι η ExoS είναι ο παράγοντας που έχει συσχετισθεί με την ικανότητα της *P. aeruginosa* να διαπερνά τους επιθηλιακούς φραγμούς και να προκαλεί λοιμώξεις

οφειλόμενες σε αιματογενή διασπορά (Nicas *et al*, 1985). Έχει βρεθεί επίσης ότι η ExoS είναι ασθενής διεγέρτης επαγωγής της παραγωγής TNF-α (Epelman *et al*, 2000), καθώς επίσης έχει την ικανότητα να καταστρέφει τις ανοσοσφαιρίνες IgG και IgA (Ben Haj Khalifa *et al*, 2011).

Η εξωτοξίνη A αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους λοιμογόνους παράγοντες της *P. aeruginosa*. Παράγεται από το 90% των στελεχών και έχει δράση παρόμοια με τη διφθεριτική τοξίνη αν και οι δύο τοξίνες είναι αντιγονικά διάφορες. Η εξωτοξίνη A αναστέλλει την πρωτεινοσύνθεση μέσω αδρανοποίησης του παράγοντα επιμήκυνσης 2 (elongation factor 2-EF2). Είναι κυτταροτοξική *in vitro* και νεκρωτική *in vivo*.

Η *P. aeruginosa* παράγει επίσης ελαστάσες, LasA (πρωτεάση σερίνης) και LasB (μεταλλοπρωτεάση σερίνης) οι οποίες διασπούν την ελαστίνη προκαλώντας βλάβη στους ιστούς.

Άλλοι παράγοντες που συμβάλλουν στην τοξικότητα και στην παθεγενετικότητα της *P. aeruginosa* είναι η αλκαλική πρωτεάση, η φωσφολιπάση C το ραμνολιπίδιο, η κυτταροτοξίνη, η πυοκυανίνη, η πυοβερδίνη και ο σχηματισμός βιομεμβρανών.

Βιομεμβράνη: ο σχηματισμός βιομεμβράνης επιτρέπει την προσκόλληση των βακτηρίων στις επιφάνειες, την προστασία τους από τις αντιμικροβιακές ουσίες και το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού και ευνοεί την μεταξύ τους επικοινωνία (Harmsen *et al*, 2010). Στη βιομεμβράνη παρατηρείται το φαινόμενο Quorum sensing, δηλαδή της κυτταροκυτταρικής επικοινωνίας, που ρυθμίζεται μέσω 3 συστημάτων: των Las, Rhl και Pqs. Το Quorum sensing ρυθμίζει πολλά γονίδια στην ψευδομονάδα (Harmsen *et al*, 2010). Το σύστημα Las ρυθμίζει την παραγωγή παραγόντων που εμπλέκονται στην οξεία φλεγμονή και στην καταστροφή των κυττάρων του ξενιστή, όπως είναι η ελαστάση LasA, η ελαστάση LasB, η εξωτοξίνη A και η αλκαλική πρωτεάση. Το Rhl σύστημα ρυθμίζει την έκφραση πολλών γονιδίων συμπεριλαμβανομένων των υπεύθυνων για την παραγωγή των ραμνολιπιδίων και την καταστολή γονιδίων υπεύθυνων για τη συναρμολόγηση και τη λειτουργία του συστήματος TTS (Jimenez *et al*, 2012).

1.2.5 Κλινικές Εκδηλώσεις

Η *P. aeruginosa* είναι ένα ευκαιριακό παθογόνο μικρόβιο και προκαλεί λοιμώξεις κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Προδιαθεσικοί παράγοντες για την ανάπτυξη λοίμωξης είναι η ύπαρξη αιματολογικών κακοηθειών, εγκαύματα, χειρουργικές επεμβάσεις, καθετηριασμοί, παρακεντήσεις, ενδοφλέβιες εγχύσεις και η τραχειοτομία. Ιδιαίτερο κίνδυνο έχουν τα άτομα που πάσχουν από κυστική ίνωση καθώς μια τέτοια λοίμωξη μπορεί να τους οδηγήσει σε θάνατο. Σύμφωνα με το CDC (Center of Disease Control and Prevention) η *P. aeruginosa* αποτελεί το πέμπτο συχνότερο νοσοκομειακό παθογόνο βακτήριο που απομονώνεται, προκαλώντας το 9% των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων (Lister *et al*, 2009).

Οι λοιμώξεις που προκαλεί η *P. aeruginosa* είναι οι εξής:

Λοιμώξεις αναπνευστικού συστήματος: κυμαίνεται από απλό αποικισμό έως τραχειοβρογχίτιδα και βαριά νεκρωτική βρογχοπνευμονία. Άτομα που πάσχουν από κυστική ίνωση ή άλλες πνευμονοπάθειες καθώς και άτομα με μηχανικός αερισμό παρουσιάζουν συχνά αποικισμό από *P. aeruginosa* (Murray *et al*, 2005). Στην κυστική ίνωση προσβάλλει το βρογχοαναπνευστικό επιθήλιο σε χρόνο απροσδιόριστο, γιατί δεν απομονώνεται εύκολα με τις συνήθεις καλλιέργειες αναπνευστικών εκκρίσεων και όταν εμφανισθεί έχει τη τυπική μορφολογία αποικιών. Αποικίζει ταυτόχρονα και το γαστρεντερικό. Αποικίζει την επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού επί των οποίων αναπτύσσει την μικροαποικία του, από την οποία απελευθερώνονται πρωτεάσες με αποτέλεσμα καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης, απελευθέρωση μυκίνης και δημιουργία, μαζί με το πολυμερές σακχαρίδιο της ψευδομονάδας, μιας γέλης. Η γέλη αυτή προάγει τον περαιτέρω σχηματισμό μικροαποικιών και την παρεμπόδιση της κάθαρσης του επιθηλίου με τους κροσσούς του. Το βλεννοειδές, δηλαδή το mucoid, που αναπτύσσεται παρεμβαίνει επιπλέον στη φαγοκυττάρωση για την επιτυχία της οποίας χρειάζονται πλέον οψωνίζοντα αντισώματα.

Στο ορό του αίματος κυκλοφορούν αντιψευδομοναδικά αντισώματα και δημιουργούνται ανοσοσυμπλέγματα στα βρογχικά εκκρίματα τα οποία προκαλούν βλάβες τοπικά στο βρογχικό δένδρο. Λίγα από τα παιδιά με κυστική ίνωση επιζούν μέχρι την ενηλικίωση τους. Συνήθως πεθαίνουν από αναπνευστική λοίμωξη.

Η πνευμονία που σχετίζεται με αναπνευστήρα (VAP: Ventilator-associated pneumonia) αποτελεί ένα από τα συχνότερα προβλήματα στις μονάδες εντατικής θεραπείας (Koenig SM, Truwit JD, 2006).

Δερματικές λοιμώξεις: πρόκειται κυρίως για διαπύηση εγκαυματικών επιφανειών και σηψαιμία με υψηλή θνητότητα (77%). Το υγρό περιβάλλον του εγκαυματικού τραύματος, η υδατοθεραπεία, ο αποικισμός και η μειωμένη αντίσταση του εγκαύματος είναι οι παράγοντες που ευνοούν αυτή τη λοίμωξη (Tredget *EE et al*, 1992). Επίσης δεν είναι σπάνιες και οι διαπυήσεις τυχαίων ή χειρουργικών τραυμάτων.

Ουρολοιμώξεις: Αφορά κυρίως άτομα που φέρουν μόνιμο καθετήρα μετά από καθετηριασμό, κυστεοσκόπηση ή εγχείρηση ενώ στις ουρολοιμώξεις των παιδιών σπάνια αποτελεί το πρωταρχικό αίτιο αλλά βρίσκεται στα ούρα μετά από καθετηριασμό ή άλλη παρεμβατική αγωγή.

Ωτικές λοιμώξεις: προκαλεί συχνά εξωτερική ωτίτιδα και σε υγιή άτομα, με σημαντικότερο παράγοντα κινδύνου το κολύμπι (swimmer's ear-αυτί του κολυμβητή) και τη σοβαρότερη μορφή

αυτής που είναι η κακοήθης εξωτερική ωτίτιδα σε άτομα μεγάλης ηλικίας που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη (Δημητρακόπουλος, 1983). Ακόμη, προκαλεί χρόνια μέση ωτίτιδα και αποτελεί το δεύτερο αίτιο μετά το χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο που ανευρίσκεται σε ωτίτιδες πάσης μορφής. Ευνοϊκοί παράγοντες για την ανάπτυξη της θεωρούνται οι προηγηθείσες θεραπείες με αντιβιοτικά και οι επανειλημμένες προσβολές, οι ανατομικές ανωμαλίες του ωτός, η βλάβη του τυμπανικού υμένα και κυρίως η χρόνια μέση ωτίτιδα με έκκριμα. Ο παθογενετικός μηχανισμός της ψευδομοναδικής ωτίτιδας εστιάζεται στην προσκόλληση των ψευδομονάδων στα επιθηλιακά κύτταρα όπου πολλαπλασιάζεται και στις πρωτεάσες που διαχέονται από τις μικροαποϊκίες όπως η ελαστάση και η αλκαλική πρωτεάση οι οποίες διαλύουν τα κύτταρα. Το πιο ωτοτοξικό στοιχείο στην επιμονή της ψευδομοναδικής ωτίτιδας φαίνεται να είναι το λιποπολυσακχαριδικό αντιγόνο LPS το οποίο παραμένει στο αυτί παρα την επιτυχή αντιμικροβιακή θεραπεία. Το αντιγόνο αυτό συμβάλλει στην καταστροφή των αγγείων και την εξίδρωση ορού στην κοιλότητα χωρίς να παραβλάπεται η ευσταχιακή σάλπιγγα.

Οφθαλμικές λοιμώξεις: μπορεί να προκαλέσει οφθαλμία με τήξη του κερατοειδούς και καταστροφή του βολβού σε ασθενείς που τραυματίστηκαν ή χειρουργήθηκαν το μάτι. Κερατίτιδα και θυλακίτιδα εφόσον υπάρξει λύση της συνέχειας στην εξωτερική επιφάνεια του κερατοειδούς είτε από εξωτερικά αίτια είτε από νόσους του ματιού (Inslar *et al*, 1986). Οι φακοί επαφής θεωρούνται αίτια κερατίτιδας. Μειώνουν τη διακίνηση οξυγόνου και δημιουργώντας μια κατάσταση υποξίας που ευνοεί την εγκατάσταση μικροβίων που υπάρχουν στο φακό. Συχνές είναι και μολύνσεις των υγρών διατήρησης των φακών με υδρόφιλα μικρόβια του φυσικού περιβάλλοντος, όπως οι ψευδομονάδες.

Βακτηραιμία: Μπορεί να προκαλέσει θανατηφόρο σηψαιμία σε λευχαιμικούς και καρκινοπαθείς που βρίσκονται υπό ανοσοκατασταλτική θεραπεία και ενδοκαρδίτιδα σε τοξικομανείς και σε άτομα που έχουν υποβληθεί σε καρδιοχειρουργική επέμβαση (Mesaros *et al*, 2007, Shekar *et al*, 1985).

Λοιμώξεις ΚΝΣ: Μηνιγγίτιδα μετά από οσφυονωτιαία παρακέντηση ενώ στα νεογνά μπορεί να προκαλέσει πρωτοπαθή σηψαιμία, μηνιγγίτιδα και επιδημική διάρροια.

Λοιμώξεις οστών και αρθρώσεων: συμβαίνουν είτε μέσω άμεσου ενοφθαλμισμού είτε μέσω αιματογενούς διασποράς από την πρωτοπαθή λοίμωξη.

Λοιμώξεις γαστρεντερικού συστήματος: Τέτοιες λοιμώξεις προκαλούνται κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς μετά από εκτεταμένο αποικισμό. Έχει ενοχοποιηθεί επίσης για διαρροϊκό σύνδρομο σε νεογνά, περιπρωκτικές λοιμώξεις, νεκρωτική εντεροκολίτιδα και γαστρεντερίτιδα.

Ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις: Αποτελούν ιδιαίτερο κεφάλαιο στη μελέτη των λοιμώξεων από την *P. aeruginosa* και σχετίζονται με τη δυνατότητα επιβίωσης των μικροοργανισμών στο

ενδονοσοκομειακό περιβάλλον. Τα αντισηπτικά διαλύματα είναι πιθανή εστία αναπτύξεως της ψευδομονάδας και ως εκ τούτου πιθανή πηγή διασποράς αυτής στους ευπαθείς νοσηλευόμενους ασθενείς. Πολλές νοσοκομειακές λοιμώξεις και θανατηφόρες επιδημίες έγιναν στα νοσοκομεία από μόλυνση νοσηλευτικών υγρών, ενδοσκοπικών οργάνων, ενδαγγειακών γραμμών και άλλων υλικών με τη ψευδομονάδα. Ιδιαίτερα επικίνδυνoi θεωρούνται οι διυγραντήρες που προσαρμόζονται στους αναπνευστήρες παροχής οξυγόνου. Ο κίνδυνος ανάπτυξης πνευμονικής νόσου από ψευδομονάδα σε άτομα με κυστική ίνωση είναι ιδιαίτερα σοβαρός και συχνά η αιτία θανάτου. Τελευταία γίνονται αρκετές προσπάθειες ανάπτυξης αποτελεσματικού εμβολίου για τα άτομα αυτά, ωστόσο η αποτελεσματικότητα του *in vivo* είναι υπό διερεύνηση (Grimwood K *et al*, 2014). Στις ουρολογικές κλινικές αποτελεί τον πιο σημαντικό παράγοντα εξωγενών λοιμώξεων ασθενών με μόνιμο καθετήρα.

Προδιαθεσικοί παράγοντες για την ανάπτυξη ενδονοσοκομειακής λοίμωξης είναι η ύπαρξη αιματολογικών νοσημάτων, κακοθηριών και θεραπευτικών αγωγών που μειώνουν τη φυσική άμυνα του οργανισμού. Επίσης τοπικοί παράγοντες που μειώνουν την τοπική ακεραιότητα όπως οι καθετηριασμοί, οι παρακεντήσεις, οι ενδοφλέβιες εγχύσεις και η τραχειοτομία προδιαθέτουν για λοίμωξη.

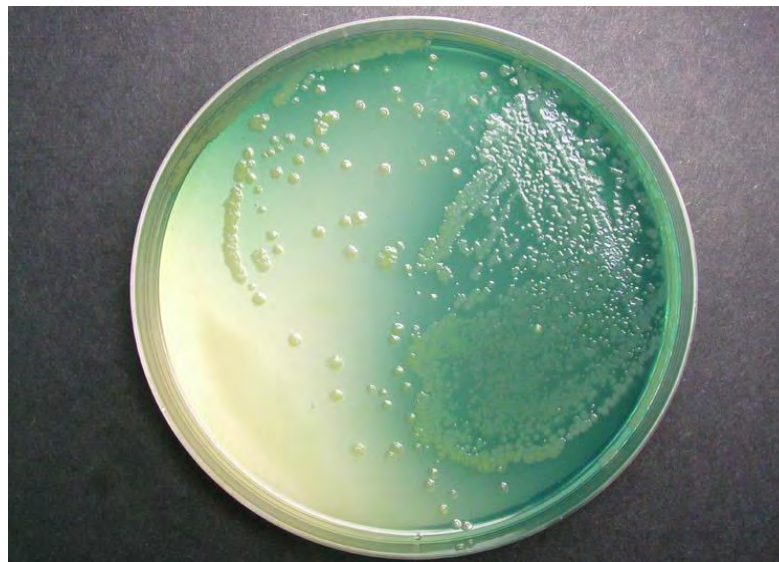
1.2.6 Εργαστηριακή Διάγνωση

Η διάγνωση των νόσων από *P. aeruginosa* προϋποθέτουν την καλλιέργεια, απομόνωση και ταυτοποίηση της ψευδομονάδας.

Η *P. aeruginosa* αναπτύσσεται εύκολα στα κοινά πεπτονούχα θρεπτικά υλικά όπως ο θρεπτικός ζωμός και το θρεπτικό άγαρ. Στο αιματούχο άγαρ μερικά στελέχη προκαλούν αιμόλυση. Αναπτύσσεται επίσης στα εκλεκτικά θρεπτικά υλικά των εντεροβακτηριακών όπως το MacConkey. Στο άγαρ οι αποικίες είναι γυαλιστερές, υδαρείς, κυκλικές, επηρμένες στο κέντρο σαν αυγά μάτια με κυματοειδή παρυφή και επιφάνεια στίλβουσα και με ιριδισμό στις νεαρές καλλιέργειες που όμως γρήγορα χάνεται. Ο ιριδισμός είναι μεταλλικός και είναι εντονότερος στις περιοχές διάχυτης ανάπτυξης όπου γρήγορα εμφανίζονται σημεία αυτόλυσης. Από τις αποικίες διαχέεται προς το θρεπτικό υλικό κυανοπράσινη χρωστική και στο άνοιγμα του τρυβλίου γίνεται αντιληπτή μια ευχάριστη αρωματική οσμή. Αντίθετα, στο MacConkey οι αποικίες είναι άχρες. Η μορφολογία των αποικιών δεν είναι παντοτε η τυπική. Έχουν διαχωρισθεί 6 μορφότυποι αποικιών όπως οι λείες, οι ξηρές, οι βλενώδεις, οι ζελατινώδεις, οι μικρές και άλλες. Οι βλενώδεις οφείλουν τη μορφή τους στην παραγωγή του mucoid.

Η *P. aeruginosa* παράγει μια γαλαζοπράσινη χρωστική, την πυοκυανίνη, η οποία είναι ορατή μόνο όταν ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται στο άγαρ. Πολλά στελέχη παράγουν παράλληλα μια πρασινίζουσα χρωστική την πυοβερδίνη. Κάποια στελέχη παράγουν μια κοκκινωπή, μη

καροτινοειδή χρωστική την πυορουμπίνη και κάποια μια καστανόμαυρη την πυομελανίνη. Υπάρχουν και στελέχη που δεν παράγουν καμία χρωστική.



Εικόνα 4: Αποικίες *Pseudomonas aeruginosa*

Η ταυτοποίηση του απομονωθέντος Gram-αρνητικού γίνεται από τους καλλιεργητικούς και βιοχημικούς χαρακτήρες της ψευδομονάδας. Η πρώτη δοκιμή εκτός της πυοκυανίνης είναι η δοκιμή της οξειδάσης. Γίνεται με ενστάλαξη του αντιδραστηρίου πάνω στις ύποπτες αποικίες. Οι υπόλοιπες ταυτοποιητικές δοκιμές είναι: κινητικότητα, χρώση βλεφαρίδας, οξειδάση της γλυκόζης, καταλάση, ινδόλη, MR,VP. Σημαντική βοήθεια για την ταυτοποίηση των ψευδομονάδων προσφέρουν τα συστήματα των έτοιμων βιοχημικών δοκιμών όπως το API-σύστημα ή το Micro-ID. Το api 20E (bioMerieux) αποτελεί ένα προτυποποιημένο σύστημα ταυτοποίησης για *Enterobacteriaceae* και άλλα μη απαιτητικά Gram αρνητικά βακτήρια που χρησιμοποιεί 21 βιοχημικές δοκιμασίες σε μικρογραφία και μια βάση δεδομένων (Smith *et al*, 1972). Επίσης, διάφορα αυτοματοποιημένα συστήματα ταυτοποίησης χρησιμοποιούνται πλέον στη ρουτίνα των κλινικών εργαστηρίων.

Οροδιαγνωστική: Αντισώματα προς τα κυτταρικά αντιγόνα της ψευδομονάδας βρίσκονται στο αίμα ατόμων πασχόντων από ενεργό νόσο ψευδομοναδική σε τίτλους αυξανόμενους κατά την εξέλιξη της λοίμωξης και ελαττούμενους κατά την αποδρομή. Ο προσδιορισμός του τίτλου των αντισωμάτων αυτών βοηθάει στην παρακολούθηση της πορείας της νόσου και της επιτυχίας ή μη της θεραπευτικής αγωγής. Οι προσδιορισμοί αυτοί έχουν ιδιαίτερη αξία στην παρακολούθηση της ψευδομοναδικής λοίμωξης στην κυστική ίνωση και σε άτομα προφυλακτικά εμβολιασθέντα. Τίτλοι των αντι-IgG και IgM προς λιποσακχαριδικά O-αντιγόνα και των διαφόρων O-οροτύπων

προσδιορίζονται. Εκτός των αντισωμάτων προς τα κυτταρικά αντιγόνα στον ορό των πασχόντων βρίσκονται και αντισώματα προς τις άλλες ουσίες που παράγει και εκκρίνει η ψευδομονάδα όπως είναι οι εξωτοξίνες, τα ένζυμα κλπ.

Διαγνωστική αξία φαίνεται να έχει η ανεύρεση αντισωμάτων προς τη λιπάση και προς την εξωτοξίνη A ιδιαίτερα σε περιπτώσεις αναπνευστικής λοίμωξης με ψευδομονάδα που δεν καλλιεργείται, δηλαδή στο πολύ αρχικό στάδιο, όταν οι ψευδομονάδες δεν έχουν γίνει βλενώδεις και δεν είναι άφθονες. Αντιψευδομοναδικά αντισώματα βρέθηκαν και σε υγιείς σε μικρό ποσοστό και σε χαμηλούς τίτλους συχνότερα προς τον ορότυπο 7. Για τον προσδιορισμό του τίτλου των αντισωμάτων χρησιμοποιούνται όλες σχεδόν οι γνωστές οροαντιδράσεις.

Διάφορες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την επιδημιολογική επιτήρηση της *P. aeruginosa*. Αυτές χωρίζονται σε δύο ομάδες, τις φαινοτυπικές και τις γονοτυπικές.

1.2.6.1 Φαινοτυπικές μέθοδοι

Βιοτυπία

Αναφέρεται στο σύνολο των μεταβολικών ιδιοτήτων που εκφράζονται από ένα στέλεχος και περιλαμβάνουν βιοχημικές αντιδράσεις, μορφολογία αποικιών, παραγωγή χρωστικών και περιβαλλοντικές αντιδράσεις. Ωστόσο ο βιότυπος υπόκειται σε αλλαγές κατά τη διάρκεια της εξέλιξης μιας επιδημίας (Murray *et al*, 2005).

Λυσιτυπία

Τα περισσότερα στελέχη που απομονώνονται στα νοσοκομεία λύνονται από βακτηριοφάγους. Με τη χρήση ορισμένων λυτικών βακτηριοφάγων που ο καθένας έχει ειδικότητα διαφορετική προς τα στελέχη των ψευδομονάδων μπορεί να γίνει διαχωρισμός των στελεχών σε λυσιτύπους. Ο διαχωρισμός αυτός χρησιμεύει για μελέτες επιδημιολογικές της διασποράς της ψευδομονάδας στο νοσοκομείο και χρησιμοποιήθηκε στο παρελθόν για στελέχη που δεν είχαν τυποποιηθεί με οροτυπία. Η πρότυπος τεχνική της λυσιτυπίας είναι ανάλογη με την τεχνική της λυσιτυπίας των σταφυλοκόκκων και τα στελέχη των βακτηριοφάγων που χρησιμοποιούνταν ήταν περίπου 25.

Πρωτεινοτυπία

Γίνεται με ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης του μικροβιακού κυττάρου.

Πυοσινοτυπία

Τα διάφορα στελέχη *P. aeruginosa* παράγουν πυοσίνες δηλαδή βακτηριοσίνες. Οι βακτηριοσίνες αυτές είναι αντιβιοτικές ουσίες που παραγονται από τα στελέχη αυτά και διαφέρουν

από τα κλασικά αντιβιοτικά στο ότι η θανατηφόρος δράση περιορίζεται σε άλλα στελεχη του ίδιου ή στενώς συγγενεύοντος είδους. Οι πυοσίνες πρωτοπεριγράφησαν από το Jacob το 1954 και μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κύριες ομάδες ανάλογα με το μοριακό τους βάρος (S-πυοσίνες και R-πυοσίνες). Ένα στέλεχος μπορεί να παράγει περισσότερες από μία πυοσίνες. Βάσει της ευαισθησίας σε αυτές τις πυοσίνες έχει διαμορφωθεί σχήμα πυοσινοτυπίας με τη χρήση προτύπων στελεχών-δεικτών ευαίσθητων το κάθε ένα σε διαφορετική πυοσίνη. Πιο πρακτική είναι η μέθοδος των Fyfe *et al.* Συνήθως χρησιμοποιούνται 8 δείκτες όπως είναι και 4-5 υπότυποι αυτών. Η ανάγνωση του αποτελέσματος γίνεται βάσει ειδικών πινάκων όπως αυτός των Gilles και Cowan.

Φαινότυπος αντοχής σε αντιμικροβιακά φάρμακα

Πρόκειται για τον έλεγχο ευαισθησίας-αντοχής στα αντιβιοτικά. Τα στελέχη που απομονώνονται ταξινομούνται σύμφωνα με το φαινότυπο αντοχής στα διάφορα αντιβιοτικά.

Οροτυπία

Γίνεται με τη χρήση ειδικών αντιορών προς τα O-αντιγόνα, οροί συγκολλητικοί για τους 17 O τύπους και τους τρεις υποτύπους. Η συγκολλητινοαντίδραση μπορεί να γίνει πάνω σε πλάκα σαν ταχεία συγκολλητινοαντίδραση αλλά μπορεί να γίνει και σε σωληνάρια. Οροτυπία γίνεται και με μοριακές μεθόδους όπως με τη μέθοδο ηλεκτροφορήσεως των πολυθεσικών ενζυμικών γόνων (Charnock *et al*,1992).

1.2.6.2 Γονοτυπικές μέθοδοι

Πλασμιδοτυπία

Τα πλασμίδια είναι εξωχρωμοσωμικά στοιχεία που φέρουν πληροφορίες εκτός του χρωμοσωμικού γονότυπου. Αποκτώνται με διάφορους μηχανισμούς και ενώ κληρονομούνται σταθερά στα θυγατρικά κύτταρα μπορεί να χαθούν διότι δεν είναι απαραίτητα για τη βιωσιμότητα του κυττάρου. Γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης υλικού που προκύπτει από τη λύση των μικροβιακών κυττάρων καλλιέργηματος της ψευδομονάδας. Η λύση γίνεται με SDS και Tris/HCL σε πολύ αλκαλικό περιβάλλον pH(μέθοδος Kado και Li). Η παρουσία πλασμιδίων στο ηλεκτροφόρημα διαβάζεται από την εμφάνιση ταινιών. Τα ηλεκτροφορήματα όλων των επιδημικών στελεχών θα παρουσιάσουν τη ίδια εικόνα.

Ριβοτυπία

Η ριβοτυπία βασίζεται στις διαφορές που υπάρχουν στην ακολουθία του ριβοσωμικού RNA (rRNA) μεταξύ των διαφορετικών ειδών και πρωτοπεριγράφηκε στα μέσα της δεκαετίας του 80 (Sambrook and Maniatis, 1989). Το γονίδιο αυτό είναι καλά συντηρημένο σε όλους τους προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς και συνεπώς ο χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής έχει ευρεία εφαρμογή. Ωστόσο, είναι μια τεχνική επίπονη και για την *P. aeruginosa* η ευαισθησία και η ειδικότητα της δεν έχει αποδειχθεί.

RAPD PCR-Random Amplified Polymorphic DNA PCR

Η τεχνική τυχαία ενισχυμένων πολυμορφικών τμημάτων DNA (RAPD) βασίζεται στην παράλληλη ενίσχυση μιας ομάδας τμημάτων DNA με τη χρήση τυχαίων εκκινητών (συνήθως 10 βάσεων) που στοχεύουν σε διάφορες γενωμικές αλληλουχίες. Η ενίσχυση διεξάγεται σε χαμηλή θερμοκρασία υβριδοποίησης, η οποία επιτρέπει τη μη αυστηρή, βάσει του κανόνα της συμπληρωματικότητας, υβριδοποίηση των χρησιμοποιούμενων εκκινητών. Όταν η απόσταση μεταξύ δύο θέσεων δέσμησης των εκκινητών στις δύο αλυσίδες του DNA είναι μεταξύ 0,1 έως 3 kb, παράγεται ένα αμπλικόνιο που καλύπτει την αλληλουχία μεταξύ των δύο αυτών θέσεων δέσμησης. Έτσι, ο αριθμός και οι θέσεις δέσμησης των εκκινητών είναι μοναδικές για ένα συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος. Τα παραχθέντα αμπλικόνια της RAPD δύναται να αναλυθούν είτε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είτε με αλληλούχιση του DNA, ανάλογα με την σήμανση των εκκινητικών μορίων με κατάλληλες φθορίζουσες ουσίες.

Ωστόσο, αν και η RAPD χαρακτηρίζεται από μικρότερη διακριτική ικανότητα σε σχέση με την PFGE, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την τυποποίηση των βακτηριακών στελεχών σε περιπτώσεις επιδημικών εξάρσεων, επειδή είναι απλή, φθηνή, ταχεία και εύκολη στη χρήση της μέθοδος (Chang *et al*, 2009, Lanini *et al*, 2011). Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου RAPD είναι η χαμηλή ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα της, δεδομένου ότι χρησιμοποιούνται πολύ χαμηλές θερμοκρασίες υβριδοποίησης. Τέλος, η RAPD στερείται διεργαστηριακής επαναληψιμότητας, δεδομένου ότι είναι ευαίσθητη ακόμα και σε λεπτές διαφορές στα αντιδραστήρια, τα πρωτόκολλα και τα χρησιμοποιούμενα μηχανήματα.

Rep-PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επαναλαμβανόμενων στοιχείων (rep-PCR) βασίζεται στα ηλεκτροφορητικά μοτίβα μετά την ενίσχυση συγκεκριμένων γονιδιωματικών αλληλουχιών ώστε να τυποποιηθούν τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη. Συγκεκριμένα, στις rep-PCR μεθόδους χρησιμοποιούνται εκκινητές που υβριδοποιούνται με μη κωδικεύουσες διαγονιδιακές

επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, οι οποίες βρίσκονται διάσπαρτες σε ολόκληρο το γονιδίωμα των βακτηρίων. Έτσι, ενισχύονται, χρησιμοποιώντας την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, οι περιοχές του γονιδιώματος μεταξύ αυτών των γειτονικών επαναλαμβανόμενων στοιχείων με αποτέλεσμα την παραγωγή πολλαπλών αμπλικονίων, ανάλογα με την κατανομή των εν λόγω επαναλαμβανόμενων στοιχείων σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Τα μεγέθη αυτών των αμπλικονίων στη συνέχεια χαρακτηρίζονται ηλεκτροφορητικά και τα ηλεκτροφορητικά μοτίβα μεταξύ των βακτηριακών στελεχών συγκρίνονται ώστε να προσδιοριστεί η γενετική συγγένεια των συγκεκριμένων στελεχών.

Πολλές οικογένειες επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του βακτηριακού γονιδιώματος έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την τυποποίηση με *rep*-PCR, όπως για παράδειγμα οι συντηρημένες επαναλαμβανόμενες διαγονιδιακές αλληλουχίες της οικογένειας των *Enterobacteriaceae* (enterobacterial repetitive intergenic consensus, ERIC-PCR), οι επαναλαμβανόμενες εξωγονιδιακές παλίνδρομες αλληλουχίες (repetitive extragenic palindromic, REP-PCR) και τις αλληλουχίες BOX (BOX-PCR) (Versalovic *et al*, 1994).

Ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE-Pulse Field Gel Electrophoresis).

Η ηλεκτροφόρηση σε γέλη υπό την επίδραση παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου (PFGE) έχει θεωρηθεί ως το «χρυσό πρότυπο» μεταξύ των μοριακών μεθόδων τυποποίησης για μία πλειάδα κλινικά σημαντικών βακτηριακών ειδών. Για τα περισσότερα βακτηριακά είδη, η εν λόγω τεχνική υιοθετήθηκε ως εργαλείο επιδημιολογικής επιτήρησης στη δεκαετία του 1990 (Arbeit *et al*, 1999, Prévost *et al*, 1991, Gordillo *et al*, 1993, Tenover *et al*, 1995). Σήμερα, εξακολουθεί να είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη προσέγγιση για την διερεύνηση βακτηριακών στελεχών σε επιδημίες (Tosh *et al*, 2011, Yu *et al*, 2012). Για πολλά χρόνια, η PFGE υπήρξε το πρωταρχικό εργαλείο τυποποίησης για την διερεύνηση της μετάδοσης από νοσοκομείο σε νοσοκομείο παθογόνων στελεχών, ενώ έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε μεγάλης κλίμακας επιδημιολογικές μελέτες (McDougal *et al*, 2003). Η PFGE είναι μια σχετικά φθηνή προσέγγιση με την επιτυχία της να οφείλεται στην εξαιρετική διακριτική της ικανότητα και στην ενδοεργαστηριακή της επαναληψιμότητα. Κατά την τελευταία δεκαετία, τα πρωτόκολλα για την PFGE έχουν προτυποποιηθεί ενώ κατέστησαν δυνατές και οι διεργαστηριακές συγκρίσεις μέσω πρωτοβουλιών, όπως το PulseNet ή το Harmony (Swaminathan *et al*, 2001, Murchan *et al*, 2003). Επίσης κατεστεί δυνατό να δημιουργηθούν διεθνείς βάσεις αποτυπωμάτων, γεγονός που επέτρεψε τον γρήγορο εντοπισμό νεοεμφανιζόμενων κλώνων και την παρακολούθηση της εξάπλωσης των παθογόνων βακτηριακών στελεχών σε διαφορετικές περιοχές ή χώρες.

Για τη διενέργεια της PFGE, ένα εξαιρετικά καθαρισμένο γενωμικό δείγμα DNA διασπάται με μία ενδονουκλεάση περιορισμού που αναγνωρίζει σπάνια εμφανιζόμενες θέσεις

περιορισμού στο γονιδίωμα των αντίστοιχων βακτηριακών ειδών. Τα προκύπτοντα θραύσματα περιορισμού, τα οποία κατά βάση είναι μεγάλα, μπορούν να διακριθούν σε ένα πήκτωμα αγαρόζης με ηλεκτροφόρηση υπό παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίου, κατά την οποία ο προσανατολισμός του ηλεκτρικού πεδίου κατά μήκος του πήκτωματος μεταβάλλεται περιοδικά. Τα διαχωρισμένα θραύσματα DNA μπορούν να απεικονιστούν στο πήκτωμα ως ζωνώσεις, οι οποίες σχηματίζουν ένα συγκεκριμένο ηλεκτροφορητικό μοτίβο επί της γέλης, το PFGE μοτίβο. Για τα περισσότερα βακτηριακά είδη η PFGE δύναται να παράγει θραύσματα με μεγέθη που κυμαίνονται από περίπου 30 kb έως πάνω από 1 Mb (Goering, 2010). Τα εν λόγω θραύσματα περιορισμού έτσι διαχωρίζονται με ένα γενοεξαρτώμενο τρόπο και η μέθοδος αποδίδει σχετικά λίγες ζώνες στη γέλη, πράγμα που καθιστά την ανάλυση των αποτελεσμάτων ευκολότερη. Ένα σαφές πλεονέκτημα της PFGE είναι ότι λαμβάνει υπόψη ένα μεγάλο τμήμα του γονιδιώματος (>90%). Συνεπώς, οι ενθέσεις ή οι ελλείψεις κινητών γενετικών στοιχείων, καθώς και τα μεγάλα γεγονότα ανασυνδυασμού εντός του γονιδιωματικού DNA οδηγούν σε αλλαγές στα ηλεκτροφορητικά μοτίβα της PFGE. Συνήθως, το πλασμιδιακό DNA δεν παρεμβαίνει στα ηλεκτροφορητικά προφίλ του χρωμοσωμικού DNA, καθώς τα θραύσματα που δημιουργούνται με την κατάτμηση του πλασμιδίου DNA είναι πολύ μικρά για να επηρεάσουν το ηλεκτροφορητικό προφίλ.

Η ερμηνεία της PFGE γίνεται βάσει των κριτηρίων του Tenover που περιγράφησαν το 1995. Σύμφωνα με τα κριτήρια αυτά τρία ή περισσότερα γενετικά συμβάντα καθώς και επτά ή περισσότερες διαφορές στον αριθμό των θραυσμάτων περιορισμού δύο στελεχών, κατατάσσουν τα στελέχη σε διαφορετικούς κλώνους (Tenover *et al*, 1995).

Πολυτοπική νουκλεοτιδική ανάλυση-MLST (Multilocus Sequence Typing)

Η τυποποίηση πολυτοπικής αλληλούχισης (MLST) επινοήθηκε για να ξεπεραστεί η ελλιπής ή η μερική συγκρισιμότητα των προαναφερθέντων μεθόδων μεταξύ των διαφόρων εργαστηρίων. Το πρώτο σήμα της MLST αναπτύχθηκε το 1998 για τη *Neisseria meningitidis*, ενώ λίγο αργότερα, η εν λόγω μέθοδος επεκτάθηκε σε άλλα βακτηριακά είδη και με την πάροδο του χρόνου, έχει γίνει ένα πολύ δημοφιλές εργαλείο για παγκόσμιες επιδημιολογικές μελέτες, καθώς και για μελέτες σχετικά με την μοριακή εξέλιξη των παθογόνων (Maiden *et al*, 1998, Urwin & Maiden, 2003). Σύμφωνα με τη MLST, οι εσωτερικές αλληλουχίες (κατά προσέγγιση 300 έως 700 bp) ως επί το πλείστον επτά γονιδίων “οικιακής οικονομίας” για κάθε βακτηριακό είδος ενισχύονται με PCR και εν συνεχεία προσδιορίζεται η αλληλουχία των εν λόγω προϊόντων ενίσχυσης. Για κάθε γονίδιο, σε έκαστη μοναδική αλληλουχία (αλληλόμορφο) αποδίδεται ένας αριθμός και με βάση το συνδυασμό των αριθμών των επτά γονιδίων (αλληλικό προφίλ), προσδιορίζεται ο τύπος της αλληλουχίας (ST), στον οποίο ανήκει κάθε βακτηριακό στέλεχος.

Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της MLST είναι ότι χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερη επαναληψιμότητα και ότι όλα τα δεδομένα που παράγονται με αυτή τη μέθοδο είναι συγκρίσιμα

ενδοεργαστηριακά και διαεργαστηριακά καθώς βασίζονται σε μια διεθνώς καθιερωμένη ονοματολογία. Επιπλέον, οι αλληλουχίες των αλληλομόρφων και προφίλ των διαφόρων STs είναι διαθέσιμα σε μεγάλες κεντρικές βάσεις δεδομένων (www.pubmlst.org, www.mlst.net και <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/>) προσβάσιμες μέσω του διαδικτύου. Αυτές οι βάσεις δεδομένων παρέχουν επίσης on-line λογισμικό (eBURST) για τον προσδιορισμό της γενετικής συγγένειας μεταξύ βακτηριακών στελεχών μέσα σε ένα είδος, καθώς και πληροφορίες για την προέλευση των στελεχών του κάθε ST που έχουν απομονωθεί από κάθε χώρα παράλληλα με τις λεπτομέρειες αυτών των στελεχών.

Στην περίπτωση της *P. aeruginosa* βασίζεται στη εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας επτά γονιδίων (housekeeping genes):

acsA (Acetyl coenzyme A synthetase)

aroE (Shikimate dehydrogenase)

guaA (GMP synthase)

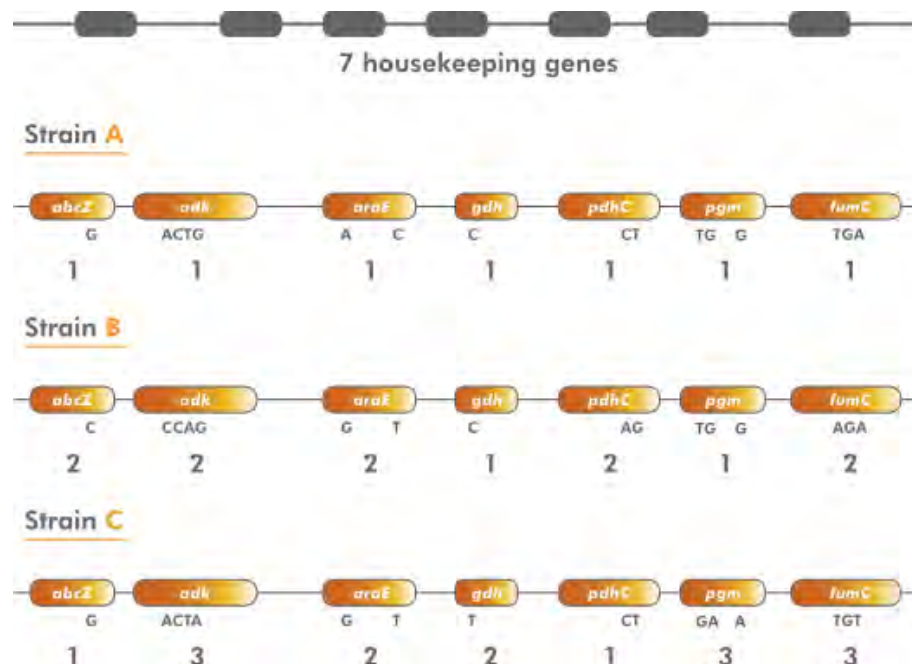
mutL (DNA mismatch repair protein)

nuoD (NADH dehydrogenase I chain C,D)

ppsA (Phosphoenolpyruvate synthase)

trpE (Anthralite synthetase component I)

Τα γονίδια αυτά είναι παρόντα σε όλα τα βακτηριακά γονιδιώματα, αφού είναι υπεύθυνα για ζωτικές για το κύτταρο λειτουργίες.



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση τυποποίησης πολυτοπικής αλληλούχησης (MLST)

1.2.7 Αντιμικροβιακοί Παράγοντες δραστικοί έναντι της *P. aeruginosa*

Η θεραπεία των λοιμώξεων από *P. aeruginosa* αποτελεί σοβαρό πρόβλημα για τους λοιμωξιολόγους, καθώς το βακτήριο προσβάλλει κυρίως ανοσοκατεσταλμένα άτομα και διαθέτει ποικιλία λοιμογόνων παραγόντων και μηχανισμών αντοχής σε διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες.

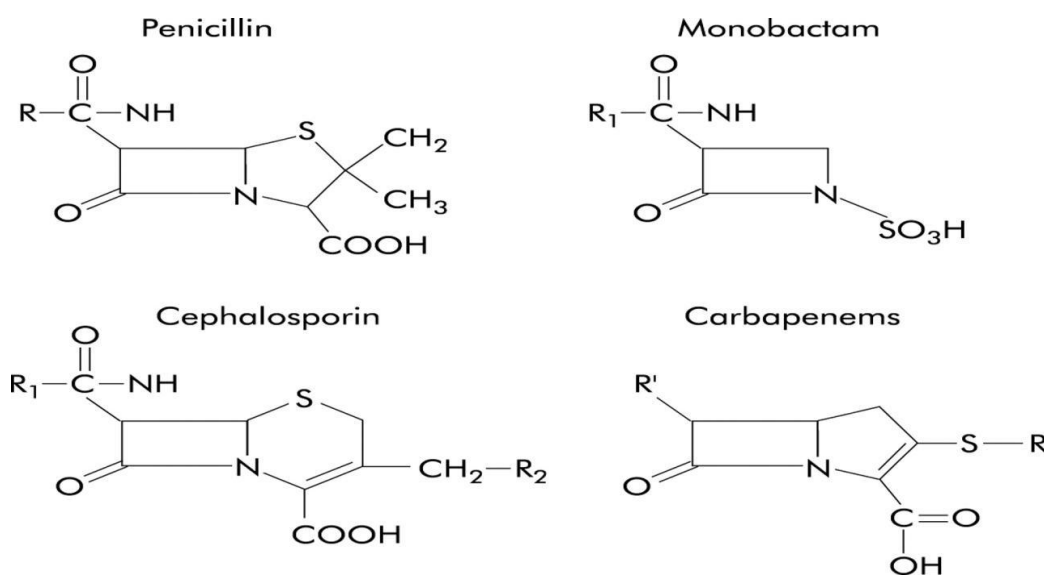
Τα αντιβιοτικά με αντιψευδομοναδική δράση ανήκουν στις β-λακτάμες, στις αμινογλυκοσίδες, στις κινολόνες και στις πολυμυξίνες.

1.2.7.1 Β-λακταμικά αντιβιοτικά

Γενικά

Τα αντιβιοτικά β-λακτάμης διαθέτουν ένα τετραμελή β-λακταμικό δακτύλιο που περιέχει άζωτο και παρεμβαίνουν στη σύνθεση του βακτηριακού τοιχώματος, αναστέλλοντας κυρίως τις

σταυρο-συνδέσεις των πλάγιων πεπτιδικών αλυσίδων του κυτταρικού τοιχώματος. Οι β-λακτάμες είναι κυρίως βακτηριοκτόνες με χρονοεξαρτώμενη δράση και οι περισσότερες εξ' αυτών αποβάλλονται αναλλοίωτες στα ούρα, γεγονός που τις καθιστά κατάλληλες για τη θεραπεία ουρολοιμώξεων. Έχουν μεγάλο θεραπευτικό δείκτη, με κύρια ανεπιθύμητη ενέργεια τις αλλεργικές αντιδράσεις, η πιο συχνή από τις οποίες είναι το ερυθρηματώδες κηλιδοβλατιδώδες εξάνθημα με κνησμό. Ωστόσο σπάνια προκαλούν αναφυλαξία και θεωρούνται ασφαλείς για χρήση κατά την εγκυμοσύνη. Περιλαμβάνουν τέσσερις υποκατηγορίες (Εικόνα 6): i) τις πενικιλίνες, ii) τις κεφαλοσπορίνες, iii) τις καρβαπενέμες και iv) τις μονοβακτάμες (Page *et al*, 2005).



Εικόνα 6: Βασική χημική δομή των τεσσάρων κύριων κατηγοριών αντιβιοτικών β-λακτάμης. Τα R, R', R1 και R2 δείχνουν τα σημεία όπου μπορούν να γίνουν χημικές υποκαταστάσεις για τη δημιουργία των διαφόρων φαρμάκων (Parmar & Nasser, 2005)

Αντιψευδομοναδικά β-λακταμικά αντιβιοτικά

Αντιψευδομοναδικές πενικιλίνες

Διακρίνουμε δύο ομάδες, τις καρβοξυπενικιλίνες που περιλαμβάνουν την καρμπενικιλίνη και την τικαρσιλλίνη και τις ουρεϊδοπενικιλίνες που περιλαμβάνουν τη μεζλοκιλλίνη, την αζλοκιλλίνη και την πιπερακιλλίνη.

Αντιψευδομοναδικές κεφαλοσπορίνες

Υπάρχουν τρεις ομάδες κεφαλοσπορινών με αντιψευδομοναδική δράση: οι κεφαλοσπορίνες 3^{ης} γενιάς όπως η κεφαζιδίμη, η κεφοπεραζόνη και η κεφσουλοδίνη, οι κεφαλοσπορίνες 4^{ης} γενιάς όπως η κεφεπίμη και η κεφπιρόμη και οι κατεχολικές κεφαλοσπορίνες οι οποίες εισέρχονται στο κύτταρο διαμέσου συστήματος μεταφοράς σιδήρου που όμως δεν έχουν χρησιμοποιηθεί στην κλινική πράξη (Giamarellou H and Antoniadou A, 2001).

Μονοβακτάμες

Στην κατηγορία αυτή ανήκει η αζτρεονάμη που είναι 2 φορές λιγότερο δραστική από την κεφαζιδίμη και αποτελεί ήπιο επαγωγέα χρωμοσωμικών β-λακταμασών. Χορηγείται εναλλακτικά σε ασθενείς με αλλεργία στις β-λακτάμες (Giamarellou H and Antoniadou A, 2001).

Καρβαπενέμες

Οι καρβαπενέμες αποτελούνται από ένα β-λακταμικό δακτύλιο συμπυκνωμένο με ένα πενταμελή πενεμικό δακτύλιο. Οι καρβαπενέμες που κυκλοφορούν σήμερα είναι η ερταπενέμη, η ιμιπενέμη, η μεροπενέμη και η δοριπενέμη. Είναι ανθεκτικές στις περισσότερες β-λακταμάσες και έχουν το ευρύτερο αντιμικροβιακό φάσμα από όλα τα διαθέσιμα μέχρι σήμερα αντιβιοτικά. Αναλυτικότερα, είναι δραστικές έναντι των στρεπτόκοκκων, των σταφυλοκόκκων, των εντεροβακτηριοειδών, των αζυμωτικών Gram αρνητικών (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, κ.α), των ειδών του γένους *Haemophilus* και των αναερόβιων βακτηρίων συμπεριλαμβανομένου του *Bacteroides fragilis*. Οι καρβαπενέμες είναι δραστικές έναντι πολλών στελεχών του *Enterococcus faecalis* αλλά όχι έναντι των άλλων ειδών του γένους *Enterococcus*. Όπως και οι κεφαλοσπορίνες είναι αδρανείς έναντι της *L. monocytogenes* και των ανθεκτικών στη μεθικιλίνη σταφυλοκόκκων (MRSA).

Η ιμιπενέμη διασπάται στους νεφρούς από μια ανθρώπινη β-λακταμάση, τη δεϋδροπεπτιδάση-1 σε ένα νεφροτοξικό μεταβολίτη. Για αυτό χρησιμοποιείται πάντα μαζί με το φάρμακο σιλαστατίνη, η οποία είναι εκλεκτικός αναστολέας της νεφρικής β-λακταμάσης. Το εμπορικό σκεύασμα περιέχει καθορισμένη αναλογία ιμιπενέμης/σιλαστατίνης. Η μεροπενέμη, αντιθέτως, δε διασπάται από τη νεφρική δεϋδροπεπτιδάση και δεν απαιτεί τη συγχορήγηση σιλαστατίνης. Η ιμιπενέμη δύναται να προκαλέσει επιληπτικές κρίσεις σε επιληπτικούς ασθενείς, ειδικά αν συνυπάρχει νεφρική ανεπάρκεια.

Οι καρβαπενέμες χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία των λοιμώξεων από βακτήρια ανθεκτικά σε άλλα αντιβιοτικά. Επίσης, εξαιτίας του ευρέως αντιμικροβιακού φάσματος τους, χορηγούνται σε

πολυμικροβιακές λοιμώξεις, αντί να χρησιμοποιηθούν δυο ή περισσότερα διαφορετικά αντιβιοτικά (Page *et al*, 2005).

1.2.7.2. Αμινογλυκοσίδες και ψευδομονάδα

Έχουν ταχεία και εξαιρετική βακτηριοκτόνο δράση και χρησιμοποιούνται συχνά σε απειλητικές για τη ζωή νοσοκομειακές λοιμώξεις στις μονάδες εντατικής θεραπείας. Παρουσιάζουν συνέργεια με πενικιλίνες και κεφαλοσπορίνες *in vitro* και *in vivo*. Ωστόσο έχουν και σημαντικές παρενέργειες όπως νεφροτοξικότητα, ωτοτοξικότητα, νευρομυϊκός αποκλεισμός, φτωχή κινητικότητα στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, σε τμήματα του οφθαλμού και στον προστάτη.

1.2.7.3 Κινολόνες και ψευδομονάδα

Η σιπροφλοξασίνη φαίνεται να είναι η πιο δραστική έναντι της *Pseudomonas aeruginosa*. Μεταξύ των νεότερων κινολονών (λεβοφλοξασίνη, λομεφλοξασίνη, ρουφλοξασίνη, γκρεπαφλοξασίνη, μοξιφλοξασίνη, γκατιφλοξασίνη, σπαρφλοξασίνη, κλιναφλοξασίνη και τροαφλοξασίνη) μόνο οι δυο τελευταίες έχουν αντιψευδομοναδική δράση.

1.2.7.4 Πολυμυξίνες και ψευδομονάδα

Οι πολυμυξίνες είναι μια ομάδα πολυπεπτιδικών αντιβιοτικών που περιλαμβάνει πέντε διαφορετικές χημικές ενώσεις (A-E). Στην κλινική πράξη έχουν χρησιμοποιηθεί η πολυμυξίνη Β και Ε (κολιστίνη). Η κολιστίνη έχει εξαιρετική βακτηριοκτόνο δράση έναντι της *P. aeruginosa*.

1.2.7.5 Φωσφομυκίνη και ψευδομονάδα

Η φωσφομυκίνη είναι βακτηριοστατικό αντιβιοτικό, έχει δράση ευρέως φάσματος και εμφανίζει μικρότερα ποσοστά αντοχής συγκρινόμενο με τα άλλα αντιβιοτικά. Πρόσφατα, λόγω της εμφάνισης των πολυανθεκτικών στελεχών άρχισε να χρησιμοποιείται ως εναλλακτική θεραπεία για την αντιμετώπιση λοιμώξεων από Gram αρνητικά βακτήρια.

1.2.8 Φυσική αντοχή

Η *P. aeruginosa* παρουσιάζει ενδογενώς αντοχή σε πολλά αντιβιοτικά και τα περισσότερα στελέχη του ίδιου είδους (wild type) εκφράζουν μια μειωμένη ευαισθησία στα περισσότερα αντιβιοτικά συγκρινόμενα με τα άλλα Gram-αρνητικά βακτήρια. Αυτό οφείλεται κυρίως στη χαμηλή διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης η οποία είναι 12-100 φορές μικρότερη από αυτή του

E.coli αλλά και σε ιδιοσυστασιακά συστήματα εξώθησης καθώς και σε παραγωγή ενζύμων (Hancock, 1998). Τελευταίες μελέτες υποστηρίζουν την ύπαρξη πολλών μεταλλάξεων σε γονίδια που συμμετέχουν στην ενδογενή αντοχή της *P. aeruginosa* (Breidenstein *et al*, 2011).

1.2.8.1. Ελαττωμένη κυτταρική διαπερατότητα

Η διέλευση του αντιβιοτικού διαμέσου του κυτταρικού τοιχώματος είναι το απαραίτητο βήμα για να φθάσει αυτό στο στόχο του. Η λειτουργία αυτή είναι ευκολότερη προκειμένου για τα Gram θετικά και δυσκολότερη για τα Gram αρνητικά που περιβάλλονται από δύο μεμβράνες, μία εσωτερική και μία εξωτερική. Οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης των Gram αρνητικών αποτελούν φυσικό φραγμό. Το ιοντικό φορτίο και η υδροφοβία είναι παράγοντες που διευκολύνουν ή επιβραδύνουν ή εμποδίζουν τη διέλευση των αντιβιοτικών διαμέσου του πρωτεϊνικού φράγματος (πορίνες). Το μέγεθος του μορίου του αντιβιοτικού παίζει ουσιαστικό ρόλο.

Αλλαγές στη δομή της εξωτερικής μεμβράνης επηρεάζουν το ρυθμό διέλευσης του αντιβιοτικού και ως εκ τούτου και το βαθμό ευαισθησίας του μικροβίου προς αυτό.

Η κύρια πορίνη της *P. aeruginosa* είναι η OprF και βοηθητικές πορίνες οι OprB, OprC, OprE, OprD (Bellido *et al*, 1992, Nkaido *et al*, 1991). Η πορίνη OprF βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη και αποτελεί μία μη αποδοτική οδό για την είσοδο των αντιβιοτικών στο κύτταρο. Η OprD είναι ειδική για την είσοδο των καρβαπενεμών στο βακτήριο καθώς διαθέτει υποδοχέα για ένα βασικό τους αμινοξύ (Trias and Nkaido, 1990)

1.2.8.2. Ιδιοσυστασιακά συστήματα εξώθησης (efflux pumps)

Υδρόφοβες ουσίες και αμφιπαθητικά μόρια, όπως οι φλουοροκινολόνες, β-λακτάμες, αναστολείς των β-λακταμασών, τετρακυκλίνη, χλωραμφενικόλη, μακρολίδες, τριμεθοπρίμη, νοβοβοκίνη, ερυθρομυκίνη, αμινογλυκοσίδες και σουλφοναμίδες έχουν τη δυνατότητα να διαπερνούν ικανοποιητικά την εξωτερική μεμβράνη της *P.aeruginosa* (Poole, 2001). Η αντοχή του βακτηρίου στα ανωτέρω πλην των: μεροπενέμη, αντιψευδομοναδικές πενικιλίνες, νεότερες αμινογλυκοσίδες και οξυμινοκεφαλοσπορίνες οφείλεται σε ενεργητικά ιδιοσυστασιακά συστήματα εξώθησης (multidrug efflux system) (Hancock, 1998, Schweizer, 2003). Στην *P.aeruginosa* έχουν περιγραφεί δύο ιδιοσυστασιακά συστήματα εξώθησης, το MexAB-OprM και το MexXY-OprM (εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα) (Mesaros *et al*, 2007, Schweizer, 2003). Η *P.aeruginosa* παρουσιάζει ενδογενή αντοχή και στη νεότερη αντιμικροβιακή ουσία τιγκεκυκλίνη μέσω του συστήματος εξώθησης MexXY-OprM (Dean *et al*, 2003).

1.2.8.3. Ένζυμα

Το βακτήριο παρουσιάζει χαμηλού επιπέδου αντοχή στην καναμυκίνη λόγω παραγωγής σε βασικά επίπεδα χρωμοσωμικά κωδικοποιημένης φωσφοτρανσφεράσης (Okii *et al*, 1983).

Η *P. aeruginosa* φέρει μια χρωμοσωμικά κωδικοποιούμενη AmpC επαγωγίμη β-λακταμάση. Τα φυσικά στελέχη παράγουν μικρά ποσά AmpC και παραμένουν ευαίσθητα στις αντιψευδομοναδικές πενικιλίνες, συνδυασμούς πενικιλινών με αναστολείς των β-λακταμασών, κεφαλοσπορίνες και καρβαπενέμες. Υπερπαραγωγή της AmpC προσφέρει αντοχή της *P. aeruginosa* σε όλα τα β-λακταμικά με εξαίρεση τις καρβαπενέμες, ενώ εντεροβακτηριακά με υπερπαραγωγή AmpC παραμένουν ευαίσθητα εκτός από τις καρβαπενέμες και στην cefepime. Η υπερπαραγωγή της χρωμοσωμικής AmpC μπορεί να προκληθεί: (α) με επαγωγή, η οποία απαιτεί σύνδεση ενός επαγωγίμου β-λακταμικού παράγοντα ή ενός αναστολέα β-λακταμάσης (π.χ. cefoxitine, imipenem, clavulanate) με τις PBPs (η διαδικασία είναι αναστρέψιμη μετά την απομάκρυνση του επαγωγέα) και (β) με χρωμοσωμική μετάλλαξη των γονιδίων που ρυθμίζουν την έκφραση της AmpC, η οποία οδηγεί σε υψηλού επιπέδου παραγωγή της κεφαλοσπορινάσης χωρίς την παρουσία κάποιου επαγωγέα (Bagge N *et al*, 2002). Επειδή το κλαβουλανικό προκαλεί την έκφραση της AmpC β-λακταμάσης και ανταγωνίζεται έτσι την βακτηριοκτόνο δράση της τικαρκιλίνης, έχει προταθεί η αποφυγή του συνδυασμού τικαρκιλίνης-κλαβουλανικό στην επιλογή των αντιψευδομοναδικών β-λακταμικών αντιβιοτικών (Lister PD *et al*, 1999).

1.2.8.4. Βιομεμβράνες (biofilm)

Η αντοχή της βιομεμβράνης της *P.aeruginosa* στις αντιμικροβιακές ουσίες παρουσιάζεται σύνθετη και πολυπαραγοντική (Drenkard, 2003, Hoiby *et al*, 2010). Το αλγινικό οξύ και το e-DNA λειτουργούν ως φυσικός φραγμός για αρκετά αντιβιοτικά (Smith, 1982). Αν και τα περισσότερα αντιμικροβιακά διαχέονται εύκολα μέσω της βιομεμβράνης σε wild στελέχη *P.aeruginosa*, το αλγινικό οξύ που παράγεται από βλενώδη στελέχη επιβραδύνει τη διάχυση κάποιων αντιμικροβιακών ουσιών (π.χ. πιπερακιλλίνη, αμικασίνη, γενταμυκίνη), ενώ άλλες διεισδύουν εύκολα (π.χ. σιπροφλοξασίνη, λεβοφλοξασίνη, οφλοξασίνη) (Shigeta *et al*, 1997). Μελέτες δείχνουν ότι τα βακτήρια στο εσωτερικό της μεμβράνης είναι λιγότερο μεταβολικά ενεργά και αναπτύσσονται πιο αργά (λόγω της μειωμένης παροχής οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών (Werner *et al*, 2004) σε σύγκριση με τα βακτήρια της περιφέρειας. Ως εκ τούτου, τα βακτήρια εντός της βιομεμβράνης καθίστανται ανθεκτικά έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων που κατά κανόνα έχουν στόχο δράσης μεταβολικά ενεργά κύτταρα (Pamp *et al*, 2008).

1.2.9 Επίκτητη αντοχή

Γενικά

Η ευρεία και άσκοπη χρήση αντιβιοτικών προκάλεσε την ανάδυση μικροβίων με επίκτητη αντοχή σε αντιμικροβιακά φάρμακα. Μεμονωμένες μεταλλάξεις ή μεταφορά εξωγενούς γενετικού υλικού και ενσωμάτωση αυτού συμβάλλουν σημαντικά στην ανάπτυξη αυτής της αντοχής. Πολλά γονίδια που προσδίδουν αντοχή εδράζονται σε πλασμίδια ή σε τρανσποζόνια τα οποία μπορούν να διασπαρούν μεταξύ των βακτηρίων με μηχανισμούς σύζευξης, μετασχηματισμού και μεταφοράς με φάγο (Murray *et al*, 2005).

Υπάρχουν τέσσερις κύριοι μηχανισμοί με τους οποίους τα βακτήρια αναπτύσσουν αντοχή στους διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες:

1. ελαττωμένη κυτταρική διαπερατότητα
2. παραγωγή ενζύμων που αδρανοποιούν τον αντιμικροβιακό παράγοντα
3. τροποποίηση του στόχου δράσης
4. ύπαρξη αντλιών εκροής και εξώθησης (efflux pumps)

Η επίκτητη αντοχή αφορά κυρίως τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, τις αμινογλυκοσίδες, τις κινολόνες και σπάνια την κολιστίνη.

1.2.9.1 Αντοχή στα β-λακταμικά αντιβιοτικά

Η αντοχή της *P.aeruginosa* στα β-λακταμικά οφείλεται κυρίως στην απώλεια της πορίνης OprD, στην έκφραση συστημάτων εξώθησης (efflux systems) και στην παραγωγή β-λακταμασών.

- **Απώλεια OprD**

Η απώλεια της πορίνης OprD αποτελεί το βασικό μηχανισμό αντοχής του βακτηρίου στις καρβαπενέμες και κυρίως στην ιμιπενέμη (Mesaros *et al*, 2007). Η απώλεια της OprD συμβαίνει στο 50% των περιπτώσεων λοίμωξης από *P.aeruginosa* στις οποίες χρησιμοποιείται θεραπευτικά η ιμιπενέμη (Quinn *et al*, 1988).

- **Συστήματα εξώθησης- Efflux systems**

Υπερέκφραση των ιδιοσυστασιακών συστημάτων εξώθησης MexAB-OprM μπορεί να οδηγήσει σε αντοχή σε πενικιλίνες κεφαλοσπορίνες, αζτρεονάμη και μεροπενέμη ενώ της αντλίας MexXY-OprM κυρίως σε κεφαλοσπορίνες και λιγότερο στις πενικιλίνες. Επιπλέον μεταλλάξεις στην MexCD-OprJ υπό τη πίεση αντιβιοτικών μπορεί να οδηγήσει σε αντοχή στις πενικιλίνες και την αζτρεονάμη (Mesaros *et al*, 2007).

- **Παραγωγή αδρανοποιητικών ενζύμων**

Τα πιο γνωστά είναι αυτά που αδρανοποιούν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά και αυτά που αδρανοποιούν τις αμινογλυκοσίδες.

β-λακταμάσες

Είναι μια μεγάλη ομάδα ενζύμων που αδρανοποιούν τα β-λακταμικά αντιβιοτικά και η παραγωγή τους κωδικοποιείται από πλασμιδιακά και χρωμοσωμικά γονίδια.

Ευρέως φάσματος β-λακταμάσες (Extended-spectrum b-lactamases-ESBLs)

Οι ESBLs υδρολύουν τις πενικιλίνες, τις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες και την αζτρεονάμη, αλλά δεν υδρολύουν τις 7-methoxy-cephalosporins (cephamycins). Οι ESBLs αναστέλλονται από τους αναστολείς κλαβουλανικό, σουλπμαλκτάμη και ταζομπακτάμη, ανήκουν στην λειτουργική ομάδα 2be (το e σημαίνει extended) κατά Bush-Jacoby-Medieros και στην μοριακή κλάση A κατά Ambler. Η πρώτη ESBL βρέθηκε σε στέλεχος *Klebsiella ozaenae* που απομονώθηκε στη Γερμανία το 1983 (Kliece C *et al*, 1985). Ωστόσο, έχουν περιγραφεί διάφορες ESBLs στη *P.aeruginosa*, όπως GES, SHV, PER, TEM, VEB (Bokaeian M *et al*, 2014, Ranellou K *et al*, 2012).

Καρβαπενεμάσες

Οι καρβαπενεμάσες (carbapenemases) αντιπροσωπεύουν την πιο πολύπλευρη οικογένεια των β-λακταμασών, με εύρος υδρολυτικού φάσματος που περιλαμβάνει σχεδόν όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Αν και τα εν λόγω ένζυμα είναι γνωστά ως "καρβαπενεμάσες", πολλά από αυτά υδρολύουν σχεδόν όλες τις β-λακτάμες ενώ η δράση των περισσότερων εξ' αυτών δεν αναστέλλεται από όλους τους εμπορικά διαθέσιμους αναστολείς των β-λακταμασών (Livermore & Woodford, 2006, Walther-Rasmussen & Hoiby, 2006).

Οι καρβαπενεμάσες ανήκουν σε δύο κύριες οικογένειες, βάσει του υδρολυτικού μηχανισμού του ενεργού κέντρου τους. Οι πρώτες καρβαπενεμάσες που περιγράφηκαν, προέρχονταν από Gram θετικούς βακίλλους. Σε αντίθεση με τις γνωστές μέχρι εκείνη τη στιγμή β-λακταμάσες, τα ένζυμα αυτά αναστέλλονταν από το EDTA και χαρακτηρίστηκαν ως μέταλλο-β-λακταμάσες. Από μελέτες που ακλούθησαν αποδείχτηκε ότι όλα τα εν λόγω ένζυμα περιείχαν τουλάχιστον ένα άτομο ψευδαργύρου στο ενεργό τους κέντρο, το οποίο διευκολύνει την υδρόλυση του δικυκλικού δακτυλίου της β-λακτάμης (Frere *et al*, 2005). Στα μέσα με τέλη της δεκαετίας του 1980, μια άλλη οικογένεια ενζύμων με δράση καρβαπενεμάσης ανακαλύφθηκε μεταξύ των μελών της οικογένειας των *Enterobacteriaceae* (Medeiros & Hare, 1986) των οποίων η δράση δεν αναστέλλονταν από το EDTA (Rasmussen *et al*, 1996). Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι αυτά τα ένζυμα έφεραν σερίνη στο

ενεργό τους κέντρο και αναστέλλονταν από αναστολείς των β-λακταμασών, όπως το κλαβουλανικό οξύ και η ταζομπακτάμη (Rasmussen *et al*, 1996, Yang *et al*, 1990).

Ταξινόμηση Καρβαπενεμασών

Η ταξινόμηση των καρβαπενεμασών δύναται να πραγματοποιηθεί είτε λειτουργικά είτε μοριακά. Στις πρώιμες μελέτες των β-λακταμασών, πρώτου την καθιέρωση της κλωνοποίησης και της αλληλούχισης γονιδίων, τα νέα μέλη των εν λόγω ενζύμων χαρακτηρίζονταν βιοχημικά με την απομόνωση των ίδιων των ενζύμων, τον καθορισμό του ισοηλεκτρικού σημείου τους καθώς και ενζυμικές μελέτες για να εξακριβωθεί η υδρόλυση του υποστρώματος τους και τα χαρακτηριστικά της αναστολής τους (Sykes & Matthew, 1976). Έτσι, τα σχετικά ποσοστά υδρόλυση για ένα ευρύ φάσμα β-λακταμικών υποστρωμάτων και το προφίλ της αναστολής επέτρεπαν την ταξινόμηση των νέων β-λακταμασών. Αυτή η λειτουργική ταξινόμηση εξελίχθηκε εν μέσω των χρόνων σε ένα ευρέως πλέον αποδεκτό ταξινομικό σχήμα, βάσει του οποίου οι β-λακταμάσες εν γένει διακρίνονται σε τέσσερις βασικές λειτουργικές ομάδες (ομάδες 1 έως 4), με την ομάδα 2 να περιλαμβάνει αρκετές υποομάδες (Bush *et al*, 1995). Στο εν λόγω σύστημα, οι καρβαπενεμάσες ανήκουν κυρίως στις ομάδες 2f και 3.

Η ταξινόμηση των β-λακταμασών με βάση την ομολογία αμινοξέων οδήγησε στην διάκριση τεσσάρων κύριων τάξεων (Ambler, 1980), οι οποίες ταυτίζονται με τις ομάδες της λειτουργικής ταξινόμησης, ωστόσο στερούνται τις λεπτομέρειες σχετικά με την ενζυμική δράση του ενζύμου. Αναλυτικότερα, οι τάξεις A, C και D περιλαμβάνουν τις β-λακταμάσες που φέρουν σερίνη στο ενεργό τους κέντρο, ενώ η τάξη B περιλαμβάνει τις β-λακταμάσες που φέρουν ψευδάργυρο. Οι καρβαπενεμάσες, δηλαδή οι β-λακταμάσες με ικανότητα να υδρολύουν καρβαπενέμες με αποτέλεσμα αυξημένες MIC σε αυτές, περιλαμβάνουν ένζυμα των τάξεων A, B και D.

Τα συστήματα λειτουργικής ταξινόμησης που περιλαμβάνουν καρβαπενεμάσες προτάθηκαν για πρώτη φορά από τον Bush το 1988 (Bush, 1988). Αρκετά συστήματα υποδιαίρεσης για τις μέταλλο-β-λακταμάσες προτάθηκαν εκ των υστέρων κατά τη διάρκεια των τελευταίων 10 ετών. Οι Rasmussen και Bush το 1997 πρότειναν ότι η λειτουργική ομάδα 3 των μέταλλο-β-λακταμασών θα μπορούσε να χωριστεί σε τρεις λειτουργικές υποομάδες, βασισμένοι κυρίως στις ιδιαιτερότητες των υποστρωμάτων τους (Rasmussen & Bush, 1997), ενώ κι ο Frere και οι συνεργάτες του έχουν προτείνει μοριακή υποταξινόμηση αυτών (Galleni *et al*, 2001, Garau *et al*, 9

2004). Έτσι, λοιπόν, οι μέταλλο-β-λακταμάσες διακρίνονται σε τρεις υποκατηγορίες με βάση ένα συνδυασμό δομικών χαρακτηριστικών, συγγένειες του ψευδάργυρου για τις δύο θέσεις πρόσδεσης και τα χαρακτηριστικά της υδρόλυσης. Αναλυτικότερα, οι υποτάξεις B1 και B3 απαιτούν την πρόσδεση δύο ατόμων ψευδαργύρου για τη βέλτιστη υδρόλυση, ενώ οι μέταλλο-β-λακταμάσες

της υποτάξης B2 αναστέλλονται με την πρόσδεση του δεύτερου ατόμου ψευδαργύρου. Η υποτάξη B2 διαφέρει, επίσης, και στο φάσμα υδρόλυσης, καθώς υδρολύει κατά προτίμηση τις καρβαπενέμες, σε αντίθεση με το ευρύ φάσμα υδρόλυσης που παρατηρείται για τα ένζυμα των B1 και B3 υποτάξεων (Frere *et al*, 2005).

Καρβαπενεμάσες τάξης A

Τα ένζυμα αυτά φέρουν σερίνη στο ενεργό κέντρο τους. Εμφανίστηκαν για πρώτη φορά πριν την κλινική χρήση της ιμιπενέμης, την δεκαετία του 1980 και απομονώθηκαν είτε μεμονωμένα είτε σε μικρές επιδημίες από στελέχη *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* και *Klebsiella spp.* Χαρακτηρίζονται από μειωμένη ευαισθησία στην ιμιπενέμη, αλλά οι MICs ποικίλουν από τιμές <4μg/ml έως 256μg/ml, γι'αυτό και συχνά υποδιαγιγνώσκονταν σε έλεγχο ρουτίνας σύμφωνα με τα κριτήρια CLSI 2009 όπου το όριο ευαισθησίας ήταν 4μg/ml. Υδρολύουν καρβαπενέμες, κεφαλοσπορίνες, πενικιλίνες και αζτρεονάμη και αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ και ταζομπακτάμη. Διακρίνονται σε χρωμοσωμικές και πλασμιδιακές.

Στις χρωμοσωμικές ανήκουν οι SME1-2-3 (*Serratia Marcescens* Enzyme), IMI-1-2(Imipenem –hydrolyzing β -lactamase), και η NMC-A(Non Metallo-enzyme Carbapenemase).

Στις πλασμιδιακές ανήκουν οι KPC1-2-3-4 έως 12 (*Klebsiella Pneumonia* Carbapenemase που ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά το 1996 στις ΗΠΑ σε στέλεχος *Klebsiella pneumonia* και η GES/IBC (Guiana Extended Spectrum / Integron-Borne Cephalosporinase) που ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά το 2000 σε στέλεχος *Enterobacter cloacae* στην Ελλάδα και σε στέλεχος *Klebsiella pneumonia* στη Γαλλική Γουιάνα. Οι KPC σύντομα επεκτάθηκαν στην Ευρώπη και στην Κίνα. Διαθέτουν την μεγαλύτερη ικανότητα διασποράς σε σχέση με άλλες καρβαπενεμάσες και τα στελέχη που τις παράγουν ενδημούν κυρίως σε νοσοκομειακό περιβάλλον. Συχνά είναι πολυανθεκτικά υδρολύοντας αποτελεσματικά πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, αζτρεονάμη και καρβαπενέμες, αφήνοντας περιορισμένες θεραπευτικές επιλογές και υψηλά ποσοστά θνησιμότητας (Nordmann *et al*, 2011). Τα γονίδια GES εδράζονται σε ιντεγκρόνια ή πλασμίδια, γεγονός που συντέλεσε στην παγκόσμια εξάπλωση τους, παρά το γεγονός ότι σχετίζονται με σποραδικά κρούσματα και μικρής έκτασης νοσοκομειακές επιδημίες.

Καρβαπενεμάσες τάξης D

Τα ένζυμα αυτά φέρουν σερίνη στο ενεργό κέντρο τους. Αναφέρονται και ως OXA (oxacillin-hydrolysing) β -λακταμάσες και αποτέλεσαν τις κυριότερες πλασμιδιακές β -λακταμάσες στα τέλη της δεκαετίας του 1970.

Αποτελούν ετερογενή ομάδα ως προς τη δομή και τις βιοχημικές ιδιότητες. Έχουν ποικίλη αναστολή από κλαβουλανικό οξύ. Το φάσμα υδρόλυσης τους ποικίλει. Υδρολύουν τις πενικιλίνες, αλλά ελάχιστα έως καθόλου τις εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορίνες και την αζτρεονάμη.

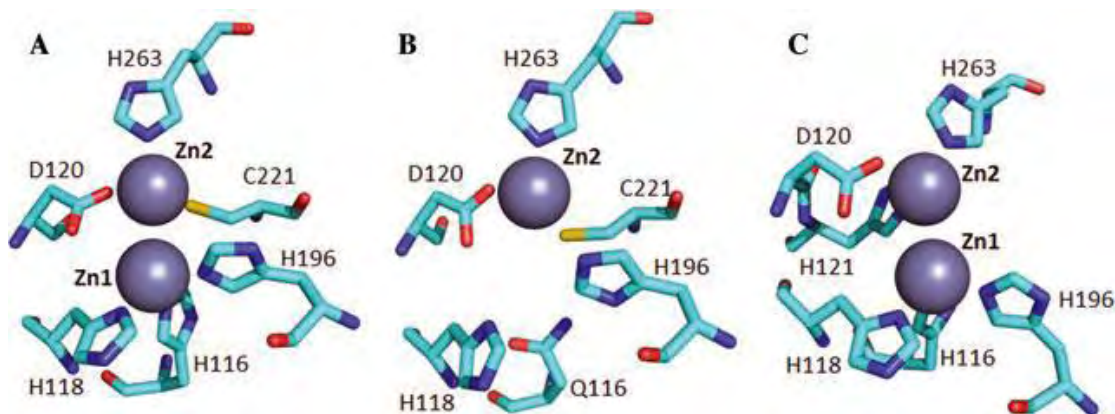
Έχουν χαμηλότερη υδρολυτική δράση έναντι των καρβαπενεμών σε σχέση με τα μεταλλοένζυμα. Ωστόσο σε κλινικά στελέχη παρουσιάζεται υψηλή αντοχή λόγω της συχνής συνύπαρξης άλλων μηχανισμών.

Έως σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 102 διακριτές OXA β λακταμάσες. Από αυτές, οι 9 αποτελούν ευρέως φάσματος β-λακταμάσες και τουλάχιστον 37 καρβαπενεμάσες. Οι OXA καρβαπενεμάσες αποτελούν το βασικότερο μηχανισμό αντοχής στις καρβαπενέμες στο είδος *A. baumannii*. Έχουν ανιχνευτεί επίσης σε στελέχη *Enterobacteriaceae* και *Pseudomonas aeruginosa*.

Καρβαπενεμάσες Τάξης B

Ο όρος καρβαπενεμάσες τάξης B κατά Ambler αφορά τις μέταλλο-β-λακταμάσες (MBLs), οι οποίες είναι β-λακταμάσες με ικανότητα υδρόλυσης των καρβαπενεμών, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Οι μέταλλο-β-λακταμάσες, όπως όλες οι β-λακταμάσες, διακρίνονται στις χρωμοσωμικά κωδικοποιούμενες και σε εκείνες που κωδικοποιούνται από μεταβιβάσιμα γονίδια. Οι πρώτες μελέτες σχετικά με τις χρωμοσωμικά κωδικοποιούμενες μέταλλο-β-λακταμάσες επικεντρώθηκαν στον *Bacillus cereus* (BC II) και στη *Stenotrophomonas maltophilia* (L1) (Lim *et al*, 1988, Walsh *et al*, 1994). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια εξαιτίας της ανάπτυξης της τεχνολογίας της πλήρους χαρτογράφησης των γονιδιωμάτων, ανακαλύπτονται ολοένα και περισσότερες χρωμοσωμικά κωδικοποιούμενες μέταλλο-β-λακταμάσες, οι περισσότερες εκ των οποίων βρίσκονται σε βακτήρια μη κλινικού ενδιαφέροντος (Naas *et al*, 2003, Simm *et al*, 2001). Σε αντίθεση με τις χρωμοσωμιακές MBLs τα επίκτητα και μεταβιβάσιμα μεταλλοένζυμα παρουσιάζουν μια δραματική αύξηση στην ανίχνευση και στη γεωγραφική τους διασπορά. Περιλαμβάνουν τις οικογένειες VIM, IMP, GIM (German imipenemase), SPM (Sao Paulo metallo-β-lactamase) και SIM (Seoul imipenemase).

Οι MBLs υδρολύουν όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά (πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, κεφαμυσίνες, καρβαπενέμες) εκτός από την αζτρεονάμη. Τα ένζυμα αυτά δεν αναστέλλονται από τους αναστολείς των β-λακταμασών αναστέλλονται όμως από τη χηλική ουσία EDTA η οποία δεσμεύει τα δισθενή ιόντα του Zn²⁺ και άλλα δισθενή κατιόντα.



Εικόνα 7: Δομή ενεργού κέντρου μεταλλο-β-λακταμασών των υποτάξεων B1, B2 και B3, αντίστοιχα (Palzkill, 2013)

IMP Η πρώτη ένδειξη για την ύπαρξη επίκτητων μέταλλο-β-λακταμασών ήρθε με την απομόνωση τους στελέχους *P. aeruginosa* GN17203 στην Ιαπωνία το 1988 (Watanabe *et al*, 1991). Το εν λόγω στέλεχος χαρακτηρίζονταν από ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) στην ιμιπενέμη ίση με 50 µg/ml, καθώς και από ανθεκτικότητα έναντι των ευρέως φάσματος κεφαλοσπορινών (MIC>400 µg/ml). Το υπεύθυνο για την ανθεκτικότητα γονίδιο, γνωστό πλέον ως IMP-1, βρέθηκε να εδράζεται επί ενός μεταφερόμενου πλασμιδίου. Τρία χρόνια αργότερα, το γονίδιο IMP-1 βρέθηκε στο στέλεχος *S. marcescens* Tη9106 που απομονώθηκε στο νοσοκομείο Aichi στο Οκαζάκι της Ιαπωνίας από ασθενή με ουρολοίμωξη (Osano *et al*, 1994). Δυο χρόνια αργότερα, το γονίδιο IMP-1 βρέθηκε να εδράζεται επί ενός πλασμιδίου 120 kb εντός ενός ιντεγκρονίου τάξης 3 σε ένα στέλεχος *S. marcescens* που απομονώθηκε σε διπλανή από το Οκαζάκι πόλη (Arakawa *et al*, 1995) ενώ σταδιακά ακολούθησε διασπορά του ενζύμου σε όλες τις ηπείρους.

SPM Ένα στέλεχος *P. aeruginosa*, που απομονώθηκε κατά τη διάρκεια του παγκόσμιου προγράμματος αντιμικροβιακής επιτήρησης (SENTRY) το 1997 στο Σαο Πάολο της Βραζιλίας, βρέθηκε ότι φέρει ένα νέο γονίδιο μεταλλο-β-λακταμάσης, που είναι γνωστό ως SPM-1 (Sao Paolo MBL) (Tolman *et al*, 2002). Το εν λόγω στέλεχος (48-1997A), το οποίο απομονώθηκε από δείγμα αίματος ενός τετράχρονου κοριτσιού που έπασχε από λευχαιμία και τελικά υπέκυψε στη λοίμωξη, ήταν ιδιαίτερα ανθεκτικό σε όλους τους συνήθεις αντιμικροβιακούς παράγοντες έναντι των Gram αρνητικών βακτηρίων, εκτός από την κολιστίνη (Gales *et al*, 2003).

GIM Το 2002, πέντε στελέχη *P. aeruginosa* απομονώθηκαν από διαφορετικούς ασθενείς σε νοσοκομείο του Ντίσελντορφ της Γερμανίας και φάνηκε να φέρουν μια νέα μεταλλο-β λακταμάση, που είναι γνωστή σήμερα ως GIM-1 (German imipenemase) (Castanheira *et al*, 2004). Ομοίως με τα περισσότερα στελέχη *P. aeruginosa* που φέρουν μεταλλο-β-λακταμάσες, τα πέντε αυτά στελέχη ήταν ευαίσθητα μόνο στην πολυμυξίνη Β και μετά από ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο

ηλεκτρικό πεδίο αποδείχθηκε ότι ήταν πανομοιότυπα. Τα εν λόγω στελέχη, συγκρινόμενα με έξι στελέχη ευαίσθητα στις καρβαπενέμες που απομονώθηκαν από το ίδιο νοσοκομείο διαπιστώθηκε ο,τι ανήκαν σε διαφορετικούς κλώνους (Castanheira *et al*, 2004).

SIM: Σχετικά πρόσφατα αναφέρθηκε και μια άλλη οικογένεια επίκτητων μεταλλο-β-λακταμασών στην Κορέα (Lee *et al*, 2005). Το πρώτο μέλος της οικογένειας, το ένζυμο SIM-1 (Seoul imipenemase) έχει την πλησιέστερη ταυτότητα αμινοξέων με τα μέλη της οικογένειας IMP και ανιχνεύθηκε εδραζόμενο επί ιντεγκρονίων τάξης 1 σε στελέχη *A. baumannii* (Lee *et al*, 2005). Οι μεταλλο-β-λακταμάσες τύπου SPM, GIM και SIM δεν έχουν διασπαρεί πέραν των γεωγραφικών περιοχών από τις οποίες πρωτοανιχνεύτηκαν, ενώ οι μεταλλο-β-λακταμάσες τύπου VIM και IMP εξακολουθούν να ανιχνεύονται σε παγκόσμιο επίπεδο και να διασπείρονται πέρα από το είδος *P. aeruginosa* και στα άλλα Εντεροβακτηριακά.

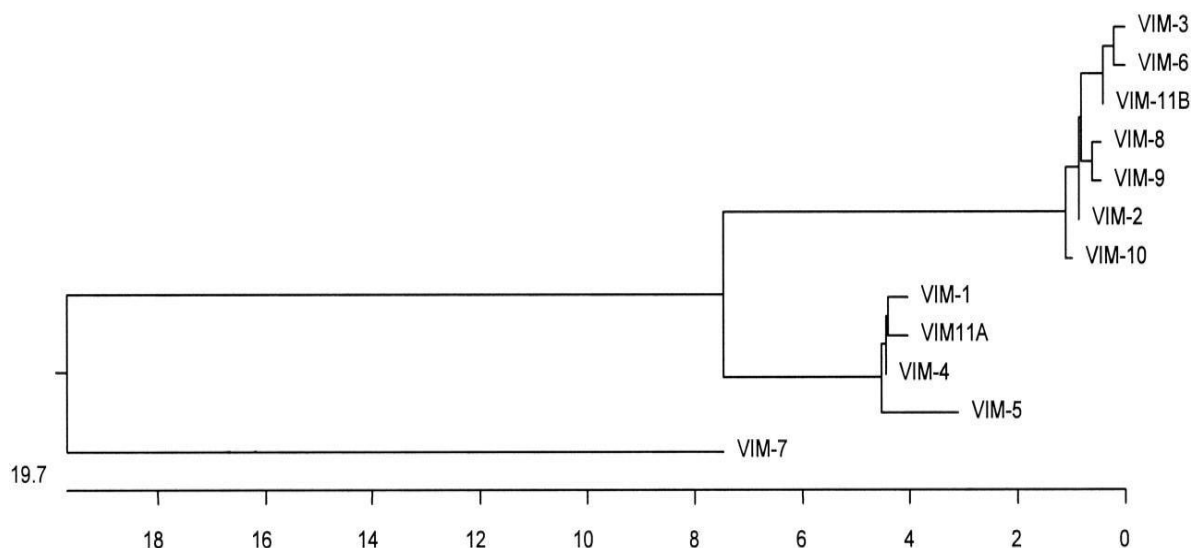
NDM: Πρόσφατα περιγράφηκε η NDM-1 μεταλλο-β-λακταμάση (New Delhi metallo-beta-lactamase), η οποία υδρολύει όλα τα β-λακταμικά πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες και καρβαπενέμες με εξαίρεση την αζτρεονάμη. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την NDM- 1 βρέθηκε σε πλασμίδιο σε ένα μεταβιβάσιμο γενετικό στοιχείο μεγέθους 180-kb που περιέχει μια ποικιλία ανθεκτικών γονιδίων όπως: (α) γονίδιο που κωδικοποιεί την CMY-4 (AmpC β-λακταμάση), (β) γονίδια που αδρανοποιούν ερυθρομυκίνη, σιπροφλοξασίνη, ριφαμπικίνη και χλωραμφενικόλη (γ) γονίδιο που κωδικοποιεί *efflux pump*, η οποία προκαλεί επιπρόσθετη αντιμικροβιακή αντοχή (Bush *et al*, 1995). Στελέχη με NDM-1 σχεδόν πάντα έχουν μια 16S rRNA μεθυσίαση, η οποία προσφέρει αντοχή σε όλες τις αμινογλυκοσίδες. Η NDM-1 έχει ανιχνευθεί κυρίως σε *K. pneumoniae* αλλά και σε *E. coli* και *E. cloacae*. Τα στελέχη που παράγουν NDM-1 είναι πολυανθεκτικά με ευαισθησία μόνο στις πολυμυξίνες και στη τιγκεκυκλίνη.

VIM Το πρώτο ένζυμο της ομάδας VIM-1 (Verona Integron encoded Metallo-β-lactamase) απομονώθηκε το 1997 στη Βερόνα της Ιταλίας και το αντίστοιχο VIM-2 το 1996 στη Γαλλία. Και τα δύο ένζυμα ανιχνεύτηκαν σε κλινικά στελέχη *P. aeruginosa*. Στη Νότια Ευρώπη και κυρίως στην Ιταλία και Ελλάδα η ανίχνευση VIM και IMP μεταλλο-β-λακταμασών είναι συνεχής, με κυριότερο ένζυμο το VIM-1.

Τα στελέχη αυτά παρουσιάζουν αντοχή στα περισσότερα β-λακταμικά αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανομένης και της ιμιπενέμης και αναστελλόταν από EDTA. Ο λεπτομερής χαρακτηρισμός του ενζύμου έδειξε μια αλληλουχία 266 αμινοξέων. Το ισοηλεκτρικό σημείο ήταν 5,3. Το φάσμα υποστρωμάτων της VIM-1 ήταν τυπικό της τάξης B κατά Ambler, συμπεριλαμβάνοντας τα περισσότερα β-λακταμικά πλην της αζτρεονάμης. Η αρχική αντοχή στην αζτρεονάμη που παρουσίαζε το κλινικό στέλεχος οφειλόταν στη συνύπαρξη άλλων μηχανισμών αντοχής. Το υπεύθυνο για την παραγωγή της VIM-1 γονίδιο, *bla_{VIM-1}*, φερόταν ως γονιδιακή κασσέτα σε ένα ενσωματόνιο τάξης 1 χρωμοσωματικής εντόπισης. Το συγκεκριμένο ενσωματόνιο έφερε επίσης το

aacA4 γονίδιο που καθιστούσε το στέλεχος ανθεκτικό στις αμινογλυκοσίδες. στη συνέχεια, το γονίδιο *bla_{VIM-1}* βρέθηκε στο ίδιο νοσοκομείο στη Βερόνα φερόμενο σε μη συζευκτικό πλασμίδιο σε στέλεχος *Achromobacter xylosoxidans*. Το VIM-1 ενσωματόνιο (In70) έφερε τέσσερις γονιδιακές κασσέτες και τρία διαφορετικά γονίδια που προσδίδουν αντοχή στις αμινογλυκοσίδες (*aacA4*, *aphA15* και *aadA1*)(Walsh *et al*, 2005).

Έκτοτε η VIM-1 έχει βρεθεί σε στελέχη *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. xylosoxidans*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *P. putida*, *Acinetobacter spp*, *P. stutzeri*, *C. freundii*, *E. Coli* και *P. mirabilis* σε πολλές χώρες όπως, μεταξύ άλλων, στη Γαλλία, στη Ελλάδα, στην Ιταλία, στην Ισπανία, στην Κορέα, στην Πορτογαλία, στην Πολωνία, στις ΗΠΑ, στην Κροατία, στο Βέλγιο και σε χώρες της Νότιας Αμερικής (Protonotariou *et al*, 2008, Giakkouri *et al*, 2003, Lauretti *et al*, 1999, Lee *et al*, 2002, Miriagou *et al*, 2003, Pournaras *et al*, 2002, Tsakris *et al*, 2000, Yan *et al*, 2001, Patzer *et al*, 2009). Η φυλογενετική συγγένεια μεταξύ των κυριότερων ενζύμων τύπου VIM φαίνεται στο παρακάτω δενδρόγραμμα.



Εικόνα 8:Φυλογενετικό δέντρο των κυριότερων μέταλλο-β-λακταμασών τύπου VIM με τη μέθοδο neighbor joining (Walsh *et al*, 2005).

1.2.9.2 Αντοχή στις αμινογλυκοσίδες

Ο σημαντικότερος μηχανισμός αντοχής της *P. aeruginosa* στις αμινογλυκοσίδες είναι η ενζυμική τους τροποποίηση. Τα ένζυμα που τροποποιούν τις αμινογλυκοσίδες ανήκουν σε τρεις τάξεις: APH (φωσφοτρανσφεράσες), ANT (νουκλεοτιδιλοτρανσφεράσες) και AAC (ακετυλοτρανσφεράσες) (Hancock, 1998).

Επιπλέον, η *P. aeruginosa* φέρει το γονίδιο *aphA* το οποίο ενεργοποιείται μετά από μετάλλαξη και η έκφραση του οδηγεί σε αντοχή στις αμινογλυκοσίδες (Okii *et al*, 1983).

Ένας άλλος τρόπος αντοχής στις αμινογλυκοσίδες είναι η μεθυλίωση του 16S rRNA από τα ένζυμα μεθυλάσες (π.χ. RmtA, RmtD). Τα γονίδια των μεθυλασών εδράζονται σε τρανσποζόνια πλασμιδίων και εύκολα μεταφέρονται από βακτήριο σε βακτήριο (Strateva and Yordanov, 2009).

Υπερέκφραση του ιδιοσυστασικού συστήματος εξώθησης MexXY-OrpM μπορεί επίσης να οδηγήσει σε αντοχή στις αμινογλυκοσίδες (Mesaros *et al*, 2007).

1.2.9.3 Αντοχή στις κινολόνες

Η αντοχή στις κινολόνες οφείλεται είτε σε ιδιοσυστασιακά συστήματα εξώθησης (MexAB-OrpM και MexXY-OrpM) (Mesaros *et al*, 2007), είτε σε σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *gyrA* που κωδικοποιεί το ένζυμο DNA-γυράση (Kureishi *et al*, 2000).

1.2.9.4 Αντοχή στην κολιστίνη

Συνήθως αντοχή στην κολιστίνη παρουσιάζουν στελέχη που απομονώνονται από ασθενείς που χρησιμοποιούν την κολιστίνη θεραπευτικά για μεγάλο διάστημα, όπως ασθενείς με κυστική ίνωση (Macfarlane *et al*, 2000, Moskowitz *et al*, 2004). Μεταλλάξεις στα ρυθμιστικά συστήματα PmrAB και PhoPQ έχουν ως συνέπεια την παραγωγή προϊόντων τα οποία οδηγούν στην υποκατάσταση του λιπιδίου A του LPS της *P. aeruginosa* από αμινοαραβινόζη και κατά συνέπεια στην αντοχή του βακτηρίου στην κολιστίνη (Macfarlane *et al*, 2000, Moskowitz *et al*, 2004).

1.2.10 Ανίχνευση των καρβαπενεμασών

1.2.10.1 Επίπεδα αντοχής σε καρβαπενέμες

Η παρουσία μεταλλοενζύμων συχνά εξαρτάται από το είδος του μικροβίου και την τιμή της MIC στις καρβαπενέμες (Walsh *et al*, 2005).

Τα εντεροβακτηριακά και κάποια *Acinetobacter spp.* που φέρουν μεταλλοένζυμα συχνά παρουσιάζονται ευαίσθητα με χαμηλή MIC στην ιμιπενέμη (1-2 µg/ml). Οι ψευδομονάδες έχουν εγγενώς υψηλότερες τιμές MIC στις καρβαπενέμες από τα εντεροβακτηριακά. Στελέχη *Pseudomonas aeruginosa* που εκφράζουν VIM, IMP, GIM, SIM και SPM μεταλλο-β-λακταμάσες, έχουν τιμές ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (MIC) στην ιμιπενέμη που ποικίλουν από 8 έως >128 µg/ml. Εντούτοις όταν τα γονίδια για τα ένζυμα αυτά εισάγονται σε στελέχη *E. coli* η αντίστοιχη

MIC στην ιμιπενέμη είναι σημαντικά χαμηλότερη. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει τη συνύπαρξη και άλλων μηχανισμών που προσδίδουν υψηλού επιπέδου αντοχή στην ιμιπενέμη, όπως η απουσία της πορίνης OmpK36 και ο μηχανισμός αυξημένης αποβολής του φαρμάκου μέσω αντλίας στη κυτταρική μεμβράνη (efflux pump). Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί επίσης σε στελέχη *Acinetobacter baumannii* και *Klebsiella pneumoniae* με μεταλλοένζυμα, όπως επίσης και με ΟΧΑ καρβαπενεμάσες (Queenan and Bush, 2007).

1.2.10.2 Χρωμογόνα υλικά καλλιέργειας

Είναι διαθέσιμα στο εμπόριο εκλεκτικά υλικά καλλιέργειας για στελέχη που εμφανίζουν αντοχή στις καρβαπενέμες, στα οποία οι αποικίες των μικροοργανισμών που παράγουν καρβαπενεμάσες διαχωρίζονται λόγω του διαφορετικού χρώματος τους. Έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες παρακολούθησης, χωρίς ωστόσο η αξιοπιστία τους να έχει εκτιμηθεί συστηματικά.

1.2.10.3 Modified Hodge Test ή cloverleaf test

Με την δοκιμασία αυτή ανιχνεύονται όλες οι καρβαπενεμάσες. Mueller-Hinton άγαρ επιστρώνεται με εναιώρημα πυκνότητας 0.5 McFarland προτύπου στελέχους *E. Coli* (ATCC 25922) που είναι ευαίσθητο σε καρβαπενέμες, ενώ στο κέντρο του τρυβλίου τοποθετείται δίσκος meropenem (10 µg) ή ertapenem σύμφωνα με τις οδηγίες του Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012. Τα εξεταζόμενα για παραγωγή καρβαπενεμάσης στελέχη επιστρώνονται υπό μορφή λωρίδας από το δίσκο μέχρι το χείλος του τρυβλίου. Παραμόρφωση της ζώνης αναστολής γύρω από το εξεταζόμενο βακτήριο θεωρείται ενδεικτική παραγωγής καρβαπενεμάσης (εικόνα 9).



Εικόνα 9: Τροποποιημένη δοκιμασία κατά Hodge για στελέχη *P. aeruginosa* παρουσία θετικού (+) και αρνητικού (-) μάρτυρα

1.2.10.4 Μέθοδος δίσκων: Double Disc Test (DDST) και Combined Disk Test (CDT)

Οι συνήθεις δοκιμασίες που εφαρμόζονται για ανίχνευση των μεταλλο-β-λακταμασών (MBLs) είναι: (α) το MBL Etest (AB Biodisk Solna, Sweden) (εικόνα 10), (β) η δοκιμασία συνέργιας με δύο δίσκους (double-disk synergy test) και (γ) η δοκιμασία συνδυασμού του δίσκου με αναστολέα της MBL (combined disk test).

Όλες οι δοκιμασίες βασίζονται στην ικανότητα χηλικών παραγόντων, όπως του EDTA και των thiol-ενώσεων (mercaptoethanol, mercaptopropionic acid, mercaptoacetic acid) να αναστέλλουν την δράση της MBL (IMBL).

Στη δοκιμασία συνέργιας δίσκος imipenem ή ceftazidime τοποθετείται σε απόσταση, η οποία ρυθμίζεται με βάση τη διάμετρο της ζώνης αναστολής των, από δίσκο που περιέχει μόνο IMBL. Διεύρυνση της ζώνης αναστολής μεταξύ των δύο δίσκων είναι ενδεικτική παραγωγής MBL. Για την αύξηση της ευαισθησίας της δοκιμασίας, ιδιαίτερα σε μη ζυμωτικά βακτήρια, συνιστάται η χρήση τριών δίσκων imipenem, meropenem και ceftazidime γύρω από το δίσκο με το EDTA (extended EDTA disk synergy test).

Έχει παρατηρηθεί ότι το EDTA έχει ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη ορισμένων βακτηρίων με αποτέλεσμα ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Στελέχη *P. aeruginosa* αρνητικά για MBL, παρουσία EDTA ελαττώνουν τις MICs του imipenem (IMP) με αποτέλεσμα ψευδή ανίχνευση MBL με το Etest και τη δοκιμασία των δίσκων με IMP/IMP+EDTA. Το EDTA μπορεί επίσης να προκαλέσει υδρόλυση των αντιβιοτικών με αποτέλεσμα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Για όλους αυτούς τους λόγους από κάποιους συγγραφείς προτείνεται η χρήση του dipicolinic acid (2,6-

pyridinedicarboxylic acid) για την ανίχνευση των MBLs ιδίως σε στελέχη *P. aeruginosa* και *A. baumannii*. Το dipicolinic acid (DPA) είναι ανώτερο των άλλων χηλικών ενώσεων διότι: έχει ισχυρή χηλική δράση, δεν αναστέλλει την ανάπτυξη των βακτηρίων και δεν υδρολύει τα αντιβιοτικά. Η ειδικότητα και η ευαισθησία των μεθόδων που χρησιμοποιούν ως αναστολέα DPA είναι ανώτερες σε σύγκριση με τις φαινοτυπικές δοκιμασίες που χρησιμοποιούν EDTA για ανίχνευση των MBLs σε *Pseudomonas spp.* και *Acinetobacter spp.*

Οι KPC αναστέλλονται από το boronic acid (3-aminophenyl boronic acid) το οποίο χρησιμοποιείται για την ανίχνευσή τους σε δοκιμασίες συνέργειας ή συνδυασμού με δίσκους καρβαπενεμών, ενώ δεν αναστέλλονται από το EDTA. Ο δίσκος της ertapenem (ERT) έχει προταθεί ως ο πλέον κατάλληλος για την ανίχνευση της KPC σε εντεροβακτηριακά με χαμηλού επιπέδου αντοχή στις καρβαπενέμες και φαίνεται να είναι ο πλέον κατάλληλος για την ανίχνευση της NDM. Το boronic acid έχει αναφερθεί ως ειδικό για την ανίχνευση των KPC με δίσκους imipenem (IMP) και meropenem (MEM) αλλά όχι με ERT όταν το στέλεχος παράγει πλασμιδιακή AmpC. Το CLSI συνιστά εκτέλεση της τροποποιημένης δοκιμασίας του Hodge (MHT) με δίσκους MEM ή ERT για στελέχη με MICs κοντά στα όρια ευαισθησίας.

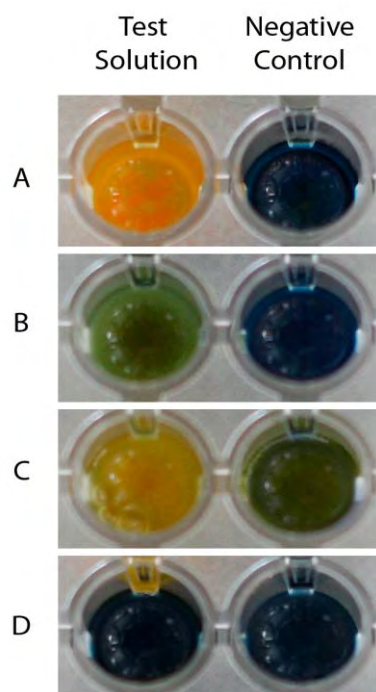


Εικόνα 10: E-test για τη ανίχνευση μεταλλο-β-λακταμασών

1.2.10.5 Carba-NP-Blue Carba

Πρόσφατα περιγράφηκε μία απλή φαινοτυπική μέθοδος η οποία δύναται να ανιχνεύσει την ύπαρξη καρβαπενεμάσης σε πολύ λίγο χρόνο και με πολύ μεγάλη ευαισθησία που βασίζεται στην

υδρόλυση του αντιβιοτικού. Το Carba-NP χρησιμοποιεί μία χρωστική, το ερυθρό της φαινόλης, ως δείκτη αλλαγής pH και μέσα σε δύο ώρες δίνει ένα αξιόπιστο αποτέλεσμα. Παραλλαγή του Carba-NP αποτελεί το Blue Carba που διαφέρει ως προς το δείκτη που χρησιμοποιείται, που στην περίπτωση αυτή είναι το μπλε της βρωμοθυμόλης.



Εικόνα 11: Δοκιμασία Blue-Carba

1.2.10.6 Η φασματοφωτομετρική μέθοδος

Χρησιμοποιώντας εκχυλίσματα κυττάρων ή καθαρές β-λακταμάσες μπορεί με αξιοπιστία να ανιχνεύσει την υδρόλυση στην ιμιπενέμη. Εάν η υδρόλυση αφορά μεταλλοένζυμο, βραχεία επώαση με EDTA πριν την έναρξη της αντίδρασης θα έχει ως αποτέλεσμα χαμηλότερο ρυθμό υδρόλυσης. Πολύ ασθενείς καρβαπενεμάσες δεν είναι δυνατόν να ανιχνευθούν, εκτός και αν χρησιμοποιηθούν μεγάλες ποσότητες εκχυλίσματος κυττάρων. Η συγκεκριμένη μέθοδος δεν μπορεί να αποτελέσει μέθοδο ρουτίνας στο εργαστήριο, διότι είναι χρονοβόρος, απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό και ο διαχωρισμός μεταξύ των καρβαπενεμασών είναι δυσχερής. Θεωρείται όμως η μέθοδος αναφοράς για την πιστοποίηση παραγωγής καρβαπενεμάσης σε εξειδικευμένα κέντρα.

1.2.10.7 Ισοηλεκτρική εστίαση

Όταν ένα μίγμα αμφολυτών βρεθεί σε ηλεκτρικό πεδίο, σχηματίζεται μία κλίση pH. Αν μέσα στο ίδιο ηλεκτρικό πεδίο βρεθεί μία πρωτεΐνη, αυτή, διατρέχοντας την κλίση θα ακινητοποιηθεί στο pH εκείνο, στο οποίο το καθαρό ηλεκτρικό φορτίο εξουδετερώνεται (Ισοηλεκτρική Εστίαση, Isoelectric Focusing, I.E.F.). το pH αυτό ορίζεται ως το Ισοηλεκτρικό Σημείο της συγκεκριμένης πρωτεΐνης και είναι χαρακτηριστικό της χημικής της δομής και επομένως καθοριστικό για την ταυτοποίηση της.

Η I.E.F διαχωρίζει τις πρωτεΐνες με βάση το φορτίο τους και ανιχνεύει τις β-λακταμάσες με τη βοήθεια της χρωμογενούς κεφαλοσπορίνης νιτροσεφίνης.επικάλυψη της γέλης με EDTA, κλαβουλανικό ή αζτρεονάμη, επιτρέπει την ανίχνευση ευαισθησίας των ενζύμων σε αυτούς τους αναστολείς υποδηλώνοντας έτσι την παρουσία Β, Α και C β-λακταμασών αντίστοιχα.

1.2.10.8 MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight)

Η φασματομετρία μάζας είναι μια διαγνωστική μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους και της δομής των οργανικών ενώσεων. Μολονότι εξελίχθηκε τα τελευταία χρόνια σε μια πολλά υποσχόμενη αναλυτική μέθοδο, δεν είναι μια νέα τεχνολογία, αφού εφαρμόζεται ήδη εδώ και τουλάχιστον μισό αιώνα.

Η MALDI-TOF MS είναι μία τεχνική φασματοσκοπίας μάζας με ποικίλες εφαρμογές στη Διαγνωστική – Κλινική Μικροβιολογία. Η κυριότερη εφαρμογή της είναι η ταυτοποίηση βακτηρίων και μυκήτων, η οποία είναι αξιόπιστη, γρήγορη και εξαιρετικά οικονομική. Στη συγκεκριμένη τεχνική το κλινικό δείγμα (αποικία βακτηρίου/μύκητα ή σε κάποιες περιπτώσεις υλικό από καλλιέργεια αίματος, ούρα ή ENY), αναμειγνύεται με ένα κορεσμένο διάλυμα οργανικού υποστρώματος (matrix) και στη συνέχεια το μείγμα τοποθετείται σε μεταλλική πλάκα, έτοιμο για ανάλυση. Ο ρόλος του οργανικού υποστρώματος είναι ουσιαστικός για το ιονισμό του κλινικού δείγματος γιατί λειτουργεί ως προμηθευτής πρωτονίων. Ακολουθεί ακτινοβολία με UV laser η οποία ιονίζει το κλινικό δείγμα/οργανικό υπόστρωμα (MALDI). Τα δημιουργηθέντα ιόντα διαχωρίζονται με το σύστημα TOF βάσει του λόγου μάζας/φορτίου και παράγουν ένα πρωτεϊνικό αποτύπωμα, το οποίο συγκρίνεται σε βάση δεδομένων που περιλαμβάνει πρωτεϊνικά αποτυπώματα γνωστών μικροβίων. Ήδη υπάρχουν διαθέσιμες τράπεζες όπως οι Andromas, Saramis-Biomerieux, Biotyper-Bruker.

Η καταγραφή και η παρουσίαση του φάσματος μαζών είναι το τελικό στάδιο της τεχνικής. Ο φασματογράφος μάζας είναι εφοδιασμένος με ηλεκτρονικό υπολογιστή και η καταγραφή γίνεται ηλεκτρονικά όπου προκύπτουν κορυφές μικρού εύρους, διαφορετικής σχετικής θέσης και ύψους. Το ύψος της κάθε κορυφής είναι ανάλογο με τη σχετική αφθονία του ιόντος που αντιπροσωπεύει, ενώ η

σχετική θέση στον οριζόντιο άξονα αντιπροσωπεύει τελικά το ζητούμενο λόγο μάζας προς φορτίο του εξεταζόμενου ιόντος.

Πρόσφατα η MALDI-TOF χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση μηχανισμών αντοχής (αντοχή σε καρβαπενέμες, αντοχή σε μεθικιλίνη, αντοχή σε γλυκοπεπτιδία). Η μέθοδος βασίζεται στην ανάλυση του αντιβιοτικού και των προϊόντων αποδόμησης του. Συγκεκριμένα η ανίχνευση καρβαπενεμασών γίνεται μετά από επώαση του βακτηρίου με καρβαπενέμη και στη συνέχεια σύγκριση του φάσματος του αντιβιοτικού που δεν έχει υποστεί υδρόλυση με το φάσμα του αντιβιοτικού που υδρολύθηκε.

1.2.10.9 Μοριακές μέθοδοι

Αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Αποτελεί το γρηγορότερο και ασφαλέστερο τρόπο αναγνώρισης καρβαπενεμασών με εξαιρετικά ποσοστά ευαισθησίας. Χρησιμοποιείται ευρέως σε ερευνητικά εργαστήρια προκειμένου να υπερκεραστούν προβλήματα φαινοτυπικής ανίχνευσης στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες.

Αλληλούχιση ολόκληρης της γονιδιακής περιοχής

Αποτελεί την ολοκληρωτική ανίχνευση του γονιδίου της καρβαπενεμάσης. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για επιδημιολογικούς λόγους. Ο χαρακτηρισμός ενός νέου ενζύμου δεν μπορεί να είναι πλήρης αν δεν υπάρχει μοριακή αλληλούχιση και προσδιορισμός του φάσματος υδρόλυσης και αναστολής του καθαρού ενζύμου.

1.2.11 Γενετικό υλικό βακτηρίων και αντοχή

Το γενετικό υλικό των βακτηρίων απαντά σε δύο μορφές: το χρωμόσωμα και τα πλασμίδια. Και στις δύο περιπτώσεις, ωστόσο, πρόκειται για διπλές δεξιόστροφες έλικες DNA, οι οποίες περιέχουν μεταξύ άλλων γονίδια που διακρίνονται σε δομικά και ρυθμιστικά. Ο βαθμός της ομολογίας μεταξύ του γενετικού υλικού των διαφορετικών βακτηρίων αποτελεί σημαντικό κριτήριο για τον προσδιορισμό της φυλογενετικής τους σχέσης (Dobrindt et al, 2001). Η αλληλουχία του γενετικού υλικού των βακτηρίων μπορεί να τροποποιηθεί είτε μέσω εξωγενών παραγόντων, όπως η

ιονίζουσα ακτινοβολία, είτε αυτόματα, όπως στην περίπτωση της διαδικασίας απαμίνωσης, ενώ λόγω των πολλαπλών σταδίων ελέγχου (προσυνθετικός έλεγχος, μετασυνθετικός έλεγχος, μετα-αντιγραφική επιδιόρθωση, ειδικά ένζυμα, κ.α.) τα λάθη σπανίζουν (Ambur *et al*, 2009). Ωστόσο το DNA των βακτηρίων υφίσταται μεταλλάξεις, οι οποίες μπορεί να είναι σημειακές και να έχουν ως αποτέλεσμα την αλλαγή στο πλαίσιο διαβάσματος, είτε μεγαλύτερες του ενός ζεύγους βάσεων, όπως για παράδειγμα οι ελλείψεις.

Χρωμοσωματικό DNA

Το βακτηριακό χρωμόσωμα αποτελείται από ένα κυκλικό δίκλωνο μόριο DNA. Το βακτηριακό χρωμόσωμα είναι υπεύθυνο για όλες τις μεταβολικές λειτουργίες που είναι απαραίτητες για την επιβίωση του βακτηρίου (Wang and Levin, 2009). Το βακτηριακό χρωμόσωμα είναι κατά κανόνα κυκλικό, αν και έχουν παρατηρηθεί και γραμμικά χρωμοσώματα. Το μέγεθος του βακτηριακού χρωμοσώματος ποικίλει (Hacker *et al*, 2003).

Πλασμίδια

Ως ρεπλικόνια (replicons) χαρακτηρίζονται τα μόρια DNA που έχουν την ικανότητα να αυτοπολλαπλασιάζονται, όπως το βακτηριακό χρωμόσωμα, τα πλασμίδια και οι φάγοι. Τα πλασμίδια είναι ρεπλικόνια που ανευρίσκονται στα βακτήρια ως διακριτά εξωχρωμοσωματικά γενετικά στοιχεία. Φέρουν περιοχή έναρξης της αντιγραφής, οπότε είναι ικανά για αναδιπλασιασμό. Το μέγεθος των πλασμιδίων ποικίλει από λίγες μέχρι μερικές εκατοντάδες χιλιάδες βάσεις. Είναι κατά κανόνα κυκλικά, ενώ όπως και στην περίπτωση του βακτηριακού χρωμοσώματος έχουν παρατηρηθεί γραμμικά πλασμίδια.

Τα μεγάλα μεγέθους πλασμίδια (>40 kbp) έχουν συνήθως μικρούς αριθμούς αντιγράφων και κωδικοποιούν για όλες τις λειτουργίες που είναι απαραίτητες για τον αναδιπλασιασμό και το διαχωρισμό τους στα θυγατρικά κύτταρα. Τα μικρά πλασμίδια (<7,5 kbp) υπάρχουν συνήθως σε μεγάλο αριθμό αντιγράφων.

Η ικανότητα ή όχι των πλασμιδίων να συνυπάρχουν σε ένα βακτηριακό κύτταρο τα κατατάσσει σε ομάδες ασυμβατότητας (Carattoli *et al*, 2006). Συγγενικά πλασμίδια που ανήκουν στην ίδια ομάδα πλασμιδιακής ασυμβατότητας δεν μπορούν να συνυπάρξουν στον ίδιο ξενιστή. Τα πλασμίδια που μπορούν να αυτομεταφέρονται από ένα κύτταρο σε κάποιο άλλο κύτταρο ονομάζονται συζευκτικά πλασμίδια και κωδικοποιούν, μεταξύ άλλων λειτουργίες που επάγουν τη μεταφορά του πλασμιδίου μέσω βακτηριακής σύζευξης (Norman *et al*, 2009).

Σε αντίθεση με το βακτηριακό χρωμόσωμα, οι λειτουργίες για τις οποίες είναι υπεύθυνα τα πλασμίδια δεν είναι απολύτως απαραίτητες. Ωστόσο, κάποια πλασμίδια ελέγχουν σημαντικές ιδιότητες των παθογόνων βακτηρίων, όπως η αντοχή στα αντιβιοτικά.

1.2.12. Μεταθετά στοιχεία

Τα μεταθετά στοιχεία είναι γενετικές μονάδες που έχουν την ικανότητα να μετακινούνται μεταξύ διαφορετικών ρεπλικονίων. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί δύο τύποι μεταθετών στοιχείων, τα τρανσποζόνια (transposons) και οι αλληλουχίες εισδοχής (insertion sequences) (Bennett, 2004).

1.2.12.1 Τρανσποζόνια

Σε αντίθεση με τις αλληλουχίες εισδοχής, τα τρανσποζόνια προσδίδουν συνήθως στον φέροντα οργανισμό ένα συγκεκριμένο φαινότυπο. Πρόκειται για τμήματα DNA που μπορούν να μετακινηθούν από μια περιοχή του μορίου του DNA, αλλά δεν έχουν τη δυνατότητα να αυτοπολλαπλασιάζονται. Παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναδιάταξη του γενωμικού υλικού, στη μεταφορά γονιδίων και στην απενεργοποίηση γονιδίων. Κάθε τρανσποζόνιο κωδικοποιεί τις απαραίτητες λειτουργίες για τη μετάθεση του, όπως για παράδειγμα την παραγωγή τρανσποζάσης. Κατά τη μετάθεση, μικρή αλληλουχία της περιοχής-στόχου διπλασιάζεται και το τρανσποζόνιο τοποθετείται μεταξύ της αρχικής αλληλουχίας και της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας. Το μήκος αυτού του διπλασιασμού είναι χαρακτηριστικό του κάθε τρανσποζονίου. Μερικά τρανσποζόνια εντίθεται τυχαία, ενώ άλλα απαιτούν ειδικές αλληλουχίες-στόχους. Η μεταφορά γίνεται με δύο τρόπους, είτε με διπλασιασμό του τρανσποζονίου και μετάθεση του αντιγράφου, είτε με αποκοπή και μετάθεση του ίδιου του τρανσποζονίου.

1.2.12.2 Αλληλουχίες εισδοχής

Οι αλληλουχίες εισδοχής είναι μεταθετά στοιχεία απλούστερα από τα τρανσποζόνια, αφού φέρουν αποκλειστικά και μόνο τα απαραίτητα για την μετακίνησή τους στοιχεία. Οι αλληλουχίες εισδοχής είναι μικρού μοριακού μεγέθους τμήματα DNA και βρίσκονται συχνά τόσο στο βακτηριακό χρωμόσωμα, όσο και στα πλασμίδια. Παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της ικανότητας τους να προκαλούν γενετικές ανακατατάξεις. Επιπλέον, οι αλληλουχίες εισδοχής παίζουν σημαντικό ρόλο στη διασπορά γονιδίων αντοχής. Συγκεκριμένα, δύο αντίγραφα αλληλουχιών εισδοχής που αφορίζουν μια περιοχή, χαρακτηριζόμενη και ως «νησίδα» αντοχής, μπορούν να δράσουν σε συνδυασμό μετακινώντας αυτήν την περιοχή.

Η τυπική δομή μιας αλληλουχίας εισδοχής περιλαμβάνει ακραίες ανεστραμμένες αλληλουχίες (inverted repeats, IR) μήκους 10-40bp. Οι ακραίες ανεστραμμένες αλληλουχίες οριοθετούν τα άκρα της αλληλουχίας εισδοχής και της τρανσποζάσης.

1.2.13 Ιντεγκρόνια τάξης 1

Τα ενσωματόνια ή ιντεγκρόνια είναι γενετικά στοιχεία που έχουν τη δυνατότητα να ενσωματώνουν γονίδια-κασσέτες αντοχής (Labbate *et al*, 2009). Πολλά από τα γονίδια αντοχής στα Gram-αρνητικά βακτήρια συσσωρεύονται σε ενσωματόνια. Τα ενσωματόνια μεταφέρονται μέσω πλασμιδίων και τρανσποζονίων και λειτουργούν ως συστήματα μεταφοράς και έκφρασης γονιδίων.

Έχουν περιγραφεί τουλάχιστον πέντε τάξεις ιντεγκρονίων, που χαρακτηρίζονται κυρίως από την αλληλουχία της αντίστοιχης ιντεγκράσης. Τα ιντεγκρόνια που ανιχνεύονται πιο συχνά στα κλινικά στελέχη των Gram-αρνητικών βακτηρίων και ιδιαίτερα των εντεροβακτηριοειδών, είναι ιντεγκρόνια τάξης 1. Η βασική δομή των ιντεγκρονίων τάξης 1 περιλαμβάνει τρία μέρη τα οποία περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

(α) Το 5' συντηρημένο τμήμα (5' CS, Conserved Segment). Στο 5'CS βρίσκεται το γονίδιο *int1*, που κωδικοποιεί για την ιντεγκράση, η οποία είναι ένζυμο κατευθυνόμενου ανασυνδυασμού (recombinase). Στο 5' άκρο υπάρχει επίσης η ειδική θέση ανασυνδυασμού *attI* και ο υποκινητής μεταγραφής P. η ιντεγκράση εξασφαλίζει τον ανασυνδυασμό μεταξύ της *attI* και μιας δεύτερης θέσης που λέγεται *attC* και βρίσκεται στη γονιδιακή κασσέτα. Έτσι το γονίδιο της κασσέτας ενσωματώνεται στο ενσωματόνιο και μπορεί να μεταγραφεί με υποκινητή τον P του 5'CS.

(β) Τη μεταβλητή περιοχή στην οποία ενσωματώνονται τα γονίδια-κασσέτες αντοχής. Έχουν περιγραφεί περισσότερες από 60 γονιδιακές κασσέτες που σχετίζονται με αντοχή σε αμινογλυκοσίδες, πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες, τριμεθοπρίμη, χλωραμφαινικόλη, ριφαμπικίνη, ερυθρομυκίνη, ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου και κινολόνες. Θεωρητικά κάθε γονιδιακή κασσέτα, πριν από την ενσωμάτωση της, είναι ένα κυκλικό μόριο DNA, που περιέχει την αλληλουχία *attC* και ένα γονίδιο χωρίς υποκινητή (σε αυτή τη μορφή η γονιδιακή πληροφορία δεν μπορεί να εκφραστεί).

(γ) Το 3' συντηρημένο τμήμα (3'CS, Conserved Segment), που περιέχει το γονίδιο *gacEΔ1* για αντοχή στις ενώσεις του τεταρτοταγούς αμμωνίου, το γονίδιο *su1* για αντοχή στις σουλφοναμίδες και το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης *orf5*, ο ρόλος του οποίου δεν είναι γνωστός.

Τα ιντεγκρόνια αποτελούν συχνά τμήματα μεταθετών στοιχείων που βρίσκονται στο βακτηριακό χρωμόσωμα ή σε μεγάλα συζευκτικά πλασμίδια διαφόρων ομάδων ασυμβατότητας (Carattoli, 2001). Τα ιντεγκρόνια είναι ευρέως διαδεδομένα και η μεγάλη τους διασπορά οφείλεται και στη συσχέτιση τους με κινητά γενετικά στοιχεία, όπως τρανσποζόνια, αλληλουχίες εισδοχής και συζευκτικά πλασμίδια. Τα ιντεγκρόνια παίζουν σημαντικό ρόλο στη διασπορά της αντοχής των βακτηρίων στα αντιβιοτικά, αλλά και στην εξέλιξη και προσαρμογή των μικροβιακών ειδών.

Τα περισσότερα, αν όχι όλα τα γονίδια που κωδικοποιούν μεταλλο-β-λακταμάσες βρίσκονται σε γονιδιακές κασσέτες σε ιντεγκρόνια τάξης 1, αν και ορισμένα που κωδικοποιούν IMP ένζυμα

βρίσκονται σε ιντεγκρόνια τάξης 3. Και ενώ οι γονιδιακές κασσέτες που περιέχουν τα γονίδια αντοχής μπορούν να μεταφερθούν εύκολα μεταξύ των ιντεγκρονίων, δεν μπορούν να μεταφερθούν μεταξύ των μικροοργανισμών χωρίς τη βοήθεια άλλων γενετικών στοιχείων όπως πλασμίδια και τρανσποζόνια. Στην πλειοψηφία τους τα MBL γονίδια βρίσκονται σε πλασμίδια 120-180Kb, έχουν όμως ανευρεθεί και σε συζευγμένα πλασμίδια 24Kb στις ΗΠΑ. Παράλληλα έχουν ταυτοποιηθεί τρανσποζόνια όπως το Tn5051 σε στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa* υπεύθυνο για τη διασπορά τάξης 1 ιντεγκρονίου που κωδικοποιούσε μεταλλοένζυμο, μεταξύ χωρών της Ευρώπης.

Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν σχετίζονται όλα τα μεταλλοένζυμα με ιντεγκρόνια ή τρανσποζόνια. Σε στέλεχος *Salmonella enterica* το bla_{SPM-1} γονίδιο κωδικοποιείται σε κοινή μεταθετή περιοχή η οποία σχετίζεται με άλλα μεταθετά στοιχεία που καλούνται SXT περιοχές. Αυτές οι περιοχές κινητοποιούνται όταν το φέρον βακτηριακό κύτταρο βρίσκεται σε κατάσταση stress (π.χ. έκθεση σε φθοριομένες κινολόνες) (Walsh *et al*, 2005).

1.2.14 Γονιδιακές κασσέτες

Προσδιορίζονται από ένα γονίδιο αντοχής με θέση πρόσδεσης ριβοσώματος και θέση ανασυνδυασμού γνωστή ως 59-base element, τοποθετημένη στο γονίδιο της ιντεγκράσης (Nordmann *et al*, 2002). Οι γονιδιακές κασσέτες μπορούν εύκολα να μετακινηθούν μεταξύ ιντεγκρονίων, όχι όμως μεταξύ των μικροοργανισμών χωρίς τη βοήθεια άλλων μεταθετών στοιχείων όπως πλασμίδια και τρανσποζόνια.

1.3 Σκοπός της διατριβής

Σκοπός της μελέτης μας ήταν η ανίχνευση και ο προσδιορισμός του μηχανισμού ανοχής στις καρβαπενέμες σε στελέχη *P. aeruginosa* που απομονώθηκαν από δύο νοσοκομεία, από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές της χώρας.

Αρχικά έγινε προσδιορισμός της MIC (Minimum Inhibitory Concentration) στα διάφορα αντιβιοτικά και φαινοτυπικός έλεγχος για την παραγωγή καρβαπενεμάσης με την τροποποιημένη δοκιμασία Hodge καθώς και με τη δοκιμασία αναστολής με συνδυασμό δίσκων.

Ακολούθησε ανίχνευση των γονιδίων που σχετίζονται με τη παραγωγή καρβαπενεμάσης και μελετήθηκε το γενετικό περιβάλλον της.

Η τυποποίηση των στελεχών που παρήγαγαν καρβαπενεμάση έγινε με MLST (Multi Locus Sequence Typing) και ακολούθησε σύγκριση των κλώνων που απομονώθηκαν σε κάθε νοσοκομείο.

Επιπλέον, στελέχη από τους επικρατέστερους MLST κλώνους μελετήθηκαν για την παθογονικότητα τους με σκοπό να ερμηνευθεί η ικανότητα τους για διασπορά.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Μικροβιολογικό υλικό

Κατά τη διάρκεια ενός οκταμήνου, από τον Μάρτιο έως και τον Οκτώβριο του 2011 απομονώθηκαν συνολικά 813 στελέχη *Pseudomonas aeruginosa* από τα οποία τα 245 προέρχονταν από το Νοσοκομείο Νοσημάτων Θώρακος Αθηνών 'Η Σωτηρία' ενώ τα υπόλοιπα στελέχη από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Όλα τα στελέχη απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα ασθενών που νοσηλεύτηκαν κατά το χρονικό διάστημα της μελέτης στα δύο νοσοκομεία: τραυμάτων-υγρών, ενδοφλέβιων καθετήρων, δειγμάτων αναπνευστικού, ούρων και αίματος.

2.2 Ταυτοποίηση του Μικροοργανισμού με Κλασικές Μεθόδους

2.2.1 Χρώση κατά Gram

Η χρώση κατά Gram αποτελεί την πιο σημαντική χρώση στη βακτηριολογία και χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση βακτηρίων με βάση τις φυσιολογικές ιδιότητες του κυτταρικού τους τοιχώματος (Moyes *et al*, 2009). Για τη χρώση κατά Gram των υπό μελέτη στελεχών χρησιμοποιήθηκε το Gram Color Kit σύμφωνα με το εγχειρίδιο της κατασκευάστριας εταιρείας (Liofilchem).

2.2.2 Σύστημα ταυτοποίησης api 20E

Το api 20E (bioMerieux) αποτελεί ένα προτυποποιημένο σύστημα ταυτοποίησης για *Enterobacteriaceae* και άλλα μη απαιτητικά Gram αρνητικά βακτήρια που χρησιμοποιεί 21 βιοχημικές δοκιμασίες σε μικρογραφία και μια βάση δεδομένων (Smith *et al*, 1972). Για την ταυτοποίηση των υπό μελέτη στελεχών χρησιμοποιήθηκε το εν λόγω σύστημα σύμφωνα με το εγχειρίδιο της κατασκευάστριας εταιρείας (bioMerieux).

2.3 Αντιβιογράμμα

Ο έλεγχος της ευαισθησίας όλων των υπό μελέτη στελεχών στα διαθέσιμα στη κλινική θεραπευτική αντιβιοτικά και δη στις καρβαπενέμες έγινε με τη δοκιμασία διάχυσης σε άγαρ κατά Kirby-Bauer και με τη δοκιμασία διαδοχικών αραιώσεων για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης αυτών (Minimum Inhibitory Concentration, MIC), όπως αναφέρεται αναλυτικότερα παρακάτω.

2.3.1 Δοκιμασία Διάχυσης των Δίσκων

Πρόκειται για την πιο διαδεδομένη και απλή μέθοδο που χρησιμοποιείται στα διαγνωστικά εργαστήρια των νοσοκομείων. Στη συγκεκριμένη μέθοδο, κατάλληλο μικροβιακό εναιώρημα ενοφθαλμίζεται στην επιφάνεια κατάλληλου θρεπτικού υλικού. Στην συνέχεια τοποθετείται δίσκος από διηθητικό χαρτί, εμποτισμένος με κατάλληλη συγκέντρωση αντιβιοτικού. Όταν ο χάρτινος δίσκος έρθει σε επαφή με την υγρή επιφάνεια του υλικού, προσροφά νερό και το αντιβιοτικό διαχέεται στο υλικό που τον περιβάλλει.

Η διάχυση του αντιβιοτικού γίνεται με βάση την αρχή ότι το αντιβιοτικό μετακινείται από περιοχές μεγαλύτερης συγκέντρωσης και εξαρτάται από τις φυσικοχημικές του ιδιότητες. Όσο αυξάνεται η απόσταση από το δίσκο, τόσο μειώνεται (λογαριθμικά) η συγκέντρωση του αντιβιοτικού. Ταυτόχρονα με τη διάχυση του αντιβιοτικού, τα βακτήρια που έχουν τοποθετηθεί στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται. Η ζώνη αναστολής σχηματίζεται στα σημεία όπου η συγκέντρωση του αντιβιοτικού είναι ίση ή μεγαλύτερη από την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC). Από τη διάμετρο της ζώνης αναστολής, ανατρέχοντας στους ερμηνευτικούς πίνακες που συντάσσει ετησίως το CLSI, χαρακτηρίζουμε ένα μικροοργανισμό ως ευαίσθητο, μετρίως ευαίσθητο ή ανθεκτικό, συγκρίνοντας τις διαμέτρους με εκείνες που προτείνει το CLSI για κάθε αντιβιοτικό ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού (CLSI, 2009α). Το CLSI έχοντας αναλύσει μεγάλο αριθμό μικροβιακών στελεχών, με παρόμοιο ρυθμό ανάπτυξης, διαφορετική όμως ευαισθησία, έχει στατιστικά συσχετίσει τη διάμετρο ζώνης αναστολής με την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Minimal Inhibitory Concentration, MIC).

Για την εν λόγω μέθοδο, αρχικά, παρασκευάζεται ομογενές βακτηριακό εναιώρημα 0,5 McFarland (1,5x10⁸ cfu/ml) από μεμονωμένες αποικίες ολονύχτιας καλλιέργειας έκαστου στελέχους. Έπειτα ενοφθαλμίζεται ομοιόμορφα με αυτό η επιφάνεια τρυβλίου με Mueller-Hinton II άγαρ (bioMerieux) και απομακρύνεται η περίσσεια του εναιωρήματος από αυτό. Αφού απορροφηθεί πλήρως η πλεονάζουσα υγρασία, τοποθετούνται τα εμποτισμένα με αντιβιοτικό δισκία (Mast group) στην επιφάνεια του άγαρ και τα τρυβλία επωάζονται ανεστραμμένα σε κλίβανο για 24 ώρες. Τέλος, αξιολογούνται τα αποτελέσματα με βάση τα κριτήρια της CLSI.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα κάτωθι δισκία αντιβιοτικών συγκεκριμένης φόρτισης της εταιρίας Mast group: Amikacin (30 mg), Ampicillin/Sulbactam (20 mg), Aztreonam (30 mg), Cefepime (30 mg), Ceftazidime (30 mg), Ciprofloxacin (5 mg), Colistin (10 mg), Gentamicin (10 mg), Imipenem (10 mg), Levofloxacin (5 mg), Meropenem (10 mg), Minocycline (30 mg), Netilmicin (30 mg), Piperacillin (100 mg), Piperacillin/Tazobactam (110 mg), Tetracycline (30 mg), Ticarcillin (75 mg), Ticarcillin/Clavulanic Acid (85 mg), Tobramycin (10 mg) Trimethoprim/Sulfamethoxazole (25 mg).

2.3.2 Προσδιορισμός Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης (MIC)

Οι μέθοδοι αραίωσης των αντιβιοτικών σε υγρά ή στερεά θρεπτικά υλικά χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο ευαισθησίας των αερόβιων και δυνητικά αναερόβιων βακτηρίων στα αντιβιοτικά. Πρόκειται για μεθόδους προτυποποιημένες από το Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), χρήσιμες ως μέθοδοι αναφοράς τόσο σε κλινικά όσο και σε ερευνητικά εργαστήρια. Η αρχή στην οποία βασίζονται είναι η έκθεση συγκεκριμένου μικροβιακού εναιωρήματος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικού. Η μικρότερη συγκέντρωση αντιβιοτικού που δεν επιτρέπει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού καλείται ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του (MIC). Η MIC δεν παριστάνει μια απολυτή τιμή, ενώ η “αληθινή” MIC μπορεί να βρίσκεται μεταξύ της ελάχιστης συγκέντρωσης που αναστέλλει τη μικροβιακή ανάπτυξη και της αμέσως προηγούμενης αραίωσης που επιτρέπει τη μικροβιακή ανάπτυξη.

Για τον πλήρη προσδιορισμό της MIC χρησιμοποιούνται 10 υποδιπλάσιες αραιώσεις κάθε αντιβιοτικού, αντιπροσωπευτικές των αντιστοιχών θεραπευτικών συγκεντρώσεων (π.χ 0,25, 0,5,1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 και 128 µg/ml). Με βάση τις

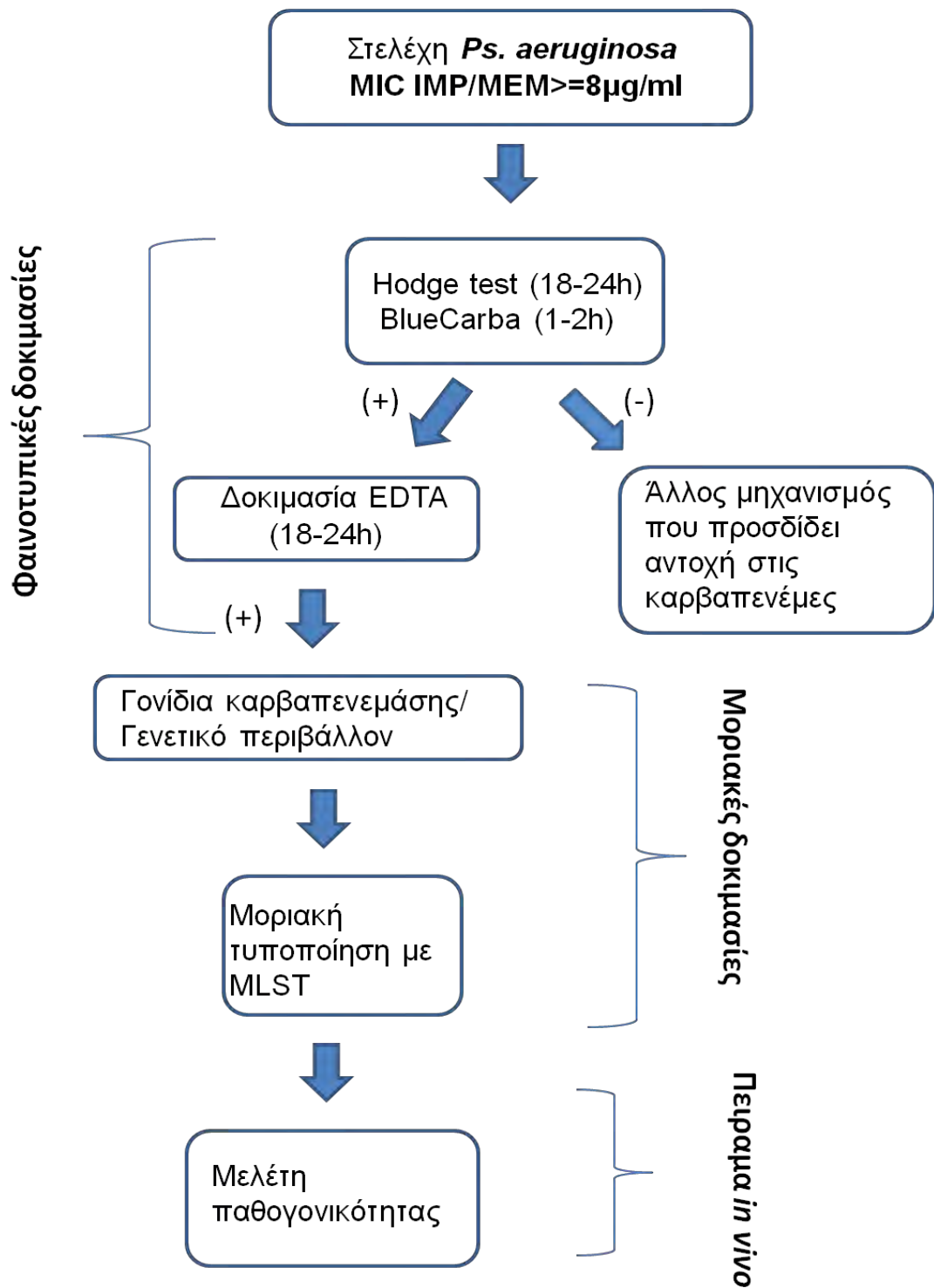
συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών που επιτυγχάνονται στο αίμα και των MIC καθορίζονται 3 κατηγορίες ευαισθησίας οι οποίες ερμηνεύονται ως εξής: i) *ευαίσθητοι* (susceptible, S): μικροοργανισμοί οι οποίοι αναστέλλονται από συγκεντρώσεις αντιβιοτικού, που επιτυγχάνονται στο αίμα κατά τη συνήθη θεραπευτική χορήγηση, ii) *μετρίως ευαίσθητοι* (intermediate, I): μικροοργανισμοί που αναστέλλονται όταν το φάρμακο χορηγείται στη μέγιστη ανεκτή δοσολογία και iii) *ανθεκτικοί* (resistant, R): μικροοργανισμοί οι οποίοι δεν αναστέλλονται από συγκεντρώσεις που επιτυγχάνεται συνήθως στο αίμα.

Η CLSI καθορίζει ανάλογα με το αντιβιοτικό και το μικροοργανισμό δυο κριτικές συγκεντρώσεις: τη μικρή (c) και τη μεγάλη (C). Αν η MIC του υπό εξέταση μικροοργανισμού είναι μικρότερη ή ίση της c ($MIC \leq c$) τότε είναι ευαίσθητος, αν είναι μεγαλύτερη της C ($MIC > C$) είναι ανθεκτικός και αν είναι μεγαλύτερη της c και μικρότερη ή ίση της C ($c < MIC \leq C$) τότε είναι μετρίως ευαίσθητος για το συγκεκριμένο αντιβιοτικό.

Για την εν λόγω μέθοδο, αρχικά, παρασκευάζεται 3 ml ομογενούς βακτηριακού εναιωρήματος 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ cfu/ml) από μεμονωμένες αποικίες ολονύχτιας καλλιέργειας έκαστου στελέχους σε θρεπτικό ζωμό Mueller-Hinton II (Mast group). Αφού γίνεται η παρασκευή των διαδοχικών αραιώσεων των υπό εξέταση αντιβιοτικών (2,5, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 και 1280 $\mu\text{g/ml}$) σε αποστειρωμένα σωληνάρια 13x100 mm με όγκο 300 μl , ενοφθαλμίζονται σε αυτά 300 μl από το παρασκευασθέν βακτηριακό εναιώρημα και προσθέτεται ο κατάλληλος όγκος θρεπτικού ζωμού Mueller-Hinton II (Mast group) μέχρι τελικού όγκου 3 ml (με αντιπροσωπευτικές συγκεντρώσεις αντίστοιχες των θεραπευτικών). Τα σωληνάρια επωάζονται σε κλίβανο για 24 ώρες. Τέλος, αξιολογούνται τα αποτελέσματα με βάση τα κριτήρια της CLSI, θεωρώντας τη μικρότερη συγκέντρωση αντιβιοτικού που αποτρέπει την ανάπτυξη του εν λόγω μικροοργανισμού ως την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση για το συγκεκριμένο αντιβιοτικό (MIC).

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα κατωθι αντιβιοτικά σε σκόνη της εταιρίας Sigma-Aldrich: Amikacin (5 g), Ampicillin (25 g), Aztreonam (50 mg), Clavulanic Acid (10 g), Cefepime (100 mg), Ceftazidime (5 g), Ciprofloxacin (25 g), Colistin (100 mg), Gentamicin (50 mg), Imipenem (25 mg), Levofloxacin (10 mg), Meropenem (10 mg), Minocycline (25 mg), Netilmicin (5 mg), Piperacillin (5 mg), Sulbactam (10 mg), Sulfamethoxazole (10 g), Tazobactam (10 mg), Tetracycline (25 g), Ticarcillin (1 g), Tigecycline (25 mg), Tobramycin (100 mg), Trimethoprim (25 mg).

Η επιλογή των στελεχών έγινε σύμφωνα με την MIC στις καρβαπενέμες (CLSI, 2012) και στη συνέχεια στη μελέτη μας ακολουθήσαμε τον αλγόριθμο που φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 12: Αλγόριθμος Μεθοδολογίας

2.4 Φαινοτυπική Διερεύνηση Αντοχής έναντι Καρβαπενέμων

2.4.1 Τροποποιημένη Δοκιμασία κατά Hodge

Διάφορες απλές φαινοτυπικές δοκιμές, οι περισσότερες των οποίων στηρίζονται στη μέθοδο διάχυσης δίσκων σε άγαρ έχουν περιγραφεί και καθιερωθεί για την αναζήτηση αζιμωτικών βακτηρίων που παράγουν καρβαπενεμάσες, ωστόσο μόνο η τροποποιημένη δοκιμασία κατά Hodge συστήνεται από τη CLSI για την ανίχνευση των εν λόγω βακτηρίων. Η συγκεκριμένη δοκιμασία περιγράφηκε τη δεκαετία του 1970 και αποτελεί μια αποτελεσματική αλλά μη ειδική δοκιμασία ανίχνευσης της παραγωγής καρβαπενεμασών (Hodge *et al*, 1978). Η τροποποιημένη δοκιμασία κατά Hodge στηρίζεται στη μείωση της δραστηριότητας ενός δίσκου καρβαπενέμης έναντι ενός ευαίσθητου στις καρβαπενέμες στελέχους *E. coli* (ATCC 25922), λόγω της παραγωγής καρβαπενεμάσης από το υπό μελέτη στέλεχος. Η συγκεκριμένη δοκιμασία είναι ευαίσθητη για την ανίχνευση ενός ενζυμικού μηχανισμού ανθεκτικότητας έναντι των καρβαπενέμων αλλά δεν δίδει πληροφορίες σχετικά με τον τύπο της καρβαπενεμάσης που παράγει το υπό μελέτη στέλεχος.

Συγκεκριμένα, εναιώρημα πυκνότητας 0,5 McFarland του στελέχους *E. coli* ATCC 25922 ενοφθαλμίζεται σε Mueller-Hinton II άγαρ (MH II agar, bioMerieux) και στο κέντρο του τρυβλίου τοποθετείται δίσκος μεροπενέμης (MEM, 10 μg, Mast group). Από την περιφέρεια του δίσκου προς την περιφέρεια του τρυβλίου γίνεται ακτινωτά αδρός εμβολιασμός με το ύποπτο για παραγωγή καρβαπενεμάσης στέλεχος. Επαναλαμβάνεται η ίδια δοκιμασία με στέλεχος που δεν έχει παράγει καρβαπενεμάση για να χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός μάρτυρας. Μετά από την επώαση για 16 έως 24 ώρες στους 37 °C, αξιολογούνται τα αποτελέσματα και ως θετικό αποτέλεσμα θεωρείται η παραμόρφωση της ζώνης αναστολής του ευαίσθητου στελέχους, δηλαδή η αναστολή της δράσης της μεροπενέμης γύρω από τον αδρό εμβολιασμό του υπό μελέτη στελέχους.

2.4.2 Δοκιμασία Αναστολής με Συνδυασμό Δίσκων

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το θετικό αποτέλεσμα στη τροποποιημένη δοκιμασία κατά Hodge είναι ενδεικτικό παραγωγής καρβαπενεμάσης, χωρίς όμως, να μπορεί να διακριθεί ο τύπος αυτής. Για το σκοπό αυτό, έχει προταθεί η δοκιμασία αναστολής με το συνδυασμό δίσκων που έχουν διαποτιστεί με φαινυλβορονικό οξύ (PBA) ή/και EDTA, παράγοντες που αναστέλλουν εκλεκτικά τη δράση των καρβαπενεμασών των τάξεων A και B αντίστοιχα (Tsakris *et al*, 2010).

Συγκεκριμένα, εναιώρημα πυκνότητας 0,5 McFarland του ύποπτου για παραγωγή καρβαπενεμάσης στελέχους ενοφθαλμίζεται σε Mueller-Hinton II άγαρ και τοποθετούνται επί αυτού τέσσερις δίσκοι μεροπενέμης (MEM, 10 µg, Mast group) σε απόσταση 30 mm το κέντρο του ενός από το κέντρο του άλλου. Στον ένα δίσκο μεροπενέμης δεν προστίθεται τίποτα, ο ένας δίσκος διαποτίζεται με 10 µl διαλύματος EDTA 0,1 M (Sigma-Aldrich), ο άλλος δίσκος διαποτίζεται με 20 µl διαλύματος PBA 20 mg/ml (Sigma-Aldrich) σε DMSO (Sigma-Aldrich) ενώ ο τέταρτος δίσκος διαποτίζεται με 10 µl διαλύματος EDTA 0,1M και 20 µl διαλύματος PBA 20 mg/ml σε DMSO.

Μετά από την επώαση για 18 έως 24 ώρες στους 37 °C αξιολογούνται τα αποτελέσματα της δοκιμασίας. Η μεγαλύτερη ή ίση με 5 mm αύξηση στην άλω αναστολής του δίσκου MEM/EDTA σε σχέση με τον δίσκο MEM είναι ενδεικτική της παραγωγής καρβαπενεμάσης τάξης B, ενώ η μεγαλύτερη ή ίση με 5 mm αύξηση στην άλω αναστολής του δίσκου MEM/PBA σε σχέση με τον δίσκο MEM είναι ενδεικτική της παραγωγής καρβαπενεμάσης τάξης A. Η μεγαλύτερη ή ίση με 5 mm αύξηση στην άλω αναστολής του δίσκου MEM/EDTA/PBA σε σχέση με τον δίσκο MEM είναι ενδεικτική της παραγωγής καρβαπενεμασών τάξης A και B.

2.4.3 Blue-Carba

Πρόκειται για μια άλλη, πρόσφατα προτεινόμενη φαινοτυπική δοκιμασία που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάση. Βασίζεται σε μια απλή βιοχημική αντίδραση στην οποία ως δείκτης pH χρησιμοποιείται το μπλε της βρωμοθυμόλης. Πλεονεκτεί σε σχέση με τη δοκιμασία Hodge διότι δίνει αποτέλεσμα μέσα σε δύο ώρες σε σχέση με τις 24 ώρες που απαιτεί το Hodge test.

Για την δοκιμασία χρησιμοποιήθηκαν υδατικό διάλυμα μπλε της βρωμοθυμόλης 0,04% σε pH=6.0, υδατικό διάλυμα μπλε της βρωμοθυμόλης 0,04% σε pH=7.0, θειικός ψευδάργυρος (ZnSO₄) 10Mm και ιμιπενέμη Tienam 500. Για την εν λόγω μέθοδο, χρησιμοποιήθηκαν μεμονωμένες αποικίες ολονύχτιας καλλιέργειας έκαστου στελέχους σε θρεπτικό άγαρ Mueller-Hinton II.

Για τον έλεγχο 10 στελεχών ετοιμάσαμε 1ml διαλύματος εργασίας: 6mg Tienam (που ισοδυναμεί με 3 mg μονοϋδρικής ιμιπενέμης) διαλύθηκαν σε 990 μL διαλύματος μπλε της βρωμοθυμόλης 0,04% σε pH=6.0 και προστέθηκαν 10 μL θειικού ψευδαργύρου. Στη συνέχεια σε πλάκα 96 θέσεων προσθέσαμε 100 μL του διαλύματος εργασίας για κάθε στέλεχος και 100 μL του διαλύματος για τον αρνητικό μάρτυρα (μπλε της βρωμοθυμόλης 0,04% σε pH=7.0) σε διπλανή θέση της πλάκας. Προσθέσαμε περίπου 5 μL από το καλλιέργημα μας και στις δύο θέσεις και ακολούθησε ομογενοποίηση και επώαση με ανακίνηση (150 rpm) στους 37°C για 2 ώρες. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων έγινε σε 30 λεπτά, 1 και 2 ώρες. Θετική θεωρήθηκε η δοκιμασία, όταν παρατηρήθηκε αλλαγή του χρώματος μεταξύ του υπό μελέτη στελέχους και του αρνητικού του μάρτυρα (Pires *et al*, 2013).

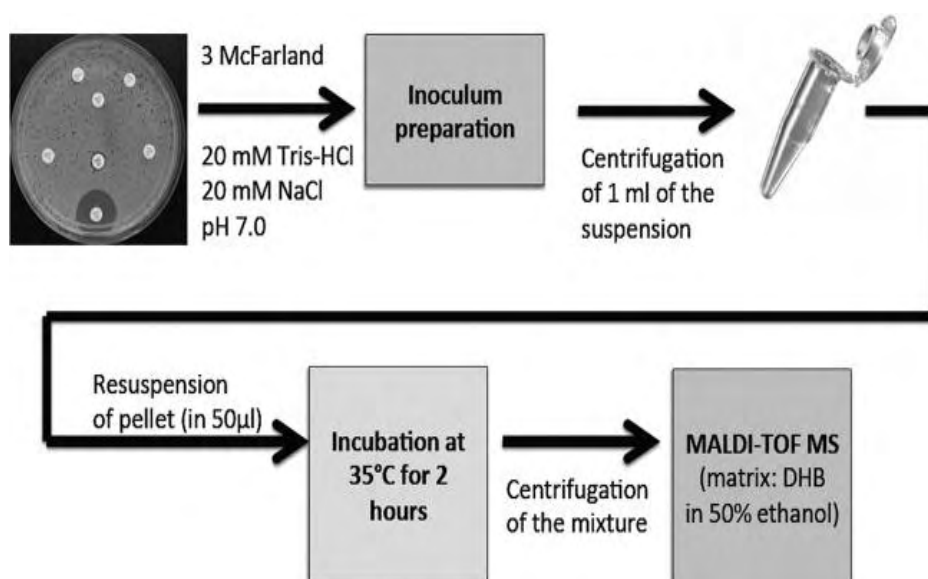
Πίνακας 2: Ερμηνεία της δοκιμασίας Blue Carba

Διάλυμα ελέγχου	Αρνητικός μάρτυρας	Παραγωγή καρβαπενεμάσης
Κίτρινο	Μπλε	+
Κίτρινο	Πράσινο	+
Πράσινο	Μπλε	+
Πράσινο	Πράσινο	-
Μπλε	Μπλε	-

2.4.4 MALDI-TOF MS

Η μέθοδος MALDI-TOF MS εφαρμόστηκε σε 33 στελέχη *Ps. aeruginosa* τα οποία εμφάνισαν αντοχή στις καρβαπενέμες. Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε η εμπορικά διαθέσιμη μεροπενέμη που περιέχει ανθρακικό νάτριο (Meropenem, 500 mg; AstraZeneca UK, Ltd., Macclesfield, United Kingdom). Ως θεμέλια ουσία χρησιμοποιήθηκε 10 mg/ml, 2,5 διυδροξυβενζοϊκό οξύ και 0,1μM ρεσερπίνη (reserpine) διαλυμένα σε 50% αιθανόλη (Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic).

Αποικίες των στελεχών, μετά από ολονύχτια επώαση σε Mueller Hinton άγαρ αναμιγνύονται με ρυθμιστικό διάλυμα (20mM Tris-HCL-20mM NaCl, pH 7.0) με πυκνότητα 3.0 McFarland. 1ml από το διάλυμα αυτό φυγοκεντρείται και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 50μl ρυθμιστικό διάλυμα (20mM Tris-HCL, 0,01% SDS pH 7.0) που περιείχε 0,1mM μεροπενέμη. Ακολουθεί επώαση στους 35°C για 2 ώρες και φυγοκέντρωση. Τέλος, 1 μl από το υπερκείμενο αναμιγνύεται με ποσότητα 1 μl από το διάλυμα της θεμέλιας ουσίας, εφαρμόστηκε πάνω στη πλάκα (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany; MSP 96 Target, catalog no. 224989) και παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στεγνώσει. Έγινε σύγκριση της μεθόδου MALDI-TOF MS με υδρόλυση της μεροπενέμης και μιας τροποποιημένης MALDI-TOF MS. Η τροποποιημένη MALDI-TOF MS διαφέρει από την προηγούμενη στο γεγονός ότι στο ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης προστέθηκε 50mM NH₄HCO₃ (pH 7).



Εικόνα 13: Δοκιμασία υδρόλυσης για ανίχνευση καρβαπενεμασών (Hrabak et al, 2012)

Οι μετρήσεις έγιναν μεταξύ 160 και 600 m/z χρησιμοποιώντας φασματομέτρο Microflex LT (Bruker Daltonics) τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα software flex-Analysis, version 3.3 (Bruker Daltonics) σε εύρος μεταξύ 350 και 480 m/z. Για την ανίχνευση στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες έχουν ανιχνευθεί δυο προϊόντα αποδόμησης της μεροπενέμης στα 358,5 και στα 380,5 m/z. Οι κορυφές αυτές απουσιάζουν στα στελέχη που δεν παράγουν καρβαπενεμάσες. Τα κριτήρια για την παραγωγή καρβαπενεμάσης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3: Κριτήρια για την παραγωγή καρβαπενεμάσης

ΚΟΡΥΦΗ (m/z) ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΓΙΑ		
ΚΡΙΤΗΡΙΑ	ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΥΝ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ	ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΑΓΟΥΝ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΕΣ
ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΜΙΑΣ ΤΟΥΛΑΧΙΣΤΟΝ ΚΟΡΥΦΗΣ	358.5 (decarboxylated product) 380.5 (sodium salt of decarboxylated product)	384.5 (meropenem) 406.5 (meropenem sodium salt)
ΑΠΟΥΣΙΑ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΚΟΡΥΦΩΝ	384.5 (meropenem) 406.5 (meropenem sodium salt)	358.5 (decarboxylated product) 380.5 (sodium salt of decarboxylated product)

2.5 Μοριακές Μέθοδοι

2.5.1 Εκχύλιση Γενετικού Υλικού

Το DNA είναι η απαραίτητη πρώτη ύλη των περισσότερων πειραματικών διεργασιών της μοριακής μικροβιολογίας και η απελευθέρωση του σε διαλυτή μορφή μετά από ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών καθώς και μεμβρανών υποκυτταρικών οργανιδίων όπως οι πυρήνες, είναι προϋπόθεση για κάθε περαιτέρω διαδικασία.

Η εκχύλιση του DNA απαιτεί την λύση των κυττάρων, την απενεργοποίηση των ενδοκυτταρικών νουκλεασών και τον διαχωρισμό του από τα κυτταρικά υπολείμματα. Η λύση των κυττάρων, η οποία πραγματοποιείται είτε με μηχανική διάρρηξη είτε με εφαρμογή χημικών ή ενζύμων, πρέπει να είναι αφενός ισχυρή ώστε να τμηματοποιήσει το βακτηριακό κύτταρο και αφετέρου ήπια ώστε να διατηρηθεί ακέραιο το DNA. Η απενεργοποίηση των ενδοκυτταρικών νουκλεασών πραγματοποιείται με τη χρήση ισχυρών χαστροπικών αλάτων, ενώ η απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμμάτων επιτυγχάνεται με φιλτράρισμα ή κατακρήμνιση.

Η εκχύλιση του DNA διενεργήθηκε με τη χρήση του Quick-gDNA MiniPrep Kit, σύμφωνα με το εγχειρίδιο της κατασκευάστριας εταιρίας (Zymo Research Corp). Συγκεκριμένα, αρχικά προετοιμάζονται 200 μl ομογενούς εναιωρήματος 3 McFarland (9x10⁸ cfu/ml) έκαστου στελέχους σε WFI, στο οποίο προστίθεται τετραπλάσιος όγκος (800 μl) Genomic Lysis Buffer, το μίγμα αναδεύεται με τη χρήση vortex και εν συνεχεία επωάζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10 λεπτά. Έπειτα, το μίγμα μεταφέρεται σε στήλη (Zymo-Spin™ Column), η οποία έχει τοποθετηθεί σε σωλήνα συλλογής, φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου σε 10.000 g για 1 λεπτό και το διήθημα απορρίπτεται. Ακολούθως, προστίθενται 200 μl DNA Pre-Wash Buffer στη στήλη, η οποία φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου σε 10.000 g για 1 λεπτό και το διήθημα απορρίπτεται. Εν συνεχεία, προστίθενται 500 μl g-DNA Wash Buffer στη στήλη η οποία φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου σε 10.000 g για 1 λεπτό και το διήθημα απορρίπτεται. Η στήλη μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα συλλογής και προστίθενται σε αυτή 50 μl DNA Elution Buffer, επωάζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 λεπτά και φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου στη μέγιστη δυνατή ταχύτητα για 30 sec. Τέλος, για την ανίχνευση της παρουσίας και την ποσοτικοποίηση γενετικού υλικού στο διήθημα (~50 μl) ακολούθησε ηλεκτροφόρηση 5 μl του διηθήματος σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8 % (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE και φωτογράφηση.

2.5.2 Ηλεκτροφόρηση σε Πήκτωμα Αγαρόζης

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό και την αναγνώριση τμημάτων DNA είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η τεχνική αυτή είναι απλή, γρήγορη και ικανή να διαχωρίζει μίγματα τμημάτων DNA που δεν μπορούν να διαχωριστούν με άλλες τεχνικές.

Σύμφωνα με αυτή την τεχνική, τα τμήματα DNA αναγκάζονται να κινηθούν μέσω των πόρων που σχηματίζονται σε πήκτωμα αγαρόζης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται κυρίως από τέσσερις παραμέτρους: το μέγεθος του DNA, τη συγκέντρωση της αγαρόζης, τη στερεοδιάταξη του DNA και την ένταση του ρεύματος. Η θέση του DNA στο πήκτωμα προσδιορίζεται υπό υπεριώδες φως με τη χρήση μικρής συγκέντρωσης βρωμιούχου αιθιδίου, μιας φθορίζουσας χρωστικής που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις αζωτούχες βάσεις του DNA.

Συγκεκριμένα, η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε οριζόντια συσκευή και η συγκέντρωση του πηκτώματος ήταν 0,8% (w/v) αγαρόζη (Lonza) σε διάλυμα TBE 1X (Lonza). Στο διάλυμα αγαρόζης είχε εξ αρχής προστεθεί 0,6% διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (Sigma-Aldrich) συγκέντρωσης 10 mg/ml. Στα δείγματα του DNA έγινε προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης 6X (1:5, Fermentas) και στη συνέχεια φορτώθηκαν στα διαμορφωμένα πηγαδάκια του πηκτώματος. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν στα 80 V για 45 περίπου λεπτά της ώρας. Ακολούθησε παρατήρηση του πηκτώματος σε συσκευή με υπεριώδη ακτινοβολία και φωτογράφησή του.

2.5.3 Καθαρισμός Προϊόντων της PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR ώστε να επακολουθήσει η διαδικασία της αλληλούχισής τους έγινε με το PureLink PCR Purification Kit, σύμφωνα με το εγχειρίδιο της κατασκευάστριας εταιρίας (Invitrogen).

Συγκεκριμένα, αρχικά προσθέτονται 10 ml ισοπροπανόλης 100% και 32 ml αιθανόλης 96-100% στα 15 ml Binding Buffer και στα 8 ml Wash Buffer αντίστοιχα και τα διαλύματα αναδεύονται ελαφρώς ώστε να καταστούν ομοιογενή. Εν συνεχεία, προστίθεται τετραπλάσιος όγκος ανασυσταμένου με ισοπροπανόλη Binding Buffer από τον όγκο του προϊόντος της PCR σε καθένα από αυτά και αναμειγνύεται καλά. Τοποθετείται έκαστο από τα παραπάνω διαλύματα Binding Buffer-προϊόντος της PCR σε στήλη φυγοκέντρησης (PureLink). Φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό στα 10.000 g και απορρίπτεται το διήθημα. Έπειτα, προσθέτονται σε έκαστη

στήλη 650 μl ανασυσταμένου με αιθανόλη Wash Buffer και φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό στα 10.000 g και απορρίπτεται εκ νέου το διήθημα. Επαναφυγοκεντρείται έκαστη στήλη σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά στη μέγιστη δυνατή ταχύτητα και απορρίπτεται το διήθημα ώστε να απομακρυνθούν τα τυχόν υπολείμματα του Wash Buffer. Έπειτα, απορρίπτονται οι σωλήνες συλλογής και έκαστη στήλη τοποθετείται σε σωλήνα έκλουσης PureLink (1,7 ml), και προσθέτονται 50 μl Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) στο κέντρο κάθε στήλης. Ακολούθως, επωάζονται οι στήλες για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούνται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά στη μέγιστη δυνατή ταχύτητα. Τέλος, 5 μl από το διήθημα (~50 μl) που περιέχει το καθαρισμένο προϊόν της PCR, υποβάλλεται σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

2.5.4 Ανάλυση αλληλουχίας DNA (Sequencing)

Η ανάλυση της αλληλουχίας του DNA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Sanger, γνωστή και ως διδεόξυ-μέθοδος, που βασίζεται στον βασηο-ειδικό τερματισμό μιας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης επέκτασης εκκινητή.

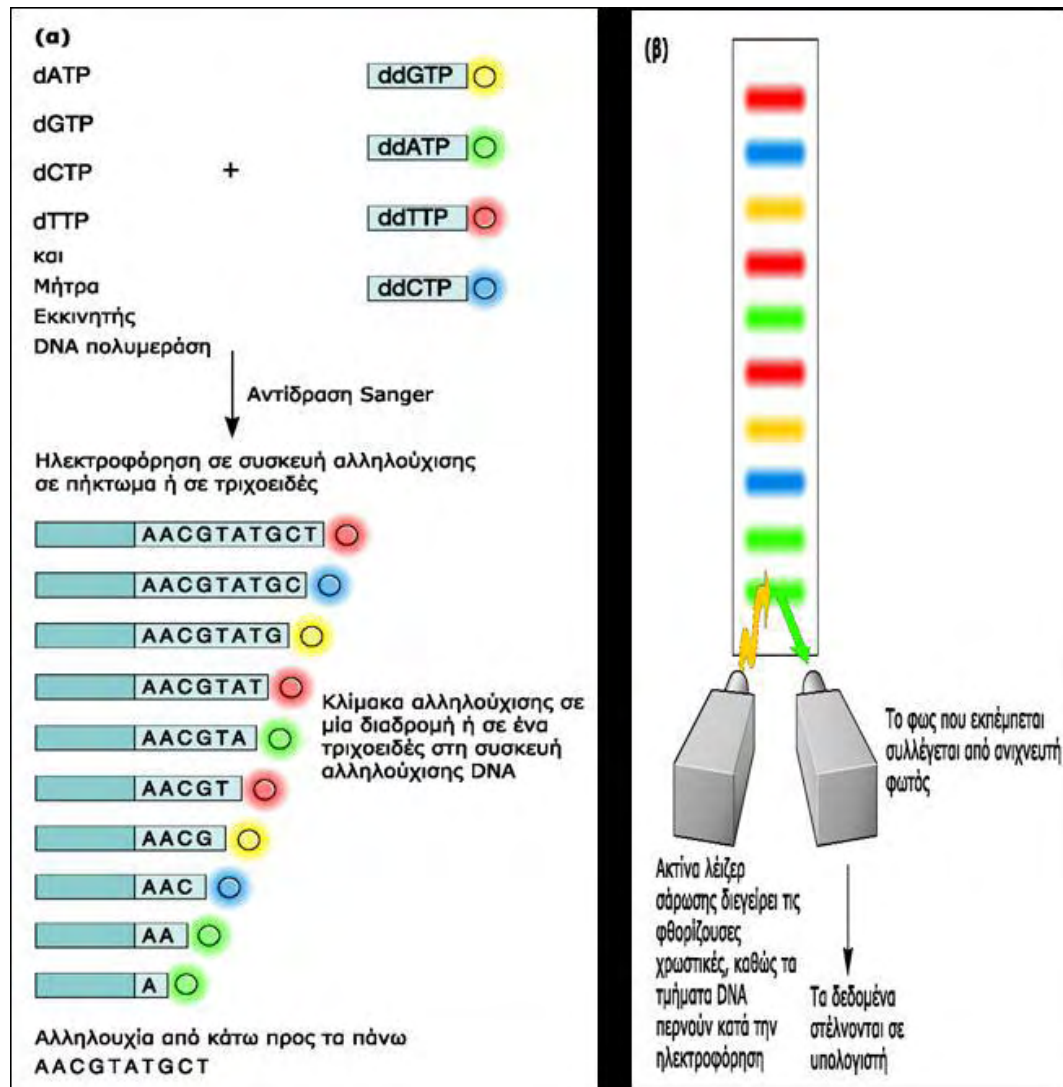
Σύμφωνα με αυτή, διενεργείται μια αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την εκτέλεση τις οποίας εκτός των τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων χρησιμοποιούνται και τροποποιημένα νουκλεοτίδια (διδεόξυριβονουκλεοτίδια) που δύναται να σταματούν την επέκταση της συμπληρωματικής αλυσίδας.

Το διδεόξυριβονουκλεοτιδιο αυτό μπορεί να ενσωματώνεται στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, όμως δεν μπορεί να σχηματίσει φωσφοδιεστερικό δεσμό με επόμενο νουκλεοτίδιο, γιατί λείπει το υδροξύλιο στην 3' θέση. Τα διδεοξυριβονουκλεοτίδια αυτά είναι σημασμένα το καθένα με διαφορετική φθορίζουσα χημική ομάδα. Έτσι, σχηματίζεται μείγμα προϊόντων τερματισμού που μπορεί να έχουν οποιαδήποτε από τις τέσσερις βάσεις στο 3' άκρο τους. Τα προϊόντα αυτά προκύπτουν από την ενσωμάτωση ενός διδεοξυριβονουκλεοτιδίου σε μία τυχαία θέση κατά τη σύνθεση.

Επειδή οι 4 φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται εκπέμπουν φωτεινή ακτινοβολία σε διαφορετικό μήκος κύματος, η ταυτότητα της βάσης στην οποία τερματίζεται η σύνθεση αντιστοιχεί στο χρώμα του διδεοξυριβονουκλεοτιδίου που έχει ενσωματωθεί στο 3' άκρο.

Όταν τα προϊόντα αυτής της αντίδρασης ηλεκτροφορηθούν στη σειρά, η ακολουθία με την οποία τα νουκλεοτίδια προστίθενται στον εκκινητή δύναται να βρεθεί

από τα αυξανόμενου μεγέθους διαδοχικά θραύσματα που προκύπτουν στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης της συσκευής αυτόματης αλληλούχισης.

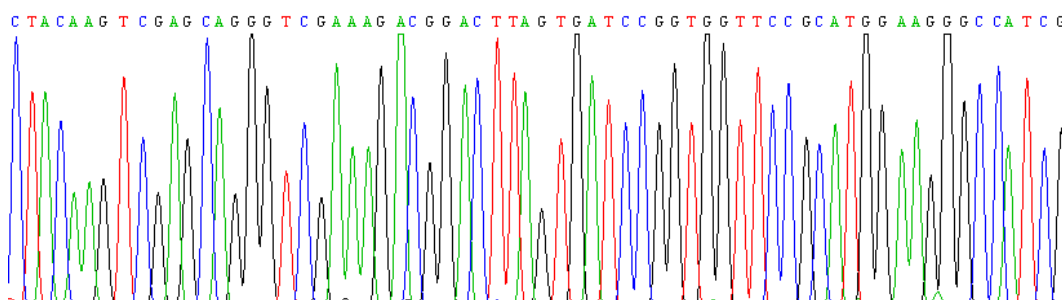


Εικόνα 14: Διαδικασία αλληλούχισης βάση της αυτοματοποιημένης μεθόδου Sanger (Watson et al, 2007)

Τα κομμάτια μεταναστεύουν σύμφωνα με το μέγεθος τους και οι φθορίζουσες χρωστικές διακρίνουν ποιο νουκλεοτίδιο είναι στο τέλος κάθε κομματιού. Κάθε διαδοχικό τμήμα είναι κατά ένα νουκλεοτίδιο μεγαλύτερο από το προηγούμενο. Οι φθορίζουσες χρωστικές διεγείρονται από την ακτίνα laser ενός ανιχνευτή, καθώς τα τμήματα περνούν κατά την ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 1). Ο αισθητήρας του ανιχνευτή καταγράφει την ένταση και το μήκος κύματος του φωτός, μετατρέπει το σήμα φθορισμού σε ηλεκτρικό σήμα και το στέλνει σε έναν υπολογιστή. Αυτό το σήμα αναλύεται με αλγόριθμους

ειδικούς για αλληλούχιση, οι οποίοι αναγνωρίζουν τη βάση που βρίσκεται στο 3' άκρο του τμήματος, δηλαδή από το μικρότερο στο μεγαλύτερο τμήμα.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε ένα ηλεκτροφερόγραμμα (electropherogram), μια σειρά, δηλαδή από κορυφές που αντιστοιχούν σε κάποια βάση ανάλογη με το χρώμα φθορισμού (Εικόνα 2). Συγκεκριμένα αναπαριστάται η ένταση των φθορίζοντων σημάτων ως συνάρτηση του χρόνου ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 15: Ηλεκτροφερόγραμμα ανάλυσης πρωτοδιάταξης αλληλουχίας DNA.

2.5.5 Σύγκριση Αλληλουχιών DNA

Οι συγκρίσεις με τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες της GeneBank πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των προγραμμάτων της οικογένειας BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al*, 1990), που είναι διαθέσιμα στο δικτυακό τόπο του NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) και συγκεκριμένα του προγράμματος BLASTN.

Το αποτέλεσμα της σύγκρισης με το εν λόγω πρόγραμμα απεικονίζεται από το λογισμικό BLAST με τη μορφή νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (BLAST hits) στοιχισμένων με την αλληλουχία που αποτελεί το ερώτημα (Query) της σύγκρισης. Επιπλέον, αναφέρεται το ποσοστό ταυτότητας μεταξύ του κάθε BLAST hit και της αλληλουχίας Query, καθώς και η τιμή E, η οποία εκφράζει την στατιστική σπουδαιότητα κάθε στοίχισης, δηλαδή την πιθανότητα η στοίχιση να είναι τυχαία.

2.6 Μοριακή Ανίχνευση γονιδίων Καρβαπενεμασών

2.6.1 Ανίχνευση Γονιδίων Καρβαπενεμασών Τάξης B

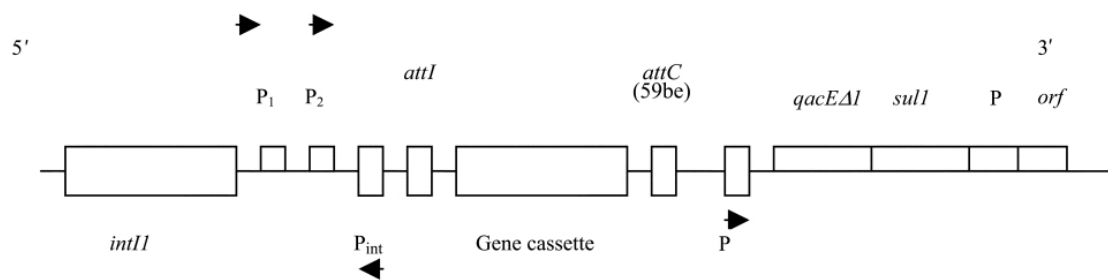
Στα απομονωθέντα στελέχη με ανοχή στις καρβαπενέμες διενεργήθηκε η ανίχνευση των αλληλομόρφων γονιδίων των καρβαπενεμασών GIM, IMP, NDM, SIM, SPM και VIM με τη τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) σε συνδυασμό με θερμοανθεκτική πολυμεράση ικανή να ενισχύει τμήματα έως 5 kb. Για την ανίχνευση των αλληλομόρφων γονιδίων της καρβαπενεμάσης GIM χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών με τις αλληλουχίες: *bla*GIMF: 5'-AGAACCTTGACCGAACGCAG-3' (837–856, εμπρόσθιος) και *bla*GIMR: 5'-ACTCATGACTCCTCACGAGG-3' (1584–1565, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία AJ620678.1), οι οποίοι ενισχύουν ένα τμήμα 728 bp αυτού (Castanheira *et al*, 2004). Για την ανίχνευση των αλληλομόρφων γονιδίων της καρβαπενεμάσης IMP σχεδιάστηκε και χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών με τις αλληλουχίες: *bla*IMPf: 5'-CCGCAGCAGAGTCTTTACC-3' (147-165, εμπρόσθιος) και *bla*IMPR: 5'-AACAACCAGTTTTGCCTTA-3' (618-636, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία AY055216.1), οι οποίοι ενισχύουν ένα τμήμα 489 bp αυτού, ενώ για την ανίχνευση των αλληλομόρφων γονιδίων της καρβαπενεμάσης NDM σχεδιάστηκε και χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών με τις αλληλουχίες: *bla*NDMF: 5'-TGGCAGCACACTTCTATC-3' (279-297, εμπρόσθιος) και *bla*NDMR: 5'-AGATTGCCGAGCGACTTG-3' (749-766, ανάστροφος), οι οποίοι ενισχύουν ένα τμήμα 487 bp αυτού (αρίθμηση κατά την αλληλουχία KC347597.1). Επιπλέον, για την ανίχνευση των αλληλομόρφων γονιδίων των καρβαπενεμασών SIM και SPM χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών με τις αλληλουχίες: *bla*SIMF: 5'-GTACAAGGGATTCGGCATCG-3' (126–145, εμπρόσθιος) και *bla*SIMR: 5'-TGGCCTGTTCCCATGTGAG-3' (694–676, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία AY887066.1) και *bla*SPMF: 5'-CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG-3' (11-31, εμπρόσθιος) και *bla*SPMR: 5'-CCTTTTCCGCGACCTTGATC-3' (789-808, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία AJ492820.1), οι οποίοι ενισχύουν τμήματα 550 bp και 797 bp αυτών αντίστοιχα (Mendes *et al*, 2007). Τέλος, για την ανίχνευση των αλληλομόρφων γονιδίων της καρβαπενεμάσης VIM χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών με τις αλληλουχίες: *bla*VIMF: 5'-AGTGGTGAGTATCCGACA-3' (1339-1357, εμπρόσθιος) και *bla*VIMR: 5'-ATGAAAGTGCGTGGAGAC-3' (1599-1617, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία Y18050.2), οι οποίοι ενισχύουν ένα τμήμα 261 bp αυτού (Tsakris *et al*, 2000). Η σύσταση του μίγματος για τις εν λόγω αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης ήταν η εξής: 40 ng γενωμικού DNA, 50 mM KCl, 10 mM Tris–HCl (pH 8,8),

0,08% (v/v) Nonidet P40, 2 Units Taq DNA πολυμεράση (Fermentas), 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂ και 1 mM από κάθε εκκινητή. Το πρόγραμμα των συγκεκριμένων αντιδράσεων ξεκινούσε με ένα αρχικό στάδιο στους 94 °C για 5 λεπτά και ακολουθούσαν 35 κύκλοι ο καθένας από τους οποίους περιελάμβανε 1 λεπτό σε θερμοκρασία αποδιάταξης (94 °C), 1 λεπτό σε θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητικών μορίων στο DNA στόχο (56 °C) και 1 λεπτό σε θερμοκρασία επέκτασης των νεοσυντιθέμενων πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων (72 °C). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε με ένα τελικό στάδιο στους 72 °C για 5 λεπτά. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε οριζόντια συσκευή σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (w/v) σε διάλυμα TBE 1X και ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR με το PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen). Η αλληλούχιση και προς τις δυο κατευθύνσεις των τμημάτων ενίσχυσης στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, ενώ για την σύγκριση της προκύπτουσας αλληλουχίας με τις πρότυπες αλληλουχίες των διαφόρων αλληλομόρφων εκάστης καρβαπενεμάσης χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MEGA4 (Tamura *et al*, 2007).

2.7 Χαρακτηρισμός του γενετικού περιβάλλοντος

2.7.1 Χαρτογράφηση Δομών Ιντεγκρονίου

Η πιθανή συσχέτιση των γονιδίων των καρβαπενεμασών με ιντεγκρονιακές δομές διερευνήθηκε με τον συνδυασμό εκκινητών ειδικών για έκαστο γονίδιο καρβαπενεμασών και εκκινητών ειδικών για τις συντηρημένες περιοχές 5'-CS και 3'-CS της δομής των ιντεγκρονίων. Αναλυτικότερα, η χαρτογράφηση των εν λόγω δομών έγινε με δύο αντιδράσεις PCR για κάθε στέλεχος όπου χρησιμοποιήθηκαν ο 5'-CS εκκινητής με τον αντίστοιχο ανάστροφο εκκινητή του γονιδίου (*reverse*) που κωδικοποιεί για την υπό μελέτη καρβαπενεμάση στη μία αντίδραση και ο 3'-CS εκκινητής με τον αντίστοιχο εμπρόσθιο εκκινητή του γονιδίου (*forward*) που κωδικοποιεί για την υπό μελέτη καρβαπενεμάση στην άλλη (Εικόνα 4).



Εικόνα 16: Δομή Ιντεγκρονίου Τάξης I (*attI*: Θέση ενσωμάτωσης, *attC*: αλληλουχία αναγνώρισης από την ιντεγκράση, P: υποκινητής, P1: υποκινητής για τη γονιδιακή κασέτα, P2: δεύτερος υποκινητής, P_{int}: υποκινητής για το γονίδιο της ιντεγκράσης, *orf*: ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης, *qacEΔ1*: μερικώς διαγραμμένο γονίδιο υπεύθυνο για την ανθεκτικότητα στις ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου, *Sul1*: γονίδιο ανθεκτικότητας στις σουλφοναμίδες).

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές με τις αλληλουχίες: 5'-CS: 5'-GGCATCCAAGCAGCAAG-3' (271-287, εμπρόσθιος) και 3'-CS: 5'-AAGCAGACTTGACCTGA-3' (976-992, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία EU118149.2) σε συνδυασμό με θερμοανθεκτική πολυμεράση ικανή να ενισχύει τμήματα έως 20 kb. Η σύσταση του μίγματος για τις εν λόγω αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης ήταν η εξής: 40 ng γενωμικού DNA, 60 mM Tris-SO₄ (pH 8,9), 18 mM (NH₄)₂SO₄, 2 Units Taq DNA πολυμεράση (Invitrogen), 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgSO₄ και 1 mM από κάθε εκκινητή.

Το πρόγραμμα των συγκεκριμένων αντιδράσεων ξεκινούσε με ένα αρχικό στάδιο στους 94 °C για 5 λεπτά και ακολουθούσαν 35 κύκλοι ο καθένας από τους οποίους περιελάμβανε 1 λεπτό σε θερμοκρασία αποδιάταξης (94 °C), 1 λεπτό σε θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητικών μορίων στο DNA στόχο (56 °C) και 6 λεπτά σε θερμοκρασία επέκτασης των νεοσυντιθέμενων πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων (72 °C). Οι αντιδράσεις ολοκληρώθηκαν με ένα τελικό στάδιο στους 72 °C για 10 λεπτά.

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε οριζόντια συσκευή σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (w/v) σε διάλυμα TBE 1X (Lonza) και ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR με το PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen). Η αλληλούχιση και προς τις δυο κατευθύνσεις των τμημάτων ενίσχυσης στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, χρησιμοποιώντας και εσωτερικούς εκκινητές όπου απαιτούνταν και για την συναρμολόγηση της πλήρους αλληλουχίας του ιντεγκρονίου χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MEGA4 (Tamura *et al*, 2007).

2.8 Μοριακή Τυποποίηση Στελεχών

2.8.1 Τυποποίηση με BOX-PCR

Για την αρχική τυποποίηση των απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών *P. aeruginosa* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος BOX-PCR. Οι BOX αλληλουχίες ανήκουν σε μια από τις τρεις οικογένειες επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών που έχουν περιγραφεί στο προκαρυωτικό γονιδίωμα (REP, ERIC και BOX αλληλουχίες), οι οποίες περιλαμβάνουν παλίνδρομα τμήματα μεγέθους 35-40 bp. Η εν λόγω μέθοδος, για τη τυποποίηση βακτηριακών στελεχών χρησιμοποιεί μόρια εκκινητές συμπληρωματικά προς υψηλά συντηρημένες επαναλαμβανόμενες DNA αλληλουχίες, που απαντώνται σε πολλαπλά αντίγραφα, σε διακριτές θέσεις επί του γονιδιώματος των περισσότερων αρνητικών και θετικών κατά Gram βακτηρίων.

Μόρια εκκινητές συμπληρωματικά με εξαιρετικά συντηρημένες αλληλουχίες της *boxA* υπομονάδας του στοιχείου BOX, έχουν σχεδιαστεί προκειμένου να ενισχυθούν οι περιοχές του προκαρυωτικού γονιδιώματος μεταξύ των BOX στοιχείων. Τα ενισχυμένα κομμάτια μπορούν να ηλεκτροφορηθούν σε πήκτωμα αγαρόζης και να διαχωριστούν, δίνοντας την εικόνα ενός ραβδωτού κώδικα, μοναδικού για κάθε στέλεχος.

Προκειμένου να ενισχυθούν οι περιοχές του προκαρυωτικού γονιδιώματος μεταξύ των BOX αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε ένα εκκινητικό μόριο, διότι οι BOX αλληλουχίες στο προκαρυωτικό γονιδίωμα απαντώνται ως παλίνδρομες επαναλήψεις. Για την τυποποίηση των στελεχών χρησιμοποιήθηκε το εκκινητικό μόριο με την αλληλουχία: *BOXA1R*: 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3' (Versalovic *et al*, 1995).

Η σύσταση του μίγματος για την εν λόγω αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ήταν η εξής: 40 ng γενωμικού DNA, 10 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 0,1% Triton X-100, 1 Unit TaqDNA πολυμεράση (Fermentas), 0,2 mM dNTPs, 3,75 mM MgCl₂, 1 mM από κάθε εκκινητή και 4% DMSO. Το πρόγραμμα της συγκεκριμένης αντίδρασης ξεκινούσε με ένα αρχικό στάδιο στους 94 °C για 5 λεπτά και ακολουθούσαν 35 κύκλοι ο καθένας από τους οποίους περιελάμβανε 1 λεπτό σε θερμοκρασία αποδιάταξης (94 °C), 1 λεπτό σε θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητικών μορίων στο DNA στόχο (51 °C) και 3:30 λεπτά σε θερμοκρασία επέκτασης των νεοσυντιθέμενων πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων (72 °C). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε με ένα τελικό στάδιο στους 72 °C για 16 λεπτά.

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε οριζόντια συσκευή σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% (w/v) με διάλυμα TAE 1X (Lonza) και 0,6% διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (Sigma-Aldrich) συγκέντρωσης 10 mg/ml στα 50 V για 5 ώρες. Τέλος, το παραχθέν πρότυπο των ζωνώσεων παρατηρήθηκε και φωτογραφήθηκε υπό υπεριώδες φως.

2.8.2 Τυποποίηση με MLST

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η τυποποίηση πολυτοπικής αλληλούχισης (MLST) αποτελεί μέθοδο χαρακτηρισμού και τυποποίησης των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών σε μοριακό επίπεδο. Συνοπτικά, κάθε σχήμα MLST βασίζεται στην ανάλυση συνήθως επτά γονιδίων που κωδικοποιούν κρίσιμες μεταβολικές πρωτεΐνες για το βακτηριακό κύτταρο. Τα υπό μελέτη στελέχη, ορίζονται από τα αλληλόμορφα που είναι παρόντα σε αυτούς τους επτά γονιδιακούς τόπους και αποτελούν το αλληλικό προφίλ έκαστου στελέχους. Κάθε μοναδικό αλληλικό προφίλ αντιστοιχεί σε ένα συγκεκριμένο τύπο αλληλουχίας (ST), στον οποίο ανήκει κάθε βακτηριακό στέλεχος. Στελέχη με τον ίδιο ST χαρακτηρίζονται από όμοιες γονιδιακές αλληλουχίες για τα υπό εξέταση γονίδια και θεωρείται ότι αποτελούν μέλη του ίδιου κλώνου.

Για τη τυποποίηση των απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών *P. aeruginosa* χρησιμοποιήθηκε το διαθέσιμο σχήμα MLST (Curran *et al*, 2004). Στα απομονωθέντα στελέχη διενεργήθηκε η ενίσχυση και αλληλούχιση των γονιδίων *acsA* (συνθετάση του ακετυλο-συνενζύμου Α), *aroE* (αφυδρογονάση του σικιμικού οξέος), *guaA* (συνθάση του GMP), *mutL* (πρωτεΐνη επιδιόρθωσης του DNA), *nuoD* (αφυδρογονάση Ι του NADH), *rpsA* (συνθάση του φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικού οξέος) και *trpE* (ανθρανυλική συνθάση) με τη τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) σε συνδυασμό με θερμοανθεκτική πολυμεράση ικανή να ενισχύει τμήματα έως 5 kb.

Για την ενίσχυση του γονιδίου *acsA* χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών με τις αλληλουχίες: *acsAF*: 5'-ACCTGGTGTACGCCTCGCTGAC-3' (970511–970532, εμπρόσθιος) και *acsAR*: 5'-GACATAGATGCCCTGCCCTTGAT-3' (971329–971352, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία AE004091.2), οι οποίοι ενισχύουν ένα τμήμα 842 bp αυτού (Curran *et al*, 2004). Για την ενίσχυση του γονιδίου *aroE* χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών με τις αλληλουχίες: *aroEF*: 5'-TGGGGCTATGACTGGAAACC-3' (26558-26577, εμπρόσθιος) και *aroER*: 5'-TAACCCGGTTTTGTGATTCCTACA-3' (27587-27610, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία AE004091.2), οι οποίοι ενισχύουν ένα τμήμα 1.052 bp αυτού, ενώ για την ενίσχυση του γονιδίου *guaA* χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών με τις αλληλουχίες: *guaAF*: 5'-CGGCCTCGACGTGTGGATGA-3' (4226814-4226833, εμπρόσθιος) και *guaAR*: 5'-GAACGCCTGGCTGGTCTTGTGGTA-3' (4225894-4225917, ανάστροφος), οι οποίοι ενισχύουν ένα τμήμα 897 bp αυτού (αρίθμηση κατά την αλληλουχία AE004091.2, Curran *et al*, 2004). Επιπλέον, για την ενίσχυση των γονιδίων *mutL* και *nuoD* χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών με τις αλληλουχίες: *mutLF*: 5'-

CCAGATCGCCGCGGTGAGGTG-3' (5551613–5551634, εμπρόςθιος) και *mutLR*: 5'-CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC-3' (5550695–5550715, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία AE004091.2) και *nuoDF*: 5'-ACCGCCACCCGTAAGT-3' (2984320-2984332, εμπρόςθιος) και *nuoDR*: 5'-TCTCGCCCATCTTGACCA-3' (2985344-2985361, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία AE004091.2), οι οποίοι ενισχύουν τμήματα 898 bp και 1.042 bp αυτών αντίστοιχα (Curran *et al*, 2004). Τέλος, για την ενίσχυση των γονιδίων *ppsA* και *trpE* χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών με τις αλληλουχίες: *ppsAF*: 5'-GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG-3' (1914847-1914868, εμπρόςθιος) και *ppsAR*: 5'-GGGTTCTCTTCTTCCGGCTCGTAG-3' (1915812-1915835, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία AE004091.2) και *trpEF*: 5'-GCGGCCAGGGTCGTGAG-3' (671604-671621, εμπρόςθιος) και *trpER*: 5'-CCCGGCGCTTGTGATGGTT-3' (672395-672414, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία AE004091.2), οι οποίοι ενισχύουν τμήματα 989 bp και 811 bp αυτών αντίστοιχα (Curran *et al*, 2004).

Η σύσταση του μίγματος για τις εν λόγω αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης ήταν η εξής: 40 ng γενωμικού DNA, 50 mM KCl, 10 mM Tris–HCl (pH 8,8), 0,08% (v/v) Nonidet P40, 2 Units Taq DNA πολυμεράση (Fermentas), 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂ και 1 mM από κάθε εκκινητή. Το πρόγραμμα των συγκεκριμένων αντιδράσεων ξεκινούσε με ένα αρχικό στάδιο στους 94 °C για 5 λεπτά και ακολουθούσαν 35 κύκλοι ο καθένας από τους οποίους περιελάμβανε 1 λεπτό σε θερμοκρασία αποδιάταξης (94 °C), 1 λεπτό σε θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητικών μορίων στο DNA στόχο (60 °C) και 2:30 λεπτά σε θερμοκρασία επέκτασης των νεοσυντιθέμενων πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων (72 °C). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε με ένα τελικό στάδιο στους 72 °C για 5 λεπτά. Ακλούθησε ηλεκτροφόρηση σε οριζόντια συσκευή σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (w/v) σε διάλυμα TBE 1X (Lonza) και ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR με το PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen). Η αλληλούχιση και προς τις δυο κατευθύνσεις των τμημάτων ενίσχυσης στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, ενώ για την σύγκριση της προκύπτουσας αλληλουχίας για έκαστο γονίδιο από τα υπό μελέτη στελέχη και την τυποποίηση των στελεχών αυτών χρησιμοποιήθηκε η διαθέσιμη βάση δεδομένων (<http://www.pubmlst.org/paeruginosa/>).

2. 9 Μελέτη παθογονικότητας

2.9.1 Ανίχνευση τοξινογόνων στελεχών

Σε στελέχη *P. aeruginosa* αντιπροσωπευτικών MLST διενεργήθηκε η ανίχνευση των γονιδίων που σχετίζονται με την παθογονικότητα με τη τεχνική της multiplex αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται τα γονίδια που κωδικοποιούν παράγοντες παθογονικότητας: εξωτοξίνη A (*toxA*) , ελαστάση (*lasB*), πυοκυανίνη (*phzM*) και οι πρωτείνες του Type III Secretion System (TTSS) ExoS,T,U και Υ. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα (Shi *et al*, 2012).

Πίνακας 4 : Εκκινητές για την ανίχνευση γονιδίων παθογονικότητας (Shi *et al*, 2012).

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία	Μέγεθος προϊόντος (bp)
ExoU	EXOU94-F	CCAACACATTAGCAGCGAGA	94
	EXOU94-R	TGGGAGTACATTGAGCAGCA	
ecfX	EXOU130-F	CCTTCCCTCCTTCCCCCCCCAACACATTAGCAGCGAGA	130
	EXOU130-R	CCTTCCCTCCTTCCCCCCTGGGAGTACATTGAGCAGCA	
ecfX	ECF164-F	ATGCCTATCAGGCGTTCCAT	164
	ECF164-R	GGCGATCTGGAAAAGAAATG	
ExoS	ECF200-F	CCTTCCCTCCTTCCCCCCATGCCTATCAGGCGTTCCAT	200
	ECF200-R	CCTTCCCTCCTTCCCCCCGGCGATCTGGAAAAGAAATG	
ExoS	EXOS240-F	CATCCTCAGGCGTACATCCT	240
	EXOS240-R	ATCGATGTCAGCGGGATATC	
phzM	EXOS276-F	CCTTCCCTCCTTCCCCCCCATCCTCAGGCGTACATCCT	276
	EXOS276-R	CCTTCCCTCCTTCCCCCCATCGATGTCAGCGGGATATC	
toxA	PYO330-F	CGGCGAAGACTTCTACAGCT	330
	PYO330-R	AGGTAGATATCGCCGTTGGA	
toxA	PYO366-F	CCTTCCCTCCTTCCCCCCCGGCGAAGACTTCTACAGCT	366
	PYO366-R	CCTTCCCTCCTTCCCCCCAGGTAGATATCGCCGTTGGA	
lasB	ETA397-F	ATGGTGTAGATCGGCGACAT	397
	ETA397-R	AAGCCTTCGACCTCTGGAAC	
lasB	ETA433-F	CCTTCCCTCCTTCCCCCCATGGTGTAGATCGGCGACAT	433
	ETA433-R	CCTTCCCTCCTTCCCCCCAAGCCTTCGACCTCTGGAAC	
Universal primer	ELA520-F	ACATCGCCCAACTGGTCTAC	520
	ELA520-R	ACCAGCGGATAGAACATGGT	
Universal primer	ELA556-F	CCTTCCCTCCTTCCCCCCACATCGCCCAACTGGTCTAC	556
	ELA556-R	CCTTCCCTCCTTCCCCCCACCAGCGGATAGAACATGGT	
Universal primer	UP	CCTTCCCTCCTTCCCCCC	-

2.9.2 In vivo μελέτη παθογονικότητας

Η μελέτη της παθογονικότητας αντιπροσωπευτικών MLST στελεχών *P. aeruginosa* πραγματοποιήθηκε στο μη σπονδυλωτό μοντέλο *Galleria mellonella*. Η *Galleria mellonella* αποτελεί ένα κατάλληλο μη θηλαστικό μοντέλο-ξενιστή για τη μελέτη του ρόλου του Type III Secretion System στη παθογένεση των ψευδομονάδων (Miyata *et al*, 2003).

Χρησιμοποιήθηκαν ολονύχτιες καλλιέργειες των στελεχών σε LB ζωμό. Ακολούθησε αραιώση του ζωμού 1:100. Μετά από φυγοκέντρηση, το ίζημα διαλύθηκε σε 10mM MgSO₄ και στη συνέχεια σε 10 υποδιπλάσιες αραιώσεις σε 10mM MgSO₄. 10 προνύμφες εμβολιάστηκαν για κάθε αραιώση από τουλάχιστον τέσσερις συνεχόμενες αραιώσεις για κάθε στέλεχος. Ακολούθησε επώαση στους 37°C, ενώ η αξιολόγηση των ζωντανών-νεκρών προνυμφών έγινε για 4 ημέρες. Η προνύμφη θεωρούνταν νεκρή όταν δεν υπήρχε ανταπόκριση ερέθισμα.

3. Αποτελέσματα

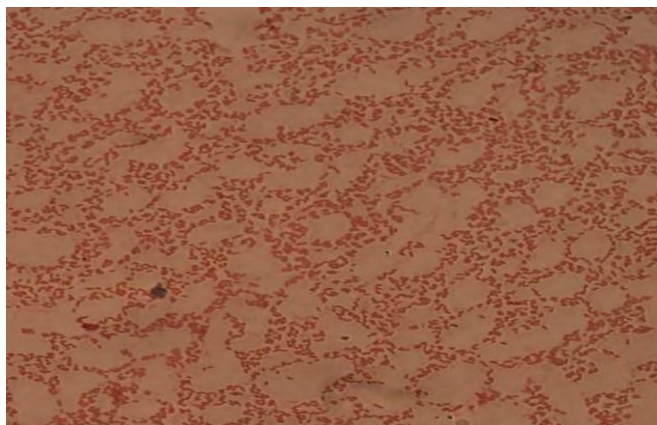
3.1 Επιλογή Μικροβιακών Στελεχών

Κατά το χρονικό διάστημα από τον Μάρτιο έως και τον Οκτώβριο του 2011 απομονώθηκαν συνολικά 813 στελέχη *Pseudomonas aeruginosa* εκ των οποίων 387 (47,6%) παρουσίασαν αντοχή στις καρβαπενέμες (MIC>8μg/ml) σύμφωνα με τα κριτήρια του CLSI, 2012. Από αυτά τα στελέχη, 245 προέρχονται από το Νοσοκομείο Νοσημάτων Θώρακος Αθηνών 'Η Σωτηρία' και τα υπόλοιπα από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας.

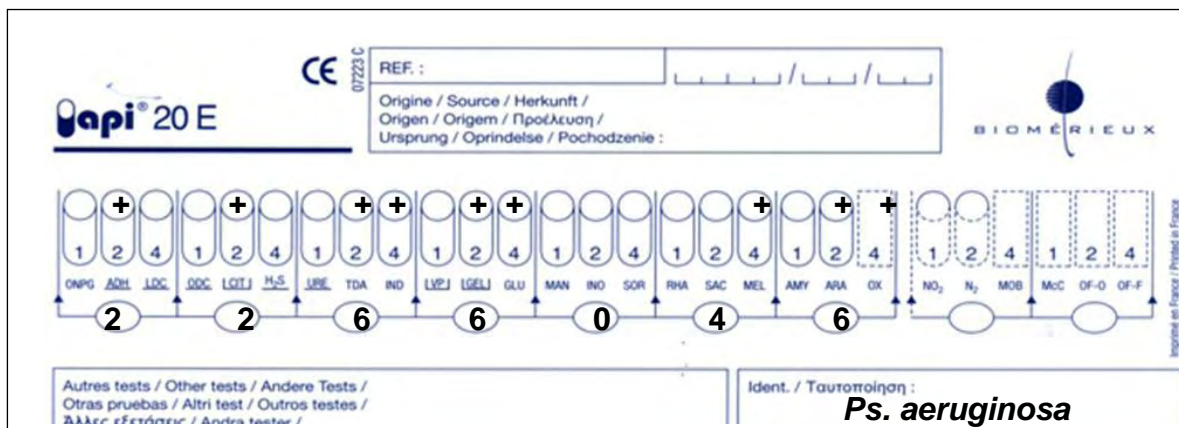
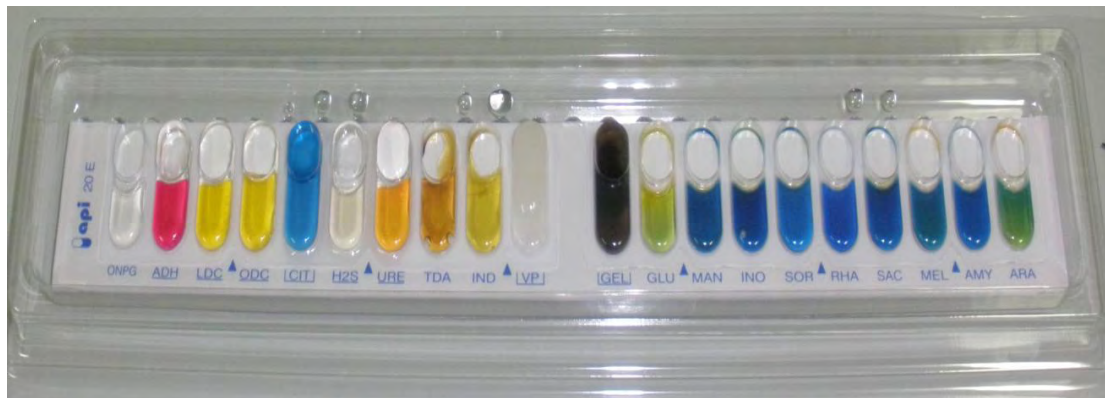
Τα στελέχη αυτά απομονώθηκαν από διάφορα κλινικά δείγματα. Συγκεκριμένα απομονώθηκαν από αίμα, βιολογικά υγρά (εγκεφαλονωτιαία, παροχeteύσεων, πλευριτικά, τραχειοστομίας), εκκρίματα (βρογχικά, οφθαλμικά, ωτικά), καθετήρες κόπραννα, ούρα, πτύελα και πύο ασθενών που νοσηλεύονταν στις παθολογικές και χειρουργικές κλινικές, στη μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) ή προσήλθαν στα εξωτερικά ιατρεία.

3.2 Ταυτοποίηση Μικροοργανισμών με Κλασικές Μεθόδους

Τα παραπάνω στελέχη με πιθανή ανθεκτικότητα έναντι των καρβαπενεμών ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους με συμβατικές μικροβιολογικές μεθόδους, όπως χαρακτηριστικές αποικίες σε Mc Conkey άγαρ, θετική δοκιμασία οξειδάσης και Gram χρώση (Εικόνα 17). Στη συνέχεια στα εν λόγω στελέχη διενεργήθηκε η ταυτοποίηση τους μέσω του συστήματος api 20E.



Εικόνα 17: Χρώση Gram στελεχών *P. aeruginosa*

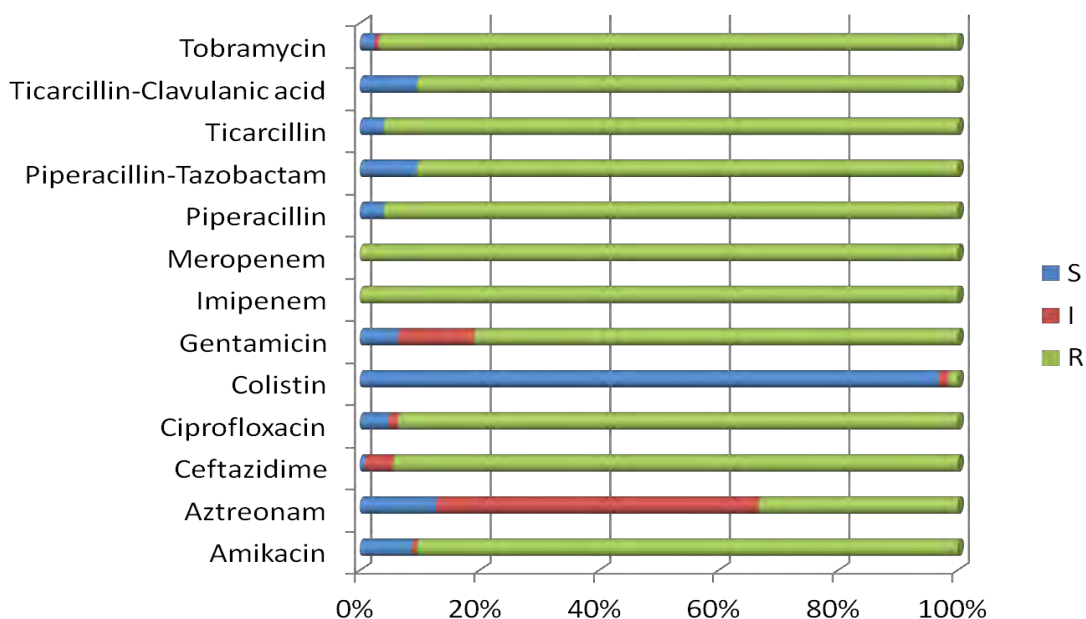


Εικόνα 18: Προφίλ βιοχημικών δοκιμασιών στελεχών *Ps. aeruginosa*.

Όλα τα στελέχη άνηκαν στο προφίλ με θετικές τις εξής βιοχημικές δοκιμασίες: L-αργινίνη (ADH), κιτρικό τρινάτριο (CIT), ουρία (URE), L-τρουπτοφάνη (TDA), ζελατίνη (GEL), D-γλυκόζη (GLU), D-μελιβιόζη (MEL), L-αραβινόζη (ARA) και N,N,N,N-τετραμεθυλ-π-φαινυλενοδιαμίνιο διυδροχλωρικό οξύ (OX) χαρακτηριζόμενα από το επταψήφιο αριθμητικό προφίλ 2266046, το οποίο αντιστοιχεί στο είδος *Pseudomonas aeruginosa* (Εικόνα 18).

3. 3 Ανθεκτικότητα Μικροβιακών Στελεχών

Σύμφωνα με τα κριτήρια της CLSI του 2012, 387 απομονωθέντα στελέχη *P. aeruginosa* βρέθηκε να είναι ανθεκτικά έναντι των καρβαπενεμών. Από αυτά επιλέχτηκαν 126 που βρέθηκαν θετικά στην παραγωγή καρβαπενεμάσης. Τα 80 από αυτά προέρχονται από το Πανεπιστημιακό νοσοκομείο της Λάρισας ενώ τα υπόλοιπα από το Νοσοκομείο «Η Σωτηρία». Μεταξύ των εν λόγω στελεχών η πλειοψηφία έφερε ανθεκτικότητα στην αμικασίνη (90,47%), στη κεφταζιδίμη (94,44%), στη σιπροφλοξασίνη (93,65%), στη κολιστίνη (1,58%), στη γενταμικίνη (80,95%), στη πιπερακιλλίνη (96,03%), στη πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη (90,47%), στη τικαρκιλλίνη (96,03%), στη τικαρκιλλίνη/κλαβουλανικό οξύ (90,47%) και στη τομπραμυκίνη (96,82%), ενώ υπήρξαν στελέχη που εμφάνισαν ανθεκτικότητα στην αζτρεονάμη (33,33%).



Εικόνα 19: Κατανομή των φαινοτύπων S, I και R των υπό μελέτη στελεχών για τους συνηθέστερα χρησιμοποιούμενους αντιβιοτικούς παράγοντες.

Μεταξύ των ελεγχθέντων στελεχών *P. aeruginosa* υπήρξαν στελέχη που εμφάνισαν ενδιάμεσο φαινότυπο στην αμικασίνη (0,8%), στην αζτρεονάμη (53,98%), στη κεφταζιδίμη (4,77%), στη σιπροφλοξασίνη (1,59%), στη κολιστίνη (1,6%), στη γενταμικίνη (12,76%) και στη τομπραμυκίνη (0,8%). Τέλος, υπήρξαν στελέχη που εμφάνισαν ευαίσθητο φαινότυπο στην αμικασίνη (8,73%), στη κεφταζιδίμη (0,79%), στη

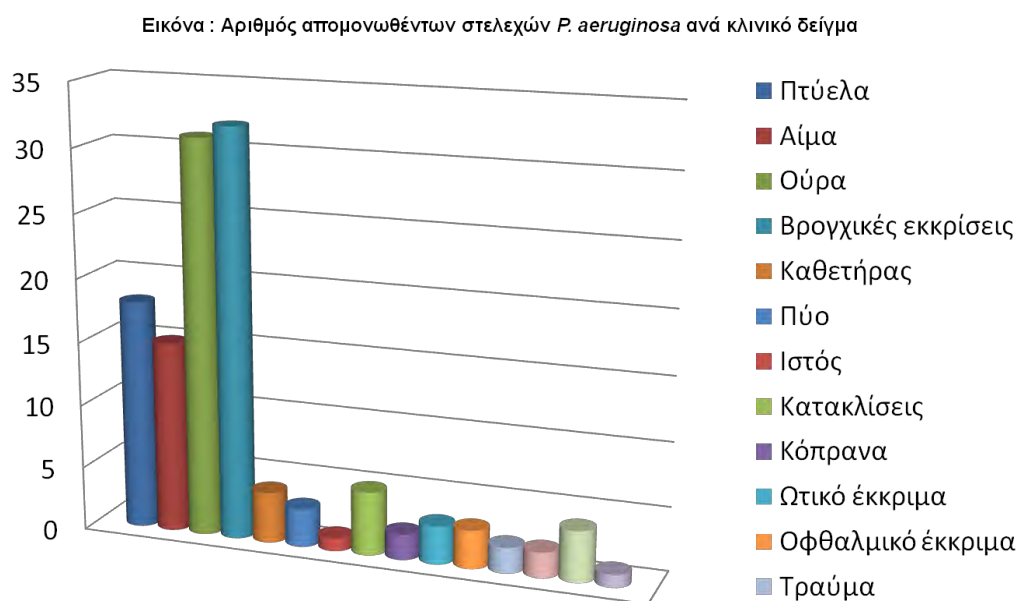
σιπροφλοξασίνη (4,76%), στη κολιστίνη (96,82%), στη γενταμυκίνη (6,34%), στη πιπερακιλλίνη (3,96%), στη πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη (9,52%), στη τικαρκιλλίνη (3,96%), στη τικαρκιλλίνη/κλαβουλανικό οξύ (9,52%) και στη τομπραμυκίνη (2,38%), ενώ στην αζτρεονάμη (12,69%).

Η πλειοψηφία των MICs των ελεγχθέντων στελεχών *P. aeruginosa* κυμαίνονταν μεταξύ των ορίων που θέτει η CLSI για τα ανθεκτικά στελέχη για τους περισσότερους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Οι επικρατούσες τιμές MIC για τα υπό μελέτη στελέχη ήταν: MIC \geq 64 mg/l στην αμικασίνη (90,47%), MIC \geq 32 mg/l στην αζτρεονάμη (33,33%), MIC \geq 64 mg/l στη κεφταζιδίμη (59,16%), MIC \geq 4 mg/l στη σιπροφλοξασίνη (93,65%), MIC \geq 8 mg/l στη κολιστίνη (1,58%), MIC \geq 16 mg/l στη γενταμυκίνη (80,95%), MIC \geq 128 mg/l στη πιπερακιλλίνη (96,04%), MIC \geq 128 mg/l στη πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη (90,47%), MIC \geq 128 mg/l στη τικαρκιλλίνη (96,04%), MIC \geq 128 mg/l στη τικαρκιλλίνη/κλαβουλανικό οξύ (90,47%) και MIC \geq 16 mg/l στη τομπραμυκίνη (96,83%).

Πίνακας 5: Ποσοστά κατανομής στελεχών *P. aeruginosa* σε MIC για τους ελεγχθέντες αντιμικροβιακούς παράγοντες

MIC(mg/l)	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
Amikacin	0	8.74	0	0	0	0	0	0.79	0.47	0
Aztreonam	0	0	0	12.71	0	0	53.96	0	3.33	0
Ceftazidime	0	0	0	0	0	0.79	4.76	5.29	9.16	0
Ciprofloxacin	0	2.38	2.38	1.58	93.65	0	0	0	0	0
Colistin	0	18.25	18.25	60.34	1.58	0	1.58	0	0	0
Gentamycin	0	0	0	0	6.34	12.71	80.95	0	0	0
Imipenem	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
Meropenem	0	0	0	0	0	5.56	4.44	0	0	0
Piperacillin	0	0	0	0	1.98	0	1.98	0	0	96.04
Piperacillin-Tazobactam	0	0	0	0	3.96	1.61	3.96	0	0	90.47
Ticarcillin	0	0	0	0	1.98	0	1.98	0	0	96.04
Ticarcillin/CA	0	0	0	0	3.96	1.61	3.96	0	0	90.47
Tobramycin	0	0	2.38	0	0	0.79	96.83	0	0	0

Τα στελέχη αυτά απομονώθηκαν από ποικίλα κλινικά δείγματα με τη πλειοψηφία αυτών να προέρχονται από δείγματα του αναπνευστικού.

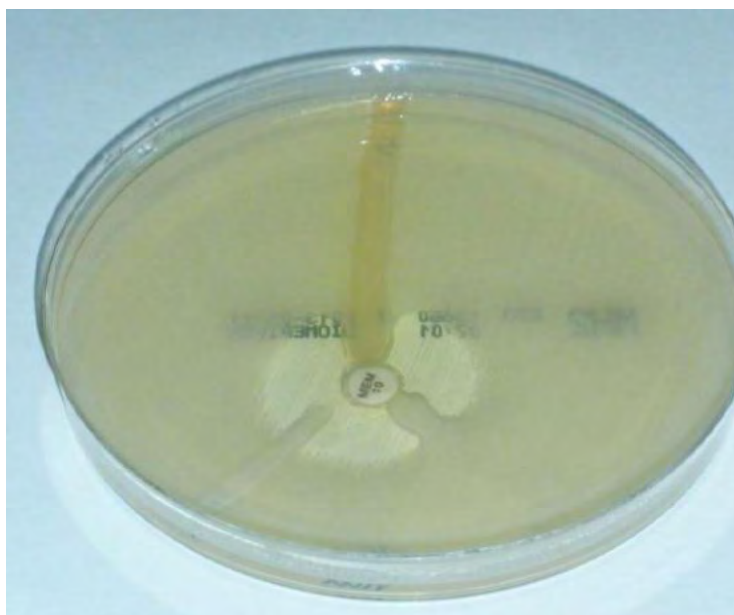


Εικόνα 20: Κατανομή στελεχών *Ps. aeruginosa* ανά κλινικό δείγμα

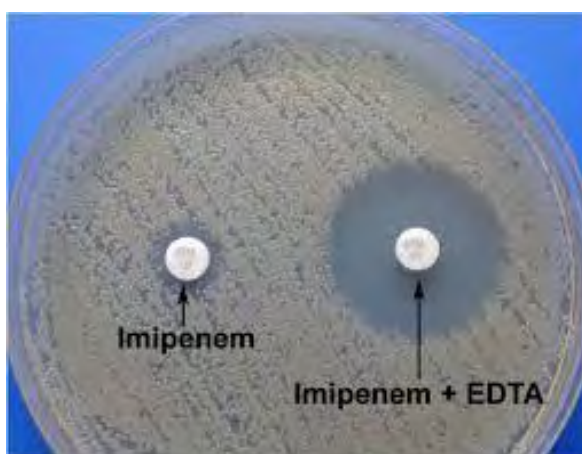
3.4 Φαινοτυπική Διερεύνηση Ανθεκτικότητας έναντι Καρβαπενεμών

3.4.1 Παρουσία καρβαπενεμασών στα Μικροβιακά Στελέχη

Με σκοπό να διερευνηθεί η παραγωγή καρβαπενεμασών στα στελέχη *Ps. aeruginosa*, υποβλήθηκαν στη τροποποιημένη δοκιμασία κατά Hodge καθώς και στη δοκιμασία αναστολής με το συνδυασμό δίσκων που έχουν διαποτιστεί με EDTA, παράγοντας που αναστέλλει εκλεκτικά τις καρβαπενεμάσες της τάξης B. Από τα 387 ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη, 126 (32,5%) βρέθηκαν θετικά και με τις δύο δοκιμασίες δηλώνοντας την παρουσία μέταλλο-β-λακταμάσης (τάξης B).

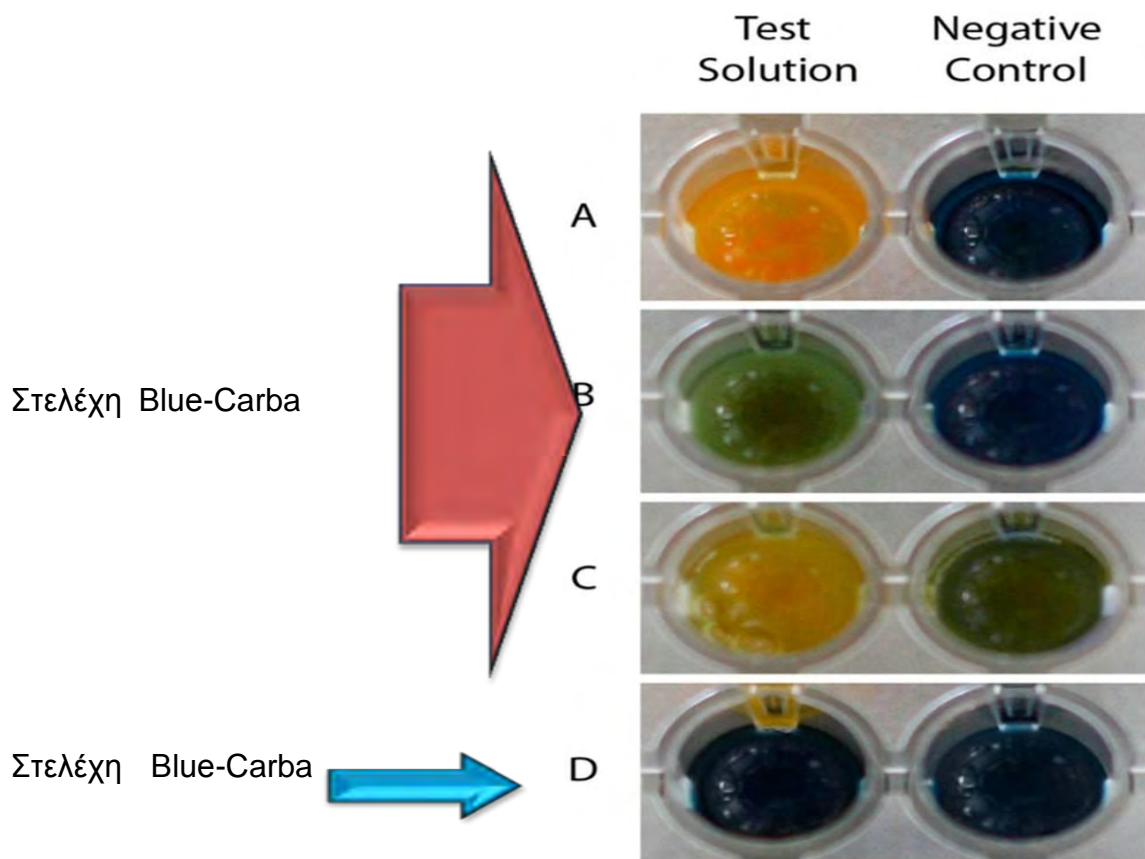


Εικόνα 21: Τροποποιημένη δοκιμασία κατά Hodge για στελέχη και *P. aeruginosa* παρουσία θετικού (+) και αρνητικού (-) μάρτυρα.



Εικόνα 22: Δοκιμασία EDTA σε συνδυασμό με ιμιπενέμη για την ανίχνευση μεταλλο-B-λακταμασών

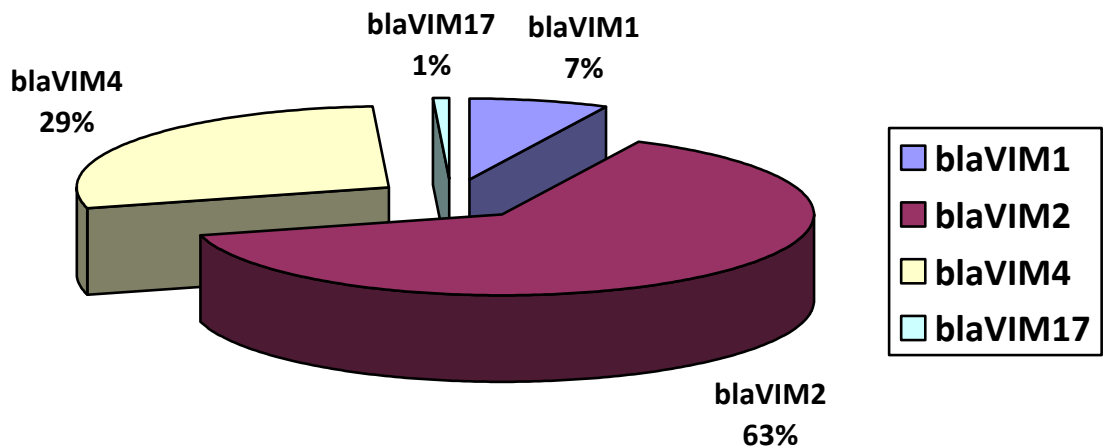
Επιπλέον, σε όλα τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *P. aeruginosa* καθώς και ορισμένα ευαίσθητα εφαρμόστηκε η φαινοτυπική δοκιμασία Blue-Carba για την άμεση ανίχνευση καρβαπενεμάσης. Σε όλα τα ευαίσθητα στελέχη η δοκιμασία ήταν αρνητική, ενώ τα 126 στελέχη που βρέθηκαν θετικά με τις προηγούμενες δοκιμασίες, έδωσαν θετική και τη δοκιμασία αυτή.



Εικόνα 23: Αξιολόγηση αποτελεσμάτων δοκιμασίας Blue-Carba

3.5 Μελέτη Γονιδίων Καρβαπενεμασών

Μεταξύ των 126 στελεχών *P. aeruginosa* ανιχνεύτηκαν αποκλειστικά αλληλόμορφα γονίδια της καρβαπενεμάσης VIM της τάξης B και συγκεκριμένα σε 80 στελέχη (63%) ανιχνεύτηκε το αλληλόμορφο VIM-2, σε 36 στελέχη (29%) ανιχνεύτηκε το αλληλόμορφο VIM-4, σε 9 στελέχη (7%) το αλληλόμορφο VIM-1 και σε 1 στέλεχος (1%) το αλληλόμορφο VIM-17.



Εικόνα 24: Ποσοστά ανίχνευσης των καρβαπενεμασών τύπου VIM σε στελέχη *P. aeruginosa*

3.6 Γενετικό Περιβάλλον των Γονιδίων των Καρβαπενεμασών

Στα 126 στελέχη *P. aeruginosa* τα αλληλόμορφα της μεταλλο-β-λακταμάσης (VIM-1, VIM-2, VIM-4 και VIM-17) που έφεραν αποτελούσαν μέρος 6 διαφορετικών γονιδιακών κασετών και εδράζονταν επί ιντεγκρονίων τάξης I. Αναλυτικότερα, τα περισσότερα στελέχη που άνηκαν στους ST-111, ST-244, ST-253, ST 308, ST-277 και ST-773 έφεραν ως τμήμα της γονιδιακής κασέτας το αλληλόμορφο VIM-2 πλαισιωμένο με δυο ομόροπα αντίγραφα του γονιδίου *aacA29* που κωδικοποιεί μια ακετυλοτρανσφεράση παρέχοντας ανθεκτικότητα έναντι των αμινογλυκοσιδών. Τα περισσότερα στελέχη που άνηκαν στον ST-235 έφεραν ως τμήμα της γονιδιακής κασέτας το αλληλόμορφο VIM-4 και καθοδικά αυτού τα γονίδια *agr-7* που κωδικοποιεί μια ADP-ριβοσυλ-τρανσφεράση παρέχοντας ανθεκτικότητα έναντι της ριφαμπικίνης, το γονίδιο *aacA4* που κωδικοποιεί μια ακετυλοτρανσφεράση παρέχοντας ανθεκτικότητα έναντι των αμινογλυκοσιδών και το γονίδιο PSE-1 που κωδικοποιεί μια καρβαπενικιλινάση. Κάποια που ανήκαν στον ίδιο ST έφεραν ως τμήμα μιας νέας γονιδιακής κασέτας το αλληλόμορφο VIM-2 και καθοδικά αυτού τα γονίδια *aacA7* και

dfrB που κωδικοποιούν μια ακετυλοτρανσφεράση και μια ρεδουκτάση παρέχοντας ανθεκτικότητα έναντι των αμινογλυκοσιδών και της τριμεθοπρίμης, αντίστοιχα, ενώ ορισμένα έφεραν μόνο το αλληλόμορφο VIM-1. Επίσης, τα στελέχη που άνηκαν στον ST-395 έφεραν ως τμήμα μιας νέας γονιδιακής κασέτας το γονίδιο OXA-10 που κωδικοποιεί μια οξακιλλινάση, ακολουθούμενο από το γονίδιο *aacA4* που κωδικοποιεί μια ακετυλοτρανσφεράση παρέχοντας ανθεκτικότητα έναντι των αμινογλυκοσιδών, το αλληλόμορφο VIM-2 και τέλος το γονίδιο *smr-2* που κωδικοποιεί μια μικρή διαμεμβρανική πρωτεΐνη παρέχοντας ανθεκτικότητα έναντι διαφόρων αντισηπτικών και κυρίως τον τετρασθενών ιόντων αμμωνίου.

Όσον αφορά στα στελέχη που άνηκαν στο νέο ST-1457 έφεραν ως τμήμα της γονιδιακής κασέτας το αλληλόμορφο VIM-17 πλαισιωμένο με δυο ομόρροπα αντίγραφα του γονιδίου *aacA29* που όπως αναφέρθηκε παραπάνω αποτελεί και τη συνηθέστερη γονιδιακή κασέτα και των στελεχών που έφεραν το αλληλόμορφο VIM-2.

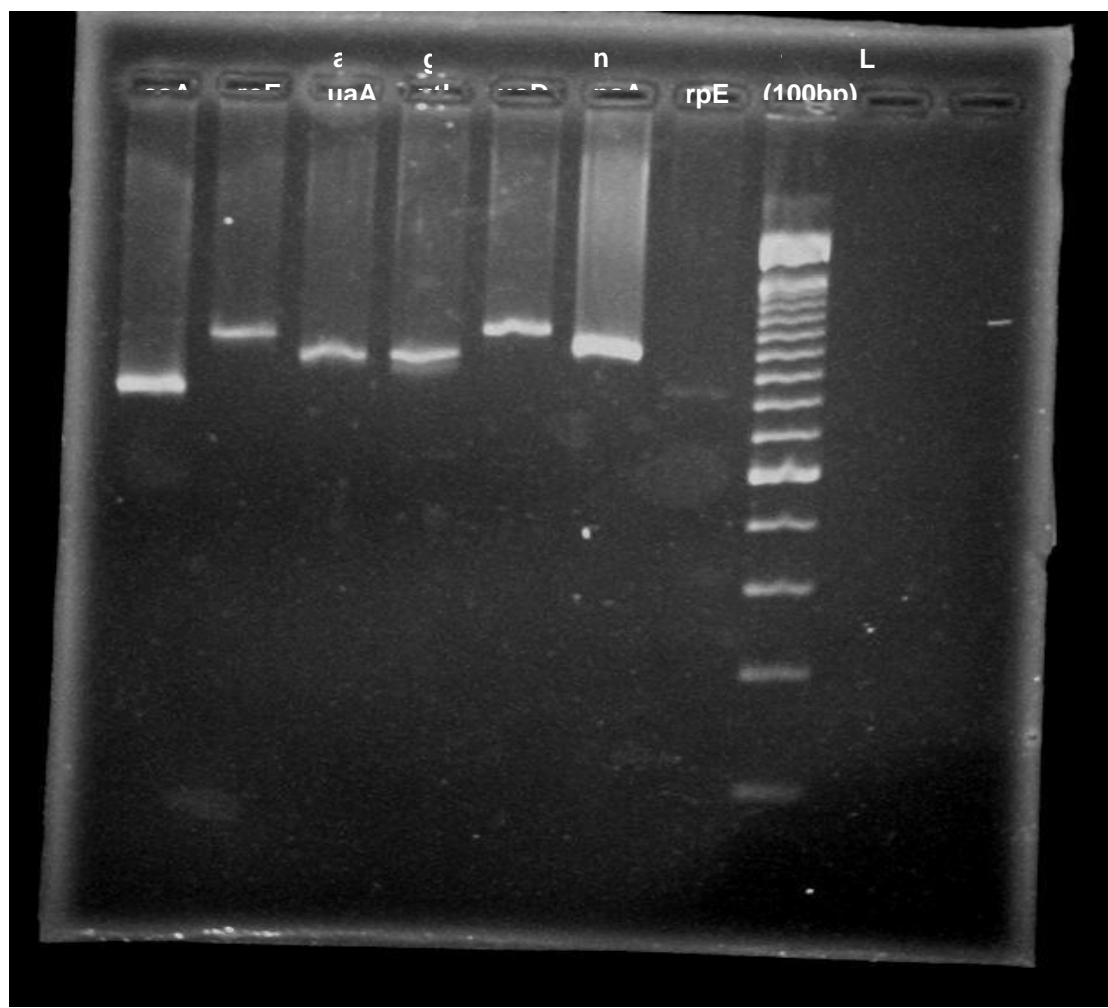
Πίνακας 6: Αποτελέσματα χαρτογράφησης του γενετικού περιβάλλοντος των στελεχών *P. aeruginosa*.

ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ	ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	ΓΟΝΙΔΙΟ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΗΣ
ST 111	<i>aacA29a/blaVIM-2 /aacA29b</i>	VIM-2
ST 235	<i>blaVIM-4/arr-7/aacA4/blaPSE-1</i>	VIM-4
ST 235	<i>blaVIM-1</i>	VIM-1
ST 235	<i>blaVIM-2/ aacA7/dfrB</i>	VIM-2
ST 308	<i>aacA29a/blaVIM-2 /aacA29b</i>	VIM-2
ST 244	<i>aacA29a/blaVIM-2 /aacA29b</i>	VIM-2
ST 395	<i>blaOXA-10/aacA4/blaVIM-2/smr-2</i>	VIM-2
ST 253	<i>aacA29a/blaVIM-2 /aacA29b</i>	VIM-2
ST 773	<i>aacA29a/blaVIM-2 /aacA29b</i>	VIM-2
ST 277	<i>aacA29a/blaVIM-2 /aacA29b</i>	VIM-2
ST 1457	<i>aacA29a/blaVIM-17/aacA29b</i>	VIM-17

3.7 Μοριακή Τυποποίηση Στελεχών

Η αρχική τυποποίηση των 126 στελεχών *P. aeruginosa* που φέρουν αλληλόμορφα γονίδια της καρβαπενεμάσης VIM διενεργήθηκε με τη μέθοδο BOX-PCR. Τα εν λόγω στελέχη βάσει της μεθόδου αυτής ταξινομήθηκαν σε 20 διαφορετικά ηλεκτροφορητικά προφίλ (P1 έως P20), τα δυο εκ των οποίων περιελάμβαναν 60 (47,6%) και 45 (35,7%) στελέχη, αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα 18 ηλεκτροφορητικά προφίλ περιελάμβαναν από 1 έως και 5 ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη.

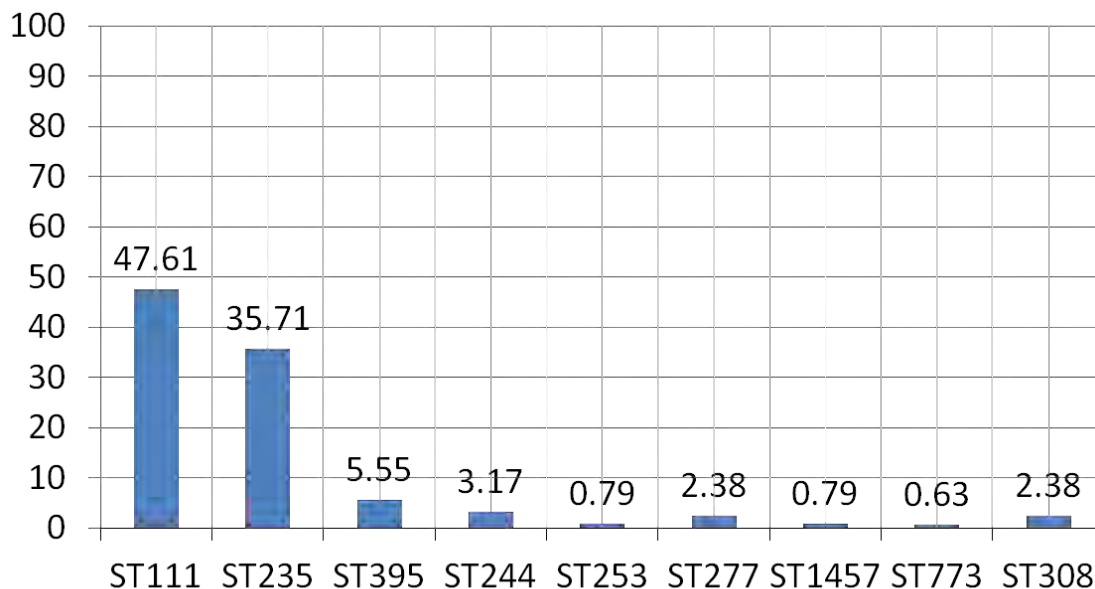
Εν συνεχεία, η τυποποίηση των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *P. aeruginosa* ολοκληρώθηκε με τη διενέργεια της μεθόδου MLST σε όλα τα στελέχη που περιλαμβάνονταν στα 2 κυριότερα ηλεκτροφορητικά προφίλ (P1 και P2) καθώς και σε ένα αντιπροσωπευτικό στέλεχος από έκαστο από τα υπόλοιπα ηλεκτροφορητικά προφίλ. Τα απομονωθέντα, λοιπόν, στελέχη *P. aeruginosa* άνηκαν σε 9 διαφορετικούς STs τύπους και συγκεκριμένα στους ST-111, ST-235, ST-244, ST-253, ST-277, ST-308, ST-395, ST-773 και ST-1457.



Εικόνα 25: Ενδεικτική ηλεκτροφόρηση προϊόντων ενίσχυσης MLST στελεχών

P. aeruginosa.

Ανευρέθηκαν λοιπόν συνολικά, 60 στελέχη που ανήκουν στον ST111 (από τα οποία τα 36 προέρχονται από το νοσοκομείο της Λάρισας) και 45 στον ST235 (33 από το νοσοκομείο Λάρισας). Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνονται τα ποσοστά στελεχών ανά MLST τύπο συνολικά και από τα δύο νοσοκομεία.



Εικόνα 26: Ποσοστά στελεχών *P. aeruginosa* ανά MLST τύπο

Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι οι κλώνοι που επικρατούν είναι οι ίδιοι και στα δύο νοσοκομεία της χώρας που είχαμε τη δυνατότητα να ελέγξουμε, δηλαδή ο ST111 και ο ST235.

3.8 MALDI-TOF MS

Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε σε 33 στελέχη *Ps. aeruginosa* τα οποία εμφάνισαν αντοχή στις καρβαπενέμες. Από αυτά τα στελέχη, 26 ήταν θετικά για το γονίδιο *vim* ενώ τα υπόλοιπα δεν βρέθηκαν θετικά για την παραγωγή καρβαπενεμάσης, όπως προέκυψε από τις φαινοτυπικές δοκιμασίες και από τον μοριακό έλεγχο για τα πιο συχνά γονίδια που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή καρβαπενεμάσης στις ψευδομονάδες (VIM, IMP, GIM, SIM, NDM, KPC, GES). Έγινε σύγκριση της μεθόδου MALDI-TOF MS με υδρόλυση της μεροπενέμης και μιας τροποποιημένης MALDI-TOF MS. Η τροποποιημένη MALDI-TOF MS διαφέρει από την προηγούμενη στο γεγονός ότι στο ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης προστέθηκε 50Mm NH_4HCO_3 (pH 7). Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 7: Αποτελέσματα δοκιμασίας MALDI-TOF MS

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΤΟΧΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ	MAL DI-TOF MS	MALDI- TOF MS + NH_4 HCO_3
VIM	26	16	25
ΜΗ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΟΠΑΡΑΓΩΓΑ	7	0	0

Με τη μέθοδο MALDI-TOF MS 16 από τα 26 στελέχη *Ps. aeruginosa* που ήταν θετικά για το γονίδιο *vim* βρέθηκαν θετικά για την παραγωγή καρβαπενεμάσης ενώ 10 από αυτά ήταν αρνητικά. Αντίθετα με την τροποποιημένη μέθοδο MALDI-TOF ο αριθμός των θετικών αυξήθηκε στους 25 αυξάνοντας παράλληλα και την ευαισθησία της μεθόδου. Ωστόσο και στις δυο περιπτώσεις όλα τα μη καρβαπενεμασοπαραγωγά στελέχη αναδείχθηκαν αρνητικά για την παραγωγή καρβαπενεμάσης.

Πίνακας 8: Διαγνωστική αξία της δοκιμασίας MALDI-TOF MS για την ανίχνευση καρβαπενεμασοπαραγωγών στελεχών *Ps. aeruginosa*.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ	ΑΘ	ΑΑ	ΨΘ	ΨΑ	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙ Α	ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ
MALDI-TOF MS	16	7	0	10	61,53%	100%
MALDI-TOF MS + NH_4 HCO_3	25	7	0	1	96,1%	100%

ΑΘ: Αληθώς θετικά, ΑΑ: Αληθώς αρνητικά, ΨΘ: Ψευδώς θετικά, ΨΑ: Ψευδώς

αρνητικά

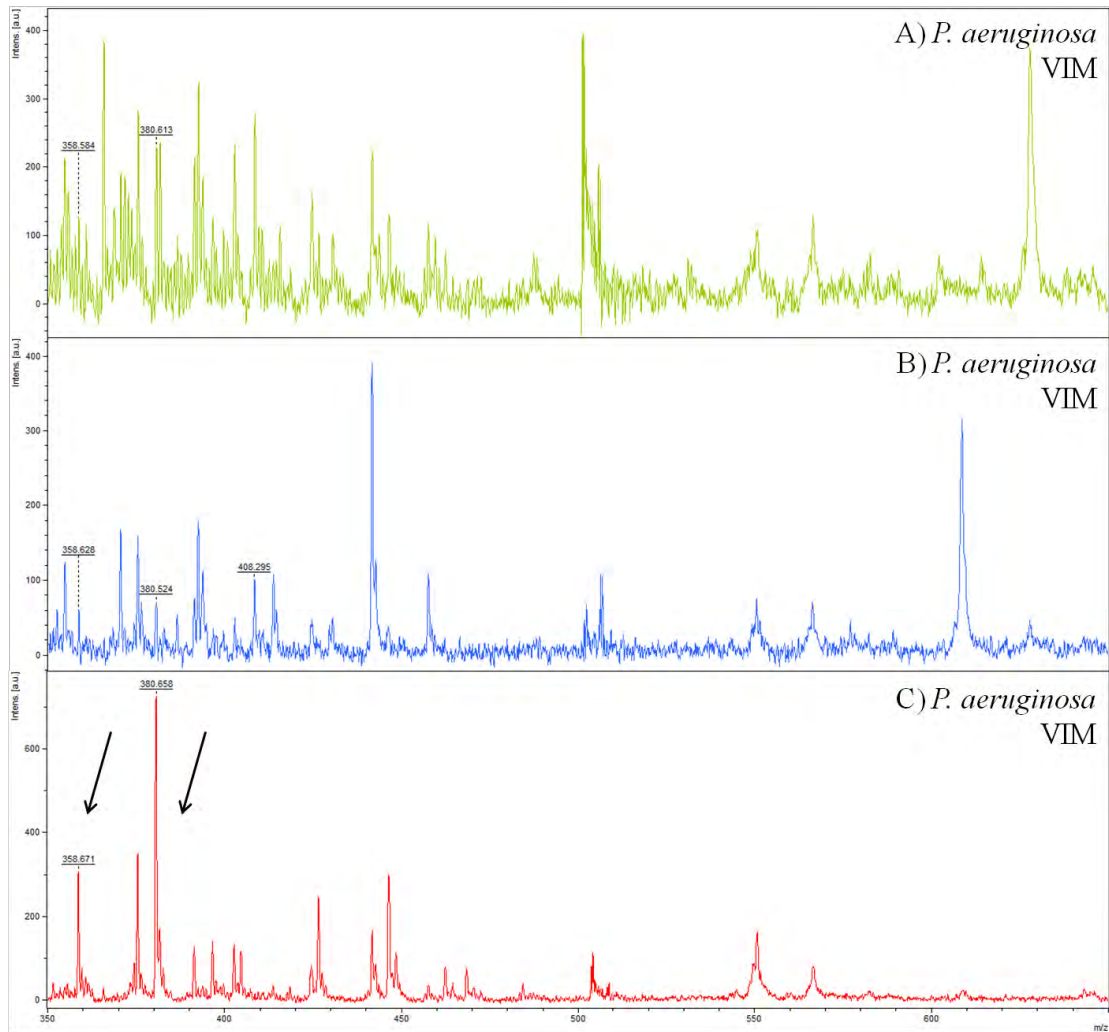
Πίνακας 9: Κριτήρια για την ερμηνεία της δοκιμασίας MALDI-TOF MS

Strain type	Peak at m/z^*			
	358.5	380.5	384.5	406.5
Παραγωγή καρβαπενεμάσης **	Παρουσία	Παρουσία	Απουσία	Απουσία
Μη παραγωγή καρβαπενεμάσης ***	Απουσία	Απουσία	Παρουσία	Παρουσία

*:358.5- m/z peak: αποκαρβοξυλιωμένο προϊόν της μεροπενέμης, 380.5- m/z peak: άλας νατρίου αποκαρβοξυλιωμένου προϊόντος της μεροπενέμης, 384.5- m/z peak: μεροπενέμη, 406.5- m/z peak: άλας νατρίου της μεροπενέμης. Μία κορυφή ερμηνεύεται ως θόρυβος εάν η ένταση της δεν ήταν πέντε φορές υψηλότερη από την ένταση των κορυφών του φόντου.

** : Ένα στέλεχος ερμηνεύεται ως καρβαπενεμασοπαραγωγό αν ανιχνεύεται η παρουσία τουλάχιστον ενός από τα αποκαρβοξυλιωμένα προϊόντα της μεροπενέμης.

***: Ένα στέλεχος ερμηνεύεται ως μη καρβαπενεμασοπαραγωγό αν παρατηρείται η απουσία και των δυο αποκαρβοξυλιωμένων προϊόντων της μεροπενέμης.



Εικόνα 27: Αντιπροσωπευτικά δεδομένα από στελέχη *P. aeruginosa*. A) VIM (+)-*P. aeruginosa*, αρνητική για παραγωγή καρβαπενεμάσης. B) VIM (+)-*P. aeruginosa*, αρνητική για παραγωγή καρβαπενεμάσης. C) VIM (+) *P. aeruginosa*, θετική για την παραγωγή καρβαπενεμάσης.

3.9 ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΘΟΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ

3.9.1 Ανίχνευση τοξινογόνων στελεχών

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η παθογονικότητα αντιπροσωπευτικών MLST στελεχών. Επιλέχθηκε ένα στέλεχος από τους πιο επικρατείς κλώνους και μελετήθηκε αρχικά η παρουσία των γονιδίων παθογονικότητας του εκκριτικού συστήματος τύπου III και στη συνέχεια έγιναν πειράματα in vivo στο μοντέλο *Galleria mellonella*. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν και πρότυπα στελέχη με γνωστή υψηλή παθογονικότητα (PA01, PA14) καθώς και τα αντίστοιχα μεταλλαγμένα αυτών (PA01ΔpcrV, PA14ΔexsA) με μειωμένη παθογονικότητα. Στον πίνακα 6 περιγράφεται για κάθε κλώνο, η παρουσία διαφόρων γονιδίων παθογονικότητας (*exoS*, *exoU*, *exoT*, *exoY*).

Πίνακας 10: Γονίδια παθογονικότητας του εκκριτικού συστήματος τύπου III

VIRULENCE				
TTSS (Type III Secretion System)				
	<i>exoS</i>	<i>exoU</i>	<i>exoT</i>	<i>exoY</i>
ST111	-	+	+	+
ST235	-	+	+	+
ST395	+	-	+	+
ST244	-	+	+	+
ST308	-	+	+	+
ST277	+	-	+	+
ST773	-	+	+	+
PA01	+	-	+	+
PA14	-	+	+	+

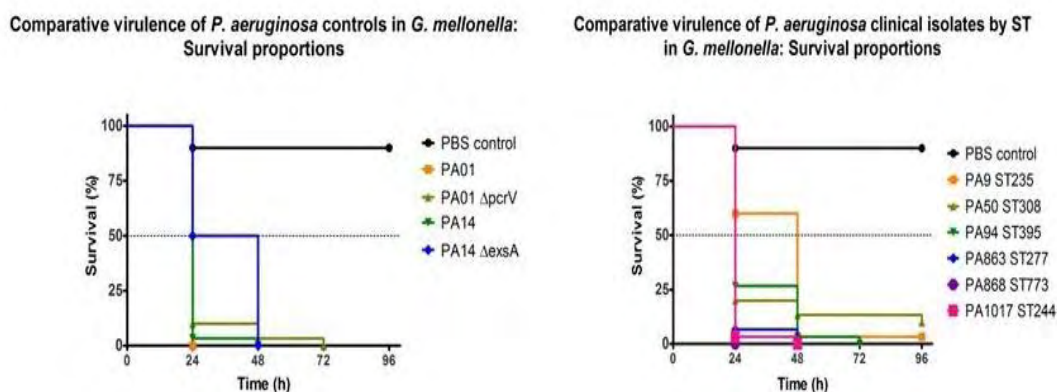
Όλα τα στελέχη αναδείχθηκαν θετικά για τα γονίδια *exoT* και *exoY* ενώ διαφορές υπήρχαν στα γονίδια *exoS* και *exoU*. Όλα τα στελέχη έφεραν τρία από τα τέσσερα γονίδια του TTSS. Συγκεκριμένα τα στελέχη που ανήκουν στους ST111, ST235, ST244, ST308, ST773 καθώς και το πρότυπο στέλεχος PA14 έφεραν το γονίδιο *exoU* ενώ τα στελέχη που ανήκουν στους ST395, ST 277 καθώς και το πρότυπο στέλεχος PA01 έφεραν το γονίδιο *exoS*.

3.9.2 *In vivo* μελέτη παθογονικότητας

Αρχικά έγινε πιλοδότηση του βακτηριακού εναιωρήματος κάθε στελέχους με μέτρηση των αποικιών σε τρυβλίο Mueller Hinton μετά από διαδοχικές αραιώσεις. Κάθε προνύμφη εμβολιάστηκε με βακτηριακό φορτίο 10^1 - 10^5 , ενώ για κάθε αραιώση εμβολιάστηκαν 10 προνύμφες. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές για κάθε στέλεχος ενώ σε κάθε πείραμα εμβολιάστηκαν και 10 προνύμφες με PBS ως αρνητικό μάρτυρα. Η θνησιμότητα μετρήθηκε κάθε 24 ώρες για 4 ημέρες και τα αποτελέσματα καταγράφηκαν.

Από τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα υπολογίστηκε πως το μικροβιακό φορτίο που απαιτήθηκε για να σκοτωθεί το 50% των προνυμφών σε 24 ώρες (LD_{50}) ήταν 10^2 . Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται τα αποτελέσματα του πειράματος.

Fig 1



Εικόνα 28: Αποτελέσματα *in vivo* πειράματος στελεχών *Ps. aeruginosa*.

Το ποσοστό επιβίωσης των πρότυπων στελεχών PA01 και PA14 στις 24 ώρες άγγιζε το 0% γεγονός που δικαιολογείται από τη γνωστή υψηλή παθογονικότητα των στελεχών αυτών. Το ποσοστό επιβίωσης ωστόσο αυξάνει για τα μεταλλαγμένα αυτών στελέχη PA01 Δ pcrV και PA14 Δ exsA που έχουν γνωστή μειωμένη παθογονικότητα σε σχέση με τα αρχικά στελέχη.

Τα υπό μελέτη στελέχη μας εμφάνισαν διαφορές στη παθογονικότητα. Συγκεκριμένα οι προνύμφες που εμβολιάστηκαν με τα στελέχη που ανήκουν στους ST277, ST244 και ST773 είχαν ποσοστό επιβίωσης 0% στις πρώτες 24 ώρες, παρόμοιο με αυτό των πρότυπων στελεχών. Ακολουθούν τα στελέχη που ανήκουν στους ST308 και ST395 με ποσοστό επιβίωσης των προνυμφών περίπου 25% ενώ οι προνύμφες που εμβολιάστηκαν με τα στελέχη που ανήκουν στους ST111 και ST235 εμφάνισαν το μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης ξεπερνώντας το 50% το πρώτο 24ωρο.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ένα από τα βασικά προβλήματα της σύγχρονης ιατρικής αποτελεί η διασπορά πολυανθεκτικών μικροβίων τόσο στο νοσοκομειακό περιβάλλον όσο και στην κοινότητα. Τα συγκεκριμένα στελέχη προκαλούν σοβαρές λοιμώξεις με υψηλή θνητότητα και αυξημένο κόστος νοσηλείας ασθενών. Τα Gram αρνητικά πολυανθεκτικά βακτηρίδια, αποτελούν σοβαρότατο κίνδυνο για τους νοσηλευόμενους ασθενείς όχι μόνο στις μονάδες εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ), όπου τα εν λόγω παθογόνα είναι ικανά να προκαλέσουν σοβαρές μολύνσεις αλλά και σε βαρέως πάσχοντες και ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Ανάμεσα στα πολυανθεκτικά Gram(-) αρνητικά βακτηρίδια συγκαταλέγεται και η *P. aeruginosa*, ένα μικρόβιο το οποίο πέρα από τη φυσική αντοχή έχει αποκτήσει επίκτητη αντοχή σε πολλά αντιμικροβιακά φάρμακα περιπλέκοντας τη θεραπεία των λοιμώξεων και επηρεάζοντας αρνητικά την κλινική έκβαση και τον κόστος της θεραπείας των ασθενών (Harris *et al*, 1999, Aloush *et al*, 2006).

Η εισαγωγή των καρβαπενεμών τη δεκαετία του 1980 στην κλινική θεραπευτική, βοήθησε στη θεραπεία των σοβαρών βακτηριακών λοιμώξεων. Ωστόσο σε Gram αρνητικά βακτήρια όπως και στα είδη *P. aeruginosa* σύντομα αναπτύχθηκε αντοχή στα εν λόγω αντιβιοτικά. Ο συχνότερα υπεύθυνος μηχανισμός για την ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες είναι η παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων, τα οποία συνήθως βρίσκονται σε γενετικές δομές οι οποίες φέρουν γονίδια αντοχής σε διάφορες τάξεις αντιμικροβιακών παραγόντων.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, το 47,6% των ψευδομονάδων που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα ασθενών από δύο διαφορετικά νοσοκομεία, της Αθήνας και της Λάρισας, αναδείχθηκαν ανθεκτικές στις καρβαπενέμες, ενώ το 32.5% αυτών των στελεχών παρήγαγαν καρβαπενεμάση. Τα ποσοστά αυτά συμφωνούν με αυτά προηγούμενων μελετών που αφορούν την Ελλάδα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η πλειοψηφία των στελεχών αυτών παρουσιάζει ανθεκτικότητα και σε άλλες τάξεις αντιβιοτικών δυσχεραίνοντας ακόμη περισσότερο την αντιμετώπιση αυτών των λοιμώξεων. Τα ποσοστά ανθεκτικότητας στα άλλα αντιβιοτικά κυμαίνεται από 80.95% έως 96.82% στα περισσότερα από αυτά με τη κολιστίνη να παραμένει σε πολύ χαμηλά ποσοστά αντοχής (1.58%) και την αζτρεονάμη να ακολουθεί με ποσοστό 33.33%.

Πληθώρα μεταλλο-β-λακταμασών (VIM, IMP, GIM, SIM) έχουν συσχετισθεί με το φαινότυπο αντοχής στις καρβαπενέμες στελεχών *P.aeruginosa* (Rieber *et al*. 2012, Gilarranz *et al*. 2013, Flateau *et al*. 2012, Polotto *et al*. 2012). Ωστόσο στην Ελλάδα οι

διάφορες μελέτες έως τώρα σχετίζουν τα στελέχη αυτά με την παρουσία του γονιδίου VIM (Mavroidi *et al*, 2000, Tsakris *et al*, 2000, Pournaras *et al*, 2002, Giakkouri *et al*, 2003, Siarkou *et al*, 2009, Koutsogiannou *et al*, 2013). Το εν λόγω γεγονός τεκμηριώθηκε και στην παρούσα μελέτη, αποδεικνύοντας την εξάπλωση στελεχών *P. aeruginosa* που παράγουν καρβαπενεμάσες τύπου VIM και συγκεκριμένα τις VIM-2, VIM-4, VIM-1 και VIM-17 σε ποσοστό 63%, 29%, 7% και 1%, αντίστοιχα.

Μεταξύ των στελεχών αυτών που παράγουν καρβαπενεμάσες η μελέτη ανέδειξε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό ανήκει σε δυο κλώνους, τον ST-111 και τον ST-235 σε ποσοστό 47.61% και 35.71% αντίστοιχα. Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στους επικρατούντες κλώνους μεταξύ των δύο νοσοκομείων. Τα υπόλοιπα στελέχη ανήκαν στους ST395, ST-244, ST253, ST-277, ST-1457, ST773, ST-308. Βιβλιογραφικά οι δύο επικρατέστεροι κλώνοι στην παρούσα μελέτη φαίνεται να κυριαρχούν και σε διάφορες άλλες γεωγραφικές περιοχές (Giske *et al*, 2006, Empel *et al*, 2007, Lepsanovic *et al*, 2008, Libisch *et al*, 2008, Duljasz *et al*, 2009, Samuelsen *et al*, 2010) και επιπλέον τα στελέχη που ανήκουν σε αυτούς, έχουν συσχετιστεί με τα παλαιότερα γνωστά επιδημικά στελέχη των οροτύπων O:12 και O:11 (Samuelsen *et al*, 2010).

Στην παρούσα μελέτη τα γονίδια των καρβαπενεμασών τύπου VIM εδράζονταν επί ιντεγκρονίων τάξης I, τα οποία έφεραν έξι διαφορετικές μεταβλητές περιοχές. Συγκεκριμένα τρεις διαφορετικές γενετικές δομές βρέθηκε να σχετίζονται με το γονίδιο της VIM-2 (*aacA29a|blaVIM-2|aacA29b*, *blaVIM-2|aacA7|dfrB*, and *blaOXA-10|aacA4|blaVIM-2|smr-2*), μια με το γονίδιο της VIM-4 (*blaVIM-4|arr-7|aacA4|blaPSE-1*), μια με το γονίδιο της VIM-1 (*blaVIM-1*) και μια με το γονίδιο της VIM-17 (*aacA29a|blaVIM-17|aacA29b*). Οι τρεις από τις εν λόγω ιντεγκρονιακές δομές έχουν περιγράψει προηγουμένως σε στελέχη *P. aeruginosa* ανθεκτικά στις καρβαπενέμες, ενώ οι δυο που περιέχουν το γονίδιο της VIM-2 βρέθηκε να αποτελεί μέρος νέων γονιδιακών συστοιχιών (KC527014.1 και KC527015.1) (Siarkou *et al*, 2009, Samuelsen *et al*, 2010).

Η γονιδιακή συστοιχία *aacA29a|blaVIM-2|aacA29b* εντοπίστηκε στο 90% των στελεχών *P. aeruginosa* που έφεραν το γονίδιο της καρβαπενεμάσης VIM-2, τα οποία άνηκαν στους ST-111, ST-308, ST-244, ST-253, ST-277 και ST-773 με τα περισσότερα εξ αυτών να ανήκουν ST-111 (60 στελέχη) στη ΜΕΘ. Στο 8,75% και στο 1,25% των στελεχών *P. aeruginosa* που έφεραν το γονίδιο της καρβαπενεμάσης VIM-2, το γονίδιο αυτό βρέθηκε να αποτελεί μέρος των νέων γονιδιακών συστοιχιών *blaOXA-10|aacA4|blaVIM-2|smr-2* και *blaVIM-2|aacA7|dfrB*, αντίστοιχα. Επιπλέον σε όλα τα στελέχη που έφεραν το αλληλόμορφο VIM-1 εντοπίστηκε η γονιδιακή κασέτα που έφερε

μόνο το συγκεκριμένο γονίδιο, υπεύθυνο για την παραγωγή καρβαπενεμάσης. Στα στελέχη που έφεραν το γονίδιο της καρβαπενεμάσης VIM-4, αυτό βρέθηκε να σχετίζεται αποκλειστικά με τη γονιδιακή συστοιχία *blaVIM-4|arr-7|aacA4|blaPSE-1*, η οποία περιγράφηκε πρώτη φορά στη Σκανδιναβία σε στελέχη απομονωθέντα από ασθενείς που είχαν νοσηλευτεί προηγουμένως στην Ελλάδα και τη Κύπρο (Samuelson *et al*, 2010). Ομοίως με τα απομονωθέντα στη Σκανδιναβία στελέχη, τα στελέχη της παρούσας μελέτης που έφεραν τη συγκεκριμένη γονιδιακή συστοιχία άνηκαν στον ST-235. Τέλος, το γονίδιο της καρβαπενεμάσης VIM-17, που προήρθε από σημειακές μεταλλαγές του γονιδίου της VIM-2 και έχει αναφερθεί αποκλειστικά στην Ελλάδα, βρέθηκε ως μέρος της γονιδιακής συστοιχίας *aacA29a|blaVIM-17|aacA29b*, ενώ τα στελέχη που έφεραν την εν λόγω συστοιχία άνηκαν σε ένα νέο ST, γνωστό πλέον ως ST-1457.

Οι νοσοκομειακές λοιμώξεις από στελέχη *P. aeruginosa* ανθεκτικά στις καρβαπενέμες αποτελούν ένα παγκόσμιο πρόβλημα. Διάφορες μελέτες υποστηρίζουν πως η επιδημιολογική επιτήρηση βασισμένη στην άμεση ανίχνευση της παραγωγής καρβαπενεμάσης θα μπορούσε να εμποδίσει την διασπορά αυτών των ανθεκτικών στελεχών και να ελαττώσει σημαντικά το κόστος νοσηλείας.

Μέχρι σήμερα διάφορες μέθοδοι χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση παραγωγής καρβαπενεμάσης. Σε αυτές περιλαμβάνονται διάφορες φαινοτυπικές μέθοδοι (Modified Hodge Test, EDTA, Boronic acid). Οι περισσότερες από τις δοκιμασίες αυτές απαιτούν τουλάχιστον 18-24 ώρες για να ολοκληρωθούν. Πρόσφατα προτάθηκε ένα νέο φαινοτυπικό τεστ –Carba-NP- που υπόσχεται πολύ καλά αποτελέσματα στην ανίχνευση καρβαπενεμασών (Dortet *et al*, 2012). Ωστόσο, σύμφωνα με μελέτες, υστερεί στην ανίχνευση καρβαπενεμάσης στις ψευδομονάδες καθώς και σε κάποιες κατηγορίες καρβαπενεμασών (π.χ OXA-48). Η δοκιμασία Blue-Carba (Pires *et al*, 2013) που αποτελεί παραλλαγή του Carba-NP φαίνεται να έχει πολύ καλά αποτελέσματα στην ανίχνευση των ψευδομονάδων που παράγουν καρβαπενεμάση κάτι που επιβεβαιώθηκε και από την παρούσα μελέτη. Μία πρόσφατη μελέτη που αξιολογεί τη δοκιμασία αυτή υποστηρίζει ο,τι η αυξημένη ευαισθησία της αφορά όλα τα εντεροβακτηριακά καθώς και αζυμωτικά βακτήρια με διαφορετικές καρβαπενεμάσες εκτός από την OXA-48 (Pasteran *et al*, 2015).

Η χρήση της MALDI-TOF MS ως μέσο ταυτοποίησης μικροβίων κερδίζει συνεχώς έδαφος προσφέροντας άμεσα αποτελέσματα με το χαμηλότερο δυνατό κόστος. Ωστόσο το εύρος εφαρμογών της MALDI-TOF MS αυξάνει διαρκώς και μια από αυτές τις εφαρμογές αφορά την ανίχνευση των μηχανισμών ανοχής σε διάφορα αντιβιοτικά και

ιδιαίτερα των καρβαπενεμασών. Στην παρούσα μελέτη έγινε επίσης προσπάθεια να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της τροποποιημένης μεθόδου MALDI-TOF MS που διαφέρει από την προηγούμενη στο γεγονός ότι στο ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης προστέθηκε 50Mm NH_4HCO_3 (pH 7). Η τροποποίηση αυτή δεν επηρέασε την ειδικότητα της μεθόδου (100%) και επιπλέον βελτίωσε εντυπωσιακά την ευαισθησία της μεθόδου (96,1%) στις ψευδομονάδες. Η μέθοδος αυτή έχει παρόμοια αποτελέσματα με τη μέθοδο αναφοράς που είναι η ανίχνευση της υδρόλυσης της καρβαπενέμης με τη μέθοδο της φασματοφωτομετρίας και χρησιμοποιείται σε εξειδικευμένα κέντρα. Ωστόσο η μέθοδος αναφοράς είναι χρονοβόρα, απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό και είναι δύσκολο να χρησιμοποιηθεί στη ρουτίνα του εργαστηρίου. Έτσι λοιπόν, η χρήση της τροποποιημένης MALDI-TOF MS φαίνεται να αποτελεί ένα αξιόπιστο εργαλείο για την ανίχνευση καρβαπενεμασών στις ψευδομονάδες δίνοντας αξιόπιστο και γρήγορο αποτέλεσμα σε σύγκριση με τις άλλες μεθόδους (Hrabak *et al*, 2011).

Πέρα από την αντοχή της *P. aeruginosa* στα διάφορα αντιμικροβιακά φάρμακα η αντιμετώπιση των λοιμώξεων που προκαλούνται από τα συγκεκριμένα μικρόβια συχνά είναι πολύ δύσκολη και σχετίζεται τόσο με παράγοντες του ξενιστή, όσο και με παράγοντες του ίδιου του μικροοργανισμού.

Σύμφωνα με μελέτες, αποτυχία σε τέτοιες λοιμώξεις παρά τη χορήγηση κατάλληλης θεραπείας πιθανό να οφείλεται στην ενδογενή παθογονικότητα της *P. aeruginosa*. Ένας από τους πιο καθοριστικούς παράγοντες λοιμογονικότητας στη *P. aeruginosa* αποτελεί το εκκριτικό σύστημα τύπου III (TTSS). Επιπλέον φαίνεται πως ορισμένοι κλώνοι, συμπεριλαμβανομένων των πολυανθεκτικών κλώνων υψηλού κινδύνου (Woodford *et al*, 2011), σχετίζονται με συγκεκριμένα προφίλ του εκκριτικού συστήματος τύπου III και διαδραματίζουν σημαντικό πόλο στην παθογονικότητα (Maatallah *et al*, 2011).

Στη παρούσα εργασία προσπαθήσαμε να μελετήσουμε την παθογονικότητα στελεχών *P. aeruginosa* που παράγουν καρβαπενεμάσες και ανήκουν στους επικρατέστερους MLST τύπους των δύο νοσοκομείων που ελέγξαμε. Έγιναν πειράματα *in vivo* στο πειραματικό μοντέλο *Galleria mellonella*. Η επιλογή αυτού του μοντέλου έγινε διότι διαθέτει πολύπλοκο ανοσοποιητικό σύστημα, το κόστος είναι χαμηλό και δεν προκύπτουν ηθικά ζητήματα. Επιπλέον σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με άλλα πειραματικά μοντέλα.

Από τα πειράματα μας προέκυψε ότι οι ST244, ST277 και ST773 ήταν οι πιο παθογονικοί, ακολουθούμενοι από τους ST308 και ST395. Οι ST235 και ST111 που είναι και οι επικρατέστεροι στα δύο νοσοκομεία αναδείχθηκαν οι λιγότερο παθογονικοί. Το γεγονός αυτό πιθανόν να σχετίζεται με την επικράτηση τους και την ικανότητα τους

να διασπείρονται.

Ωστόσο δεν φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση της παθογονικότητας με τα διάφορα προφίλ γονιδίων του εκριτικού συστήματος τύπου III (TTSS) γεγονός που συνηγορεί υπέρ της άποψης ότι ποικίλοι παράγοντες επηρεάζουν την λοιμογόνο δράση του μικροοργανισμού.

Συμπεράσματα

- ✓ Το ποσοστό των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *P. aeruginosa* στα ελληνικά νοσοκομεία παραμένει ιδιαίτερα υψηλό.
- ✓ Τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *P. aeruginosa* εμφάνιζαν πολυανθεκτικούς φαινοτύπους (ανθεκτικότητα σε τουλάχιστον 3 διαφορετικές τάξεις αντιβιοτικών), περιορίζοντας τις υπάρχουσες θεραπευτικές επιλογές.
- ✓ Η ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες των στελεχών *P. aeruginosa* οφείλεται σε αρκετά μεγάλο ποσοστό στην παρουσία των αλληλομόρφων του γονιδίου VIM (VIM-1, VIM-2, VIM-4 και VIM-17).
- ✓ Τα υπεύθυνα για την ανθεκτικότητα έναντι των καρβαπενέμων γονίδια (VIM-1, VIM-2, VIM-4 και VIM-17) βρέθηκε να εδράζονται επί ιντεγκρονίων, γενετικών δομών με ικανότητα ενσωμάτωσης και άλλων γονιδίων που προσδίδουν αντοχή και σε άλλες τάξεις αντιβιοτικών.
- ✓ Η πλειονότητα των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *P. aeruginosa* άνηκαν στους ST-111_{MLST} και ST-235_{MLST}.
- ✓ Αποτελεί επιτακτική ανάγκη η εύρεση μεθόδων για την άμεση ανίχνευση των στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες έτσι ώστε να επιτευχθεί ο έλεγχος της διασποράς.
- ✓ Η τροποποιημένη MALDI-TOF MS αποτελεί μία μέθοδο με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα στην ανίχνευση των ψευδομονάδων που παράγουν καρβαπενεμάση, όπως και η δοκιμασία Blue-Carba η οποία είναι φτηνή, γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδος με δυνατότητα εφαρμογής σε οποιοδήποτε εργαστήριο.
- ✓ Υπάρχουν διαφορές στην παθογονικότητα των στελεχών που ανήκουν σε διαφορετικούς STs που δε σχετίζονται με την παρουσία συγκεκριμένων γονιδίων παθογονικότητας του εκκριτικού συστήματος τύπου III

- ✓ Οι πιο συχνοί MLST τύποι της μελέτης μας συσχετίστηκαν με μειωμένη παθογονικότητα εύρημα που συσχετίζεται με την ικανότητα τους να διασπείρονται και να επικρατούν έναντι των υπολοίπων.

BIBΛIOΓPAΦIA

Allewelt M, Coleman FT, Grout M, Priebe GP, Pier GB. Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. *Infect Immun.* 2000;68(7):3998-4004.

Aloush V, Navon-Venezia, S., Seigman-Igra, Y., Cabili, S., Carmeli, Y., (2006). Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 43–48.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.

Arbeit, R.D., Arthur, M., Dunn, R., Kim, C., Selander, R.K., Goldstein, R., (1990). Resolution of recent evolutionary divergence among *Escherichia coli* from related lineages: the application of pulsed field electrophoresis to molecular epidemiology. *J. Infect. Dis.* 161, 230–235

bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic

Bagge N, Ciofu O, Hentzer M, Campbell JI, Givskov M, Høiby N. Constitutive high expression of chromosomal beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in ampD. *Antimicrob Agents Chemother* 2002, 46:3406-3411.

Bellido F, Martin NL, Siehnel RJ, Hancock RE. Reevaluation, using intact cells, of the exclusion limit and role of porin OprF in *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane permeability. *J Bacteriol.* 1992;174(16):5196-203

Ben Haj Khalifa A, Moissenet D, Vu Thien H, Khedher M. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. *Ann Biol Clin.* 2011;69(4):393-403.

Bennett PM. Genome plasticity: insertion sequence elements, transposons and integrons, and DNA rearrangement. *Methods Mol Biol.* 2004;266:71-113.

Bokaeian M, Shahraki Zahedani S, Soltanian Bajgiran M, Ansari Moghaddam A. Frequency of PER, VEB, SHV, TEM and CTX-M Genes in Resistant Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Producing Extended Spectrum β -Lactamases. *Jundishapur J Microbiol.* 2014 Dec 8;8(1):e13783. doi: 10.5812/jjm.13783. eCollection

2015.

Breidenstein EB, de la Fuente-Núñez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol.* 2011 Aug;19(8):419-26. doi: 10.1016/j.tim.2011.04.005. Epub 2011 Jun 12.

Burrows LL. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annu Rev Microbiol.* 2012;66:493-520.

Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(6):1211-33.

Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):969-76.

Carattoli A, Miriagou V, Bertini A, Loli A, Colinon C, Villa L, Whichard JM, Rossolini GM. Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer beta-lactams. *Emerg Infect Dis.* 2006 Jul;12(7):1145-8.

Castanheira, M., Toleman, M.A., Jones, R.N., Schmidt, F.J., Walsh, T.R., (2004). Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 4654–4661

Chang, H.L., Tang, C.-H., Hsu, Y.-M., Wan, L., Chang, Y.-F., Lin, C.-T., Tseng, Y.-R., Lin, Y.-J., Sheu, J.J.-C., Lin, C.-W., Chang, Y.-C., Ho, M.-W., Lin, C.-D., Ho, C.-M., Lai, C.-H., (2009). Nosocomial outbreak of infection with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a medical center in Taiwan. *Infect Control Hosp Epidemiol* 30, 34–38.

Charnock C, Bergan T. Multilocus enzyme electrophoresis of major O-antigen reference strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1992 Sep;11(9):810-6.

Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2013 Jul;26(3):547-603. doi: 10.1128/CMR.00072-12.

Cohen J, Powderly WG. *Infectious Diseases, Pseudomonas and Miscellaneous Gram-negative Bacilli.* 2nd edition, Mosby.2004.

Curran, B., Jonas, D., Grundmann, H., Pitt, T., Dowson, C.G., (2004). Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen

Pseudomonas aeruginosa. J. Clin. Microbiol. 42, 5644–5649.

Dobrindt U, Hacker J. Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. Curr Opin Microbiol. 2001 Oct;4(5):550-7.

Dortet L, Poirel L, and Nordmann P. Rapid Detection of Carbapenemase-Producing *Pseudomonas* spp. J. Clin. Microbiol. 2012, 50(11):3773. DOI: 10.1128/JCM.01597-12.

Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Microbes Infect. 2003;5(13):1213-9.

Duljasz, W., Gniadkowski, M., Sitter, S., Wojna, A., Jebelean, C., (2009). First Organisms with Acquired Metallo- β -Lactamases (IMP-13, IMP-22, and VIM-2) Reported in Austria. Antimicrob. Agents Chemother. 53, 2221–2222.

Elsevier Inc ., New York, USA

Empel, J., Filczak, K., Mrówka, A., Hryniewicz, W., Livermore, D.M., Gniadkowski, M., (2007). Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* Infections with PER-1 Extended-Spectrum β -Lactamase in Warsaw, Poland: Further Evidence for an International Clonal Complex. J. Clin. Microbiol. 45, 2829–2834.

Epelman S, Bruno TF, Neely GG, Woods DE, Mody CH. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S induces transcriptional expression of proinflammatory cytokines and chemokines. Infect Immun. 2000;68(8):4811-4.

F. Pasteran, O. Veliz, P. Ceriana, C. Lucero, M. Rapoport, E. Albornoz, S. Gomez, A. Corso, ReLAVRA Network Group. Evaluation of the Blue-Carba test for rapid detection of carbapenemases in gram- 2 negative bacilli. J. Clin. Microbiol. 2015, doi:10.1128/JCM.03026-14.

Farmer JJ 3rd, Weinstein RA, Zierdt CH, Brokopp CD. Hospital outbreaks caused by *Pseudomonas aeruginosa*: importance of serogroup O11. J Clin Microbiol. 1982 Aug;16(2):266-70.

Feltman H, Schulert G, Khan S, Jain M, Peterson L, Hauser AR. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology. 2001;147(Pt 10):2659-69.

Finck-Barbancon V, Goranson J, Zhu L, Sawa T, Wiener-Kronish JP, Fleiszig SM, Wu C, Mende-Mueller L, Frank DW. *ExoU* expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. Mol Microbiol. 1997;25(3):547-57.

Flateau, C., Janvier, F., Delacour, H., Males, S., Ficko, C., Andriamanantena,

D., Jeannot, K., Merens, A., Rapp, C., (2012). Recurrent pyelonephritis due to NDM-1 metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in a patient returning from Serbia, France, 2012. Euro Surveill. 17.

Fleiszig SM, Wiener-Kronish JP, Miyazaki H, Vallas V, Mostov KE, Kanada D, Sawa T, Yen TS, Frank DW. *Pseudomonas aeruginosa*-mediated cytotoxicity and invasion correlate with distinct genotypes at the loci encoding exoenzyme S. Infect Immun. 1997;65(2):579-86.

for frequent recombination and epidemic occurrence of CC235. PLoS

Frank DW. The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol. 1997;26(4):621-9.

Frère, J.M., Galleni, M., Bush, K., Dideberg, O., (2005). Is it necessary to change the classification of {beta}-lactamases? J. Antimicrob. Chemother. 55, 1051–1053.

Frithz-Lindsten E, Du Y, Rosqvist R, Forsberg A. Intracellular targeting of exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* via type III-dependent translocation induces phagocytosis resistance, cytotoxicity and disruption of actin microfilaments. Mol Microbiol. 1997;25(6):1125-39.

Fyfe JA, Harris G, Govan JR. Revised pyocin typing method for *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol. 1984 Jul;20(1):47-50.

Galan JE, Collmer A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. Science. 1999;284(5418):1322-8.

Giakkoupi P, Petrikos G, Tzouvelekis LS, Tsonas S, Legakis NJ, Vatopoulos AC; WHONET Greece Study Group. Spread of integron-associated VIM-type metallo-beta-lactamase genes among imipenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* strains in Greek hospitals. J Clin Microbiol. 2003 Feb;41(2):822-5.

Giakkoupi P, Xanthaki A, Kanelopoulou M, Vlahaki A, Miriagou V, Kontou S, Papafraggas E, Malamou-Lada H, Tzouvelekis LS, Legakis NJ, Vatopoulos AC. VIM-1 Metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. J Clin Microbiol. 2003 Aug;41(8):3893-6.

Giakkoupi, P., Petrikos, G., Tzouvelekis, L.S., Tsonas, S., Legakis, N.J., Vatopoulos, A.C., WHONET Greece Study Group, (2003β). Spread of integron-associated VIM-type metallo-beta-lactamase genes among imipenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* strains in Greek hospitals. J. Clin. Microbiol. 41, 822–825.

Gilarranz, R., Juan, C., Castillo-Vera, J., Chamizo, F.J., Artiles, F., Alamo, I., Oliver, A., (2013). First detection in Europe of the metallo- β -lactamase IMP-15 in clinical strains of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Microbiol. Infect.*

Gillies RR, Govan JR. Typing of *Pseudomonas pyocyanea* by pyocine production. *J Pathol Bacteriol.* 1966 Apr;91(2):339-45.

Giske, C.G., Libisch, B., Colimon, C., Scoulica, E., Pagani, L., Füzi, M., Kronvall, G., Rossolini, G.M., (2006). Establishing clonal relationships between VIM-1-like metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from four European countries by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4309–4315.

Goering, R.V., (2010). Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect. Genet. Evol.* 10, 866–875.

Gordillo, M.E., Singh, K.V., Baker, C.J., Murray, B.E., (1993). Typing of group B streptococci: comparison of pulsed-field gel electrophoresis and conventional electrophoresis. *J Clin Microbiol* 31, 1430–1434.

Grimwood K, Kyd JM, Owen SJ, Massa HM, Cripps AW . Vaccination against respiratory *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Hum Vaccin Immunother.* 2014 Aug 5;11(1). [Epub ahead of print]

Hacker J, Hentschel U, Dobrindt U. Prokaryotic chromosomes and disease. *Science.* 2003 Aug 8;301(5634):790-3.

Hancock RE. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative Gram negative bacteria. *Clin Infect Dis.* 1998;27 Suppl 1:S93-9.

Hancock, R.E.W. (1998) Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative Gram-negative bacteria. *Clin.Infect. Dis.* 27 (Suppl. 1), S93–S99

Harmsen M, Yang L, Pamp SJ, Tolker-Nielsen T. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010;59(3):253-68.

Harris A, Torres-Viera, C., Venkataraman, L., DeGirolami, P., Samore, M., Carmeli, Y., (1999). Epidemiology and clinical outcomes of patients with multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Infect. Dis.* 28, 1128–1133.

Hauser AR, Kang PJ, Engel JN. *PepA*, a secreted protein of *Pseudomonas*

aeruginosa, is necessary for cytotoxicity and virulence. *Mol Microbiol.* 1998;27(4):807-18.

Hodge, W., Ciak, J., Tramont, E.C., (1978). Simple Method for Detection of Penicillinase-Producing *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Clin. Microbiol.* 7, 102–103.

Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35(4):322-32.

Hrabak J, Chudackova E, Walkova R. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (MALDITOF) Mass Spectrometry for Detection of Antibiotic Resistance Mechanisms: from Research to Routine Diagnosis. *CMR* Jan. 2013

Hrabák J, Studentová V, Walková R, Zemlicková H, Jakubu V, Chudácková E, Gniadkowski M, Pfeifer Y, Perry JD, Wilkinson K, Bergerová T. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012 Jul;50(7):2441-3. doi: 10.1128/JCM.01002-12. Epub 2012 May 2.

Hrabák J, Walková R, Studentová V, Chudácková E, Bergerová T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011 Sep;49(9):3222-7. doi: 10.1128/JCM.00984-11. Epub 2011 Jul 20.

Hrabak J., Walkova R, Sřtudentova V, Chudaćkova E, and Bergerova T. Carbapenemase Activity Detection by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal Of Clinical Microbiology*, Sept. 2011, p. 3222–3227

Inslar MS, Gore H. *Pseudomonas* keratitis and folliculitis from whirlpool exposure. *Am J Ophthalmol.* 1986 Jan 15;101(1):41-3.

J. Pires, Â. Novais and L. Peixe. Blue-Carba, an Easy Biochemical Test for Detection of Diverse Carbapenemase Producers Directly from Bacterial Cultures *J. Clin. Microbiol.* 2013, 51(12):4281 DOI: 10.1128/JCM.01634-13.

Jimenez PN, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH, Quax WJ. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012;76(1):46-65.

Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1985, 28:302–307.

Koenig SM, Truwit JD. Ventilator-associated pneumonia: diagnosis, treatment,

and prevention. Clin Microbiol Rev. 2006 Oct;19(4):637-57.

Koneman WE, Allen DS, Janda MW, Schreckenberger CP, Winn CW. Color atlas and textbook of Diagnostic Microbiology. 5th edition, Lippincott Williams and Wilkins 1997.

Koutsogiannou, M., Drougka, E., Liakopoulos, A., Jelastopulu, E., Petinaki, E., Anastassiou, E.D., Spiliopoulou, I., Christofidou, M., (2013). Spread of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clones in a university hospital. J. Clin. Microbiol. 51, 665–668.

Kureishi A, Diver JM, Beckthold B, Schollaardt T, Bryan LE. Cloning and nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* DNA gyrase *gyrA* gene from strain PAO1 and quinolone-resistant clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. 1994;38(9):1944-52.

Lanini, S., D'Arezzo, S., Puro, V., Martini, L., Imperi, F., Piselli, P., Montanaro, M., Paoletti, S., Visca, P., Ippolito, G., (2011). Molecular Epidemiology of a *Pseudomonas aeruginosa* Hospital Outbreak Driven by a Contaminated Disinfectant-Soap Dispenser. PLoS ONE 6, e17064.

Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother. 1999 Jul;43(7):1584-90.

Lee K, Lim JB, Yum JH, Yong D, Chong Y, Kim JM, Livermore DM. bla(VIM-2) cassette-containing novel integrons in metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital. Antimicrob Agents Chemother. 2002 Apr;46(4):1053-8.

Legakis NJ, Aliferopoulou M, Papavassiliou J, Papapetropoulou M. Serotypes of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical specimens in relation to antibiotic susceptibility. J Clin Microbiol. 1982 Sep;16(3):458-63.

Lepsanovic, Z., Libisch, B., Tomanovic, B., Nonkovici, Z., Balogh, B., Füzi, M., (2008). Characterisation of the first VIM metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Serbia. Acta Microbiol Immunol Hung 55, 447–454.

Libisch, B., Watine, J., Balogh, B., Gacs, M., Muzslay, M., Szabó, G., Füzi, M., (2008). Molecular typing indicates an important role for two international clonal complexes in dissemination of VIM-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates

in Hungary. Res. Microbiol. 159, 162–168.

Lister PD, Gardner VM, Sanders CC. Clavulanate induces expression of the *Pseudomonas aeruginosa* AmpC cephalosporinase at physiologically relevant concentrations and antagonizes the antibacterial activity of ticarcillin. Antimicrob Agents Chemother 1999, 43:882-889.

Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clin Microbiol Rev. 2009;22(4):582-610

Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev. 1995;8(4):557-84.

Livermore, D.M., Woodford, N., (2006). The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. Trends Microbiol. 14, 413–420.

Maatallah M, Cheriaa J, Backhrouf A, et al. Population structure of **Macfarlane EL, Kwasnicka A, Hancock RE.** Role of *Pseudomonas aeruginosa* PhoP-phoQ in resistance to antimicrobial cationic peptides and aminoglycosides. Microbiology. 2000;146 (Pt 10):2543-54.

Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., Spratt, B.G., (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 3140–3145.

Mavroidi, A., Tsakris, A., Tzelepi, E., Pournaras, S., Loukova, V., Tzouvelekis, L.S., (2000). Carbapenem-hydrolysing VIM-2 metallo- beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* from Greece. J. Antimicrob. Chemother. 46, 1041–1042.

Medeiros, A.A., (1997). Evolution and Dissemination of -Lactamases Accelerated by Generations of -Lactam Antibiotics. Clinical Infectious Diseases 24, S19–S45.

Mesaros N, Nordmann P, Plesiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, Van Laethem Y, Jacobs F, Lebecque P, Malfroot A, Tulkens PM, Van Bambeke F. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. Clin Microbiol Infect. 2007;13(6):560-78

Michel-Briand Y, Baysse C. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*.

Biochimie. 2002 May-Jun;84(5-6):499-510.

Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M, Malamou-Lada E, Martinez-Martinez L, Navarro F, Nordmann P, Peixe L, Pournaras S, Rossolini GM, Tsakris A, Vatopoulos A, Cantón R. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect.* 2010 Feb;16(2):112-22.

Miriagou V, Tzelepi E, Gianneli D, Tzouvelekis LS. Escherichia coli with a self-transferable, multiresistant plasmid coding for metallo-beta-lactamase VIM-1. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Jan;47(1):395-7

Miyata S, Casey M, Frank DW, Ausubel FM, Drenkard E. Use of the Galleria mellonella caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in Pseudomonas aeruginosa pathogenesis. *Infect Immun.* 2003 May;71(5):2404-13.

Moskowitz SM, Ernst RK, Miller SI. *PmrAB*, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *J Bacteriol.* 2004;186(2):575-9.

Moyes, R.B., Reynolds, J., Breakwell, D.P., (2009). Differential staining of bacteria: gram stain. *Curr Protoc Microbiol Appendix 3, Appendix 3C.*

Murchan, S., Kaufmann, M.E., Deplano, A., de Ryck, R., Struelens, M., Zinn, C.E., Fussing, V., Salmenlinna, S., Vuopio-Varkila, J., El Solh, N., Cuny, C., Witte, W., Tassios, P.T., Legakis, N., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Vindel, A., Laconcha, I., Garaizar, J., Haeggman, S., Olsson-Liljequist, B., Ransjo, U., Coombes, G., Cookson, B., (2003). Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1574–1585

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA, *Medical Microbiology* 5th ed., 2005,

Mutharia LM, Nicas TI, Hancock RE. Outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* serotype strains. *J Infect Dis.* 1982 Dec;146(6):770-9

Nicas TI, Iglewski BH. The contribution of exoproducts to virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can J Microbiol.* 1985;31(4):387-92.

Nikaido H, Nikaido K, Harayama S. Identification and characterization of porins

in *Pseudomonas aeruginosa*. J Biol Chem. 1991 15;266(2):770-9.

Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis. 2011 Oct;17(10):1791-8. doi: 10.3201/eid1710.110655.

Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clin Microbiol Infect. 2002 Jun;8(6):321-31.

Norman A, Hansen LH, Sørensen SJ. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2009 Aug 12;364(1527):2275-89.

Okii M, Iyobe S, Mitsuhashi S. Mapping of the gene specifying aminoglycoside 3'-phosphotransferase II on the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. J Bacteriol. 1983;155(2):643-9.

One 2011; 6:e25617.

Page, C., Curtis, M., Walker, M., Hoffman, B., (2005). Integrated pharmacology, 2nd ed. Mosby, London.

Palleroni NJ, Family Pseudomonadaceae, In: Krieg NR, Holt JG, eds Bergey's Manual of Systemic Bacteriology. Vol I. Baltimore: Williams and Wilkins 1984;141-219

Paton, R., Miles, R.S., Hood, J., Amyes, S.G., Miles, R.S., Amyes, S.G., (1993). ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Int. J. Antimicrob. Agents 2, 81–87.

Patzer JA, Walsh TR, Weeks J, Dzierzanowska D, Toleman MA. Emergence and persistence of integron structures harbouring VIM genes in the Children's Memorial Health Institute, Warsaw, Poland, 1998-2006. J Antimicrob Chemother. 2009 Feb;63(2):269-73. doi: 10.1093/jac/dkn512. Epub 2008 Dec 18.

Peña C, Cabot G, Gómez-Zorrilla S, Zamorano L, Ocampo-Sosa A, Murillas J, Almirante B, Pomar V, Aguilar M, Granados A, Calbo E, Rodríguez-Baño J, Rodríguez-López F, Tubau F, Martínez-Martínez L, Oliver A; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. Clin Infect Dis. 2015 Feb 15;60(4):539-48. doi: 10.1093/cid/ciu866. Epub 2014 Nov 6.

Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. J Clin Microbiol. 2013

Dec;51(12):4281-3. doi: 10.1128/JCM.01634-13. Epub 2013 Oct 9.

Pitt TL, Livermore DM, Pitcher D, Vatopoulos AC, Legakis NJ. Multiresistant serotype O12 *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for a common strain in Europe. *Epidemiol Infect.* 1989 Dec;103(3):565-76

Pollack M. The virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis.* 1984;6 Suppl 3:S617-26.

Polotto, M., Casella, T., de Lucca Oliveira, M.G., Rúbio, F.G., Nogueira, M.L., de Almeida, M.T., Nogueira, M.C., (2012). Detection of *P. aeruginosa* harboring bla CTX-M-2, bla GES-1 and bla GES-5, bla IMP-1 and bla SPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. *BMC Infect. Dis.* 12, 176

Poole K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2001;3(2):255-64.

Poole K, Srikumar R. Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms and clinical significance. *Curr Top Med Chem.* 2001 May;1(1):59-71.

Pournaras S, Tsakris A, Maniati M, Tzouvelekis LS, Maniatis AN. Novel variant (bla(VIM-4)) of the metallo-beta-lactamase gene bla(VIM-1) in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Dec;46(12):4026-8.

Pournaras, S., Tsakris, A., Maniati, M., Tzouvelekis, L.S., Maniatis, A.N., (2002). Novel variant (bla(VIM-4)) of the metallo-beta-lactamase gene bla(VIM-1) in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 4026–4028.

Prévost, G., Pottecher, B., Dahlet, M., Bientz, M., Mantz, J.M., Piémont, Y., (1991). Pulsed field gel electrophoresis as a new epidemiological tool for monitoring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* 17, 255–269.

Protonotariou E, Tsalidou M, Vitti D, Kalogeridis A, Sofianou D. First identification of VIM-1-producing *Citrobacter freundii* in Greece. *Int J Antimicrob Agents.* 2008 Nov;32(5):460-1. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.05.008. Epub 2008 Aug 19.

Pseudomonas aeruginosa from five Mediterranean countries: evidence

Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin*

Microbiol Rev. 2007 Jul;20(3):440-58

Ranellou K, Kadlec K, Poulou A, Voulgari E, Vrioni G, Schwarz S, Tsakris A. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates of the international clonal complex 11 carrying the blaPER-1 extended-spectrum β -lactamase gene in Greece. J Antimicrob Chemother. 2012 Feb;67(2):357-61. doi: 10.1093/jac/dkr471. Epub 2011 Nov 8.

Rasmussen, B.A., Bush, K., Keeney, D., Yang, Y., Hare, R., O’Gara, C., Medeiros, A.A., (1996). Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. Antimicrob. Agents Chemother. 40, 2080–2086.

resistance. FEMS Microbiol Rev 2011; 35:736–55.

Rieber, H., Frontzek, A., von Baum, H., Pfeifer, Y., (2012). Emergence of metallo- β -lactamases GIM-1 and VIM in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in North Rhine-Westphalia, Germany. J. Antimicrob. Chemother. 67, 1043–1045.

Rosqvist R, Magnusson KE, Wolf-Watz H. Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia YopE* cytotoxin into mammalian cells. Embo J. 1994;13(4):964-72.

Roy-Burman A, Savel RH, Racine S, Swanson BL, Revadigar NS, Fujimoto J, Sawa T, Frank DW, Wiener-Kronish JP. Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections. J Infect Dis. 2001;183(12):1767-74.

Sambrook J FE, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual, Second ed., 1989, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Samuelsen, Ø., Toleman, M.A., Sundsfjord, A., Rydberg, J., Leegaard, T.M., Walder, M., Lia, A., Ranheim, T.E., Rajendra, Y., Hermansen, N.O., Walsh, T.R., Giske, C.G., (2010). Molecular Epidemiology of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Norway and Sweden Shows Import of International Clones and Local Clonal Expansion. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 346–352.

Schweizer HP. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. Genet Mol Res.2003;2(1):48-62.

Shekar R, Rice TW, Zierdt CH, Kallick CA. Outbreak of endocarditis caused by *Pseudomonas aeruginosa* serotype O11 among pentazocine and tripeleennamine

abusers in Chicago. *J Infect Dis.* 1985 Feb;151(2):203-8.

Shi H, Trinh Q, Xu W, Zhai B, Luo Y, Huang K. A universal primer multiplex PCR method for typing of toxinogenic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012 Sep;95(6):1579-87. doi: 10.1007/s00253-012-4277-8. Epub 2012 Jul 20.

Shigeta M, Tanaka G, Komatsuzawa H, Sugai M, Suginaka H, Usui T. Permeation of antimicrobial agents through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a simple method. *Chemotherapy.* 1997;43(5):340-5.

Siarkou, V.I., Vitti, D., Protonotariou, E., Ikonomidis, A., Sofianou, D., (2009). Molecular epidemiology of outbreak-related *pseudomonas aeruginosa* strains carrying the novel variant blaVIM-17 metallo-beta-lactamase gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 1325–1330

Smith GL. Methods for preventing pseudomonas folliculitis. *Cutis.* 1982;29(4):378, 81.

Smith, P.B., Tomfohrde, K.M., Rhoden, D.L., Balows, A., (1972). API System: a Multitube Micromethod for Identification of Enterobacteriaceae. *Appl Microbiol* 24, 449–452

Smith, P.B., Tomfohrde, K.M., Rhoden, D.L., Balows, A., (1972). API System: a Multitube Micromethod for Identification of Enterobacteriaceae. *Appl Microbiol* 24, 449–452.

Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol.* 2009;58(Pt 9):1133-48.

Swaminathan, B., Barrett, T.J., Hunter, S.B., Tauxe, R.V., (2001). PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerging Infect. Dis.* 7, 382–389.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33(9):2233-9.

Todar K. *Todar's Online Textbook of Bacteriology, Bacterial Diseases of*

Humans, Opportunistic Infections by *Pseudomonas aeruginosa*. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. 2002.

Tosh, P.K., Disbot, M., Duffy, J.M., Boom, M.L., Heseltine, G., Srinivasan A., Gould, C.V., Berríos-Torres, S.I., (2011). Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* surgical site infections after arthroscopic procedures: Texas, 2009. *Infect Control Hosp Epidemiol* 32, 1179–1186.

Tredget EE, Shankowsky HA, Joffe AM, Inkson TI, Volpel K, Paranchych W, Kibsey PC, Alton JD, Burke JF. Epidemiology of infections with *Pseudomonas aeruginosa* in burn patients: the role of hydrotherapy. *Clin Infect Dis*. 1992 Dec;15(6):941-9.

Trias J, Nikaido H. Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. *J Biol Chem*. 1990;265(26):15680-4.

Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, Palepou MF, Babini GS, Douboyas J, Livermore DM. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *J Clin Microbiol*. 2000 Mar;38(3):1290-2.

Tsakris, A., Poulou, A., Pournaras, S., Voulgari, E., Vrioni, G., Themeli-Digalaki, K., Petropoulou, D., Sofianou, D., (2010). A simple phenotypic method for the differentiation of metallo-beta-lactamases and class A KPC carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1664–1671

Tsakris, A., Pournaras, S., Woodford, N., Palepou, M.-F.I., Babini, G.S., Douboyas, J., Livermore, D.M., (2000). Outbreak of Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa* Producing VIM-1 Carbapenemase in Greece. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1290–1292.

Urwin, R., Maiden, M.C.J., (2003). Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* 11, 479–487.

Versalovic, J., Kapur, V., Koeuth, T., Mazurek, G.H., Whittam, T.S., Musser, J.M., Lupski, J.R., (1995). DNA fingerprinting of pathogenic bacteria by fluorophore-enhanced repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 119, 23–29.

Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* 2005 Apr;18(2):306-25.

Walther-Rasmussen, J., Høiby, N., (2007). Class A carbapenemases. *J.*

Antimicrob. Chemother. 60, 470–482.

Wang JD, Levin PA. Metabolism, cell growth and the bacterial cell cycle. Nat Rev Microbiol. 2009 Nov;7(11):822-7. doi: 10.1038/nrmicro2202. Epub 2009 Oct 6

Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M., Mitsuhashi, S., (1991). Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 35, 147–151.

Winn M, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, WoodsVG, Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology sixth ed., 2006, Julie Montalbano, Williams & Wilkins, Philadelphia

Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant gram-negative
Yahr TL, Vallis AJ, Hancock MK, Barbieri JT, Frank DW. ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(23):13899-904.

Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC, Luh KT, Tsai SH, Wu HM, Wu JJ. Metallo-beta-lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. Antimicrob Agents Chemother. 2001 Aug;45(8):2224-8.

Yang, Y.J., Wu, P.J., Livermore, D.M., (1990). Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 34, 755–758.

Yigit, H., Queenan, A.M., Anderson, G.J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J.W., Steward, C.D., Alberti, S., Bush, K., Tenover, F.C., (2001). Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 1151–1161.

Yu, F., Ying, Q., Chen, C., Li, T., Ding, B., Liu, Y., Lu, Y., Qin, Z., Parsons, C., Salgado, C., Qu, D., Pan, J., Wang, L., (2012). Outbreak of pulmonary infection caused by *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring blaIMP-4 and blaDHA-1 in a neonatal intensive care unit in China. J Med Microbiol.

Αντιγόνη Αρσένη. Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή διάγνωση των λοιμώξεων, Ψευδομονάδες, 4^η έκδοση, Ιατρικές εκδόσεις «Ζήτα», 1994.

Δημητρακόπουλος Γ. Ιατρική βακτηριολογία, 1983, Ιατρικές εκδόσεις ΠΧ Πασχαλίδη.

Παπαπαναγιώτου Ι, Κυριαζοπούλου-Δαλαίνα Β. Εισαγωγή στην Ιατρική Μικροβιολογία, Ιολογία και Ανοσολογία. Εκδόσεις University Studio Press. Θεσσαλονίκη, 2005.

Παπαπαναγιώτου Ι, Κυριαζοπούλου-Δαλαίνα Β. Ιατρική Μικροβιολογία και ιολογία. 1^η έκδοση University Studio Press. Θεσσαλονίκη, 2001.