



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Θέμα: *Klebsiella pneumoniae* ανθεκτική στην κολιστίνη. Επιδημιολογικά δεδομένα-Διερεύνηση μηχανισμών αντοχής**

Αλεξάνδρα Κούμπου  
Βιολόγος

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Ευθυμία Πετεινάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Επιβλέπουσα
- Αναστάσιος Γερμενής, Καθηγητής Ανοσολογίας
- Ματθαίος Σπελέτας, Αναπληρωτής Καθηγητής Ανοσολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στις Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής

Λάρισα, Μάρτιος, 2016



UNIVERSITY OF THESSALY  
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE  
FACULTY OF MEDICINE



**MASTER PROGRAM IN**  
**“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”**

**MASTER THESIS**

**TITLE: *Klebsiella pneumoniae* colistin resistant. Epidemiological data-Study of mechanisms of resistance**

By  
Alexandra Koumpou  
Biologist

Three-membered examination committee:

- Efthimia Petinaki, Associate Professor of Microbiology, Supervisor
- Anastasios Germenis, Professor of Immunology
- Matthaios Speletas, Associate Professor of Immunology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Clinical Applications of Molecular Medicine

Larissa, March, 2016

## Πίνακας περιεχομένων

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	7
ABSTRACT .....	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	10
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	11
1. <i>Enterobacteriaceae</i> .....	13
2. <i>Klebsiella spp.</i> .....	14
3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	19
3.1 Γενικά στοιχεία.....	19
3.2 Μορφολογία.....	19
3.2.1 Εξωτερικά χαρακτηριστικά.....	19
3.3 Κυτταρικά στοιχεία.....	20
3.3.1 Κάψα .....	20
3.3.2 Κροσσοί .....	21
3.3.3 Κυτταρικός φάκελος.....	21
3.3.4 Εξωτερική μεμβράνη.....	22
3.3.4.1 Λιποπολυσακχαρίτης (Lipopolysaccharide, LPS).....	23
3.3.4.1.1 Αντιγόνο-O.....	24
3.3.4.1.2 Ολιγοσακχαριδικός πυρήνας .....	25
3.3.4.1.3 Λιπίδιο A.....	25
3.3.5 Κυτταρικό τοίχωμα πεπτιδογλυκάνης .....	26
3.3.6 Περίπλασμα.....	26
3.3.7 Εσωτερική μεμβράνη .....	27
3.3.8 Το γονιδίωμα της <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	27
3.4 Λοιμογόνοι παράγοντες της <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	28
3.4.1 Αντιγόνο K .....	28
3.4.2 Προσκολλητίνες.....	29
3.4.3 Ενδοτοξίνες .....	30
3.4.4 Μεταφορείς σιδήρου .....	32
3.5 Λοιμώξεις που προκαλούνται από <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	33
3.6 Εργαστηριακή ταυτοποίηση <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	34
3.7 Αντιβιοτικά .....	34
3.8 Β-λακταμικά αντιβιοτικά.....	37

3.9 Θεραπευτικά σχήματα για την αντιμετώπιση της <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	39
3.10 Επιδημιολογικά στοιχεία.....	40
3.11 Πολυμυξίνες .....	43
3.11.1 Κολιστίνη .....	44
3.12 Μηχανισμοί αντοχής στις πολυμυξίνες στην <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	45
3.12.1 LPS τροποποιήσεις .....	46
3.12.2 Υποακυλίωση του λιπιδίου A και η επίδρασή της στην αντοχή στις πολυμυξίνες .....	48
3.12.3 Άλλες τροποποιήσεις του LPS που συνδέονται με αντοχή στις πολυμυξίνες .....	48
3.12.4 Ρόλος της κάψας στην αντοχή στις πολυμυξίνες.....	49
3.12.5 Ρόλος της αντλίας εκροής στην αντοχή στις πολυμυξίνες.....	49
3.13 Ο ρόλος του <i>mgrB</i> γονιδίου στην αντοχή στην κολιστίνη στην <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	50
3.13.1 Το <i>mgrB</i> γονίδιο και η MgrB πρωτεΐνη .....	50
3.13.2 Μηχανισμός λειτουργίας του <i>mgrB</i> γονιδίου και η σχέση του στην έκφραση αντοχής στην κολιστίνη σε <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	51
3.13.3 Τρόποι μετάλλαξης/απενεργοποίησης του <i>mgrB</i> γονιδίου .....	53
Σκοπός .....	55
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	56
1. Υλικά και μέθοδοι .....	57
1.1 Βακτηριακά στελέχη <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	57
1.2 Καλλιέργεια στελεχών <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	57
1.3 Έλεγχος αντοχής στα αντιβιοτικά.....	58
1.3.1 Διάχυση δίσκων (Kirby – Bauer).....	58
1.3.2 Ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικού (E-test).....	58
1.3.3 Έλεγχος ευαισθησίας με το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek-2 (BioMerieux) .....	58
1.4 Απομόνωση DNA .....	59
1.4.1 Υλικά και Εξοπλισμός: .....	59
1.4.2 Διαδικασία.....	59
1.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης .....	60
1.5.1 Αρχή της μεθόδου .....	60
1.5.2 Υλικά και Εξοπλισμός: .....	60
1.5.3 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης (gel) και ηλεκτροφόρηση του δείγματος.....	61
1.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reactin).....	62
1.6.1 Αρχή της μεθόδου .....	62
1.6.2 Υλικά και Εξοπλισμός .....	63
1.6.3 Διαδικασία.....	63
1.7 Καθαρισμός προϊόντων PCR .....	64

1.7.1 Υλικά και Εξοπλισμός .....	64
1.7.2 Διαδικασία.....	65
1.8 Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (Αλληλούχιση, Sequencing) .....	66
1.8.1 Αρχή μεθόδου .....	66
1.9 Πολυτοπική Τυποποίηση Αλληλουχίας (Multilocus Sequence Typing, MLST) .....	68
1.9.1 Αρχή της μεθόδου .....	68
1.9.2 Διαδικασία.....	69
1.10 Διερεύνηση ύπαρξης γονιδίων που κωδικοποιούν VIM και KPC καρβαπενεμάσες .....	71
2. Αποτελέσματα .....	72
3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	81
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	84
Παραπομπές.....	90
Συνομογραφίες .....	91

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Μικροβιολογίας κ. Ευθυμίας Πετεινάκη, κατά το χρονικό διάστημα 2014-2015.

Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της διπλωματικής κ. Πετεινάκη, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα του τομέα της Μικροβιολογίας, για τη θεωρητική αλλά και πρακτική κατάρτιση που μου πρόσφερε, αλλά και για την καθοδήγηση, τη βοήθεια, τις συμβουλές και τις παρατηρήσεις ώστε να ολοκληρωθεί επιτυχώς αυτή η διπλωματική εργασία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ανοσολογίας κ. Αναστάσιο Γερμενή και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ανοσολογίας κ. Ματθαίο Σπελέτα, για την τιμή που μου έκαναν με τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή, τη διοργάνωση των μαθημάτων ανοσολογίας, αλλά και την ευκαιρία που μου έδωσαν να συμμετέχω σε αυτό το πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μικροβιολόγο και υποψήφια διδάκτορα Στέλα Σάρρου και τη μικροβιολόγο και Δρ. Όλγα Οικονόμου από τις οποίες διδάχθηκα βασικές τεχνικές που εφάρμοσα στα πειράματά μου, αλλά και για τις συμβουλές και τη βοήθειά τους καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής.

Θερμές ευχαριστίες στη Βίκη Χαχούδη και την Ιωάννα Βουλγαρίδη με τις οποίες ξεκίνησα αυτό το μεταπτυχιακό, για την άριστη συνεργασία, την ανταλλαγή απόψεων και τη βοήθειά τους όποτε χρειάστηκε.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας που έμμεσα ή άμεσα συνέβαλαν στην πραγματοποίηση αυτής της διπλωματικής.

Ευχαριστώ πολύ τους φίλους μου που με υποστηρίζουν και με ενθαρρύνουν να συνεχίσω και ιδιαίτερα τη Δρ Πηνελόπη Σαμαρά για τις εύστοχες παρατηρήσεις της, τις συμβουλές και την ουσιαστική βοήθεια για την ολοκλήρωση αυτής της διπλωματικής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράστασή τους σε ότι και αν κάνω και για τις αγόγγυστες θυσίες τους, την αδερφή μου Μαρία που είναι πάντα δίπλα μου και τον εκπληκτικό ανιψιό μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια η αύξηση των λοιμώξεων που προκαλούνται από πολυανθεκτικά Gram-αρνητικά βακτήρια, ειδικά των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες Εντεροβακτηριακών, οδήγησε παγκοσμίως στην επαναχρησιμοποίηση των πολυμυξινών (πολυμυξίνης Β και κολιστίνης) σαν θεραπεία τελευταίας καταφυγής, καθώς ανήκουν στους ελάχιστους αντιμικροβιακούς παράγοντες που διατηρούν τη δράση τους έναντι αυτών των βακτηρίων. Ωστόσο, υπάρχουν αυξανόμενες αναφορές για ανάδυση ανθεκτικών στις πολυμυξίνες βακτηριακών στελεχών, διακυβεύοντας έτσι τη χρήση τους ως θεραπευτικό μέσο.

Η *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) είναι ένα Gram-αρνητικό βακτήριο της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών που σχετίζεται με νοσοκομειακές λοιμώξεις όπως ουρολοιμώξεις, πνευμονία και σηψαιμία. Τα στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν KPC τύπου καρβαπενεμάσες (KPC-KP) όχι μόνο εμφανίζουν πολυαντοχή σε διάφορα αντιμικροβιακά φάρμακα αλλά έχουν διασπαρεί στα ελληνικά νοσοκομεία. Καθώς η κολιστίνη αποτελεί το μοναδικό αντιμικροβιακό παράγοντα έναντι των KPC+ *K. pneumoniae*, η εμφάνιση αντοχής σε αυτή αποτελεί σοβαρό θεραπευτικό πρόβλημα.

Η αντοχή στις πολυμυξίνες και σε άλλα κατιονικά αντιμικροβιακά πεπτιδία στην *K. pneumoniae*, φαίνεται να οφείλεται στην τροποποίηση του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) ύστερα από την προσθήκη της 4-άμινο-4-δεόξυ-L-αραβινόζης (L-Ara4N) στο λιπίδιο A, που μειώνει τη συγγένεια των πολυμυξινών στον LPS στόχο καθώς δημιουργεί ένα πιο θετικά φορτισμένο λιποπολυσακχαρίτη. Αυτή η τροποποίηση οφείλεται στα προϊόντα του *pmrHFJKLM* οπερονίου (επίσης γνωστό ως *pbgPE* ή *arn*), το οποίο έχει συντηρημένη λειτουργία στα Εντεροβακτηριακά και φαίνεται να ρυθμίζεται θετικά από τα PhoP/PhoQ και PmrA/PmrB συστήματα σηματοδότησης. Αυτά τα συστήματα σηματοδότησης των δύο-στοιχείων ενεργοποιούνται από σήματα όπως το χαμηλό εξωκυττάριο  $Mg^{2+}$ , το όξινο pH, ή η παρουσία κατιονικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων.

Η MgrB είναι μια μικρή ρυθμιστική διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η παραγωγή της οποίας επάγεται με την ενεργοποίηση του PhoP/PhoQ συστήματος σηματοδότησης και ασκεί αρνητική ανάδραση σε αυτό το σύστημα με απευθείας αλληλεπίδραση με τον PhoQ αισθητήρα κινάσης. Η πρωτεΐνη αυτή έχει αξιοσημείωτα συντηρημένη λειτουργία στα Εντεροβακτηριακά.

Η απενεργοποίηση του *mgrB* γονιδίου στην *K. pneumoniae* φαίνεται ότι οδηγεί σε πλειορύθμιση του PhoP/PhoQ συστήματος και του *pmrHFJKLM* οπερονίου και καθώς συνιστά ένα γενετικό μηχανισμό υπεύθυνο για την αντοχή στην κολιστίνη, η μελέτη του αποτέλεσε το κύριο αντικείμενο μελέτης αυτής της διπλωματικής εργασίας. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι μεταβολές του *mgrB* αφορούσαν μη σιωπηλές σημειακές μεταλλάξεις

(που είχαν ως αποτέλεσμα αμινοξικές αντικαταστάσεις και παρουσία πρόωρου κωδικονίου τερματισμού της σύνθεσης της αμινοξικής αλυσίδας) και ενθετική απενεργοποίηση από IS στοιχεία που αποτελούσε και τον επικρατέστερο τύπο μεταβολής.

**Λέξεις κλειδιά:** πολυανθεκτικά, Εντεροβακτηριακά, *Klebsiella pneumoniae*, KPC-KP, πολυμυξίνες, κολιστίνη, *mgrB*, PhoP/PhoQ, λιποπολυσακχαρίτης, αμινοξικές αντικαταστάσεις, πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού, ενθετική απενεργοποίηση από IS στοιχεία



## ABSTRACT

Recently, the rise in infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria, especially the resistant in carbapenems *Enterobacteriaceae*, has led to the resuscitation of polymyxins (polymyxin B and colistin) worldwide as a last-resort treatment option, since they are among the few antimicrobial agents that maintain their activity against these bacteria. However, there are increased reports concerning the emergence of polymyxin-resistant bacterial isolates, thus putting at risk their usage as a therapeutic mean.

*Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) is a Gram-negative bacterium of the *Enterobacteriaceae* family associated with nosocomial infections such as urinary tract infections, pneumonia and septicemia. *K. pneumoniae* isolates producing KPC type of carbapenemases (KPC-KP) not only appear to be multi-drug resistant, but also to have spread in Greek hospitals. Since colistin constitutes the only antimicrobial agent against KPC+ *K. pneumoniae*, the appearance of resistance in it makes it a serious therapeutic issue.

Resistance to polymyxins and other cationic antimicrobial peptides in *K. pneumoniae* seems to be due to the modification of the lipopolysaccharide (LPS) after the addition of 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-Ara4N) to lipid A, which decreases the affinity of polymyxins to the LPS target by creating a more positively charged lipopolysaccharide. This modification is due to the products of the *pmrHFIJKLM* operon (also known as *pbgPE* or *arn*) that has a conserved function among *Enterobacteriaceae* and is positively charged by the PhoP/PhoQ and PmrA/PmrB signaling systems. These two-component signaling systems are activated by low extracellular  $Mg^{2+}$ , acidic pH or the presence of cationic antimicrobial peptides.

MgrB is a small regulatory transmembrane protein, whose production is induced with the activation of the PhoP/PhoQ signaling system and exerts a negative feedback on that system by interacting directly with the PhoQ sensor kinase. This protein is remarkably conservative among *Enterobacteriaceae*.

Inactivation of the *mgrB* gene in *K. pneumoniae* leads to upregulation of the PhoP/PhoQ system and of the *pmrHFIJKLM* operon and as it constitutes a genetic mechanism responsible for colistin resistance, its study was the main subject of this thesis. The results of the experiments showed that the *mgrB* alteration included non silent mutations or deletions (leading to amino acid substitutions and stop codon signaling the termination of the synthesis of the amino acid chain) and insertional inactivation by IS elements that was the prevalent type of alteration.

**Keywords:** multidrug-resistant, *Klebsiella pneumoniae*, KPC-KP, polymyxins, colistin, PhoP/PhoQ, lipopolysaccharide, amino acid substitutions, stop codon, insertional inactivation by IS elements

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

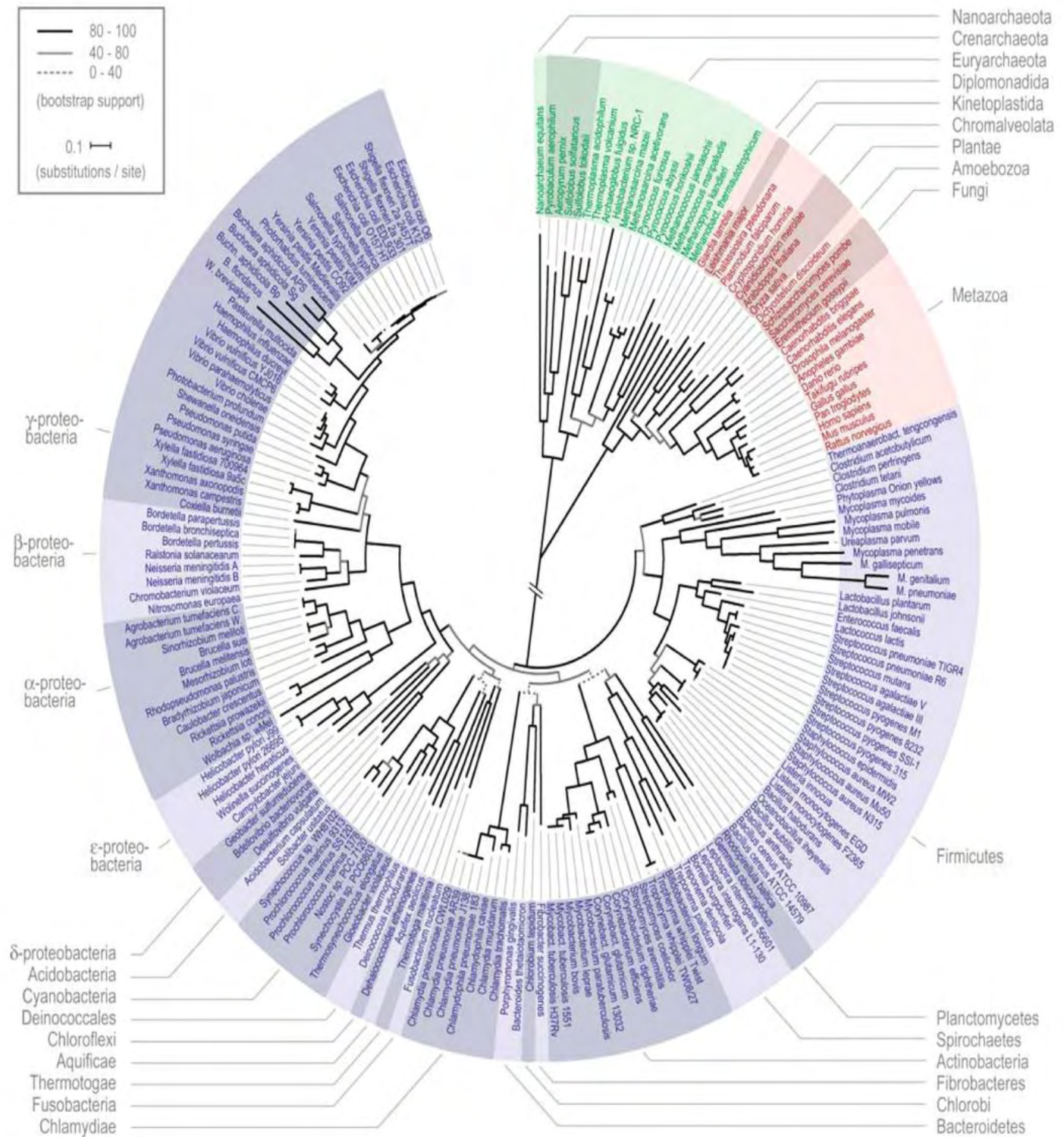
Η διασπορά των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες Εντεροβακτηριακών (*Enterobacteriaceae*) που συνέβει σε παγκόσμια κλίμακα τα τελευταία χρόνια, επανέφερε στο προσκήνιο τη χρήση πολυμυξινών, καθώς, μαζί με την τιγκεκυκλίνη, ανήκουν στα ελάχιστα διαθέσιμα φάρμακα που διατηρούν ακόμη τη δραστηρότητά τους έναντι αυτών των Gram-αρνητικών βακτηρίων.

Τα στελέχη *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) που παράγουν KPC τύπου καρβαπενεμάσες (KPC-KP) έχουν εξελιχθεί σε μέγιστη κλινική πρόκληση όσον αφορά τη θεραπευτική τους αντιμετώπιση. Αναδυόμενα στα τέλη της δεκαετίας του '90, τα στελέχη KPC-KP εμφανίζουν αξιοσημείωτη διασπορά στο κλινικό περιβάλλον με μεγάλα επιδημικά ξεσπάσματα να αναφέρονται σε Αμερική, Ευρώπη και Ασία. Στην Ελλάδα και σε κάποιες άλλες περιοχές (π.χ. Ιταλία, Ισραήλ, Κολομβία, σε κάποιες πολιτείες των ΗΠΑ και σε μερικές επαρχίες της Κίνας), τα στελέχη KPC-KP έγιναν ενδημικά και αντιπροσωπεύουν σημαντική μερίδα των απομονωμένων στελεχών *K. pneumoniae*.

Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από στελέχη KPC-KP είναι τυπικά δύσκολο να αντιμετωπιστούν, εξαιτίας της πολυαντοχής τους στα διάφορα αντιμικροβιακά φάρμακα, ενώ οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί έχουν συσχετιστεί με υψηλούς δείκτες θνησιμότητας. Συγκεκριμένα, η ανάδυση ανθεκτικών στην κολιστίνη KPC-KP τα τελευταία χρόνια, σε κάποιες περιοχές έχει λάβει αξιοσημείωτες διαστάσεις.

Σκοπός αυτής της διπλωματικής είναι η διερεύνηση των μηχανισμών αντοχής στην κολιστίνη στελεχών *K. pneumoniae* και συγκεκριμένα η αποσαφήνιση του ρόλου που διαδραματίζει το *mgrB* γονίδιο σε αυτή την αντοχή, ενώ ταυτόχρονα έγινε μοριακή τυποποίηση στελεχών ώστε να καθοριστεί ο τύπος αλληλουχίας τους.

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



Εικόνα 1: Φυλογενετικό δέντρο της επικράτειας των βακτηρίων

## 1. *Enterobacteriaceae*

Πίνακας 1: Συστηματική κατάταξη *Enterobacteriaceae*

Επικράτεια	<i>Bacteria</i>
φύλο	<i>Proteobacteria</i>
Κλάση	<i>Gamma proteobacteria</i>
Τάξη	<i>Enterobacteriales</i>
Οικογένεια	<i>Enterobacteriaceae</i> Rahn, 1937

Η οικογένεια των Εντεροβακτηριακών αποτελεί τη μεγαλύτερη ομάδα των μη φωτοσυνθετικών Gram-αρνητικών βακτηρίων (Πίνακας 1). Τα περισσότερα μέλη της είναι ραβδοειδείς, ευθύγραμμοι, ή καμπυλοειδείς βάκιλοι με διαστάσεις 2-3 x 0,4-0,6 μm. Ορισμένα από τα Εντεροβακτηριακά είναι ακίνητα, ενώ τα περισσότερα κινούνται με μαστίγια από τη διάταξη των οποίων χαρακτηρίζονται ως περίτριχα, πολικά ή μεικτού τύπου.<sup>1</sup>

Είναι μη σποριογόνα, προαιρετικά αναερόβια, αρνητικά στη δοκιμή της οξειδάσης και, με ελάχιστες εξαιρέσεις, θετικά στη δοκιμή της καταλάσης. Περιέχουν το κοινό εντεροβακτηριακό αντιγόνο και έχουν απλές θρεπτικές απαιτήσεις.

Τα γένη που περιλαμβάνει η οικογένεια έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν τα νιτρικά σε νιτρώδη, διεξάγουν μικτή ζύμωση οξέων και παράγουν γαλακτικό, οξικό, ηλεκτρικό, μυρμηκικό οξύ και αιθανόλη. Αποικοδομούν σάκχαρα μέσω της Embder – Meyerhof μεταβολικής οδού, διασπών δε το πυροσταφυλικό οξύ σε μυρμηκικό το οποίο στη συνέχεια, ζυμώνουν σε υδρογόνο και διοξείδιο του άνθρακα.<sup>2</sup>

Τα περισσότερα είδη αναπτύσσονται στους 37°C αν και πολλά είδη αναπτύσσονται καλύτερα στους 25-30°C. Είναι ανθεκτικά στα χολικά άλατα (και γι' αυτό επιζούν στο ανθρώπινο εντερικό επιθήλιο) και αναπτύσσονται σ' ένα ευρύ φάσμα pH.

Τα Εντεροβακτηριακά βρίσκονται στο έδαφος, στο νερό, τα φρούτα, τα λαχανικά, τα δημητριακά, τα φυτά και αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του γαστρεντερικού σωλήνα των περισσότερων ζώων, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Αποτελούν τα πιο συχνά βακτηριακά στελέχη που απομονώνονται από τα κλινικά δείγματα και συνιστούν σημαντικά αίτια ασθενειών με ήπια συμπτώματα έως και σοβαρές λοιμώξεις όπως σηψαιμία. Νοσηλεύόμενα ή ανοσοκατεσταλμένα άτομα, ειδικά ασθενείς που λαμβάνουν αντιμικροβιακή θεραπεία, συχνά αποικίζονται από Gram-αρνητικούς βακίλους συμπεριλαμβανομένων και των Εντεροβακτηριακών.<sup>3</sup>

Τα σημαντικότερα στοιχεία του κυττάρου των Εντεροβακτηριακών είναι ο **κυτταρικός φάκελος** που περιλαμβάνει το **κυτταρικό τοίχωμα**, την **εξωτερική και την εσωτερική** (κυτταροπλασματική) **μεμβράνη**, το **χρωμόσωμα** που συνίσταται από δίκλωνο DNA και τα

**ριβοσώματα** που είναι μικρότερα και απλούστερα από αυτά των ευκαρυωτικών κυττάρων. Συχνά φέρει και εξωχρωμοσωμικό DNA με τη μορφή **πλασμιδίων**.<sup>4</sup> Πολλοί οργανισμοί, όπως τα *Klebsiella spp.* και ένας αριθμός από στελέχη *E.coli*, διαθέτουν μία επιπλέον στοιβάδα, την **κάψα** (ή έλυτρο).<sup>5</sup>

Πάνω από 20 γένη και 120 είδη κατατάσσονται στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Περισσότερο του 95% των κλινικά σημαντικών στελεχών εμπίπτουν σε 10 γένη και σε λιγότερο από 25 είδη (Πίνακας 2). Ανάμεσά τους βρίσκεται και η *Klebsiella pneumoniae* που αποτελεί και το αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας.<sup>6</sup>

**Πίνακας 2 : Κλινικά σημαντικά Εντεροβακτηριακά**

<ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>Citrobacter</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>● <i>Citrobacter freundii</i></li> <li>● <i>Citrobacter diversus</i></li> </ul> </li> <li>● <b>Enterobacter spp.</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>● <i>Enterobacter aerogenes</i></li> <li>● <i>Enterobacter agglomerans</i></li> <li>● <i>Enterobacter cloacae</i></li> </ul> </li> <li>● <b>Escherichia coli</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Opportunistic <i>Escherichia coli</i></li> <li>● ETEC = enterotoxigenic <i>E. coli</i></li> <li>● EIEC = enteroinvasive <i>E. coli</i></li> <li>● EPEC = enteropathogenic <i>E. coli</i></li> <li>● EHEC = enterohemorrhagic <i>E. coli</i></li> <li>● EaggEC = enteroaggregative <i>E. coli</i></li> <li>● UPEC = uropathogenic <i>E. coli</i></li> </ul> </li> <li>● <b>Klebsiella spp.</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>● <i>Klebsiella pneumoniae</i></li> <li>● <i>Klebsiella oxytoca</i></li> </ul> </li> <li>● <b>Morganella morganii</b></li> <li>● <b>Proteus spp.</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>● <i>Proteus mirabilis</i></li> <li>● <i>Proteus vulgaris</i></li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>Providencia spp.</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>● <i>Providencia alcalifaciens</i></li> <li>● <i>Providencia rettgeri</i></li> <li>● <i>Providencia stuartii</i></li> </ul> </li> <li>● <b>Salmonella spp.</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>● <i>Salmonella enterica</i></li> </ul> </li> <li>● <b>Serratia spp.</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>● <i>Serratia marcesans</i></li> <li>● <i>Serratia liquifaciens</i></li> </ul> </li> <li>● <b>Shigella spp.</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>● <i>Shigella dysenteriae</i></li> <li>● <i>Shigella flexneri</i></li> <li>● <i>Shigella boydii</i></li> <li>● <i>Shigella sonnei</i></li> </ul> </li> <li>● <b>Yersinia spp.</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>● <i>Yersinia enterocolitica</i></li> <li>● <i>Yersinia pestis</i></li> <li>● <i>Yersinia pseudotuberculosis</i></li> </ul> </li> </ul>
--	---

## 2. *Klebsiella spp.*

Το γένος *Klebsiella* ανήκει στην οικογένεια των Εντεροβακτηριακών και πήρε το όνομά του από τον Trevisan το 1885 προς τιμή του Γερμανού μικροβιολόγου Edwin Klebs (1834-1913). Το πρώτο είδος *Klebsiella* που περιγράφηκε ποτέ ήταν ένας βάκιλος με κάψα από ασθενείς με ρινοσκλήρωμα (Von Frisch, 1882). Ο οργανισμός ονομάστηκε αργότερα *Klebsiella rhinoscleromatis* από τον Trevisan (1887). Ιστορικά, η ταξινόμηση του γένους *Klebsiella* βρίθει ονοματολογίας γεγονός που αντανακλά την έντονη ταξινομική της ιστορία. Αρχικά, η ιατρική σημασία του γένους *Klebsiella* (οικογένεια *Enterobacteriaceae*) οδήγησε στην

υποκατηγοριοποίησή του σε τρία είδη ανάλογα με τις ασθένειες που προκαλούσαν: την *K. pneumoniae*, την *K. ozaenae*, και την *K. rhinoscleromatis*. Καθώς η ταξινόμηση εκλεπτύνθηκε λόγω της ανάπτυξης νέων μεθόδων όπως της αριθμητικής ταξινόμησης, η κατηγοριοποίηση των ειδών σε αυτό το γένος αναθεωρούνταν διαρκώς. Με τον καιρό, ανέκυψαν τρεις κύριες κατηγοριοποιήσεις, του Cowan, του Bascomb, και του Ørskov όπως φαίνεται στον πίνακα 3 που ακολουθεί.<sup>7,8</sup>

**Πίνακας 3: Οι τρεις κύριες κατηγοριοποιήσεις των *Klebsiella* spp.**

<b>Ταξινόμηση βάσει :</b>		
<b>Cowan</b>	<b>Bascomb</b>	<b>Ørskov</b>
<i>K. aerogenes</i>	<i>K. aerogenes/oxytoca/edwardsii</i>	<i>K. pneumoniae</i> <i>subsp. pneumoniae</i> <i>subsp. ozaenae</i> <i>subsp. rhinoscleromatis</i>
<i>K. edwardsii</i> <i>subsp. edwardsii</i> <i>subsp. atlantae</i>	<i>K. pneumoniae</i> <i>sensu stricto</i> <i>sensu lato</i>	<i>K. oxytoca</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. ozaenae</i>	<i>K. terrigena</i>
<i>K. ozaenae</i>	<i>K. rhinoscleromatis</i>	<i>K. planticola</i> (syn. <i>K. trevisanii</i> )
<i>K. rhinoscleromatis</i>	<i>K. "unnamed group"</i>	<i>K. ornithinolytica</i>
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	

Στις αρχές του 1980, τα απομονωμένα στελέχη *Klebsiella* του περιβάλλοντος, που μέχρι τότε ορίζονταν ως «*Klebsiella*-like organisms» (ομάδες J, K, L, και M), ολοένα και περισσότερο ταξινομούνταν σε προσωρινά τάξα. Οι ομάδες αυτές, έδωσαν τη θέση τους σε τέσσερα νέα είδη: την *K. terrigena*, την *K. ornithinolytica*, την *K. planticola* και την *K. trevisanii*.

Το 1986 τα δύο τελευταία είδη συμπτύχθηκαν σε ένα, την *K. planticola*, εξαιτίας της εκτεταμένης ομολογίας της αλληλουχίας βάσεων του DNA. Αν και τα παραπάνω είδη απομονώθηκαν σε υδάτινα, φυτικά και χερσαία περιβάλλοντα και θεωρήθηκαν χωρίς κλινική σημασία, υπάρχουν αναφορές ότι η *K. terrigena* και η *K. planticola* βρέθηκαν σε σωματικές εκκρίσεις του ανθρώπου. Ωστόσο, αφού τα περισσότερα από τα απομονωμένα στελέχη λήφθηκαν από πολυμικροβιακά δείγματα, ήταν δύσκολο να εκτιμηθεί η σημασία αυτών των στελεχών ως παράγοντες που προκαλούν λοίμωξη. Παρόλο αυτά, 6 από τα 94 απομονωμένα στελέχη ανακτήθηκαν από μονομικροβιακά δείγματα και θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως υπεύθυνα για τις αντίστοιχες λοιμώξεις (Πίνακας 4).<sup>7</sup>

Σήμερα τα είδη που παρουσιάζουν μεγαλύτερο κλινικό ενδιαφέρον με σειρά ελαττωμένης παθογένειας είναι: *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. ozaenae*, *K. rhinoscleromatis*, *K. granulomatis*, *K. variicola*, *K. singaporensis* (αν και είναι ακόμα πολύ νέο και η παθογένειά του στους ανθρώπους δεν έχει ακόμα επακριβώς καθοριστεί).<sup>9</sup>

Πίνακας 4: Είδη του γένους *Klebsiella* που έχουν περιγραφεί

<i>Klebsiella granulomatis</i>	(Aragão and Vianna 1913) Carter <i>et al.</i> 1999, comb. nov.
<i>Klebsiella michiganensis</i>	Saha <i>et al.</i> 2013, sp. Nov
<i>Klebsiella mobilis</i>	Bascomb <i>et al.</i> 1971, species
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	Sakazaki <i>et al.</i> 1989, sp. nov.
<i>Klebsiella oxytoca</i>	(Flügge 1886) Lautrop 1956, species
<i>Klebsiella ozaenae</i>	(Abel 1893) Bergey <i>et al.</i> 1925, species
<i>Klebsiella planticola</i>	Bagley <i>et al.</i> 1982, sp. nov.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Schroeter 1886) Trevisan 1887, species. (Type species of the genus.)
<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>	Brisse <i>et al.</i> 2014, sp. nov.
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	Trevisan 1887, species
<i>Klebsiella singaporensis</i>	Li <i>et al.</i> 2004, sp. nov.
<i>Klebsiella terrigena</i>	Izard <i>et al.</i> 1981, sp. nov.
<i>Klebsiella trevisanii</i>	Ferragut <i>et al.</i> 1983, sp. nov.
<i>Klebsiella variicola</i>	Rosenblueth <i>et al.</i> 2004, sp. nov.

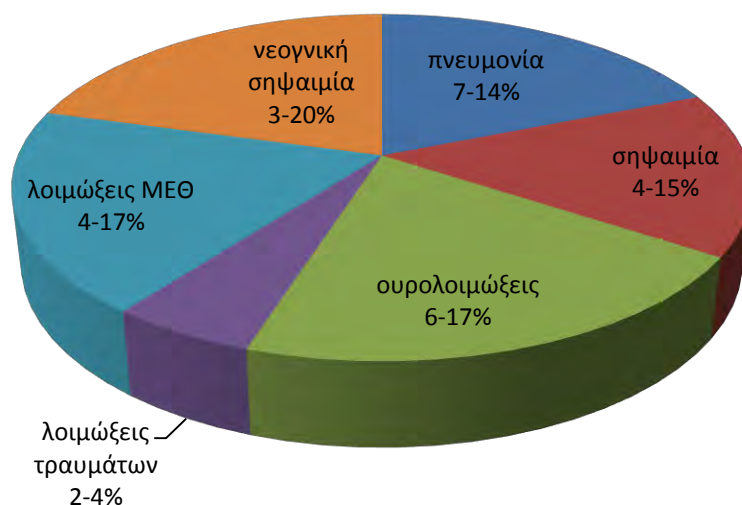
Τα βακτήρια του γένους *Klebsiella spp.* έχουν τα κύρια χαρακτηριστικά της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών που προαναφέρθηκαν. Γενικά, είναι μη κινητά, ραβδωτά βακτήρια που έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσουν βλεννώδεις αποικίες με τη βοήθεια του πολυσακχαριτικού ελύτρου (αντιγόνο K) που διαθέτουν, το οποίο τα προστατεύει από τη φαγοκυττάρωση και τα βοηθάει στην προσκόλληση.

Στα πλαίσια των φυσικοχημικών ιδιοτήτων η *Klebsiella*, όπως τα υπόλοιπα Εντεροβακτηριακά, ζυμώνει τη γλυκόζη με παραγωγή οξέος, ανάγει τα νιτρικά, παράγει καταλάση αλλά όχι οξειδάση και είναι θετική στο Voges-Proskauer τεστ.

Τα *Klebsiella spp.* έχουν ταυτοποιηθεί σαν κοινά νοσοκομειακά παθογόνα που ευθύνονται για νοσοκομειακή πνευμονία (7-14% όλων των περιπτώσεων), σηψαιμία (4-15%), ουρολοιμώξεις (6-17%), λοιμώξεις τραυμάτων (2-4%), λοιμώξεις ΜΕΘ (4-17%), και νεογνική σηψαιμία (3-20%) (Διάγραμμα 1).



## Κοινές νοσοκομειακές λοιμώξεις από *Klebsiella spp.*



Διάγραμμα 1: Σχηματική αναπαράσταση των πιο κοινών νοσοκομειακών λοιμώξεων από *Klebsiella spp.*

Τα *Klebsiella spp.* μπορεί επίσης να προκαλέσουν βακτηριαιμίες και ηπατικές λοιμώξεις και έχουν απομονωθεί από έναν αριθμό ασυνήθιστων λοιμώξεων, όπως ενδοκαρδίτιδας, πρωταρχικού μεσοθωράκιου αποστήματος που περιέχει αέριο, περιτονίτιδας, οξείας χολοκυστίτιδας, τρίζουσας μυνέκρωσης, πυομυοσίτιδας, νεκρωτικής απονευρωσίτιδας, απόστημα ψοίτη μυός, χώρου περιτονίας του κεφαλιού και του λαιμού, και σηπτικής αρθρίτιδας. Είναι επίσης σημαντικά ευκαιριακά παθογόνα, ιδιαίτερα για τους ανοσοκατεσταλμένους (Πίνακας 5).

Τα είδη του γένους *Klebsiella* υπάρχουν σε παγκόσμιο επίπεδο, ιδιαίτερα σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές και είναι πανταχού παρόντα μεταξύ άλλων σε δασικές περιοχές, έδαφος, νερό και στις βλεννογόνες μεμβράνες των ξενιστών. Παρότι είναι κοινά παθογόνα για εξωνοσοκομειακές πνευμονίες και βακτηριαιμίες, η πλειοψηφία των λοιμώξεων είναι νοσοκομειακές (~56% όλων των λοιμώξεων από *Klebsiella*). Τα *Klebsiella spp.* ενδημούν σε νεογνικούς θαλάμους όπου οι εξάρσεις είναι συχνές. Τα ενήλικα αρσενικά άτομα είναι πιο ευαίσθητα σε λοιμώξεις από *Klebsiella spp.* σε σχέση με ενήλικα θηλυκά άτομα. Ωστόσο, τα *Klebsiella spp.* επιδεικνύουν υψηλότερα ποσοστά αποικισμού σε νεογνά όπου μπορεί να επιβιώσουν και μήνες σε σχέση με τις λίγες μέρες ως εβδομάδες στους ενήλικες. Ο κίνδυνος λοίμωξης και τα ποσοστά μεταφοράς των *Klebsiella spp.* αυξάνουν με την αύξηση της διάρκειας νοσηλείας, 11%-42% αύξηση των ποσοστών μεταφοράς μέσα σε 14 μέρες νοσηλείας. Η λοίμωξη και τα ποσοστά μεταφοράς αυξάνουν επίσης με τη χρήση αντιμικροβιακών οδηγώντας συχνά στη δημιουργία ενός εκτεταμένου εύρους β-λακταμασών (ESBLs, extended-spectrum beta-lactamase) που παρέχουν αντοχή στα αντιβιοτικά.<sup>7,10,11</sup>

**Πίνακας 5: Η παθογένεια των *Klebsiella spp.* που παρουσιάζουν κλινικό ενδιαφέρον**

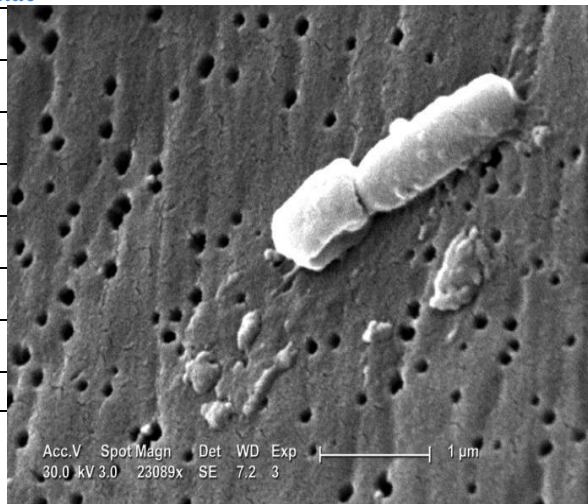
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxycota</i>	<i>K. ozaenae</i>	<i>K. rhinoscleromatis</i>	<i>K. granulomatis</i>
<b>Πηγές/δείγματα</b>	Όλα τα μέρη στο ανθρώπινο σώμα, πιο κοινά στα ρινοφαρυγγικά και τα δείγματα της ουροποιητικής οδού	Όλα τα μέρη στο ανθρώπινο σώμα	Πιο κοινά σε εκκρίματα ρινικά/ρινοφαρυγγικά/ουροποιητικής οδού, αίμα	Ρινικές εκκρίσεις	Γεννητικό σύστημα
<b>Παθογένεια</b>					
Αναπνευστική λοίμωξη	Κύρια αιτία εξωνοσοκομειακής και νοσοκομειακής πνευμονίας και πνευμονικού αποστήματος. Η λοίμωξη του άνω λοβού είναι πιο κοινή. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν: πυρετό, ρίγος και λευκοκυττάρωση με κόκκινα, όμοια με ζελέ πτύελα. Σπάνιες επιπλοκές περιλαμβάνουν πνευμονική λοίμωξη με νέκρωση και απόρριψη ολόκληρου του λοβού		Προκαλεί όζαινα, μια πρωταρχική ατροφική ρινίτιδα που περιλαμβάνει χρόνια φλεγμονή της μύτης	Προκαλεί ρινοσκλήρωμα, μια χρόνια κοκκιοματώδη λοίμωξη που πρωταρχικά επηρεάζει τη ρινική κοιλότητα	
Λοιμώξεις Κεντρικού Νευρικού Συστήματος	Προκαλεί εξωνοσοκομειακή μηνιγγίτιδα και εγκεφαλικό απόστημα. Τα κλινικά συμπτώματα περιλαμβάνουν: πονοκέφαλο, πυρετό, μεταβολή στη συνείδηση, επιληπτικές κρίσεις και σηπτικό σοκ	Όμοια με την <i>K. pneumoniae</i>	Συσχετίζεται με σπάνιες περιπτώσεις εγκεφαλικού αποστήματος και μηνιγγίτιδας		
Λοιμώξεις ουροποιητικής οδού	Τα <i>Klebsiella spp.</i> είναι συχνά αίτια λοιμώξεων της ουροποιητικής οδού. Σοβαρή βακτηριουρία έχει αποδοθεί στην <i>K. ozaenae</i>				
Ηπατική νόσος	Ένα σημαντικό παθογόνο αίτιο πυογόνων ηπατικών αποστημάτων. Συμπτώματα: πυρετός, πόνος στο δεξί άνω τεταρτημόριο, ναυτία, εμετός, διάρροια ή κοιλιακό άλγος και λευκοκυττάρωση. Αποστήματα ανιχνεύονται κυρίως στο δεξί λοβό και είναι μονήρη				
Άλλες λοιμώξεις					Προκαλεί βουβωνικό κοκκίωμα ή κοκκίωμα, μια χρόνια ελκώδη ασθένεια που προσβάλλει πρωταρχικά τα γεννητικά όργανα. Συμπτώματα: ανάπτυξη μικρού εξανθήματος ή έλκους που αργότερα εξελίσσεται σε μεγάλα κόκκινα έλκη (βλάβες) που εξαπλώνονται στις πτυχώσεις των γεννητικών οργάνων
<b>Λοιμογόνος δόση</b>	Άγνωστη, σύμφωνα με μια πηγή, 10 <sup>8</sup> οργανισμοί <i>Klebsiella</i> ανά γραμμάριο περιττωμάτων απαιτούνται για να προκληθεί βλάβη				
<b>Τρόποι μετάδοσης</b>	Τα <i>Klebsiella spp.</i> μεταδίδονται μέσω επαφής του δέρματος με περιβαλλοντικά μολυσμένες επιφάνειες και/ή αντικείμενα π.χ. σφουγγάρια Λούφες, ιατρικό εξοπλισμό και προϊόντα αίματος. Έχει επίσης προταθεί η μετάδοση μέσω περιττωμάτων για κάποιες περιπτώσεις βακτηριαμίας. Η <i>K. rhinoscleromatis</i> μπορεί να μεταδοθεί από άτομο σε άτομο μέσω αερομεταφερόμενων εκκρίσεων. Ωστόσο, για τη λοίμωξη απαιτείται παρατεταμένη επαφή με μολυσμένα άτομα. Η <i>K. granulomatis</i> είναι σεξουαλικά μεταδιδόμενη. Μπορεί επίσης να υπάρχει κάθετη μετάδοση (από μητέρα σε παιδί) ή από τυχαίο εμβολιασμό. Ο βαθμός μετάδοσης μεταξύ συντρόφων είναι χαμηλός (<50%) σε σύγκριση με άλλες σεξουαλικά μεταδιδόμενες ασθένειες				

### 3. *Klebsiella pneumoniae*

#### 3.1 Γενικά στοιχεία

Πίνακας 6: Συστηματική κατάταξη της *Klebsiella pneumoniae*

Επικράτεια	Bacteria
Φύλο	Proteobacteria
Κλάση	Gamma proteobacteria
Τάξη	Enterobacteriales
Οικογένεια	Enterobacteriaceae
Γένος	<i>Klebsiella</i>
Είδος	<i>K. pneumoniae</i>
Διωνυμική ονοματολογία	
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b> (Schroeter 1886) Trevisan 1887	



Εικόνα 2: Η *K. pneumoniae* όπως φαίνεται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Η *K. pneumoniae* είναι ένα Gram-αρνητικό, μη κινητό, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο (Πίνακας 6). Είναι επίσης γνωστό ως ο Βάκιλος του Friedlander προς τιμή του Carl Friedlander, ενός Γερμανού παθολόγου, που το 1882, ήταν ο πρώτος που πρότεινε το βακτήριο αυτό ως αιτιολογικό παράγοντα πνευμονίας που απαντιόταν ιδιαίτερα σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα, όπως αυτά με χρόνιες ασθένειες ή αλκοολικούς.<sup>12, 13</sup>

Η *K. pneumoniae* υπάρχει στον άνθρωπο στη φυσιολογική χλωρίδα του στόματος, του δέρματος και του εντέρου. Επίσης εντοπίζεται φυσιολογικά στο χώμα και αποτελεί έναν σημαντικό οργανισμό για τη γεωργία λόγω της αζωτοδεσμευτικής της ικανότητας, καθώς το 30% των στελεχών μπορούν να δεσμεύσουν άζωτο σε αναερόβιες συνθήκες. Τέλος, συναντάται στο επιφανειακό νερό και στις αποχετεύσεις.<sup>14, 15</sup>

#### 3.2 Μορφολογία

##### 3.2.1 Εξωτερικά χαρακτηριστικά

Η *K. pneumoniae* έχει μικρό, ραβδοειδές κύτταρο διαστάσεων 1-2 x 0,5-0,8 μm που περιβάλλεται από έλυτρο. Δεν σχηματίζει σπόρια και είναι ακίνητο. Έχει διάταξη μονήρη, σε ζεύγη ή τσαμπιού.

Όταν καλλιεργείται, παράγει μια χαρακτηριστική μυρωδιά ζύμης και οι βακτηριακές αποικίες έχουν ιξώδη/βλενώδη εμφάνιση.<sup>12, 16</sup>

### 3.3 Κυτταρικά στοιχεία

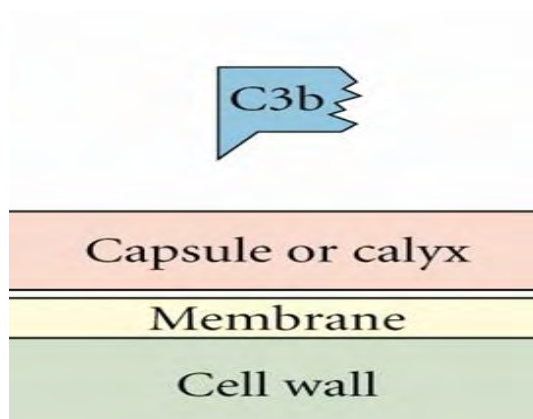
#### 3.3.1 Κάψα

Η *K. pneumoniae* περιβάλλεται από μια παχιά κάψα (ή έλυτρο) γνωστή ως αντιγόνο K. Ουσιαστικά είναι μια περίτεχνη πολυσακχαριτική μήτρα που εγκλείει ολόκληρο το κύτταρο και διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην επιβίωσή του.

Η κάψα θεωρείται σημαντικός παράγοντας μολυσματικότητας και η σύσταση του στρώματος των πολυσακχαριτών είναι χαρακτηριστική για κάθε στέλεχος. Στην *K. pneumoniae*, έχουν αναφερθεί τουλάχιστον 80 διαφορετικοί ορολογικοί τύποι πολυσακχαριτικών καψών (K αντιγόνα). Από τα ήδη γνωστά K αντιγόνα δεν υπάρχει σημαντική επικράτηση κάποιου συγκεκριμένου, αν και οι ορότυποι K2, K21 και K7 ανευρίσκονται περισσότερο συχνά σε λοιμώξεις των αναπνευστικών και ουροφόρων οδών.

Οι πολυσακχαρίτες της κάψας συμβάλλουν στην παθογονικότητα προσφέροντας προστασία έναντι των αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή όπως των μακροφάγων αλλά και της φαγοκυττάρωσης από πολυμορφοπύρηνα κοκκιοκύτταρα.

Η πυκνή λιποπολυσακχαριδική κάψα εμποδίζει τόσο την αντίχενυση των σωματικών τους αντιγόνων από τα αντισώματα του ξενιστή όσο και την ενεργοποίηση του συμπληρώματος του ορού. Στην πραγματικότητα, η *K. pneumoniae* αποφεύγει τη βακτηριοκτόνο δράση των πρωτεϊνών του συμπληρώματος εξαιτίας του εξαιρετικά μεγάλου μήκους των μορίων που συνθέτουν την κάψα της, εξαναγκάζοντας το λυτικό σύμπλεγμα C5b-9 (συμπλήρωμα) να σχηματιστεί πολύ μακριά από την μεμβράνη. Αυτό παρεμποδίζει την οψωνίωση και την εισαγωγή του συμπλέγματος προσβολής της μεμβράνης (membrane attack complex, MAC), που οδηγεί στη λύση του βακτηρίου (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Δράση του συμπλέγματος προσβολής στη βακτηριακή μεμβράνη

Οι καψικοί πολυσακχαρίτες μαζί με τους κροσσούς φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κατά το σχηματισμό ώριμων δομών βιοφίλμ. Επιπλέον, η υψηλή περιεκτικότητα σε νερό προστατεύει το κύτταρο από αφυδάτωση, από υδροφοβικούς

παράγοντες όπως απορρυπαντικά αλλά και τον παρασιτισμό τους από βακτηριοφάγους.<sup>7,11,17,18</sup>

### 3.3.2 Κροσσοί

Οι κροσσοί μαζί με την κάψα είναι εξέχουσες δομές της κυτταρικής επιφάνειας της *K. pneumoniae* και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση και την παθογονικότητά της.

Η προσκόλληση του μικροβίου στα κύτταρα του ξενιστή αποτελεί άλλον έναν κύριο μηχανισμό μολυσματικότητας του μικροβίου και δεν συνιστά απλά κάποια μη ειδική σύνδεση. Απαιτεί την παρουσία ειδικών πρωτεϊνών προσκόλλησης που αποτελούν προεξοχές του πολυσακχαριτικού ελύτρου και συνδέονται σε αντίστοιχους υποδοχείς της επιφάνειας των κυττάρων του ξενιστή.

Μια άλλη ομάδα παραγόντων μολυσματικότητας που παράγεται από την *K. pneumoniae* είναι οι προσκολλητίνες κροσσού (fimbrial adhesions), πρωτεϊνικές δομές που αναγνωρίζουν ένα ευρύ φάσμα μοριακών μοτίβων και παρέχουν στόχευση του βακτηρίου σε συγκεκριμένες επιφάνειες ιστού του ξενιστή. Η *K. pneumoniae* παράγει δύο κύριους τύπους κροσσών, τους κροσσούς τύπου 1 και 3 (Mrk). Οι τύπου 1 κροσσοί είναι λεπτά, άκαμπτα, προσκολλητικά, επιφανειακά οργανίδια που μπορεί να εκτείνονται πέρα από την καψιδιακή μήτρα και υπάρχουν κατ' ουσίαν σε όλα τα *Εντεροβακτηριακά*. Σε ένα κροσσωτό βακτήριο, αρκετές εκατοντάδες αυτών των οργανιδίων ξεπροβάλλουν περίτριχα από την επιφάνεια σε μια απόσταση περίπου 1 μm. Οι τύπου 1 κροσσοί αντλούν τις προσκολλητικές τους ικανότητες από την FimH προσκολλητίνη, ένα μικρό στοιχείο του οργανιδίου που εντοπίζεται στα άκρα των κροσσών. Η FimH προσκολλητίνη αναγνωρίζει τις γλυκοπρωτεΐνες που περιέχουν μαννόζη οι οποίες είναι παρούσες σε πολλούς ιστούς θηλαστικών, όπως είναι η επιφάνεια της ουροποιητικής οδού. Αυτό επιτρέπει στο βακτήριο να στοχεύει, να προσκολλάται και τελικά να αποικίζει το ουροεπιθήλιο.

Οι τύπου 3 κροσσοί έχουν πλάτος 2-4 nm και μήκος 0.5-2 μm. Είναι δομικά οργανίδια που αποτελούνται κύρια από μια μεγάλη πρωτεϊνική υπομονάδα (MrkA) και μια προσκολλητίνη (MrkD). Διευκολύνουν την προσκόλληση σε βασειοπλευρικές επιφάνειες των κυττάρων του τραχειακού επιθηλίου και σε στοιχεία των βασικών μεμβρανών.<sup>18</sup>

### 3.3.3 Κυτταρικός φάκελος

Ο βακτηριακός κυτταρικός φάκελος είναι μια πολύπλοκη πολυστρωματική δομή που εξυπηρετεί στην προστασία αυτών των οργανισμών από απρόβλεπτα και συχνά εχθρικά

περιβάλλοντα. Στα Gram-αρνητικά βακτήρια διακρίνονται 3 κύρια στρώματα στο φάκελο : η εξωτερική μεμβράνη, το κυτταρικό τοίχωμα και η εσωτερική (ή κυτταροπλασματική) μεμβράνη. Η εσωτερική και η εξωτερική μεμβράνη ορίζουν ένα υδαρές κυτταρικό τμήμα, το περίπλασμα.<sup>19</sup>

### 3.3.4 Εξωτερική μεμβράνη

Είναι χαρακτηριστικό διάκρισης των Gram-αρνητικών βακτηρίων, καθώς τα Gram-θετικά δε διαθέτουν αυτό το οργανίδιο. Η πιο γνωστή λειτουργία της εξωτερικής μεμβράνης είναι αυτή του προστατευτικού φραγμού αν και δεν είναι εμφανής ο λόγος που αυτό το οργανίδιο είναι απαραίτητο. Ωστόσο, είναι γενικά αποδεκτό, ότι τα Gram-αρνητικά βακτήρια είναι περισσότερο ανθεκτικά από τα Gram-θετικά.

Όπως άλλες βιολογικές μεμβράνες, η εξωτερική μεμβράνη είναι μια λιπιδική διπλοστοιβάδα, αλλά είναι σημαντικό ότι, δεν είναι μια φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα. Η εξωτερική μεμβράνη περιέχει φωσφολιπίδια τα οποία είναι περιορισμένα στο εσωτερικό φύλλο αυτής της μεμβράνης. Το εξωτερικό φύλλο αποτελείται από γλυκολιπίδια, κυρίως LPS, στον οποίο θα γίνει εκτενέστερη αναφορά παρακάτω, καθώς αποτελεί μείζον μόριο της εξωτερικής μεμβράνης των Gram-αρνητικών βακτηρίων και παίζει κρίσιμο ρόλο στην προστασία τους από δυσμενή περιβάλλοντα και τοξικά στοιχεία, συμπεριλαμβανομένων των αντιβιοτικών.

Με ελάχιστες εξαιρέσεις οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τις λιποπρωτεΐνες και τις πρωτεΐνες β-βαρελίου (β-barrel). Οι λιποπρωτεΐνες περιέχουν λιπιδικές ομάδες που είναι προσκολλημένες σε ένα αμινο-τελικό κυστεϊνικό κατάλοιπο. Γενικά πιστεύεται ότι αυτές οι λιπιδικές ομάδες ενσωματώνουν τις λιποπρωτεΐνες στο εσωτερικό φύλλο της εξωτερικής μεμβράνης με άλλα λόγια αυτές οι πρωτεΐνες δεν είναι διαμεμβρανικές.

Σχεδόν όλες οι εσωτερικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες λαμβάνουν ένα κυλινδρικό σχήμα β-βαρελίου (αναφέρονται και ως OMPs, Outer Membrane Proteins). Κάποιες από αυτές, όπως οι πορίνες OmpF και OmpC, επιτρέπουν την παθητική διάχυση μικρών μορίων όπως μονο- και δισακχαριτών και αμινοξέων κατά μήκος της εξωτερικής μεμβράνης. Άλλες OMPs, όπως η LamB ή η PhoE βοηθούν τη διάχυση συγκεκριμένων μικρών μορίων, μαλτόζης ή μαλτοδεξτρίνης και ανιόντων όπως φωσφορικών ομάδων, κατά μήκος της εξωτερικής μεμβράνης.

Μια άλλη άφθονη πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης είναι η OmpA. Το ασυνήθιστο με την OmpA είναι ότι μπορεί να υπάρχει σε δύο διαφορετικές διαμορφώσεις. Η ελάσσω

μορφή της πρωτεΐνης, με άγνωστο αριθμό διαμεμβρανικών κλώνων, μπορεί να λειτουργήσει ως πορίνη, η μείζων, μη πορινική μορφή έχει μόνο οκτώ διαμεμβρανικούς κλώνους και η περιπλαστική περιοχή αυτής της μορφής διαδραματίζει έναν πολύ σημαντικό δομικό ρόλο.

Μια επιπρόσθετη τάξη των OMPs, με μεγαλύτερες δομές β-βαρελίου, που υπάρχουν σε χαμηλότερα επίπεδα, λειτουργούν σαν πυλωτοί διάυλοι στην υψηλής συγγένειας μεταφοράς μεγάλων προσδεμάτων, όπως Fe-χηλικά ή βιταμίνες όπως είναι η βιταμίνη B-12.

Πολύ λίγα ένζυμα υπάρχουν στην εξωτερική μεμβράνη. Σε αυτά περιλαμβάνονται, μια φωσφολιπάση (PldA), μια πρωτεάση (OmpT) και ένα ένζυμο που τροποποιεί τον LPS (PagP). Η ενεργή θέση όλων αυτών των ενζύμων είτε εντοπίζεται στο εξωτερικό φύλλο ή αντικρίζει το εξωτερικό του κυττάρου (OmpT). Μεταλλαγμένα στελέχη με έλλειψη κάποιου από τα παραπάνω ένζυμα δεν παρουσιάζουν κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή του φαινοτύπου.<sup>19</sup>

#### 3.3.4.1 Λιποπολυσακχαρίτης (Lipopolysaccharide, LPS)

Ο LPS, γνωστός και ως λιπογλυκάνη και ενδοτοξίνη, είναι ένα πολύ σημαντικό στοιχείο της εξωτερικής μεμβράνης των Gram-αρνητικών βακτηρίων, καθώς παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της ως προστατευτικού φραγμού και προστατεύει τα βακτήρια από συγκεκριμένα είδη χημικών επιθέσεων. Ο LPS αυξάνει επίσης το αρνητικό φορτίο της κυτταρικής μεμβράνης και βοηθά στη σταθεροποίηση της συνολικής μεμβρανικής δομής. Έχει ουσιαστική συμβολή στην επιβίωση των Gram-αρνητικών βακτηρίων, καθώς μετάλλαξη ή αφαίρεσή του μπορεί να τα οδηγήσει στο θάνατο.

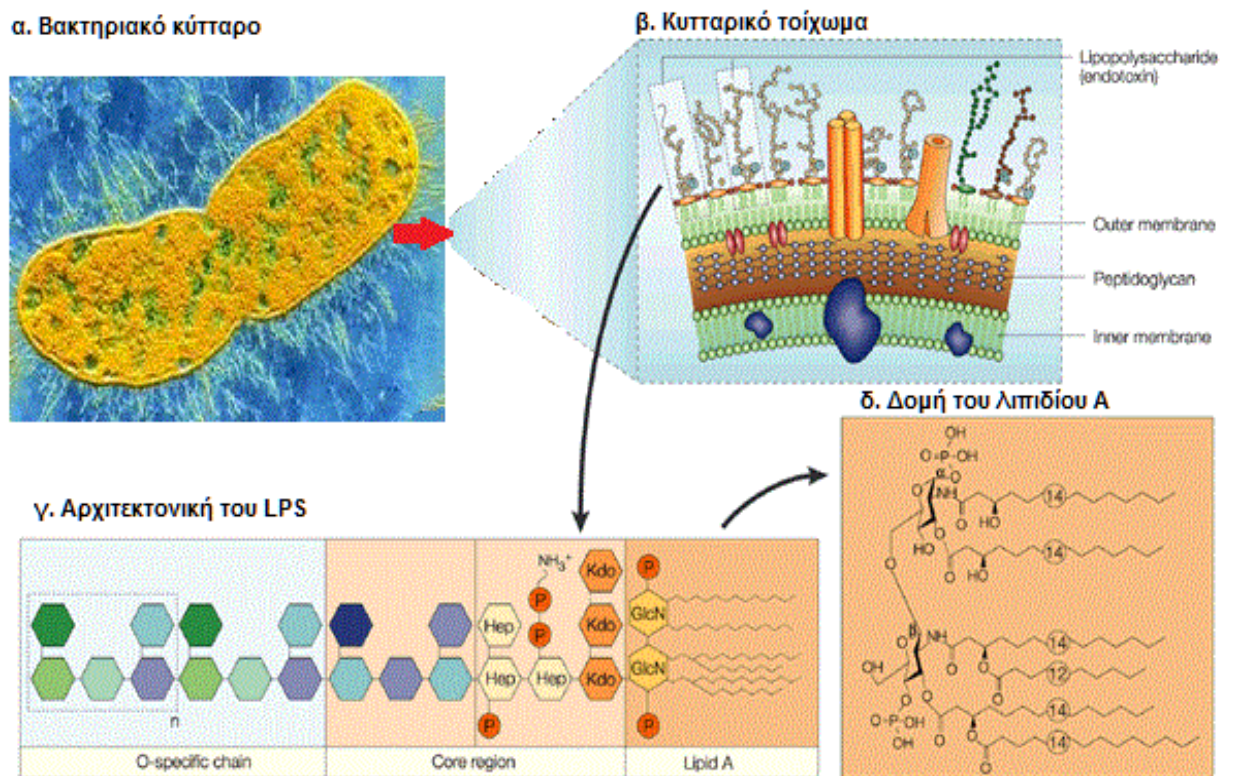
Ο LPS είναι ένα μόριο υπεύθυνο για ενδοτοξικό σοκ που σχετίζεται με σηψαιμία προκαλούμενη από Gram-αρνητικούς οργανισμούς. Ο LPS επιφέρει ισχυρές ανοσολογικές αποκρίσεις. Το σύστημα της έμφυτης ανοσίας στον άνθρωπο ευαισθητοποιείται από αυτό το μόριο καθώς αποτελεί σίγουρο δείκτη μόλυνσης.

Ο LPS, συνίσταται από τρία μέρη:

1. Αντιγόνο O
2. Ολιγοσακχαριδικό πυρήνα (εσωτερικό + εξωτερικό)
3. Λιπίδιο A

Τα μόρια του LPS συνδέονται μεταξύ τους ισχυρά, ιδίως αν είναι παρόντα κατιόντα όπως  $Mg^{2+}$  για να εξουδετερώσουν το αρνητικό φορτίο των φωσφορικών ομάδων που υπάρχουν στο μόριο. Το μη υδαρές συνεχές που σχηματίζεται από τα LPS μόρια είναι ένας αποτελεσματικός φραγμός για υδρόφοβα μόρια. Αυτό σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι πορίνες περιορίζουν τη διάχυση υδρόφιλων μορίων μεγαλύτερων των 700 Daltons, καθιστούν

την εξωτερική μεμβράνη έναν πολύ αποτελεσματικό και ταυτόχρονα εκλεκτικό φραγμό διαπερατότητας (Εικόνα 4).<sup>19,20</sup>



Εικόνα 4. α) *Klebsiella pneumoniae*, β) σχηματική αναπαράσταση της θέσης του LPS στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα γ) αρχιτεκτονική του LPS δ) Πρωτοταγής δομή του τοξικού κέντρου του LPS, του λιπιδίου A

#### 3.3.4.1.1 Αντιγόνο-O

Το αντιγόνο-O είναι μια εκτεταμένη αλυσίδα αποτελούμενη από επαναλαμβανόμενα πολυσακχαριδικά μόρια. Είναι προσδεμένο στον ολιγοσακχαριδικό πυρήνα και συνιστά το μεγαλύτερο μέρος του LPS μορίου. Η σύσταση των αλυσίδων-O διαφέρει από στέλεχος σε στέλεχος.

Η *K. pneumoniae* παράγει εννιά διαφορετικούς οροτύπους αντιγόνου-O και τέσσερις από αυτούς, οι O1, O2ab, O2ac και O3, εντοπίζονται σε κλινικά στελέχη του μικροβίου σε ποσοστό άνω του 70% (Εικόνα 5).



	Serotype
$\overline{\text{D}} \text{---} \overline{\text{C}} \text{---} \overline{\text{B}'}$ $\overline{\text{A}} \text{---} \overline{\text{B}} \text{---} \overline{\text{A}''}$ $\text{[3-}\beta\text{-Galp-(1-3)-}\alpha\text{-Galp-(1-)}_n\text{-}\beta\text{-Galp-(1-}\overline{\text{3-}\alpha\text{-Galp-(1-3)-}\beta\text{-Galp-(1-)}_n\text{-3)-}\alpha\text{-Galp-CP}$	O1
$\overline{\text{B}'}$ $\overline{\text{A}} \text{---} \overline{\text{B}} \text{---} \overline{\text{A}''}$ $\beta\text{-Galp-(1-}\overline{\text{3-}\alpha\text{-Galp-(1-3)-}\beta\text{-Galp-(1-)}_n\text{-3)-}\alpha\text{-Galp-CP}$	O1, O2a, O2a,c
$\overline{\text{D(D)'}}$ $\overline{\text{C}} \text{---} \overline{\text{B'(B*)}}$ $\overline{\text{A}} \text{---} \overline{\text{B}} \text{---} \overline{\text{A}''}$ $\text{[5-}\beta\text{-Galp-(1-3)-}\beta\text{-GlcNAc-(1-)}_n\text{-}\beta\text{-Galp-(1-}\overline{\text{3-}\alpha\text{-Galp-(1-3)-}\beta\text{-Galp-(1-)}_n\text{-3)-}\alpha\text{-Galp-CP}$	O2a,c
$\overline{\text{E}} \text{---} \overline{\text{D}} \text{---} \overline{\text{C}} \text{---} \overline{\text{B}} \text{---} \overline{\text{A}} \text{---} \overline{\text{N}} \text{---} \overline{\text{Q}}$ $\text{T-[2-}\alpha\text{-Man-(1-2)-}\alpha\text{-Man-(1-2)-}\alpha\text{-Man-(1-3)-}\alpha\text{-Man-(1-3)-}\alpha\text{-Man-(1-)}_n\text{-3)-}\alpha\text{-Man-(1-3)-}\alpha\text{-Man-CP}$	O3
$\overline{\text{T}}$ $\overline{\text{B}'}$ $\overline{\text{A}} \text{---} \overline{\text{B}} \text{---} \overline{\text{A}''}$ $\alpha\text{-Kdo-(2-2)-}\beta\text{-Ribp-(1-}\overline{\text{4-}\alpha\text{-Gal-(1-2)-}\beta\text{-Ribp-(1-)}_n\text{-4)-}\alpha\text{-Gal-(1-CP}$	O4
$\overline{\text{T}}$ $\overline{\text{C}} \text{---} \overline{\text{B}} \text{---} \overline{\text{A}} \text{---} \overline{\text{N}} \text{---} \overline{\text{Q}}$ $\text{Me-3)-}\alpha\text{-Man-(1-}\overline{\text{3-}\beta\text{-Man-(1-2)-}\alpha\text{-Man-(1-2)-}\alpha\text{-Man-(1-)}_n\text{-3)-}\alpha\text{-Man-(1-3)-}\alpha\text{-Man-(1-CP}$	O5
$\overline{\text{T}}$ $\overline{\text{A}'}$ $\overline{\text{B}} \text{---} \overline{\text{A}}$ $\beta\text{-Kdo-(2-3)-}\alpha\text{-Rha-(1-}\overline{\text{3-}\beta\text{-GlcNAc-(1-4)-}\alpha\text{-Rha-(1-)}_n\text{-1-CP}$	O12
$\overline{\text{F}}$ $\overline{\text{L}}$ $\overline{\text{M}}$ $\text{-3)-}\beta\text{-GlcNAc-(1-5)-}\alpha\text{-Kdo-(2-6)-anhMan}$ $\overline{\text{P-(1-4)}}$	CP (common part)

a, P = H  
b, P =  $\alpha$ -Hep

Εικόνα 5. Δομές αλυσίδων-Ο γλυκανών απομονωμένες από απαμινωμένους LPSs διαφορετικών οροτύπων *K. pneumoniae*. Οι ορότυποι παρατίθενται στη δεξιά πλευρά. Οι μονάδες επαναλαμβανόμενων επικρατειών επισημαίνονται στα κουτιά. (<http://www.jbc.org/content/277/28/25070.full>)

Η παρουσία ή απουσία των αλυσίδων-Ο καθορίζει αν ο LPS θεωρείται τραχύς ή λείος. Ο LPS με πλήρους μήκους αλυσίδες-Ο θεωρείται λείος, ενώ ο LPS χωρίς καθόλου ή με μειωμένες αλυσίδες-Ο θεωρείται τραχύς. Βακτήρια με τραχύ LPS συνήθως έχουν περισσότερο διαπερατές μεμβράνες στα υδρόφοβα αντιβιοτικά, αφού ένας τραχύς LPS είναι πιο υδρόφοβος. Το αντιγόνο-Ο εκτίθεται στην εξωτερική επιφάνεια του βακτηριακού κυττάρου και, συνεπώς, αποτελεί στόχο αναγνώρισης για τα αντισώματα του ξενιστή.<sup>20,21,22</sup>

### 3.3.4.1.2 Ολιγοσακχαριδικός πυρήνας

Ο πυρήνας περιέχει πάντα ένα ολιγοσακχαριδικό στοιχείο που προσδένεται απευθείας στο λιπίδιο A και συνήθως αποτελείται από σάκχαρα όπως επτόζη και KDO (3-deoxy-D-mannooctulosonic Acid ή keto-deoxyoctulosonate). Ο LPS πυρήνας πολλών βακτηρίων περιέχει επίσης μη υδατανθρακικά στοιχεία όπως φωσφορικές ομάδες, αμινοξέα και υποκατάστατα αιθανολαμίνης.<sup>23</sup>

### 3.3.4.1.3 Λιπίδιο A

Το λιπίδιο A είναι, υπό φυσιολογικές συνθήκες, ένας φωσφορυλιωμένος γλυκοζαμινικός δισακχαρίτης με πολλά λιπαρά οξέα. Αυτές οι υδρόφοβες αλυσίδες λιπαρών οξέων αγκυροβολούν τον LPS στη βακτηριακή μεμβράνη και το υπόλοιπο τμήμα του LPS προβάλλει από την κυτταρική επιφάνεια. Το λιπίδιο A είναι σε μεγάλο μέρος υπεύθυνο για την τοξικότητα των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Όταν τα βακτηριακά κύτταρα λύονται από

το ανοσοποιητικό σύστημα, τμήματα της μεμβράνης που περιέχουν το λιπίδιο A απελευθερώνονται στην κυκλοφορία προκαλώντας πυρετό, διάρροια και πιθανά σηπτικό σοκ. Το λιπίδιο A αποτελεί ένα πολύ συντηρημένο στοιχείο του LPS.<sup>24</sup>

### **3.3.5 Κυτταρικό τοίχωμα πεπτιδογλυκάνης**

Τα βακτήρια δε λύνονται όταν τοποθετηθούν σε απεσταγμένο νερό επειδή έχουν έναν άκαμπτο εξωσκελετό. Η πεπτιδογλυκάνη αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες του δισακχαρίτη N-ακετυλο-γλυκοζαμίνης-N-ακετυλο-μουραμικού οξέος, που συνδέονται σταυρωτά από πενταπεπτιδικές πλευρικές αλυσίδες. Το θυλάκιο της πεπτιδογλυκάνης είναι ένα πολύ μεγάλο πολυμερές που μπορεί να απομονωθεί και να παρατηρηθεί στο οπτικό μικροσκόπιο. Εξαιτίας της ακαμψότητάς του, καθορίζει το κυτταρικό σχήμα.

Παράγοντες όπως ένζυμα ή αντιβιοτικά που βλάπτουν την πεπτιδογλυκάνη προκαλούν κυτταρική λύση εξαιτίας της πίεσης σπαργής του κυτταροπλάσματος. Η λύση μπορεί να αποφευχθεί σε μέσα με υψηλή ωσμωτικότητα. Ωστόσο, χωρίς την πεπτιδογλυκάνη, τα κύτταρα χάνουν τα χαρακτηριστικά τους σχήμα. Τα κύτταρα που προκύπτουν καλούνται σφαιροπλάστες. Είναι κατά κανόνα μη βιώσιμα κύτταρα, όμως σε κάποια Εντεροβακτηριακά παρατηρήθηκε ότι μπορούν να συνεχίσουν το μεταβολισμό και τη βιοσύνθεση για ώρες.

Η εξωτερική μεμβράνη είναι ουσιαστικά συρραμμένη στην υποκείμενη πεπτιδογλυκάνη με μια λιποπρωτεΐνη που καλείται Lpp, λιποπρωτεΐνη μουρείνη ή λιποπρωτεΐνη του Braun. Τα λιπίδια που συνδέονται στο αμινοτελικό άκρο αυτής της μικρής πρωτεΐνης την ενθέτουν στην εξωτερική μεμβράνη.<sup>19</sup>

### **3.3.6 Περίπλασμα**

Η εξωτερική και η εσωτερική μεμβράνη οριοθετούν ένα υδατικό κυτταρικό διαμέρισμα που καλείται περίπλασμα. Το περίπλασμα είναι πυκνά στοιβαγμένο με πρωτεΐνες και είναι πιο πυκνόρρευστο από το κυτταρόπλασμα. Η κυτταρική διαμερισματοποίηση επιτρέπει στα Gram-αρνητικά βακτήρια να απομονώνουν πιθανά επιβλαβή αποικοδομητικά ένζυμα όπως ριβονουκλεάση (RNase) ή αλκαλική φωσφατάση. Εξαιτίας αυτού, το περίπλασμα έχει αποκαλεστεί και ως ένας εξελικτικός πρόδρομος των λυσοσωμάτων των ευκαρυωτικών κυττάρων. Άλλες πρωτεΐνες που απαντώνται σε αυτό το διαμέρισμα περιλαμβάνουν τις περιπλασμικές πρωτεΐνες πρόσδεσης, που συμμετέχουν στη μεταφορά και χημειοτακτισμό σακχάρων και αμινοξέων, και άλλα μόρια «συνοδούς» (σαπερόνες, chaperones) που συμμετέχουν στη βιογένεση του φακέλου.<sup>19</sup>

### 3.3.7 Εσωτερική μεμβράνη

Τα βακτήρια στερούνται ενδοκυττάρων οργανιδίων, συνεπώς, όλες οι μεμβρανοσυνδεδεμένες λειτουργίες των ευκαρυωτικών οργανισμών (όπως η παραγωγή ενέργειας, η σύνθεση λιπιδίων, η έκκριση πρωτεϊνών, η ανταλλαγή μηνυμάτων με το περιβάλλον και η μεταφορά θρεπτικών και απεκκρίσεων), εν προκειμένω πραγματοποιούνται στην εσωτερική μεμβράνη. Πολλές από τις μεμβρανικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην παραγωγή ενέργειας, τη βιοσύνθεση λιπιδίων, την έκκριση πρωτεϊνών και τη μεταφορά, είναι συντηρημένες στα βακτήρια αλλά ο κυτταρικός τους εντοπισμός διαφέρει. Στα βακτήρια αυτές οι πρωτεΐνες βρίσκονται στην εσωτερική μεμβράνη.

Αξίζει να σημειωθεί ότι εδώ εντοπίζονται και οι πενικιλινο-δεσμευτικές πρωτεΐνες (penicillin binding proteins, PBPs) που εμπλέκονται στα τελικά στάδια της σύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης που, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί σημαντικό συστατικό του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος.

Η εσωτερική μεμβράνη είναι μια φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα. Σημαντικά φωσφολιπίδια είναι η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη και φωσφατιδυλογλυκερόλη, σε μικρότερες ποσότητες υπάρχει φωσφατιδυλοσερίνη και καρδιολιπίνη. Άλλα ελάσσονα λιπίδια περιλαμβάνουν πολυισοπρενοειδείς μεταφορείς (C55), που συμμετέχουν στη μετατόπιση ενεργών σακχαρικών ενδιάμεσων, απαραίτητων για τη βιογένεση του φακέλου.

Ο LPS, συμπεριλαμβανομένου του πολυσακχαριδικού πυρήνα και του αντιγόνου-O, συντίθεται στο εσωτερικό φύλλο της εσωτερικής μεμβράνης. Ο LPS αναστρέφεται προς το εξωτερικό φύλλο της εσωτερικής μεμβράνης από τον ABC μεταφορέα MsbA. Το αντιγόνο-O συντίθεται επάνω σε έναν πολυισοπρενοειδή μεταφορέα, που έπειτα το αναστρέφει προς το εξωτερικό φύλλο. Το αντιγόνο-O προσδέεται στον LPS πυρήνα στο εξωτερικό φύλλο της εσωτερικής μεμβράνης, μια αντίδραση που καταλύεται από WaaL. Έχουν ταυτοποιηθεί επτά απαραίτητες πρωτεΐνες που απαιτούνται για τη μεταφορά του LPS από το εξωτερικό φύλλο της εξωτερικής μεμβράνης στην κυτταρική επιφάνεια. Αυτές οι πρωτεΐνες ορίζονται ως Lpt (μεταφορείς λιποπολυσακχαρίτη) και περιλαμβάνουν τις: LptA (ή YhbN), LptB (ή YhbG), LptC (ή YrbK), LptD (ή Imp ή OstA), LptE (ή RlpB), LptF (ή YjgP) και LptG (ή YjgQ). Η μεγάλη πρωτεΐνη με μορφή β-βαρελιού LptD και η λιποπρωτεΐνη LptE σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα στην εξωτερική μεμβράνη.<sup>19</sup>

### 3.3.8 Το γονιδίωμα της *Klebsiella pneumoniae*

Έχουν αναλυθεί πλήρως τα γονιδιώματα πέντε στελεχών *K. pneumoniae* (MGH 78578, NTUH-K2044, Kp342, και KCTC2242) (Πίνακας 7).

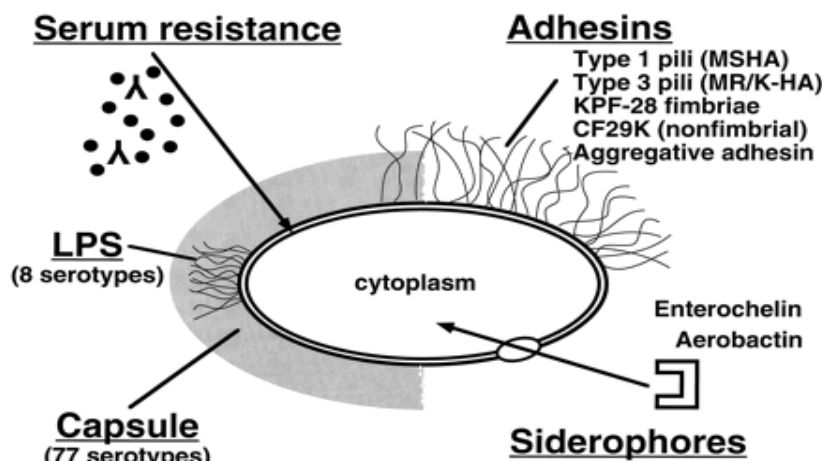
Η *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae HS11286* αποτελείται από επτά κυκλικά ρεπλικόνια που περιλαμβάνουν ένα χρωμόσωμα και έξι πλασμίδια. Το χρωμόσωμα (μήκους 5,332,752 bp, 57.5% αναλογία G+C) κωδικοποιεί 5,316 πρωτεΐνες και φέρει 87 tRNAs, 1 tmRNA, και 8 αντίγραφα 16S-23S-5S rRNAs. Ταυτοποιήθηκε ένα σύνολο 422 HS11286 γονιδίων ειδικών για το συγκεκριμένο στέλεχος. Επιπλέον, ανιχνεύτηκαν επτά προφαγικές περιοχές από τις οποίες οι τρεις ήταν ακέραιες. Τέλος, το HS11286 χρωμόσωμα περιέχει δύο νέα ενσωματωμένα και συζευκτικά στοιχεία, ένα asn tRNA σχετιζόμενο με το γονίδιο ICEKpnHS11286-1 (μήκους 62 kb, 52.5% αναλογία G+C) και ένα phe tRNA σχετιζόμενο με το γονίδιο ICEKpnHS11286-2 (μήκους 56 kb, 50.2% αναλογία G+C).<sup>25,26,27</sup>

**Πίνακας 7: Γονιδίωμα αναφοράς *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae HS11286***

Τύπος	Όνομα	Μέγεθος	GC%	Πρωτεΐνες	rRNA	tRNA	Γονίδιο
Χρωμόσωμα	-	5.33	57.5	5,316	25	62	5,404
Πλασμίδιο	pKPHS1	0.122799	49.5	141	-	-	141
Πλασμίδιο	pKPHS2	0.111195	53.3	160	-	-	160
Πλασμίδιο	pKPHS3	0.105974	52.5	152	-	-	152
Πλασμίδιο	pKPHS4	0.003751	52.5	4	-	-	4
Πλασμίδιο	pKPHS5	0.003353	42.8	5	-	-	5
Πλασμίδιο	pKPHS6	0.001308	47.9	1	-	-	1

### 3.4 Λοιμογόνοι παράγοντες της *Klebsiella pneumoniae*

Οι κύριοι λοιμογόνοι παράγοντες της *K. pneumoniae* είναι το αντιγόνο K, οι προσκολλητίνες, οι ενδοτοξίνες και οι μεταφορείς σιδήρου (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση των παθογόνων παραγόντων στην *Klebsiella pneumoniae*

#### 3.4.1 Αντιγόνο K

Η κάψα αποτελεί τον πρώτο λοιμογόνο παράγοντα που περιγράφηκε στην *Klebsiella*. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί περίπου 80 καψιδιακά αντιγόνα K. Ο καψιδιακός αυτός πολυσακχαρίτης είναι τοξικός και συντίθεται από επαναλαμβανόμενες βασικές μονάδες τεσσάρων έως έξι σακχάρων. Ιδιαίτερη σημασία για τον άνθρωπο έχουν οι ορότυποι K1, K2, K3, K5 και K21. Πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι υπάρχει διαφορά στη λοιμογόνο δράση

ανάμεσα στους διαφορετικούς καψιδιακούς ορότυπους, με τους K1 και K2 να είναι οι πιο λοιμογόνοι.

Όπως προαναφέρθηκε, η λοιμογόνος δράση στηρίζεται στην αναστολή της φαγοκυττάρωσης και της καταστροφής του μικροβίου από τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα και τους βακτηριοκτόνους παράγοντες του ορού, αντίστοιχα. Το αντιγόνο K διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην προστασία του βακτηρίου από την οψωνοποίηση όταν συγκεκριμένα αντισώματα εκλείπουν, εμποδίζοντας τη μετάθεση ή την ενεργοποίηση του συμπληρώματος.

Η περιεκτικότητα σε μαννόζη του καψιδιακού πολυσακχαρίτη αποτελεί παράγοντα που καθορίζει το βαθμό της λοιμογόνου δράσης που σχετίζεται με το K αντιγόνο. Στους πολυσακχαριδικούς τύπους με υψηλή λοιμογόνο δράση, λείπει το σύμπλοκο μαννόζη-α2/3-μαννόζη, μια δομή που εμφανίζεται στους καψιδιακούς τύπους με μικρότερη λοιμογόνο δράση.<sup>28,29</sup>

### 3.4.2 Προσκολλητίνες

Το πρώτο βήμα για τον αποικισμό και τη μόλυνση είναι η προσκόλληση στην επιφάνεια των βλεννογόνων και των επιθηλιακών κυττάρων, που πραγματοποιείται μέσω της έκφρασης σειράς ινιδιακών και μη ινιδιακών προσκολλητινών. Η βακτηριακή προσκόλληση πρέπει να είναι επαρκώς ισχυρή ώστε να αντιστέκεται στις διάφορες δυνάμεις που ασκούνται, όπως για παράδειγμα από τις αέριες εκροές της αναπνευστικής οδού.

Όπως προαναφέρθηκε, στην *K. pneumoniae* απαντώνται δύο τύποι κροσσών, οι τύπου 1 και 3. Οι τύπου 1 λεπτοί κροσσοί με διακλαδώσεις αντιπροσωπεύουν περισσότερο από το 80% των κλινικών στελεχών *K. pneumoniae*. Τα μόρια προσκολλητίνης βρίσκονται στο απομακρυσμένο άκρο των κροσσών για την προσκόλληση στο κύτταρο ξενιστή, ενώ οι κροσσοί συναρμολογούνται σε μια τρισδιάστατη ελικοειδή δομή για να σχηματιστεί το κροσσωτό του κορμού. Η ελικοειδής δομή επιτρέπει στους κροσσούς να τεντώσουν, κάτι που κάνει τα βακτήρια ικανά να αντισταθούν στην απομάκρυνσή τους.

Οι τύπου 3 λεπτοί μη διακλαδισμένοι κροσσοί παίζουν σημαντικό ρόλο στις λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος. Μεσολαμβάν επίσης στην προσκόλληση διαφόρων τύπων κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των επιθηλιακών κυττάρων της τραχείας, των κυττάρων των νεφρικών σωλήνων και των συστατικών των μεμβρανών των ιστών του πνεύμονα. Αυτοί οι κροσσοί κωδικοποιούνται από ένα άθροισμα γονιδίων *mrk*. Αποτελούνται από ινιδιακές δομές, οι οποίες συντίθενται από την κύρια υπομονάδα *mrkA* και την προσκολλητίνη *mrkD*, η οποία περιέχεται στη δομή.

Υπάρχουν και άλλοι βακτηριακοί παράγοντες με μη ινιδιακές δομές που ευθύνονται για την ικανότητα προσκόλλησης της *K. pneumoniae*. Σε αυτούς τους παράγοντες περιλαμβάνονται η προσκολλητίνη CF29K που κωδικοποιείται από πλασμίδια και διαπιστώθηκε ότι διευκολύνει την προσκόλληση των στελεχών σε εντερικές κυτταρικές γραμμές ανθρώπινης προέλευσης. Η CF29K είναι μια προσκολλητίνη μεγέθους 29kDa, της οποίας το γονίδιο περιέχεται σε ένα συζευκτικό πλασμίδιο που περιέχει επίσης γονίδια για την αντοχή στις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες.<sup>28,30,31,32</sup>

### 3.4.3 Ενδοτοξίνες

Οι ενδοτοξίνες αποτελούν συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης των Gram-αρνητικών βακτηρίων και απελευθερώνονται από τη βακτηριακή επιφάνεια μέσω κυστιδίων της εξωτερικής μεμβράνης μετά τη φυσιολογική λύση του βακτηρίου.

Η τοξική δραστηριότητα του LPS πρωτοπαρατηρήθηκε από τον Richard Friedrich Johannes Pfeiffer και χαρακτηρίστηκε ως «ενδοτοξίνη». Σήμερα ο όρος «ενδοτοξίνη» χρησιμοποιείται κατά κόρον ως συνώνυμο του LPS, παρότι υπάρχουν κάποια μόρια που εκκρίνονται από άλλα βακτήρια και δεν σχετίζονται με τον LPS, όπως η αποκαλούμενη ενδοτοξίνη-δέλτα, μια πρωτεΐνη που εκκρίνεται από τον *Bacillus thuringiensis*.

Ο LPS, όπως αναφέρθηκε, είναι ουσιαστικά ένα σύμπλεγμα λιπιδίων και πολυσακχαριτών και αποτελεί βασικό δομικό συστατικό του τοιχώματος των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Το σύμπλεγμα αυτό βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη του βακτηρίου, προσδεδεμένο με ιοντικές και υδροφοβικές δυνάμεις, σχηματίζοντας ένα ισχυρά αρνητικό φορτίο, το οποίο εξουδετερώνεται από ιόντα  $Ca^{2+}$  και  $Mg^{2+}$ . Το μοριακό σύμπλεγμα των λιποπολυσακχαριτών, όπως προελέχθει, αποτελείται από τρία δομικά στοιχεία: τον ολιγοσακχαριτικό πυρήνα που διαμορφώνει τη δομή του μακρομορίου και μια αλυσίδα μορίων σακχάρων που σχηματίζουν το αντιγόνο O και το λιπίδιο A.

Σε γενικές γραμμές, η αλληλεπίδραση των LPS μορίων με τα κύτταρα του συστήματος των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην εκδήλωση της ενδοτοξικής δράσης. Προκαλούν ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων και αυξάνουν την έκφραση και τη λειτουργικότητα των μορίων προσκόλλησης της μεμβράνης τους. Προκαλούν επίσης την απελευθέρωση πλήθους ενδογενών μεσολαβητών, με κυρίαρχη σημασία στην εκδήλωση φαινομένων σήψης, οι κυριότεροι από τους οποίους είναι οι κυτταροκίνες που παράγονται από τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα, παρουσία των οποίων οι LPS πυροδοτούν την αυτόλυση των κυττάρων, επιδεινώνοντας έτσι την υπάρχουσα βλάβη.

Η πρώτη γραμμή άμυνας του ξενιστή έναντι της εισβολής μικροοργανισμών περιλαμβάνει, επιπρόσθετα της φαγοκυττάρωσης από πολυμορφοπύρρηνα κοκκιοκύτταρα, τη βακτηριοκτόνο επίδραση του συμπληρώματος. Αυτή η βακτηριοκτόνος δράση διαμεσολαβείται πρωταρχικά από πρωτεΐνες του συμπληρώματος. Μετά την όμοια με καταρράκτη ενεργοποίησή τους, αυτές οι πρωτεΐνες συσσωρεύονται σαν μεμβρανικό σύμπλεγμα επίθεσης στην επιφάνεια του μικροοργανισμού. Αυτό το σύμπλεγμα αποτελείται από τις τελικές πρωτεΐνες του συμπληρώματος C5b–C9, που παράγουν ένα διαμεμβρανικό πόρο στην εξωτερική μεμβράνη του Gram-αρνητικού βακτηρίου, οδηγώντας σε εισροή Na<sup>+</sup> και επακόλουθη ωσμωτική λύση του βακτηρίου. Ο καταρράκτης του συμπληρώματος μπορεί να ενεργοποιηθεί από δύο διαφορετικούς μηχανισμούς: το κλασσικό μονοπάτι του συμπληρώματος, που τυπικά απαιτεί ειδικά αντισώματα για να ενεργοποιηθεί και το εναλλακτικό μονοπάτι του συμπληρώματος, που μπορεί να ενεργοποιηθεί απουσία αυτών των αντισωμάτων. Το εναλλακτικό μονοπάτι θεωρείται επίσης ως ένα πρώιμο αμυντικό σύστημα της έμφυτης ανοσίας, που καθιστά ικανό τον ξενιστή να αντιδρά έναντι των μικροοργανισμών που εισβάλλουν προτού ακόμη σχηματιστούν τα ειδικά αντιγόνα. Και τα δύο μονοπάτια του συμπληρώματος οδηγούν, μέσω της ενεργοποίησης του C3, στο σχηματισμό της οψωνίνης C3b, που καταλήγει στο σχηματισμό του τελικού C5b–C9 συμπλέγματος παίζοντας έτσι ρόλο-κλειδί σε αυτόν το μηχανισμό άμυνας.

Ως απάντηση σε αυτή την άμυνα του ξενιστή, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί ανέπτυξαν στρατηγικές για να αντιμετωπίζουν τη βακτηριοκτόνο δράση του συμπληρώματος.

Οι ακριβείς μηχανισμοί που οδηγούν σε βακτηριακή αντοχή στο συμπλήρωμα είναι άγνωστοι. Για την *K. pneumoniae*, δύο υποθέσεις έχουν διατυπωθεί: Πρώτον, οι πολυσακχαρίτες της κάψας μπορεί να καλύπτουν και να αποκρύπτουν τον υποκείμενο LPS εκθέτοντας μια επιφανειακή δομή που δεν ενεργοποιεί το συμπλήρωμα. Δεύτερον, οι πλευρικές αλυσίδες O του LPS μπορεί να διαπεράσουν το καψικό στρώμα και να εκτεθούν στο εξωτερικό περιβάλλον σε συγκεκριμένους τύπους κάψας στην *K. pneumoniae*. Αφού ο LPS είναι γενικά ικανός να ενεργοποιήσει το συμπλήρωμα, το C3b επακόλουθα εναποτίθεται σε μόρια του LPS. Ωστόσο, αφού προτιμητέα προσδένεται στις μακρύτερες O-πολυσακχαριτικές πλευρικές αλυσίδες, το C3b βρίσκεται μακριά από τη βακτηριακή κυτταρική μεμβράνη. Έτσι, ο σχηματισμός του λυτικού μεμβρανικού συμπλέγματος επίθεσης (C5b–C9) παρεμποδίζεται και δε λαμβάνει χώρα επακόλουθη μεμβρανική βλάβη και κυτταρικός θάνατος.

Ο LPS μπορεί να τροποποιηθεί έτσι ώστε να εμφανίζει συγκεκριμένη σακχαριδική δομή. Έχει δειχθεί ότι ένα συγκεκριμένο ένζυμο του εντέρου, η αλκαλική φωσφατάση, μπορεί να απενεργοποιήσει την τοξική δράση του LPS αφαιρώντας τις δύο φωσφορικές ομάδες που

υπάρχουν στους υδρογονάνθρακες του LPS. Αυτό μπορεί να λειτουργήσει ως ένας προσαρμοστικός μηχανισμός που βοηθάει τον ξενιστή να αντιμετωπίσει πιθανές τοξικές επιδράσεις των Gram-αρνητικών βακτηρίων του λεπτού εντέρου. Απενεργοποίηση της τοξικής δράσης του LPS μπορεί να πραγματοποιηθεί από μια λιπάση, την ακυλοξυακυλ-υδρολάση (acyloxyacyl hydrolase, AOAΗ) που παράγεται από ουδετερόφιλα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα, η οποία απενεργοποιεί τον LPS αφαιρώντας τις δύο δευτερεύουσες άκυλο-ομάδες από το λιπίδιο A. Πειραματικά έχει δειχθεί σε ποντίκια που έχουν έλλειψη της AOAΗ, ότι αν τους δοθεί LPS παρεντερικά, αναπτύσσουν υψηλούς τίτλους μη-ειδικών αντισωμάτων, παρατεταμένη ηπατομεγαλία και εμφανίζουν παρατεταμένη ανοχή στις ενδοτοξίνες. Η απενεργοποίηση του LPS μπορεί να είναι απαραίτητη στα ζώα για να αποκαταστήσουν την ομοιόσταση ύστερα από παρεντερική έκθεση σε LPS.

Αξίζει να σημειωθεί ότι μεταβολές του LPS παίζουν σπουδαίο ρόλο στην ανοχή της *K. pneumoniae* σε αντιβιοτικά όπως θα αναφερθεί εκτενέστερα παρακάτω.<sup>33,34,35,36,37</sup>

#### 3.4.4 Μεταφορές σιδήρου

Ο σίδηρος είναι απαραίτητο στοιχείο για το μεταβολισμό και τη βακτηριακή ανάπτυξη και χρησιμοποιείται από όλους τους οργανισμούς σαν συμπράγοντας ενζύμων σε ρόλο καταλύτη. Η *K. pneumoniae* όπως και άλλα Εντεροβακτηριακά, συναγωνίζονται τον ξενιστή στην απόκτηση ελεύθερου σιδήρου, που βρίσκεται άλλωστε σε ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις ( $10^{-18}$  M), για να μπορέσουν να αναπτυχθούν, να εισέλθουν εντός των διαφόρων ιστών και να δημιουργήσουν αποικίες.

Σε αναερόβιο περιβάλλον, όπου ο σίδηρος επικρατεί, εισάγεται στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου μέσω πορινών και του συστήματος μεταφοράς ABC. Στον ανθρώπινο οργανισμό, πλούσια πηγή σιδήρου αποτελεί το αίμα. Ωστόσο ο σίδηρος αυτός δεν είναι άμεσα διαθέσιμος στο βακτήριο καθώς δεν είναι ελεύθερος, αλλά συνδεδεμένος με μεταφορικά μόρια, όπως η τρανσφερίνη στον ορό, η λακτοφερίνη στο γάλα και σε άλλες ενώσεις ή βρίσκεται απομονωμένος μέσα στα κύτταρα, όπως για παράδειγμα στις πρωτεΐνες της αίμης.

Πολλά βακτήρια επιχειρούν να εξασφαλίσουν την προμήθεια του σιδήρου στον ξενιστή εκκρίνοντας υψηλής συγγένειας, χαμηλού μοριακού βάρους χηλωτές σιδήρου, που καλούνται μεταφορείς σιδήρου, που είναι ικανοί να δεσμεύουν ανταγωνιστικά το σίδηρο που είναι προσδεμένος στις πρωτεΐνες του ξενιστή. Σε συνθήκες ανεπάρκειας σιδήρου, π.χ. στο περιβάλλον του ξενιστή, τα Εντεροβακτηριακά συνθέτουν τριών ειδών συστημάτων μεταφορέων σιδήρου: τις φαινολικές ενώσεις (εντερομπακτίνη), τις υδροξαμικές ενώσεις (αερομπακτίνη) και τη γερσιομπακτίνη.



Σχεδόν όλα τα στελέχη *K. pneumoniae* παράγουν εντερομπακτίνη, ενώ μόνο λίγα μπορούν να παράγουν γερσιομπακτίνη και αερομπακτίνη. Η δεσμευτική ικανότητα των ενώσεων των μεταφορέων αυτών για το σίδηρο είναι τέτοια που ακόμα και ο σίδηρος της τρανσφερίνης μπορεί να προσληφθεί από τα βακτηριακά κύτταρα.<sup>38,39,40,41</sup>

### 3.5 Λοιμώξεις που προκαλούνται από *Klebsiella pneumoniae*

Η *K. pneumoniae* είναι ένα παθογόνο μικρόβιο ικανό να προκαλεί λοιμώξεις των ουροφόρων οδών και πνευμονία σε μη νοσηλεύόμενα άτομα. Οι περισσότερες όμως λοιμώξεις που προκαλούνται από την *K. pneumoniae* αφορούν εξασθενημένα άτομα, που πάσχουν από υποκείμενα νοσήματα ή επισυμβαίνουν σε νοσοκομειακό περιβάλλον.

Πέρα από πνευμονία και ουρολοιμώξεις, οι νοσοκομειακές λοιμώξεις που προκαλούνται από την *K. pneumoniae* περιλαμβάνουν λοιμώξεις τραυμάτων, κεντρικών φλεβικών γραμμών και καθετήρων, λοιμώξεις χοληφόρων οδών, περιπτώσεις περιτονίτιδας και μηνιγγίτιδας.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η *K. pneumoniae* αποτελεί το δεύτερο σε συχνότητα αίτιο βακτηριαμίας προκαλούμενης από Gram-αρνητικά βακτήρια, μετά την *E. coli*. Επίσης, με την πρόκληση ουρολοιμώξεων σε άτομα με φυσιολογικές ή μη ουροφόρες οδούς αποτελεί και πάλι το δεύτερο, μετά την *E. coli*, αίτιο βακτηριαμίας με εστία το ουροποιητικό.

Δε χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα κλινικά ευρήματα οι λοιμώξεις των ουροφόρων οδών που προκαλούνται από την *K. pneumoniae* σε σχέση με εκείνες που προκαλούνται από άλλα μικρόβια. Αντίθετα, η πνευμονία που προκαλεί η *K. pneumoniae*, έχει ιδιαίτερα κλινικά χαρακτηριστικά που τη διαχωρίζουν, εξού και η ονομασία «ασθένεια του Friedländer». Τα κλασσικά αυτά χαρακτηριστικά αφορούν τη σοβαρότητα της νόσου, το γεγονός ότι είναι συχνή σε αλκοολικούς, την τάση προσβολής των άνω πνευμονικών λοβών και την παραγωγή πυοαιματηρών σκουρόχρωων πτυέλων (currant jelly). Υπάρχουν επίσης χαρακτηριστικά ακτινολογικά ευρήματα, όπως είναι η εικόνα του διογκωμένου πνεύμονα (bulging fissure sign), οι διατεταμένες μεσολόβιες σχισμές και η τάση ανάπτυξης αποστηματικών κοιλοτήτων. Ωστόσο, παρά την ύπαρξη αυτών των χαρακτηριστικών, τις περισσότερες φορές δεν είναι δυνατή η κλινική διάγνωση της πνευμονίας από *K. pneumoniae*, με τη θνησιμότητα να ξεπερνά ίσως και το 50%, ακόμα και υπό αντιμικροβιακή αγωγή.<sup>42,43,44</sup>

### 3.6 Εργαστηριακή ταυτοποίηση *Klebsiella pneumoniae*

#### Κύρια χαρακτηριστικά της *Klebsiella pneumoniae*

GRAM-ΑΡΝΗΤΙΚΟ
ΡΑΒΔΟΜΟΡΦΟ
ΑΚΙΝΗΤΟ
ΜΗ ΣΠΟΡΙΟΓΟΝΟ
ΚΑΤΑΛΑΣΗ: ΘΕΤΙΚΟ
ΟΞΕΙΔΑΣΗ: ΑΡΝΗΤΙΚΟ

Πίνακας 8: Βιοχημικά χαρακτηριστικά της *Klebsiella pneumoniae*

Ανάπτυξη σε MacConkey	Παραγωγή ινδόλης	Κόκκινο του μεθυλίου	Voges-Proskauer	Κιτρικό (Simmons)	Σουλφίδιο του υδρογόνου (TS)	Υδρόλυση της ουρίας	Δεκαρβοξυλάση της λυσίνης	Διυδρολάση της αργινίνης	Δεκαρβοξυλάση ορνιθίνης
<b>θετική</b>	<b>αρνητική</b>	<b>αρνητική</b>	<b>θετική</b>	<b>θετική</b>	<b>αρνητική</b>	<b>θετική</b>	<b>θετική</b>	<b>αρνητική</b>	<b>αρνητική</b>
Κινητικότητα (36 °C)	D-γλυκόζη οξύ/αέριο	D-μαννιτόλη ζύμωση	Σακχαρόζη ζύμωση	Λακτόζη ζύμωση	D-σορβιτόλη ζύμωση	Κελλοβιόζη	Υδρόλυση εσκουλίνης	Χρήση οξικού	ONPG test
<b>αρνητική</b>	<b>θετική/θετική</b>	<b>θετική</b>	<b>θετική</b>	<b>θετική</b>	<b>θετική</b>	<b>θετική</b>	<b>θετική</b>	κυρίως <b>θετική</b>	<b>θετική</b>

#### Επεξήγηση :

θετική (> 90% των στελεχών είναι θετικά)  
κυρίως θετική (51 - 89%)  
κυρίως αρνητικό (11 - 50%)  
αρνητικό (0 - 10%)<sup>45</sup>

### 3.7 Αντιβιοτικά

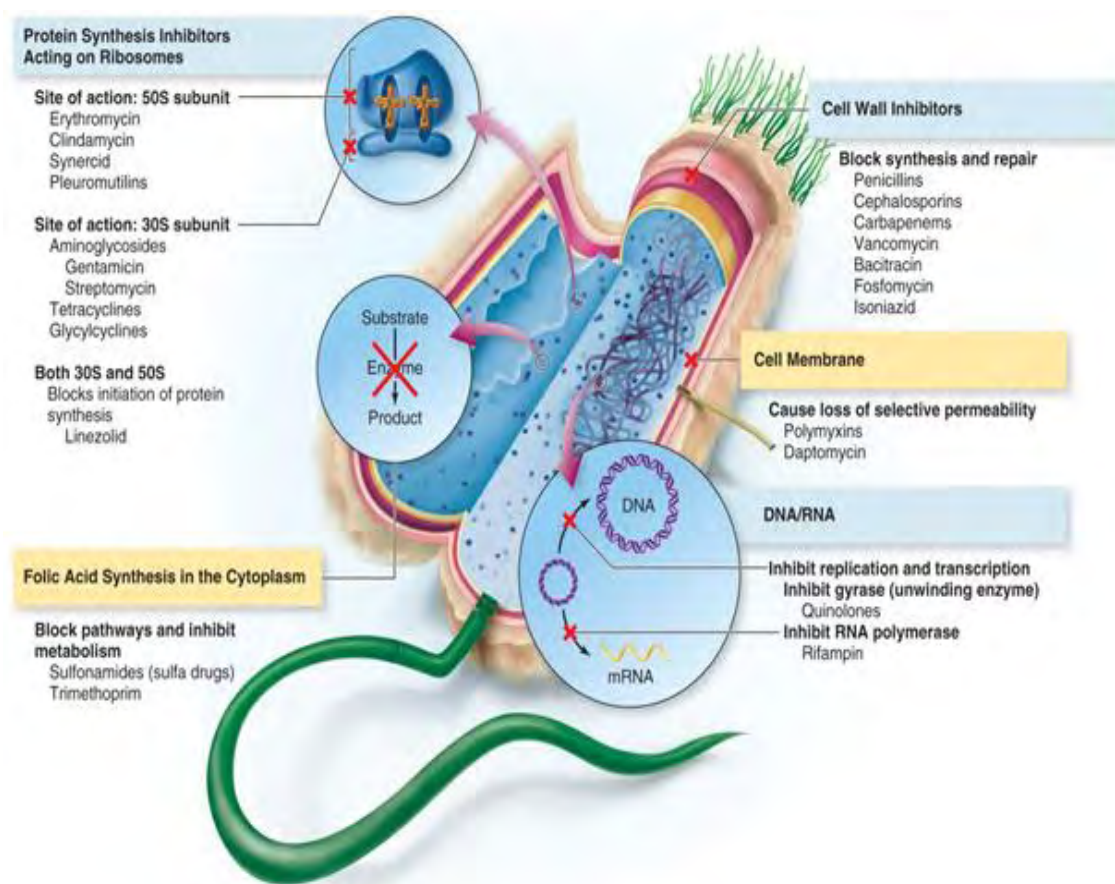
Αρχικά ο όρος «αντιβιοτικό» χρησιμοποιήθηκε για την περιγραφή οποιουδήποτε μέσου με βιολογική δράση ενάντια στους μικροοργανισμούς. Εντούτοις, σήμερα χρησιμοποιείται για να αποδώσει ουσίες με αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή ή αντιπαρασιτική δράση. Ο όρος αυτός έχει πλέον αντικατασταθεί από τον πιο περιεκτικό όρο «αντιμικροβιακός παράγοντας». Στην πραγματικότητα, τα φυσικά αντιβιοτικά είναι τοξικές ουσίες και, πιο συγκεκριμένα, ενδοτοξίνες, οι οποίες παράγονται από ορισμένους μικροοργανισμούς ως όπλα έναντι άλλων μικροοργανισμών. Σήμερα, στην κατηγορία των αντιβιοτικών περιλαμβάνονται τόσο βιοσυνθετικές όσο και συνθετικές ή ημισυνθετικές ουσίες, οι οποίες σε χαμηλές συγκεντρώσεις εκδηλώνουν μικροβιοκτόνο ή μικροβιοστατική δράση. Τα περισσότερα

αντιβακτηριακά αντιβιοτικά δεν αναπτύσσουν τη δραστηριότητα ενάντια στους ιούς ή τους μύκητες και μπορεί να είναι επιβλαβή όταν δε λαμβάνονται σωστά.

Τα αντιβακτηριακά αντιβιοτικά ταξινομούνται συνήθως βάσει του μηχανισμού δράσης τους, της χημικής τους δομής ή του εύρους δραστηριότητάς τους (Εικόνα 7).

Ο μηχανισμός με τον οποίο δρα ένα αντιβιοτικό στο βακτηριακό κύτταρο έχει να κάνει με το βιολογικό του στόχο. Έτσι, σε κυτταρικό επίπεδο, ένα αντιμικροβιακό φάρμακο μπορεί να στοχεύει σε:

- αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος (β-λακταμικά αντιβιοτικά, βανκομυκίνη, βακιτρακίνη)
- αλλαγή στη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης (πολυμυξίνες)
- αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης (αμινογλυκοσίδες, χλωραμφαινικόλη, ερυθρομυκίνη, τετρακυκλίνες, λινκοσαμίδες)
- αναστολή της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων (σουλφοναμίδες, τριμεθοπρίμη, κινολόνες, ριφαμπικίνη, νοβοβοικίνη)<sup>46,47,48,49</sup>



Εικόνα 7. Οι βιολογικοί στόχοι των αντιβιοτικών στο βακτηριακό κύτταρο

**Πίνακας 9: Η πλέον αποδεκτή διεθνώς ταξινόμηση των αντιμικροβιακών φαρμάκων**

<b>ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ</b>	
Β-λακταμικά αντιβιοτικά: Τα περιέχοντα στο μόριό τους τον β-λακταμικό δακτύλιο:	
Πενικιλίνες	π.χ. Amoxicillin (Amoxil, Augmantin), Ampicillin (Pentrexyl), κλπ
Κεφαλοσπορίνες ή Κεφέμες:(α,β,γ,δ γενιάς):	π.χ. Cephradine, Cefotaxime (Solvatan), Cefaclor (Ceclor), Cefadroxil (Moxacef), κλπ
Κεφαμυκίνες	π.χ. Cefoxitin (Mefoxil), Cefotetan, Cefixime (Ceftoral), Ceforanide (Radacef)
Μονοβακτάμες	π.χ. Aztreonam (Azactam)
Οξαλακτάμες ή Οξακεφέμες	π.χ. Latamoxef (Lamoxactam)
Θειεναμυκίνες, Πενέμες, Καρβαπενέμες	π.χ. Imipenem (Primaxin), Carbapenem
Αναστολείς της β-λακταμάσης	π.χ. Clavulanic acid (Augmentin)
Άλλα νέα λακταμικά αντιβιοτικά	
<b>Αμινογλυκοσίδες</b>	
Παλαιές και Νεώτερες	π.χ. Streptomycin, Gentamycin (Garamycin), Netilmycin (Netromycin)
<b>Σουλφοναμίδες</b>	
	π.χ. Sulphamethoxazole (Septrin, Bactrimel)
<b>Κινολόνες (α,β,γ γενιάς)</b>	
	π.χ. Norfloxacin (Norocin), Enoxacin, Ciprofloxacin (Ciproxin)
<b>Τετρακυκλίνες</b>	
	π.χ. Doxycyclin (Vibramycin), Minocyclin (Minocin)
<b>Μακρολίδια</b>	
Ομάδα Ερυθρομυκίνης	π.χ. Erythromycin Stearate, Clarithromycin (Claricid),
Ομάδα Λινκομυκίνης	π.χ. Lincomycin
<b>Διάφορα αντιμικροβιακά</b>	
Πολυπεπίδια	
Παράγωγα αμινοξέων	
Στεροειδή αντιβιοτικά	π.χ. Fusidic acid (Fucidin)
<b>Αντιφυματικά φάρμακα</b>	
	π.χ. Isoniazid, Rifampicin
<b>Αντιλεπρικά φάρμακα</b>	
	π.χ. Dapsone
<b>Μυκητοκτόνα, ή Αντιμυκητιασικά φάρμακα</b>	
	π.χ. Itraconazol (Sporanox), Terbinathrine (Lamisil), Fluconazol (Fungustatin)
<b>Αντισηπτικά ουροφόρων οδών</b>	
	π.χ. Nitrofurantoin (Furolin)
<b>Ιοστατικά, ή Αντιϊικά φάρμακα</b>	
	π.χ. Acyclovir (Zovirax), Amantadine (Symmetrel), Oseltamivir (Tamiflu), κλπ
<b>Τοπικά αντισηπτικά</b>	
	π.χ. Povidone Iodine (Betadine), Chlorexidine (Hibitane), Hexetidine (Hexalen), Octenidine Hydrochloride (Octenisept), Cetrimide (Cetavlon), Chloroxylenol (Dettol) κλπ

### 3.8 Β-λακταμικά αντιβιοτικά

Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά είναι τα πιο δραστικά και περισσότερο χρησιμοποιούμενα έναντι της *K. pneumoniae* (Πίνακας 9).

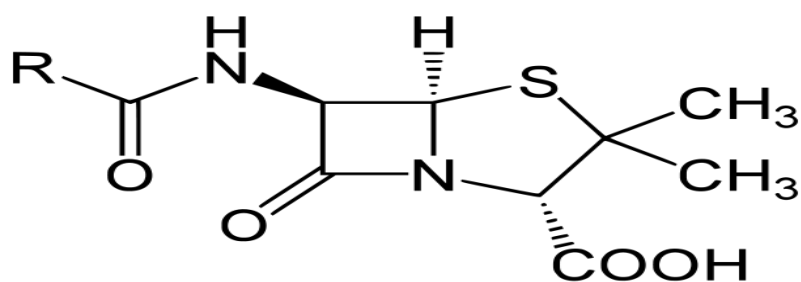
Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους αντιμικροβιακούς παράγοντες λόγω της υψηλής ειδικότητας και αποτελεσματικότητας τους. Συνιστούν μια μεγάλη κατηγορία χημικών ενώσεων με κοινό χαρακτηριστικό τον τετραμελή β-λακταμικό δακτύλιο. Όπως προαναφέρθηκε, τα βακτήρια περιβάλλονται και από τοίχωμα εκτός από την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Το τοίχωμα αυτό προσδίδει μεγάλη αντοχή σε μεταβολές της οσμωτικής πίεσης του περιβάλλοντος. Αν λυθεί το τοίχωμα, το μικρόβιο καταστρέφεται, γιατί παύει να προστατεύεται από τις μηχανικές επιδράσεις του περιβάλλοντος.

Όσον αφορά το μηχανισμό δράσης των β-λακταμικών αντιβιοτικών: αναστέλλουν τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος, καθώς συνδέονται ομοιοπολικά με τις τρανσπεπτιδάσες και τις καρβοξυπεπτιδάσες που καλούνται εναλλακτικά και πενικιλίνο-δεσμευτικές πρωτεΐνες (penicillin binding proteins, PBPs) οι οποίες, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, βρίσκονται στην εσωτερική μεμβράνη όλων των βακτηρίων και συμμετέχουν στη σύνθεση του κυτταρικού τους τοιχώματος καθώς είναι απαραίτητες για το σχηματισμό του δικτύου πεπτιδογλυκάνης. Πολλά βακτήρια παράγουν β-λακταμάσες (ή πενικιλινάσες), ένζυμα τα οποία αδρανοποιούν τις β-λακτάμες, υδρολύοντας τον αμιδικό δεσμό O=CN του β-λακταμικού δακτυλίου.

Όσες πενικιλίνες διασπώνται από πενικιλινάσες συγχορηγούνται με αναστολείς της β-λακταμάσης (κλαβουλανικό οξύ, σουλβακτάμη, ταζαβακτάμη). Οι β-λακταμικοί αναστολείς δεν έχουν καμία αντιβιοτική δράση αλλά συνδέονται ομοιοπολικά με το ενεργό κέντρο της β-λακταμάσης, προκαλώντας μη αντιστρεπτή απενεργοποίησή της και με αυτόν τον τρόπο επιτρέπουν στις β-λακτάμες να ασκήσουν την αντιβιοτική τους δράση.

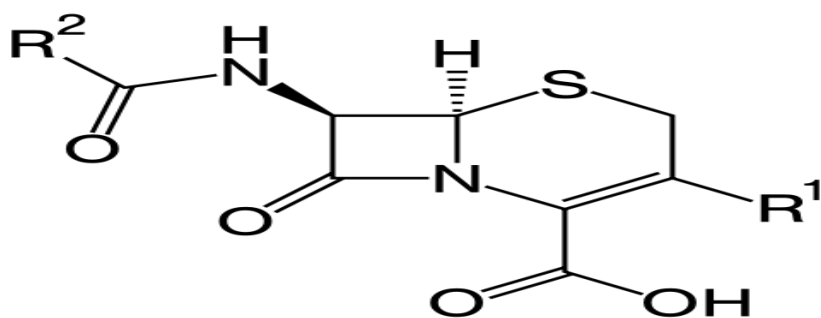
Τα μέλη της ομάδας αυτής περιλαμβάνουν τις:

α) **Πενικιλίνες:** Στο μόριο τους ο τετραμελής δακτύλιος της β-λακτάμης συνδέεται με έναν πενταμελή δακτύλιο θειαζολιδίνης. Οι πλευρικές ομάδες του μορίου διαφέρουν μεταξύ των μελών της ομάδας και καθορίζουν τις παραλλαγές στις αντιβακτηριακές ιδιότητες των διαφόρων β-λακταμικών αντιβιοτικών. Διακρίνονται σε φυσικές και ημισυνθετικές πενικιλίνες. Οι φυσικές δρουν κυρίως έναντι των Gram-θετικών βακτηρίων και μερικών Gram-αρνητικών, ενώ δεν είναι δραστικές έναντι των Εντεροβακτηριακών. Οι ημισυνθετικές δρουν έναντι Gram-θετικών και αρνητικών βακτηρίων.



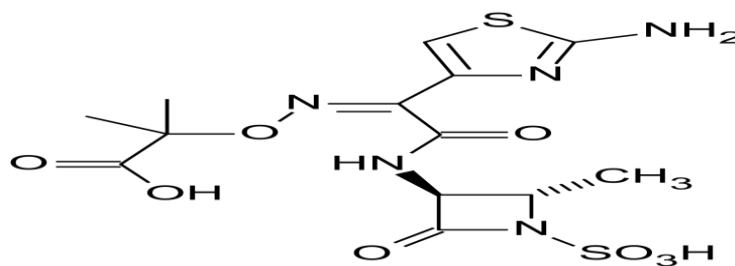
Εικόνα 8. Δομή πυρήνα πενικιλίνης από Yikrazuul - Own work. Licensed under Public Domain via Commons [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Penicillin\\_core.svg#/media/File:Penicillin\\_core.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Penicillin_core.svg#/media/File:Penicillin_core.svg)

β) **Κεφαλοσπορίνες:** Ο β-λακταμικός δακτύλιος συνδέεται με τον εξαμελή δακτύλιο της διυδροθειαζίνης, ο οποίος επιτρέπει τη γρηγορότερη είσοδο του αντιβιοτικού στο κύτταρο των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Έχουν ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα που περιλαμβάνει Gram θετικά και αρνητικά βακτήρια. Διακρίνονται σε τέσσερις γενεές. Οι κεφαλοσπορίνες πρώτης γενιάς δρουν έναντι Gram-θετικών κόκκων καθώς και ορισμένων Εντεροβακτηριακών συμπεριλαμβανομένων των *Klebsiella spp.* Οι κεφαλοσπορίνες δεύτερης γενιάς έχουν ευρύτερο φάσμα και δρουν έναντι των μικροοργανισμών που είναι ευάλωτοι και στις πρώτης γενιάς καθώς και έναντι άλλων (π.χ. *Providencia, Enterobacter spp.*). Οι κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς μπορούν να δράσουν έναντι των νοσοκομειακών Gram-αρνητικών βακτηρίων που έχουν αντοχή στις προηγούμενες γενιές κεφαλοσπορινών (π.χ. *Klebsiella spp.*). Η τέταρτη γενιά περιλαμβάνει τις νεότερες κεφαλοσπορίνες που δημιουργήθηκαν με τροποποιήσεις στις πλευρικές αλυσίδες της κεντρικής δομής των κεφαλοσπορινών (Εικόνα 9).



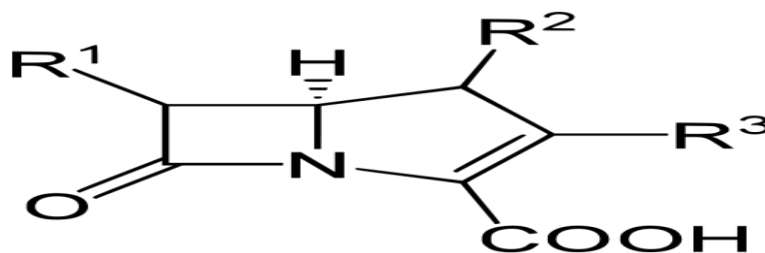
Εικόνα 9. Δομή πυρήνα κεφαλοσπορίνης από Fvasconcellos. Licensed under Public Domain via Commons – [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cephalosporin\\_core\\_structure.svg#/media/File:Cephalosporin\\_core\\_structure.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cephalosporin_core_structure.svg#/media/File:Cephalosporin_core_structure.svg)

γ) **Μονοβακτάμες:** Στο βασικό τους πυρήνα περιέχουν μόνο τον δακτύλιο της β-λακτάμης γεγονός που τις καθιστά σταθερές στην παρουσία των β-λακταμασών. Έχουν μικρή αντιμικροβιακή δράση. Η μοναδική μονοβακτάμη που χρησιμοποιείται είναι η αζθρεονάμη, η οποία συνδέεται μόνο με την πενικιλινοδεσμευτική πρωτεΐνη (penicillin binding protein, PBP) των Gram-αρνητικών βακτηρίων, γεγονός που την καθιστά μη δραστική έναντι των Gram-θετικών και αερόβιων βακτηρίων.



Εικόνα 10. Δομή αζτρεονάμης από :Mysid. Licensed under Public Domain via Commons - [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aztreonam\\_structure.svg#/media/File:Aztreonam\\_structure.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aztreonam_structure.svg#/media/File:Aztreonam_structure.svg)

δ) **Καρβαπενέμες:** Οι καρβαπενέμες αποτελούνται από ένα β-λακταμικό δακτύλιο, συμπυκνωμένο με ένα πενταμελή πεναμικό δακτύλιο. Η δομή τους τις καθιστά πολύ ανθεκτικές κατά των περισσοτέρων β-λακταμασών και έτσι αποτελούν χρήσιμο εργαλείο για τη θεραπεία λοιμώξεων από βακτήρια ανθεκτικά σε άλλα αντιβιοτικά. Έχουν ευρύ πεδίο δράσης και οι κυριότεροι εκπρόσωποι της ομάδας αυτής είναι η ιμιπενέμη και η μεροπενέμη. Θεωρούνται από τα αντιβιοτικά τελευταίας καταφυγής για πολλές βακτηριακές λοιμώξεις, συμπεριλαμβανομένων αυτών από *K. pneumoniae* (Εικόνα 11).<sup>50,51,52</sup>



Εικόνα 11. Δομή καρβαπενεμών από Yikrazuul - Own work. Licensed under Public Domain via Commons - [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Carbapenems\\_structure.svg#/media/File:Carbapenems\\_structure.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Carbapenems_structure.svg#/media/File:Carbapenems_structure.svg)

### 3.9 Θεραπευτικά σχήματα για την αντιμετώπιση της *Klebsiella pneumoniae*

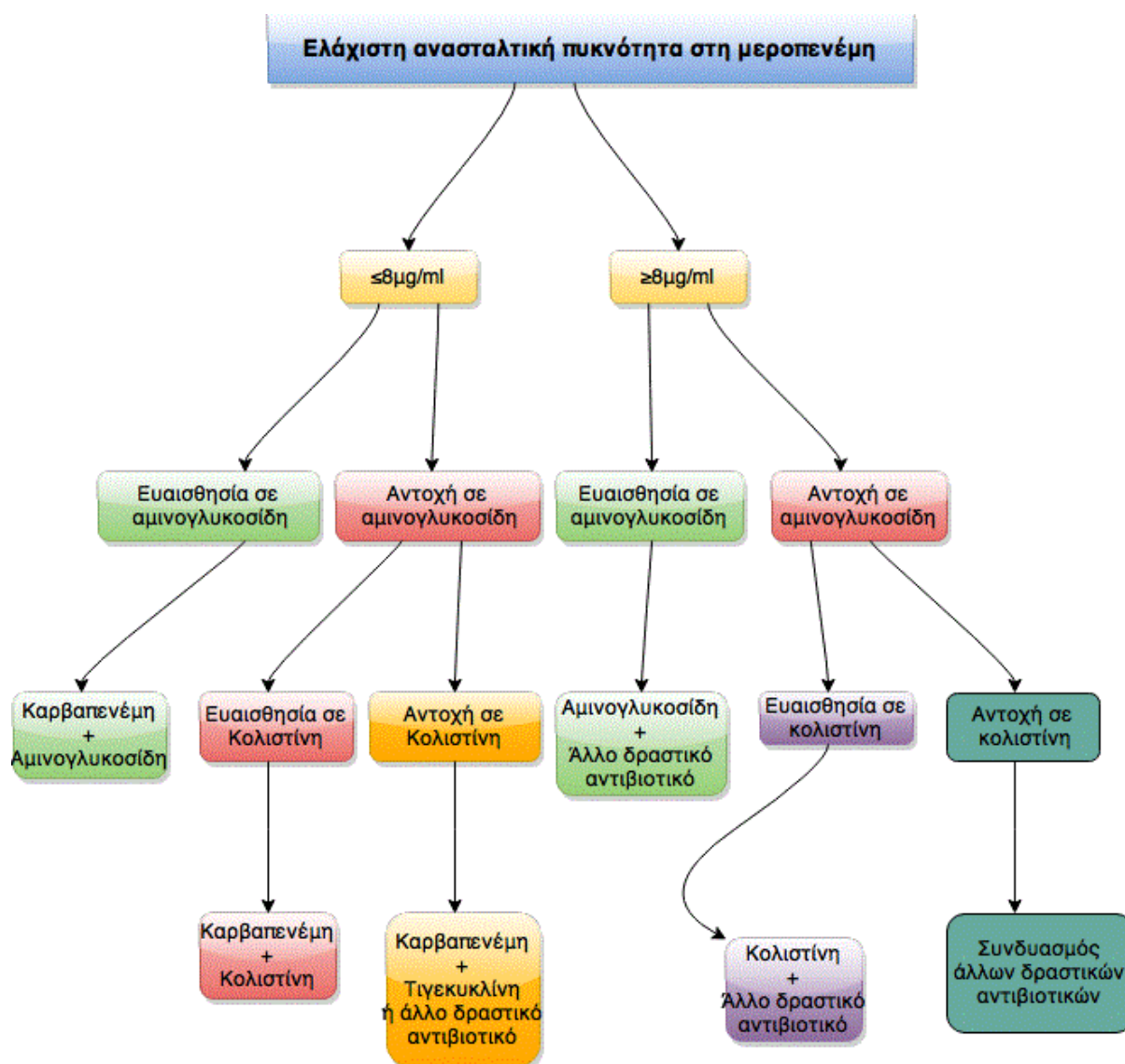
Η επιλογή του κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος θα πρέπει να καθοδηγείται πάντα από *in vitro* δοκιμασίες ευαισθησίας και η χρήση του κατάλληλου αντιβιοτικού εξαρτάται από τη διάγνωση (Πίνακας 10).

**Πίνακας 10: Θεραπευτικές επιλογές για την αντιμετώπιση λοιμώξεων από *Klebsiella pneumoniae***

Λοιμώξεις των ουροφόρων οδών χωρίς επιπλοκές
σουλφαμεθοξαζόλη - τριμεθοπρίμη κεφαλοσπορίνες (δεύτερης και τρίτης γενιάς) τετρακυκλίνες
Εναλλακτικά
αμινογλυκοσίδες αμοξικιλίνη /κλαβουλανικό οξύ αμπικιλίνη/σουλμπακτάμη
Άλλες λοιμώξεις
φλουοροκινολόνες κεφαλοσπορίνες (δεύτερης και τρίτης γενιάς)
Εναλλακτικά
αμινογλυκοσίδες ιμιπενέμη/σιλαστατίνη αζτρεονάμη κολιστίνη

Στα στελέχη που παράγουν ευρέος φάσματος β-λακταμάσες (Extended-Spectrum Beta-Lactamases, ESBL) αποφεύγονται οι κεφαλοσπορίνες, ενώ αυτά που παράγουν καρβαπενεμάσες (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, KPCs) είναι ανθεκτικά σε καρβαπενέμες, πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, φλουοροκινολόνες και αμινογλυκοσίδες.

Παρακάτω παρατίθεται ένας αλγόριθμος που ακολουθείται για τη θεραπεία λοιμώξεων από *K. pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάσες.<sup>53</sup>



Διάγραμμα 2: Σχηματική αναπαράσταση του αλγόριθμου που στη χρησιμοποιείται θεραπεία λοιμώξεων από *Klebsiella pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάσες

### 3.10 Επιδημιολογικά στοιχεία

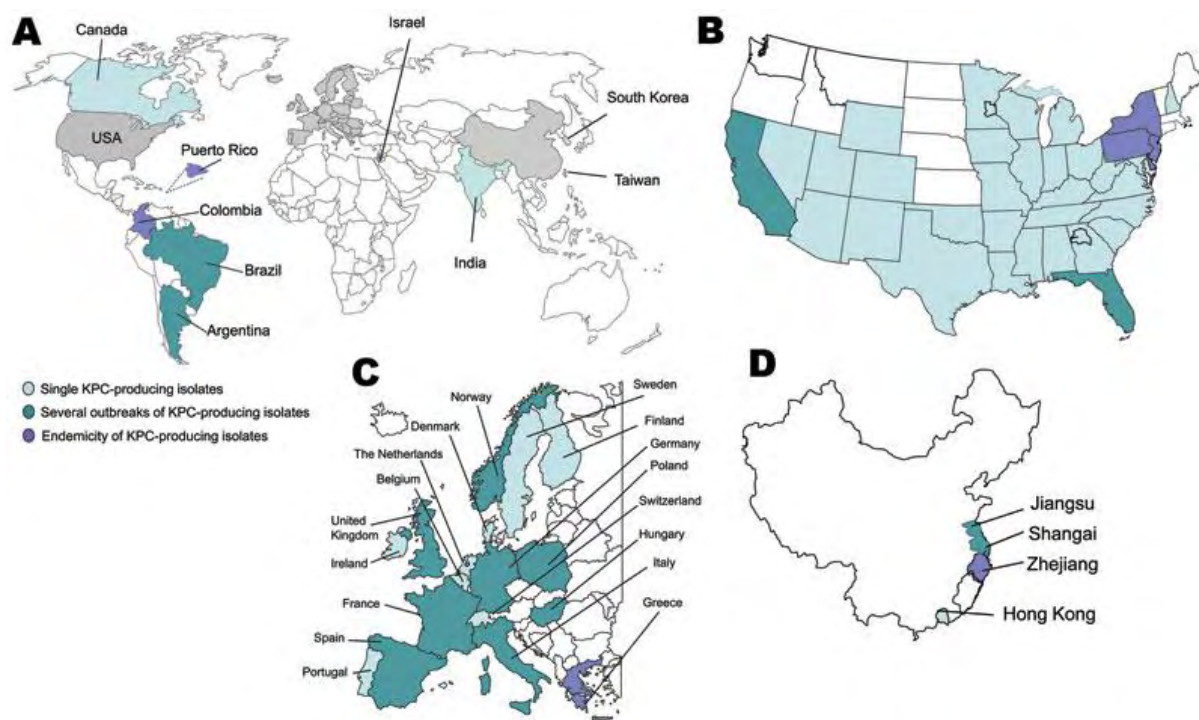
Τελευταία έχει παρατηρηθεί σημαντική αύξηση των λοιμώξεων από πολυανθεκτικά Gram-αρνητικά παθογόνα παγκοσμίως. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει προκαλέσει η ανάδυση Εντεροβακτηριακών στελεχών που παράγουν β-λακταμάσες (κυρίως VIM, IMP, NDM, KPC, και OXA-48) με υδρολυτικές ικανότητες έναντι όλων σχεδόν των β-λακταμικών αντιβιοτικών



συμπεριλαμβανομένων και των καρβαπενεμών. Η χώρα μας ανήκει στις γεωγραφικές περιοχές με τον υψηλότερο επιπολασμό λοιμώξεων από τέτοια στελέχη με κύριο εκπρόσωπο την *Klebsiella*, η οποία παράγει κυρίως καρβαπενεμάση τύπου KPC. Το φαινόμενο αυτό έχει προκαλέσει ιδιαίτερη ανησυχία, διότι τα εν λόγω στελέχη έχουν την ικανότητα να διασπείρονται ευρέως και να προκαλούν αυξημένη θνητότητα, ενώ οι θεραπευτικές επιλογές είναι λίαν περιορισμένες.

Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες που έχουν *in vitro* δραστικότητα έναντι των Εντεροβακτηριακών που παράγουν καρβαπενεμάσες (Carbapenemase Producing Enterobacteriaceae, CPE), είναι η κολιστίνη, η τιγκεκυκλίνη, η γενταμικίνη και η φθορομυκίνη.

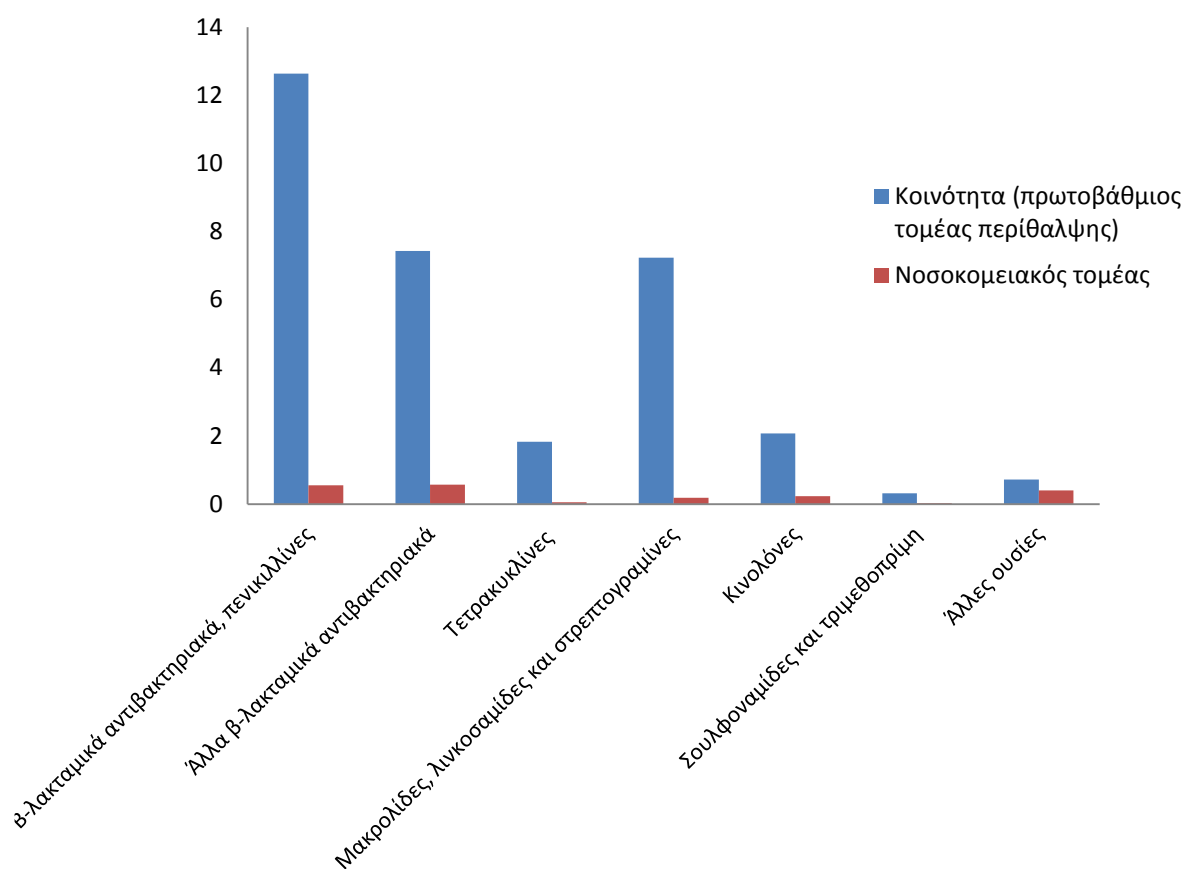
Η αντοχή στις καρβαπενεμές που αποδίδεται στα στελέχη *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing, KPC) έχει εξελιχθεί ραγδαία από το 2001. Η κατανομή αυτής της αντοχής ποικίλλει ουσιαστικά ανά γεωγραφικό διαμέρισμα. Παρότι τα KPC αναφέρονται στις περισσότερες χώρες ανά τον κόσμο, δύο αποκλίνουντα επιδημιολογικά πρότυπα παρατηρούνται: περιοχές που αναφέρουν ελάχιστα απομονωμένα στελέχη που παράγουν KPC (Αυστραλασία και Αφρική) και περιοχές όπου τα KPCs θεωρούνται πλέον ενδημικά (βορειοανατολικές ΗΠΑ, Πουέρτο Ρίκο, Ελλάδα, Επαρχία Τσετσιάνγκ της Κίνας και Ισραήλ) (Εικόνα 12).<sup>54</sup>



Εικόνα 12. Α) Παγκόσμια γεωγραφική κατανομή των στελεχών *Klebsiella pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες (KPC). Β) κατανομή στις ΗΠΑ C) κατανομή στην Ευρώπη D) κατανομή στην Κίνα

**Πίνακας 11: Κατανάλωση αντιβιοτικών στην Κοινότητα (πρωτοβάθμιος τομέας περίθαλψης) και στον Νοσοκομειακό τομέα εκφρασμένη σε καθορισμένη ημερήσια δόση (Defined Daily Dose, DDD) ανά 1000 κατοίκους και ανά μέρα το 2013 στην Ελλάδα.<sup>55</sup>**

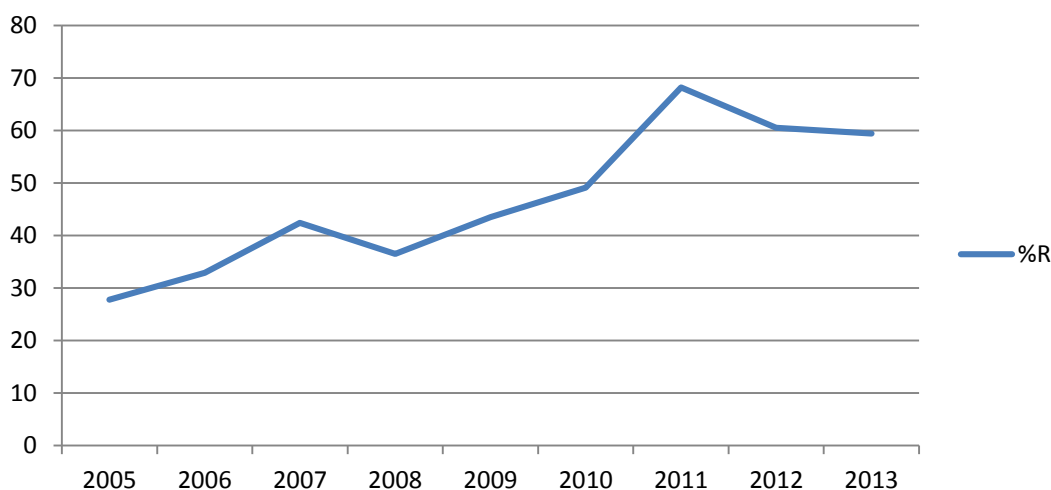
Αντιβιοτικά για συστηματική χρήση	Κοινότητα (πρωτοβάθμιος τομέας περίθαλψης)	Νοσοκομειακός τομέας
Β-λακταμικά αντιβιοτικά, πενικιλίνες	12.64	0.55
Άλλα β-λακταμικά αντιβιοτικά	7.43	0.57
Τετρακυκλίνες	1.83	0.05
Μακρολίδες, λινκοσαμίδες και στρεπτογραμίνες	7.23	0.18
Κινολόνες	2.07	0.23
Σουλφοναμίδες και τριμεθοπρίμη	0.32	0.02
Άλλες ουσίες	0.72	0.40
<b>Συνολικά</b>	<b>32.24</b>	<b>2.00</b>



Διάγραμμα 3: Αναπαράσταση σε γράφημα της κατανάλωσης αντιβιοτικών φαρμάκων στην Κοινότητα και στο Νοσοκομειακό τομέα

Πηγή : ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control)

### Αντοχή στις καρβαπενέμες (%R) στην Ελλάδα την περίοδο 2005-2013



Διάγραμμα 4: Αναπαράσταση σε γράφημα της αντοχής σε καρβαπενέμες την περίοδο 2005-2013

Πηγή : ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control)

### 3.11 Πολυμυξίνες

Τα τελευταία χρόνια, ο αυξανόμενος αριθμός των λοιμώξεων που οφείλονται σε πολυανθεκτικά στα αντιβιοτικά Gram-αρνητικά βακτήρια (MDR, multidrug-resistant), ιδιαίτερα των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες ειδών όπως το *Acinetobacter baumannii*, η *K. pneumoniae* και η *Escherichia coli*, σε συνδυασμό με την έλλειψη νέων αντιμικροβιακών παραγόντων με δράση έναντι των Gram-αρνητικών βακτηρίων, οδήγησε παγκοσμίως στην επαναχρησιμοποίηση των πολυμυξινών ως επιλογή θεραπείας τελευταίας καταφυγής.

Οι πολυμυξίνες είναι πολυκατιοντικά, κυκλικά, αντιμικροβιακά πολυπεπίδια, των οποίων, όπως προαναφέρθηκε, βιολογικός στόχος είναι η κυτταρική μεμβράνη (ή εσωτερική ή κυτταροπλασματική). Η διατάραξη της λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης οδηγεί στην καταστροφή του μικροβιακού κυττάρου, καθώς αυτή ελέγχει τη διαβίβαση διαφόρων μορίων από και προς το κυτταρόπλασμα μέσω της παθητικής διάχυσης και της ενεργού μεταφοράς. Ανακαλύφθηκαν το 1947 και συνιστούν μια ομάδα αντιβιοτικών που αποτελείται από 5 διαφορετικά χημικά συστατικά (πολυμυξίνες A-E). Μόνο η πολυμυξίνη B και η πολυμυξίνη E (κολιστίνη) χρησιμοποιήθηκαν στην ιατρική πρακτική .

Αυτά τα αντιβιοτικά χρησιμοποιήθηκαν εκτεταμένα για δεκαετίες σε παγκόσμια κλίμακα για τοπική χρήση. Ωστόσο, η παρεντερική χρήση αυτών των φαρμάκων εγκαταλείφθηκε για περισσότερο από 20 χρόνια στις περισσότερες χώρες, με εξαίρεση τη θεραπευτική αγωγή της κυστικής ίνωσης, εξαιτίας αναφορών κοινής και σοβαρής νεφροτοξικότητας και νευροτοξικότητας.<sup>56,57</sup>

### 3.11.1 Κολιστίνη

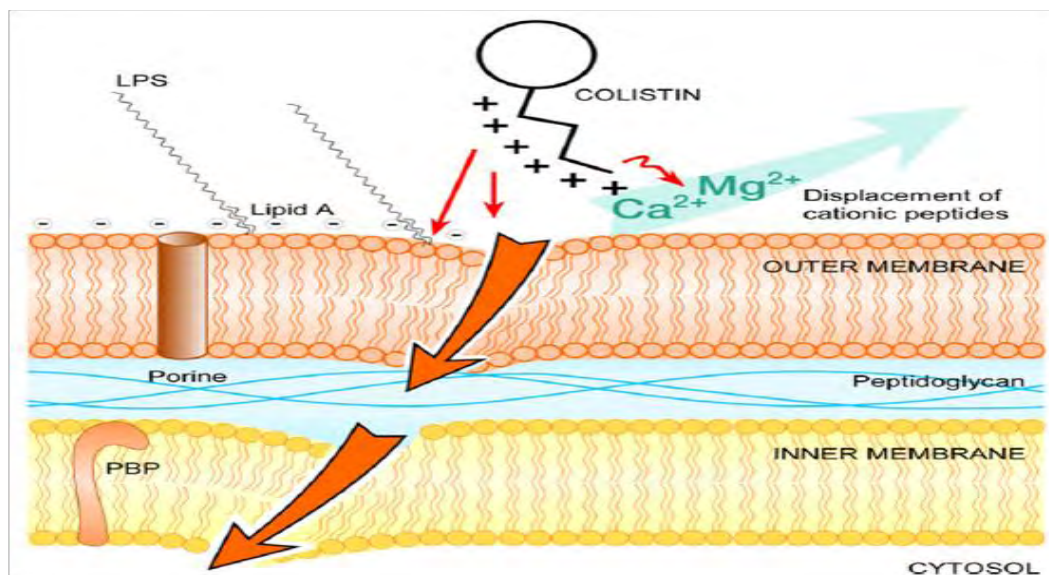
Η κολιστίνη ανακαλύφθηκε το 1949 και συντέθηκε μη ριβωσωμικά από τον *Bacillus polymyxa* υποείδος *colistinus* Koyama. Χρησιμοποιήθηκε αρχικά ως θεραπευτικό μέσο στην Ιαπωνία και την Ευρώπη τη δεκαετία του '50 και στις ΗΠΑ στη μορφή νατριούχου κολιστιμεθάτης το 1959. Ωστόσο, τα ενδοφλέβια σκευάσματα κολιστίνης και πολυμυξίνης Β εγκαταλείφθηκαν σταδιακά στα περισσότερα μέρη του κόσμου στις αρχές της δεκαετίας του '80 εξαιτίας των συχνών αναφορών περιστατικών νεφροτοξικότητας. Έτσι, η ενδοφλέβια χρήση της κολιστίνης περιορίστηκε κυρίως στη θεραπεία πνευμονικών λοιμώξεων οφειλόμενων σε πολυανθεκτικά (multidrug-resistant, MDR), Gram-αρνητικά βακτήρια σε ασθενείς με κυστική ίνωση.

Η κολιστίνη αποτελείται από ένα κυκλικό κατιονικό δεκαπεπτίδιο που συνδέεται με μια αλυσίδα λιπαρού οξέος μέσω ενός α-αμιδικού συνδέσμου. Το μοριακό της βάρος είναι 1750 Da. Τα αμινοξικά στοιχεία στο μόριο της κολιστίνης είναι τα: D-λευκίνη, L-θρεονίνη και L-α-γ-διαμινοβουτυτικό οξύ. Το τελευταίο συνδέεται με το κατάλοιπο λιπαρού οξέος, που έχει ταυτοποιηθεί ως 6-μέθυλ-οκτανοϊκό οξύ (κολιστίνη Α) ή 6-μέθυλ-επτανοϊκό οξύ (κολιστίνη Β). Διαφορετικά φαρμακευτικά σκευάσματα της κολιστίνης μπορεί να περιέχουν διαφορετικές ποσότητες δύο συστατικών (κολιστίνη Α ή Β).

Δύο μορφές κολιστίνης είναι εμπορικά διαθέσιμες, το θειικό άλας κολιστίνης και η νατριούχος κολιστιμεθάτη. Η νατριούχος κολιστιμεθάτη είναι λιγότερο ισχυρή και λιγότερο τοξική από το θειικό άλας κολιστίνης και παράγεται από την αντίδραση της κολιστίνης με φορμαλδεΰδη και διθειικό νάτριο. Το θειικό άλας κολιστίνης χορηγείται δια του στόματος (ταμπλέτες ή σιρόπι) για απολύμανση του εντέρου και τοπικά σε σκόνη για τη θεραπεία δερματικών λοιμώξεων βακτηριακής προέλευσης. Η νατριούχος κολιστιμεθάτη είναι διαθέσιμη σε παρεντερικά σκευάσματα και μπορεί να χορηγηθεί ενδοφλέβια, ενδομυϊκά, ή εισπνεύσιμη.

Ο στόχος της αντιμικροβιακής δράσης της κολιστίνης είναι, όπως προαναφέρθηκε, η βακτηριακή κυτταρική μεμβράνη. Η αρχική επαφή της κολιστίνης με τη βακτηριακή μεμβράνη πραγματοποιείται μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του κατιονικού πολυπεπτιδίου (κολιστίνη) και των ανιονικών λιποπολυσακχαριδικών μορίων (LPS) στην εξωτερική μεμβράνη των Gram-αρνητικών βακτηρίων, προκαλώντας διατάραξη της κυτταρικής μεμβράνης. Η κολιστίνη εκτοπίζει  $Mg^{+2}$  και  $Ca^{+2}$ , που φυσιολογικά σταθεροποιούν τα LPS μόρια, από τα αρνητικά φορτισμένα μόρια LPS, οδηγώντας σε τοπική διατάραξη της εξωτερικής μεμβράνης. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η αύξηση της διαπερατότητας του κυτταρικού φακέλου, η διαρροή του κυτταρικού περιεχομένου και, συνεπακόλουθα, ο κυτταρικός θάνατος.

Επιπροσθέτως της άμεσης αντιβακτηριδιακής δράσης, η κολιστίνη έχει επίσης ισχυρή δράση αντί-ενδοτοξίνης. Ως ενδοτοξίνη στα Gram-αρνητικά βακτήρια λειτουργεί και το λιπίδιο A, τμήμα των LPS μορίων, και έτσι η κολιστίνη προσδένεται και εξουδετερώνει τον LPS (Εικόνα 13).<sup>57</sup>



Εικόνα 13. Μηχανισμός δράσης της κολιστίνης

### 3.12 Μηχανισμοί αντοχής στις πολυμυξίνες στην *Klebsiella pneumoniae*

Η επαναχρησιμοποίηση των πολυμυξινών στην αντιμικροβιακή θεραπεία ακολουθήθηκε από μια αύξηση των αναφορών για αντοχή αρκετών Gram-αρνητικών βακτηρίων σε αυτή την κατηγορία φαρμάκων. Κάποια βακτήρια όπως η *K. pneumoniae*, το *Acinetobacter baumannii* και η *Pseudomonas aeruginosa* αναπτύσσουν αντοχή στις πολυμυξίνες με μια διαδικασία που αναφέρεται ως επίκτητη αντοχή, ενώ άλλα βακτήρια, όπως ο *Proteus spp.*, η *Serratia spp.* και η *Burkholderia spp.* έχουν ενδογενή αντοχή σε αυτά τα αντιβιοτικά.

Τα βακτήρια επιστρατεύουν αρκετά μέσα για να προστατευτούν από δυσμενή περιβαλλοντικά ερεθίσματα, όπως είναι τα κατιονικά αντιμικροβιακά πεπτίδια συμπεριλαμβανομένης της κολιστίνης και της πολυμυξίνης Β. Αυτές οι στρατηγικές περιλαμβάνουν μεταβολές των λιπολυσακχαριτών (LPSs), που έχουν αρνητικά φορτία και είναι πρωταρχικοί στόχοι των πολυμυξινών. Τέτοιες μεταβολές μπορούν να επιτευχθούν με ομοιοπολικές τροποποιήσεις του λιπιδίου Α, που αποτελεί τμήμα του LPS, μέσω της προσθήκης φωσφοαιθανολαμίνης (PEtN) και 4-άμινο-4-δεόξυ-L-αραβινόζης (L-Ara4N), απακυλίωσης, υδροξυλίωσης και προσθήκης παλμιτικού με *ragP* (η προσθήκη παλμιτικού δεν συνεισφέρει στην αντοχή στην πολυμυξίνη). Άλλες στρατηγικές περιλαμβάνουν τη χρήση αντλιών εκροής και το σχηματισμό κάψας.<sup>57</sup>

### 3.12.1 LPS τροποποιήσεις

Υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός ερευνών που διεξάγονται και έχουν ως στόχο τη διαλεύκανση της αντοχής στις πολυμυξίνες στην *K. pneumoniae*. Έχει βρεθεί σε ένα γενετικά μη χαρακτηρισμένο στέλεχος *K. pneumoniae* ανθεκτικό στις πολυμυξίνες, ότι οι φωσφορικές ομάδες του λιπιδίου A περιέχουν πέντε φορές περισσότερη 4-άμινο-4-δεόξυ-L-αραβινόζη (L-Ara4N) σε σχέση με το ευαίσθητο στις πολυμυξίνες στέλεχος. Αυτή η τροποποιημένη σύνθεση της εξωτερικής μεμβράνης μειώνει το αρνητικό της φορτίο οδηγώντας σε μειωμένη αλληλεπίδραση της μεμβράνης με τις πολυμυξίνες.

Μοριακός χαρακτηρισμός των δομικών μεταβολών των LPSs ανθεκτικών στις πολυμυξίνες στελεχών *K. pneumoniae* έδειξε την εμπλοκή των *phoP/phoQ* και *pmrA/pmrB* ρυθμιστικών συστημάτων. Έχει παρατηρηθεί ότι τα *phoP/phoQ* και *pmrA/pmrB* ρυθμιστικά συστήματα πλειορρυθμίζονται ύστερα από έκθεση στελεχών *K. pneumoniae* σε πολυμυξίνες, υποδηλώνοντας την εμπλοκή αυτών των συστημάτων στην αντοχή αυτών των βακτηρίων στη συγκεκριμένη κατηγορία αντιβιοτικών. Η συνεχής ενεργοποίηση του *pmrA/pmrB* συστήματος μπορεί να προκληθεί από παρανοηματικές μεταλλάξεις στο *pmrA* ή *pmrB* που οδηγούν επακόλουθα σε πλειορύθμιση του *pmrC* και του *arnBCADTEF* οπερονίου, καταλήγοντας στη σύνθεση και την προσθήκη φωσφοαιθανολαμίνης (PEtN) και 4-άμινο-4-δεόξυ-L-αραβινόζης (L-Ara4N) αντίστοιχα, στο λιπίδιο A. Ωστόσο, έχουν παρατηρηθεί και αρκετές συνώνυμες μεταλλάξεις στο *pmrA* ή *pmrB* που δεν είναι υπεύθυνες για αντοχή. Επίσης, έχουν παρατηρηθεί μεταλλάξεις και στα *phoQ* γονίδια σε ανθεκτικά στην κολιστίνη στελέχη *K. pneumoniae*.

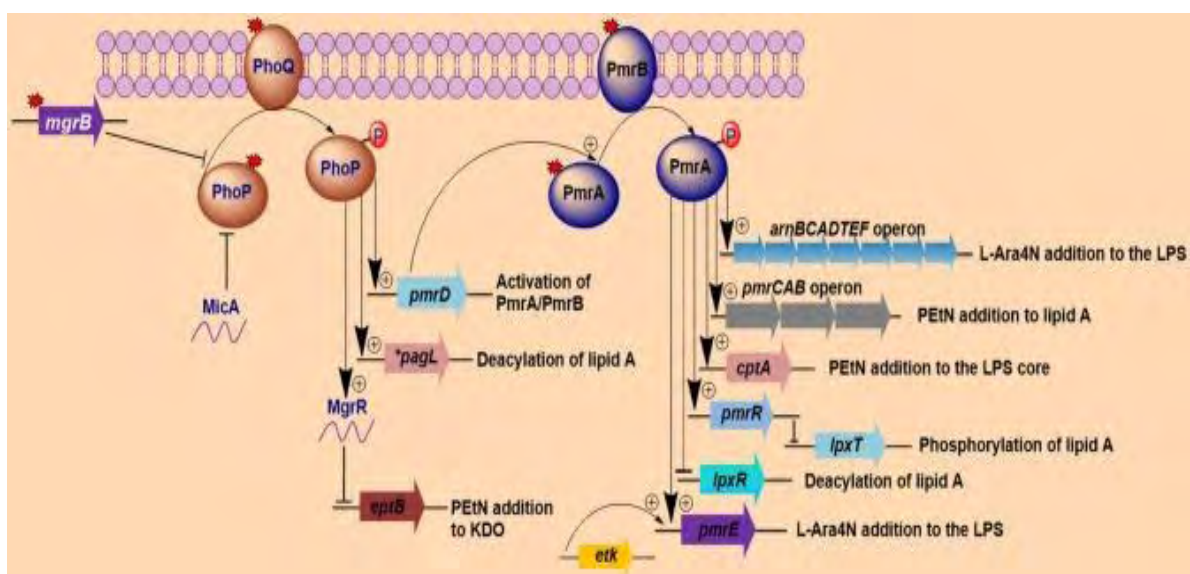
Ένας μοριακός μηχανισμός που οδηγεί σε αντοχή στην κολιστίνη στην *K. pneumoniae*, στον οποίο θα γίνει παρακάτω εκτενής αναφορά καθώς αποτελεί αντικείμενο αυτής της διπλωματικής, είναι η μετάλλαξη/απενεργοποίηση του *mgrB* γονιδίου. Γενικά, το *mgrB* γονίδιο κωδικοποιεί μια μικρή διαμεμβρανική πρωτεΐνη που ασκεί αρνητική ανάδραση στο PhoP/PhoQ ρυθμιστικό σύστημα. Η διατάραξη του *mgrB* γονιδίου μπορεί να συμβεί με διάφορους τρόπους, όπως είναι η ενθετική απενεργοποίησή του από ένα IS5-όμοιο στοιχείο αλλά και από άλλες αλληλουχίες ένθεσης. Άλλες μεταβολές που έχουν αναφερθεί είναι μια μη νοηματική μετάλλαξη του *mgrB* που προκαλεί τον πρόωρο τερματισμό της MgrB διαμεμβρανικής πρωτεΐνης αλλά και παρανοηματικές μεταλλάξεις που οδηγούν σε αμινοξικές αντικαταστάσεις. Αρκετές αλληλουχίες ένθεσης, όπως εκείνες των IS5-όμοιων, των IS903B, των IS17-όμοιων και των ISKpn14 στοιχείων που ανήκουν σε διάφορες IS οικογένειες (κυρίως στην IS5 οικογένεια), βρέθηκε ότι οδηγούν σε διακοπή του *mgrB*. Έχει παρατηρηθεί η μετάθεση στο χρωμόσωμα ενός IS5D-όμοιου στοιχείου, αρχικά εντοπισμένου στο

πλασμίδιο, και η επακόλουθη απενεργοποίηση του *mgrB*. Επίσης, έχουν αναφερθεί αρκετές αμινοξικές αντικαταστάσεις, όπως η C28F, σε ανθεκτική στην κολιστίνη *K. pneumoniae*.

Η διατάραξη του *mgrB* μπορεί να οδηγήσει σε πλειορύθμιση του *arnBCADTEF* οπερονίου που προσθέτει 4-άμινο-4-δεόξυ-L-αραβινόζη (L-Ara4N) στο λιπίδιο A. Η πλειορύθμιση του *arnBCADTEF* οπερονίου αποδίδεται στη φωσφορυλιωμένη PmrA, που ενεργοποιείται από την PmrD, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιείται από τη φωσφορυλίωση της PhoP που είναι απόρροια της διατάραξης της MgrB. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η ενεργοποιημένη PhoP μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει απευθείας το *arnBCADTEF* οπερόνιο στην *K. pneumoniae* ανεξάρτητα από τις ενεργοποιημένες πρωτεΐνες PmrD- και PmrA-, με ένα φαινόμενο που καλείται πρόσω-συνδετική θηλιά (feedforward connector loop, FCL).

Γενικά, έχει παρατηρηθεί ότι η μετάλλαξη/απενεργοποίηση του *mgrB* έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη αντοχή στην κολιστίνη μεταξύ των ανθεκτικών στελεχών *K. pneumoniae*, σε σχέση με τις μεταλλάξεις που αφορούν τα ρυθμιστικά συστήματα δύο στοιχείων (*pmrA/pmrB* ή *phoP/phoQ*), γεγονός που σημαίνει ότι το *mgrB* παίζει σπουδαίο ρόλο στην αντοχή στην πολυμυξίνη στην *K. pneumoniae* (Εικόνα 14).

Τέλος, έχει βρεθεί στην *K. pneumoniae* μια διαμεσολαβούμενη ρυθμιστική αλληλεπίδραση μεταξύ των συστημάτων PhoP/PhoQ και Rcs phosphorelay<sup>1</sup>. Μεταλλαγμένο *rscB* πλειορυθμίζει την έκφραση του *phoP/phoQ*, υποδηλώνοντας ότι το Rcs σύστημα φυσιολογικά μειορυθμίζει το *phoP/phoQ* ρυθμιστικό σύστημα. Αυτό σημαίνει ότι μια μετάλλαξη στο *rscB* μπορεί να έπαιξε κάποιο ρόλο στην αντοχή στις πολυμυξίνες, μέσω της πλειορύθμισης του *phoP/phoQ*, ωστόσο, αυτό μένει να αποδειχθεί με περαιτέρω πειράματα.<sup>57,58</sup>



Εικόνα 14. Ενεργοποίηση των γονιδίων που τροποποιούν τον λιποπολυσακχαρίτη και εμπλέκονται στην αντοχή στις πολυμυξίνες στα Gram-αρνητικά βακτήρια

### 3.12.2 Υποακυλίωση του λιπιδίου A και η επίδρασή της στην αντοχή στις πολυμυξίνες

Στην *K. pneumoniae*, το *lpxM* γονίδιο κωδικοποιεί το ένζυμο που συμμετέχει στην προσθήκη της μυριστόυλο-ομάδας (myristoyl group) στο λιπίδιο A, που έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του εξα-ακυλιωμένου λιπιδίου A. Ένα μεταλλαγμένο *lpxM* στην *K. pneumoniae* που παράγει κύρια πέντα-ακυλιωμένο λιπίδιο A βρέθηκε ότι είναι 8- με 16- φορές περισσότερο ευαίσθητο τόσο στην πολυμυξίνη B όσο και στην κολιστίνη σε σχέση με το φυσικού τύπου που έχει εξα-ακυλιωμένο λιπίδιο A. Επίσης, πειράματα έδειξαν ότι οι LPSs στελεχών *K. pneumoniae* που φέρουν το μεταλλαγμένο *lpxM* με MIC κολιστίνης της τάξης των 0.25 mg/L έχουν τέσσερις φορές υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης στις πολυμυξίνες σε σχέση με το φυσικού τύπου στέλεχος με MIC της τάξης των 4 mg/L.

Η υποακυλίωση πιστεύεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην αντοχή στις πολυμυξίνες στην *K. pneumoniae*, πιθανόν εξαιτίας της ανικανότητας της υποακυλιωμένης *K. pneumoniae* να πραγματοποιήσει την τροποποίηση της 4-άμινο-4-δεόξυ-L-αραβινόζης (L-Ara4N) του λιπιδίου A. Εναλλακτικά, έχει προταθεί ότι η αυξημένη ευαισθησία της υποακυλιωμένης *K. pneumoniae*, που έχει ως αποτέλεσμα λιγότερες άκυλο-αλυσίδες, οδηγεί σε ενισχυμένη ένθεση των πολικών κεφαλών ή των ουρών από λιπαρά οξέα των πολυμυξινών μέσα στις μεμβράνες και με αυτό τον τρόπο, σε υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης του λιπιδίου A με αυτά τα αντιβιοτικά.<sup>57</sup>

### 3.12.3 Άλλες τροποποιήσεις του LPS που συνδέονται με αντοχή στις πολυμυξίνες

Πρόσφατα, γενωμική ανάλυση ανθεκτικών στην κολιστίνη απομονωμένων στελεχών *K. pneumoniae*, αποκάλυψε ότι αυτά έφεραν οχτώ διακριτές μεταλλάξεις σε σύγκριση με ευαίσθητα στελέχη οι οποίες βρέθηκαν τόσο σε κωδικεύουσες όσο και σε μη-κωδικεύουσες περιοχές. Οι μεταλλάξεις ανιχνεύτηκαν σε γονίδια που κωδικοποιούν έναν microcin μεταφορέα<sup>ii</sup>, μια μεμβρανική πρωτεΐνη, μια πρωτεΐνη μεταφοράς και την ανθεκτική πρωτεΐνη σε μέθυλ βιολογόνο SmvA.

Άλλη μελέτη συγκριτικής γενωμικής ανάλυσης δύο ανθεκτικών σε κολιστίνη στελεχών *K. pneumoniae*, ταυτοποίησε μη συνώνυμες μεταλλάξεις στα γονίδια *waaL*, *rfaA* και *vacJ*. Τα τρία αυτά γονίδια είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στη βιοσύνθεση πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης. Ωστόσο, δεν είναι γνωστό κατά πόσο αυτά τα γονίδια ή οι μεταλλάξεις τους συμβάλλουν στην αντοχή στην κολιστίνη.

Συνολικά, η δράση των περισσότερων αυτών γονιδίων σχετίζεται με την εξωτερική μεμβράνη και οποιοδήποτε γονίδιο που λειτουργεί στην υπονόμευση της ακεραιότητας της



βακτηριακής εξωτερικής μεμβράνης μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στην αντοχή στις πολυμυξίνες. Συνεπώς, χρειάζεται μια πιο προσεκτική μελέτη των προαναφερθέντων γονιδίων.

#### 3.12.4 Ρόλος της κάψας στην αντοχή στις πολυμυξίνες

Έχει αναφερθεί ότι η *K. pneumoniae* είναι ικανή να αποβάλει καψικούς πολυσακχαρίτες (capsular polysaccharides, CPSs) από την επιφάνειά της. Οι απελευθερωμένοι CPSs είναι ικανοί να παγιδεύονται ή να προσδένονται στις πολυμυξίνες, μειώνοντας έτσι την ποσότητα του φαρμάκου που φτάνει στην επιφάνεια του βακτηριακού κυττάρου, οδηγώντας σε αυξημένη αντοχή στις πολυμυξίνες. Ο υποκείμενος μηχανισμός αποδίδεται σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κατιονικών πολυμυξινών και των ανιονικών CPSs.

Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι οι CPSs παίζουν άμεσο ρόλο στην αντοχή στα αντιμικροβιακά πεπτιδία, συμπεριλαμβανομένης της πολυμυξίνης B, με το να μειώνουν τις αλληλεπιδράσεις τους με τη βακτηριακή εξωτερική μεμβράνη, κυρίως μέσω της πλειορύθμισης των γονιδίων της καψιδιακής βιοσύνθεσης. Τα γονίδια CPS εξαρτώνται περαιτέρω από ένα κατώφλι βιοσύνθεσης CPS για αντοχή. Ωστόσο, ο ρόλος της κάψας στη μεσολάβηση αντοχής στις πολυμυξίνες είναι υπό συζήτηση. Υπάρχουν αρκετές μελέτες που ανέφεραν ότι η κάψα δε συνεισφέρει στην αντοχή έναντι αντιμικροβιακών πεπτιδίων, συμπεριλαμβανομένης της πολυμυξίνης B. Είναι ενδιαφέρον ότι το γονίδιο *ugd* έχει διττό ρόλο στη βιοσύνθεση των CPS και της 4-άμινο-4-δεόξυ-L-αραβινόζης (L-Ara4N) και η φωσφορυλίωσή του λειτουργεί σαν γέφυρα μεταξύ της καψικής σύνθεσης και της αντοχής στις πολυμυξίνες.<sup>57,59</sup>

#### 3.12.5 Ρόλος της αντλίας εκροής στην αντοχή στις πολυμυξίνες

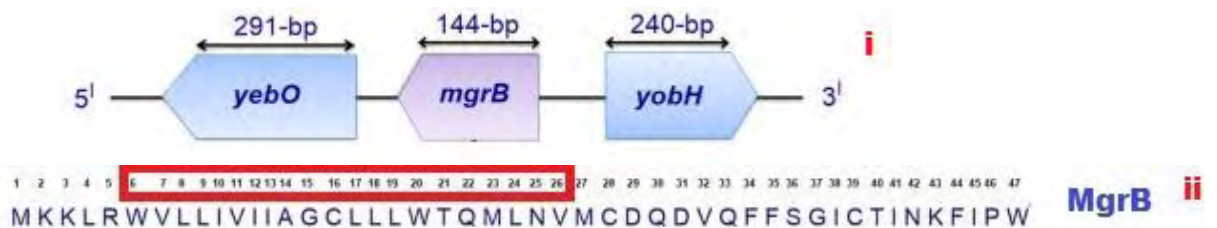
Κάποιες μελέτες έδειξαν ότι οι αντλίες εκροής μπορούν να συμβάλλουν στην αντοχή στις πολυμυξίνες. Οι αντλίες εκροής που μελετήθηκαν περιλαμβάνουν την AcrAB και KpnEF. Παρατηρήθηκε ότι στέλεχος *K. pneumoniae* με μετάλλαξη στο *acrB* είναι σημαντικά πιο ευαίσθητο σε σχέση με το φυσικού τύπου στέλεχος και η πολυμυξίνη B αντλείται έξω από την *K. pneumoniae* με έναν ενεργειακά εξαρτώμενο τρόπο. Άλλη μελέτη έδειξε ότι στέλεχος με μεταλλαγμένη KpnEF είναι περισσότερο ευαίσθητο σε αρκετά αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανομένης της κολιστίνης, σε σχέση με φυσικού τύπου στέλεχος *K. pneumoniae* και αυτό το μεταλλαγμένο στέλεχος επιδεικνύει δύο φορές μεγαλύτερη μείωση στην MIC

κολιστίνης σε σύγκριση με το φυσικού τύπου στέλεχος. Είναι ενδιαφέρον ότι το ίδιο μεταλλαγμένο *kpnEF* επιδεικνύει επίσης βλάβη στην καμική σύνθεση.<sup>5</sup>

### 3.13 Ο ρόλος του *mgrB* γονιδίου στην αντοχή στην κολιστίνη στην *Klebsiella pneumoniae*

#### 3.13.1 Το *mgrB* γονίδιο και η *MgrB* πρωτεΐνη

Το *mgrB* γονίδιο (γνωστό και ως *yobG*) είναι ένα συντηρημένο γονίδιο με ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης μήκους 141bp που κωδικοποιεί μια μικρή διαμεμβρανική πρωτεΐνη 47 αμινοξέων και μάζας 5,544 Da, την MgrB. Η διαμεμβρανική περιοχή περιλαμβάνει τα αμινοξέα των θέσεων 6-26. Η παραγωγή της MgrB πρωτεΐνης επάγεται με την ενεργοποίηση του PhoP/PhoQ συστήματος σηματοδότησης και αυτή η πρωτεΐνη ασκεί αρνητική ανάδραση στο ίδιο σύστημα αλληλεπιδρώντας απευθείας με τον PhoQ αισθητήρα κινάσης<sup>iii</sup> στο περιπλασμικό επίπεδο. Έχουν βρεθεί ομόλογα του *mgrB* σε πολυάριθμα είδη της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών και για κάθε υποψήφιο *mgrB* υπήρχε επίσης και ένα αντίστοιχο *phoP* και *phoQ* ορθόλογο<sup>iv</sup>, ενώ το αντίστροφο δεν φαίνεται να ισχύει (Εικόνα 15,16).<sup>57,60,61,62</sup>



Εικόνα 15. (i) Γενετική αναπαράσταση του *mgrB* γονιδίου και (ii) Παράθεση της φυσικού τύπου MgrB πρωτεΐνης της *K. pneumoniae*

<i>E. coli</i>	-----MKKFRWVVLVVVVLACLLLWAQVFNMMCDQD-VQFFSGICAINQFIPW----
<i>S. flexneri</i>	-----MKKFRWVVLVVVVLACLLLWAQVFNMMCDQD-VQFFSGICAINQFIPW----
<i>C. koseri</i>	-----MKKFRWVILIIIVALVCLLLWAQVFNIMCDQD-VQFFNGICAINKFIPIW----
<i>S. typhimurium</i>	-----MKKFRWVVLGIVVVVCLLLWAQVFNIMCDQD-VQFFSGICAINKFIPIW----
<i>E. sakazakii</i>	-----MKKFRWAILLAVLVACLLLWMTLNVMCDQD-VQFFSGICTINKFIPIW----
<i>K. pneumoniae</i>	-----MKKLRWVLLIVIIAGCLLLWTQMLNVMCDQD-VQFFSGICTINKFIPIW----
<i>Y. pestis</i>	--MLDLNITKLVTTVVIIAACLFLYLLALDSYCDQG-GTFSTGICAITTIVPW----
<i>P. luminescens</i>	-----MDIKKTIAILALLGICLFLYLLALDSYCDQG-EQFDGSGICSVTRYLPF----
<i>S. proteamaculans</i>	MRLLNLLRKKILVIIAFLAACLFYLLALDSYCDAG-GTFALGVCVTRFVPIW----
<i>P. penneri</i>	-----MNAKKIIISLIIALVITFGLYLVALDNFCDRG-EDFQQGLCRFTTLFPSKHH----
<i>P. stuartii</i>	-----MKYKLIIGVCIVITCIFYLLAMDSLCDQGGENFI FGICQITDLLPF----
	:: :: ** . * *:* .. *
<i>S. glossinidius</i>	-RNRVLKRGTMVKLIVILLCLAL LSVINSFCDDGGD-FFSGMCLVTK MPW----

Gap: "-" Internal Stop codon: "\*" "

Identity: "\*" Conservative Substitution: ":" Semi-conservative Substitution: "." "

Εικόνα 16. MgrB ομόλογα που ταυτοποιήθηκαν από γενωμικές αλληλουχίες διαφόρων γενών Enterobacteriaceae, Lipa, Goulian

### 3.13.2 Μηχανισμός λειτουργίας του *mgrB* γονιδίου και η σχέση του στην έκφραση αντοχής στην κολιστίνη σε *Klebsiella pneumoniae*

Όπως προαναφέρθηκε, το MgrB είναι ένα ευρέως συντηρημένο πεπτιδίο στα Εντεροβακτηριακά που συνιστά έναν κρίσιμο ενδιάμεσο της αρνητικής ανάδρασης στο PhoQ/PhoP κύκλωμα, που ελέγχει, μεταξύ άλλων, την τροποποίηση του LPS ο οποίος αποτελεί στόχο των πολυμυξινών. Αξίζει να σημειωθεί ότι η αρνητική ανάδραση διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην κυτταρική ρύθμιση και τη διατήρηση του ομοιοστατικού ελέγχου. Έτσι, η MgrB λειτουργεί σαν ένα σημείο ελέγχου που ενσωματώνει επιπρόσθετα εισαγωγικά σήματα για τη ρύθμιση της δραστηριότητας του σημαντικού συστήματος σηματοδότησης PhoP/PhoQ και ο μηχανισμός της αλληλεπίδρασής τους θα αναλυθεί παρακάτω.

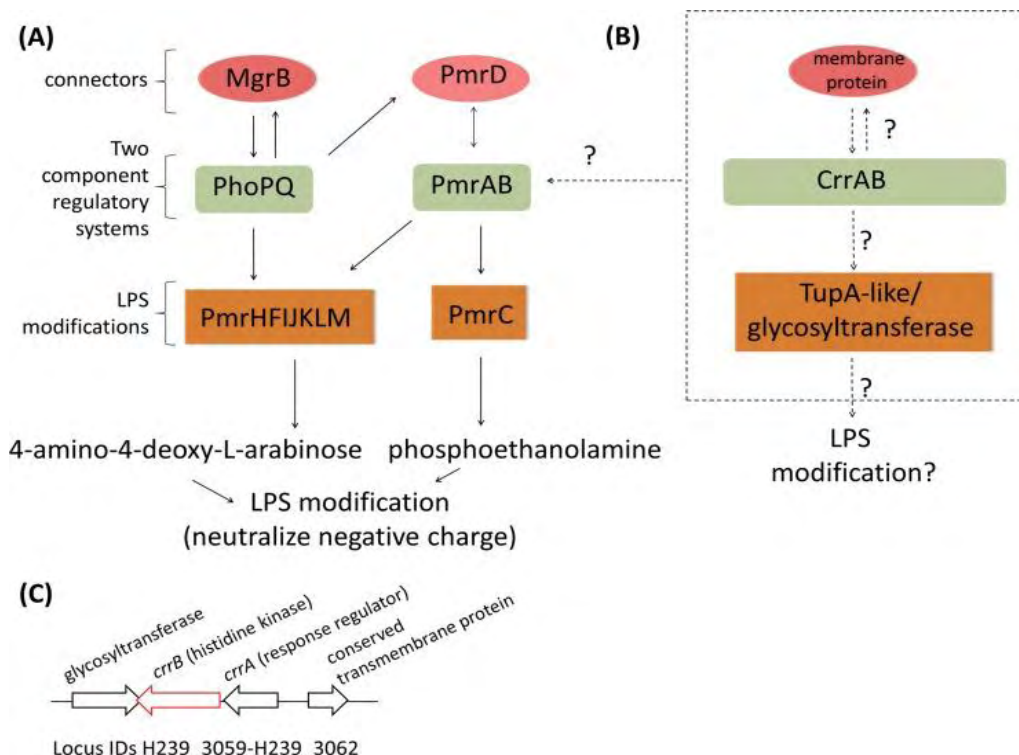
Τα βακτήρια αποικίζουν ποικιλία ενδιαιτημάτων με ανόμοιες περιβαλλοντικές συνθήκες και προκλήσεις για τον πολλαπλασιασμό. Συνεπώς, δεν αποτελεί έκπληξη ότι έχουν εξελίξει πληθώρα ρυθμιστικών κυκλωμάτων που τους επιτρέπει να προσαρμόζονται σε αυτά τα περιβάλλοντα. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι το σύστημα σηματοδότησης που ελέγχεται από τον αισθητήρα κινάσης PhoQ και το ρυθμιστή απόκρισης PhoP που εντοπίζεται στα Εντεροβακτηριακά. Αυτό το σύστημα των δύο-στοιχείων (two-component system, TCS) ενεργοποιείται από σήματα όπως χαμηλό εξωκυττάριο  $Mg^{2+}$ , όξινο pH (5.5) ή παρουσία κατιονικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων και οδηγεί στην έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν, μεταξύ άλλων, μεταφορείς  $Mg^{2+}$ , ένζυμα που τροποποιούν τον κυτταρικό φάκελο και επιφέρουν αντοχή σε κατιονικά μικροβιακά πεπτιδία, ένζυμα που μειώνουν το στρες που σχετίζεται με το χαμηλό pH καθώς και άλλους παράγοντες που ρυθμίζουν τη μολυσματικότητα πολυάριθμων Gram-αρνητικών βακτηρίων.

Ο αισθητήρας κινάσης PhoQ είναι μια εσωτερική μεμβρανική πρωτεΐνη της οποίας η περιπλαστική περιοχή συμμετέχει στην ανίχνευση σήματος και ενεργοποιείται παρουσία κάποιου εκ των προαναφερθέντων στρεσογόνων παραγόντων. Με την ενεργοποίησή του, μέσω αυτοφωσφορυλίωσης, ο PhoQ ενεργοποιεί τον PhoP με φωσφορυλίωση. Στη συνέχεια, ο PhoP ενεργοποιεί την έκφραση της *PmrHF IJKLM* απευθείας με πρόσδεση στον *pmrHF IJKLM* υποκινητή και εμμέσως μέσω *PmrD*- εξαρτώμενης ενεργοποίησης της *PmrA* πρωτεΐνης που επίσης προσδένεται στον *pmrHF IJKLM* υποκινητή.

Το *pmrHF IJKLM* οπερόνιο (που επίσης καλείται *pmrF*, *pdg* ή *arn* οπερόνιο) κωδικοποιεί ένζυμα υπεύθυνα για τη σύνθεση και τη μεταφορά 4-άμινο-4-δεόξυ-L-αραβινόζης (L-Ara4N). Η προσθήκη αυτού του κατιονικού προϊόντος (L-Ara4N) στο λιπίδιο A οδηγεί σε αντοχή στις πολυμυξίνες, καθώς τροποποιεί τον λιποπολυσακχαριδικό (LPS) τους στόχο.

Η MgrB πρωτεΐνη παράγεται με την ενεργοποίηση του PhoPQ συστήματος σηματοδότησης καθώς η φωσφορυλίωση του PhoP οδηγεί σε αυξημένη μεταγραφή του *mgrB* γονιδίου. Η MgrB εισάγεται στην εσωτερική μεμβράνη με το αμινοτελικό της άκρο στο κυτταρόπλασμα και το καρβοξυτελικό στο περίπλασμα και ρυθμίζει αρνητικά το PhoP/PhoQ σύστημα μέσω αλληλεπίδρασής της με την περιπλαστική επικράτεια του PhoQ. Φαίνεται ότι η MgrB καταστέλλει τη φωσφορυλίωση του PhoP είτε αναστέλλοντας την ενεργότητα της PhoQ κινάσης ή διεγείροντας την ενεργότητα φωσφατάσης. Είναι συνεπώς φανερό, ότι η MgrB πρωτεΐνη αποτελεί μέρος ενός αρνητικού βρόχου ανάδρασης στο PhoP/PhoQ σύστημα σηματοδότησης.

Αξίζει να σημειωθεί ότι πέρα από την εμπλοκή των PhoP/PhoQ και PmrA/PmrB συστημάτων δύο στοιχείων (two-component systems, TCS) στην αντοχή στην κολιστίνη στην *K. pneumoniae*, υπάρχουν ενδείξεις για τη συμμετοχή και ενός τρίτου που αποδίδεται με τον όρο CrrA/CrrB. Τα *crrAB* γονίδια φαίνεται να απαντώνται σε πολλά στελέχη *K. pneumoniae* (έχουν εντοπιστεί κυρίως σε στελέχη με ST258) ωστόσο, αν και δε φαίνεται να έχουν ξεκάθαρα ορθόλογα<sup>iv</sup> στην *E.coli* ή τη *Salmonella*, ορθόλογα αυτών των γονιδίων είναι παρόντα στα γονιδιώματα αρκετών άλλων Εντεροβακτηριακών, με διαφορετικό όμως γενωμικό περιεχόμενο σε σχέση με την *K. pneumoniae*. Πιστεύεται ότι η CrrAB πρωτεΐνη επάγει την έκφραση μιας όμοιας με γλυκοτρανσφεράση πρωτεΐνης, η οποία μεταφέρει κάποιο σάκχαρο στη φωσφορική ομάδα του λιπιδίου A μεταβάλλοντας έτσι τον LPS, ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός μένει να εξακριβωθεί. Το σημαντικό είναι ότι υπάρχει ένα συνονθύλευμα μηχανισμών που όμως οδηγούν σε έναν κοινό φαινότυπο και η εξακρίβωσή τους είναι πιθανόν εξέχουσας σημασίας για τη μελλοντική ανάπτυξη νέων κατιονικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων και μοριακών διαγνωστικών εργαλείων, καθώς ο στόχος δράσης τους μπορεί να ποικίλλει στα διάφορα βακτηριακά στελέχη (Εικόνα 17).<sup>62,63,64</sup>



Εικόνα 17. Μοντέλο των Col<sup>R</sup> μηχανισμών. (Α) Διάγραμμα γονιδίων που πιστεύεται ότι εμπλέκονται στην ανοχή στην κολιστίνη στα Gram-αρνητικά βακτήρια βάσει δημοσιευμένων ερευνών. (Β) Μοντέλο πρόσφατα ταυτοποιημένων πρωτεϊνών και πιθανών αλληλεπιδράσεων με μονοπάτια της Col<sup>R</sup> που έχουν περιγραφεί. (C) Τμήμα γονιδιώματος που περιέχει διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια (*crrAB* γονίδια)

### 3.13.3 Τρόποι μετάλλαξης/απενεργοποίησης του *mgrB* γονιδίου

Έχει αναφερθεί ότι η μετάλλαξη/απενεργοποίηση του *mgrB* γονιδίου είναι ένας συνηθισμένος μηχανισμός που παρέχει ανοχή στην κολιστίνη στην *K. pneumoniae*. Πειράματα έδειξαν διάφορες μη σιωπηλές μεταλλάξεις του *mgrB* που περιλαμβάνουν απενεργοποίησή του με διάφορες αλληλουχίες εισδοχής (Insertion sequences, ISs) όπως είναι τα IS5-όμοια, IS17-όμοια, IS903B και ISKpn κινητά στοιχεία, παρανοηματικές ή μη νοηματικές σημειακές μεταλλάξεις και μικρές ή μεγάλες απαλοιφές.

Ο πιο κοινός μηχανισμός των *mgrB* μεταλλάξεων στα στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες φαίνεται να είναι η απενεργοποίηση του *mgrB* από ενθετικές αλληλουχίες<sup>v</sup>, ιδίως των IS5-όμοιων στοιχείων, που συνηγορεί στην πιθανότητα ύπαρξης ενός σημείου υψηλής μεταλλακτικότητας (hot spot) για την ένθεση IS5 στο *mgrB*. Πράγματι, έρευνα έδειξε ότι η ένθεση IS5-όμοιων στοιχείων που ταυτοποιήθηκε στο *mgrB* γονίδιο διαφορετικών στελεχών, στόχευε πάντα στην ίδια θέση, ανάμεσα στα νουκλεοτίδια 74 και 75 και είχε πάντα τον ίδιο προσανατολισμό. Ωστόσο, IS5-όμοια στοιχεία έχουν παρατηρηθεί και σε άλλες θέσεις με διαφορετικούς προσανατολισμούς. Πειράματα έδειξαν ότι ο μηχανισμός ανοχής βασισμένος στην ενθετική απενεργοποίηση του *mgrB* ήταν σταθερός ακόμα και απουσία της επίδρασης του αντιβιοτικού.

Είναι αξιοσημείωτο ότι *in vitro* πειράματα ανταγωνισμού μεταξύ COL<sup>S</sup> (ευαίσθητων στην κολιστίνη) και COL<sup>R</sup> (ανθεκτικών στην κολιστίνη) στελεχών *K. pneumoniae* δεν έδειξε κάποιο βιολογικό κόστος σχετιζόμενο με την ενθετική απενεργοποίηση του *mgrB* γονιδίου, σε αντίθεση με ότι παρατηρήθηκε με τις *pmr* ή *lpx* μεταλλάξεις στο *Acinetobacter baumannii*. Θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί η πιθανή επίδραση της απενεργοποίησης του *mgrB* στη μολυσματικότητα και την ικανότητα εγκαθίδρυσης επίμονου αποικισμού στον άνθρωπο.<sup>63,65,66,67</sup>

## Σκοπός

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία είχε ως κύριο στόχο τη μελέτη του ρόλου του *mgrB* γονιδίου στην αντοχή των βακτηρίων *K. pneumoniae* στην κολιστίνη, διερευνώντας τυχόν συσχέτιση δομικών αλλαγών του γονιδίου με την έκφραση αντοχής.

Η τροποποίηση του *mgrB* γονιδίου στην *K. pneumoniae* φαίνεται ότι οδηγεί σε πλειορύθμιση του PhoP/PhoQ συστήματος μεταγωγής σήματος και του *pmrHFIJKLM* οπερονίου, που έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) με την προσθήκη της 4-άμινο-4-δεόξυ-L-αραβινόζης (L-Ara4N) στο λιπίδιο A, μειώνοντας έτσι τη συγγένεια των πολυμυξινών με τον LPS στόχο, καθώς δημιουργείται ένας πιο θετικά φορτισμένος λιποπολυσακχαρίτης.

Τα βασικά βήματα που ακολουθήθηκαν για τη μελέτη έχουν ως εξής:

- επιλογή στελεχών *K. pneumoniae* που απομονώθηκαν από ασθενείς που νοσηλεύτηκαν στο ΠΓΝ Λάρισας το 2012
- έλεγχος αντοχής σε αντιβιοτικά
- καλλιέργεια
- απομόνωση DNA
- διερεύνηση ύπαρξης γονιδίων που κωδικοποιούν τόσο τις μέταλλο-β-λακταμάσες τύπου VIM όσο και τις KPC καρβαπενεμάσες με μοριακές μεθόδους (PCR)
- μοριακή τυποποίηση για το χαρακτηρισμό στελεχών *K. pneumoniae* (MLST)
- ενίσχυση του *mgrB* γονιδίου με PCR
- αλληλούχιση του *mgrB* (sequencing)
- ερμηνεία των αποτελεσμάτων

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



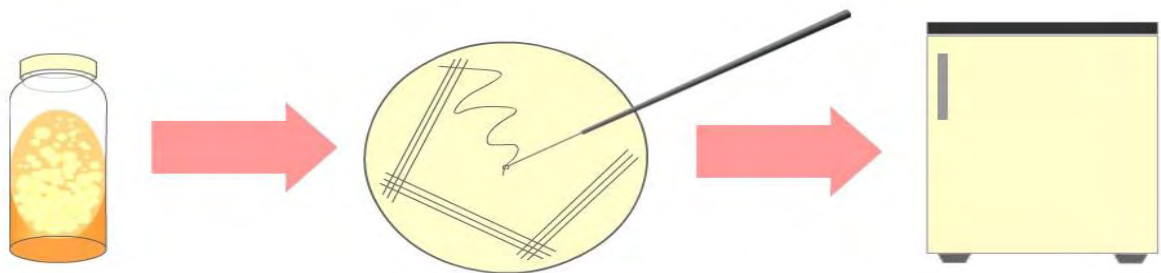
## 1. Υλικά και μέθοδοι

### 1.1 Βακτηριακά στελέχη *Klebsiella pneumoniae*

Το πειραματικό υλικό συνίστατο από φυλαγμένα στελέχη *Klebsiella pneumoniae* ανθεκτικά στην κολιστίνη που απομονώθηκαν στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (ΠΓΝΛ) το 2012. Η συντήρηση των στελεχών *K.pneumoniae* γινόταν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  σε ζωμό brain-heart infusion εμπλουτισμένο με 15% γλυκερόλη και προήλθαν από δείγματα αίματος, ούρων, πτυέλων, τραυμάτων, κατάκλισης, βρογχικών εκκρίσεων, δερματικών βλαβών, τραυμάτων, άκρου καθετήρα, κοπράνων και Κ.Φ.Γ.

### 1.2 Καλλιέργεια στελεχών *Klebsiella pneumoniae*

Οι καλλιέργειες των στελεχών *K. pneumoniae* έγιναν σε τρυβλία Petri με θρεπτικό υπόστρωμα MacConkey άγαρ και μετά τον εμβολιασμό ακολουθούσε επώαση για 24 ώρες σε επωαστικό κλίβανο με θερμοκρασία  $37^{\circ}\text{C}$  (Εικόνα 18).



Εικόνα 18. Τυπική εικόνα καλλιέργειας *K. pneumoniae*

## 1.3 Έλεγχος αντοχής στα αντιβιοτικά

### 1.3.1 Διάχυση δίσκων (Kirby - Bauer)

Συνιστά την πιο διαδεδομένη μέθοδο για τον έλεγχο της ευαισθησίας. Σε τρυβλίο με θρεπτικό άγαρ ενοφθαλμίζεται ομοιόμορφα προτυποποιημένη ποσότητα του εξεταζόμενου μικροβίου. Στη συνέχεια τοποθετούνται στην επιφάνεια του θρεπτικού άγαρ, ειδικοί δίσκοι από διηθητικό χαρτί εμποτισμένοι με γνωστές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών. Κατά την επώαση του τρυβλίου τα αντιβιοτικά διαχέονται από τους δίσκους στο άγαρ. Η συγκέντρωση του αντιβιοτικού μειώνεται όσο αυξάνεται η απόσταση διάχυσής τους από τους δίσκους. Εάν το αντιβιοτικό είναι δραστικό έναντι του μικροβίου, μετά τον προκαθορισμένο χρόνο επώασης, γύρω από το δίσκο σχηματίζεται μια ζώνη αναστολής της ανάπτυξης του μικροβίου. Η διάμετρος της ζώνης συγκρίνεται με προτυποποιημένες διαμέτρους που υπάρχουν σε πίνακες αναφοράς και ο μικροοργανισμός χαρακτηρίζεται ως: ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΣ – ΜΕΤΡΙΩΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΣ – ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΣ.<sup>73</sup>

### 1.3.2 Ταινίες διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικού (E-test)

Μια πιο εξελιγμένη μέθοδος διάχυσης είναι το E – Test που επιτρέπει τον υπολογισμό της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (MIC, Minimal Inhibitory Concentration), δηλαδή της μικρότερης συγκέντρωσης αντιβιοτικού που αναστέλλει την ορατή ανάπτυξη του υπό εξέταση βακτηρίου. Πάνω στο άγαρ στο οποίο ενοφθαλμίζεται το μικρόβιο τοποθετείται πλαστικοποιημένη ταινία εμποτισμένη με διαβάθμιση συγκεντρώσεων του αντιβιοτικού. Με τη μέθοδο αυτή η MIC αντιστοιχεί στο σημείο που αρχίζει η αναστολή της ανάπτυξης του βακτηρίου και διαβάζεται εύκολα στην κλίμακα συγκεντρώσεων που είναι τυπωμένη πάνω στην ταινία.<sup>73</sup>

### 1.3.3 Έλεγχος ευαισθησίας με το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek-2 (BioMerieux)

Το αυτόματο σύστημα ταυτοποίησης μικροβίων-παροχής αντιβιογράμματος με τη μέθοδο MIC (Vitek 2, BioMerieux) αποτελεί ένα καινοτόμο σύστημα για γρήγορη και ακριβή μικροβιακή ταυτοποίηση αλλά και για τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά με το λιγότερο χρόνο επεξεργασίας. Σε αυτό εμπεριέχεται μια διευρυμένη βάση ταυτοποίησης και μια αυτοματοποιημένη πλατφόρμα για γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα. Το μηχάνημα δίνει τη δυνατότητα ανάλυσης MIC και ανίχνευσης φαινοτύπων για τους περισσότερους μικροοργανισμούς.<sup>74</sup>

## 1.4 Απομόνωση DNA

### 1.4.1 Υλικά και Εξοπλισμός:

- i. εναιώρημα αποικιών *K. pneumoniae*
- ii. αυτόματες πιπέτες
- iii. φυγόκεντρος
- iv. vortex
- v. στήλη Zymo-Spin™ Column
- vi. σωληνάκι περισυλλογής Collection Tube
- vii. σωληνάκι μικροφυγοκέντρωσης (microcentrifuge tube)
- viii. Genomic Lysis Buffer
- ix. DNA Pre-Wash Buffer
- x. gDNA Wash Buffer
- xi. Elution Buffer

### 1.4.2 Διαδικασία

Η απομόνωση του βακτηριακού DNA έγινε με χρήση του kit Quick-gDNA™ MiniPrep της εταιρείας Zymo Research.

Το πρωτόκολλο που έπεται σχεδιάστηκε για μέχρι 200μl δείγματος βιολογικού υγρού και κυτταρικών εναιωρημάτων που περιέχουν λιγότερα από  $5,0 \times 10^6$  κύτταρα, καθώς και λυμάτων (κυττάρων) που έχουν εξαχθεί από δείγματα ύστερα από πέψη με πρωτεΐνάση K.

Εν προκειμένω, χρησιμοποιήθηκε εναιώρημα αποικιών *K. pneumoniae* σε Water for Injection το οποίο φωτομετρήθηκε ώστε η θολρότητα να είναι ~2 McFarland.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν έχουν ως εξής :

1. Προσθήκη 800μl Genomic Lysis Buffer σε 200μl υγρού δείγματος. Σύντομη ανάδευση στο vortex και το δείγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10 λεπτά.
2. Μεταφορά του μείγματος σε μια στήλη Zymo-Spin™ Column τοποθετημένη σε ένα σωληνάκι περισυλλογής Collection Tube. Φυγοκέντρωση στις 10,000 στροφές για ένα λεπτό. Απόρριψη του υγρού που εισέρευσε από τη στήλη (flow through) μαζί με το σωληνάκι περισυλλογής.
3. Μεταφορά της στήλης Zymo-Spin™ Column σε ένα νέο σωληνάκι περισυλλογής (Collection Tube). Προσθήκη 200μl DNA Pre-Wash Buffer στη στήλη περιστροφής (Spin Column). Φυγοκέντρωση στις 10,000 στροφές για 1 λεπτό.
4. Προσθήκη 500μl gDNA Wash Buffer στη στήλη περιστροφής (Spin Column). Φυγοκέντρωση στις 10,000 στροφές για 1 λεπτό.

5. Μεταφορά της στήλης περιστροφής σε ένα καθαρό σωληνάκι μικροφυγοκέντρησης (microcentrifuge tube). Προσθήκη  $\geq 50\mu\text{l}$  DNA Elution Buffer ή νερού στη στήλη περιστροφής. Επώαση 2-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα για 30 δευτερόλεπτα ώστε να εκλουστεί το DNA. Το εκλουσμένο DNA μπορεί είτε να χρησιμοποιηθεί άμεσα για μοριακές εφαρμογές ή να αποθηκευτεί στους  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  για μελλοντική χρήση.

## 1.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

### 1.5.1 Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση είναι το φαινόμενο της κίνησης χημικών ενώσεων (κυρίως πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων) μέσα σε ένα πήκτωμα (gel) με την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η κίνηση των ουσιών μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από το ηλεκτρικό φορτίο και το μοριακό βάρος των ουσιών.

Δείγμα βιολογικού υγρού τοποθετείται σε ηλεκτρικό πεδίο που προκαλεί την κίνηση των φορτισμένων ουσιών του προς την άνοδο ή την κάθοδο ανάλογα με το ηλεκτρικό φορτίο τους. Η κατεύθυνση της κίνησης εξαρτάται από το ηλεκτρικό φορτίο της ένωσης και η ταχύτητα τους από το βάρος ή το μέγεθος κάθε ουσίας.

Η καθιερωμένη τεχνική για το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση, την απομόνωση και τον καθαρισμό κομματιών DNA είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η αγαρόζη είναι πολυσακχαρίτης υψηλού μοριακού βάρους, που αποτελείται από D-γαλακτόζη και από ομάδες της 3,6-ανυδρο-L-γαλακτόζης.

Η ταχύτητα μετακίνησης του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται από: το μοριακό μέγεθος του DNA, τη συγκέντρωση αγαρόζης, τη μορφή του DNA, την τάση του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού ρεύματος και τις χρωστικές που ενσωματώνονται στο DNA.

### 1.5.2 Υλικά και Εξοπλισμός:

- xii. σκόνη αγαρόζης
- xiii. φαρμακευτικός ζυγός
- xiv. διάλυμα TBE 0,5x ή διάλυμα TAE 1x
- xv. συσκευή ηλεκτροφόρησης
- xvi. αυτόματες πιπέτες
- xvii. δείκτης γνωστών μοριακών βαρών GeneRuler 100bp DNA Ladder, 0.1μg/μl, Fermentas
- xviii. χρωστική 6x DNA loading dye

- xix. τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας UV
- xx. διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου, EtBr 10mg/ml
- xxi. Water for Injection

### 1.5.3 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης (gel) και ηλεκτροφόρηση του δείγματος

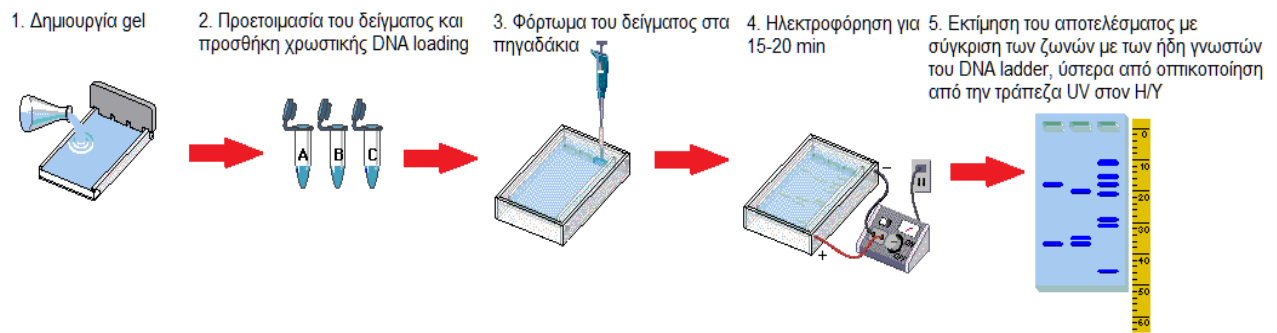
**Πίνακας 12: Υλικά για την παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων TBE και TAE**

TBE (μεγάλο gel 1% αγαρόζη)	TAE (μικρό gel 1% αγαρόζη)
150ml TBE 0,5%	50ml TAE 0,5%
1,5gr αγαρόζη	0,5gr αγαρόζη
8-10μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr)	3-4μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr)

Σε κωνική φιάλη διαλύεται αγαρόζη στο επιλεγμένο ρυθμιστικό διάλυμα TBE ή TAE και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 5 λεπτά, μέχρι να προκύψει ένα διαυγές διάλυμα. Προστίθεται το βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση των τμημάτων DNA στο πήκτωμα αγαρόζης καθώς αυτό έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φωσφορίζει κάτω από την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Το μείγμα αφήνεται να κρυώσει και έπειτα εκχύεται στο εκμαγείο τοποθετώντας και την ειδική χτένα για το σχηματισμό των φρεατίων. Όταν σταθεροποιηθεί αφαιρείται η χτένα και το πήκτωμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης με τα φρεάτια προς τον αρνητικό πόλο.

Η συσκευή ηλεκτροφόρησης πληρείται με ρυθμιστικό διάλυμα TBE ή TAE (σε αντιστοιχία με το gel που χρησιμοποιήθηκε) μέχρι τέλειας κάλυψης του πηκτώματος. Στη συνέχεια 3μl από κάθε δείγμα (DNA από extraction ή PCR), που έχουν προηγουμένως αναμιχθεί με 1μl χρωστικής 6x DNA loading dye, φορτώνονται με τη σειρά στα πηγαδάκια του πηκτώματος. Σε ένα πηγαδάκι ο μάρτυρας μοριακού βάρους (GeneRuler 100bp DNA Ladder, 0.1μg/μl, Fermentas) που περιέχει τμήματα DNA γνωστού μεγέθους. Τα δείγματα με το μάρτυρα ηλεκτροφορούνται για 15-20 λεπτά.

Τέλος, όταν η διαδικασία ολοκληρωθεί, το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται σε τράπεζα εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας και το DNA οπτικοποιείται με τη μορφή ζωνών γεγονός που οφείλεται, στη δέσμευση του βρωμιούχου αιθιδίου. Ακολουθεί φωτογραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια του προγράμματος Gel Capture και αποθήκευσή τους σε αρχείο στον υπολογιστή (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. Τα βήματα που ακολουθούνται για την ηλεκτροφόρηση δειγμάτων

## 1.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction)

### 1.6.1 Αρχή της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ανακαλύφθηκε το 1983 από τον Kary Mullis, για την οποία και του απονεμήθηκε το Νόμπελ Χημείας το 1993. Η αρχή της PCR (συμβατική PCR) συνοψίζεται στην *in vitro* ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA, με τη χρήση διαδοχικών μεταβολών θερμοκρασίας. Απαραίτητα στοιχεία για την πραγματοποίηση της αντίδρασης, εκτός από το αρχικό DNA που θα χρησιμοποιηθεί σαν εκμαγείο για την παρασκευή αντιγράφων, είναι η DNA πολυμεράση, μείγμα δεοξυνουκλεοτιδίων, ένα ζευγάρι εκκινητών που καθορίζουν και το μέγεθος των αντιγράφων DNA καθώς και ένα ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει στοιχεία που βελτιστοποιούν την αντίδραση και τη δράση του ενζύμου.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε αυτόματους θερμικούς κυκλοποιητές που μεταβαίνουν αυτόματα στις καθορισμένες επιθυμητές θερμοκρασίες κάθε κύκλου. Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται κάθε φορά ποικίλλουν ανάλογα με τις απαιτήσεις του ενζύμου, τη δομή και το μέγεθος του DNA που χρησιμοποιείται σαν εκμαγείο, καθώς και τις βέλτιστες συνθήκες πρόσδεσης του εκκινητή. Ωστόσο, ένα γενικό πρωτόκολλο εργασίας της συμβατικής τεχνικής PCR περιλαμβάνει:

1. Αποδιάταξη αρχικού δείγματος (denaturation): Το μείγμα θερμαίνεται αρχικά στους 95°C για ~15 λεπτά, ώστε να αποδιαταχθεί το DNA με τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου και την καταστροφή των δευτεροταγών και τριτοταγών δομών και η διπλή έλικα να ανοίξει σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες.
2. Υβριδισμός (annealing): Η θερμοκρασία μειώνεται μεταξύ 50 και 70°C για 30-60 δευτερόλεπτα, ώστε να γίνει η πρόσδεση των εκκινητών στο μονόκλωνο DNA-εκμαγείο στο 3' άκρο κάθε αλυσίδας. Η θερμοκρασία ποικίλλει ανάλογα με τη βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών, η οποία για μήκος ~20 βάσεων προσεγγίζεται θεωρητικά από τον τύπο :  $T_m = (A+T) \times 2 + (G+C) \times 4$ .

3. Προέκταση (extension) ή επιμήκυνση (elongation): Η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C, που είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για την θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, όπου γίνεται και η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA χρησιμοποιώντας δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) του διαλύματος. Ο χρόνος επώασης σε αυτό το στάδιο είναι 1-3 λεπτά και εξαρτάται από το μέγεθος του DNA που είναι υπό πολλαπλασιασμό.

4. Αποδιάταξη προϊόντων: Η θερμοκρασία αυξάνεται στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα, ώστε τα μικρά τμήματα δίκλωνου DNA που δημιουργήθηκαν, να αποχωριστούν πάλι και να αποτελέσουν εκμαγεΐα για τον επόμενο κύκλο σύνθεσης DNA.

Επαναλαμβάνονται 24-40 κύκλοι των σταδίων 2-4. Η χρονική διάρκεια προέκτασης του τελευταίου κύκλου είναι ~10 λεπτά, ώστε να υπάρχει χρόνος για την επέκταση όλων των προϊόντων από τη θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (Εικόνα 20).<sup>68</sup>

### 1.6.2 Υλικά και Εξοπλισμός

- i. DNA (απομονωμένο από Col<sup>R</sup> στελέχη *K. pneumoniae* με τη διαδικασία που προαναφέρθηκε)
- ii. eppendorfs
- iii. αυτόματες πιπέτες
- iv. αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O
- v. ρυθμιστικό διάλυμα (buffer)
- vi. MgCl<sub>2</sub>
- vii. dNTPs (δεοξυνουκλεοτίδια)
- viii. εκκινητές (primers, forward και reverse)
- ix. Taq πολυμεράση
- x. Φυγόκεντρος
- xi. συσκευή Vortex
- xii. θερμοκυκλοποιητής

### 1.6.3 Διαδικασία

Για την αντίδραση PCR προετοιμάστηκε ένα διάλυμα (mastermix) που περιείχε αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O, ρυθμιστικό διάλυμα (buffer), MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, το ζεύγος εκκινητών (forward, reverse) και Taq πολυμεράση. Εν συνεχεία, το διάλυμα μοιράστηκε σε eppendorfs από 22,5μl στο καθένα και προστέθηκε 2,5μl DNA από κάθε δείγμα απομονωμένου DNA

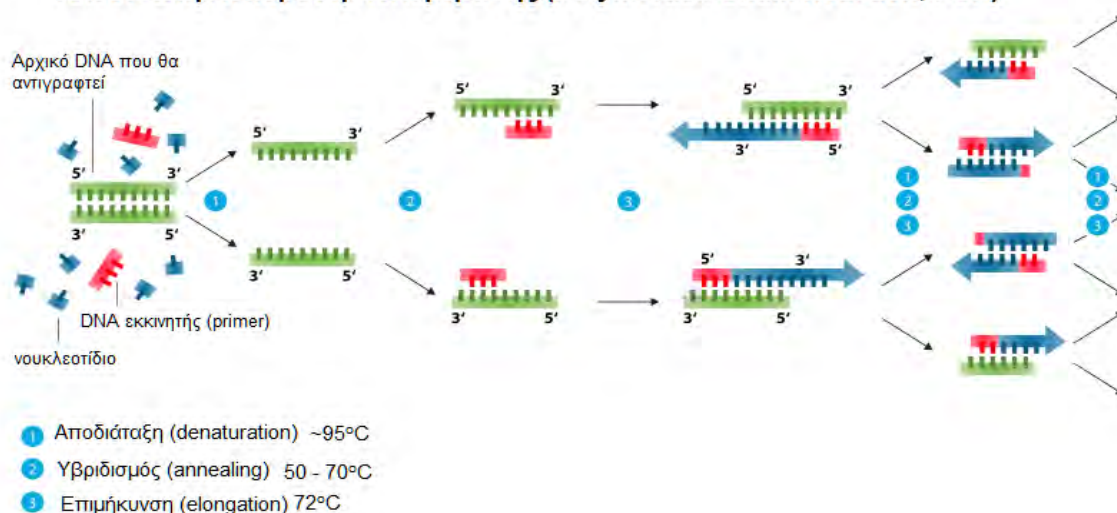
των βακτηριακών στελεχών. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 25μl. Στην PCR χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O ως αρνητικός μάρτυρας.

Το υπό μελέτη γονίδιο που ενισχύθηκε με την τεχνική της PCR ήταν το *mgrB* και οι αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι συνθήκες φαίνονται στον πίνακα 13 που ακολουθεί :

**Πίνακας 13: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση με PCR του *mgrB* γονιδίου**

Γονίδιο	Εκκινητές	Αλληλουχίες 5'-3'	Συνθήκες PCR (°C/sec)	Αναμενόμενο προϊόν
<i>mgrB</i>	<i>mgrB_ext_F</i>	AAGGCGTTCATTCTACCACC	D (95/30)	144bp
	<i>mgrB_ext_R</i>	TTAAGAAGGCCGTGCTATCC	A (54/30)	
			E (72/105)	
Βιβλιογραφία	Cannatelli A, D'Andrea MM, Giani T, Di Pilato V, Arena F, Ambretti S, Gaibani P, Rossolini GM. 2013. In vivo emergence of colistin resistance in <i>Klebsiella pneumoniae</i> producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP <i>mgrB</i> regulator. Antimicrob. Agents Chemother. 57:5521–5526. 10.1128/AAC.01480-13 [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]			
Παρατηρήσεις	<ul style="list-style-type: none"> <li>• όπου D: Denaturation (Αποδιάταξη), A : Annealing (Υβριδισμός), E : Elongation (Επιμήκυνση)</li> <li>• οι PCRs περιελάμβαναν ένα αρχικό βήμα αποδιάταξης 180sec στους 95°C, 30 κύκλους αποδιάταξης, υβριδισμού και επιμήκυνσης στις αναφερόμενες θερμοκρασίες και χρόνους, και ένα τελικό βήμα επιμήκυνσης 300sec στους 72°C</li> </ul>			

### Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)



Εικόνα 20. Η αρχή της μεθόδου της PCR

## 1.7 Καθαρισμός προϊόντων PCR

### 1.7.1 Υλικά και Εξοπλισμός

- i. προϊόντα PCR
- ii. αυτόματες πιπέτες
- iii. στήλη Purelink® Spin Column
- iv. σωληνάκι περισυλλογής (Collection Tube)



- v. σωληνάκι έκλουσης (Elution Tube) 1,7 ml
- vi. Binding Buffer (B2) με ισοπροπανόλη
- vii. Wash Buffer (W1) με αιθανόλη
- viii. Elution Buffer
- ix. συσκευή Vortex
- x. φυγόκεντρος

### 1.7.2 Διαδικασία

Για τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit Purelink® PCR Purification Kit (Invitrogen. Inc, Carlsbad, CA, USA) ώστε να απομακρυνθούν άλατα, εκκινητές, dNTPs και τυχόν άλλα μη νουκλεϊκά αντιδραστήρια. Παρατίθενται τα βήματα που ακολουθήθηκαν που συνιστούν το προτεινόμενο από τον παρασκευαστή πρωτόκολλο:

1. Συνδυασμός. Στα 22μl προϊόντος PCR προστέθηκαν 88μl Binding Buffer (B2) με ισοπροπανόλη και ακολούθησε καλή ανάδευση.
2. Φόρτωμα. Το δείγμα πιπεταρίστηκε σε μια στήλη Purelink® Spin Column τοποθετημένη μέσα σε ένα σωληνάκι περισυλλογής (Collection Tube) και φυγοκεντρήθηκε στις 11.000 x g στροφές για 2 λεπτά. Το υγρό που είχε εισρεύσει από τη στήλη απορρίφθηκε.
3. Πλύσιμο. Η στήλη επανατοποθετήθηκε στο σωληνάκι περισυλλογής και προστέθηκαν 650μl διαλύματος Wash Buffer (W1) με αιθανόλη και φυγοκεντρήθηκε στις 11.000 x g στροφές για 2 λεπτά. Το υγρό που είχε εισρεύσει από τη στήλη απορρίφθηκε και η στήλη επανατοποθετήθηκε στο ίδιο σωληνάκι περισυλλογής. Ακολούθησε φυγοκέντρωση της στήλης για 4 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης.
4. Έκλουση. Η στήλη τοποθετήθηκε σε ένα καθαρό σωληνάκι έκλουσης (Elution Tube) 1,7 ml και προστέθηκαν 50μl Elution Buffer στο κέντρο της στήλης και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στη μέγιστη ταχύτητα για 4 λεπτά. Το καθαρισμένο DNA αποθηκεύτηκε στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

## 1.8 Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (Αλληλούχιση, Sequencing)

### 1.8.1 Αρχή μεθόδου

Η επικρατέστερη μέθοδος για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA, μέχρι στιγμής, είναι η ενζυμική μέθοδος που επινοήθηκε το 1977 από τον Frederick Sanger, ο οποίος μαζί με τον Walter Gilbert τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ χημείας το 1980.

Η μέθοδος στηρίζεται στην *in vitro* σύνθεση του DNA παρουσία άλυσσο-τερματικών τριφωσφορικών διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs). Το αρχικό στάδιο περιλαμβάνει την παρασκευή μονόκλωνων μορίων DNA, που θα χρησιμοποιηθούν ως εκμαγεία. Στη συνέχεια, ένας εκκινητής (primer) προσδένεται στην ίδια θέση κάθε μορίου και δρα ως ένα πρωταρχικό τμήμα στη σύνθεση ενός νέου κλώνου DNA, συμπληρωματικού του αρχικού. Η σύνθεση του νέου κλώνου καταλύεται από την DNA πολυμεράση I και απαιτεί τα τέσσερα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP και dTTP) ως υποστρώματα. Στη μέθοδο Sanger μαζί με τα 4 dNTPs, προστίθεται και μια μικρή ποσότητα διδεοξυνουκλεοτιδίου (ddNTP). Η DNA πολυμεράση δε διακρίνει τα dNTPs από τα ddNTPs και έτσι ένα διδεοξυνουκλεοτίδιο μπορεί να προσδεθεί στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα. Στα ddNTPs λείπει το –OH του τρίτου άνθρακα της δεοξυριβόζης με αποτέλεσμα η DNA πολυμεράση να μην μπορεί να συνεχίσει την επιμήκυνση αφού δεν μπορεί να συνδεθεί το επόμενο νουκλεοτίδιο.

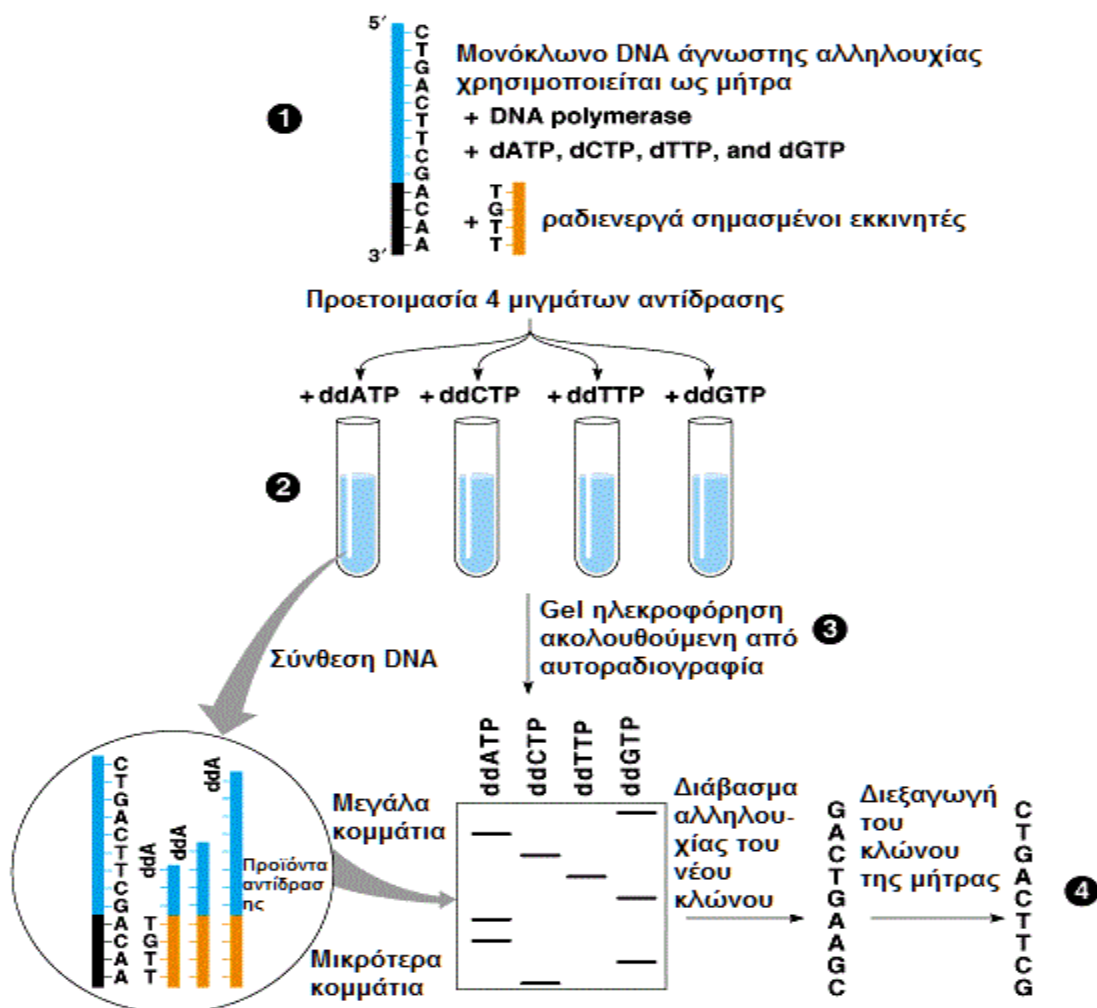
Για παράδειγμα, αν μαζί με τα φυσιολογικά dNTPs προστεθεί και μια ποσότητα ddCTP, η επιμήκυνση κάθε νεοσυντιθέμενης αλυσίδας σταματά απέναντι από τις θέσεις γουανίνης του DNA εκμαγείου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός συνόλου από DNA θραύσματα διαφορετικού μεγέθους, που αντιστοιχούν στις διαφορετικές θέσεις στις οποίες βρίσκονται οι βάσεις γουανίνης στο προσδιοριζόμενο DNA.

Στη μέθοδο Sanger ένα από τα 4 dNTPs είναι ραδιοσημασμένο (συνήθως με  $S^{35}$ ). Στις μέρες μας πλέον αντί της ραδιοσήμανσης των dNTPs, χρησιμοποιούνται εκκινητές σημασμένοι με φθορίζουσες ενώσεις. Τα θραύσματα DNA διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και ανιχνεύονται με αυτοραδιογραφία ή με φθορισμομετρία όπου εμφανίζονται μόνο τα επισημασμένα θραύσματα.

Για την εύρεση της πλήρους νουκλεοτιδικής αλληλουχίας το ίδιο πείραμα επαναλαμβάνεται τέσσερις φορές με τη χρήση διαφορετικών ddNTPs, ένα για κάθε σύνθεση. Τα θραύσματα που παράγονται διαχωρίζονται, σύμφωνα με το μέγεθός τους, σε παράλληλες διαδρομές του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου δίνοντας εικόνα από μια σειρά ραδιενεργών ή φθορίζουσών ζωνών DNA, με βάση τις οποίες διαβάζουμε την νουκλεοτιδική αλληλουχία με κατεύθυνση 5' προς 3'. Πρέπει να δίνεται προσοχή στην αναλογία ddNTP:dNTP ώστε η

αντίδραση του συμπληρωματικού κλώνου να τερματίζεται σε όλα τα δυνατά σημεία και να μπορέσει να γίνει ο σωστός προσδιορισμός της αλληλουχίας του DNA (Εικόνα 21).

Σήμερα η μέθοδος Sanger είναι πλήρως αυτοματοποιημένη. Η αυτοματοποίηση της μεθόδου στηρίχθηκε στη χρησιμοποίηση ddNTPs που έχουν επισημανθεί με φθορίζουσες χρωστικές ουσίες διαφορετικού χρώματος για το καθένα, έτσι ώστε να μπορούν να εντοπιστούν εύκολα από έναν ανιχνευτή φθορισμού. Η προαναφερθείσα μέθοδος, εκτός του ότι δε χρειάζεται ραδιενέργεια και διαβάζεται γρηγορότερα, προσφέρει το πλεονέκτημα του να μπορεί το μείγμα να τρέξει σε μια στήλη. Μετά την ηλεκτροφόρηση, ένας ανιχνευτής φθορισμού περνά πάνω από το πήκτωμα και καταγράφει ποιο διδεοξυνουκλεοτίδιο υπάρχει. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατό να προσδιοριστούν αλληλουχίες που περιέχουν και 500 βάσεις. Ωστόσο, η κατασκευή νέων αυτοματοποιημένων συσκευών που χρησιμοποιούν ένα σύνολο από τριχοειδή κανάλια για το διαχωρισμό (τριχοειδής ηλεκτροφόρηση) αντί του πηκτώματος ακρυλαμιδίου, δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού αλληλουχιών μέχρι και 1000 βάσεων.<sup>69</sup>



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Εικόνα 21. Η αρχή της μεθόδου αλληλούχισης

Τα προϊόντα της PCR στάλθηκαν για αλληλούχιση στην ανώνυμη εταιρία κυτταρικών και μοριακών ανοσολογικών εφαρμογών CeMIA SA στη Λάρισα.

Το «διάβασμα» των αλληλουχιών έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0, Tamura et al, 2007). Οι αλληλουχίες βάσεων που βρέθηκαν συγκρίθηκαν με τις καταχωρημένες αλληλουχίες στην Τράπεζα Γονιδιακών Πληροφοριών, Genbank, που διατίθεται από το NCBI, National Center for Biological Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## 1.9 Πολυτοπική Τυποποίηση Αλληλουχίας (Multilocus Sequence Typing, MLST)

### 1.9.1 Αρχή της μεθόδου

Η Πολυτοπική Τυποποίηση Αλληλουχίας (Multilocus Sequence Typing, MLST) είναι μια μη διαφορούμενη διαδικασία για το χαρακτηρισμό στελεχών βακτηριακών ειδών. Αναλύει γονίδια και χρησιμοποιείται για να ταυτοποιήσει αλληλία καθορίζοντας τις εσωτερικές αλληλουχίες των γονιδίων που κωδικοποιούν τις απαραίτητες πρωτεΐνες για τις βασικές λειτουργίες του κυττάρου. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται, συνήθως, οι αλληλουχίες εσωτερικών θραυσμάτων επτά γονιδίων «κυτταρικής οικονομίας, housekeeping genes». Χρησιμοποιούνται περίπου 450-500bp εσωτερικών θραυσμάτων, καθώς αυτές μπορούν να αλληλουχηθούν με ακρίβεια και στους δύο κλώνους με έναν αυτοματοποιημένο DNA αλληλουχητή. Για κάθε housekeeping γονίδιο (γονίδιο κυτταρικής οικονομίας), οι διαφορετικές αλληλουχίες που παρουσιάζονται στα βακτηριακά είδη έχουν εκχωρηθεί ως διακριτά αλληλόμορφα και για κάθε απομόνωση τα αλληλόμορφα σε κάθε ένα από τους επτά γενετικούς τόπους (loci) ορίζουν το αλληλικό προφίλ ή τον τύπο αλληλουχίας (ST).

Κάθε απομονωμένο στέλεχος ενός είδους χαρακτηρίζεται με μια σειρά επτά ακέραιων αριθμών που αντιστοιχούν στα αλληλόμορφα στους επτά housekeeping loci (γενετικούς τόπους κυτταρικής οικονομίας).

Η MLST βασίζεται στις καλά τεκμηριωμένες αρχές της πολυτοπικής ενζυμικής ηλεκτροφόρησης, αλλά διαφέρει στο ότι προσδιορίζει αλληλόμορφα σε πολλούς housekeeping loci απευθείας με αλληλούχιση DNA και όχι εμμέσως μέσω της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας των γονιδιακών τους προϊόντων.

Το μεγάλο πλεονέκτημα της MLST είναι ότι τα αποτελέσματα αλληλούχισης δεν είναι διαφορούμενα και το αλληλικό προφίλ των απομονωμένων στελεχών μπορούν εύκολα να συγκριθούν με εκείνο μιας μεγάλης βάσης δεδομένων στο διαδίκτυο (σε αντίθεση με τις περισσότερες διαδικασίες τυποποίησης που περιλαμβάνουν σύγκριση μεγεθών τμημάτων DNA σε gel). Επιπλέον, υπάρχει η δυνατότητα του απευθείας χαρακτηρισμού στελεχών

χωρίς να προηγηθεί καλλιέργεια, με ενίσχυση με PCR απευθείας από το κλινικό υλικό (αίμα ή εγκεφαλονωτιαίο υγρό) των επτά housekeeping loci.<sup>70</sup>

### 1.9.2 Διαδικασία

Η μέθοδος της Πολυτοπικής Τυποποίησης Αλληλουχίας (MLST) χρησιμοποιήθηκε για το χαρακτηρισμό των απομονωμένων στελεχών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες επτά housekeeping γονιδίων, συγκεκριμένα των *rpoB*, *gapA*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *infB* και *tonB*. Συνοπτικά, η λειτουργία των γονιδίων αυτών έχει ως εξής: το *rpoB* κωδικοποιεί τη β-υπομονάδα της RNA πολυμεράσης, το *gapA* την 3-φωσφορική αφυδρογονάση της γλυκεραλδεΐδης, το *mdh* την αφυδρογονάση του μηλικού, το *pgi* κωδικοποιεί την φωσφογλυκοζοϊσομεράση και το *phoE* την φωσφορίνη, ενώ το γονίδιο *infB* αποτελεί τον παράγοντα 2 (IF-2) της έναρξης της μετάφρασης και το *tonB* τον περιπλασματικό μετατροπέα ενέργειας.

Για την MLST πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του απομονωμένου DNA των βακτηριακών στελεχών που αποτέλεσαν το πειραματικό δείγμα με PCR, με τη διαδικασία που προαναφέρθηκε, χρησιμοποιώντας τους κάτωθι εκκινητές για καθένα από τα επτά γονίδια:

**Πίνακας 14: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση με PCR των housekeeping γονιδίων της MLST**

Γονίδιο	Εκκινητές	Αλληλουχίες 5'-3'	Συνθήκες PCR	Αναμενόμε- νο προϊόν
<i>rpoB</i>	F: Vic3	GGCGAAATGGCWGAGAACCA	D : 94°C/5min	501 bp
	R: Vic2	GAGTCTTCGAAGTTGTAACC	A : 94°C/30sec 50°C/30sec 72°C/1min } x35 κύκλοι	
			E : 72°C/10min	
<i>gapA</i>	F:gapA173	TGAAATATGACTCCACTCACGG	D : 94°C/5min	450 bp
	R:gapA181	CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT	A : 94°C/30sec 60°C/30sec 72°C/1min } x35 κύκλοι	
			E : 72°C/10min	
<i>mdh</i>	F:mdh130	CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG	D : 94°C/5min	477 bp
	R:mdh867	CCGTTTTTCCCAGCAGCAG	A : 94°C/30sec 50°C/30sec 72°C/1min } x35 κύκλοι	
			E : 72°C/10min	
<i>pgi</i>	F:pgi1F	GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC	D : 94°C/5min	432 bp
	R:pgi1R	CGCGCCACGCTTATAGCGGTTAAT	A : 94°C/30sec 50°C/30sec 72°C/1min } x35 κύκλοι	
			E : 72°C/10min	
<i>phoE</i>	F:phoE604.1	ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG	D : 94°C/5min	420 bp
	R:phoE604.2	TGATCAGAAGCTGGTAGGTGAT	A : 94°C/30sec 50°C/30sec 72°C/1min } x35 κύκλοι	
			E : 72°C/10min	

<b>infB</b>	F:infB1F	CTCGCTGCTGGACTATATTCG	D : 94°C/5min	318 bp
	R:infB1R	CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC	A : 94°C/30sec 50°C/30sec 72°C/1min } x35 κύκλοι	
			E : 72°C/10min	
<b>tonB</b>	F:tonB1F	CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT	D : 94°C/5min	
	R:tonB2R	ATTGCGCCGGCTGRGCRGAGAG	A : 94°C/30sec 45°C/30sec 72°C/1min } x35 κύκλοι	
			E : 72°C/10min	
Βιβλιογραφία	Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus Sequence Typing of <i>Klebsiella pneumoniae</i> Nosocomial Isolates. <i>Journal of Clinical Microbiology</i> . 2005;43(8):4178-4182. doi:10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005. <a href="http://bigsdb.web.pasteur.fr/klebsiella/primers_used.html">http://bigsdb.web.pasteur.fr/klebsiella/primers_used.html</a>			
Παρατηρήσεις	όπου D: Denaturation (Αποδιάταξη), A: Annealing (Υβριδισμός), E: Elongation (Επιμήκυνση) Για το γονίδιο tonB, πρέπει να χρησιμοποιηθεί MgCl <sub>2</sub> στα 50 mM, ενώ για όλα τα άλλα γονίδια οι εκκινητές δουλεύουν MgCl <sub>2</sub> στα 25 mM			

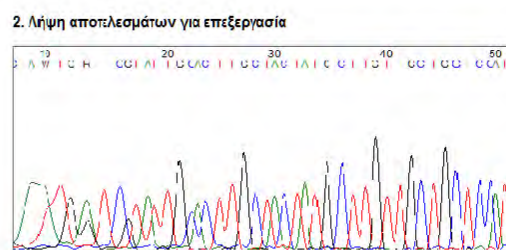
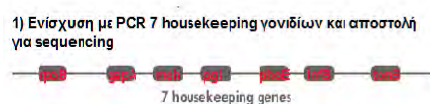
Για **sequencing** χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι PCR εκκινητές, με εξαίρεση το γονίδιο *infB*, για το οποίο χρησιμοποιήθηκε ο infB2F αντί του forward PCR εκκινητή, και το *pgi*, για το οποίο χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *pgi2F* and *pgi2R*. Συγκεκριμένα:

**Πίνακας 15: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το sequencing για το γονίδιο infB και pgi**

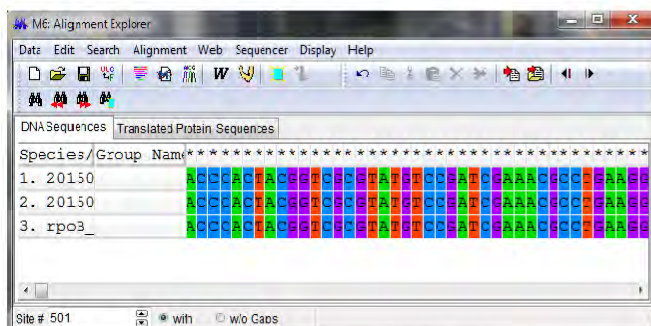
Για Sequencing (εξαιρέσεις)		
Γονίδιο	Εκκινητές	Αλληλουχίες 5'-3'
<b>infB</b>	F : infB2F	ACTAAGGTTGCCTCCGGCGAAGC
	R : infB1R	CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC
<b>pgi</b>	F : pgi2F	CTGCTGGCGCTGATCGGCAT
	R : pgi2R	TTATAGCGGTTAATCAGGCCGT

Για τη σύγκριση της προκύπτουσας αλληλουχίας για ένα γονίδιο των υπό μελέτη στελεχών και για την τυποποίηση αυτών, χρησιμοποιήθηκε η διαθέσιμη βάση δεδομένων του Ινστιτούτου Pasteur.

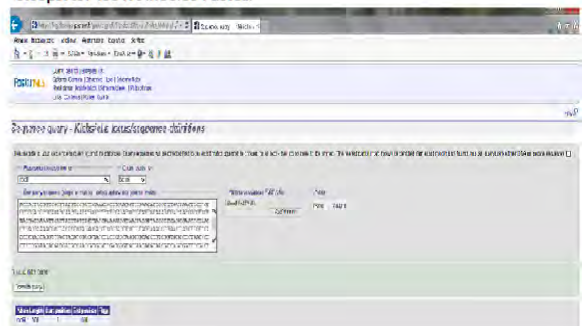
([http://bigsdb.web.pasteur.fr/perl/bigsdb/bigsdb.pl?db=pubmlst\\_klebsiella\\_seqdef\\_public](http://bigsdb.web.pasteur.fr/perl/bigsdb/bigsdb.pl?db=pubmlst_klebsiella_seqdef_public))



3. Χρήση του προγράμματος MEGA για την εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας



4. Αναζήτηση της προκύπτουσας αλληλουχίας στη βάση δεδομένων του Ινστιτούτου Pasteur



Εικόνα 22. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την αλληλούχιση των δειγμάτων

### 1.10 Διερεύνηση ύπαρξης γονιδίων που κωδικοποιούν VIM και KPC καρβαπενεμάσες

Παράλληλα, στο απομονωμένο DNA στελεχών του πειραματικού δείγματος έγινε διερεύνηση για τυχόν ύπαρξη γονιδίων που κωδικοποιούν τόσο τις μέταλλο-β-λακταμάσες τύπου VIM όσο και τις KPC καρβαπενεμάσες.

Η αύξηση της διασποράς των επίκτητων και μεταβιβάσιμων μέταλλο-β-λακταμασών έχει μεγάλη σημασία, καθώς οι εν λόγω καρβαπενεμάσες υδρολύουν όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά (πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, κεφαμυκίνες, καρβαπενέμες), εκτός από την αζτρεονάμη. Επιπλέον, τα ένζυμα αυτά δεν αναστέλλονται από τους αναστολείς των β-λακταμασών (κλαβουλανικό, σουλμπακτάμη, ταζομπακτάμη), αναστέλλονται όμως από τη χηλική ουσία EDTA η οποία δεσμεύει τα δισθενή ιόντα  $Zn^{2+}$  και άλλα δισθενή κατιόντα.<sup>71,72</sup>

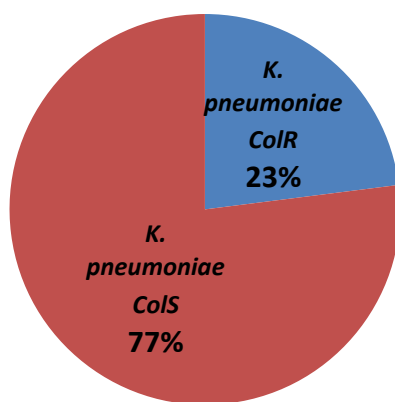
**Πίνακας 16:** Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση με PCR των γονιδίων που κωδικοποιούν για VIM και KPC

Γονίδιο	Εκκινητές	Αλληλουχίες 5'-3'	Συνθήκες PCR	Αναμενόμε- νο προϊόν
Γονίδιο που κωδικοποιεί μεταλλο-β-λακταμάσες VIM	F : bla <sub>VIM</sub> F	AGTGGTGAGTATCCGACA	D : 94°C/5min	261 bp
	R : bla <sub>VIM</sub> R	ATGAAAGTGCGTGGAGAC	A : 94°C/1min 56°C/1min 72°C/1min } x35 κύκλοι E : 72°C/5min	
Γονίδιο που κωδικοποιεί καρβαπενεμάσες KPC	F : bla <sub>KPC</sub> F	TCGCTAAACTCGAACAGG	D : 94°C/5min	780 bp
	R: bla <sub>KPC</sub> R	TTACTGCCCGTTGACGCCCAA TCC	A : 94°C/30sec 55°C/30sec 72°C/1min } x35 κύκλοι E : 72°C/10min	
Βιβλιογραφία	<b>VIM:</b> 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. <b>KPC:</b> Lomaestro, B.M., Tobin, E.H., Shang, W., Gootz, T., (2006). The spread of <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase-producing <i>K. pneumoniae</i> to upstate New York. Clin. Infect. Dis. 43, e26–28.			
Παρατηρήσεις	όπου D: Denaturation (Αποδιάταξη), A: Annealing (Υβριδισμός), E: Elongation (Επιμήκυνση)			

## 2. Αποτελέσματα

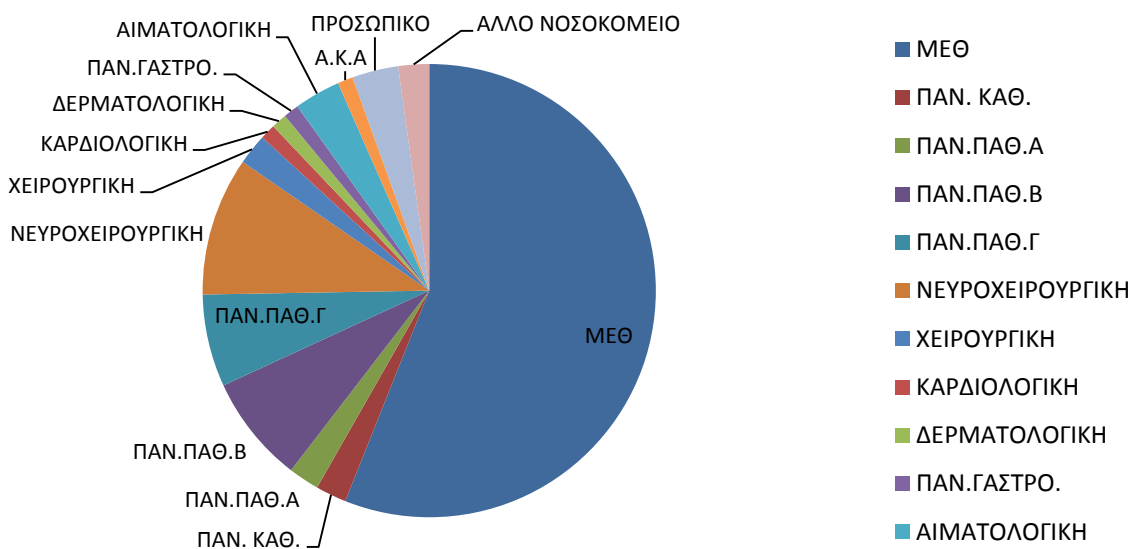
Στο πλαίσιο αυτής της διπλωματικής εργασίας το πειραματικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε συνίστατο από στελέχη *K. pneumoniae* που απομονώθηκαν στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας το έτος 2012, τα οποία, βάση αντιβιογράμματος, ήταν ανθεκτικά στην κολιστίνη και προήρθαν από ποικίλα κλινικά δείγματα.

**Το έτος 2012 το ποσοστό των ανθεκτικών στην κολιστίνη στελεχών *Klebsiella pneumoniae* ανήλθε στο 23%**



Διάγραμμα 5: Σχηματική αναπαράσταση του ποσοστού των Col<sup>R</sup> και Col<sup>S</sup> στελεχών *Klebsiella pneumoniae* στο ΠΓΝΛ το 2012

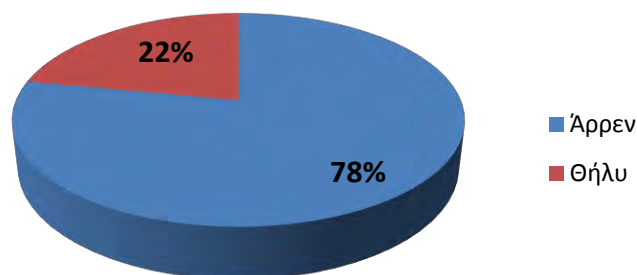
**Κατανομή ανθεκτικών στην κολιστίνη στελεχών *Klebsiella pneumoniae* ανά κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.**



Διάγραμμα 6: Απεικόνιση των Col<sup>R</sup> στελεχών *Klebsiella pneumoniae* ανά κλινική στο ΠΓΝΛ το 2012

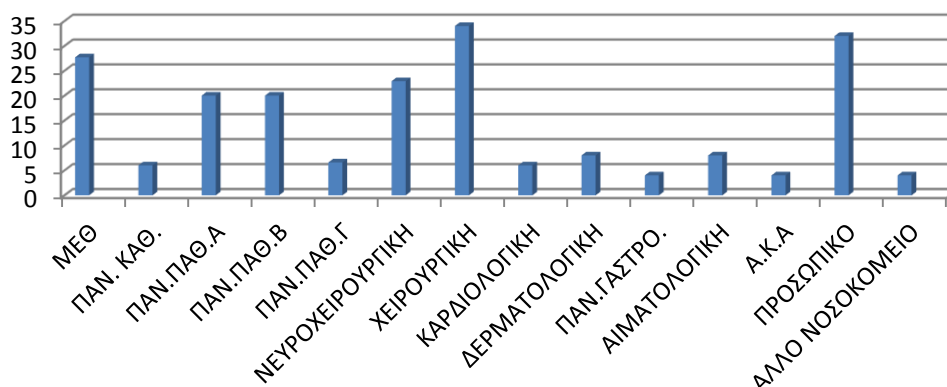


### Φύλο ασθενών με *Klebsiella pneumoniae* Col<sup>R</sup>



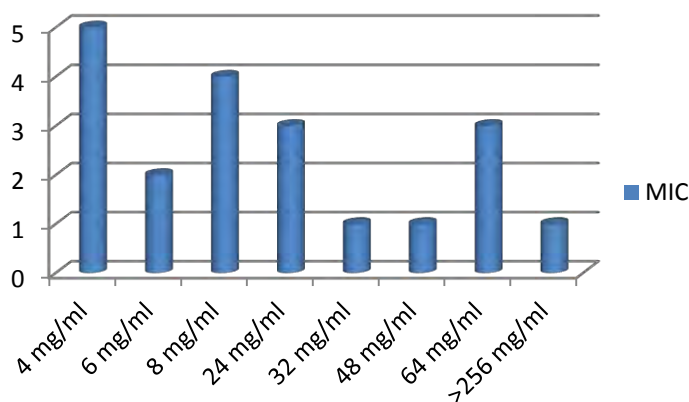
Διάγραμμα 7: Απεικόνιση του φύλου των ασθενών με *Klebsiella pneumoniae* Col<sup>R</sup>

### Μέσος όρος της MIC ανά κλινική



Διάγραμμα 8: Γράφημα του μέσου όρου MIC ανά κλινική το 2012 σε ότι αφορά τα στελέχη *Klebsiella pneumoniae* Col<sup>R</sup>

### MICs κολιστίνης των COL<sup>R</sup>



Διάγραμμα 9: MICs κολιστίνης των στελεχών *Klebsiella pneumoniae* Col<sup>R</sup>

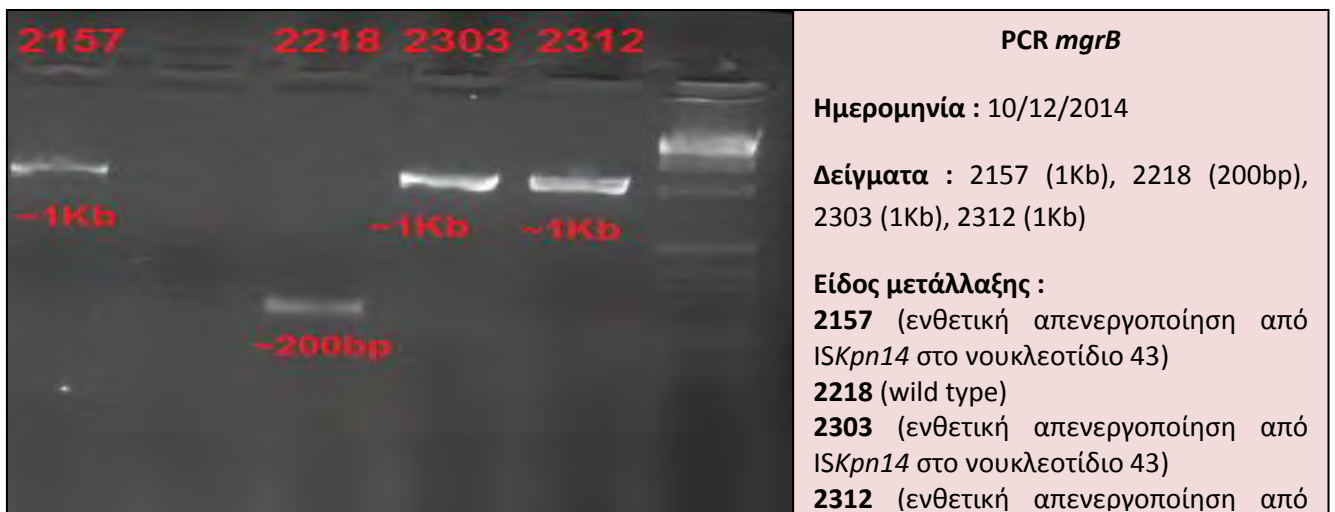
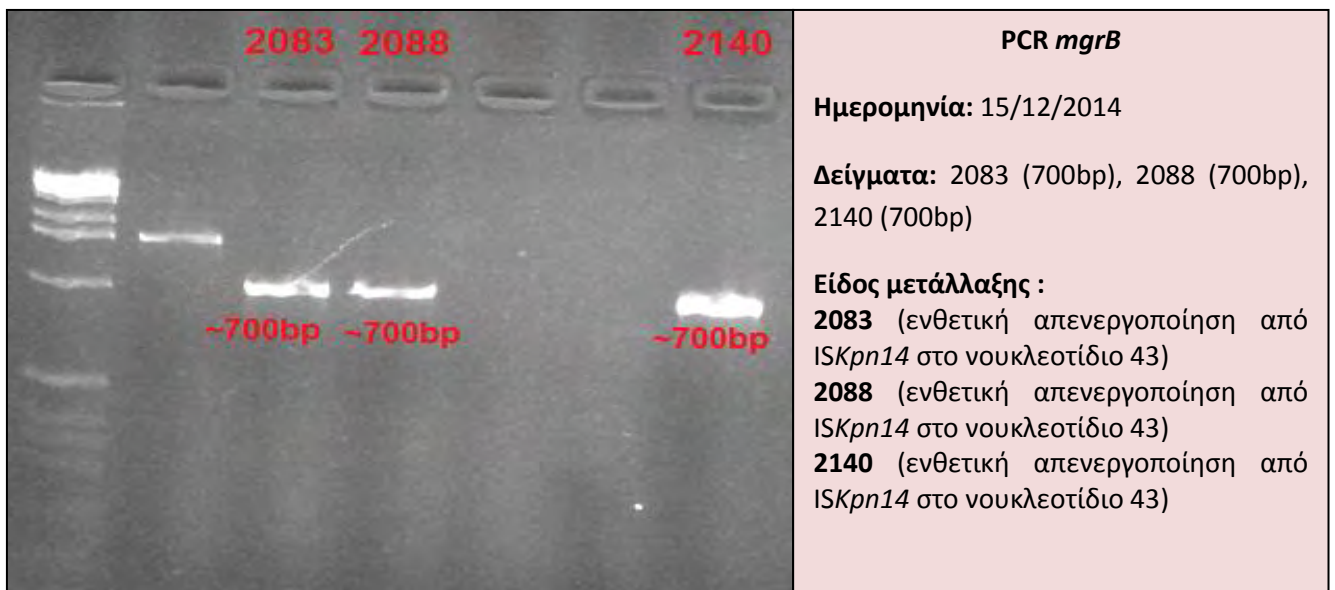
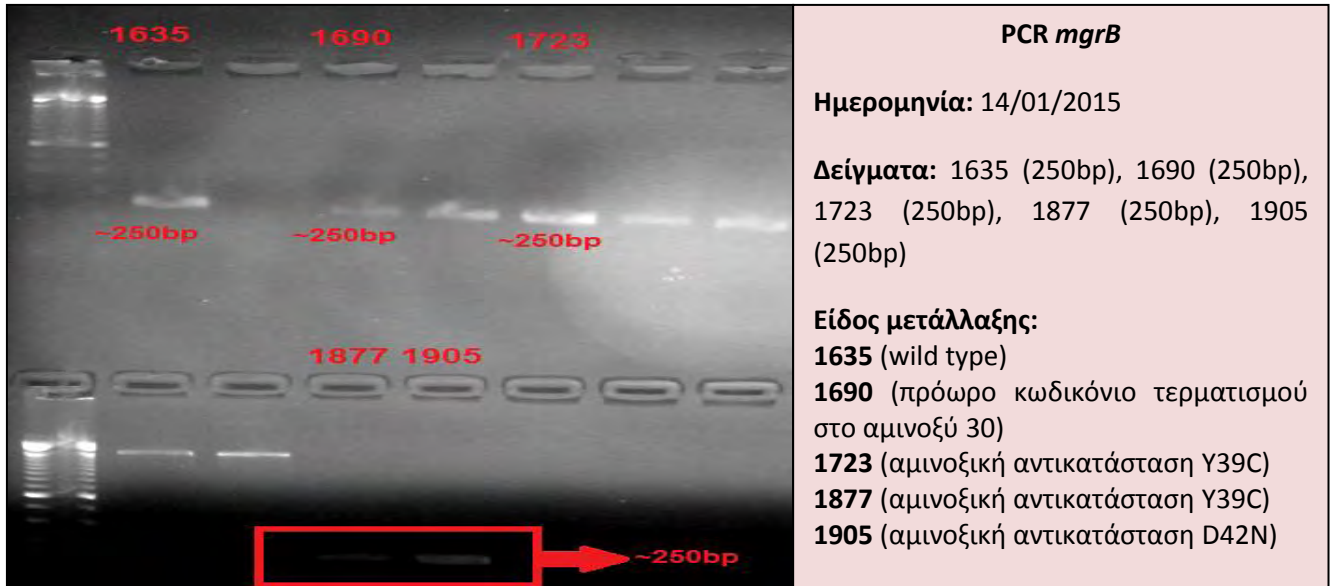
Ένα σύνολο 25 στελεχών (21 Col<sup>R</sup> και 4 Col<sup>S</sup>) που προέρχονταν από διάφορες κλινικές επιλέχθηκαν για αλληλούχιση (sequencing) του ενισχυμένου με PCR *mgrB* γονιδίου. Σε αυτά τα στελέχη πραγματοποιήθηκε επιπλέον διερεύνηση για τυχόν ύπαρξη γονιδίων που κωδικοποιούν KPC καρβαπενεμάσες και μέταλλο-β-λακταμάσες τύπου VIM, με ενίσχυση με PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές για αυτά τα γονίδια, οι οποίοι έχουν περιγραφεί αναλυτικά προηγουμένως. Σε 11 στελέχη έγινε MLST, όπου ύστερα από ενίσχυση με PCR των επτά housekeeping γονιδίων (*rpoB*, *gapA*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *infB* και *tonB*), ακολουθούμενη από sequencing, καθορίστηκε ο τύπος αλληλουχίας (ST) της.

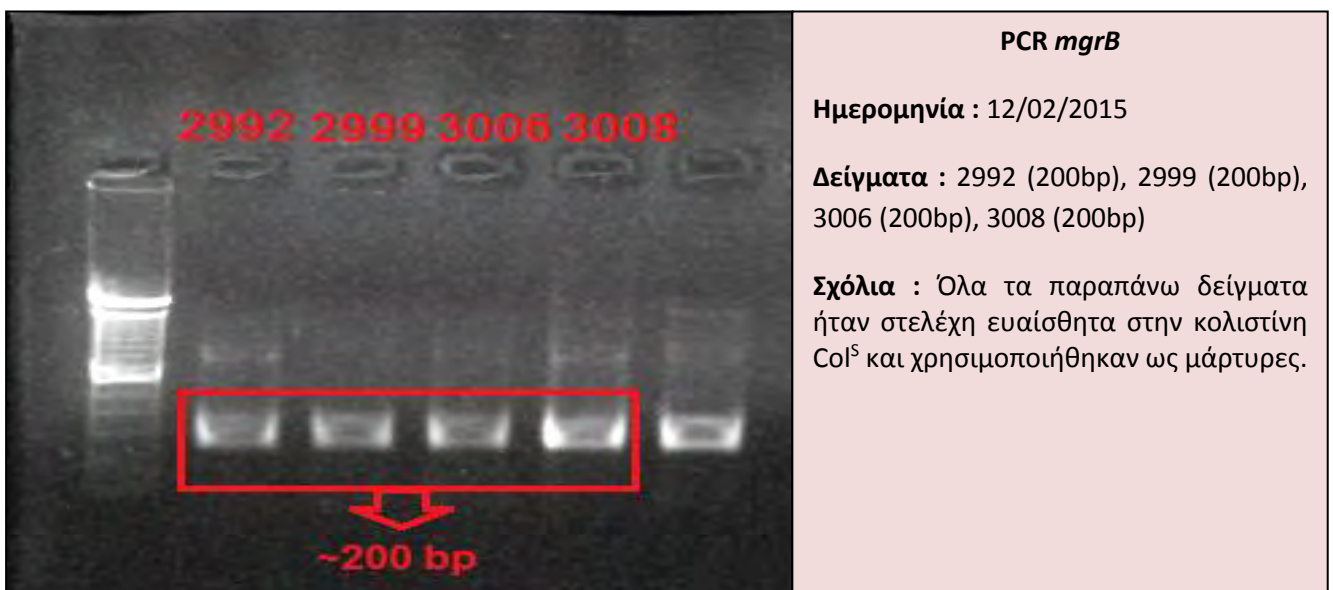
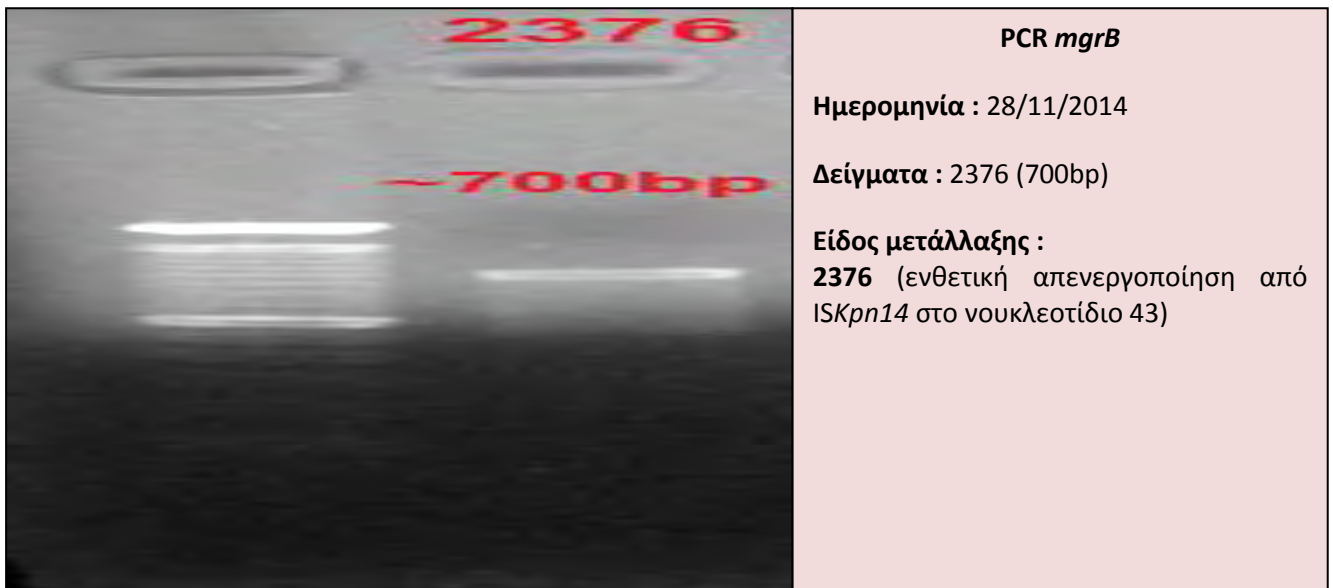
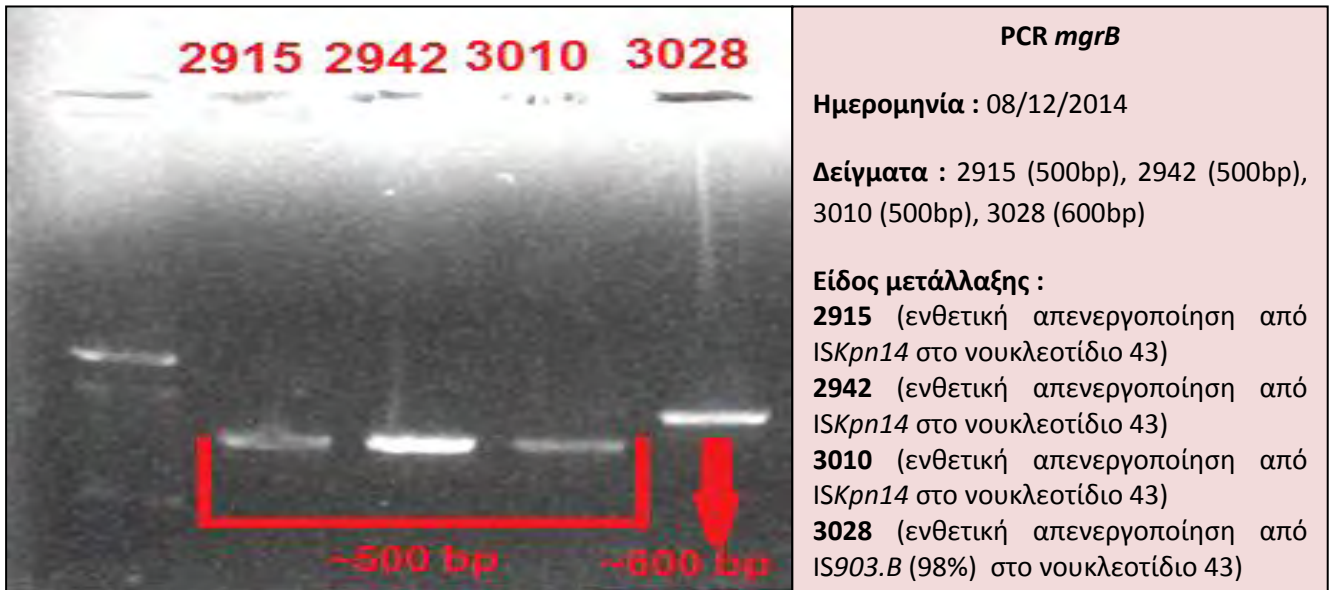
Ακολουθούν αναλυτικά τα αποτελέσματα των δοκιμασιών για αυτά τα στελέχη .

## Αποτελέσματα PCR

### Ηλεκτροφορήσεις

Τα αποτελέσματα της PCR, όπως φάνηκε από της ηλεκτροφορήσεις, ήταν σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του sequencing που ακολούθησε, σε ότι αφορά το μέγεθος του *mgrB* γονιδίου.





Εικόνα 23. Εικόνες των ηλεκτροφορήσεων του συνόλου των προϊόντων της PCR των δειγμάτων που αποτέλεσαν το πειραματικό υλικό

Πίνακας 17: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα

A/Φ	αριθμός καλλιέργειας	δείγμα	ημερομηνία	Κλινική	MLST	<i>mgrB</i>	KPC	VIM	MIC colistin	colistin
1635	3743	ούρα	3/1/2012	N/X		Wild type	NEG	NEG	6	R
1690	3721	κατάκλιση	3/1/2012	ΠΠΑ		Premature stop codon at 30aa.	NEG	NEG	32	R
1723	4825	βρογχικές	12/1/2012	ΠΑΝ. ΚΑΘ.	ST15	Y39C	POS	NEG	6	R
1877	49	δερματική βλάβη	18/2/2012	ΔΕΡΜ/ΚΗ		Y39C	POS	NEG	8	R
1905	967	αίμα	25/2/2012	ΠΑΝ.ΓΑΣ ΤΡΟ.	ST859	D42N	POS	NEG	4	R
1931	2026	βρογχικές	3/3/2012	ΜΕΘ	ST323	Wild type	NEG	NEG	4	R
2020	5341	πτύελα	28/3/2012	ΑΙΜ/ΚΗ	ST101	Premature stop codon at 30aa.	POS	NEG	8	R
2037	5815	ούρα	31/3/2012	ΠΠΒ		Wild type	POS	POS	4	R
2082	6906	ούρα	10/4/2012	N/X		Wild type	POS	POS	64	R
2083	7093	ούρα	11/4/2012	N/X	ST147	interrupted by <i>ISKpn14</i> at nt 43	POS	POS	64	R
2088	7136	τραύμα	12/4/2012	ΜΕΘ		interrupted by <i>ISKpn14</i> at nt 43	POS	POS	24	R
2140	8652	αίμα	27/4/2012	ΜΕΘ		interrupted by <i>ISKpn14</i> at nt 43	POS	POS	24	R
2157	9109	αίμα	2/5/2012	ΜΕΘ		interrupted by <i>ISKpn14</i> at nt 43	POS	POS	48	R
2218	1148	άκρο καθετήρα	19/5/2012	ΜΕΘ	ST258	Wild type	POS	NEG	24	R
2303	3324	τραύμα	7/6/2012	ΜΕΘ		interrupted by <i>ISKpn14</i> at nt 43	POS	NEG	?	R
2312	3437	άκρο καθετήρα	8/6/2012	ΜΕΘ		interrupted by <i>ISKpn14</i> at nt 43	POS	POS	4	R
2376	4805	K.F.G.	20/6/2012	ΜΕΘ	ST147	interrupted by <i>ISKpn14</i> at nt 43	POS	POS	8	R
2915	7646	τραύμα	8/10/2012	ΜΕΘ		interrupted by <i>ISKpn14</i> at nt 43	POS	NEG	>256	R
2942	8004	κόπρανα	12/10/2012	ΜΕΘ		interrupted by <i>ISKpn14</i> at nt 43	POS	POS	64	R
3010	433	K.F.G.	31/10/2012	ΜΕΘ	ST147	interrupted by <i>ISKpn14</i> at nt 43	POS	POS	4	R
3028	753	ούρα	2/11/2012	ΑΙΜ/ΚΗ	ST11	interrupted by IS903.B (98%) at nt 70	NEG	NEG	8	R
2992	9658	κατάκλιση	24/10/2012	ΠΑΝ.ΠΑΘ .Α		Wild type	POS	NEG	1	S
2999	9763	πτύελα	26/10/2012	ΟΓΚΟΛΟ ΓΙΚΗ		Wild type	POS	NEG	≤0.5	S
3006	381	αίμα	30/10/2012	ΠΑΝ.ΠΑΘ .Γ		Wild type	NEG	NEG	≤0.5	S
3008	375	ούρα	29/10/2012	ΠΑΝ.ΠΑΘ .Γ	ST101	Wild type	NEG	NEG	≤0.5	S

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν διάφορες μεταβολές του *mgrB* γονιδίου. Αυτές περιλάμβαναν μη σιωπηλές σημειακές μεταλλάξεις (που είχαν ως αποτέλεσμα αμινοξικές αντικαταστάσεις και παρουσία πρόωρου κωδικονίου τερματισμού της σύνθεσης της αμινοξικής αλυσίδας) και ενθετική απενεργοποίηση του *mgrB* από IS στοιχεία που

αποτελούσε και τον επικρατέστερο τύπο μεταβολής του *mgrB*. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι υπήρχαν και στελέχη που ενώ είχαν φαινότυπο ανθεκτικό στην κολιστίνη, δεν παρουσίαζαν μεταβολή του *mgrB* (wild type).

Συγκεκριμένα από τα 21 Col<sup>R</sup> στελέχη *Klebsiella pneumoniae*:

**A) Τρία έφεραν αμινοξικές αντικαταστάσεις του τύπου:**

- i) Y39C: Η τυροσίνη της θέσης 39 (Tyr) αντικαταστάθηκε από κυστεΐνη (Cys)
- ii) D42N: Το ασπαρτικό οξύ (Asp) της θέσης 42 αντικαταστάθηκε από ασπαραγίνη

(Asn)

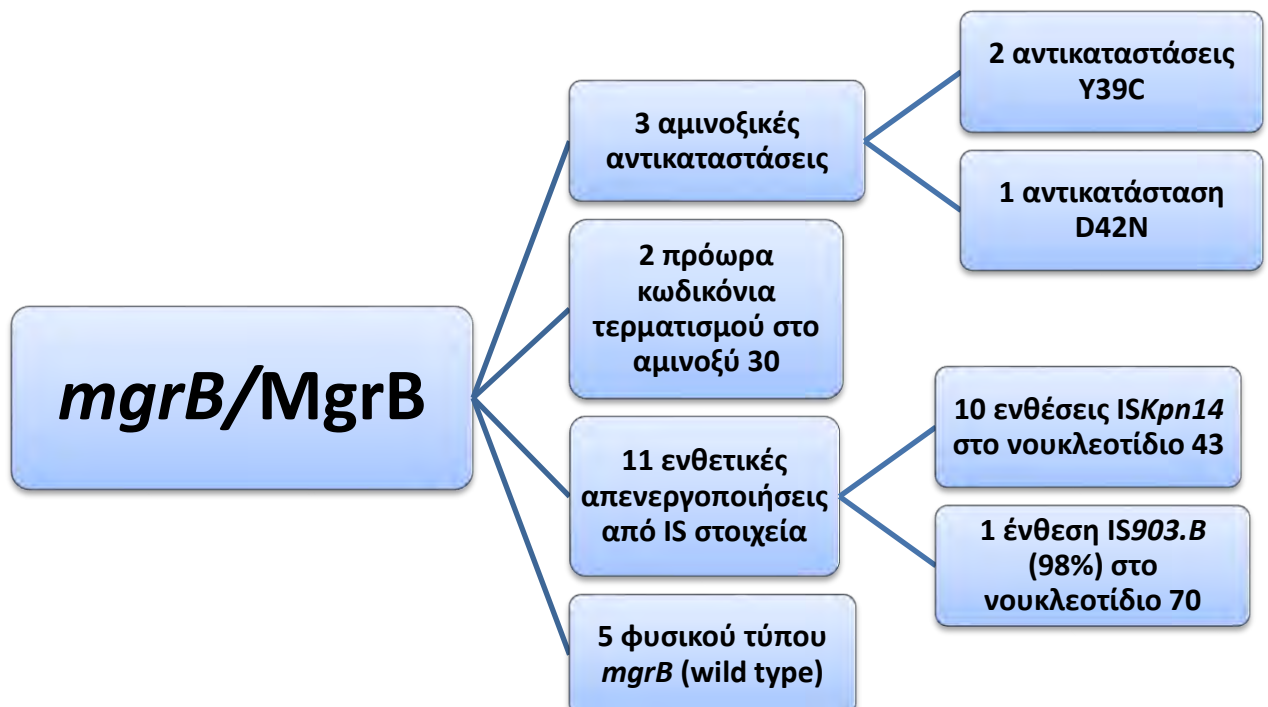
**B) Δύο έφεραν πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού στο αμινοξύ 30**

**Γ) Έντεκα έφεραν αλληλουχίες εισδοχής, IS-όμοια στοιχεία**

i) Δέκα εντοπίστηκαν να φέρουν το κινητό στοιχείο *ISKpn14* εισηγμένο στο νουκλεοτίδιο 43 του *mgrB*

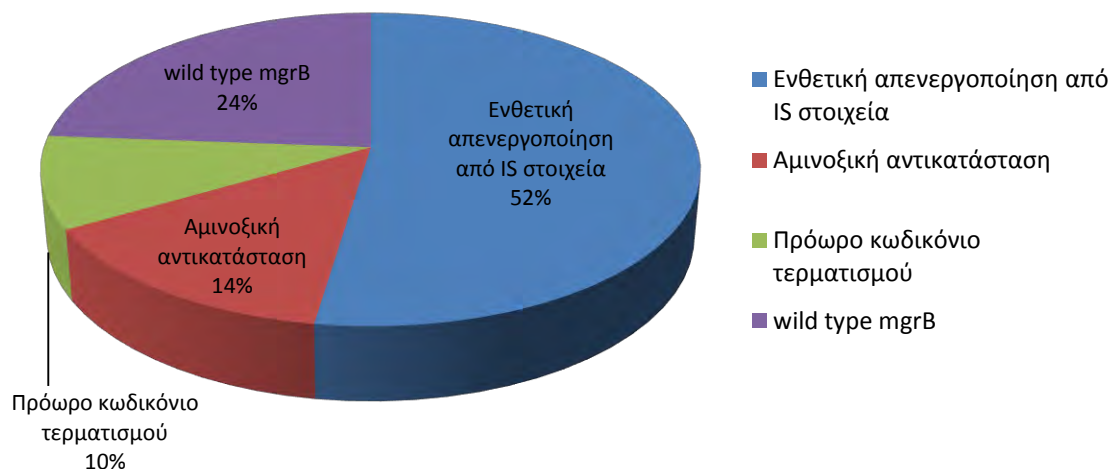
ii) Ένα έφερε το στοιχείο *IS903.B* (98%) στο νουκλεοτίδιο 70 του *mgrB*

**Δ) Πέντε εμφάνιζαν φυσικού τύπου (wild type) *mgrB***



Διάγραμμα 10: Σχηματική απεικόνιση των μεταβολών που εντοπίστηκαν στο *mgrB* γονίδιο και την MgrB πρωτεΐνη

## Μεταβολές του *mgrB* γονιδίου



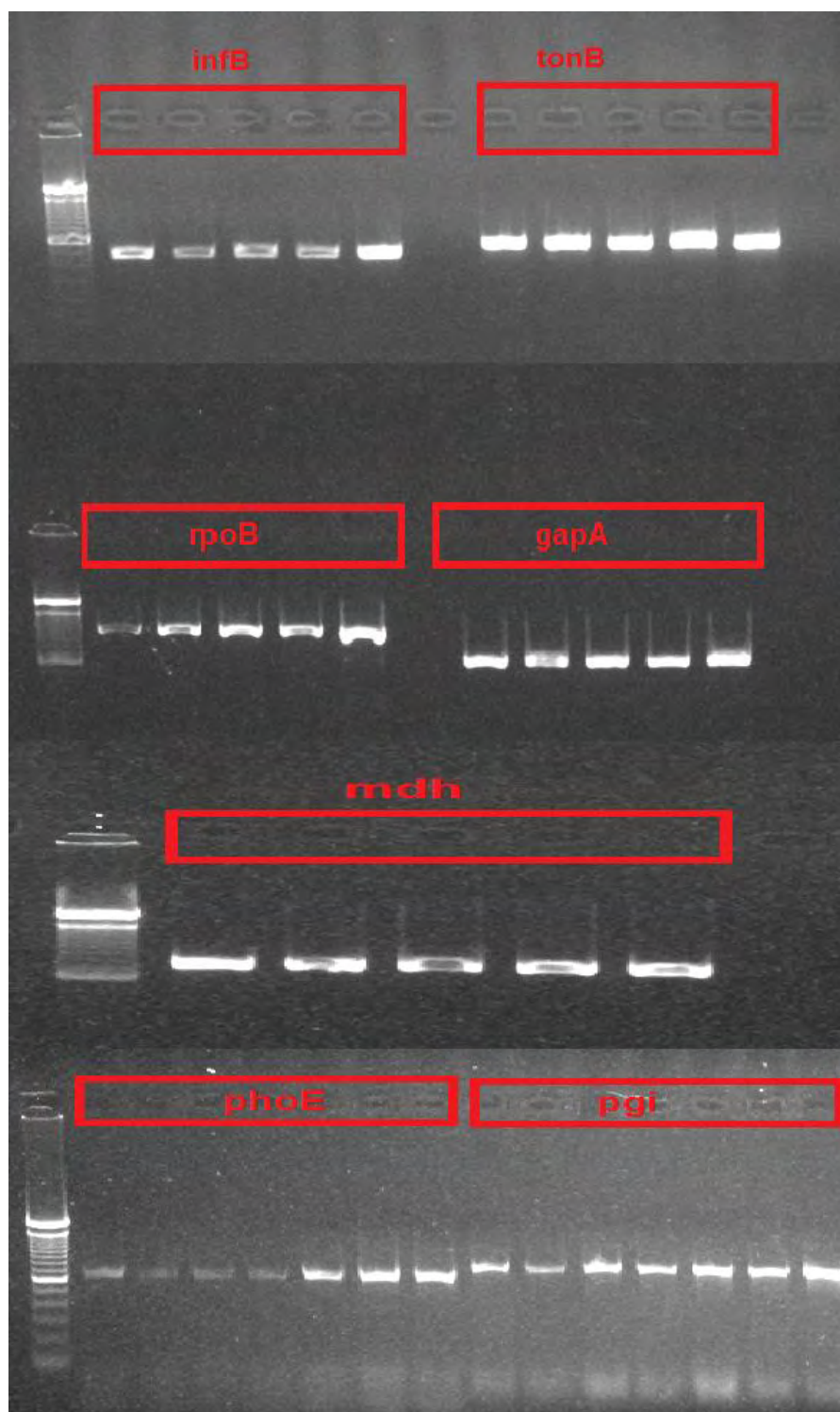
Διάγραμμα 11: Ποσοτικοποίηση των μεταβολών του *mgrB* γονιδίου

Πίνακας 18: Μεταβολές του *mgrB* γονιδίου και της MgrB πρωτεΐνης

Enθετική απενεργοποίηση του <i>mgrB</i> από IS στοιχεία	Αμινοξικές αντικαταστάσεις	Πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού στο αμινοξύ 30	Wild type <i>mgrB</i>
<b>ISKpn14 στο νουκλεοτίδιο 43</b>	<b>Y39C</b>	250bp (No στελέχους 1690) - (No στελέχους 2020)	200bp (No στελέχους 1635) 200bp (No στελέχους 2218)
700bp (No στελέχους 2083)	250bp (No στελέχους 1723)		- (No στελέχους 1931)
700bp (No στελέχους 2088)	250bp (No στελέχους 1877)		- (No στελέχους 2037)
700bp (No στελέχους 2140)	<b>D42N</b>		- (No στελέχους 2082)
1Kb (No στελέχους 2157)	250bp (No στελέχους 1905)		
1Kb (No στελέχους 2303)			
1Kb (2 No στελέχους 312)			
700bp (No στελέχους 2376)			
500bp (No στελέχους 2915)			
500bp (No στελέχους 2942)			
500bp (No στελέχους 3010)			
<b>IS903.B (98%) στο νουκλεοτίδιο 70</b>			
600bp (No στελέχους 3028)			

## MLST

Τυπική εικόνα ηλεκτροφόρησης των γονιδίων της MLST ύστερα από ενίσχυση με PCR



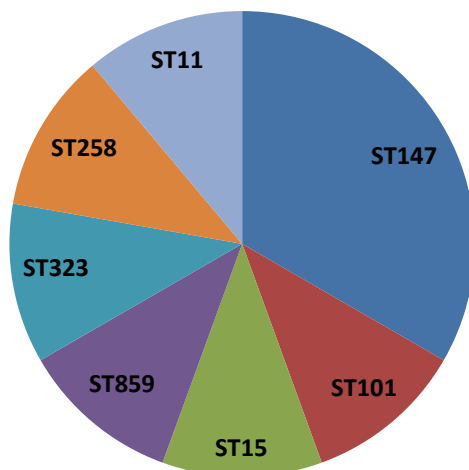
Εικόνα 24.Τυπική εικόνα των housekeeping γονιδίων της MLST

**Πίνακας 19: Οι τύποι αλληλουχίας στελεχών *Klebsiella pneumoniae* Col<sup>R</sup> και Col<sup>S</sup>**

**Αλληλικό προφίλ στελεχών *Klebsiella pneumoniae* Col<sup>R</sup> και Col<sup>S</sup> ύστερα από MLST**

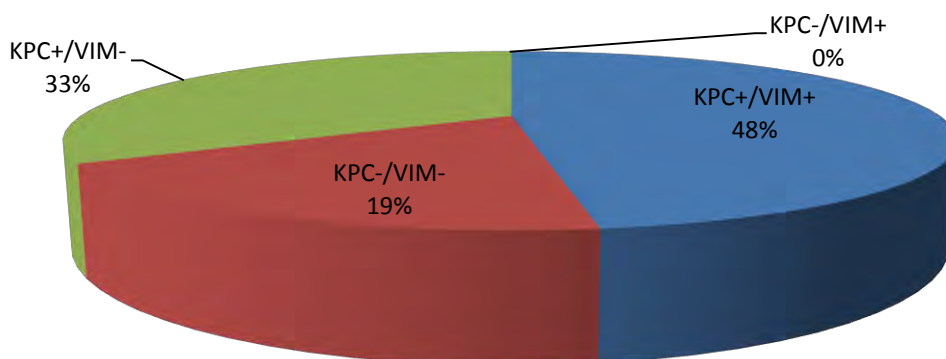
STs
ST15, ST859, ST323, ST101, ST147, ST11, ST258

### Αλληλικό προφίλ στελεχών *Klebsiella pneumoniae* Col<sup>R</sup>

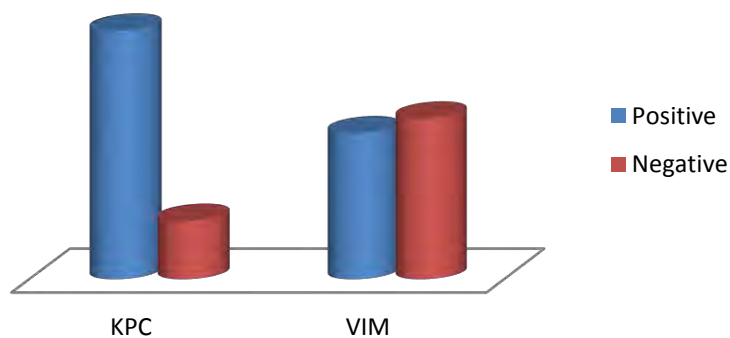


Διάγραμμα 12: Σχηματική απεικόνιση των τύπων αλληλουχίας των στελεχών *Klebsiella pneumoniae* Col<sup>R</sup> και Col<sup>S</sup> που αποτέλεσαν το πειραματικό μας υλικό

### Αποτελέσματα της PCR που αφορούν την ύπαρξη γονιδίων που κωδικοποιούν VIM/KPC καρβαπενεμάσες στα 21 Col<sup>R</sup> στελέχη *Klebsiella pneumoniae*



Διάγραμμα 13



Διάγραμμα 14

Διαγράμματα 13 & 14 : Σχηματική αναπαράσταση που αφορά την ύπαρξη γονιδίων που κωδικοποιούν την ύπαρξη γονιδίων που κωδικοποιούν VIM/KPC καρβαπενεμάσες στο πειραματικό υλικό ανά ζεύγη (13) και μεμονωμένα (14)



### 3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η Ελλάδα συμπεριλαμβάνεται στις χώρες της Ευρώπης με τα υψηλότερα ποσοστά χρήσης αντιβιοτικών στα νοσοκομεία και την κοινότητα, ενώ εδώ και δεκαετίες παρουσιάζει επίσης πολύ υψηλά ποσοστά πολυανθεκτικών Gram-αρνητικών βακτηρίων.

Για το λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια, πληθώρα ερευνών προσανατολίζεται στην εξιχνίαση των μηχανισμών που διέπουν την αντοχή στις πολυμυξίνες στα Εντεροβακτηριακά γενικά και στην *K. pneumoniae* ειδικά.

Η παρούσα διπλωματική, προσανατολίστηκε στη διερεύνηση του ρόλου του *mgrB* γονιδίου στην αντοχή στην κολιστίνη που παρουσιάζουν κάποια στελέχη *K. pneumoniae*, διότι το εν λόγω αντιβιοτικό αποτελεί θεραπευτική επιλογή για τους πολυανθεκτικούς μικροοργανισμούς. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν 25 στελέχη (21 Col<sup>R</sup> και 4 Col<sup>S</sup>), που απομονώθηκαν στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας το 2012. Στα στελέχη αυτά πραγματοποιήθηκε απομόνωση του DNA τους και ενίσχυση του *mgrB* γονιδίου τους με PCR προκειμένου να ανιχνευτούν τυχόν δομικές αλλαγές και να συσχετιστούν με την έκφραση αντοχής.

Ακολούθησε αλληλούχιση και από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκαν διαφορών τύπων μεταλλάξεις του *mgrB* γονιδίου και κατ' επέκταση της MgrB πρωτεΐνης που περιελάμβαναν:

1. αμινοξικές αντικαταστάσεις (Y39C και D42N),
2. παρουσία κωδικονίου πρόωρου τερματισμού της σύνθεσης της αμινοξικής αλυσίδας και
3. ενθετική απενεργοποίηση του *mgrB* από IS στοιχεία (IS903.B και IS*Kpn14*) που αποτελούσε και τον επικρατέστερο τύπο μεταβολής του *mgrB*. Κυρίαρχη ήταν η ενθετική απενεργοποίηση του *mgrB* από το IS*Kpn14* στοιχείο, ένα 758bp IS που ανήκει στην IS1 οικογένεια.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι υπήρχαν και στελέχη που ενώ είχαν ανθεκτικό στην κολιστίνη φαινότυπο, δεν παρουσίαζαν μεταβολή του *mgrB* (wild type), δείχνοντας ότι η μεταβολή του *mgrB* γονιδίου δεν είναι ο μοναδικός μηχανισμός αντοχής στο εν λόγω αντιβιοτικό. Οι πρόσθετοι μηχανισμοί που οδηγούν σε αντοχή στην κολιστίνη μπορεί να περιλαμβάνουν μεταλλάξεις του εκκινητή που θα οδηγούσαν σε μειωμένη έκφραση του *mgrB* ή μεταβολές στο *rhoP/rhoQ* ή σε άλλους γενετικούς τόπους που θα οδηγούσαν σε πλειορύθμιση του συστήματος Pmr, υπεύθυνου για την τροποποίηση του λιποπολυσακχαριδικού στόχου πολυμυξίνης και θα μπορούσε να αποτελέσει αντικείμενο περαιτέρω διερεύνησης.

Επιπλέον, διενεργήθηκε MLST (Πολυτοπική Τυποποίηση Αλληλουχίας) για τον χαρακτηρισμό των τύπων αλληλουχίας (STs) στελεχών *K. pneumoniae* COL<sup>R</sup> και COL<sup>S</sup>. Οι

STs αυτών των στελεχών έχουν ως εξής: ST15, ST859, ST323, ST258, ST11, ST101, ST147. Από τη βιβλιογραφία, παρουσιάζει ενδιαφέρον, ότι η ST258 κλωνική γενιά φέρεται να είναι υπεύθυνη για πρόσφατη, παγκόσμια διασπορά των KPC *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες.<sup>63</sup>

Παράλληλα, έγινε διερεύνηση για την ύπαρξη των γονιδίων KPC/VIM που σχετίζονται με αντοχή καρβαπενέμες, με τη βοήθεια της τεχνικής της PCR, χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους εκκινητές. Από τα 21 Col<sup>R</sup> στελέχη 17 ήταν KPC+ και 4 KPC-, 10 VIM+ και 11 VIM- ενώ 10 στελέχη ήταν KPC+/VIM+. Από τα 4 Col<sup>S</sup> στελέχη 2 ήταν θετικά για KPC και 2 αρνητικά, ενώ όλα ήταν αρνητικά για VIM. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρουσία αυτών των γονιδίων δεν σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στην κολιστίνη.

Οι MICs κολιστίνης των Col<sup>R</sup> στελεχών *K. pneumoniae* κυμαίνονταν από 4 μέχρι πάνω από 256 mg/ml.

Όπως επιβεβαιώθηκε από τα πειράματα, μεταβολή της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του *mgrB* γονιδίου κατέληγε σε ανθεκτικό στην κολιστίνη στέλεχος *K. pneumoniae*, υπογραμμίζοντας τη σημασία αυτού του γονιδίου στην αντοχή στις πολυμυξίνες.

Εν κατακλείδι, η απενεργοποίηση του *mgrB* γονιδίου φαίνεται να είναι ένας μεταλλακτικός μηχανισμός επίκτητης αντοχής στις πολυμυξίνες σε ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *K. pneumoniae*. Η MgrB είναι μια μικρή διαμεμβρανική πρωτεΐνη που λειτουργεί σαν αρνητικός αναδραστικός ρυθμιστής στο PhoPQ σύστημα σηματοδότησης δύο στοιχείων. Η απενεργοποίηση του *mgrB* γονιδίου οδηγεί σε πλειορύθμιση αυτού του συστήματος που, με τη σειρά, του ενεργοποιεί το Pmr σύστημα, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη βιοχημική τροποποίηση του λιπιδίου A του LPS, μειώνοντας με αυτό τον τρόπο τη συγγένειά του για τις πολυμυξίνες.

Αξίζει να σημειωθεί ότι στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί σε Εντεροβακτηριακά η ύπαρξη τουλάχιστον δύο άλλων πρωτεϊνών (YneN, SlyB) στις οποίες αποδίδεται ο ρόλος του ρυθμιστή της έκφρασης του PhoP/PhoQ συστήματος σηματοδότησης, ωστόσο, το επίπεδο της συντήρησης της λειτουργίας τους φαίνεται να είναι περιορισμένο, σε αντίθεση με την MgrB πρωτεΐνη που έχει ευρέως συντηρημένη λειτουργία στα Εντεροβακτηριακά.<sup>62</sup>

Επίσης, είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθούν περαιτέρω πειράματα που να εστιάζουν στο μηχανισμό με τον οποίο η MgrB πρωτεΐνη καταστέλλει τη PhoQ και να καθοριστούν τυχόν επιπρόσθετοι ρόλοι της MgrB σε αυτό το σημαντικό σύστημα σηματοδότησης. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι IS5 όμοια στοιχεία που είναι ταυτόσημα ή πολύ όμοια με αυτά που εμπλέκονται στην ενθετική απενεργοποίηση του *mgrB* βρέθηκαν σε αρκετά πλασμίδια που κωδικοποιούν KPC, παραπέμποντας στην υπόθεση ότι απόκτηση αυτών των πλασμιδίων θα μπορούσε να διευκολύνει την ανάδυση της αντοχής στην κολιστίνη με την παροχή μιας πηγής

όμοιων ενθετικών αλληλουχιών, ικανών να στοχεύουν το *mgrB* γονίδιο. Αυτό μένει να επαληθευθεί σε μελλοντικές μελέτες.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Prescott L, Harley J, Klein D. “Microbiology”, 6th ed., McGraw-Hill, USA, 2005, ISBN:0072556781
2. Καραγκούνη – Κύρτσου Δ. Αμαλία «Μικροβιολογία», εκδόσεις Σταμούλης Αθαν., 1999, ISBN:960-351-204-4
3. Lu P.L, Liu Y.C, Toh H.S, et al. Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of Gram-negative bacteria causing urinary tract infections in the Asia-Pacific region: 2009–2010 results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Int. J. Antimicrobial Agents*, 40:S37-S43, 06, 2012
4. Wang S, Shaevitz J.W. The mechanics of shape in prokaryotes. *Front Biosci*, 5:564-74, 2013
5. Osborn MJ. Structure and biosynthesis of the bacterial cell wall. *Annual Review of Biochemistry*. 38: 501-538, 1969
6. [Enterobacteriaceae](#) Retrieved 21 July 2015.
7. Podschun R., and U. Ullmann. “*Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors.” *Clinical Microbiology Reviews* 11.4 (1998): 589–603.
8. Brisse S., Grimont F., Grimond P. A. D., The Genus *Klebsiella*, chapter 3.3.8, *Prokaryotes* (2006) 6:159–196, doi: 10.1007/0-387-30746-x\_8
9. [KLEBSIELLA SPP. PATHOGEN SAFETY DATA SHEET - INFECTIOUS SUBSTANCES](#) Retrieved 23 July 2015.
10. Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2006). The Genera *Klebsiella* and *Raoultella*. *The Enterobacteria* (2nd ed., pp. 115-129). Washington, USA: ASM Press.
11. Mavroidi A, Liakopoulos A, Gounaris A, et al. Successful control of a neonatal outbreak caused mainly by ST20 multidrug-resistant SHV-5-producing *Klebsiella pneumoniae*, Greece. *BMC Pediatrics*. 2014;14:105. doi:10.1186/1471-2431-14-105.
12. [Klebsiella pneumoniae. Pathogen Profile Dictionary](#) Retrieved 26 July 2015.
13. [Klebsiella Pneumoniae. EOL: Encyclopedia of Life](#) Retrieved 26 July 2015.
14. , Ryan, KJ; Ray, CG, eds. (2004). *Sherris Medical Microbiology* (4th ed.). McGraw Hill. ISBN 0-8385-8529-9.
15. Postgate, J (1998). *Nitrogen Fixation* (3rd ed.). Cambridge University Press. ISBN 978-0521640473.
16. [Klebsiella pneumoniae. Symptoms and Treatment](#) Retrieved 28 July 2015
17. [Klebsiella pneumoniae Capsule](#) Retrieved 29 July 2015

18. Schembri MA, Blom J, Krogfelt KA, Klemm P. Capsule and Fimbria Interaction in *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*. 2005;73(8):4626-4633. doi:10.1128/IAI.73.8.4626-4633.2005.
19. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010;2(5):a000414. doi:10.1101/cshperspect.a000414.
20. Raetz CRH, Whitfield C. Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annual review of biochemistry*. 2002;71:635-700. doi:10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.
21. Ramm LE, Whitlow MB, Mayer MM. Size distribution and stability of the transmembrane channels formed by complement complex C5b-9. *Mol Immunol*. 1983; 20:155-160.
22. Vinogradov E, Frirdich E, MacLean LL, Perry MB, Petersen BO, Duus JØ, Whitfield C. Structures of lipopolysaccharides from *Klebsiella pneumoniae*. Elucidation of the structure of the linkage region between core and polysaccharide O chain and identification of the residues at the non-reducing termini of the O chains. *J Biol Chem*. 2002 Jul 12;277(28):25070-81. Epub 2002 May 1. PubMed PMID: 11986326.
23. Hershberger C, Binkley SB. Chemistry and metabolism of 3-deoxy-D-mannooctulosonic acid. I. Stereochemical determination. *J Biol Chem*. 1968 Apr 10;243(7):1578-84. PubMed PMID: 4296687.
24. Tzeng YL, Datta A, Kolli VK, Carlson RW, Stephens DS (May 2002). "Endotoxin of *Neisseria meningitidis* composed only of intact lipid A: inactivation of the meningococcal 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase". *J. Bacteriol*. 184 (9): 2379–88. doi:10.1128/JB.184.9.2379-2388.2002. PMC 134985. PMID 11948150.
25. Liu P, Li P, Jiang X, et al. Complete Genome Sequence of *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* HS11286, a Multidrug-Resistant Strain Isolated from Human Sputum. *Journal of Bacteriology*. 2012;194(7):1841-1842. doi:10.1128/JB.00043-12.
26. [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae HS11286](#) Retrieved 2 August 2015.
27. McClelland, M., Florea, L., Sanderson, K., Clifton, S., Parkhill, J., Churcher, C., Dougan, G., Wilson, R., Miller, W. "Comparison of the *Escherichia coli* K-12 genome with sampled genomes of a *Klebsiella pneumoniae* and three *Salmonella enterica* serovars, *Typhimurium*, *Typhi* and *Paratyphi*". *Nucleic Acids Res.* 2000. Volume 28(24). p. 4974–4986
28. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11(4):589-603, 1998

29. Williams, P., P. A. Lambert, M.R. Brown, and R. J. Jones. The role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiella aerogenes* to serum killing and phagocytosis. *J. Gen. Microbiol.* 1983; 129:2181-2191.
30. Clegg S, Gerlach G.F. Enterobacterial Fimbriae. *J. Bacteriol.*, 169(3):934-938, 1987
31. Schembri AM, Blom J, Krogfelt AK, et al. Capsule and Fimbria Interaction in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 73(8):4626-4633, 2005
32. Gerlach, G. F., S. Clegg, and B.L. Allen. Identification and characterization of the genes encoding the type 3 and type 1 fimbrial adhesins of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 1989; 171:1262-1270
33. March C, Cano V, Moranta D, et al, Role of Bacterial Surface Structures on the Interaction of *Klebsiella pneumoniae* with Phagocytes, *PLoS ONE*, 8(2): e56847, 2013
34. Vinogradov E, Fridrich E, MacLean LL, et al.; Structures of Lipopolysaccharides from *Klebsiella pneumoniae* : Elucidation of the Structure of the linkage region between core and polysaccharide O and identification of the residues at the non-reducing termini of the chains, *J. Biol. Chem.*, 277:25070-25081, 2002
35. Trautmann M, Cross A S, Reich G, Held T K , Podschun R, Marre R. Evaluation of a competitive ELISA method for the determination of *Klebsiella* O antigens. *J Med Microbiol.* 1996; 44:44-51
36. Taylor P W. Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against gram-negative bacteria. *Microbiol Rev.* 1983; 47:46-83
37. Ramm LE, Whitlow MB, Mayer MM. Size distribution and stability of the transmembrane channels formed by complement complex C5b-9. *Mol Immunol.* 1983; 20:155-160.
38. Griffiths E, Chart H, Stevenson P. High-affinity iron uptake systems and bacterial virulence. In: Roth J A., editor. *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*. Washington , D.C: American Society for Microbiology; 1988. pp. 121-137
39. J. B. Neilands (1995). "Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds". *J. Biol. Chem.* 270 (45): 26723–26726.  
doi:10.1074/jbc.270.45.26723. PMID 7592901
40. J. H. Crosa, A. R. Mey, S. M. Payne (editor) (2004). *Iron Transport in Bacteria*. ASM Press. ISBN 1-55581-292-9
41. Highsmith A.K, Jarvis W.R. *Klebsiella pneumoniae*: selected virulence factors that contribute to pathogenicity. *Infect. Control*, 6(2):75-7, 1985
42. Jarvis WR, Munn VP, Highsmith AK, et al. The epidemiology of nosocomial infections caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Control.* 1985; 6:68-74.

43. Geerdes HF, Ziegler D, Lode H, et al. Septicemia in 980 patients at a university hospital in Berlin: Prospective studies during 4 selected years between 1979 and 1989. *Clin Infect Dis.* 1992; 15:991-1002.
44. Garcia de la Torre M, Romero-Vivas J, Martinez-Beltrán J, et al. *Klebsiella* bacteremia : An analysis of 100 episodes. *Rev Infect Dis.* 1985; 7:143-150. Bishara J, Leibovici L, Huminer D, et al. Five-year prospective study of bacteraemic urinary tract infection in a single institution. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1997; 16:563-567.
45. [Tests for identification of \*Klebsiella pneumoniae\*](#) Retrieved 13 August 2015
46. Χαράλαμπος Γκούβας: "Αντιμικροβιακά Φάρμακα και Λοιμώξεις", Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης, Αθήνα 1986
47. Ελένη Γιαμαρέλου: "Αρχές αντιμικροβιακής χημειοθεραπείας των λοιμώξεων". Περιοδικό Ιατρική, 1988, 53:631-636
48. Walsh C. "Antibiotics: actions, origins, resistance", American Society for Microbiology, Washington, 2003, ISBN:1-55581-254-6
49. Βατόπουλος Α. Η μικροβιακή αντοχή στα αντιβιοτικά :Ένα σημαντικό άγνωστο πρόβλημα της δημόσιας υγείας, Κοινωνία και Υγεία , σ.95-107, 2007
47. Bush K. Antimicrobial agents targeting bacterial cell walls and cell membranes. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 31 (1):43-56, 2012
48. Geisla M, Soares S, et al., Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. *J. Appl. Oral Sci.*, 20(3): 295–304, 2012
49. Birnbaum J, Kahan FM, Kropp H, MacDonald JS (June 1985). "Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics. Discovery and development of imipenem/cilastatin". *American Journal of Medicine* 78 (6A): 3-21. doi:10.1016/0002-9343(85)90097-X. ISSN 0002-9343. PMID 3859213
50. Cohen, N.C. (1983) "β-lactam antibiotics: Geometrical requirements for antibacterial activities." *J Med Chem* 26(2), 259–64.
51. Elander P.R. Industrial production of β-lactam antibiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61: 385-392, 2003
52. Velkov T, Roberts D.K. Pharmacology of polymyxins: new insights into an ‘old’ class of antibiotics. *Future Microbiol.*, 8(6): 10.2217, 2013
53. Daikos GL, Markogiannakis A, Souli M, Tzouvelekis LS. Bloodstream infections caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a clinical perspective. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012 Dec;10(12):1393-404. doi: 10.1586/eri.12.138. Review. PubMed PMID: 23253318.

54. Chen LF, Anderson DJ, Paterson DL. Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. *Infection and Drug Resistance*. 2012;5:133-141. doi:10.2147/IDR.S26613.
55. [Antimicrobial resistance interactive database \(EARS-Net\)](#) . Retrieved 12 August 2015.
56. Velkov T, Roberts D.K. Pharmacology of polymyxins: new insights into an ‘old’ class of antibiotics. *Future Microbiol.*, 8(6): 10.2217, 2013
57. Olaitan, Abiola O., Serge Morand, and Jean-Marc Rolain. “Mechanisms of Polymyxin Resistance: Acquired and Intrinsic Resistance in Bacteria.” *Frontiers in Microbiology* 5 (2014): 643. PMC. Web. 28 Aug. 2015.
58. Huang YH, Ferrières L, Clarke DJ. *Res Microbiol*. The role of the Rcs phosphorelay in *Enterobacteriaceae*. *Res Microbiol*. 2006 Apr;157(3):206-12. Epub 2006 Jan 4.
59. Kawulka KE, Sprules T, Diaper CM, Whittal RM, McKay RT, Mercier P, Zuber P, Vederas JC (March 2004). "Structure of subtilosin A, a cyclic antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual sulfur to alpha-carbon cross-links: formation and reduction of alpha-thio-alpha-amino acid derivatives". *Biochemistry* 43 (12): 3385–95. doi:10.1021/bi0359527. PMID 15035610
60. Cannatelli A, D’Andrea MM, Giani T, et al. In Vivo Emergence of Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Producing KPC-Type Carbapenemases Mediated by Insertional Inactivation of the PhoQ/PhoP *mgrB* Regulator. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013;57(11):5521-5526. doi:10.1128/AAC.01480-13.
61. Krell T, Lacal J, Busch A, Silva-Jiménez H, Guazzaroni ME, Ramos JL. Bacterial sensor kinases: diversity in the recognition of environmental signals. *Annu Rev Microbiol*. 2010;64:539-59. doi:10.1146/annurev.micro.112408.134054. Review. PubMed PMID: 20825354.
62. Lippa AM, Goulian M. Feedback Inhibition in the PhoQ/PhoP Signaling System by a Membrane Peptide. Burkholder WF, ed. *PLoS Genetics*. 2009;5(12):e1000788. doi:10.1371/journal.pgen.1000788.
63. Poirel L, Jayol A, Bontron S, Villegas MV, Ozdamar M, Türkoglu S, Nordmann P. The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Jan;70(1):75-80. doi:10.1093/jac/dku323. Epub 2014 Sep 3. PubMed PMID: 25190723.
64. Wright MS, Suzuki Y, Jones MB, et al. Genomic and Transcriptomic Analyses of Colistin-Resistant Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Reveal Multiple Pathways



- of Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015;59(1):536-543.  
doi:10.1128/AAC.04037-14.
65. Cannatelli A, Giani T, D'Andrea MM, et al. MgrB Inactivation Is a Common Mechanism of Colistin Resistance in KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* of Clinical Origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014;58(10):5696-5703.  
doi:10.1128/AAC.03110-14.
66. Cannatelli A, Santos-Lopez A, Giani T, Gonzalez-Zorn B, Rossolini GM. Polymyxin resistance caused by *mgrB* inactivation is not associated with significant biological cost in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 May;59(5):2898-900. doi: 10.1128/AAC.04998-14. Epub 2015 Feb 17. PubMed PMID: 25691629; PubMed Central PMCID: PMC4394794.
67. Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, et al. *An Introduction to Genetic Analysis*. 7th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Bacterial insertion sequences. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21779/>
68. Σκορίλας Ανδρέας. Αρχές Κλινικής Χημείας και Μοριακής Διαγνωστικής. 6:106-109, 2007
69. Σκορίλας Ανδρέας. Αρχές Κλινικής Χημείας και Μοριακής Διαγνωστικής. 6:133-136, 2007
70. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, et al. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J. Clin. Microbiol*, 43:4178-82, 2005
71. Walsh, T.R., Toleman, M.A., Poirel, L., Nordmann, P., (2005). Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 306–325.
72. Moland, E.S., Hanson, N.D., Herrera, V.L., Black, J.A., Lockhart, T.J., Hossain, A., Johnson, J.A., Goering, R.V., Thomson, K.S., (2003). Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 711–714.
73. [Θεραπευτική των λοιμώξεων](#) . Retrieved 8 March 2016
74. [Vitek 2:Αναλυτής ταυτοποίησης και ευαισθησίας μικροβίων](#) . Retrieved 8 March 2016

## Παραπομπές

i) **Rcs phosphorelay system** : regulator of the capsule synthesis phosphorelay system, είναι ένα πολύπλοκο σύστημα μεταγωγής σήματος που υπάρχει αποκλειστικά στα Εντεροβακτηριακά.

ii) **Microcins** : είναι πολύ μικρές βακτηριοκίνες, που αποτελούνται από σχετικά λίγα πεπτίδια

iii) **sensor kinase** : Τα βακτήρια αισθάνονται και αποκρίνονται σε ποικιλία φυσικών και χημικών σημάτων. Κύρια εργαλεία αίσθησης και απόκρισης σε αυτά τα σήματα είναι τα συστήματα δύο στοιχείων, two-component systems ή TCSs, που έχουν έναν αισθητήρα ιστιδίνης κινάσης, sensor histidine kinase ή SK, και έναν ρυθμιστή απόκρισης, response regulator ή RR σαν βασικά στοιχεία)

iv) **ορθόλογα** : Ο όρος αναφέρεται σε πρωτεΐνες ή γονίδια με μεγάλη ομολογία που βρίσκονται όμως σε διαφορετικούς οργανισμούς. Θεωρείται ότι τα μόρια αυτά προήλθαν από κάποιο προγονικό γονίδιο με εξελικτική διαφοροποίηση στα διαφορετικά είδη. Η εκτίμηση της εξελικτικής απόστασης μεταξύ γονιδίων ανάγεται στο σημείο της ειδογένεσης.

v) **Αλληλουχίες εισδοχής (ένθεσης) ή στοιχεία αλληλουχιών εισδοχής (Insertion sequences insertion-sequence (IS) elements)** : είναι τμήματα βακτηριακού DNA που μπορούν να μετακινηθούν από μία θέση σε ένα χρωμόσωμα σε διαφορετική θέση στο ίδιο χρωμόσωμα ή σε διαφορετικό χρωμόσωμα. Όταν στοιχεία IS εμφανίζονται στη μέση του γονιδίου, διακόπτουν την κωδικοποιούσα αλληλουχία και απενεργοποιούν την έκφραση αυτού του γονιδίου. Εξαιτίας του μεγέθους τους και σε κάποιες περιπτώσεις, της παρουσίας μεταγραφικών ή μεταφραστικών σημάτων τερματισμού, τα στοιχεία IS elements μπορούν επίσης να παρεμποδίσουν την έκφραση άλλων γονιδίων στο ίδιο οπερόνιο αν αυτά τα γονίδια βρίσκονται καθοδικά (downstream) του υποκινητή του οπερονίου.

## Συντομογραφίες

**KPC-KP** (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing *K. pneumoniae*) : *Klebsiella pneumoniae* που παράγει καρβαπενεμάσες *K. pneumoniae*

**CPE** (Carbapenemase Producing *Enterobacteriaceae*) : Εντεροβακτηριακά που παράγουν καρβαπενεμάσες

**ESBL** (Extended-Spectrum Beta Lactamases) : Ευρέως φάσματος β-λακταμάσες

**TCS** (Two-Component System) : (Ρυθμιστικό) Σύστημα δύο στοιχείων

**SK** (Sensor histidine Kinase) : Αισθητήρας ιστοιδίνης κινάσης

**RR** (Response Regulator) : Ρυθμιστής απόκρισης

**LPS** (lipopolysaccharide) : Λιποπολυσακχαρίτης

**CPS** (Capsular Polysaccharides) : Καψικοί πολυσακχαρίτες

**OMPs** (Outer Membrane Proteins) : Πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης

**PBP** (Penicillin Binding Protein) : Πενικιλινοδεσμευτική πρωτεΐνη

**L-Ara4N** (4-amino-4-deoxy-L-arabinose) : 4-άμινο-4-δεόξυ-L-αραβινόζη

**FCL** (Feedforward connector loop) : Πρόσω-συνδετική θηλιά

**MIC** (Minimum Inhibitory Concentration) : Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση

**DDD** (Defined Daily Dose) : Καθορισμένη ημερήσια δόση

**PCR** (Polymerase Chain Reaction) : Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

**MLST** (Multilocus Sequence Typing) : Πολυτοπική τυποποίηση αλληλουχίας

**ST** (Sequence Type) : Τύπος αλληλουχίας

**IS** (Insertion Sequence) : Αλληλουχία εισδοχής

**Col<sup>R</sup>** (Colistin<sup>Resistant</sup>) : Ανθεκτικά στην κολιστίνη

**Col<sup>S</sup>** (Colistin<sup>Sensitive</sup>) : Ευαίσθητα στην κολιστίνη

**nt** (nucleotide) : Νουκλεοτίδιο

**aa** (amino acid) : Αμινοξύ