



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

« Διερεύνηση της διασποράς καρβαπενέμη-ανθεκτικών στελεχών *Acinetobacter baumannii*, στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας, το έτος 2018 »

Γαλάνη Βασιλική

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Παπαγιαννίτης Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας, Επιβλέπων
- Πετεινάκη Ευθυμία, Καθηγήτρια Μικροβιολογίας
- Σπελέτας Ματθαίος, Καθηγητής Ανοσολογίας

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

Λάρισα, Φεβρουάριος, 2020



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



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

**MASTER THESIS
«Investigation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in
University Hospital of Larissa, during 2018»**

**By
Galani Vasiliki**

Three-membered examination committee:

- Papagiannitsis Konstantinos, Assistant professor of Microbiology, Supervisor
- Petinaki Efthimia, Professor of Microbiology
- Speletas Matthaios, 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 Applications of Molecular Medicine

Larissa, February, 2020

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

σελ.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ (Ευχαριστίες)	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	10
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	13
1.1 Ταξινόμηση και διαχωρισμός του είδους	14
1.2 Γενικά χαρακτηριστικά	19
1.2.1 Μορφολογία	19
1.2.2 Καλλιέργεια	19
1.3 Ταυτοποίηση	21
1.3.1 Αυτοματοποιημένες τεχνικές ταυτοποίησης	21
1.3.2 Μοριακές τεχνικές ταυτοποίησης	22
1.3.2.1 ARDRA - (amplified rdna restriction analysis)	22
1.3.2.2 AFLP (amplified fragment length polymorfism)	23
1.3.2.3 Ριβοτυποποίηση	23
1.4 Μοριακές μέθοδοι τυποποίησης του <i>A.baumannii</i>	24
1.4.1 PFGE (pulse field gel electrophoresis)	25
1.4.2 RFLP (restriction fragment length polymorphism)	25
1.4.3 LST	26
1.4.4 MLST	26
1.5 Οικολογία	27
1.6 Λοιμογόνοι παράγοντες	28
1.7 Λοιμώξεις απο <i>A.baumannii</i>	29
1.8 Θεραπεία	30
1.9 Αντοχή στα αντιβιοτικά	32
1.9.1 Αντοχή στις β-λακτάμες	40
1.9.1.1 Ενζυματικοί μηχανισμοί	40
1.9.1.2 Μη ενζυματικοί μηχανισμοί	43
1.9.2 Αμινογλυκοσίδες	44
1.9.3 Κινολόνες	44
1.9.4 Τετρακυκλίνες και γλυκυλκυκλίνες	44

1.9.5	Πολυμυξίνες	45
1.10	Επιδημιολογία του <i>A.baumannii</i>	46
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		48
2.	Υλικά και μέθοδοι	49
2.1	Υλικό	49
2.2	Μέθοδοι	50
2.2.1	Καλλιέργεια κλινικών δειγμάτων απο τα οποία απομονώθηκαν στελέχη <i>A.baumannii</i>	51
2.2.2	Ταυτοποίηση στελεχών και μελέτη ευαισθησίας	51
2.3	Μοριακός έλεγχος για την ταυτοποίηση του <i>A.baumannii</i>	50
2.3.1	Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA (DNA extraction)	50
2.3.2	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chaine reaction,PCR)	51
2.4	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), για την ανίχνευση γονιδίων αντοχής ανίχνευση γονιδίων αντοχής	53
2.4.1	Μοριακή ανίχνευση καρβαπενεμασών και αλληλουχιών εισδοχής.....	54
2.4.2	Μοριακός έλεγχος γονιδίων που σχετίζονται με την αντοχή στην κολιστίνη	55
2.5	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	57
2.6	Καθαρισμός προϊόντων PCR	58
2.7	Αλληλούχιση (Sequencing)	60
2.8	Μοριακή τυποποίηση στελεχών με την μέθοδο (MLST)	61
2.8.1	Γονίδια της μεθόδου MLST για το <i>A.baumannii</i>	61
2.9	Ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE)	63
2.9.1	PFGE τυποποίηση των στελεχών	64
2.10	Ανάλυση πλασμιδίων	65
2.10.1	Πρωτόκολλο PGFE S1	65
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	67
3.1	Έλεγχος ευαισθησίας στις καρβαπενέμες	68
3.2	Δοκιμασία PCR για την ανίχνευση του <i>bla_{OXA-51}</i>	68
3.3	Ανίχνευση καρβαπενεμασών	68
3.4	Τυποποίηση στελεχών με MLST	69
3.5	Τυποποίηση στελεχών με PGFE	69
3.6	Έλεγχος ευαισθησίας στην κολιστίνη	70

3.7	Αποτελέσματα ανάλυσης πλασμιδίων	71
4.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	72
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	75

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην καθηγήτρια Μικροβιολογίας κ.Πετεινάκη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την ευκαιρία που μου έδωσε με την ανάθεση της παρούσας μελέτης, καθώς και για την πολύτιμη συμβολή της στην διεκπαιρέωσή της.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα τον επιβλέποντα επίκουρο καθηγητή Μικροβιολογίας, κ.Κωνσταντίνο Παπαγιαννίτση, για το αμείωτο επιστημονικό ενδιαφέρον και την πολύτιμη καθοδήγηση και συμπαράστασή του καθόλη τη διάρκεια της μελέτης που συνέβαλαν καθοριστικά στην επιτυχή ολοκλήρωσή της.

Ένα θερμό ευχαριστώ στον καθηγητή Ανοσολογίας κ.Ματθαίο Σπελέτα για την ευκαιρία που μου έδωσε.

Τέλος, ένα ξεχωριστό ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου, χρωστάω στους γονείς μου Γαλάνη Γιώργο και Γαλάνη Θωμαή καθώς και στον αδερφό μου Γαλάνη Δημήτρη, που είναι πάντα στο πλάι μου και με την αμέριστη υποστήριξή τους, στηρίζουν κάθε μου προσπάθεια.

... στη λατρεμένη μου κόρη, Δήμητρα!

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το *Acinetobacter baumannii* έχει αναδειχθεί ως κυρίαρχη αιτία νοσοκομειακών λοιμώξεων, ιδιαίτερα μεταξύ των βαρέως πασχόντων ασθενών. Η αυξανόμενη αντοχή στις καρβαπενέμες, η οποία έχει συσχετιστεί με την παραγωγή της καρβαπενεμάσης τύπου OXA β-λακταμάσης έχει αναφερθεί σε διεθνείς αναφορές. Ο στόχος της μελέτης αυτής ήταν να καθορίσει τα μοριακά χαρακτηριστικά των καρβαπενέμη-ανθεκτικών *A. baumannii* στελεχών και να περιγράψει τα επιδημιολογικά τους χαρακτηριστικά.

Συνολικά μελετήθηκαν 120 στελέχη *A. baumannii*-καρβαπενέμη ανθεκτικά (τα 10 πρώτα στελέχη κάθε μήνα) που απομονώθηκαν το 2018 από ασθενείς που νοσηλεύτηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Η ταυτοποίηση των στελεχών και ο έλεγχος ευαισθησίας ενάντια σε διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες πραγματοποιήθηκε με την χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος Vitek 2 (BioMerieux, France). Τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις καρβαπενεμάσες ελέγχθηκαν με την μέθοδο της PCR. Το σύνολο των απομονωθέντων *A. baumannii* τυποποιήθηκαν με την PFGE και την MLST. Το γενετικό περιβάλλον των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις καρβαπενεμάσες ενισχύθηκε με PCR και αλληλουχίστηκε. Τα απομονωθέντα στελέχη επίσης ελέγχθησαν για την παρουσία μεταλλάξεων στα *lpxC*, *lpxD*, *lpxA* και *pmrCAB* γονίδια, τα οποία σχετίζονται με την εμφάνιση αντοχής στην κολιστίνη. Επιπρόσθετα, όλα τα γονίδια ελέγχθησαν για την παρουσία του πλασμιδιακά μεταφερόμενου γονιδίου *mcr*, υπεύθυνου επίσης για την αντοχή στην κολιστίνη.

Η πλειονότητα των *A. baumannii* που απομονώθηκαν ήταν ανθεκτικά στις καρβαπενέμες (n=118: 98%), ενώ παρατηρήθηκε και διαφοροποίηση ως προς την ευαισθησία στα μη β-λακταμικά αντιβιοτικά. Όλα τα καρβαπενέμη-ανθεκτικά *A. baumannii* στελέχη έφεραν το *bla*_{OXA-23} γονίδιο. Κανένα άλλο γονίδιο που να κωδικοποιεί για καρβαπενεμάσες όπως τα *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} και *bla*_{VIM} δεν ανιχνεύθηκε. Ο πληθυσμός των καρβαπενέμη-ανθεκτικών *A. baumannii* στελεχών που μελετήθηκε με την MLST κατηγοριοποιήθηκε σε 2 κλώνους (STs). Ο κλώνος ST2 (Pasteur) που αντιστοιχεί στον διεθνή κλώνο II ήταν ο επικρατέστερος, αριθμώντας 108 στελέχη. Τα εναπομείναντα 12 στελέχη ανήκαν στον κλώνο ST409. Σε συμφωνία με την MLST ανάλυση, η τυποποίηση με την PFGE ανέδειξε την παρουσία δυο κλώνων. Σε όλες τις περιπτώσεις, το *bla*_{OXA-23} εμφανίστηκε ως μέρος του προηγούμενα χαρακτηρισμένου τρανσποζονίου Tn2006, με δυο αντίγραφα αλληλουχίας εισδοχής IS*Aba1* σε αντίθετο προσανατολισμό. Η αλληλούχιση του *lpx* αποκάλυψε την παρουσία τεσσάρων αμινοξικών αλλαγών σε όλα τα κολιστίνη-ευαίσθητα και στα κολιστίνη-ανθεκτικά στελέχη, σε σύγκριση με τις αλληλουχίες του *A. baumannii* ATCC 17987. Επιπλέον, η αλληλούχιση των γονιδίων *pmrCAB* εντόπισε δύο διαφορετικά μοντέλα αμινοξικών μεταλλαγών που δεν ανιχνεύονται στο ATCC 17987 στέλεχος. Ενδιαφέρον παρουσιάζει, ότι όλα τα

στελέχη που ανήκουν στον κλώνο ST 409 είναι ευαίσθητα στην κολιστίνη. Παρόμοιες αντικαταστάσεις σε γονίδια *lpxACD* και *pmrCAB*, έχουν αναφερθεί στο παρελθόν σε απομονωθέντα στελέχη *A.baumannii* κατά την περίοδο 2012-2014 στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας. Επιπλέον δεν βρέθηκαν γονίδια *mcr*, σε κανένα από τα στελέχη *A.baumannii* που απομονώθηκαν.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν και υπογραμμίζουν την κλωνική διασπορά των ST2 *A. baumannii* που παράγουν την OXA-23 καρβαπενεμάση στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με αντίστοιχα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας, που παρουσιάζουν την διασπορά στελεχών που παράγουν την OXA-23 καρβαπενεμάση και ανήκαν σύμφωνα με την 3LST στον ST 101 κλώνο, που αντιστοιχεί στον διεθνή κλώνο II. Η αυξημένη αντοχή στην κολιστίνη που παρουσιάζουν τα στελέχη που ανήκουν στον ST2 κλώνο συνηγορούν υπέρ της επικράτησής του, έναντι αυτών που ανήκουν στον ST409, γεγονός που πρέπει να μας κατευθύνει για την ανεύρεση νέων θεραπευτικών μέσων, τα οποία θα θεραπεύουν αποτελεσματικά τις λοιμώξεις από τα συγκεκριμένα στελέχη, και επιπρόσθετα θα μειώσουν την διασπορά τους, περιορίζοντας την ενίσχυση των μηχανισμών αντοχής που αναπτύσσουν. Στοχεύοντας στην μείωση της διαφοράς αυτών των παθογόνων στελεχών υπάρχει άμεση ανάγκη για βελτιστοποίηση των συνθηκών υγιεινής. Περαιτέρω, η ανεύρεση μερικών σποραδικών στελεχών *A.baumannii* που παράγουν OXA-23 και ανήκουν στο ST409 υποδηλώνει την παρούσα πρόοδο.

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii has emerged as a leading cause of nosocomial infections, particularly among critically ill patients. Increasing resistance to carbapenems associated with the production of acquired carbapenem-hydrolysing OXA-type class D beta-lactamases has been reported worldwide. Therefore, the aim of this study was to determine the molecular characteristics of the carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates and to describe the epidemiological traits.

A total of 120 *A. baumannii* exhibiting resistance to carbapenems (10 first isolates per month), isolated in 2018, from patients treated in University Hospital of Larissa (UHL) (Greece) were included in this study. Identification to species level and susceptibility testing against various antimicrobial agents was performed by the automated system Vitek 2 (BioMerieux, France). Carbapenemase-encoding genes were identified by PCR. All *A. baumannii* isolates were typed by PFGE and MLST. The genetic environment of carbapenemase-encoding genes was amplified and sequenced. The isolates were also examined for the presence of mutations in the *lpxC*, *lpxD*, *lpxD* and *pmrCAB* genes, which have been associated with the emergence of colistin resistance. The genes were amplified by PCR. Additionally, all isolates were screened for the presence of plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr*, also by PCR.

The majority of *A. baumannii* isolates was resistant to carbapenems (n=118; 98%), while variations in the MICs of non- β -lactam antibiotics were observed. All carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates carried *bla*_{OXA-23} gene. No other carbapenemase-encoding genes, *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} and *bla*_{VIM}, were found. The population structure of carbapenem-resistant isolates studied by MLST was classified into 2 sequence types (STs). The clone ST2 (Pasteur), which corresponds to the international clonal lineage II, was the most prevalent, accounting for 106 isolates. The remaining twelve isolates belonged to ST409. In agreement with MLST analysis, PFGE typing showed the presence of two clones. In all cases, *bla*_{OXA-23} occurred as part of the previously characterized Tn2006 transposon bracketed by two IS*Aba1* in opposite orientation. In order to unravel the dynamics for the successful dissemination of ST409 *A. baumannii* isolates in UHL, selected isolates were characterized by whole genome sequencing (WGS). WGS data showed that isolates belonging to ST409 exhibited. Of note was that 48.3% of carbapenem-resistant isolates exhibited also resistance to colistin. Sequencing of *lpx* revealed the presence of four amino acid mutations in all colistin-resistant and colistin-susceptible isolates, compared to the sequences of the *A. baumannii* ATCC 17987. Furthermore, sequencing of *pmrCAB* genes detected two different patterns of amino acid substitutions that were not detected in the ATCC 17987 strain. Interestingly, all isolates belonging to ST409 susceptible to colistin. Similar substitutions, in *lpxACD* and *pmrACB*

genes, have been previously reported from *A.baumannii* isolate during 2012-2014 in UHL. Moreover, no *mcr* genes were found among out *A.baumannii* isolates.

These findings underscore the clonal spread of ST2 *A. baumannii* isolates producing OXA-23, in UHL. The increased resistance to non- β -lactams, like colistin, could be involved in the predominance of ST2 isolate against other clones in our clinical setting. These results are in agreement with the respective findings of previous studies from UHL, showing the dissemination of the OXA-23-producing isolates that belonged to 3LST ST101, which corresponds to the international clonal lineage II. Thus, in order to control the spread of this challenging pathogen, there is an immediate need to improve the used hygiene practices. Furthermore, a few sporadic OXA-23-producing *A. baumannii* isolates that belonged to ST409 were identified, underlining their ongoing evolution.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα βακτήρια του γένους *Acinetobacter* παρουσιάζουν ευρεία διασπορά στη φύση και συχνά προκαλούν αποικισμό και λοιμώξεις νοσοκομειακών ασθενών, ιδιαίτερα στις μονάδες εντατικής θεραπείας. Το *Acinetobacter baumannii* είναι υπεύθυνο για μια ποικιλία σοβαρών λοιμώξεων, όπως είναι η νοσοκομειακή πνευμονία, η βακτηριαμία, η νοσοκομειακή μηνιγγίτιδα, λοιμώξεις του ανώτερου ουροποιητικού καθώς και σποραδικά περιστατικά ενδοκαρδίτιδας. Η δυνατότητα αυτών των βακτηρίων να επιβιώνουν σε ξηρές και ανόργανες επιφάνειες και η ικανότητά τους να αναπτύσσουν αντοχή στα αντιβιοτικά, ανταλλάσσοντας γενετικό υλικό, ευθύνονται για την εξάπλωση επιδημιών. Η αντοχή στις καρβαπενέμες για τα *A.baumannii* γίνεται τα τελευταία χρόνια όλο και συχνότερο φαινόμενο σε παγκόσμιο επίπεδο με την πλειονότητα των στελεχών στις ΜΕΘ να είναι ανθεκτικά στην ιμιπενέμη και την μεροπενέμη και συχνά παν-ανθεκτικά, περιορίζοντας συνεχώς τις θεραπευτικές επιλογές. Η μεγάλη αύξηση της συχνότητας των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών (carbapenem resistant) *A.baumannii* (CRAB) μπορεί να οφείλεται σε μια σειρά παραγόντων, όπως είναι η υπερβολική χορήγηση καρβαπενεμασών, η παραμονή των ασθενών στις ΜΕΘ, η ανοσοκαταστολή κ.τ.λ. Ένα μικροβιακό στέλεχος μπορεί να αναπτύξει αντοχή στα αντιβιοτικά είτε λόγω της εμφάνισης μεταλλάξεων σε ήδη υπάρχοντα γονίδια του οργανισμού, είτε λόγω της απόκτησης εξωγενών γονιδίων αντοχής. Αποτελούν μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας, λόγω των περιορισμένων θεραπευτικών επιλογών για την αντιμετώπισή του [1]. Η διερεύνηση της πληθυσμιακής σύστασης των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *A. baumannii* θα δια φωτίσει την εξέλιξη αυτού του ανησυχητικού φαινομένου. Επιπλέον, οι πληροφορίες που θα συλλεχθούν μπορεί να συμβάλουν στον περιορισμό της διασποράς των ανθεκτικών στελεχών *A. baumannii*.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

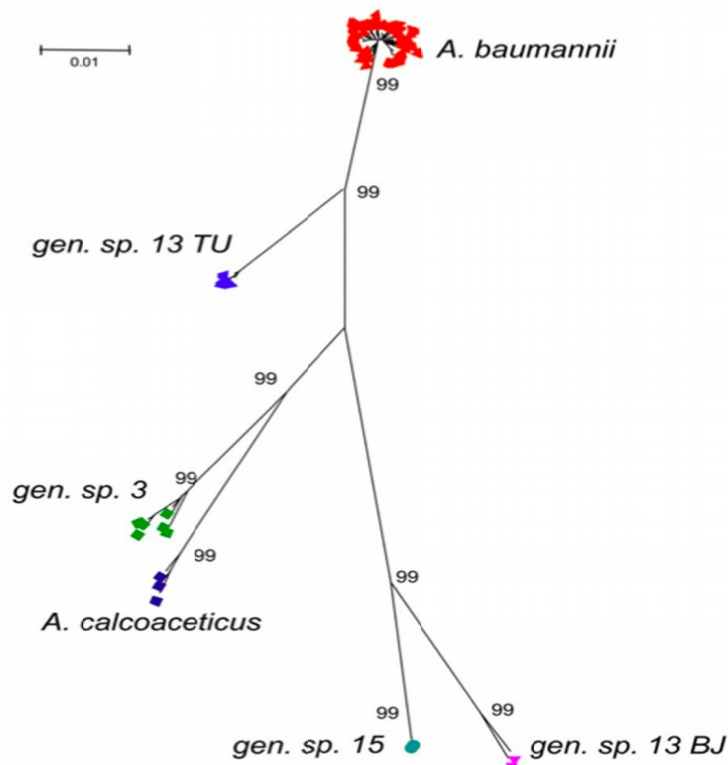
1.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ

Η ιστορία του γένους *Acinetobacter* ξεκινάει με την πρώτη απομόνωση του, στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, όταν ο Δανός μικροβιολόγος, Beijerinck, το 1991 περιέγραψε έναν μικροοργανισμό που απομόνωσε από χώμα με άλατα οξικού Ca^{2+} [2] και το ονόμασε *Micrococcus calcoaceticus*. Τα βακτηρίδια που σήμερα ταξινομούνται ως μέλη του γένους *Acinetobacter*, έχουν μακρά ιστορία αλλαγών στην ταξινόμησή τους. Έτσι στα χρόνια που ακολούθησαν παρατηρήθηκαν πολλοί παρόμοιοι μικροοργανισμοί που ταξινομήθηκαν σε τουλάχιστον 15 διαφορετικά γένη και είδη. Από τα πιο γνωστά είναι τα *Bacterium aniratu* [3], *Herellea vaginicola* και *Mima polymorpha*, *Achromobacter aniratus* [4], *Alcaligenes haemolysans* [5], *Moraxella glucitolitica*, *Moraxella Iwoffi* [6]. Το γένος *Acinetobacter*, το οποίο έχει ονομαστεί από την ελληνική λέξη «ακίνητος», προτάθηκε το 1954 από τους Brisou και Prenot, οι οποίοι περιέγραψαν μια ετερογενή ομάδα από Gram αρνητικά, αζυμωτικά, ακίνητα, οξειδάση θετικά και οξειδάση αρνητικά σαπρόφυτα που διακρίνονται από τα άλλα βακτηρίδια λόγω της έλλειψης χρωματισμού και με αυτόν τον τρόπο θέλησαν να τα διαφοροποιήσουν από τους κινητούς μικροοργανισμούς του *Achromobacter* [4], κάτι που έγινε ευρύτερα αποδεκτό το 1968. Μετά από εκτενείς μελέτες επί των τροφικών τους απαιτήσεων [7] παρατηρήθηκε ότι τα οξειδάση θετικά στελέχη διαφέρουν από τα οξειδάση αρνητικά. Έτσι, το 1971, πρότειναν στην «Επιτροπή Ταξινόμησης» των *Moraxella* και σχετικών με αυτές βακτηρίων (Subcommittee of the Taxonomy of *Moraxella* and Allied Bacteria), να προτείνει ότι το γένος *Acinetobacter* αποτελείται αποκλειστικά από οξειδάση αρνητικά στελέχη [8]. Στην έκδοση του 1974 στο *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* στο γένος *Acinetobacter* εντάσσεται το είδος *A. calcoaceticus* και μετά από λίγα χρόνια, το 1980, προστίθεται στη λίστα «Approved list of Bacterial names» και δεύτερο είδος το *A. Iwoffi*.

Σήμερα το γένος *Acinetobacter* ορίζεται ως το σύνολο των Gram αρνητικών κοκκοβακτηριδίων με αναλογία βάσεων G-C στο γένωμά τους 39-47% [9]. Είναι αυστηρά αερόβια, ακίνητα, καταλάση θετικά και οξειδάση αρνητικά κοκκοβακτηρίδια. Η πλειονότητα των στελεχών *Acinetobacter* αναπτύσσεται μεταξύ 20°C και 37°C, ενώ η ευνοϊκότερη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 33-35°C. Τα είδη *Acinetobacter* από δείγματα ανθρώπινης προέλευσης αναπτύσσονται εύκολα στα συνήθη στερεά θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιούνται στη ρουτίνα των κλινικών μικροβιολογικών εργαστηρίων (όπως το αιματούχο άγαρ ή το tryptic soy άγαρ), σε θερμοκρασία επώασης 37°C, χωρίς την ανάγκη ειδικών αναπτυξιακών παραγόντων, ενώ ανάγουν σπάνια τα νιτρικά. Τα περισσότερα στελέχη *Acinetobacter* μπορούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υλικό που περιέχει αμμώνιο ή νιτρικά άλατα ως πηγή αζώτου και οξικό ή γαλακτικό ή πυροσταφιλικό οξύ ως πηγή άνθρακα.

Το γένος *Acinetobacter* αρχικά είχε ταξινομηθεί στην οικογένεια Neisseriaceae, με ένα μόνο είδος το *Acinetobacter calcoaceticus* [10]. Νεώτερα δεδομένα προτείνουν την ταξινόμηση των μελών του γένους *Acinetobacter* στη νέα γενιά *Moraxellaceae* στη σειρά *Gammaproteobacteria*, που περιλαμβάνει τα γένη *Moraxella*, *Acinetobacter* *Psychrobacter* και συγγενείς μικροοργανισμούς [11] ενώ με βάση την μελέτη του 16S rRNA, καθώς και με δοκιμασίες υβριδισμού rRNA-DNA [12], η οικογένεια *Moraxellaceae* αποτελεί ένα ξεχωριστό φυλογενετικό κλάδο της υπεριοικογένειας (super family) II των Proteobacteria, και συγκεκριμένα στην γ-υποκλάση των Proteobacteria [12].

Δύσκολη επίσης υπήρξε και η ταξινόμηση των στελεχών του γένους *Acinetobacter* σε επίπεδο είδους. Ως «μικροβιακό είδος» ορίζουμε το σύνολο των στελεχών ενός μικροοργανισμού με κοινά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Οι μοριακές μέθοδοι σήμερα, με την δυνατότητα της χαρτογράφησης του γενετικού υλικού μας παρέχουν αξιόπιστα και αντικειμενικά δεδομένα ταξινόμησης των μικροβίων. Ως μικροβιακό είδος επισήμως ορίζεται το σύνολο των στελεχών με τουλάχιστον 70% DNA→DNA ομολογία και μέγιστη διαφορά 5°C στην θερμοκρασία αποδιάταξης του DNA (Tm) [13]. Ο υβριδισμός των νουκλεϊκών οξέων (DNA – DNA hybridization) αποτελεί τη μέθοδο διαχωρισμού που έγινε ευρύτερα γνωστή. Από τα πρώτα κιάλας πειράματα υβριδισμού που έγιναν με φίλτρα νιτροκυτταρίνης (nitrocellulose filter) διαπιστώθηκε η ετερογένεια του *Acinetobacter spp* [14] και έτσι, το 1980, στον εγκεκριμένο κατάλογο ονομάτων των βακτηριδίων συμπεριλήφθησαν μόνο δύο είδη, τα *A. calcoaceticus* και *A. lowffii* (Approved List of bacterial Names) [15]. Στην πρώτη ταξινόμηση που έγινε από τους Tjernberg και Ursing (1989) [16] και παρά τις μικρές ασυμφωνίες μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων, ταυτοποιήθηκαν 19 DNA – DNA ομόλογες ομάδες (genomic species), εκ τω οποίων 7 ονομάστηκαν με συμβατικά ονόματα (*A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. junni*, *A. johnonii*, *A. lowffii* και *A. radioresistens*), ενώ τα υπόλοιπα πήραν μόνο αριθμούς. Αναπτύχθηκαν έπειτα και άλλες, νέες μέθοδοι διαχωρισμού και ταξινόμησης των ειδών του γένους *Acinetobacter*. Αυτές είναι η ανάλυση του ενισχυμένου ριβοσωμικού DNA με περιοριστικά ένζυμα (restriction analyses of amplified ribosomal DNA ή ARDA) [17], η ανάλυση του 16S-23S rRNA γονιδίου [18], η ανάλυση του ριβοσωμικού οπερονίου [19], η ανίχνευση του γονιδίου *recA* [20], η ριβοτυπία [19], και η ανάλυση χρωμοσωμικού αποτυπώματος με περιοριστικά ένζυμα [21]. Όμως 4 είδη και συγκεκριμένα το *A. calcoaceticus*, το *A. baumannii*, το *A. genomic species 3* και το *A. genomic species 13TU* δεν μπορούν να διαχωριστούν με φαινοτυπικές διαδικασίες, εξαιτίας της τεράστιας ομοιότητάς τους. Έτσι αναφερόμαστε ομαδικά σε αυτά τα είδη ως *A. calcoaceticus-A.baumannii complex* [22]. Αξίζει τέλος να αναφερθεί ότι αυτή η ομάδα ευθύνεται για το μεγαλύτερο μέρος των κλινικών εκδηλώσεων που οφείλονται στον συγκεκριμένο μικροοργανισμό.



Εικόνα 1. Φυλογενετική ανάλυση 173 στελεχών (Diancourt et al, 2010)

Πιο συγκεκριμένα από αυτό το group το *A. baumannii* έχει την μεγαλύτερη κλινική σημασία μιας και είναι υπεύθυνο για τις νοσοκομειακές λοιμώξεις [24]. Το 1993, μελέτη έδειξε ότι από τα 584 στελέχη *Acinetobacter spp* τα 426, δηλαδή ποσοστό 73%, ήταν *A. baumannii* [25]. Επίσης, σε μελέτη που διεξήχθη στο Ηνωμένο Βασίλειο κατά τα έτη 1998-2006, παρατηρήθηκε ότι στο σύνολο 399 περιστατικών βακτηριαμίας που προκλήθηκαν από *Acinetobacter*, το *A. baumannii* ήταν ο κυριότερος αιτιολογικός παράγοντας του γένους [26].

Μέχρι σήμερα, το γένος *Acinetobacter* αποτελείται από 53 διαφορετικά είδη με έγκυρα δημοσιευμένα ονόματα (<http://apps.szu.cz/anemec/Classification.pdf>), τα οποία παρατίθενται στον Πίνακα 1. Η δημοσίευση ενός προτεινόμενου νέου ονόματος του είδους στην επικυρωμένη λίστα του περιοδικού International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology [IJSEM, (<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem>)] το καθιστά δεκτό ως έγκυρο όνομα του είδους. Το γένος *Acinetobacter* επίσης περιλαμβάνει 7 είδη με προσωρινή ονομασία, κυρίως γενωμικά είδη (genomic species) που διαχωρίστηκαν με τη βοήθεια υβριδισμού των νουκλεϊνικών οξέων, και 9 είδη με δημοσιευμένα μη έγκυρα ονόματα, δηλαδή ονόματα ειδών που δεν έχουν ακόμη επικυρωθεί από το IJSEM, όπως φαίνεται στον Πίνακα 1, το *A. grimontii* είναι ταξινομικά ταυτόσημο με συντομογραφία BJ αναφέρεται στους Bouvet και Jeanjean, ενώ η TU στου Tjernberg και Ursing. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών, αρκετά είδη με προσωρινές ονομασίες έχουν

λάβει έγκυρα ονόματα. Για παράδειγμα, οι Tjernberg & Ursing έδειξαν ότι το *Acinetobacter* genomic species 12 αντιστοιχεί στο *A. radioresistens* [16]. Επιπλέον, ο Nemeč *et al.* πρόσφατα πρότειναν ονόματα για τα *Acinetobacter* genomic species 3, 10, 11 και 13TU, που πλέον έχουν επικυρωθεί ως *A. pittii*, *A. bereziniae*, *A. guillouiae* και *A. nosocomialis*, αντίστοιχα [27, 28].

ΕΓΚΥΡΕΣ ΟΝΟΜΑΣΙΕΣ (βάση της δημοσίευσής τους)	ΑΝΕΠΙΣΗΜΕΣ ΟΝΟΜΑΣΙΕΣ	ΠΗΓΕΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ	ΑΝΑΦΟΡΕΣ
<i>A. albensis</i>	Taxon 31	Έδαφος, νερό	[29]
<i>A. apis</i>		Έντερο μέλισσών	[30]
<i>A. baumannii</i>	Genomic species 2	Άνθρωπος, θερμοάιμα ζώα	[31]
<i>A. baylyi</i>		Ενεργοποιημένη ιλύς, έδαφος	[32]
<i>A. beijerinckii</i>	Phenon 7	Άνθρωπος, ζώα, έδαφος, νερό	[33]
<i>A. bereziniae</i>	Genomic species 10	Άνθρωπος	[27,31]
<i>A. bohemicus</i>	Taxon 26	Έδαφος, νερό	[34]
<i>A. boissieri</i>		Νέκταρ λουλουδιών	[35]
<i>A. bouvetii</i>		Ενεργοποιημένη ιλύς	[32]
<i>A. brisouii</i>		Τύρφη	[36]
<i>A. calcoaceticus</i>	Genomic species 1	Έδαφος, νερό, άνθρωπος	[31]
<i>A. celticus</i>	Taxon 33	Έδαφος, νερό	[37]
<i>A. courvalinii</i>	Genomic species 14BJ	Άνθρωπος, ζώα	[38,39]
<i>A. dijkshoorniae</i>	NB14	Άνθρωπος, νερό	[40]
<i>A. dispersus</i>	Genomic species 17	Έδαφος, νερό, άνθρωπος	[38,39]
<i>A. equi</i>		Άλογο	[41]
<i>A. gandensis</i>	Taxon 30	Άλογο, βοοειδή, νερό	[42]
<i>A. gernerii</i>		Ενεργοποιημένη ιλύς	[32]
<i>A. grimontii</i> (= <i>A. junii</i>)		Ενεργοποιημένη ιλύς	[43,31]
<i>A. guangdongensis</i>		Μετάλλευμα Pb ⁺⁺ /Zn ⁺ +	[44]
<i>A. guillouiae</i>	Genomic species 11	Έδαφος, νερό, άνθρωπος	[27, 31]
<i>A. gyllenbergii</i>	Phenon 3	Άνθρωπος	[33]
<i>A. haemolyticus</i>	Genomic species 4	Άνθρωπος	[31]
<i>A. harbinensis</i>		Νερό ποταμού	[45]
<i>A. indicus</i>		Έδαφος	[46]
<i>A. johnsonii</i>	Genomic species 7	Έδαφος, νερό, άνθρωπος, ζώα	[31]
<i>A. junii</i>	Genomic	Άνθρωπος, ζώα, νερό,	[31]

	species 5	έδαφος	
<i>A. kookii</i>		Έδαφος, νερό	[42]
<i>A. lactucae</i>		Μαρούλι	[47]
<i>A. lwoffii</i>	Genomic species 9	Άνθρωπος, ζώα, έδαφος, νερό	[16 ,31]
<i>A. modestus</i>	Taxon 18	Άνθρωπος, νερό	[38, 48]
<i>A. nectaris</i>		Νέκταρ λουλουδιών	[35]
<i>A. nosocomialis</i>	Genomic species 13TU	Άνθρωπος	[16 , 28]
<i>A. pakistanensis</i> (= <i>A. bohemicus</i>)		Λύματα	[42 , 44]
<i>A. parvus</i>	Phenon 4	Άνθρωπος, ζώα	[52]
<i>A. pittii</i>	Genomic species 3	Άνθρωπος, έδαφος, νερό	[28 , 31]
<i>A. populi</i>		Φλοιός λεύκας	[49]
<i>A. pragensis</i>	Taxon 28	Έδαφος, νερό	[43]
<i>A. proteolyticus</i>	Taxon 19	Άνθρωπος	[29 , 38]
<i>A. puyangensis</i>		Φλοιός λεύκας	[44]
<i>A. qingfengensis</i>		Φλοιός λεύκας	[45]
<i>A. radioresistens</i>	Genomic species 12	Άνθρωπος, έδαφος, βαμπάκι	[22, 46]
<i>A. rudis</i>		Νωπό γάλα, λύματα	[47]
<i>A. schindleri</i>	Phenon 2	Άνθρωπος, ζώα	[48]
<i>A. seifertii</i>	'Close to 13TU'	Άνθρωπος	[42, 44]
<i>A. soli</i>		Έδαφος, άνθρωπος	[50]
<i>A. tandoii</i>		Ενεργοποιημένη ιλύς, νερό, έδαφος	[32]
<i>A. tjernbergiae</i>		Ενεργοποιημένη ιλύς	[32]
<i>A. towneri</i>		Ενεργοποιημένη ιλύς, νερό, έδαφος	[32]
<i>A. ursingii</i>	Phenon 1	Άνθρωπος	[51]
<i>A. variabilis</i>	Genomic species 15TU	Άνθρωπος, ζώα, έδαφος	[52]
<i>A. venetianus</i>		Θαλασσινό νερό	[53 , 54]
<i>A. vinii</i>	Taxon 20	Άνθρωπος, έδαφος, νερό	[38 , 48]

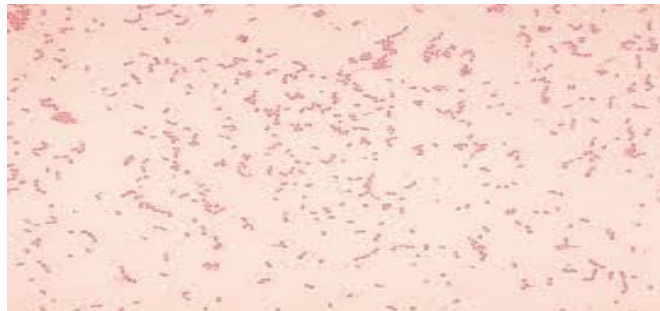
ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Οι έγκυρες ονομασίες (βάση της δημοσίευσης) των ειδών του γένους *Acinetobacter*. (<http://szu.cz/anemec/Classification.pdf>)

1.2 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

1

1.2.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Το *Acinetobacter* είναι Gram-αρνητικό κοκκοβακτηρίδιο, ακίνητο, μη σπορογόνο, αζυμώτικο, αυστηρά αερόβιο και δεν αναπτύσσεται σε συνθήκες μικροαερόφιλες ή αερόφιλες, το οποίο κατά τη φάση του πολλαπλασιασμού και της διαίρεσης του εμφανίζεται κοντό και παχύ, ενώ κατά τη φάση της στασιμότητας μας δίνει τη μορφή κόκκων, πολλές φορές διατεταγμένων σε ζευγή ή σε μικρές αλυσίδες [9]. Το μήκος του κυμαίνεται από 1,5μm έως 2,5μm και το πλάτος του από 1μm έως 1,5μm. Κατά την μικροσκόπηση η μορφολογία του, το μέγεθός του καθώς και η διάταξή του σε μικρές αλυσίδες μπορεί να μας δώσουν τη λανθασμένη εντύπωση ότι πρόκειται για Gram θετικούς κόκκους και Gram αρνητικούς κόκκους, ιδιαίτερα αν η χρώση δεν είναι επιτυχής και από εκεί προκύπτει και η παλαιότερη ονομασία τους (*Mimae*).



Εικόνα 2: *A. baumannii* (Gram χρώση)

Δεν φέρει βλεφαρίδες, φέρει όμως πολικά ινίδια που του προσδίδουν τρομώδη κίνηση. Τα ινίδια είναι λεπτότατα νημάτια, πλάτους από 0,1-1,5μm και μήκους 4-8μm, χωρίς κάμψεις, τα οποία χρησιμεύουν στην προσκόλληση του μικροβίου σε επιφάνειες. Επίσης, πολλά στελέχη φέρουν έλυτρο. Το έλυτρο ή η κάψα είναι πολύ λεπτό, δεν χρωματίζεται με τις συνήθεις χρωστικές, περιβάλλει το κυτταρικό τοίχωμα και φαίνεται ως μια διαφανής ζώνη γύρω από το βακτηρίδιο. Αποτελείται από αδρανή σάκχαρα και σε μερικά βακτηρίδια υπάρχει λεύκωμα και μουραμικό οξύ. Λειτουργεί σαν ασπίδα, προστατεύοντας έτσι το βακτηρίδιο από τους αντιμικροβιακούς παράγοντες του περιβάλλοντος (όπως είναι η λυσοζύμη, οι βακτηριοφάγοι κτλ.) και από την φαγοκυττάρωση [55, 56 , 54].

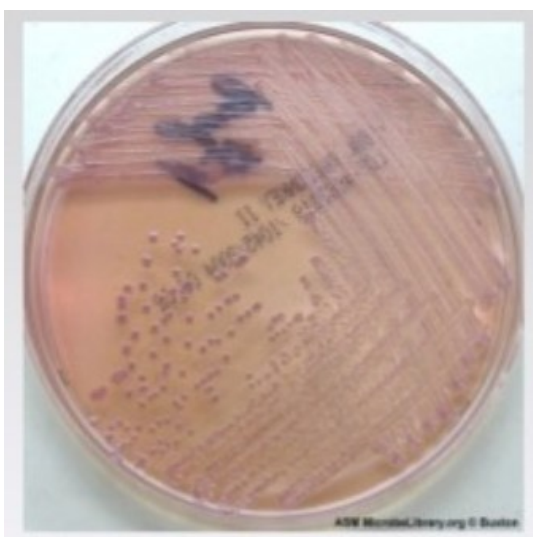
1.2.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Τα είδη *Acinetobacter*, αναπτύσσονται καλά σε συνήθη καλλιεργητικά μέσα, τόσο σε στερέα (Αιματούχο άγαρ) όσο και σε υγρά (tryptic soy broth). Τα κλινικά στελέχη που ανήκουν στο γενωμικό είδος 2 (*A.baumannii*), 3 και 13TU αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 37° C ή μεγαλύτερη,

ενώ κάποια άλλα είδη αναπτύσσονται μόνο σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Γενικά προτείνεται ως θερμοκρασία καλλιέργειας οι 30°C [57]. Τα στελέχη του συμπλέγματος *A.calcoaceticus-A.baumannii* εμφανίζουν αποικίες λείες, σπάνια βλεννώδεις, γυαλιστερές, με διάμετρο μεταξύ 1,5mm έως 3,0mm. Τα υπόλοιπα είδη *Acinetobacter* σχηματίζουν μικρότερες αποικίες και περισσότερο ημιδιαφανείς [58]. Το χρώμα τους κυμαίνεται από υποκίτρινο έως γκριζόλευκο. Στο McConkey άγαρ έχουν μια αγνή ρόδινη χροιά [56], ενώ υπάρχουν και κάποια περιβαλλοντικά στελεχη που παράγουν μια διαχεόμενη καφέ χρωστική [59]. Τα στελέχη του είδους *A. haemolyticus* και μερικών ακόμη μη προσδιορισμένων ειδών, όπως τα γενωμικά είδη *Acinetobacter* 6, 13BJ, 14BJ, 16, 1 και 17 μπορεί να εμφανίζουν κάποιου βαθμού αιμόλυση σε αιματούχο άγαρ, ιδιότητα που δε διαθέτουν ποτέ στελέχη του συμπλέγματος *A.calcoaceticus-A.baumannii*. Όλα τα στελέχη του γένους είναι οξειδάση αρνητικά και η δοκιμασία οξειδάσης είναι αυτή που μπορεί να διαχωρίζει τα είδη *Acinetobacter* από άλλα παρόμοια αζυμωτικά βακτήρια.



Εικόνα3: Αποικία σε Αιματούχο άγαρ



Εικόνα 4. Αποικία σε McConkey άγαρ (αριστερά), **Εικόνα 5.** Αποικία σε Leeds

Acinetobacter Agar (LAM), (δεξιά)

Όταν πρόκειται να καλλιεργηθούν δείγματα με ποικίλη χλωρίδα για την άμεση απομόνωση του γένους είναι σκόπιμη η χρήση εκλεκτικών υλικών που αναστέλλουν την ανάπτυξη των άλλων μικροοργανισμών, όπως το Herellea agar που περιέχει χολικά άλατα και ερυθρό της βρωμοκρεσόλης [60] ή το Leeds Acinetobacter Medium-LAM [61], που με την σύστασή του επιτρέπει την ανάπτυξη στελεχών *Acinetobacter*. Η διάκριση των άλλων οξειδάση αρνητικών μικροβίων γίνεται εύκολα από την αλλαγή του χρώματος του θρεπτικού υλικού και την μορφολογία των αποικιών τους.

1.3 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

1.3.1 ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

Τα περισσότερα εργαστήρια βασίζονται σε αυτοματοποιημένες ή μη αυτοματοποιημένες φαινοτυπικές μεθόδους που χρησιμοποιούν τα διάφορα εμπορικά συστήματα, όπως τα συστήματα API 20NE, Vitek 2, Phoenix και MicroScan WalkAway. Το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK 2 (bioMérieux, Inc.), ευδοώνει την ταυτοποίηση σε λιγότερο από 10 ώρες, εξετάζοντας βιοχημικές δοκιμασίες χρησιμοποιώντας ειδικά σχεδιασμένες κάρτες που περιέχουν κοιλότητες, με αφυδατωμένα υποστρώματα για την ταυτοποίηση των ειδών. Το κυριότερο πλεονέκτημα του συστήματος είναι ότι διαθέτει κάρτες με αφυδατωμένους αντιμικροβιακούς παράγοντες για τον ταυτόχρονο έλεγχο της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά του υπο μελέτη μικροοργανισμού. Ένα πρότυπο εναιώρημα του στελέχους παρασκευάζεται και προστίθεται στις κοιλότητες της κάρτας, και ένα ηλεκτρονικό σύστημα επώαζει, διάβάζει και ερμηνεύει την κάρτα. Το API 20NE (bioMérieux) είναι ένα ημιαυτοματο σύστημα ταυτοποίησης μη απαιτητικών, μη εντεροβακτηριακών Gram αρνητικών βακτηρίων το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί κατά κόρον. Το σύστημα αυτό αποτελείται από 20 βοηθία που περιέχουν αφυδατωμένα υποστρώματα μικροβιακών μεταβολικών ενζύμων. Το μικροβιακό εναιώρημα ενοφθαλμίζεται στα βοηθία προκαλώντας ανασύσταση των υποστρωμάτων και με επώαση στην κατάλληλη θερμοκρασία, τα υποστρώματα αυτά μεταβολίζουν με εμφανείς χρωματικές αλλαγές. Στο τέλος της επώασης το χρωματικό προφίλ της ταινίας συγκρίνεται με μια βάση δεδομένων και το λογισμικό εξάγει τα αποτελέσματα.

Οι απλές φαινοτυπικές δοκιμασίες που χρησιμοποιούνται στα διαγνωστικά εργαστήρια για το διαχωρισμό βακτηριακών γενών σε επίπεδο ειδών, είναι ακατάλληλες για τη σωστή ταξινόμηση ακόμα και των πιο συχνών ειδών *Acinetobacter* και πιο συγκεκριμένα, τα τρία κλινικά σχετιζόμενα μέλη του συμπλεγματος *A.calcoaceticus-A.baumannii* δεν μπορούν να διαχωριστούν με τα παραπάνω συστήματα. Γεγονός που μπορεί να οφείλεται, εν μέρει, στην περιορισμένη βάση δεδομένων που διαθέτουν τα παραπάνω συστήματα, αλλά και στο γεγονός ότι τα υποστρώματα

που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των βακτηριακών ειδών δεν είναι ειδικά σχεδιασμένα για την ταυτοποίηση των *Acinetobacter*.

Μια νέα και πολλά υποσχόμενη μέθοδος που χρησιμοποιείται, στα μικροβιολογικά εργαστήρια είναι η μέθοδος MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry) , και πρόκειται για φασματομετρία μάζας. Η μέθοδος βασίζεται στη μέτρηση μάζας μορίων που έχουν μετατραπεί σε θετικά ή αρνητικά φορτισμένα ιόντα. Κάθε είδος αποκτά ένα ειδικό φάσμα μάζας, το οποίο και συγκρίνεται με μια ηλεκτρονική βάση δεδομένων. Η μέθοδος είναι ταχύτατη, αφού χρειάζεται λιγότερο από μία ώρα για την ταυτοποίηση των ειδών αλλά έχει κόστος. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, η MALDI-TOF MS είναι αξιόπιστη μέθοδος για την ταυτοποίηση των ειδών του *A. baumannii* group [62,63]. Ωστόσο, μία άλλη μελέτη έδειξε ότι η MALDI-TOF MS απέτυχε να ταυτοποιήσει σωστά τα διάφορα είδη του γένους, εκτός από το *A. baumannii*, για το οποίο έδωσε καλά αποτελέσματα [64]. Κρίνεται αναγκαία η βελτιστοποίηση της βάσης δεδομένων, όπως και νέες μελέτες για την συνεχή αξιολόγηση της απόδοσης, των πλεονεκτημάτων και των περιορισμών της μεθόδου.

Εξαιτίας των ανωτέρω λόγων διερευνήθηκαν νεότερες μοριακές τεχνικές εγκυρότερες για την ταυτοποίηση των *Acinetobacter*, στις οποίες ανήκουν η μελέτη πολλαπλασιασμένου ριβοσωμικού DNA με τη χρήση ενζύμων περιορισμού (Amplified rDNA Restriction Analysis – ARDRA) [65], την ανάλυση του αποτυπώματος του DNA που προκύπτει από πολλαπλασιασμό με ειδικούς εκκινητές μετά από κατατεμαχισμό ολόκληρου του γονιδιώματος σε ειδικές θέσεις (Amplified fragment length polymorphism – AFLP) [66], [51], τη ριβοτυπία [67], (ανάλυση αποτυπώματος tRNA) [68] , την περιοριστική ανάλυση των ενδογενών περιοχών 16S-23S rRNA [69], την ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου που κωδικοποιεί για την 16S-23SrRNA περιοχή (Intergenic Spacer -ITS) [70] .

1.3.2 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

Ο υβριδισμός των νουκλεϊκών οξέων (DNA-DNA hybridization) [13,24], αποτελεί μέθοδο αναφοράς για την ταυτοποίηση των ειδών του γένους *Acinetobacter* και βασίζεται στον προσδιορισμό της θερμοκρασίας τήξεως των υβριδοποιημένων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Για την συνήθη ταυτοποίηση των ειδών σε επίπεδο ρουτίνας είναι ακατάλληλη μιας και είναι επίπονη και μη πρακτική.

1.3.2.1 ARDRA – (Amplified rDNA Restriction Analysis)

Η μελέτη πολλαπλασιαζόμενου ριβοσωμικού DNA με την χρήση ενζύμων περιορισμού (Amplified rDNA Restriction Analysis-ARDA) [65], είναι τεχνική που περιλαμβάνει την περιοριστική πέψη του ειδικού προϊόντος PCR για γονίδιο που κωδικοποιεί το ριβοσωμικό RNA με περιοριστικά

ένζυμα και σύγκριση των προϊόντων της πέψης με ηλεκτροφόρηση. Η διάκριση των ειδών του συμπλέγματος *A.calcoaceticus-A.baumannii* ήταν άμεση και η όλη διαδικασία εμφάνισε υψηλή επαναληψιμότητα, καθώς επίσης και υψηλή ειδικότητα ως τεχνική. Το 1997 [19] χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Sau3 προκειμένου να επιτευχθεί η πέψη ενός προϊόντος 4,5kb που περιελάμβανε τα γονίδια 16S rDNA και 23S rDNA καθώς και την περιοχή ITS (Intergenic Spacer-ITS), η οποία είναι η διάμεση νουκλεοτιδική αλληλουχία που διαχωρίζει τα γονίδια που κωδικοποιούν για 16S rRNA και 23S rRNA ,το και οποίο βελτίωσε την τεχνική.

Μια ιδιαίτερα κατάλληλη για την διάκριση των ειδών του συμπλόκου *A.calcoaceticus-A.baumannii*, είναι αυτή της ανάλυσης της αλληλουχίας του γονιδίου, που κωδικοποιεί για την 16S-23S rRNA περιοχή, μιας και η ITS περιοχή είναι ιδιαίτερα συντηρημένη στα είδη του συμπλόκου *A.calcoaceticus-A.baumannii*, αλλά και περισσότερο ποικιλόμορφη από την αλληλουχία του 16SrDNA. Διενεργείται PCR για την διάμεση νουκλεοτιδική ακολουθία που χωρίζει τα γονίδια που κωδικοποιούν για 16S rRNA και 23S rRNA, η οποία ακολουθείται από Sequencing του προϊόντος της PCR. Τέλος ,η αλληλουχία συγκρίνεται με βάση δεδομένων [70] .

1.3.2.2 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorfism)

Η μέθοδος AFLP (Amplified Fragment Length Polymorfism) αναπτύχθηκε τη δεκαετία του 1990 [51,66]. Αποτελεί μια εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδο, η οποία περιλαμβάνει κατακερματισμό του χρωμοσωμικού DNA με ένζυμα (όπως τα EcoR1 ή MseI), μη εκλεκτική PCR με αλληλουχίες ειδικές για τις θέσεις αναγνώρισης των δυο περιοριστικών ενζύμων και έπειτα δεύτερη εκλεκτική PCR με πρόσθετα εκλεκτικά νουκλεοτίδια. Στην παραλλαγή της, την FAFLP, το ένα απο τα εκλεκτικά PCR primers είναι σημασμένο με φθοριόχρωμα για ανίχνευση σε αυτόματο DNA sequencer.

1.3.2.3 ΡΙΒΟΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ

Η ριβοτυπία είναι μία τεχνική με ιδιαίτερη διακριτική ικανότητα, που περιλαμβάνει την πέψη του γενωμικού DNA με περιοριστικά ένζυμα και στη συνέχεια την αποτύπωση κατά Southern με ειδικούς ανιχνευτές για το ριβοσωμικό 16S rDNA και 23S rDNA. Το προφίλ των ζωνών που προκύπτει θεωρείται αντιπροσωπευτικό κάθε είδους. Μελέτη [71] έδειξε οτι η μέθοδος εμφανίζει υψηλή επαναληψιμότητα και ειδικότητα για τη διάκριση των ειδών του συμπλέγματος *A. calcoaceticus – A. baumanii* με περιοριστικά ένζυμα EcoRI, ClaI και SalI. Η διαφοροποίηση των τεσσάρων ειδών (*A.calcoaceticus*, *A.baumannii*, γενωμικά είδη 3 και 13 TU) ήταν ιδιαίτερα ικανοποιητική και κάλυπτε το 97% των περιπτώσεων, μόνο με τη χρήση του EcoRI.

Επίσης για την ταυτοποίηση των ειδών του γένους *Acinetobacter* έχει γίνει αλληλούχιση αρκετών αλληλουχιών DNA, μερικές από τις οποίες είναι η αλληλουχία 16S rDNA [72], η αλληλουχία του *recA* γονιδίου, το οποίο κωδικοποιεί για την ρεκομπινάση A [73], αυτή του *gyrB*

γονιδίου που κωδικοποιεί για τη β-υπομονάδα της DNA γυράσης [74], η αλληλουχία του *groB* γονιδίου που κωδικογραφεί τη β-υπομονάδα της RNA πολυμεράσης [75] και η αλληλουχία του γονιδίου *bla_{OXA-51-like}* [76].

Η πολυπλεκτική (multiplex) αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction) [77, 78] για το γονίδιο *gyrB*, αποτελεί μέθοδο που βασίζεται στην ενίσχυση διακριτών τμημάτων αυτού του γονιδίου με τη χρήση ειδικών εκκινήτων, για τα συγκεκριμένα είδη, οπότε προκύπτουν συγκεκριμένα μεγέθη θραυσμάτων για κάθε είδος που επιτρέπουν τη διαφοροποίηση. Αποτελεί απλή μέθοδο με την οποία διακρίνονται τα *A.baumannii*, *A.calcoaceticus*, *A.nosocomialis* και *A.pittii*.

Επίσης αξιόπιστη και γρήγορη μέθοδο για την ταυτοποίηση των ειδών του γένους *Acinetobacter* αποτελεί η ανάλυση ενός τμήματος της αλληλουχίας του γονιδίου *groB*, λόγω του πολυμορφισμού του. Ο προσδιορισμός δύο μεταβλητών περιοχών οι οποίες πλαισιώνονται από συντηρημένες αλληλουχίες [78] εντός του γονιδίου και στη συνέχεια η αλληλούχηση τους χρησιμοποιείται για την διάκριση των ειδών του γένους *Acinetobacter*.

1.4 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ του *A.baumannii*

Ο κύριος σκοπός της τυποποίησης των μικροβίων είναι να αποδείξει τη γενετική σχέση μεταξύ επιδημιολογικά σχετιζόμενων στελεχών. Με τα δεδομένα που παρέχουν οι τεχνικές τυποποίησης γίνεται αντιληπτός ο τρόπος διασποράς ενός παθογόνου μικροοργανισμού και έτσι είναι δυνατός ο περιορισμός του φαινομένου τόσο ενδό- όσο και έξω- νοσοκομειακά. Για τον σκοπό αυτό γίνονται οι εξής παραδοχές: α) οι εκπρόσωποι ενός επιδημικού κλώνου έχουν κοινό πρόγονο και επομένως έχουν τον ίδιο γονότυπο, και β) επιδημιολογικά μη σχετιζόμενα στελέχη θα διαφέρουν ως προς τον γονότυπο. Τα στελέχη πρέπει να συλλέγονται από τους ασθενείς και το περιβάλλον που σχετίζονται με α) τον χώρο και τον β) τον χρόνο εμφάνισης των κρουσμάτων των λοιμώξεων καθώς και από οποιαδήποτε πηγή διασποράς. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σήμερα για τη γονοτύπηση των στελεχών *A. baumannii* είναι η ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed field gel electrophoresis, PFGE), η AFLP, η μελέτη του πολυμορφισμού διαδοχικών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του γονιδιώματος (Multilocus variable number tandem repeat analysis, MLVA), η 3LST, η τυποποίηση με αλληλούχηση πολλαπλών γενετικών τόπων (Multilocus sequence typing, MLST), διάφορες άλλες μέθοδοι που βασίζονται στην PCR και την ανάλυση της αλληλουχίας (PCR-based and sequence-based methods) και η ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος (Whole-genome sequencing, WGS) [79].

1.4.1 PFGE (Pulse field gel electrophoresis)

Παρά την εμφάνιση νέων μεθόδων που βασίζονται στην αλληλούχιση, η PFGE εξακολουθεί να αποτελεί τον χρυσό κανόνα για τις επιδημιολογικές έρευνες των στελεχών *A.baumannii*. Η μέθοδος χρησιμοποιείται, κυρίως, για την ανάλυση των επιδημιών και την επιδημιολογική διερεύνηση σε τοπικό επίπεδο (π.χ. νοσοκομείο) και σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, ενώ αποτελεί σημαντικό συμπληρωματικό εργαλείο για την επιδημιολογική διερεύνηση σε ευρύτερη κλίμακα. Η διαδικασία της PFGE χρησιμοποιεί ένα περιοριστικό ένζυμο, που για τη συγκεκριμένη μέθοδο ευρεία χρήση έχουν τα *ApaI* και *SmaI*, ώστε να διασπαστεί το χρωμοσωμικό DNA [80] , [81] σε σπάνιες θέσεις και να προκύψουν μεγάλα θραύσματα έως και 1000 kb. Τα χρωμοσωμικά θραύσματα που προκύπτουν διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση ενός μεταβαλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου και το πρότυπο ζωνών που προκύπτει συγκρίνεται με τα υπόλοιπα στελέχη της μελέτης, ώστε να βρεθεί πιθανή γενετική σχέση [82]. Το πρωτόκολλο PFGE για το *A.baumannii* είναι αυτό που προτείνεται από τους Seifert et al, [83]. Είναι απαραίτητη η χρήση κοινών κριτηρίων ανάλυσης των αποτελεσμάτων προκειμένου να είναι δυνατή η αξιολόγησή τους από άλλα εργαστήρια. Αυτά είναι τα κριτήρια των Tenover et al, [84] τα οποία αναφέρουν:

α) Το κοινό πρότυπο ζωνών που επιδεικνύουν τα περισσότερα στελέχη της συλλογής θεωρείται το επιδημικό προφίλ.

β) Στελέχη που διαφέρουν σε 2 ή 3 ζώνες θεωρούνται στενά σχετιζόμενα με το επιδημικό προφίλ. Οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται σε σημειακή μετάλλαξη, προσθήκη ή έλλειψη νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που δημιούργησαν μια νέα ή κατέστρεψαν μια είδη υπάρχουσα θέση αναγνώρισης από το αντίστοιχο περιοριστικό ένζυμο.

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

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

Η PGFE είναι κοπιαστική μέθοδος που απαιτεί αρκετές μέρες πριν από τη δημιουργία ενός αποτελέσματος ταυτοποίησης. Το βασικό μειονέκτημα της PFGE είναι η δυσκολία στην επίτευξη επαναληψιμότητας μεταξύ των εργαστηρίων κυρίως λόγω έλλειψης προτυποποιημένων πρωτοκόλλων.

1.4.2 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Η RFLP, πολυμορφισμός μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού είναι μέθοδος που βασίζεται στην εξαγωγή του DNA, το οποίο ακολούθως επεξεργάζεται με ένζυμο περιορισμού. Πρόκειται για

ενδονουκλεάσες οι οποίες αναγνωρίζοντας συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων, τέμνουν το DNA δημιουργώντας διαφόρου μεγέθους θραύσματα. Κατά συνέπεια διαφορετικά ένζυμα περιορισμού τέμνουν το DNA σε διαφορετικά σημεία δημιουργώντας διαφορετικού μεγέθους και αριθμού θραύσματα, τα οποία στη συνέχεια διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης και μεταφέρονται σε μεμβράνη (Southern blotting), όπου ταυτοποιούνται με υβριδισμό σημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων [85].

1.4.3 3LST

Η 3LST είναι μια τεχνική τυποποίησης με τη χρήση αλληλούχισης, που προτάθηκε από τους Turton et al, [86], η οποία βασίζεται στην ανίχνευση και ταυτοποίηση τριών γονιδίων τα οποία βρίσκονται υπό εξελικτική πίεση επιλογής (selective pressure). Η τεχνική αυτή παρουσιάζει διευρυμένη διακριτική ικανότητα, εφόσον δίνει τη δυνατότητα μελέτης περισσότερων πολυμορφισμών. Ταυτόχρονα έχει το πλεονέκτημα, ότι μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικές με την παθογονικότητα του μικροβίου. Το συγκεκριμένο σχήμα μελετά τα εξής γονίδια: *ompA* (κωδικοποιεί την εξωτερική μεμβρανική πρωτεΐνη A), *csuE* (κωδικοποιεί βασικό ινίδιο για την δημιουργία βιοφίλμ) και το *bla_{OXA-51-like}* (κωδικοποιεί την ενδογενή καρβαπενεμάση του *A. baumannii*). Το σχήμα είναι πιο εύκολο να πραγματοποιηθεί, καθώς αφορά μόλις τρία (3) γονίδια, ενώ είναι αισθητά μειωμένο το κόστος που απαιτείται για την υλοποίησή του.

1.4.4 MLST

Η μέθοδος MLST (Multilocus sequence typing, τυποποίηση με νουκλεοτιδική ανάλυση πολλαπλών γενετικών τόπων) ανήκει στις πιο επιτυχημένες και πλέον αποδεκτές τεχνικές τυποποίησης, αποτελώντας πρότυπο για την πληθυσμιακή ανάλυση και την επιδημιολογική διερεύνηση ενός ευρέος φάσματος βακτηρίων σε διεθνές επίπεδο. Με την μέθοδο συγκρίνονται οι αλληλουχίες εσωτερικών τμημάτων επτά γονιδίων του βασικού μεταβολισμού (housekeeping genes) που βρίσκονται σε όλα τα στελέχη *Acinetobacter*. Τα γονίδια που παρουσιάζουν έστω και μία διαφορά στην αλληλουχία τους θεωρούνται διαφορετικά αλληλία. Κάθε στέλεχος διαθέτει ένα συνδυασμό επτά αλληλιών (allelic profile, αλληλικό προφίλ) και κατατάσσεται σε ένα ST τύπο. Οι ST τύποι που διαφέρουν σε ένα από τα επτά γονίδια θεωρούνται Single Locus Variants (SLV), ενώ οι τύποι που διαφέρουν σε δύο γονίδια θεωρούνται Double Locus Variants (DLV). Τα στελέχη που έχουν όμοια τουλάχιστον πέντε από τα επτά αλληλία ομαδοποιούνται στο ίδιο κλωνικό σύμπλεγμα (Clonal Complex, CC). Για τα *Acinetobacter* υπάρχουν δύο σχήματα MLST, τα οποία έχουν την ικανότητα να τυποποιούν τόσο τα στελέχη *A. baumannii* όσο και τα non-*A. baumannii*: το σχήμα Oxford και το σχήμα του Ινστιτούτου Pasteur που μελετούν τρεις κοινούς γενετικούς τόπους. Οι βάσεις δεδομένων MLST και των δύο σχημάτων διατίθενται στον ιστότοπο <http://pubmlst.org/abaumannii/>. Το σχήμα Oxford αρχικά περιγράφηκε από τον Bartual et al.

(MLST^B) [87] το οποίο στη συνέχεια τροποποίησε ο Wisplinghoff *et al.* [88]. Βασίζεται στον πολλαπλασιασμό και αλληλούχιση των γονιδίων *gltA*, *gyrB*, *gdhB*, *recA*, *cpn60*, *gpi* και *rpoD*. Σήμερα, στη βάση δεδομένων της MLST^B περιλαμβάνονται 1475 διακριτοί ST τύποι στελεχών *Acinetobacter*. Πιο πρόσφατα, περιγράφηκε από τον Diancourt *et al.* [23] το σχήμα MLST του ινστιτούτου Pasteur (MLST^P), το οποίο βασίζεται στην αλληλούχιση των γονιδίων *cpn60* (60-KDa chaperonin), *fusA* (elongation factor EF-G), *gltA* (citrate synthase), *pyrG* (CTP synthase), *recA* (homologous recombination factor), *rplB* (50S ribosomal protein L2) και *rpoB* (RNA polymerase subunit B). Επί του παρόντος, η βάση δεδομένων MLST^P περιλαμβάνει 950 διαφορετικούς ST τύπους *Acinetobacter*. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, συνήθως υπάρχει συμφωνία μεταξύ των δύο σχημάτων, αν και γενικά οι δημοσιεύσεις που μελετούν και τα δύο σχήματα είναι περιορισμένες [89,90,91]. Επιπλέον, μια δημοσίευση έδειξε ότι το σχήμα Oxford αδυνατεί να τυποποιήσει μερικά στελέχη, λόγω του ανασυνδυασμού που λαμβάνει χώρα στα γονίδια *gyrB* και *gpi* και επομένως τα γονίδια αυτά είναι ακατάλληλα για φυλογενετικές μελέτες [92]. Από την άλλη πλευρά, μια πολύ πρόσφατη μελέτη του 2016 έδειξε την πολύτιμη συμβολή και των δύο σχημάτων MLST στις πληθυσμιακές μελέτες. Όπως αναφέρθηκε από τους ερευνητές το σχήμα Oxford εμφανίζει υψηλότερη διακριτική ικανότητα που οφείλεται, κυρίως, στα γονίδια *gyrB* και *gpi* και συνεπώς θα μπορούσε να βοηθήσει στην ανάλυση επιδημιών σε τοπικό επίπεδο, σε αντίθεση με το σχήμα Pasteur [93].

1.5

ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ

Τα βακτήρια του γένους *Acinetobacter* συναντώνται ευρέως στο φυσικό περιβάλλον. Πιο συγκεκριμένα έχουν απομονωθεί από το νερό, τα φυτά και από διάφορα φυτικά και ζωικά τρόφιμα (π.χ. ωμό κρέας) [94]. Χαρακτηριστικά αναφέρεται η απομόνωσή του από παστεριωμένο γάλα, κατεψυγμένα τρόφιμα, πουλερικά του νοσοκομείου, πόσιμο νερό του δικτύου, κλιματιστικά συστήματα. Τα συναντάμε όμως και στο νοσοκομειακό περιβάλλον και μάλιστα εμφανίζεται ως το δεύτερο κατά σειρά αζυμωτικό βακτηρίδιο μετά την ψευδομονάδα που απομονώνεται σε νοσοκομεία [95,96,97]. Έχει απομονωθεί επίσης από διάφορα υγειονομικά υλικά και νοσηλευτικά υγρά, ιατρικά εργαλεία και συσκευές, κυρίως αναπνευστήρες, νεφελοποιητές, δεδομένου ότι το υγρό περιβάλλον ευνοεί την εγκατάσταση και την ανάπτυξή τους [60]. Συχνά βρίσκεται στα χέρια γιατρών και νοσηλευτών, οι οποίοι γίνονται φορείς, μεταφέρουν και διασπείρουν το επιδημικό στέλεχος κατά τη διάρκεια νοσοκομειακών επιδημιών [94].

Στον άνθρωπο αποικίζουν υγρά και ζεστά σημεία του σώματος όπως τους βλεννογόνους του πεπτικού, ουροποιογεννητικού και αναπνευστικού (7%φάρυγγα), παροδικά ή μόνιμα. Η κυριότερη πηγή απομόνωσης είναι το δέρμα (25%) όπου παραμένει ως μέλος της μόνιμης φυσιολογικής χλωρίδας και αποτελεί την κυριότερη πηγή μόλυνσης στον άνθρωπο [94]. Μεγάλη σημασία επομένως για την εξάπλωση των λοιμώξεων από *Acinetobacter* αποτελεί ο αποικισμός του δέρματος των νοσηλευόμενων ασθενών κυρίως στις ΜΕΘ, όπως επίσης και το πεπτικό σύστημα των ίδιων ασθενών μπορεί να αποτελέσει μια σημαντική δεξαμενή για λοιμώξεις πολυανθεκτικών κυρίως στελεχών *A.baumannii* [98]. Έγιναν πολλές μελέτες για την παρουσία του *Acinetobacter* στο περιβάλλον του νοσοκομείου, οι οποίες ανίχνευσαν σε πατώματα, σε σιφόνια και νεροχύτες [99], σε δείγματα αναπνευστήρων και σε δείγματα αέρος από περιοχές που γειτονεύουν με αποικισμένους ασθενείς ή ασθενείς με λοίμωξη [100]. Ανιχνεύτηκε επίσης στον εξοπλισμό των κρεβατιών των νοσοκομείων [101, 102]. Μεγάλου βαθμού μόλυνση του περιβάλλοντος και του αέρα παρατηρείται σε περιόδους επιδημίων με πολυανθεκτικά στελέχη *Acinetobacter* η οποία παραμένει έως 13 μέρες μετά την απομάκρυνση του ασθενούς φορέα [103].

1.6 ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Το *A. baumannii* είναι ένα ευκαιριακό παθογόνο, το οποίο τις τελευταίες δεκαετίες αυξάνει συνεχώς το ενδιαφέρον της ιατρικής κοινότητας, λόγω του όλο και αυξανόμενου αριθμού λοιμώξεων που προκαλεί, οι οποίες ως επί το πλείστον είναι ενδονοσοκομείακες, αλλά και επειδή ο μικροοργανισμός αυτός παρουσιάζει αντοχή στα αντιβιοτικά κάνοντας έτσι την αντιμετώπισή του δύσκολη. Οι λοιμώξεις αυτές είναι συχνά πολύ σοβαρές, με μεγάλο χρόνο νοσηλείας, μεγάλο κόστος νοσηλείας ακόμη και θάνατο. Αναφορές επιδημίων υπάρχουν τόσο από νοσοκομεία της Ελλάδας [104, 105], όσο και από του εξωτερικού [106]. Σημαντικό ρόλο στην εγκατάσταση της λοίμωξης παίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς και τα υποκείμενα νοσήματα του ασθενούς, όπως κακοήθη νοσήματα, εγκαύματα, μεγάλες εγχειρήσεις, η μεγάλη ηλικία του ασθενούς, η αντιμικροβιακή θεραπεία που λαμβάνει τις τελευταίες 90 μέρες, η χρήση συσκευών, όπως αιμοδιάλυσης, μηχανικός αερισμός, καθετήρες (κεντρικοί φλεβικοί,ουρηθρικοί), το φαινοτυπικό προφίλ της χλωρίδας του νοσοκομείου, η παρατεταμένη νοσηλεία του ασθενούς στο νοσοκομείο (κυρίως στις ΜΕΘ) ή σε μονάδες αυξημένης φροντίδας.

Αναφέρονται επίσης και λοιμώξεις σε ασθενείς της κοινότητας. Προδιαθεσικοί παράγοντες για την πρόκλησή τους θεωρούνται η ανοσοκατάστολη, η ηλικία, ο αλκοολισμός, το κάπνισμα, τα χρόνια αναπνευστικά νοσήματα, ο σακχαρώδης διαβήτης. Οι προδιαθεσικοί παράγοντες που αναφέρονται σε συνδυασμό με τη λοιμογόνο ικανότητα του *Acinetobacter baumannii* οδηγούν στην

εγκατάσταση μιας λοίμωξης από το συγκεκριμένο μικρόβιο. Η λοιμογόνος ικανότητα του *A. baumannii* χαρακτηρίζεται από:

- 1) Την ικανότητα προσκόλλησης του μικροβίου στα επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή, η οποία επιτυγχάνεται μέσω των ινιδίων ή και των καψιδιακών πολυσακχαριτών [107, 108].
- 2) Την παρουσία ενός πολυσακχαριδικού ελύτρου, το οποίο αποτελείται από L-ραμνόζη, D-γλυκόζη, D-γλυκουρονικό οξύ και D-μαννόζη και καθιστά την επιφάνεια του μικροβίου περισσότερο υδρόφιλη [109].
- 3) Ο λιποπολισακχαρίτης (LPS) της εξωτερικής μεμβράνης καθώς και παραγωγή του λιπιδίου A διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη λοιμογόνο ικανότητα
- 4) Η ικανότητα του μικροβίου να οργανώνεται με την μορφή βιομεμβρανών (biofilm), πάνω σε ξένες επιφάνειες είναι εξίσου σημαντική, μιας και αποτελεί δομή που το προστατεύει από αντίξοες συνθήκες, όπως η έλλειψη αυξητικών παραγόντων και η χημειοθεραπεία. [110].
- 5) Η φωσφολιπάση D ευοδώνει τον αποικισμό του μικροβίου στα επιθηλιακά κύτταρα.
- 6) Καθοριστικός παράγοντας της λοιμογόνου ικανότητας του *Acinetobacter* είναι η ικανότητά του να απορροφά σίδηρο από τον ανθρώπινο οργανισμό, στερώντας το από τα μακροφάγα, τα οποία συμμετέχουν στην άμυνα του οργανισμού [111].

1.7 ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΑΠΟ *A.baumannii*

Το μεγαλύτερο ποσοστό των *A. baumannii* απομονώνεται από το αναπνευστικό σύστημα νοσηλεύομενων ασθενών. Η νοσοκομειακή πνευμονία από *A.baumannii*, που σχετίζεται μάλιστα με αναπνευστήρα (VAP, ventilator associated pneumonia) προέρχεται στις περισσότερες περιπτώσεις από ασθενείς οι οποίοι νοσηλεύονται σε μονάδες εντατικής θεραπείας.

Σε νοσηλεύομενους ασθενείς της ΜΕΘ με πνευμονία ή λοιμώξεις τραυμάτων εμφανίζεται πολύ συχνά δευτεροπαθής βακτηριαμία. Συνήθως απομονώνεται στο πλαίσιο πολυμικροβιακής λοίμωξης [112], αλλά ενδέχεται να απομονωθεί και μόνο του. Αξίζει να σημειωθεί ότι η βακτηριαμία από *A.baumannii* αποτελεί έναν χρήσιμο δείκτη αληθινής λοίμωξης, ενώ η απομόνωσή του από πληγές ή από το αναπνευστικό μπορεί να δείχνει περισσότερο αποικισμό [26].

Ιδιαίτερα επιρρεπή ομάδα αποτελούν οι ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς και τα νεογνά [9], με παράγοντες κινδύνου που δεν διαφέρουν από τους προαναφερθέντες σχετιζόμενους με τη νοσοκομειακή πνευμονία οφειλόμενη σε *A.baumannii*.

Συχνό φαινόμενο αποτελούν οι λοιμώξεις των μαλακών μορίων και του δέρματος, κυρίως σε στρατιωτικούς πληθυσμούς, με χειρότερη πρόγνωση να έχουν οι λοιμώξεις δέρματος σε εγκαυματικές επιφάνειες [113].

Μηνιγγίτιδα που οφείλεται σε *A.baumannii* εμφανίζεται δευτερογενώς μετά από νευροχειρουργικές επεμβάσεις και κρανιακά εγκαυματά [9]. Περιγράφονται ωστόσο και σποραδικά κρούσματα πρωτοπαθούς μηνιγγίτιδας. Παράγοντες κινδύνου αποτελούν, η μόνιμη επικοινωνία των κοιλιών με το εξωτερικό περιβάλλον, η κοιλιοστομία, το συρίγγιο εκροής του εγκεφαλονωτιαίου υγρού και η παρουσία καθετήρων των κοιλιών για περισσότερες από 5 μέρες αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης μηνιγγίτιδας οφειλόμενης σε *A.baumannii*.

Άλλες λιγότερο συχνές λοιμώξεις που σχετίζονται με το είδος είναι αυτές του ανώτερου ουροποιητικού, οι οποίες συμβαίνουν σε καθετηριασμένους ασθενείς και ως επι το πλείστον άντρες [114]. Επίσης, σποραδικά έχουν αναφερθεί περιστατικά ενδοκαρδίτιδας που συνήθως σχετίζονται με επεμβάσεις ανοιχτής καρδιάς [115].

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

1.8 ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Όσον αφορά τις θεραπευτικές επιλογές, αυτές φαίνεται να περιορίζονται, αφού πριν από το 1970 η αντιμετώπιση του *A.baumannii* περιελάμβανε ευρέως φάσματος β-λακταμικά, αμινογλυκοσίδες ή τετρακυκλίνες, κάτι που πλέον δεν επιτυγχάνεται με τη συνεχή διασπορά ανθεκτικών στελεχών *A.baumannii*, ακόμα και σε ευρέως φάσματος β-λακταμικά αντιβιοτικά, όπως οι καρβαπενέμες, αφήνοντας ουσιαστικά τον κλινικό γιατρό χωρίς θεραπευτικές επιλογές. Η σουλμπακτάμη μόνη της ή σε συνδυασμό με την αμπικιλίνη δρα καλά απέναντι σε αυτούς τους μικροοργανισμούς [116]. Επίσης, η κολιστίνη (παράγωγο της πολυμιξίνης Ε) αποτελεί φάρμακο εκλογής, σε περιπτώσεις πολυανθεκτικών στελεχών, με συνοδά ωστόσο τοξικά αποτελέσματα (νεφροτοξικότητα) [117]. Έχουν αναφερθεί ωστόσο στη βιβλιογραφία, ανθεκτικά στελέχη, καθώς και στελέχη με ετεροαντοχή στην κολιστίνη [118]. Η τιγκεκυκλίνη, ένα ημισυνθετικό παράγωγο της μινोकυκλίνης, δεν προσέφερε την αναμενόμενη βοήθεια στην καταπολέμηση των MDR (Multidrug resistant) στελεχών παρά τις αρχικές προσδοκίες και έχουν ήδη εμφανιστεί στελέχη ανθεκτικά και σε αυτή [2]. Multidrug resistance στα *A. baumannii* ονομάζουμε την αντοχή σε πάνω από 2 από τις ακόλουθες κατηγορίες αντιβιοτικών: αντι-ψευδομοναδικές κεφαλοσπορίνες (κεφταζιδίμη ή κεφεπίμη), αντι-ψευδομοναδικές καρβαπενέμες (ιμιπενέμη, μεροπενέμη), αμπικιλίνη-σουλμπακτάμη, φλουοροκινολόνες (σιπροφλοξασίνη ή λεβοφλοξασίνη), και αμινογλυκοσίδες (γενταμικίνη, τομπραμυκίνη, ή αμικασίνη).

Στην καταπολέμηση του *A.baumannii* προτείνονται μικτά θεραπευτικά σχήματα γιατί δρουν συνεργικά και έτσι αυξάνεται το ποσοστό εκρίζωσής του, και μάλιστα με μικρότερες δόσεις

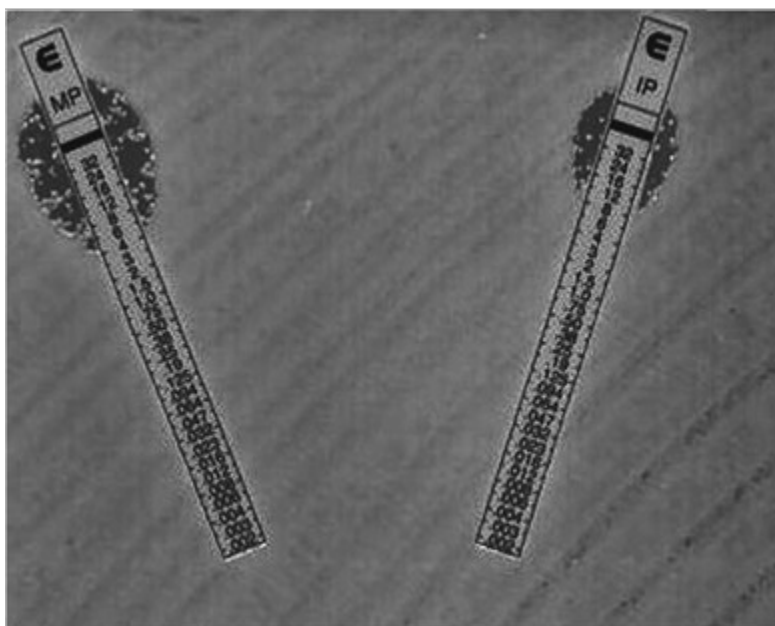
αντιβιοτικού σε σχέση με τις απαιτούμενες της μονοθεραπείας. Τέλος είναι πολύ δύσκολο να αναπτυχθούν μηχανισμοί αντοχής. Τα συνηθέστερα σχήματα που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής:

A) β-λακτάμες με αναστολείς β-λακταμικών ή σε συνδυασμό με αμινογλυκοσίδες ή φλουροκινολόνες,

B) αμπικιλίνη-σουλμπακτάμη ή σουλμπακτάμη με κεφεπίμη ή καρβαπενέμη, και

Γ) πολυμξίνη Β, ιμιπενέμη και ριφαμπικίνη [119, 120]

Τέλος, ο συνδυασμός κολιστίνης με ριφαμπικίνη είναι αποτελεσματικός στα MDR στελέχη, σε αντίθεση με τα θεραπευτικά αποτελέσματα του συνδυασμού της ριφαμπικίνης με τις καρβαπενέμες. Ωστόσο η συνδυαστική χορήγηση αντιμικροβιακών παράγοντων δεν έχει ευρέως μελετηθεί σε κλινικό επίπεδο και τα περισσότερα στοιχεία προκύπτουν από *in vitro* έρευνες [111], έτσι το πρόβλημα της αντιμετώπισης των πολυανθεκτικών στελεχών *A.baumannii* παραμένει άλυτο και ιδιαίτερα σημαντικό. Συνεπώς όλα αυτά τα στοιχεία πρέπει να συνεκτιμηθούν καθώς πολλές φορές τα *in vitro* αποτελέσματα αντοχής δεν συσχετίζονται με την *in vivo* αποτελεσματικότητα ενός φαρμάκου σε έναν ασθενή [121]. Ένα χαρακτηριστικό πολλών μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένων και του *A.baumannii* είναι η ετεροαντοχή η οποία ορίζεται ως η ανθεκτικότητα ενός υποσυνόλου μικροβιακού πληθυσμού σε ορισμένα αντιβιοτικά, όταν γενικότερα με τις παραδοσιακές *in vitro* δοκιμασίες ευαισθησίας ο πληθυσμός αυτός θεωρείται ευαίσθητος σε αυτά τα αντιβιοτικά [122]. Οι πρώτες αναφορές για ετεροαντοχή στο *A. baumannii* έγιναν από τους Pournaras et al. το 2005 [123]. Αξίζει να σημειωθεί ότι πριν από την παρατήρηση της ετεροαντοχής πολλά θεραπευτικά σχήματα εμφάνιζαν αποτυχία, μιας και δεν λαμβανόταν υπόψιν ο ο ανθεκτικός υποπληθυσμος, ο οποίος λανθασμένα θεωρούνταν ως ευαίσθητος.



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

1.9 ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Οι μηχανισμοί αντοχής του *A.baumannii* στα αντιβιοτικά, διαθέτουν μεγάλο εύρος και διαφέρει από περιγραφές που υπάρχουν για άλλα gram (-) αρνητικά αζυμοτικά παθογόνα [124,125]. Η ταχεία παγκόσμια διασπορά ανθεκτικών στελεχών *A.baumannii* σε όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά συμπεριλαμβανομένων και των καρβαπενεμών, αποδεικνύει την μοναδική ικανότητα του συγκεκριμένου μικροοργανισμού να αντιδρά ταχύτατα και να προσαρμόζεται σε εναλλασσόμενες και δύσκολες περιβαλλοντολογικές συνθήκες. Η μακρόχρονη επιβίωση του, του δίνει την ικανότητα να προσλαμβάνει γονίδια αντοχής από άλλα μικρόβια, ενισχύοντας την επίκτητη αντοχή του και σε συνδυασμό με την φυσική του αντοχή, η οποία είναι γενετικά καθορισμένη το καθιστά ακόμα πιο ισχυρό στην βακτηριοκτόνο δράση των αντιβιοτικών.

Οι γενετικοί μηχανισμοί που συμμετέχουν στην ανάπτυξη αντοχής στα αντιβιοτικά, περιλαμβάνουν, τη μεταβολή του γενετικού υλικού, η οποία γίνεται είτε μέσω α) μεταλλάξεων, είτε με β) απόκτηση νέου γενετικού υλικού μέσω μηχανισμών οριζόντιας μεταφοράς.

Οι μεταλλάξεις είναι κληρονομήσιμες αλλαγές στον γονότυπο οι οποίες μπορεί να εμφανιστούν τυχαία, με λάθος κατά την αντιγραφή του DNA (mutation rate 10^{-6} - 10^{-7} per base per generation), είτε με την επίδραση μεταλλαξιογόνων παραγόντων του περιβάλλοντος (π.χ. χρήση χημικών ουσιών, ιονίζουσα ακτινοβολία κτλ.). Οι μεταλλάξεις μπορεί να είναι σημειακές, με τον απλούστερο εκπρόσωπό τους την αντικατάσταση μιας βάσης, η οποία επιτυγχάνεται 1) με μετάβαση-“transition”, μιας πουρίνης από μια άλλη πουρίνη (π.χ. A→G), είτε με την αντικατάσταση μιας πυριμιδίνης από από μια άλλη (π.χ. T→C), 2) με μεταστροφή-“transversion”, κατά την οποία μια πουρίνη αντικαθίσταται από μια πυριμιδίνη ή το αντίστροφο (π.χ. A→T). Τέλος, αλλαγές μπορεί να προκύψουν είτε με γ) την εξάλειψη, ή δ) την προσθήκη μιας βάσης. Εκτός των σημειακών μεταλλάξεων υπάρχουν και οι πολυθεσιακές μεταλλάξεις στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντικατάσταση, η προσθήκη ή η εξάλειψη περισσότερων της μιας βάσεων.

Ο κυριότερος μηχανισμός αποκτήσεως νέου γενετικού υλικού σχετίζεται με κινητές γενετικές μονάδες (Mobile Genetic Elements, MGEs), όπως είναι :

- 1) τα μεταθετά στοιχεία, στα οποία ανήκουν, οι αλληλουχίες εισδοχής (IS) και τα τρανσποζόνια (σύνθετα και πολύπλοκα),
- 2) τα ιντεγκρόνια (κινητά ή χρωμοσωμικά),
- 3) τα συζευκτικά μεταθετά στοιχεία, και
- 4) τα πλασμίδια

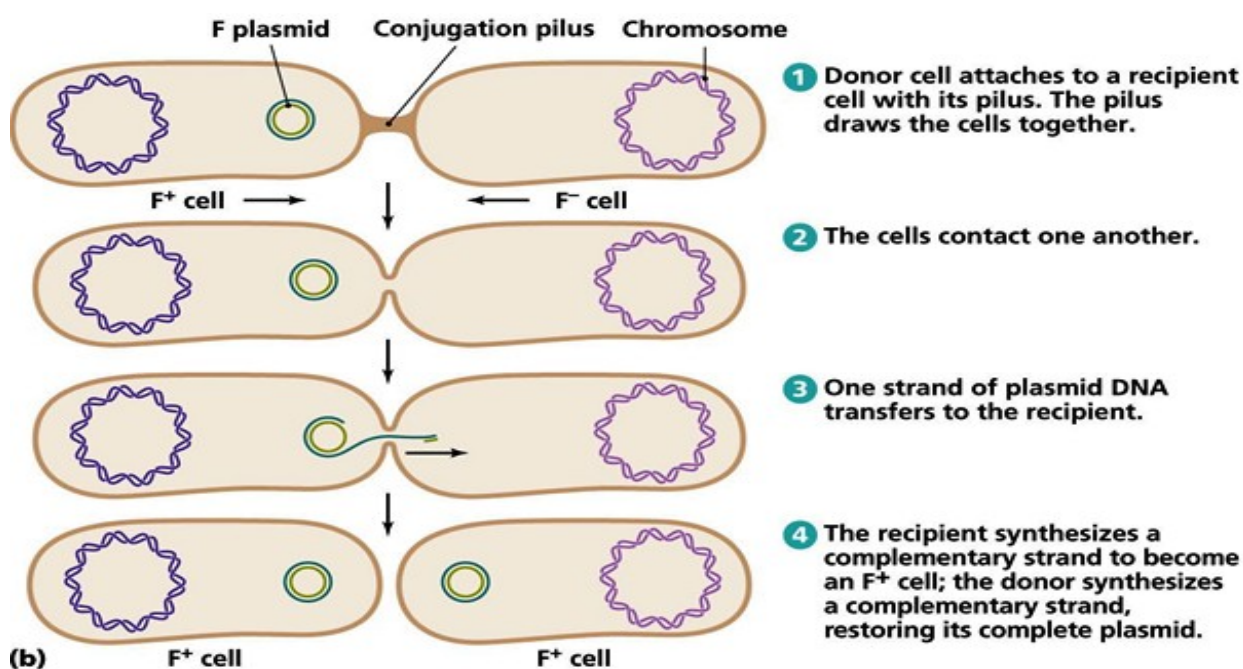
Η ανταλλαγή των γενετικών πληροφοριών μεταξύ των βακτηρίων μπορεί να συμβεί μέσω διαφόρων μηχανισμών, όπως είναι:

α) Η **μεταμόρφωση (transformation)**, κατά την οποία το βακτήριο δέκτης προσλαμβάνει εξωκυττάριο DNA. Για να λάβει χώρα ο μετασχηματισμός, τα βακτήρια δέκτες πρέπει να βρίσκονται σε κατάσταση ικανότητας (competence), η οποία μπορεί να συμβεί ως απόκριση σε περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η πείνα και η κυτταρική πυκνότητα, ή να προκληθεί στο εργαστήριο.

β) Η **μεταγωγή (transduction)**, είναι η διαδικασία κατά την οποία εισάγεται ξένο DNA σε ένα κύτταρο από βακτηριοφάγο (ιοί που μολύνουν βακτήρια). Δεν απαιτεί φυσική επαφή μεταξύ του κυττάρου που δίνει το DNA και του κυττάρου που το λαμβάνει και είναι ανθεκτική στη DNAση. Η μεταγωγή συμβαίνει είτε με τον λυτικό, είτε με τον λυσογόνο κύκλο.

Τόσο στη **μεταγωγή**, όσο και στη γενετική **μεταμόρφωση**, η ενσωμάτωση των DNA αλληλουχιών συνήθως συμβαίνει μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού. Ο ομόλογος ανασυνδυασμός απαιτεί την ύπαρξη παρόμοιων DNA αλληλουχιών και έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση παρά την προσθήκη γενετικού υλικού. Η προσθήκη γενετικού υλικού επιτυγχάνεται με το μηχανισμό της DNA μετάθεσης, που πραγματοποιείται από τα λεγόμενα μεταθετά γενετικά στοιχεία (transposons).

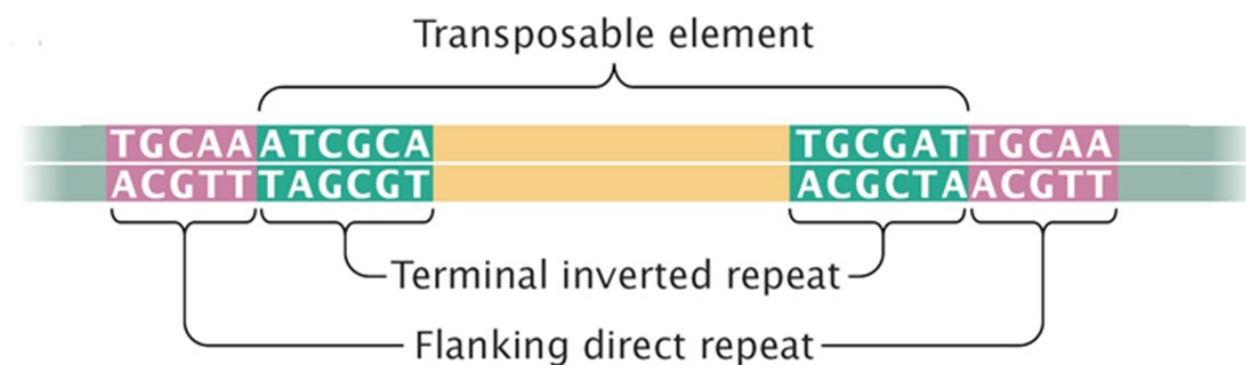
γ) Η **σύζευξη (conjugation)**, όπου το βακτήριο δότης μεταφέρει DNA στο βακτήριο δέκτη και αποτελεί τον πλέον σημαντικό τρόπο μεταβίβασης αντοχής σε κλινικά στελέχη. Με βακτηριακή σύζευξη μετακινούνται τα **πλασμίδια** και τα **συζευκτικά μεταθετά στοιχεία** (conjugative transposons). Ο μηχανισμός της βακτηριακής σύζευξης αποτελεί διαδικασία αντιγραφής DNA, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία δύο αντιγράφων του πλασμιδίου, από τα οποία το ένα μένει στο κύτταρο του δότη και το δεύτερο στο κύτταρο του δέκτη.



ΕΙΚΟΝΑ 7. Σχηματική αναπαράσταση της βακτηριακής σύζευξης

Η προσθήκη γενετικού υλικού επιτυγχάνεται με το μηχανισμό της DNA μετατόπισης (μετάθεση), που πραγματοποιείται από τα αποκαλούμενα μεταθετά γενετικά στοιχεία. Η μεταφορά των θραυσμάτων DNA διεξάγεται από τα μεταθετά στοιχεία, τα οποία είναι διακριτές γενετικές δομές με καθορισμένες άκρες. Τα μεταθετά στοιχεία μπορούν να κινούνται ως ανεξάρτητες αλληλουχίες ή να δρουν ως μεσολαβητές για τη μεταφορά άλλων DNA αλληλουχιών.

Η σημασία των μεταθετών στοιχείων αντικατοπτρίζεται από το γεγονός ότι τα περισσότερα κλινικά σημαντικά γονίδια αντοχής σχετίζονται με τέτοιες δομές.



ΕΙΚΟΝΑ 8. Απεικόνιση μεταθετού στοιχείου

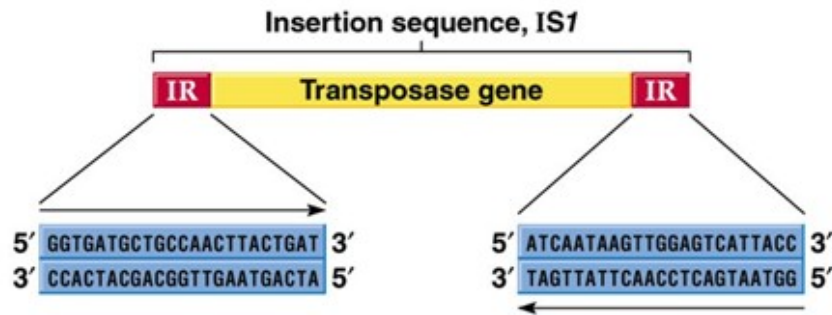
Το τρανσποζόνιο αποτελείται από ένα ORF (open reading frame), ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που εκτελεί τη διαδικασία μεταφοράς και ονομάζεται τρανσπορτάση. Τα άκρα των μεταθετών στοιχείων αποτελούνται από ανεστραμμένες επαναλήψεις (IR). Αυτές οι αλληλουχίες είναι πανομοιότυπες, εφόσον είναι ειδικές θέσεις σύνδεσης για την τρανσποζάση.

Τα μεταθετά στοιχεία μπορούν να χωριστούν σε α) αλληλουχίες εισδοχής (ISs), και β) τρανσποζόνια. Οι αλληλουχίες εισδοχής είναι μικρά μεταθετά στοιχεία (1-2 kb) που κωδικοποιούν μόνο τη λειτουργία της μεταφοράς [126], ενώ τα τρανσποζόνια φέρουν γονίδια που κωδικοποιούν άλλες λειτουργίες, όπως π.χ. αντοχή στα αντιβιοτικά [127].

α) Οι αλληλουχίες εισδοχής (ISs) αποτελούν τον πιο απλό τύπο μεταθετών στοιχείων. Είναι δομές μικρού μεγέθους (0,5-2 kb) που αποτελούνται από μικρές τερματικές IRs, που οριοθετούν ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame:ORF) που κωδικοποιεί την τρανσποζάση.

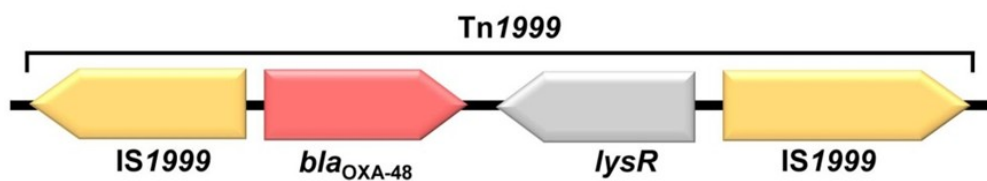
Οι αλληλουχίες εισδοχής ορίζονται από το ακρωνύμιο IS και έναν αριθμό που ακολουθεί (π.χ. IS1, IS26). <https://isfinder.biotoul.fr/>. Έχει βρεθεί ότι συχνά υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των ISs και παθογόνου και λοιμογόνου δράσης. Όσον αφορά το *Acinetobacter* αλληλουχίες εισδοχής έχουν βρεθεί συνδεδεμένες με διάφορα γονίδια αντοχής, όπως η IS*Aba1*, ανιχνεύεται με το γονίδιο *bla_{AmpC}* προσδίδοντας αντοχή στην κεφταζιδίμη [128], καθώς και με τα γονίδια *bla_{oxa-51}* και *bla_{oxa-58}* [129]. Στο γονίδιο *bla_{oxa-58}*, εκτός από IS*Aba1* έχει ανιχνευτεί και IS*Aba2*, IS*Aba3* και IS*Aba18*, που

οδηγούν σε αυξημένη έκφραση του γονιδίου [129]. Στην εικόνα που ακολουθεί φαίνεται η δομή μιας τυπικής IS.

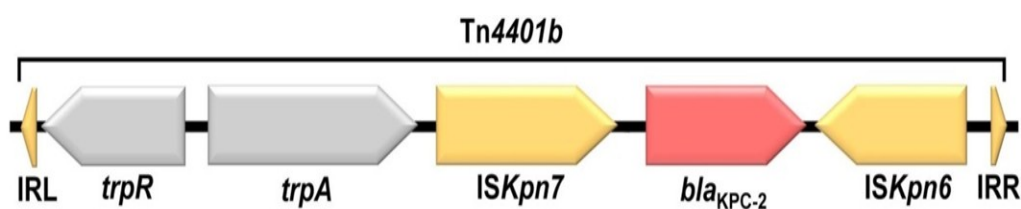


ΕΙΚΟΝΑ 9. Τυπική δομή αλληλουχίας εισδοχής IS.

β) Με τον όρο τρανσποζόνια περιγράφονται είτε τα σύνθετα μεταθετά στοιχεία (composite transposons), είτε τα πολύπλοκα μεταθετά στοιχεία (complex transposons). Ο όρος «σύνθετα τρανσποζόνια» αναφέρεται σε πρότυπες δομές που περιλαμβάνουν μία κεντρική αλληλουχία, η οποία κωδικοποιεί για τις λειτουργίες που προσδιορίζουν φαινοτυπικά το μεταθετό στοιχείο, αλλά στερείται λειτουργιών που αφορούν την μετάθεση [130]. Η κεντρική αλληλουχία αφορίζεται από δύο αντίγραφα της ίδιας αλληλουχίας εισδοχής. Συνήθως, τα δύο αντίγραφα της αλληλουχίας εισδοχής σχηματίζουν εκτεταμένες τερματικές IRs, αν και σε ορισμένα σύνθετα τρανσποζόνια οι αλληλουχίες εισδοχής σχηματίζουν τερματικές άμεσες επαναλήψεις. Οι αλληλουχίες εισδοχής παρέχουν την τρανσποζάση για τον μηχανισμό της DNA μετάθεσης, ενώ οι IRs των αλληλουχιών εισδοχής ορίζουν τα άκρα του σύνθετου μεταθετού στοιχείου. Όταν, ένα IS στοιχείο γίνεται μέρος ενός σύνθετου τρανσποζονίου, το IS στοιχείο δεν χάνει την ικανότητα του να λειτουργεί ανεξάρτητα.



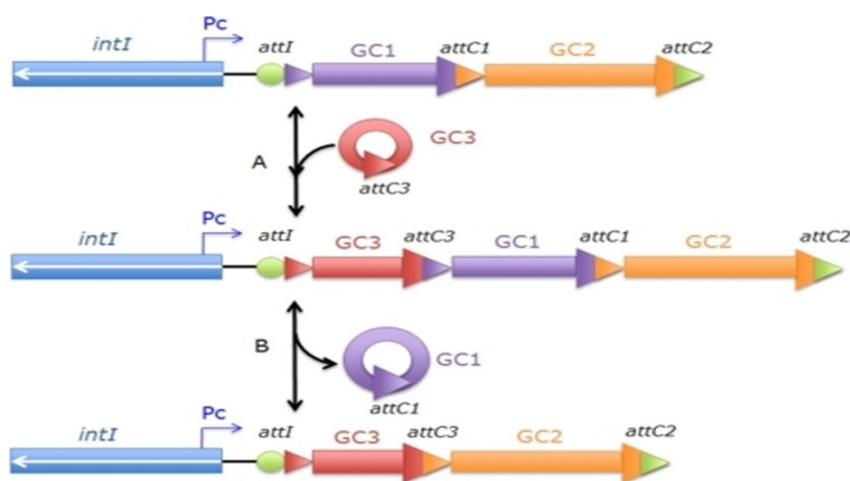
ΕΙΚΟΝΑ 10α. Απεικόνιση σύνθετου τρανσποζονίου



ΕΙΚΟΝΑ 10β. Απεικόνιση πολύπλοκου τρανσποζονίου

Με τον όρο πολύπλοκα μεταθετά στοιχεία περιγράφονται τα τραπεζοζόνια που δεν ανήκουν στην κατηγορία των σύνθετων μεταθετών στοιχείων. Τα πολύπλοκα τραπεζοζόνια στερούνται πρότυπης δομής και παρουσιάζουν πιο πολύπλοκη γενετική δομή από τα σύνθετα μεταθετά στοιχεία. Σε αντίθεση με τα σύνθετα, τα πολύπλοκα τραπεζοζόνια αφορίζονται από βραχείες IRs, μήκους 15-40 bp, ανάλογα με το τραπεζοζόνιο. Οι IRs αφορίζουν γονίδια που κωδικοποιούν λειτουργίες απαραίτητες για τη μετάθεση, καθώς και γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά. Κανένα τμήμα του πολύπλοκου τραπεζοζονίου δεν μπορεί να μετατεθεί ανεξάρτητα.

Οι δομές αυτές αποτελούνται από τρία στοιχεία, κοινά σε όλα τα ιντεγκρόνια. Το γονίδιο της ιντεγκράσης (*intI*), που κωδικοποιεί μια ειδικής-θέσης ρεκομπινάση, η οποία ευθύνεται για την ενσωμάτωση, καθώς και για την αφαίρεση των εξωγενών γονιδίων-κασετών, το κύριο σημείο ανασυνδυασμού *attI*, και μία περιοχή υποκινητών, Pc, που ευθύνεται για την μεταγραφή τους, 2) Τα ιντεγκρόνια είναι γενετικά στοιχεία τα οποία αναγνωρίζουν και ενσωματώνουν γονίδια υπο τη μορφή κασετών λειτουργώντας ως φυσικά εργαλεία γενετικού ανασυνδυασμού.



ΕΙΚΟΝΑ 11. Τυπική δομή ιντεγκρονίου, με τα τρία κοινά στοιχεία.

Τα ιντεγκρόνια διαιρούνται σε δυο υποομάδες στα κινητά ιντεγκρόνια, και στα χρωμοσωμικά ιντεγκρόνια.

Τα κινητά δεν μπορούν να κινηθούν ανεξάρτητα και η μετακίνησή τους εξαρτάται από την παρουσία κινητών γενετικών στοιχείων. Μέχρι στιγμής, πέντε τάξεις κινητών ιντεγκρονίων έχουν περιγραφεί βάσει της κωδικής αλληλουχίας της ιντεγκράσης [131]. Οι πρώτες τρεις τάξεις ιντεγκρονίων έχουν εμπλακεί στην εξέλιξη φαινοτύπων πολλαπλής αντοχής [132].

Τα ιντεγκρόνια τάξης 1 είναι τα πιο διαδεδομένα στα κλινικά βακτηριακά στελέχη. Η δομή τους περιλαμβάνει δύο συντηρημένες περιοχές, την 5'CS και την 3'CS, και μία κεντρική μεταβλητή περιοχή [133, 134]. Η 5'CS περιοχή περιέχει το γονίδιο της ιντεγκράσης (*intI1*) και το κύριο σημείο ανασυνδυασμού *attI* [135]. Η 3'CS περιοχή, στο άλλο άκρο, είναι συντηρημένη σε

μικρότερο βαθμό [145]. Συνήθως όμως, περιλαμβάνει μέρος του γονιδίου *qacEΔ1* (αντοχή στα άλατα τεταρτοταγούς αμμωνίου) και το γονίδιο *sull* (αντοχή στις σουλφοναμίδες), *orf5* και *orf6* [136 , 137]. Οι δύο αυτές συντηρημένες περιοχές περικλείουν μία μεταβλητή περιοχή, η οποία περιλαμβάνει τα γονίδια-κασέτες (συνήθως γονίδια αντοχής). Η περιοχή αυτή παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια, καθώς η ταυτότητα και ο αριθμός των γονιδίων-κασετών διαφέρει από ιντεγκρόνιο σε ιντεγκρόνιο.

Τα γονίδια-κασέτες ποικίλουν σε μέγεθος από 262 έως 1549 bp. Παρά την ποικιλομορφία τους σε μέγεθος και λειτουργία, οι κασέτες φέρουν κοινές περιοχές. Κάθε γονίδιο-κασέτα αποτελείται από το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), που καλύπτει το μεγαλύτερο μέρος της κασέτας, και την περιοχή ανασυνδυασμού, *attC* (59-base element), που βρίσκεται στο 3' άκρο της κασέτας [138]. Έως σήμερα, έχουν χαρακτηριστεί περισσότερες από 60 διαφορετικές κασέτες αντοχής, οι οποίες καλύπτουν τα περισσότερα εν χρήσει αντιβιοτικά [139]. Οι δύο πιο πρόσφατα χαρακτηρισμένες κασέτες αντοχής κωδικοποιούν για τις μεταλλο-β-λακταμάσες IMP και VIM, οι οποίες παρέχουν αντοχή έναντι των καρβαπενεμών [140,141,142,143]. Θεωρητικά, τα γονίδια-κασέτες μπορούν να υπάρξουν και ως ελεύθερα κυκλικά μόρια (ενδιάμεσες μορφές) [144].

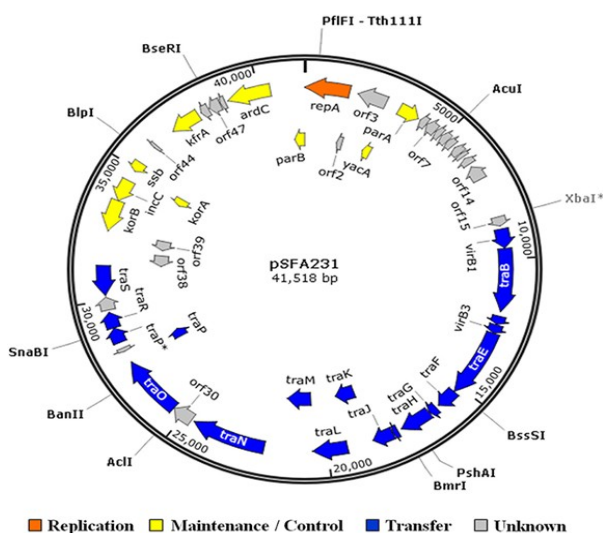
Τα γονίδια-κασέτες στερούνται δικού τους υποκινητή, καθώς στις περισσότερες κασέτες λιγότερες από 10 βάσεις χωρίζουν το πρώτο κωδικόνιο έναρξης από το 5' άκρο της κασέτας. Οι κασέτες ενσωματώνονται στο *attI* σημείο με συγκεκριμένη κατεύθυνση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η έκφραση των γονιδίων-κασετών να ελέγχεται από έναν κοινό υποκινητή (Pc). Ο Pc εντοπίζεται 214 bp ανοδικά του εσωτερικού άκρου της 5'CS περιοχής, εντός της κωδικής αλληλουχίας της ιντεγκράσης. Ο Pc απαντάται σε τέσσερις διαφορετικούς τύπους ('ασθενής', 'ισχυρός', 'υβριδικός 1' και 'υβριδικός 2') που διαφέρουν σε μία ή δύο βάσεις στις περιοχές -35 και -10, οι οποίες απέχουν μεταξύ τους 17 bp. Επιπλέον, σε ορισμένα ιντεγκρόνια, ένας δεύτερος υποκινητής (P2) έχει δημιουργηθεί από την προσθήκη τριών G νουκλεοτιδίων μεταξύ των περιοχών -35 και -10, βελτιστοποιώντας την μεταξύ τους απόσταση σε 17 βάσεις (P2 ενεργός). Η σχετική ισχύς του 'ασθενή', 'ισχυρού' και 'υβριδικού 1' τύπων Pc υποκινητών, καθώς και η ισχύς του 'ασθενή' συνδυασμένου με ενεργό P2 έχουν χαρακτηριστεί [145, 146].

Τα χρωμοσωματικά ιντεγκρόνια, γνωστά και ως 'super-integrans', εντοπίστηκαν για πρώτη φορά στο γένωμα του *Vibrio cholerae* [147]. Τα χρωμοσωματικά ιντεγκρόνια αποτελούν έναν ξεχωριστό τύπο ιντεγκρονίων που απαντούν σε χρωμοσώματα και άλλων βακτηριακών ειδών [148, 149, 150].

Οι ιντεγκράσες αυτών των χρωμοσωματικών ιντεγκρονίων είναι συγγενικές με αυτές των κινητών ιντεγκρονίων, αλλά τα χρωμοσωματικά ιντεγκρόνια παρουσιάζουν δύο χαρακτηριστικά που τα διακρίνουν από τα κινητά ιντεγκρόνια:

α) τα χρωμοσωματικά ιντεγκρόνια φέρουν μεγάλο αριθμό γονιδίων-κασετών (>20 κασέτες) και οι *attC* (VCRs) περιοχές των ενδογενών κασετών παρουσιάζουν εκτεταμένη ομοιότητα μεταξύ τους, β) τα χρωμοσωματικά ιντεγκρόνια έχουν εντοπιστεί μόνο σε χρωμοσώματα και ποτέ δεν έχει βρεθεί να σχετίζονται με κινητά γενετικά στοιχεία [151].

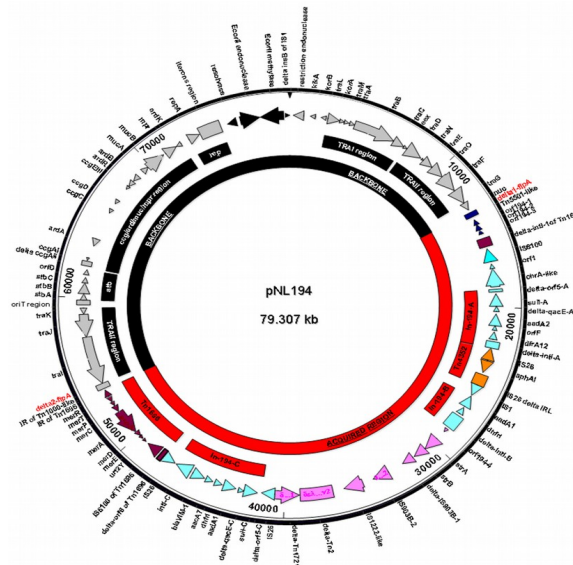
Τα πλασμίδια είναι οι πιο καλά μελετημένες γενετικές δομές, γεγονός που οφείλεται στο μικρό τους μέγεθος (5 kbp έως 2Mbp). Τα χαρακτηρίζει η ιδιότητά τους να διατηρούν και να διασπείρουν νέα γονίδια, όπως (π.χ.γονίδια αντοχής) μεταξύ των βακτηριακών πληθυσμών. Τα πλασμίδια είναι ρεπλικόνια και εμφανίζονται μέσα στα βακτήρια ως εξω-χρωμοσωματικές δομές, που έχουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού, η οποία δεν εξαρτάται από το χρωμόσωμα. Αυτές οι εξωχρωμοσωματικές γενετικές δομές φέρουν γονίδια, που εξασφαλίζουν τον αυτόνομο πολλαπλασιασμό τους, τον έλεγχο του αριθμού των αντιγράφων τους, και την σταθερότητά τους, κατά την κυτταρική διαίρεση. Επίσης εμπεριέχουν γονίδια που επιτρέπουν την μεταφορά τους μεταξύ βακτηρίων, μέσω του μηχανισμού της βακτηριακής σύζευξης. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι τα πλασμίδια φέρουν μια ποικιλία γονιδίων, όπως γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά, σε τοξικές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων, γονίδια που επεκτείνουν τις διατροφικές ικανότητες του κυττάρου, γονίδια που ενισχύουν την ικανότητα επιδιόρθωσης των DNA βλαβών και τέλος γονίδια που ευθύνονται για την μολυσματικότητα του βακτηριού επιτρέποντας την εισβολή και την επιβίωση σε ζωικούς οργανισμούς [152,153]. Τα πλασμίδια που μέχρι στιγμής έχουν χαρακτηριστεί συνίστανται από δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA ποικίλου μεγέθους.



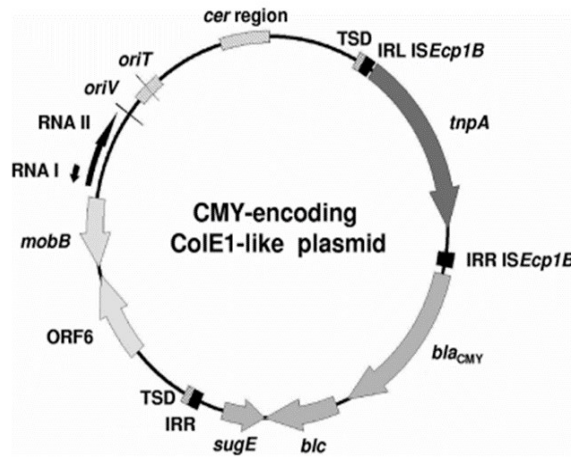
ΕΙΚΟΝΑ 12. Τα περισσότερα πλασμίδια είναι κυκλικά, υπερελικόμενα, δίκλιωνα μόρια DNA.

Τα πλασμίδια που φιλοξενούν γονίδια υπεύθυνα για αντοχή σε αντιβιοτικά λέγονται πλασμίδια αντοχής. Τα γονίδια αντοχής φέρονται είτε από συζευκτικά, αυτομεταφερόμενα πλασμίδια, είτε από, μη συζευκτικά πλασμίδια. Ο διαχωρισμός της των πλασμιδίων αντοχής, έγινε με βάση τη

δυνατότητα μεταφοράς της. Έτσι, τα μεν συζευκτικά πλασμίδια φέρουν περιοχές που κωδικοποιούν για τις λειτουργίες που είναι απαραίτητες για την διακυτταρική μεταφορά του DNA, σε αντίθεση με τα μη συζευκτικά πλασμίδια των οποίων η μεταφορά εξαρτάται από αντίστοιχες περιοχές των συζευκτικών πλασμιδίων που τυχόν συνυπάρχουν, και τα κινητοποιεί, μιας και το ίδιο δεν φέρει δικές του [154]. Τα μη συζευκτικά πλασμίδια είναι μικρά, της τάξεως ακόμη και κάτω των 10kb, ενώ αντίθετα τα συζευκτικά είναι μεγάλα 30kb ή και μεγαλύτερα. Απαραίτητη για τη μεταφορά των μη συζευκτικών πλασμιδίων είναι μόνο η αλληλουχία *oriT*, που περιέχει την αρχή και το τέλος της μεταφερόμενης DNA αλυσίδας.



ΕΙΚΟΝΑ 13. Απεικόνιση συζευκτικού πλασμιδίου.



ΕΙΚΟΝΑ 14. Απεικόνιση μη-συζευκτικού πλασμιδίου.

Για την ανάλυση της διασποράς των πλασμιδίων στη φύση και την μελέτη της εξελικτικής της πορείας, αναπτύχθηκε ένα σύστημα ταυτοποίησης και κατάταξής της σε ομάδες ανάλογα με τις μεταξύ της φυλογενετικές σχέσεις [155]. Ένα σχήμα ταξινόμησης των πλασμιδίων βασίστηκε στην

πλασμιδιακή ασυμβατότητα, δηλαδή στην ικανότητα της να συνυπάρχουν ή όχι μέσα στο ίδιο βακτηριακό κύτταρο [156,157]. Τα συζευκτικά πλασμίδια έχουν ενταχθεί σε διάφορες ομάδες πλασμιδιακής ασυμβατότητας με πρώτη την IncF-like, δεύτερη την IncP-like, τρίτη την IncP και τέταρτη την IncI. Το 2005, για την τυποποίηση των πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκε μια νέα και αξιόπιστη μέθοδος, η οποία βασίζεται στην τεχνολογία της PCR, η PCR based-replicon-typing, (PRBT) [158]. Με την μέθοδο αυτή στοχοποιούνται τα ρεπλικόνια των κύριων πλασμιδιακών ομάδων που έχουν βρεθεί σε εντεροβακτηριακά.

1.9.1 ANTOXH ΣΤΙΣ Β-ΛΑΚΤΑΜΕΣ

Όλο και συχνότερο φαινόμενο με παγκόσμιες διαστάσεις αποτελεί η αντοχή του *A.baumannii* στα β-λακταμικά αντιβιοτικά και κυρίως στις καρβαπενέμες. Η συστηματική μελέτη μοριακών μηχανισμών αναφέρεται στην παραγωγή β-λακταμασών, τόσο ενδογενών (AmpC και OXA-51), όσο και εξωγενών (IMP, VIM, OXA-58) (οι οποίες οδηγούν στην ενζυμική απενεργοποίηση των β-λακταμικών αντιβιοτικών).

1.9.1.1 ENZYMATIKOI ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

Ο κυριότερος μηχανισμός αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά είναι η ενζυμική απενεργοποίηση τους από τις β-λακταμάσες. Εξαιτίας όμως της πολύπλοκης φύσης αυτού του μικροοργανισμού εμπλέκονται πολλαπλοί μηχανισμοί στην παραγωγή του ίδιου φαινοτύπου [159,160,161]. Οι πρώτες προσπάθειες ταξινόμησης των β-λακταμασών άρχισαν την δεκαετία του 1970, όταν οι πενικιλινάσες διαχωρίστηκαν από τις κεφαλοσπορινάσες και έκτοτε προτάθηκαν διάφορα ταξινομικά σχήματα με επικρατέστερη σήμερα την ταξινόμηση κατά Ambler και την ταξινόμηση κατά Bush.

Στην ταξινόμηση κατά Ambler οι β-λακταμάσες διαχωρίζονται βάσει της αμινοξικής αλληλουχίας. Στην αρχή προτάθηκαν η μοριακή τάξη A [162], που περιελάμβανε ένζυμα με κατάλοιπο σερίνης στο ενεργό κέντρο και η μοριακή τάξη B [115], που περιελάμβανε ένζυμα που χρειάζονται δισθενή κατιόντα μετάλλων (συνήθως Zn²⁺) για να δράσουν. Αργότερα, άλλες σερίνο-β-λακταμάσες καταχωρήθηκαν στις μοριακές τάξεις C [163] και D [164]. Σύμφωνα με την τελευταία αναθεώρηση [165] οι β-λακταμάσες χωρίζονται σε σερίνο- και μεταλλο-β-λακταμάσες (μοριακή τάξη B).

Η ταξινόμηση κατά Bush προτείνει τέσσερις ομάδες βάσει των λειτουργιών. Στην ομάδα 1 ανήκουν κεφαλοσπορινάσες, στην πλειοψηφία τους χρωμοσωμικές και επαγωγίμη δράση, οι οποίες δεν αναστέλλονται από κλαβουλανικό οξύ και την σουλμπακτάμη και ανήκουν στην μοριακή τάξη C κατά Ambler. Η ομάδα 2 υποδιαιρείται σε 8 ομάδες, τα ένζυμα των οποίων αναστέλλονται περισσότερο από το κλαβουλανικό οξύ, παρά από την αζτρεονάμη [166,167] και

ανήκουν στην μοριακή τάξη A κατά Ambler. Η ομάδα 3 περιλαμβάνει ένζυμα δηλαδή β-λακταμάσες που δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ [167], για να δράσουν είναι αναγκαία η παρουσία δισθενών κατιόντων μετάλλων και για αυτό το λόγο αναστέλλονται από το EDTA (Ethylene Diamine Tetracetic Acid) και ανήκουν στην μοριακή τάξη B κατά Ambler.

Τέλος, στην ομάδα 4 ανήκουν πενικιλινάσες που δεν αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ και δεν έχει οριστεί ακόμα σαφώς η αντιστοιχία τους στο σχήμα Ambler [167].

Οι ευρέως φάσματος β-λακταμάσες (ESBLs) της ομάδας A κατά Ambler, έχουν ανιχνευθεί στα *A.baumannii*. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον υπάρχει για την VEB-1 β-λακταμάση, η οποία υδρολύει την αμοξικιλίνη, την τικαρκιλίνη, την πιπερακιλλίνη, την κεφοταξίμη, την κεφταζιδίμη και την αζτρεονάμη [168]. Η δράση της αναστέλλεται από την παρουσία του κλαβουλανικού οξέως, έτσι η παρατηρούμενη συνέργεια αυτών των αντιβιοτικών με το κλαβουλανικό οξύ οδηγεί στην φαινοτυπική ανίχνευση αυτής της β-λακταμάσης. Το γονίδιο που την κωδικοποιεί ανευρίσκεται σε ιντεγκρόνια τάξης I. Η συγκεκριμένη β-λακταμάση ανιχνεύθηκε πρώτη φορά σε νοσοκομεία της Γαλλίας και υπάρχουν έκτοτε αναφορές στο Βέλγιο και την Αργεντινή [169, 170, 171, 172, 173]. Εξίσου σημαντική β-λακταμάση, η οποία υδρολύει την αμοξικιλίνη, τικαρκιλίνη, κεφαλοθίνη και τις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες και τη δράση τους αναστέλλουν το κλαβουλανικό οξύ, η σουλμπακτάμη, η ιμιπενέμη και οι κεφαμυκίνες είναι η PER-1 β-λακταμάση. Η PER-1 έχει ανιχνευθεί στην Γαλλία, Τουρκία, Βέλγιο, Ρουμανία, Κορέα και Ηνωμένες Πολιτείες [174, 175, 176, 177, 178, 179] και η PER-2 στην Αργεντινή [172]. Η φορεία του *bla_{PER-1}* έχει συσχετιστεί με ιδιαίτερα λοιμογόνους κλώνους *A.baumannii* [180].

Οι μεταλλο-β-λακταμάσες (MBL), ανήκουν στην τάξη B κατά Ambler, δεν απαντώνται πολύ συχνά στα *A.baumannii*, ως συμπαραγόντες απαιτούν κατιόντα μετάλλων και έχουν την ικανότητα να υδρολύουν όλες τις β-λακτάμες εκτός από την μονοβακτάμη, αζτρεονάμη. Οι MBLs αναστέλλονται από την παρουσία EDTA (χηλικός παράγοντας), ιδιότητα που βοηθά στην φαινοτυπική ανίχνευση του στο εργαστήριο, με την χρήση διπλών E-test ιμιπενέμης τα οποία από το ένα άκρο έχουν EDTA και από το άλλο όχι, έτσι ώστε να είναι δυνατός ο προσδιορισμός των στελεχών τα οποία παράγουν MBLs. Έχουν ταυτοποιηθεί έξι ομάδες MBLs (IMP-like, VIM-like, NDM, SIM-1, SPM-1 και GIM-1 enzymes). Στο *A. baumannii* έχουν ανιχνευθεί οι IMP [179, 181, 182, 183, 184], VIM [185, 186, 187, 188] και SIM [189]. Η NDM-1, εντοπίστηκε το 2010 σε ένα στέλεχος *A. baumannii* στην Ινδία [190]. Πρόσφατα μάλιστα, η NDM-1 ανευρέθηκε για πρώτη φορά και στη χώρα μας σε ένα στέλεχος *A. baumannii* που απομονώθηκε από ασθενή που μεταφέρθηκε στην Ελλάδα από τη Λιβύη το 2016 [191]. Τα περισσότερα γονίδια που κωδικοποιούν τα συγκεκριμένα ένζυμα, στα στελέχη *A. baumannii* εντοπίζονται σε ιντεγκρόνια τάξης 1. Τα στελέχη *A. baumannii* που φέρουν ιντεγκρόνια παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντοχή στα

φάρμακα, από ότι τα στελέχη που δεν φέρουν αυτές τις δομές [192]. Η υδρολυτική ικανότητα των MBLs απέναντι στις καρβαπενέμες είναι 100-1000 φορές μεγαλύτερη από αυτή των οξακιλινασών, ωστόσο η ποσοτική υπεροχή των τελευταίων στο *A. baumannii* είναι αυτό που τις καθιστά τον κύριο μηχανισμό αντοχής στις καρβαπενέμες. Στην ομάδα D κατά Ambler ανήκουν οι οξακιλινάσες οι οποίες αποτελούν έναν από τους κυριότερους μηχανισμούς αντοχής των *A. baumannii*. Ορισμένες μεταλλαγές των OXA β-λακταμασών προσδίδουν αντοχή στις καρβαπενέμες. Το πρώτο ένζυμο τύπου OXA που είχε την ικανότητα να υδρολύει τις καρβαπενέμες ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά από κλινικό στέλεχος *A.baumannii* το 1985 στο Εδιμβούργο [193]. Το πλασμίδιο που κωδικοποιούσε ήταν μεταβιβάσιμο και το γονίδιο αργότερα ονομάστηκε *bla_{OXA-23}* [194] και ευθύνεται για την αντοχή στις καρβαπενέμες παγκοσμίως [174, 195, 196, 197]. Στην ομάδα OXA-23 ανήκουν και τα ένζυμα OXA-27 και OXA-49 [198, 199]. Επίσης, στο *A. baumannii* έχουν βρεθεί κι άλλες καρβαπενεμάσες τύπου-OXA, παρόμοιες με την OXA-23, που σχηματίζουν με αυτήν κοινή ομάδα γονιδίων, την ομάδα OXA-23-like. Πρόκειται για την OXA-27 που έχει εντοπιστεί στη Σιγκαπούρη [198] και τις OXA-49 και OXA-73 που ανιχνεύθηκαν στην Κίνα [200, 199]. Ακόμη, έχει παρατηρηθεί ότι τα επιδημικά στελέχη *A. baumannii* που παράγουν το ένζυμο OXA-23 ανήκουν στους διεθνείς κλώνους I ή II [201]. Το γονίδιο *bla_{OXA-23}* βρίσκεται είτε στο χρωμόσωμα, είτε σε πλασμίδια και συνδέεται με τέσσερις διαφορετικές γενετικές δομές, εκ των οποίων πιο συχνό είναι το τρανσποζόνιο Tn2006 [201]. Περιγράφονται επίσης τα *bla_{OXA-51-like}* και τα *bla_{OXA-58-like}* [202, 203, 204]. Τέλος, τα ένζυμα της ομάδας OXA-51-like (OXA-51, -64, -65, -66, -68, -69, -70, -71, -78, -79, -80 και -82) διαφέρουν από τις άλλες καρβαπενεμάσες τύπου-OXA στο γεγονός ότι ανευρίσκονται ενδογενώς στο χρωμόσωμα όλων των *A. baumannii* [205]. Όταν, όμως, τα ένζυμα αυτά συνδυαστούν με αλληλουχίες εισδοχής προκαλείται η υπερέκφρασή τους, με αποτέλεσμα να αποκτούν δραστηριότητα καρβαπενεμάσης [206]. Ο ρόλος τους στην αντοχή στις καρβαπενέμες φαίνεται να σχετίζεται με την παρουσία της αλληλουχίας IS*Abal* [206], μιας και όταν απουσιάζει, η επίδραση στην ευαισθησία του μικροβίου στις καρβαπενέμες είναι ελάχιστη, ακόμα και όταν υπάρχει υπερέκφραση των αντλιών εκροής (AdeABC) [207]. Η παρουσία στοιχείων IS με τις δύο βασικές τους λειτουργίες παίζει σημαντικό ρόλο στην έκφραση αντοχής στις καρβαπενέμες από τις οξακιλινάσες των *A.baumannii* [206, 208, 128]. Είναι κινητά κατά πρώτον, ενώ κατά δεύτερον, περιέχουν εκκινητές, οι οποίοι οδηγούν σε υπερέκφραση των στοιχείων καθόδου. Συχνότερα σχετίζονται με τα γονίδια *bla_{OXA-23}* [174, 128], *bla_{OXA-58}* [204, 209, 210] και *bla_{OXA-51}* [206]. Αξίζει να σημειωθεί ότι ορισμένα IS κυρίως το IS*Abal*, ανευρίσκονται μόνο στα *A. baumannii* [211].

Οι AmpC κεφαλοσπορινάσες (ADC) είναι β-λακταμάσες τάξης C σύμφωνα με την μοριακή ταξινόμηση κατά Ambler, τις συναντάμε σε όλα τα στελέχη *A.baumannii* [212, 174, 213, 214, 215]

καθώς το γονίδιο που τις εκφράζει είναι χρωμοσωμικό και σχετίζεται άμεσα με την αλληλουχία *ISAbal*. Η παρουσία τους εξασφαλίζει ανθεκτικότητα των στελεχών στις κεφαλοσπορίνες, ενώ αφήνει ανεπηρέαστη τη δράση της κεφεπίμης και των καρβαπενεμών [215, 216 , 213].

1.9.1.2 ΜΗ – ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

Στην ανάπτυξη αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά παίζει ρόλο και η διαπερατότητα των βακτηριακών μεμβρανών, γεγονός που οφείλεται στην παρουσία των πορινών, οι οποίες είναι πρωτεΐνες με τριμερή ή μονομερή δομή ανάλογα με τον τρόπο που συγκροτούνται στη μεμβράνη, ενώ παρουσιάζουν διαφορετικό βαθμό ελευθερίας για την εισροή των β-λακταμών, ανάλογα με το φορτίο και το μοριακό τους βάρος [217]. Οι πορίνες σχηματίζουν κανάλια στην εξωτερική μεμβράνη των Gram αρνητικών βακτηρίων διασφαλίζοντας έτσι την διακυτταρική προσκόλληση και την πρόσδεση βακτηριοκτόνων ουσιών. Μέχρι σήμερα για το *A.baumannii* έχει αναφερθεί ένας μικρός αριθμός πορινών [218], παρόλα αυτά, τόσο ο μικρός τους αριθμός, όσο και το μικρό τους μέγεθος προσδίδουν μειωμένη διαπερατότητα στην κυτταρική του μεμβράνη σε σχέση με τα άλλα Gram αρνητικά βακτηρίδια και επομένως και αντιμικροβιακή αντοχή [219]. Οι OMPs πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης του *A.baumannii* είναι οι περισσότερο μελετημένες και αλλαγές τους έχουν σχετιστεί με την αντοχή τους στα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Κύριοι εκπρόσωποί τους αναφέρονται οι OmpA (γνωστή και ως Omp38), Omp33-36 και Omp22 [220].

Το γονιδίωμα των πολυανθεκτικών στελεχών *A. Baumannii* κωδικοποιεί για ένα μεγάλο εύρος αντλιών εκροής [221], οι οποίες αποτελούν έναν ακόμη μη ενζυμικό μηχανισμό, με περισσότερο μελετημένη την αντλία AdeABC, που ανήκει στην οικογένεια RND αντλιών και ευθύνεται για έκφραση αντοχής στις β-λακτάμες [222,223], αμινογλυκοσίδες , ερυθρομυκίνη, χλωροφαινικόλη, τετρακυκλίνες, φλουοροκινολόνες, τριμεθοπρίμη και βρωμιούχο αιθίδιο [224,225]. Οι αντλίες εκροής είναι διαμεμβρανικές και η κύρια λειτουργία τους είναι η ενεργής αποβολή τοξικών ουσιών και μεταβολικών προϊόντων από το κύτταρο. Τα τρία δομικά στοιχεία της AdeABC είναι η μεμβρανική πρωτεΐνη που βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη, μια πορίνη που βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη και μια πρωτεΐνη που ενώνει τις δύο προηγούμενες και εντοπίζεται στον περιπλασματικό χώρο. Έτσι ο μικροβιακός παράγοντας εκτοπίζεται από το βακτήριο χωρίς να συσσωρεύεται στον περιπλασματικό χώρο. Υπερέκφραση της αντλίας AdeABC προκαλεί αντοχή σε αμινογλυκοσίδες, β-λακτάμες, χλωραμφαινικόλη, ερυθρομυκίνη και τετρακυκλίνες [226, 224].

Ο τελευταίος μη ενζυματικός μηχανισμός αντοχής αποτελεί μειωμένη έκφραση πενικιλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών (PBPs). Αυτές είναι πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος των Gram (-) αρνητικών βακτηρίων οι οποίες συμμετέχουν στον πολυμερισμό και την διασύνδεση των πενταπεπτιδίων, μέσω των οποίων συνδέονται οι αλυσίδες της πεπτιδογλυκανης, η οποία είναι ένα λεπτό στρώμα, το οποίο καθορίζει τη μορφολογία του κυττάρου, του παρέχει ωσμωτική προστασία

και συμμετέχει στον κυτταρικό μεταβολισμό. Διακρίνονται σε αυτές που έχουν δράση γλυκοζυλτρασφεράσης (GT) για τον πολυμερισμό του λιπιδίου II και ταυτόχρονη δράση τρανσπεπτιδάσης (TP) για την σύνθεση των πενταπεπτιδίων (τάξης A PBPs) και σε εκείνες με μόνη δράση αυτή της τρανσπεπτιδάσης. Αναστολή οποιασδήποτε από τις δύο δραστηριότητες αυτών των ενζύμων προκαλεί εξασθένηση της πεπτιδογλυκάνης και εν συνεχεία κυτταρικό θάνατο [227]. Παρόλο που υπάρχουν ενδείξεις για την ενδεχόμενη συμμετοχή των PBPs στην εμφάνιση αντοχής των στελεχών *Acinetobacter* στην ιμιπενέμη, οι σχετικές αναφορές παραμένουν ελάχιστες και αμφιλεγόμενες.

1.9.2 ΑΜΙΝΟΓΛΥΚΟΣΙΔΕΣ

Στα πολυανθεκτικά στελέχη *A. baumannii* έχουν ταυτοποιηθεί γονίδια που κωδικοποιούν για ένζυμα όπως ακετυλτρασφεράσες, νουκλεοτιδύλτρασφεράσες και φωσφοτρασφεράσες που τροποποιούν τις αμινογλυκοσίδες προσδίδοντας αντοχή στα συγκεκριμένα αντιβιοτικά και εντοπίζονται σε ιντεγκρόνια τάξης I του *A. baumannii* [228, 143, 229, 230].

Επιπλέον, σε στελέχη από την Ιαπωνία, την Κορέα και τις Η.Π.Α (231) περιγράφηκε το γονίδιο *armA* (aminoglycoside resistance methylase) το οποίο φέρεται σε πλασμίδια εντός τρασποζονίου (Tn1548), το οποίο είναι υπεύθυνο για την μεθυλίωση του 16S rRNA συμβάλλοντας στην υψηλού βαθμού αντοχή των μικροβίων σε κλινικά σημαντικές αμινογλυκοσίδες όπως η γενταμικίνη, τομπραμυκίνη και η αμικασίνη. Συμμετέχει στον μηχανισμό και η αντλία εκροής AdeM [232].

1.9.3 ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ

Στις κινολόνες ως κύριοι μηχανισμοί αντοχής, περιγράφονται οι μεταλλάξεις στην DNA γυράση ή τοποϊσομεράση IV που αφορούν τα γονίδια *gyrA* και *parC* [233]. Επίσης συμμετέχουν και εδώ οι αντλίες εκροής AdeABC και AdeM. Οι μηχανισμοί αντοχής στις κινολόνες στο *A. baumannii* οφείλονται σε χρωμοσωμικά επαγόμενα ένζυμα.

1.9.4 ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ ΚΑΙ ΓΛΥΚΥΛΚΥΚΛΙΝΕΣ

Ως κύριος μηχανισμός αντοχής του *A. baumannii* για τις τετρακυκλίνες αναφέρονται ειδικές αντλίες εκροής. Οι αντλίες εκροής κωδικοποιούνται από τα γονίδια *tet(A)* και *tet(B)* για τα *A. baumannii* [234, 235, 236]. Πιο συγκεκριμένα το *tet(A)* είναι υπεύθυνο για την αντοχή του μικροβίου στην τετρακυκλίνη, όχι όμως στην μινοκυκλίνη, αντιβιοτικό πολύ πιο ισχυρό ενάντια στα στελέχη *A. baumannii*.

Εκτός από τις αντλίες εκροής των τετρακυκλινών, συμμετέχει και η αντλία εκροής AdeABC, η οποία αποτελεί και τον κύριο μηχανισμό αντοχής που έχει αναπτύξει τα *A. baumannii* στις γλυκυλκυκλίνες και ειδικά στην τιγκεκυκλίνη [237]. Έχει βρεθεί αυξημένη έκφραση του γονιδίου *adeB* υπεύθυνου για την αντλία AdeABC, με την μέθοδο της real-time RCR, σε στελέχη με αυξημένη MIC στην τιγκεκυκλίνη [238]. Η μεγάλη σημασία της συγκεκριμένης αντλίας εκροής στην

τιγεκυκλίνη επιβεβαιώθηκε με πειράματα απενεργοποίησης του ενζύμου AdeB το οποίο οδήγησε σε αξιοσημείωτη πτώση της MIC της [237]. Μία άλλη αντλία εκροής που θεωρείται ενδογενής στο *A. baumannii*, η αντλία AdeIJK, έχει επίσης αναφερθεί ότι επιδρά στην αποτελεσματικότητα της τιγεκυκλίνης, ενεργώντας συνεργιστικά με την αντλία AdeABC [239]. Παρά το γεγονός ότι σύμφωνα με παρατηρήσεις η τιγεκυκλίνη είναι, επίσης, υπόστρωμα της αντλίας εκροής AdeFGH [240], τελικά φαίνεται ότι μόνο οι αντλίες AdeABC και AdeIJK εμπλέκονται στην αντοχή σε κλινικά στελέχη *A. baumannii* [241]. Επίσης, πρόσφατα αναφέρθηκε ότι μια μετάλλαξη στο γονίδιο *trm*, το οποίο κωδικογραφεί μία μεθυλτρανσφεράση, συνδέθηκε με μειωμένη ευαισθησία στην τιγεκυκλίνη σε ένα στέλεχος *A. baumannii*. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να διευκρινιστεί ο πιθανός ρόλος αυτής της μεθυλτρανσφεράσης στη μειωμένη ευαισθησία της τιγεκυκλίνης [242].

1.9.5 ΠΟΛΥΜΥΕΙΝΕΣ

Καθώς τα πολυανθεκτικά στελέχη *A. baumannii* αυξάνονται παγκοσμίως, οι θεραπευτικές επιλογές για την αντιμετώπιση σοβαρών λοιμώξεων είναι περιορισμένες, με την κολιστίνη συχνά να αποτελεί τη μοναδική θεραπεία [243]. Στην κλινική πράξη, η κολιστίνη χρησιμοποιείται κυρίως για τη θεραπεία των λοιμώξεων που οφείλονται σε ανθεκτικά στις καρβαπενέμες *A. baumannii*, όπου καμία άλλη αξιόπιστη θεραπευτική επιλογή δεν είναι διαθέσιμη. Μετά την απομόνωση του πρώτου ανθεκτικού στην κολιστίνη στελεχούς *Acinetobacter* spp. το 1999 στην Τσεχία [244] παρατηρήθηκε αύξηση των δημοσιεύσεων που ανέφεραν αντοχή στην κολιστίνη σε διάφορες περιοχές σε όλο τον κόσμο [218], η οποία εμφανίζεται συχνότερα μεταξύ ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών. Σύμφωνα με τα δεδομένα της ετήσιας έκθεσης επιτήρησης της μικροβιακής αντοχής στην Ευρώπη για το 2014 (EARS-Net), μεταξύ 2238 στελεχών *Acinetobacter* spp. που συλλέχθηκαν από 20 Ευρωπαϊκές χώρες η συνολική αντοχή στις πολυμυξίνες ήταν 4%, εκ των οποίων ποσοστό 80,1% προήλθε από την Ελλάδα και την Ιταλία [245]. Οι μηχανισμοί που συμβάλλουν στην αντοχή της κολιστίνης δεν είναι ακόμα απολύτως γνωστοί. Έχουν προταθεί δυο ανεξάρτητοι μεταξύ τους μηχανισμοί.

Ο πιο συνηθισμένος μηχανισμός είναι οι μεταλλάξεις και η υπερέκφραση των πρωτεϊνών του ρυθμιστικού συστήματος PmrAB, οι οποίες οδηγούν σε τροποποιήσεις του λιποπολυσακχαρίτη μέσω της προσθήκης φωσφοαιθανολαμίνης στο λιπίδιο A [246]. Ο δεύτερος μηχανισμός είναι η πλήρης απώλεια της παραγωγής του λιποπολυσακχαρίτη, ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων (αντικατάσταση, έλλειψη ή αδρανοποίηση μέσω εισδοχής της αλληλουχίας IS*Aba11*) στα γονίδια *lpxA*, *lpxC* και *lpxD*, τα οποία σχετίζονται με τη βιοσύνθεση του λιπιδίου A [247, 248]. Η ανάπτυξη αντοχής στην κολιστίνη έχει συσχετιστεί με την πίεση επιλογής που ασκείται λόγω της παρατεταμένης χορήγησης του αντιβιοτικού [249, 250]. Σε μελέτη που διεξήχθη στο

Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας το 2015, απομονώθηκαν 86 κλινικά και ένα από το περιβάλλον στελέχη *A. baumannii* ανθεκτικά στις καρβαπενέμες με ταυτόχρονη αντοχή στην κολιστίνη. Η μοριακή τους τυποποίηση έδειξε ότι ανήκουν στον ST101 τύπο του 3LST συστήματος, συμβαδίζοντας με τον διεθνή κλώνο CC2 και μετέφερε το γονίδιο *bla*_{OXA-23}, το οποίο είναι υπεύθυνο για την υψηλή αντοχή στις καρβαπενέμες (με MIC>256mg/L). Προκείμενου να ανιχνευθούν οι μηχανισμοί που οδηγούν στην υψηλού βαθμού αντοχή στην κολιστίνη, όλα τα απομονωθέντα στελέχη ανθεκτικά στην κολιστίνη ελέγχθηκαν για μεταλλάξεις στα *lpxACD* και *pmrCAB* γονιδίων. Τα ευρήματα υπογράμμισαν την συμμετοχή των μεταλλαγών στα PmrA και PmrC στην ανάπτυξη της αντοχής στην κολιστίνη σε στελέχη *A. baumannii* που ανήκουν στον τύπο ST101. Αλλάγη που δεν είχε αναφερθεί ποτέ ξανά κατά το παρελθόν.

Άλλος ένας μηχανισμός αντοχής στην κολιστίνη που αξίζει να αναφερθεί είναι το γονίδιο *mcr*. Η πρώτη αναφορά για την παρουσία του έγινε το 2016, όπου και ανιχνεύθηκε το πλασμιδιακό *mcr-1* γονίδιο σε εντεροβακτηριακά στελέχη στην Κίνα [251]. Έκτοτε πολλές αναφορές έχουν γίνει για την παρουσία του *mcr* σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές και σε διάφορους ξενιστές. Σε μελέτη, που έγινε στην Τσεχία ανέφεραν δυο πλασμίδια που έφεραν το *mcr-4.3* γονίδιο σε στελέχη *A.baumannii*, τα οποία απομονώθηκαν το ένα από κρέας που είχε εισαχθεί στη χώρα από την Βραζιλία και το δεύτερο ανήκε σε κλινικό δείγμα τραχειακής αναρρόφησης [252].

1.10 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ *A. baumannii*

Οι λοιμώξεις από *A. baumannii* αποτελούν σημαντικό πρόβλημα σε πολλές περιοχές της Ευρώπης [253]. Αναφέρονται νοσοκομειακές επιδημίες ήδη από την αρχή της δεκαετίας του 1980 στην Αγγλία, Γαλλία, Γερμανία, Ιταλία, Ισπανία και Σκανδιναβία [227, 9, 254] και μάλιστα η εξάπλωση τους παρατηρήθηκε σε εθνική κλίμακα. Έχει γίνει καταγραφή της εξάπλωσης των λεγόμενων «Ευρωπαϊκών κλώνων I, II και III, τόσο σε νοσοκομεία της Βόρειας Ευρώπης (Βέλγιο, Δανία, Γαλλία, Ισπανία, Σκανδιναβία και Ηνωμένο Βασίλειο), όσο και στην Ανατολική Ευρώπη (Ιταλία, Ισπανία, Ελλάδα και Τουρκία) [255, 256, 257], αλλά και στην Δυτική Ευρώπη [188].

Πολύ σημαντικό πρόβλημα με παγκόσμιες διαστάσεις αποτελούν τα στελέχη *A. baumannii* με αντοχή στις καρβαπενέμες. Σε Ευρωπαϊκό επίπεδο, η Ελλάδα, η Ισπανία και η Ιταλία παρουσιάζουν τα υψηλότερα ποσοστά απομόνωσης στελεχών με αντοχή στις καρβαπενέμες, ενώ χαμηλά ποσοστά κατέχουν η Γερμανία και η Ολλανδία. Στην Σκανδιναβία τα ποσοστά αντοχής παραμένουν χαμηλά, σε αντίθεση με την Ανατολική Ευρώπη που παρουσιάζει αύξηση των ανθεκτικών στελεχών. Τα υψηλότερα ποσοστά απομόνωσης ανθεκτικών στις καρβαπενέμες *A. baumannii* εντοπίζονται σε χώρες της Λατινικής Αμερικής, ενώ η περιορισμένη χρήση μοριακών τεχνικών καθώς και η έλλειψη συγκροτημένου προγράμματος επιδημιολογικής επιτήρησης

παρουσιάζει ελλιπή δεδομένα από την Αφρικανική Ήπειρο. Νοσοκομεία της Ασίας και της Μέσης Ανατολής καταγράφουν μεγάλο αριθμό πολυανθεκτικών στελεχών *A.baumannii* με ποικιλία καρβαπενεμασών να ενδημεί στις περιοχές αυτές [198, 258,259]. Στις Ηνωμένες Πολιτείες ακόμα και από το 1990 καταγράφονται πολυανθεκτικά στελέχη *A.baumannii*. Σημαντική συμβολή στην αύξηση των λοιμώξεων από *A.baumannii* αποτέλεσε η επιστροφή του στρατιωτικού προσωπικού από το Ιράκ και το Αφγανιστάν [260, 198, 261 , 262 , 263].

Αναφορικά με την εξέλιξη της αντοχής των *A. baumannii* στις καρβαπενέμες στην Ελλάδα, το 2000 άρχισαν να εμφανίζονται στελέχη με χαμηλού επιπέδου αντοχή στις καρβαπενέμες [264]. Από το 2002 και μεταγενέστερα, τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη επικράτησαν σταδιακά στα Ελληνικά νοσοκομεία [265, 104]. Απο τότε τα στελέχη *A.baumannii* που απομονώθηκαν από αιμοκαλλιέργειες από όλες τις Ελληνικές ΜΕΘ, το ποσοστό των μη ευαίσθητων στελεχών στην μιμπενέμη αυξήθηκε σταδιακά από 90,4 το 2007 σε >99% το 2014 και διατηρείται σε σταθερά επίπεδα έως το 2016. Αντίστοιχη τάση παρατηρήθηκε και για τη μεροπενέμη, για την οποία το ποσοστό των μη ευαίσθητων στελεχών το 2016 είναι επίσης >99%. Η παράγωγη καρβαπενεμασών αποτελεί τον κυρίαρχο μηχανισμό αντοχής. Μέχρι το 2009 κυριαρχούσαν στη χώρα μας τα CRAB (carbapenem-resistant *A.baumannii*), που παρήγαγαν τις καρβαπενεμάσες OXA-51-like και OXA-58-like [104, 209 , 266 , 267] , οι οποίες ανήκαν στον ST1 τύπο. Απο το 2010 αυτά τα επιδημικά στελέχη αντικαταστάθηκαν από στελέχη που παράγουν την καρβαπενεμάση OXA-23. Ο επιπολασμός των CRAB στελεχών που παράγουν OXA-23 καρβαπενεμάση κερδίζουν συνεχώς έδαφος εξαιτίας της υψηλότερης υδρολυτικής τους ικανότητας έναντι αυτών που παράγουν OXA-58. Οι υψηλότερες MICs στις καρβαπενέμες πιθανώς έχουν δώσει συγκριτικό πλεονέκτημα στην επιβίωση και στην επικράτηση τους στο νοσοκομειακό περιβάλλον. Αντίθετα, οι αναφορές για την παραγωγή του ενζύμου VIM από ανθεκτικά σε καρβαπενέμες *A.baumannii* ήταν λίγες, στις οποίες ανιχνεύθηκαν το *bla*_{VIM-1} και *bla*_{VIM-2}. Μέχρι το 2010 τα στελέχη CRAB παρουσίαζαν αντοχή στην τιγκεκυκλίνη, είτε στην κολιστίνη [268, 269 ,270 , 271]. Παρόλ'αυτά στο διάστημα από το 2011-2013 τα στελέχη που μετέφεραν το *bla*_{OXA-23} γονίδιο, επιπλέον, εμφάνιζαν αντοχή στη τιγκεκυκλίνη και ανήκαν στον διεθνή κλώνο CC2 [272]. Η αντοχή στην κολιστίνη εμφανίστηκε εξαιτίας αλλαγών ή μεταλλάξεων στα γονίδια *pmrB*, *pmrA* και *pmrC* [272, 273]. Η ταυτόχρονη αντοχή των OXA-23-παραγωγών στελεχών στην τιγκεκυκλίνη και την κολιστίνη, υπέδειξε ότι τα CRAB στελέχη παρουσιάζουν ολόένα αυξανόμενη αντοχή έναντι των χρησιμοποιούμενων αντιμικροβιακών παραγόντων. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι και η αλλαγή απο τον τύπο ST1 στον ST2, συμβαδίζει με τη αλλαγή από τον CC1 στον CC2 [274]. Η υπεροχή του CC2 κλώνου στη Ελλάδα βρίσκεται σε συμφωνία με τα παγκόσμια επιδημιολογικά δεδομένα.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΟ

Στην μελέτη μας χρησιμοποιήθηκαν 120 κλινικά στελέχη *Acinetobacter baumannii*, τα οποία απομονώθηκαν από ισάριθμους ασθενείς, οι οποίοι νοσηλεύτηκαν σε διάφορες κλινικές του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, το οποίο εξυπηρετεί την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας, κατά το έτος 2018. Πιο συγκεκριμένα, στην πειραματική μελέτη συμπεριλήφθησαν τα πρώτα δέκα απομονωθέντα στελέχη *A.baumannii* ανά μήνα, του έτους 2018. Ακολουθούν οι πίνακες με τη διασπορά των κλινικών στελεχών στις διάφορες κλινικές, καθώς και με τη διασπορά των απομονωθέντων στελεχών ανα κλινικό δείγμα.

ΚΛΙΝΙΚΗ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ
ΜΕΘ	51(42,5%)
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ	46 (38,33 %)
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΕΣ	10(8,33%)
ΤΕΠ	4(3,33%)
ΛΟΙΠΕΣ	9(7,5%)
ΣΥΝΟΛΟ	120

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Διασπορά των απομονωθέντων στελεχών *Acinetobacter baumannii* ανα κλινική του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

ΚΛΙΝΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ
ΑΙΜΑ	34(28,33%)
ΒΡΟΓΧΙΚΕΣ ΕΚΚΡΙΣΕΙΣ	29(24,16%)
ΟΥΡΑ	14(11,66%)
ΠΤΥΕΛΑ	12(9,99%)
ΤΡΑΥΜΑ	6(4,99%)
ΕΝΥ	5(4,16%)
ΚΑΘΕΤΗΡΑΣ	3(2,49%)
ΚΦ.Γ.	3(2,49%)
ΔΙΑΦΟΡΑ	(2,66%)

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Διασπορά των απομονωθέντων στελεχών *Acinetobacter baumannii* ανα είδος κλινικού δείγματος.

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΣΤΕΛΕΧΗ *ACINETOBACTER BAUMANNII*

Τα κλινικά δείγματα καλλιεργήθηκαν σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα και συγκεκριμένα σε MacConkey άγαρ και Αιματούχο άγαρ. Κατόπιν του εμβολιασμού, οι καλλιέργειες επώαστηκαν σε επωαστικό κλίβανο για 18-24h και σε θερμοκρασία 37° C σε αερόβιες συνθήκες. Όλα τα στελέχη συντηρήθηκαν σε θρεπτικό ζωμό (tryptic soy broth) με περιεκτικότητα γλυκερόλης 20% και διατηρήθηκαν στους -80° C.

2.2.2 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ

Όλα τα στελέχη της μελέτης ελέγχθησαν βάσει του αυτοματοποιημένου συστήματος VITEK 2 (bioMerieux, Inc). Το σύστημα περιλαμβάνει μία εκτεταμένη βάση δεδομένων αναγνώρισης, με διαθέσιμη την πιο αυτοματοποιημένη πλατφόρμα για γρήγορα αποτελέσματα, καθώς και βελτίωση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων. Ο έλεγχος ευαισθησίας των υπό μελέτη στελεχών στις καρβαπενέμες πραγματοποιήθηκε επίσης με το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK 2 (bioMerieux, Inc). Ενώ ο έλεγχος ευαισθησίας των στελεχών στην κολιστίνη πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των μικροαραιώσεων σε εμπορικό ζωμό ComASP™ Colistin (Liofilchem®).

2.3 ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ *ACINETOBACTER BAUMANNII*

Για την επιβεβαίωση της ταυτοποίησης του είδους ως *A.baumannii* έγινε ανίχνευση της χρωμοσωμικά επαγωγίμης οξακιλλινάσης bla_{OX451-like} με PCR [275]. Για την διεξαγωγή της διαδικασίας της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR, αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση η απομόνωση του DNA, η οποία μας προσφέρει αμιγές γενετικό υλικό χωρίς την πρόσμιξη ουσιών, οι οποίες αναστέλλουν τη δράση της DNA πολυμεράσης και καταλήγουν σε μερική ή μη ενίσχυση του προϊόντος που μας ενδιαφέρει για την μελέτη μας.

2.3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΟΥ DNA (DNA EXTRACTION)

Πρόκειται για τη διαδικασία απομόνωσης του γενωμικού υλικού ενός βιολογικού δείγματος, της οποίας τα βασικά βήματα είναι τα εξής ακόλουθα:

1. Η λύση των κυττάρων,
2. Η απομάκρυνση πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων, και
3. Η απομόνωση του DNA.

ΥΛΙΚΑ

- 1) Αιματούχο άγαρ ή MH άγαρ
- 2) Λυτικό ρυθμιστικό διάλυμα (Lysis Buffer)
- 3) Πρωτεΐνάση K

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε στην μελέτη μας ήταν η εξής ακόλουθη:

1. Καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους σε τρυβλία ΜΗ ή Blood (OXI MacConkey), και επώαση στους 37° C για 16-18 h.
2. Με βαμβακοφόρο στυλεό λαμβάνω ποσότητα κυττάρων και επαναιωρώ σε 1ml Φ.Ο. (0,9% NaCl₂)
3. Κάνουμε vortex τα σωληνάρια, και φυγοκεντρούμε στις 6,000rpm για 10min
4. Αφαιρούμε (με πιπέτα) το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 100μl Lysis Buffer. Προσθέτουμε 2μl πρωτεϊνάσης K (20mg/ml).
5. Κάνουμε vortex τα σωληνάρια, και τα τοποθετούμε σε υδατόλουτρο, για 1h στους 56° C.
6. Στη συνέχεια κάνουμε vortex τα σωληνάρια, και τα τοποθετούμε για 10min στους 100° C.
7. Τέλος φυγόκεντρούμε στις 12,000 rpm για 5 min, και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέα σωληνάρια.

2.3.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

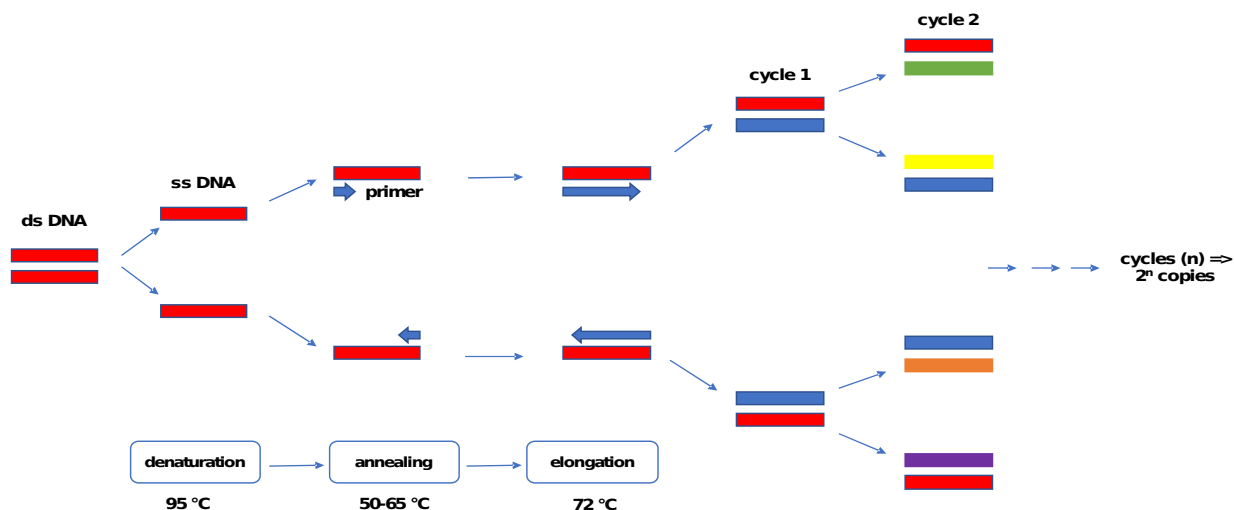
Η PCR είναι μια *in vitro* τεχνική που ανακαλύφθηκε από τον Kary Mullis, το 1983, ο οποίος τιμήθηκε με Νόμπελ Χημείας δέκα χρόνια μετά, το 1993, με την οποία ενισχύεται ο αριθμός των αντιγράφων μιας συγκεκριμένης περιοχής DNA και μας δίνει έναν τεράστιο αριθμό αντιγράφων ενός γονιδίου, γεγονός που καθιστά δυνατή την ανάλυση DNA που υπάρχει σε απειροελάχιστες ποσότητες. Το 1989 κρίθηκε ως «*η επιστημονική ανακάλυψη της χρονιάς*», ενώ μέσα σε λίγα χρόνια και μετά από σημαντικές βελτιώσεις, κυρίως από τον Saiki RK, κατέστη η πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την ενίσχυση-πολλαπλασιασμό των νουκλεϊκών οξέων, κυρίως του DNA [276]. Με την τεχνική της PCR επιτυγχάνεται ενίσχυση ειδικών τμημάτων του DNA ενός δείγματος, μέσα στο οποίο βρίσκονται διάφορα μόρια DNA εκτός του DNA που μας ενδιαφέρει (DNA στόχος). Η μέθοδος εξελίσσεται σε συγκεκριμένους κύκλους αντιδράσεων. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει τρία στάδια:

1. Στάδιο αποδιάταξης (denaturation) του DNA, κατά το οποίο θερμαίνεται το μίγμα μέχρι περίπου τους 95°C, για την αποδιάταξη τόσο του DNA στόχου, όσο και των εκκινητών, επειδή πρέπει να βρίσκονται σε μονόκλωνη μορφή.

2. Στάδιο αναδιάταξης ή υβριδισμού των εκκινητών (primer annealing) κατά τη διάρκεια του οποίου μειώνεται η θερμοκρασία σε ένα εύρος από 40° C έως 70° C, για να πραγματοποιηθεί η πρόσδεση των εκκινητών στο μονόκλωνο DNA εκμαγείο, στο 3' άκρο κάθε αλυσίδας.

3. Στάδιο επιμήκυνσης (extension), κατά το οποίο αυξάνεται η θερμοκρασία στους 72° C. Αυτό το στάδιο πραγματοποιείται από μια DNA πολυμεράση με την συνεχή επιμήκυνση των εκκινητών με προσθήκη των ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs) συμπληρωματικών με

την αλληλουχία στόχο. Με την ολοκλήρωση του πρώτου κύκλου το DNA-στόχος διπλασιάζεται και ο πολλαπλασιασμός εξελίσσεται εκθετικά κατά την διάρκεια των επαναλαμβανόμενων θερμικών κύκλων, ο αριθμός των οποίων σε μια τυπική αντίδραση PCR κυμαίνεται μεταξύ των 30 με 40.



ΕΙΚΟΝΑ 15. Απεικόνιση της θεμελιώδους αρχής της PCR.

Στην μελέτη μας τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της PCR, ήταν τα εξής ακόλουθα:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 1) DNA βακτηρίου,
- 2) WFI (Water for injection-στείρο απυρετογόνο νερό)
- 3) Ταq DNA πολυμεράση 5U/μl (πρόκειται για το ένζυμο που θα επιτελέσει τα επαναλαμβανόμενα στάδια του πολλαπλασιασμού)
- 4) 10x Taq Buffer με KCL (ρυθμιστικό δ/μα ενίσχυσης)
- 5) MgCl₂:50mM
- 6) Primer 1:100pmol/μl
- 7) Primer 2:100pmol/μl (ειδικά ολιγονουκλεοτίδια που συνδέονται με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες πριν και μετά τον DNA στόχο και λειτουργούν ως σημείο εκκίνησης της σύνθεσης των αναγραφόμενων κλώνων του DNA.)
- 8) Μείγμα dNTPs:100 mM , απαραίτητα για τη σύνθεση νέων κλώνων από την DNA πολυμεράση
- 9) DNA Engine Peltier Thermal Cycler
- 10) Συσκευή καθέτου νηματικής ροής κλάσης II
- 11) Αυτόματος αναδευτήρας vortex
- 12) Σωληνάρια erpenrdorf για PCR

13)Αυτόματες πιπέτες (1000μl, 200μl, 20μl)

14)Αποστειρωμένα ρύγχη.

ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Σε eppendorf αναμιγνύονται πολλαπλάσιες ποσότητες του αριθμού των δειγμάτων (συμπεριλαμβανομένων του θετικού και του αρνητικού μάρτυρα της αντίδρασης), ώστε να παρασκευάσουμε το μείγμα, master mix, της αντίδρασης. Στη συνέχεια μοιράζουμε σε κάθε eppendorf 23,5 μl του master mix και 1,5 μl από κάθε μικροβιακό DNA. Τέλος τοποθετούμε τα μικροσωληνάρια (eppendorf) στον θερμικό κυκλοποιητή ορίζοντας τις συνθήκες της αντίδρασης. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση του μείγματος, ώστε ο τελικός του όγκος για τη διεξαγωγή της αντίδρασης να είναι 25μl, αναφέρονται στον πίνακα που ακολουθεί:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ(μl)
10xTaq Buffer με KCl	2,5
MgCl(50mM)	0,75
Μείγμα dNTPs(20mM)	0.5
Primer 1(25pmol/μl)	0.25
Primer 2(25pmol/μl)	0.25
Taq DNA πολυμεράση(5U/μl)	0.2
dH ₂ O	18.05
DNA βακτηρίου	1.5
Τελικός όγκος	25

ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Απαιτούμενα αντιδραστήρια και οι συγκεντρώσεις τους για την διεξαγωγή της PCR .

2.4 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ, PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Η PCR στη μελέτη μας χρησιμοποιήθηκε και για την ανίχνευση των γονιδίων που σχετίζονται με ανοχή του *A.baumannii* στις καρβαπενέμες. Τα γονίδια που ελέγχθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν τα ακόλουθα: *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-24}*, *bla_{OXA-58}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{OXA-23}* και *bla_{OXA-51-like}*. Ακολουθούν οι πίνακες με τις αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και οι συνθήκες υπο τις οποίες έλαβε χώρα η PCR, για κάθε γονίδιο χωριστά.

ΠΙΝΑΚΑΣ
Εκκινητές
την
ανίχνευση

ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ 5' → 3'
<i>bla_{KPC}F</i>	TCGCTAAACTCGAACAGG
<i>bla_{KPC}R</i>	TTAGTGCCCGTTGACGCCCAATCC
<i>bla_{NDM}F</i>	TGGCAGGACACTTCCTATC
<i>bla_{NDM}R</i>	AGATTGCCGAGCGAGCGACTTG
<i>bla_{OXA-24}F</i>	GTACTAATCAAAGTTGTGAA
<i>bla_{OXA-24}R</i>	TTCCCCTAACATGAATTTGT
<i>bla_{OXA-58}F</i>	TTATCAAAAATCCAATCGGC
<i>bla_{OXA-58}R</i>	TAACCTCAAACCTTCTAATTC
<i>bla_{OXA-48}F</i>	TTGGTGGCATCGATTATCGG
<i>bla_{OXA-48}R</i>	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC
<i>bla_{OXA-23}F</i>	AAGCATGATGAGCGCAAAG
<i>bla_{OXA-23}R</i>	AAAAGGCCCATTTATCTCAA
<i>bla_{VIM}F</i>	AGT GGT GAG TAT CCG ACA
<i>bla_{VIM}R</i>	ATG AAA GTG CGT GGA GAC
<i>bla_{OXA-51-like}F</i>	TAATGCTTTGATCGGCCTTG
<i>bla_{OXA-51-like}R</i>	TGGATTGCACTTCATCTTGG

5.
για

καρβαπενεμασών.

Συνθήκες Γονίδια	Αρχική αποδιάταξη	Αποδιάταξη	Αναδιάταξη	Επιμήκυνση	Κύκλοι	Τελική επιμήκυνση
<i>bla_{KPC}</i>	95° C ► 5m	95° C ► 30s	55°C ► 30s	72° C ► 60s	35	72° C ► 10m
<i>bla_{NDM}</i>	95° C ► 5m	95° C ► 30s	50°C ► 30s	72° C ► 60s	35	72° C ► 10m
<i>bla_{OXA-24}</i>	95° C ► 5m	95° C ► 30s	52°C ► 30s	72° C ► 60s	35	72° C ► 10m
<i>bla_{OXA-58}</i>	95° C ► 5m	95° C ► 30s	52°C ► 30s	72° C ► 60s	35	72° C ► 10m
<i>bla_{OXA-48}</i>	95° C ► 5m	95° C ► 30s	58°C ► 30s	72° C ► 60s	35	72° C ► 10m
<i>bla_{OXA-23}</i>	95° C ► 5m	95° C ► 30s	52°C ► 30s	72° C ► 60s	35	72° C ► 10m
<i>bla_{VIM}</i>	95° C ► 5m	95° C ► 30s	52°C ► 40s	72° C ► 50s	35	72° C ► 10m
<i>bla_{OXA-51-like}</i>	95° C ► 5m	95° C ► 30s	58°C ► 30s	72° C ► 30s	35	72° C ► 10m

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΘΗΚΩΝ 6. Συνθήκες διεξαγωγής PCR.

2.4.1. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΕΙΣΔΟΧΗΣ

Η μελέτη των αλληλουχιών εισδοχής που σχετίζονται με τις οξακιλλινάσες στο *A.baumannii*, μελετήθηκαν με PCR. Πιο συγκεκριμένα η παρουσία του IS*AbaI* στην ανωφέρεια των οξακιλλινασών ελέγχθηκε με τη χρήση του forward εκκινητή (5'-CAC GAA TGC AGA AGT TG-3') [206,211] για το στοιχείο εισδοχής IS*AbaI*-F, με τον reverse εκκινητή που κωδικογραφεί για

κάθε μια από τις καρβαπενεμάσες. Αναλυτικότερα, ο εκκινητής OXA-51-like R(5'-CTA TAA AAT ACC TAA TTG TTC-3') και ο OXA-23R_{new} (5'-ATTCA TTACG TATA GATGCC -3'). Ελέγχθηκε επίσης η παρουσία του IS*AbaI* στην κατωφέρεια του *bla*_{OXA-23} με τον forward εκκινητή OXA-23F_{new} (TTTA CTTGCTA TGTGGTTG) που κωδικοποιεί για την OXA-23 καρβαπενεμάση. Οι συνθήκες των PCRs, που έλαβαν χώρα με τους συνδυασμούς των reverse εκκινητών των γονιδίων *bla*_{OXA-23} και *bla*_{OXA-51-like} με τον IS*AbaI*-F, παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Συνθήκες Εκκινητές	Αρχική αποδιάταξη	Αποδιάταξη	Αναδιάταξη	Επιμήκυνση	Αριθμός κύκλων	Τελική επιμήκυνση
IS <i>AbaI</i> -F	95° C ► 2m	95° C ► 20s	58°C ► 30s	72° C ► 30s	30	72° C ► 10m
OXA-23 F	95° C ► 2m	95° C ► 20s	56°C ► 30s	72° C ► 30s	30	72° C ► 10m
IS <i>AbaI</i> -F	95° C ► 2m	95° C ► 20s	58°C ► 30s	72° C ► 30s	30	72° C ► 10m
OXA-51- like R	95° C ► 2m	95° C ► 20s	58°C ► 30s	72° C ► 30s	30	72° C ► 10m
IS <i>AbaI</i> -F	95° C ► 2m	95° C ► 20s	58°C ► 30s	72° C ► 30s	30	72° C ► 10m
OXA-23 R	95° C ► 2m	95° C ► 20s	56°C ► 30s	72° C ► 30s	30	72° C ► 10m

ΠΙΝΑΚΑΣ 7. Συνθήκες των PCRs με τους συνδυασμούς των εκκινητών.

2.4.2 ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΗΝ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ

Τα στελέχη ελέγχθηκαν για την ύπαρξη μεταλλάξεων στα *lpxA*, *lpxC*, *lpxD* και *pmrCAB* γονίδια, τα οποία έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη αντοχής στη κολιστίνη. Μετά την απομόνωση του DNA, τα γονίδια ενισχύθηκαν μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Στη συνέχεια, ακολούθησε αλληλούχιση των PCR προϊόντων. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των *lpxA*, *lpxC*, *lpxD* και *pmrCAB* γονιδίων από τα ανθεκτικά στελέχη συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες αλληλουχίες που αποκτήθηκαν από τρία κολιστίνη-εύαιστα στελέχη, τα οποία ανήκουν στον ίδιο κλώνο με τα ανθεκτικά στελέχη, και με την αλληλουχία του ATCC17978 στελέχους αναφοράς (GenBank Accession Number CP000521). Άλλο ένα γονίδιο που έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη αντοχής στην κολιστίνη, είναι το *mcr*, για το οποίο ελέγχθηκαν τα υπό μελέτη στελέχη. Οι συνθήκες που έλαβαν χώρα οι εκάστοτε αντιδράσεις καθώς και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή τους φαίνονται στους παρακάτω πίνακες:

ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ
<i>lpxAF</i>	TGAAGCATTAGCTCAAGTTT	[277]
<i>lpxAR</i>	GTCAGCGCAAATCAATACAAGA	[277]
<i>lpxCF</i>	TGAAGATGACGTTCCGCAA	[277]
<i>lpxCR</i>	TGGTGAAAATCAGGCAATGA	[277]
<i>lpxDF</i>	CAAAGTATGAATACAACCTTTTGAG	[277]
<i>lpxDR</i>	GTC AATGGCACATCTGCTAAT	[277]

ΠΙΝΑΚΑΣ 8. Παρουσίαση των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν στον έλεγχο των μεταλλάξεων των γονιδίων *lpxA*, *lpxC*, *lpxD*

Συνθήκες Γονίδια	Αρχική αποδιάταξη	Αποδιάταξη	Αναδιάταξη	Επιμήκυνση	Κύκλοι	Τελική επιμήκυνση
<i>lpxA</i>	95° C ► 5m	95° C ► 30s	54°C ► 30s	72° C ► 120s	35	72° C ► 10m
<i>lpxD</i>	95° C ► 5m	95° C ► 30s	60°C ► 30s	72° C ► 120s	35	72° C ► 10m
<i>lpxC</i>	95° C ► 5m	95° C ► 30s	56°C ► 30s	72° C ► 120s	35	72° C ► 10m

ΠΙΝΑΚΑΣ 9. Παρουσίαση των απαιτούμενων συνθηκών για την διαξαγωγή κάθε αντίδρασης PCR, για κάθε γονίδιο.

ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ
<i>mcrF</i>	ACG GCG TAT TCT GTG CCG TGT AT	[278]
<i>mcrR</i>	GCT GTT CTTTTG GTG CAA AGG CAT TT	[278]
<i>pmrAF</i>	ATG ACA AAA ATC TTG ATG ATT GAA GAT	[279] , [246]
<i>pmrAR</i>	TTA TGA TTG CCC CAA ACG GTA G	[279] , [246]
<i>pmrBF</i>	GTG CAT TAT TCA TTA AAA AAA C	[279] , [246]
<i>pmrBR</i>	TCA CGC TCT TGT TCA TGT TA	[279] , [246]
<i>pmrCF</i>	ATG TTT AAT CTC ATT ATA GCC A	[279] , [246]
<i>pmrCR</i>	TTA GTT TAC ATG GGC ACA A	[279] , [246]

ΠΙΝΑΚΑΣ 10. Αλληλουχίες των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν.

Συνθήκες Γονίδια	Αρχική αποδιάταξη	Αποδιάταξη	Αναδιάταξη	Επιμήκυνση	Αριθμός κύκλων	Τελική επιμήκυνση
<i>mcr</i>	95° C ► 5m	95° C ► 30s	60°C ► 30s	72° C ► 120s	35	72° C ► 10m

<i>pmrA</i>	95° C ► 5m	95° C ► 30s	60°C ► 30s	72° C ► 120s	35	72° C ► 10m
<i>pmrB</i>	95° C ► 5m	95° C ► 30s	54°C ► 30s	72° C ► 120s	35	72° C ► 10m
<i>pmrC</i>	95° C ► 5m	95° C ► 30s	52°C ► 30s	72° C ► 120s	35	72° C ► 10m

ΠΙΝΑΚΑΣ 11. Συνθήκες διεξαγωγής PCR

2.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Τα PCR προϊόντα πάντα αναλύονται σε πήκτωμα αγαρόζης με ηλεκτοφόρηση. Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική για την ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών. Βασίζεται στον διαχωρισμό των φορτισμένων μορίων (π.χ. DNA) ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Τα φορτισμένα μόρια κινούνται μέσα στο υπόστρωμα και διαχωρίζονται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, τη στερεοδομή τους, την ένταση του ρεύματος και τη συγκέντρωση του πηκτώματος.

Η αγαρόζη, το υλικό για το πήκτωμα που χρησιμοποιούμε στην ηλεκτροφόρηση, χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στην βιολογία από τον Robert Koch, το 1882, ως καλλιεργητικό μέσο για τα βακτήρια της φυματίωσης. Είναι ένας πολυσακχαρίτης που προέρχεται από φύκη (red algae) και χρησιμοποιείται συχνά στη ζαχαροπλαστική, σε καλλιεργητικά μέσα και στην παρασκευή πηκτωμάτων ηλεκτροφόρησης. Είναι πολυσακχαρίτης υψηλού μοριακού βάρους, που αποτελείται από D-γαλακτόζη και από ομάδες της 3-6-ανυδρο-L-γαλακτόζης. Πολυμερίζεται στους 100° C δημιουργώντας ένα κολλώδες διάλυμα το οποίο πήζει στους 45 ° C σχηματίζοντας πόρους στο εσωτερικό του. Ανάλογα με την συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα σχηματίζονται πόροι που επιτρέπουν το διαχωρισμό μορίων μεγέθους από 50 ζεύγη βάσεων (bp) μέχρι και 60 κιλοβάσεις (kp). Η θέση των μορίων του DNA πάνω στο πήκτωμα προσδιορίζεται με υπεριώδες φώς και με τη χρήση μικρής ποσότητας βρωμιούχου αιθιδίου, μιας φθορίζουσας χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των αζωτούχων βάσεων του DNA. Στην μελέτη μας χρησιμοποιήσαμε πήκτωμα αγαρόζης 2% για την ηλεκτροφόρηση όλων των PCR προϊόντων. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω:

ΥΛΙΚΑ

WFI (Water For Injection-στείρο απυρετογόνο H₂O για τις αραιώσεις)

10 x TBE Buffer (Tris-Boric Acid-EDTA)

Agarose Sea Kem LE

Ethidium bromide (EtBr) solution 1mg/ml

6 x DNA Loading Dye Solution-κυανό της βρωμοφαινόλης

Gene Ruler 100bp DNA Ladder

Λάμπα UV

Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Τροφοδοτικό τάσης

Φούρνος μικροκυμάτων

Κωνική φιάλη 250ml

Εκμαγείο και «χτενάκια», στερεοποιητής πηκτώματος

Αυτόματες πιπέτες, αποστειρωμένα ρύγχη και parafilm

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αρχικά πραγματοποιείται αραίωση του 10x TBE buffer σε συγκέντρωση 1x, με ανάμειξη 100ml 10x TBE και 900ml H₂O (WFI). Σε κωνική φιάλη των 250ml αναμειγνύονται 100ml 1x TBE Buffer και 2g αγαρόζης, ώστε να προκύψει διάλυμα αγαρόζης 2% w/v. Το διάλυμα αναμειγνύεται ζωηρά με κυκλική ανακίνηση της κωνικής φιάλης και στη συνέχεια θερμαίνεται στο φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και να γίνει το διάλυμα διαυγές. Στη συνέχεια, αφήνουμε να πέσει η θερμοκρασία έως τους 55°C. Ακολούθως προσθέτουμε 2μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), ώστε να έχει τελική συγκέντρωση 0,5μg/ml στο διάλυμα. Το διάλυμα αγαρόζης τοποθετείται στο εκμαγείο και είναι έτοιμο όταν σταθεροποιηθεί για την ηλεκτροφόρηση του DNA, αφού βυθιστεί εντός της ηλεκτροφορητικής συσκευής σε διάλυμα 1x TBE Buffer. Στη συνέχεια, από κάθε δείγμα αναμειγνύουμε 5μl με 1μl από τη χρωστική Loading Dye Solution (6x) (κυανό της βρωμοφαινόλης), όπως προαναφέραμε και ακολουθεί η προσθήκη των μείγματος, DNA-χρωστική στα βυθίσματα του πηκτώματος. Για τον προσδιορισμό του μήκους των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήσαμε, σε μια θέση στο πήκτωμα τον μάρτυρα μοριακών βαρών 100bp DNA Ladder. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή τάση 120Volts και ένταση 400mA για 30 λεπτά. Τέλος το προϊόν της ηλεκτροφόρησης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός και φωτογραφήθηκε με ειδική κάμερα που είναι ενσωματωμένη στη συσκευή.

2.6 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ PCR

Ο καθαρισμός των PCR προϊόντων, είναι μια απαραίτητη διαδικασία προκειμένου να μπορέσουν τα προϊόντα να αλληλουχηθούν με επιτυχία. Με την διαδικασία αυτή από το DNA απομακρύνονται οι εκκινητές, τα dNTPs, τα ένζυμα και τα άλατα, απομακρύνονται δηλαδή, όλα τα συστατικά και οι προσμίξεις της αντίδρασης. Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε σε όλα τα υπό μελέτη δείγματα DNA (PCR amplicons) των στελεχών *A. baumannii* σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Pure Link PCR purification kit (Invitrogen) που χρησιμοποιήσαμε:

ΥΛΙΚΑ

1)Πιπέτες

2)Αποστειρωμένα ρύγχη

- 3)Στήλες (PureLink Spin Column)
- 4)Σωληνάρια συλλογής (Collection tubes)
- 5)Σωληνάρια έκλουσης (1.7ml) (Elution tube)

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 1)Binding buffer (B₂/B₃)
- 2)Wash buffer (W₁)
- 4)Ισοπροπανόλη 100%
- 5)Αιθανόλη96%-100%
- 6)Φυγόκεντρος Mini Spin (για σωληνάρια τύπου erpendorf)

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Ο καθαρισμός του DNA επιτελείται σε τρία στάδια:

1° Στάδιο:Δέσμευση του DNA:Σε κάθε προϊόν PCR (20μl) προσθέσαμε τετραπλάσιο όγκο αραιωμένου Binding Buffer (B₂) 80μl. Με τη βοήθεια της πιπέτας αναδεύουμε καλά το μίγμα και το μεταφέρουμε στην στήλη (Pure Link Spin Column), που έχουμε τοποθετήσει πρώτα σε ένα σωληνάριο συλλογής (Collection Tube). Φυγοκεντρούμε για ένα λεπτό στις 10,000rpm. Πετάμε το διήθημα και τοποθετούμε εκ νέου την στήλη στο σωληνάριο.

2° Στάδιο:Καθαρισμός του DNA:Προσθέτουμε σε κάθε στήλη 650μl του αραιωμένου με αιθανόλη Wash buffer (W₁) και το μίγμα φυγοκεντρείται σε >10,000rpm για 1 λεπτό και απορρίπτεται εκ νέου το διήθημα, και επαναφυγοκεντρούμε κάθε στήλη για 3 λεπτά στις μέγιστες στροφές (13,400rpm), απομακρύνοντας με αυτόν τον τρόπο τυχόν υπολείμματα αιθανόλης που περιεχόταν στο Wash buffer. Κάθε στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωλήνα έκλουσης Pure Link (1.7ml), και απορρίπτουμε τους παλιούς σωλήνες συλλογής του διηθήματος.

3° Στάδιο:Έκλυση DNA:Στη συνέχεια προσθέτουμε 50μl Elution buffer (E₁) στο κέντρο κάθε στήλης, ώστε η στήλη να διαβραχεί και έτσι να αποδεσμευτεί όλη η ποσότητα DNA, επωάζοντας όλες τις στήλες σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά. Τέλος φυγοκεντρούμε τις στήλες στις μέγιστες στροφές (13,400rpm) για ένα λεπτό. Όλες οι στήλες απορρίπτονται και το διήθημα που έχει απομείνει περιέχει καθαρισμένο προϊόν PCR, το οποίο μπορεί να ελεγχθεί με το πέρας της διαδικασίας με την ηλεκτροφόρηση, τεχνική που αναλύθηκε παραπάνω. Το καθαρισμένο προϊόν μπορεί να φυλαχθεί στους 4°C όταν πρόκειται για άμεση χρήση ή στους -20° C για μακροπρόθεσμη φύλαξη έως ότου πραγματοποιηθεί η αλληλούχιση του DNA τους (Sequencing).

2.7 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ (*Sequencing*)

Η αλληλούχιση του DNA είναι μια από τις πλέον θεμελιώδεις τεχνολογίες που μας επιτρέπει την αποκρυπτογράφηση της αλληλουχίας ενός τμήματος DNA. Όλες οι σύγχρονες τεχνικές βασίζονται

στη μέθοδο Sanger, την ενζυμική μέθοδο που επινοήθηκε το 1977 από τον Frederick Sanger, ο οποίος μαζί τον Walter Gilbert τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Χημείας [23]. Η τελευταία βασίζεται στη χρήση διδεόξυ-τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (ddNTPs) κατά την αντίδραση επέκτασης εκκινητή, τα οποία μόλις εισαχθούν σταματούν την επέκταση, σε διαφορετικό σημείο, καθώς δεν περιέχουν την υδροξυλ-ομάδα που είναι απαραίτητη για την προσθήκη του επόμενου dNTP. Η μέθοδος Sanger που είναι γνωστή και ως μέθοδος τερματισμού της αλυσίδας ή μέθοδος διδεόξυνουκλεοτιδίου (ddNTP), απαιτεί μονόκλωνο DNA, που χρησιμοποιείται σαν μήτρα για την σύνθεση ραδιοσημασμένης συμπληρωματικής αλυσίδας *in vitro*. Η αντίδραση επιτυγχάνεται με την χρήση DNA πολυμεράσης στην παρουσία 4 δεόξυνουκλεοτιδίων (dATP,dTTP,dGTP,dCTP), ένα από τα οποία είναι ραδιοσημασμένο και ενός συνθετικού ολιγονουκλεοτιδίου που είναι συμπληρωματικό στο DNA μήτρα και χρησιμεύει ως εκκινητής. Τέσσερις κατά τα άλλα όμοιες αντιδράσεις σύνθεσης αναμειγνύονται με προσθήκη στην κάθε μία μικρής ποσότητας ενός διαφορετικού 2',3'-διδεόξυ νουκλεοτιδίου. Η ενσωμάτωση ενός ddNMP στο 3' άκρο μιας αντιγραφόμενης αλυσίδας σταματάει την περαιτέρω σύνθεση γιατί δεν υπάρχει πια 3'-OH για επέκταση της αλυσίδας. Ο λόγος πχ. ddATP προς την dATP είναι ρυθμισμένος έτσι ώστε να μην γίνεται περάτωση της σύνθεσης σε κάθε σημείο που συναντάται A. Έτσι κάθε αντίδραση καταλήγει να περιέχει μίγμα περατωμένων αλυσίδων, όλες σε διαφορετική περίσταση που συναντάται A,G,C,T ανάλογα με το ddNTP που συμπεριλήφθηκε. Μετά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και αυτοραδιογραφία, μπορούμε να διαβάσουμε την αλληλουχία του DNA. Σήμερα η μέθοδος Sanger είναι πλήρως αυτοματοποιημένη. Γίνεται χρήση ddNTPs που έχουν επισημανθεί με φθορίζουσες χρωστικές διαφορετικού χρώματος το καθένα, έτσι ώστε να μπορούν να εντοπιστούν εύκολα από έναν ανιχνευτή φθορισμού. Η μέθοδος δεν χρειάζεται ραδιενέργεια, και μετά την ηλεκτροφόρηση ένας ανιχνευτής φθορισμού περνά πάνω από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και καταγράφει ποιο διδεόξυνουκλεοτίδιο υπάρχει. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατόν να προσδιοριστούν και αλληλουχίες που περιέχουν και 500 bp. Ωστόσο η κατασκευή νέων αυτοματοποιημένων συσκευών που χρησιμοποιούν ένα σύνολο από τριχοειδή κανάλια (τριχοειδής ηλεκτροφόρηση), αντί του πηκτώματος ακρυλαμίδιου, δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού αλληλουχιών μέχρι και 1000bp. [280].

2.8 ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΥΠΟΠΟΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ *MULTI LOCUS SEQUENCE TYPING(MLST)*

Η πολυεστιακή τυποποίηση αλληλουχιών (Multi locus sequence typing-MLST), είναι μια τεχνική που βασίζεται στην ανάλυση μιας μεταβλητής αλληλουχίας σε μια ομάδα επτά “housekeeping” γονιδίων, που βρίσκονται σε όλα τα στελέχη ενός βακτηριακού είδους. Τα επιλεγόμενα προς ανάλυση γονίδια πρέπει να έχουν ικανή απόσταση μεταξύ τους στο χρωμόσωμα, και να μην

βρίσκονται κοντά σε γονίδια που βρίσκονται υπό πίεση επιλογής, και κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν σε απαραίτητες μεταβολικές αντιδράσεις. Συγκεκριμένοι εκκινητές έχουν σχεδιαστεί προκειμένου να ενισχύσουν τμήματα (~500bp αυτών των γονιδίων) και κατόπιν αναλύεται η αλληλουχία τους προκειμένου να προσδιοριστεί η μεταβλητότητά τους. Οι αλληλουχίες μπορούν να συγκριθούν με αυτές που ήδη βρίσκονται σε παγκόσμιες βάσεις δεδομένων και να αναλυθούν επιδημιολογικά τόσο σε τοπικό, όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο. Η διαδικασία που ακολουθείται και ακολουθήθηκε και στην παρούσα μελέτη για το *A. baumannii*, περιλαμβάνει την απομόνωση του μικροοργανισμού, την ταυτοποίησή του σε επίπεδο είδους, την απομόνωση του DNA από τα βακτηριακά κύτταρα και την ενίσχυση, μέσω της PCR, ενός εσωτερικού τμήματος, του επιλεγμένου γονιδίου. Για κάθε γονίδιο βασικού μεταβολισμού οι διάφορες αλληλουχίες σημαίνονται με έναν αριθμό, οι οποίες προσδιορίζουν χωριστά αλλήλια. Τα αλλήλια που παρουσιάζουν έστω και μια διαφορά στην αλληλουχία τους θεωρούνται διαφορετικά. Κάθε βακτηριακό στέλεχος χαρακτηρίζεται από τον συνδυασμό των αλληλίων (allelic profile) επτά housekeeping γονιδίων που έχουν χρησιμοποιηθεί, και κατατάσσεται σε έναν συγκεκριμένο μοναδικό τύπο αλληλουχιών (Sequence Type, ST). Ο ST αποτελεί έναν κατάλληλο, αξιόπιστο και ακριβή τρόπο χαρακτηρισμού ενός στελέχους ή ενός βακτηριακού κλώνου. Τα στελέχη του ίδιου είδους με τον ίδιο ST αποτελούν μέλη του ίδιου κλώνου. Οι πληροφορίες που σχετίζονται με την μοριακή μέθοδο MLST καθώς και τα επιδημιολογικά δεδομένα είναι καταχωρημένα στις δυο επίσημες διαδικτυακές βάσεις δεδομένων, www.mlst.net και www.pubmlst.org, που προέρχονται από το Imperial College, London και το Oxford University αντίστοιχα.

2.8.1 ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ MLST ΓΙΑ ΤΟ *ACINETOBACTER BAUMANNII*

Στην μελέτη μας καθορίσαμε τον MLST (ST) τύπο, σύμφωνα με το σχήμα τυποποίησης του Ινστιτούτου Pasteur [281] χρησιμοποιώντας τα εξής παρακάτω επτά απαραίτητα για την επιβίωση γενετικά σταθερών γονιδίων για το *A. baumannii*:

- 1) *cpn60* (60-KDa chaperonin)
- 2) *fusA* (elongation factor, EF-G)
- 3) *gltA* (citrate synthase)
- 4) *pyrG* (CTP synthase)
- 5) *recA* (homologous recombination factor)
- 6) *rplB* (50 S ribosomal protein L2)
- 7) *rpoB* (RNA polymerase subunit B)

Για την διεξαγωγή της MLST παρασκευάστηκαν για κάθε γονίδιο χωριστά, ξεχωριστά μείγματα αντίδρασης με εκκινητές ειδικούς για το κάθε υπό διερεύνηση γονίδιο. Για όλα τα γονίδια που ανιχνεύθηκαν οι συνθήκες αποδιάταξης, αναδιάταξης και επιμήκυνσης ήταν κοινές. Όλες οι

αντιδράσεις PCR προγραμματίστηκαν και εκτελέστηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή και χρησιμοποιήθηκε η Taq πολυμεράση. Οι αλληλουχίες των εκκινητών καθώς και οι συνθήκες της PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την τυποποίηση στελεχών *A. baumannii* με την μέθοδο MLST αναφέρονται στους παρακάτω πίνακες.

ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΙΟΝΤΟΣ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ
cpn60:F	ACTGTACTTGCTCAAGC	405bp	[5], [280]
cpn60:R	TTCAGCGATGATAAGAAGTGG	405bp	[5], [280]
fusA:F	ATCGGTATTTCTGCKCACATYGAT	633bp	[5], [280]
fusA:R	CCAACATACKYTGWACACCTTTGTT	633bp	[5], [280]
gltA:F	AATTTACAGTGGCACATTAGGTCCC	483bp	[5], [280]
gltA:R	GCAGAGATACCAGCAGAGATACACG	483bp	[5], [280]
pyrG:F	GGTGTTGTTTCATCACTAGGWAAAGG	297bp	[5], [280]
pyrG:R	ATAAATGGTAAAGAYTCGATRTCACCMA	297bp	[5], [280]
recA:F	CCTGAATCTTCYGGTAAAAC	372bp	[5], [280]
recA:R	GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC	372bp	[5], [280]
rplB:F	GTAGAGCGTATTGAATACGATCCTAACC	330bp	[5], [280]
rplB:R	CACCACCACRTGYGGGTGATC	330bp	[5], [280]
rpoB:F	GGCGAAATGGC(AGT)GA(AG)AACCA	456bp	[5], [280]
rpoB:R	GA(AG)TC(CT)TCGAAGTTGTAACC	456bp	[5], [280]

ΠΙΝΑΚΑΣ 12. Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της MLST

Συνθήκες	Αρχική αποδιάταξη	Αποδιάταξη	Αναδιάταξη	Επιμήκυνση	Αριθμός κύκλων	Τελική επιμήκυνση
Γονίδια						
MLST						
<i>A.baumannii</i>	95° C ► 5m	95° C ► 30s	50° C ► 30s	72° C ► 30s	35	72° C ► 10m

ΠΙΝΑΚΑΣ 13. Συνθήκες διεξαγωγής των PCR των housekeeping γονιδίων

2.9 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΑΛΛΟΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΠΕΔΙΟ (PFGE)

Για την μελέτη της κλωνικής συγγένειας των στελεχών της παρούσας μελέτης έγινε τυποποίηση με ηλεκτροφόρηση σε παλλομενο ηλεκτρικό πεδίο Pulse field (PFGE) του χρωμοσωμικού DNA όλων

των στελεχών που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης μετά από πέψη τους με το ένζυμο *ApaI* [282]. Ακολούθησε ανάλυση των γενετικών αποτυπωμάτων των στελεχών οπτικά, εφαρμόζοντας διεθνώς αποδεκτά κριτήρια [283]. Την PFGE (Pulse field-gel electrophoresis) [84] την χρησιμοποιούμε όταν τα ηλεκτροφορούμενα τμήματα DNA δεν μπορούν να διαχωριστούν λόγω του πολύ μεγάλου μεγέθους τους. Πρόκειται για περιπτώσεις ολόκληρων χρωμοσωμάτων αλλά και των θραυσμάτων που έχουν παραχθεί μετά από πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες σε ολικό DNA (συνήθως βακτηρίων, αλλά και μυκήτων). Η PFGE είναι δυσκολότερη από την απλή ηλεκτροφόρηση, μιας και χρειάζεται ιδιαίτερη τεχνική ώστε τα βακτήρια να ενσωματωθούν μέσα σε βύσματα αгарόζης, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η μηχανική ρήξη του DNA και τα κύτταρα πέπτονται με πρωτεΐνωση K, πριν την πέψη του DNA από το περιοριστικό ένζυμο. Με την εισαγωγή παλμού ή μεταβολής της κατεύθυνσης του ηλεκτρικού πεδίου, μπορούν να διαχωριστούν τμήματα DNA μεγέθους έως και 10Mb. Είναι δυσκολότερη μέθοδος σε σχέση με την απλή ηλεκτροφόρηση, παρέχει όμως συνολικά γονιδιωματικά πρότυπα αποτελούμενα από 5-20 διακριτές ζώνες-θραύσματα που κυμαίνονται περίπου σε 10-800 χιλιάδες ζευγών βάσεων [84]. Ο χρόνος που απαιτείται για τον επαναπροσανατολισμό των τμημάτων DNA στο μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο, είναι ανάλογος του μοριακού τους βάρους. Η συχνότερα χρησιμοποιούμενη συσκευή βασίζεται σε ομοιογενές περιμετρικό ηλεκτρικό πεδίο (contour-clamped homogenous electric field) (CHEF) που διαθέτει 24 ηλεκτρόδια που είναι διαταγμένα σε εξάγωνο. Η διάρκεια της διαδικασίας είναι της τάξεως των 30-40 ωρών. Περιγράφονται όμως και πρωτόκολλα βραχύτερα και ταχύτερα. Η ποιότητα των αποτελεσμάτων επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες μεταξύ των οποίων η ποιότητα και η συγκέντρωση του DNA, η συγκέντρωση της αгарόζης, η διαφορά δυναμικού και η διάρκεια των παλμών, καθώς και η συγκέντρωση και η θερμοκρασία του ρυθμιστικού διαλύματος. Η μέθοδος χρησιμοποιείται εκτενώς για την επιδημιολογική διερεύνηση και την συσχέτιση με πρότυπα αντοχής σε αντιβιοτικά. [284]

2.9.1 PFGE ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Από την ανάλυση όλων των στελεχών, παραθέτονται 12 αντιπροσωπευτικά στελέχη που επιλέχθηκαν καλύπτοντας το χρονικό εύρος του έτους 2018. Τα επιλεγμένα στελέχη τυποποιήθηκαν με μακροπεριοριστική πέψη του γενωμικού DNA με το περιοριστικό ένζυμο *ApaI* και την ακόλουθη ανάλυση των νουκλεϊκών τμημάτων με ηλεκτροφόρηση σε μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Το πρωτόκολλο που ακολουθήσαμε είναι το εξής παρακάτω:

1) Τα στελέχη επώαστηκαν σε Muller Hinton (MHagar) στους 37° C για 18 ώρες και τα εναιωρήματα φωτομετρήθηκαν, για να αραιωθούν με τον αντίστοιχο όγκο νερού, ώστε να αποκτήσουν πυκνότητα $\geq 6 \text{ McFarland}$.

2) Φυγοκεντρήθηκε όγκος ίσος με 1ml για 5min στις 6.000 rpm και το ίζημα εναιωρήθηκε σε 1ml SE διαλύματος (75mM Tris, 100mM EDTA, 150mM NaCl, pH:7,5) και φυγοκεντρήθηκε για άλλα 5 min στις 6.000rpm.

3) Το ίζημα εναιωρήθηκε σε 300μl EC διαλύματος (6mM Tris, 1M NaCl, 100mM EDTA, 0,5% Brij 58 (Sigma), 0,2% sodium deoxycholate, 0,5% N-lauroyl sarcosyl (sarcosyl), pH 7,5.

4) Παρασκευάστηκε 1.6% αγαρόζη χαμηλού σημείου τήξεως (LMT-Low Melting Temperature Agarose) σε 50 ml H₂O και διατηρήθηκε στους 55° C για 30 λεπτά.

5) 150μl όγκου αγαρόζης αναμείχθηκε με ίδιο όγκο δείγματος και παρασκευάστηκαν 13 πλακίδια μείγματος αγαρόζης-μικροβίου (από 100μl), ανάμεσα σε πλαστικές επιφάνειες. Τα πλακίδια έμειναν στους 4° C για 20 λεπτά, ώστε να στερεοποιηθεί το μίγμα.

6) Τα πλακίδια επώαστηκαν σε 500μl EC διαλύματος, που περιείχαν 2.5 μl λυσοζύμη, για μια ώρα στους 37° C, και μετά για άλλα 10 λεπτά στους 4° C.

7) Το EC διάλυμα αντικαταστάθηκε, (πλύθηκε), με 850μl 0.5M EDTA pH 9.0 για 30 λεπτά στους 4°C και στη συνέχεια αντικαταστάθηκε από 500 μl ESP (0.5M EDTA, 1% sarcosyl, pH 9.0-9.5 με την προσθήκη 2μl πρωτεΐνης K και τα πλακίδια επώαστηκαν ολονύκτια στους 55° C.

8) Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν ξανά στους 4° C για 10 λεπτά. Αφαιρέθηκε το διάλυμα ESP/PrK και ακολούθησε πλύσιμο των πλακιδίων συνολικά 6 φορές για 20 λεπτά την κάθε φορά, με 850μl TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.6 προκειμένου να απομακρυνθεί κάθε ίχνος PrK.

9) Έγινε πέψη μισού πλακιδίου από κάθε στέλεχος σε 20 μl 10x digestion buffer με 10Units περιοριστικού ενζύμου Ara I, στους 37° C σε ολονύκτια επώαση.

10) Εν συνεχεία τοποθετήθηκαν για 10 λεπτά στους 4°C και επώαστηκαν για 15 λεπτά σε 200ml TE διαλύματος σε RT (θερμοκρασία δωματίου).

11) Στη συνέχεια αντικαταστάθηκε το διάλυμα TE με 200μl 0,5x TBE για 20 λεπτά.

12) Τα πλακίδια ηλεκτροφορήθηκαν σε αγαρόζη ειδική για παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Agarose for PFGE) που παρασκευάστηκε σε διάλυμα 0,5 x TBE και σε συσκευή CHEF-DRIII System (Biorad) με 2,5 lt 0,5TBE και στις εξής συνθήκες:

Block I

Initial time:5sec, Final time :25sec, Run time :6 hours

Block II

Initial time :12sec, Final time:65sec, Run time :14hours

2.10 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ

Για τον καθορισμό των γενετικών μονάδων των γονιδίων *bla_{OXA-23}*, τα πλασμιδιακά περιεχόμενα των 12 αντιπροσωπευτικών κλινικών στελεχών που παράγουν OXA-23 αναλύθηκαν με

ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου (PFGE) του συνολικού DNA του οποίου η πέψη πραγματοποιήθηκε με S1 nuclease (Promega, Madison, WI, USA). Η PFGE S1, χρησιμοποιείται ευρέως στην ανάλυση των πλασμιδίων, προκειμένου να προσδιοριστεί το μέγεθός τους. Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο γίνεται η χρήση της γραμμικής απεικόνισης του πλασμιδιακού DNA σε κύτταρα ενσωματωμένα σε βύσματα αγαρόζης, επιτρέποντας την ανίχνευση μεγάλων πλασμιδίων μέχρι 600kb. Μόνο οι γραμμικές μορφές κινούνται με ρυθμούς που επιτρέπουν τον ακριβή προσδιορισμό του μεγέθους. Κατά τη διαδικασία, τα βακτηριακά κύτταρα αναμειγνύονται με αγαρόζη, διοχετεύονται σε πηγάδια και μετά την σταθεροποίησή τους, μετατρέπονται σε βύσματα, όπου και υποβάλλονται σε διαδικασία λύσης, σε λυτικά διαλύματα με προσθήκη επιπλέον ενζύμων, και τέλος η S1 νουκλεάση οδηγεί στην γραμμική απεικόνιση των πλασμιδίων, μιας και μόνο οι γραμμικές μορφές κινούνται με ρυθμούς που επιτρέπουν τον ακριβή προσδιορισμό του μεγέθους τους, μιας και η κλειστή κυκλική τους μορφή κινείται πολύ αργά, με αποτέλεσμα συχνά να μην ανιχνεύεται. Τα βύσματα ενσωματώνονται σε φρεάτια μέσα σε πηκτή αγαρόζης και στη συνέχεια ηλεκτροφορούνται σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο, κατά την οποία η τάση δεν κινείται συνέχεια προς μια κατεύθυνση, αλλά αλλάζει περιοδικά μεταξύ τριών κατευθύνσεων. Το DNA κινείται αλλάζοντας συνεχώς διαδρομή και ο διαχωρισμός των τμημάτων του απαιτεί από 15 έως 30 ώρες. Η ακριβής διαδικασία καθώς και τα διαλύματα και τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν, αναφέρονται παρακάτω στην λεπτομερή ανάλυση του πρωτοκόλλου που χρησιμοποιήθηκε.

2.10.1 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ PFGE S1

1. Τα στελέχη επώστηκαν σε MH άγαρ και, την επόμενη ημέρα, τα βακτηριακά εναιωρήματα φωτομετρήθηκαν για να αραιωθούν σε 5 ml PET IV, (Tris/HCl 1M pH 7.6, NaCl 1M), ώστε να αποκτήσουν πυκνότητα [6 McFarnald].
2. Επαναδιαλύεται το βακτηριακό εναιώρημα με 5ml PET IV, και φυγοκεντρείται στις 5000 rpm για 15 λεπτά.
3. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και επαναδιαλύεται το ίζημα σε 1 ml PET IV.
4. Για τα βύσματα παρασκευάζεται πηκτή αγαρόζης 1.6% σε H₂O, η οποία ψύχεται στους 55° C.
5. Αναμειχθηκαν 150 μl βακτηριακού εναιωρήματος με 150 μl πηκτής αγαρόζης, και διοχετεύθηκαν σε πηγάδια σχηματίζοντας πλακίδια, τα οποία αφέθηκαν στους 4°C για 1 ώρα, ώστε να σταθεροποιηθεί το μίγμα.
6. Τα βύσματα επώστηκαν σε 1ml Lysis Solution, που περιείχε 5μl λυσοζύμης 100mg/ml και 2μl RNAase 10mg/ml και επώστηκαν στους 37° C για 18 ώρες χωρίς ανακίνηση.
7. Το Lysis Solution αντικαταστάθηκε με 1ml ESP με την προσθήκη 20μl πρωτεΐνωση K (50mg/ml). Τα πλακίδια επώστηκαν στους 50°C χωρίς ανακίνηση.

8. Αφαιρέθηκε το ESP/PrK διάλυμα και ακολούθησε το πλύσιμο των πλακιδίων με 1ml ρυθμιστικού διαλύματος TE σε RT (θερμοκρασία δωματίου), ολονύκτια, χωρίς ανακίνηση.

9. Την επόμενη μέρα οι πλύσεις με 1ml ρυθμιστικού διαλύματος TE συνεχίστηκαν, κάθε 2 ώρες για τουλάχιστον 5 φορές.

10. Την επόμενη μέρα έγινε η πέψη μισού πλακιδίου με 2 Units της S1 νουκλεάσης σε 200 μl nuclease buffer 1x, και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 45 λεπτά.

11. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στους 4°C για 10 λεπτά και επώαστηκαν σε 200μl ρυθμιστικού διαλύματος TE σε θερμοκρασία δωματίου RT για 15 λεπτά.

12. Αμέσως μετά απομακρύνθηκε το TE διάλυμα και κάθε πλακίδιο καλύφθηκε από 150μl 0.5x TBE, ώστε να εξισορροπηθεί πριν από την ηλεκτροφόρηση.

13. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των πλακιδίων σε 1% κανονική αγαρόζη, η οποία παρασκευάστηκε σε διάλυμα 0.5 x TBE και σε συσκευή CHEF-DRIII System (Biorad) με 2.5 lt 0.5 x TBE και στις εξής συνθήκες:

Συνθήκη εκτέλεσης:

6 V/cm (200 V)

Χρόνος μεταγωγής 5s-25s για 6 ώρες

Χρόνος μεταγωγής 30s-45s για 18 ώρες

Χρόνος εκτέλεσης 24 ώρες

14. Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολούθησε βαφή με 0.5 μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) σε απεσταγμένο νερό για τουλάχιστον 45 λεπτά και η παρατήρηση έγινε κάτω από υπεριώδες φως.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από το σύνολο των 120 στελεχών που ερευνήθηκαν κατά την διάρκεια της μελέτης, τα (n= 51) (42,5%), προήλθαν από τη ΜΕΘ, το 39,16% (n=47) από τις Παθολογικές κλινικές, οι οποίες περιλαμβάνουν (Παθολογικές, Ογκολογικές, Αιματολογική, Νεφρολογική, Πνευμονολογική). Επίσης προήλθαν από τον Χειρουργικό Τομέα (Χειρουργική, Ορθοπαιδική, Νευροχειρουργική) σε ποσοστό 8,33% (n=10). Από το Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών (ΤΕΠ), προήλθε το 3,33% (n=4) και από διάφορες κλινικές π.χ. Παιδιατρική, Μαιευτική το 7,9% (n=9). Τα περισσότερα στελέχη απομονώθηκαν από αιμοκαλλιέργειες, βρογκικές εκκρίσεις και ακολούθησε η απομόνωσή τους από ούρα, πτύελα, τραυμα, ENY, καθετήρες. Κ.Φ.Γ. και από διαφορά άλλα κλινικά δείγματα.

Ακολουθούν οι πίνακες με τη διασπορά των κλινικών στελεχών στις διάφορες κλινικές, καθώς και με την διασπορά των απομονωθέντων στελεχών ανά κλινικό δείγμα

ΚΛΙΝΙΚΗ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ
ΜΕΘ	51(42,5%)
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ	46 (38,33 %)
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΕΣ	10(8,33%)
ΤΕΠ	4(3,33%)
ΛΟΙΠΕΣ	9(7,5%)
ΣΥΝΟΛΟ	120

ΠΙΝΑΚΑΣ 14. Διασπορά των απομονωθέντων στελεχών *A.baumannii* ανα κλινική του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

ΚΛΙΝΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ
ΑΙΜΑ	34(28,33%)
ΒΡΟΓΧΙΚΕΣ ΕΚΚΡΙΣΕΙΣ	29(24,16%)
ΟΥΡΑ	14(11,66%)
ΠΤΥΕΛΑ	12(9,99%)
ΤΡΑΥΜΑ	6(4,99%)
ΕΝΥ	5(4,16%)
ΚΑΘΕΤΗΡΑΣ	3(2,49%)
ΚΦ.Γ.	3(2,49%)
ΔΙΑΦΟΡΑ	14(11,66%)

ΠΙΝΑΚΑΣ 15. Διασπορά των απομονωθέντων στελεχών *A.baumannii* ανα είδος κλινικού δείγματος.

3.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ

Τα υπό μελέτη στελέχη επιλέχθηκαν με βάση την αντοχή τους στις καρβαπενέμες (ιμιπενέμη, μεροπενέμη), σύμφωνα με το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK 2 (bioMerieux,Inc.). Τα ποσοστά αντοχής στους συγκεκριμένους αντιμικροβιακούς παράγοντες κατά το χρονικό διάστημα της διεξαγωγής της μελέτης στην πλειοψηφία τους ήταν πολύ υψηλά. Συγκεκριμένα, οι MICs κυμάνθηκαν από >8mg/l έως ≥ 16 mg/l, όπως φαίνεται πιο αναλυτικά στον πίνακα που ακολουθεί:

MICs ΙΜΙΠΕΝΕΜΗΣ ΚΑΙ ΜΕΡΟΠΕΝΕΜΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ
≥ 16 mg/l	109 (90,83%)
>8mg/l	11 (9,16,83%)

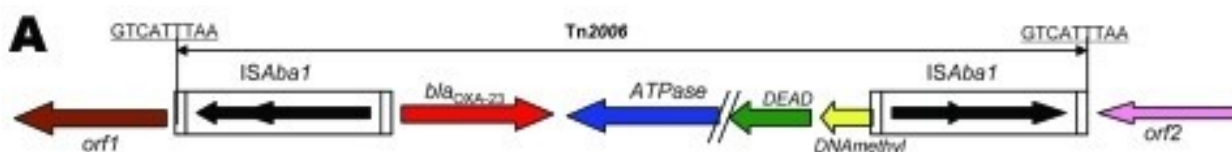
ΠΙΝΑΚΑΣ 16. Εύρος των MICs σε σχέση με τον αριθμό των ανθεκτικών στελεχών.

3.2. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ *bla*_{OXA-51}

Με τη δοκιμασία της PCR ανιχνεύθηκε η παρουσία του ενδογενούς γονιδίου για τα *A.baumannii* *bla*_{OXA-51}, σε όλα τα υπό μελέτη στελέχη, επισφραγίζοντας την ταυτοποίησή του.

3.3. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΩΝ

Η OXA-23 ήταν η μοναδική καρβαπενεμάση που ανιχνεύθηκε στα στελέχη της μελέτης, και μάλιστα το γονίδιο *bla*_{OXA-23} το έφερε το σύνολο των 120 στελεχών, τα οποία απομονώθηκαν. Κανένα άλλο από τα γονίδια που κωδικοποιούν για άλλες καρβαπενεμάσες όπως τα *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-24} δεν έφεραν τα απομονωθέντα στελέχη. Ο χαρακτηρισμός των περιοχών που συνδέουν τα γονίδια που κωδικοποιούν για καρβαπενεμάσες με χαρτογράφηση και προσδιορισμό της αλληλουχίας με PCR, έδειξε ότι το *bla*_{OXA-23} παρουσιάζεται ως μέρος του προηγούμενα χαρακτηρισμένου τρανσποζονίου Tn2006, με δυο αντίγραφα της αλληλουχίας εισδοχής *ISAbal* σε αντίθετο προσανατολισμό, (Εικόνα 16.) Ωστόσο, η *ISAbal*, δεν βρέθηκε γειτονικά του γονιδίου *bla*_{OXA-51-like}.



ΕΙΚΟΝΑ 16. Τρανσποζόνιο Tn 2006, στο οποίο φαίνονται τα δυο αντίγραφα εισδοχής *ISAbal* σε αντίθετο προσανατολισμό.

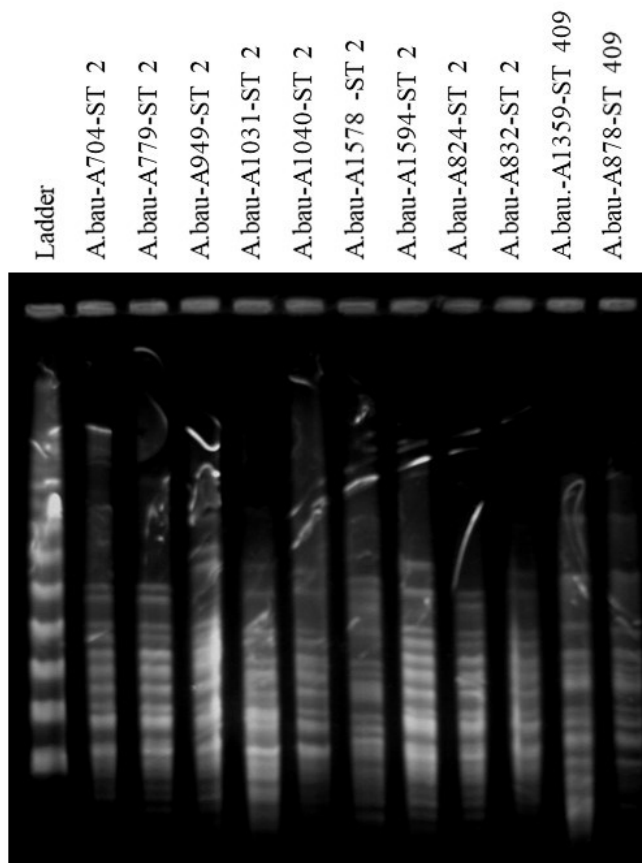
3.4. ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ MLST

Η τυποποίηση των απομονωθέντων στελεχών έγινε με τη μέθοδο MLST σύμφωνα με το σχήμα του Ινστιτούτου Pasteur (MLST^P), η οποία ανέδειξε ότι τα υπό μελέτη στελέχη ανήκαν σε δυο τύπους αλληλούχισης (STs). Ο κλώνος ST2, ο οποίος συμβαδίζει και με το διεθνές κλωνικό σύμπλεγμα CC2, ήταν ο επικρατέστερος αφού σε αυτόν ανήκαν τα 108 από τα 120 στελέχη που μελετήθηκαν. Τα υπόλοιπα 12 στελέχη ανήκαν στον ST409.

3.5. ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ PGFE

Την MLST ακολούθησε η τυποποίηση των στελεχών με την PGFE χρησιμοποιώντας το περιοριστικό ένζυμο Ara 1 για την μακροπεριοριστική πέψη του γενωμικού DNA και ακολούθησε ο διαχωρισμός των θραυσμάτων που προέκυψαν, με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγορόζης με

περιοδική εναλλαγή της γωνίας της κατεύθυνσης του ηλεκτρικού πεδίου. Ενδεικτικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα 11 στελεχών από τα 120 που ερευνήθηκαν. Τα ευρήματα επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την MLST, με την παρουσία δύο κλώνων. Όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα, συγκεκριμένα τα στελέχη από την θέση 2 έως και την θέση 10 ανήκουν στον κλώνο I, ενώ τα υπόλοιπα στελέχη ανήκουν στον κλώνο II.



ΕΙΚΟΝΑ 17. Αντιπροσωπευτικά στελέχη από τους κλώνους που τυποποιήθηκαν

3.6. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΚΟΛΙΣΤΙΝΗ

Για όλα τα στελέχη οι MICs στην κολιστίνη, προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο των μικροαραιώσεων σε εμπορικό ζωμό ComASP™ Colistin (Liofilchem®). Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται αναλυτικά τα ποσοστά των στελεχών που αντιστοιχούν στις MICs.

MIC	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ
16 mg/l (R)	45 (37,5%)
8 mg/l (R)	11 (9,16%)
4 mg/l (R)	13 (10,83%)
2mg/l (S)	11 (9,16%)
1mg/l (S)	27 (22,5%)

0,5mg/l (S)	11 (9,16%)
0,25mg/l (S)	2 (1.66%)

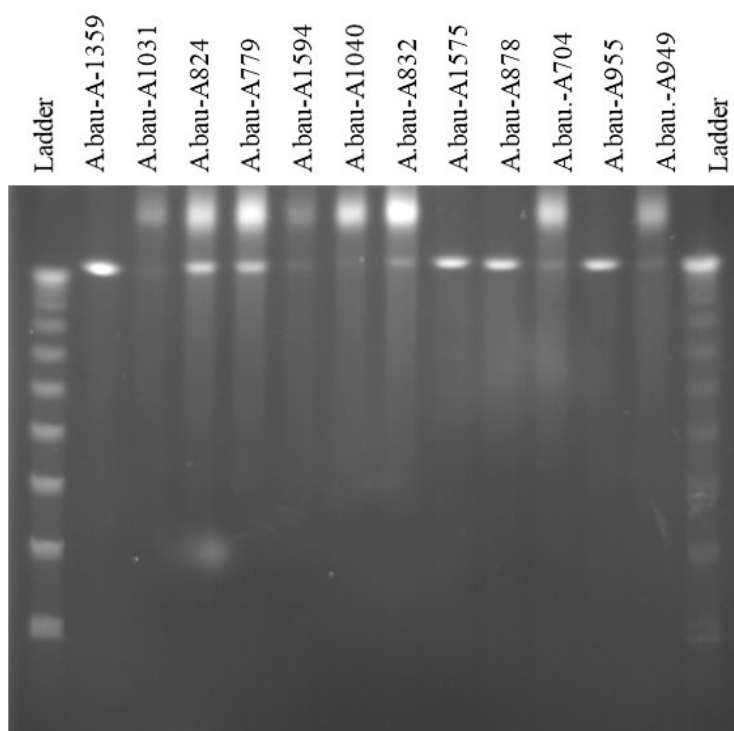
ΠΙΚΑΚΑΣ 17.Εύρος MICs της κολιστίνης σε σχέση με τον αριθμό στελεχών

Φαίνεται ότι από το σύνολο των 120 στέλεχων τα 69 στελέχη παρουσίασαν αντοχή στην κολιστίνη με την πλειονότητα τους να έχουν MIC >16 mg/l, και τα υπόλοιπα 51 βρέθηκαν ευαίσθητα με MICs που κυμαίνονται από 0,25mg/l έως 2mg/l.

Για να διερευνηθούν οι μηχανισμοί, στους οποίους οφείλονται τα υψηλά ποσοστά αντοχής στην κολιστίνη, όλα τα στελέχη, εξετάστηκαν για την παρουσία μεταλλάξεων στα γονίδια *lpxACD* και *pmrCAB*. Η αλληλούχιση των *lpx* γονιδίων αποκάλυψε την ύπαρξη τεσσάρων αμινοξικών αλλαγών (LpxA: Y131H; LpxC:C120R + N287D; LpxD:E117K) σε όλα τα κολιστίνη-ανθεκτικά και κολιστίνη-ευαίσθητα στελέχη, σε σύγκριση με τις αλληλουχίες του στελέχους *A. baumannii* ATCC 17978. Ενώ, η αλληλούχιση των *pmrCAB* γονιδίων ανέχνευσε δύο διαφορετικά πρότυπα αμινοξικών μεταλλάξεων, τα οποία δεν υπήρχαν στο ATCC 17978 στέλεχος. PmrB:P360Q; PmrC:I42V + I115V + I212V + R332K + H483R, βρέθηκαν σε απομονωμένα στελέχη που ανήκαν στον ST 409 τύπο. Περιέργως όλα τα στελέχη που ανήκαν στον ST 409 τύπο ήταν ευαίσθητα στην κολιστίνη. Η παρουσία των PmrB:A138T + A226V + A444V; PmrC: R109P + F150L + I212V + R332K + A354S + K515T; παρατηρήθηκε μεταξύ των ανθεκτικών στην κολιστίνη ST τύπων του *A.baumannii*. Ωστόσο η αντικατάσταση PmrA: A226V και PmrC: R109P, δεν βρέθηκαν μεταξύ των ευαίσθητων στην κολιστίνη *A.baumannii* του τύπου ST2. Η διαπίστωση αυτή προφανώς υπογραμμίζει την συμμετοχή της PmrA: A226V και PmrC: R109P αντικατάστασης στην ανάπτυξη της αντοχής στην κολιστίνη σε στελέχη *A. baumannii* που ανήκουν στον ST2 τύπο. Παρόμοιες αντικαταστάσεις σε γονίδια *lpxACD* και *pmrCAB*, έχουν αναφερθεί στο παρελθόν σε απομονωθέντα στελέχη *A.baumannii* κατά την περίοδο 2012-2014 στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας. Επιπλέον δεν βρέθηκαν γονίδια *mcr*, σε κανένα από τα στελέχη *A.baumannii* που απομονώθηκαν.

3.7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ

Ο προσδιορισμός της γενετικής θέσης των γονιδίων *bla_{OXA-23}*, πραγματοποιήθηκε με την πέψη ολικού DNA, χρησιμοποιώντας την S1 νουκλεάση και ακολουθώντας το πρωτόκολλο PFGE S1, για 12 αντιπροσωπευτικά στελέχη που έφεραν το συγκεκριμένο γονίδιο. DNA ζώνες που θα μπορούσαν να αποδοθούν σε πλασμιδιακά μόρια δεν βρέθηκαν. (Εικόνα 18)



ΕΙΚΟΝΑ 18. Απεικόνιση της πλασμιδιακής ανάλυσης με PFGE S1, αντιπροσωπευτικών στελεχών.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

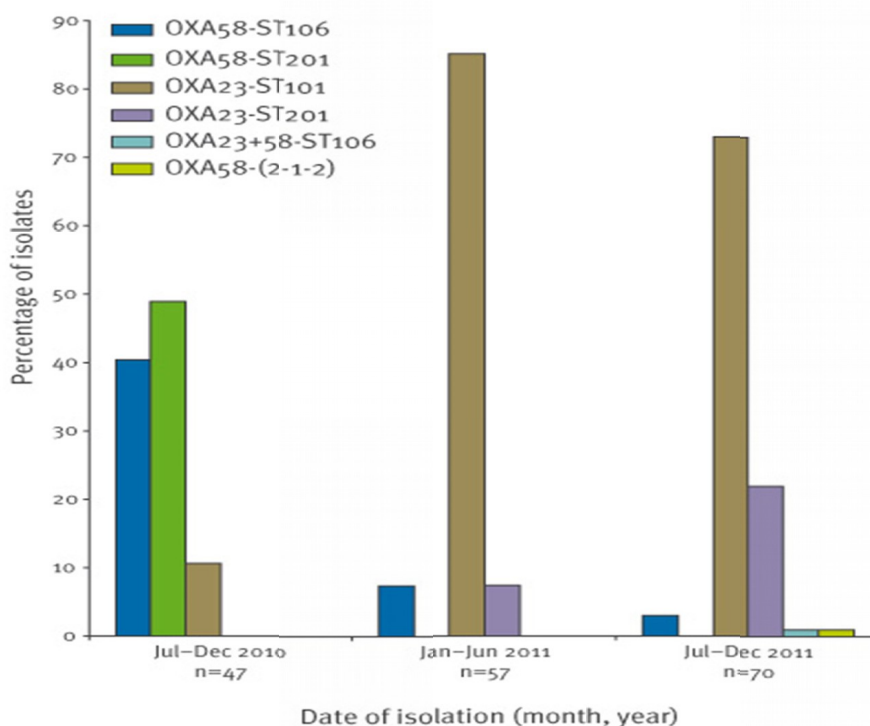
Συμπερασματικά τα επιλεγμένα στελέχη της συγκεκριμένης μελέτης, το μεγαλύτερο μέρος των οποίων προήλθε από την ΜΕΘ, κατέδειξαν την ίδια αντοχή, τόσο στην ιμιπενέμη, όσο και στην μεροπενέμη και μάλιστα το 90,83% εμφάνισε MICs>16mg/l. Όλα τα στελέχη αποδείχθηκε ότι παρήγαγαν την OXA-23 ως μοναδική καρβαπενεμάση και ο προσδιορισμός της γενετικής θέσης των γονιδίων *bla*_{OXA-23} που την κωδικοποιεί υπέδειξε την χρωμοσωμική του θέση. Επιπλέον η τυποποίηση των καρβαπενέμη-ανθεκτικών στελεχών *A.baumannii* ανέδειξε τον ST2 τύπο ως τον επικρατέστερο, ο οποίος μάλιστα συμβαδίζει και με τον διεθνή κλώνο CC2. Τυποποιήθηκε και ένας δεύτερος κλώνος, ο ST 409, που μάλιστα μέχρι σήμερα δεν είχε εμφανιστεί στο νοσοκομειακό περιβάλλον του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Λάρισας. Στην μελέτη μας διερευνήθηκε και

η αντοχή των καρβαπενέμη-ανθεκτικών στελεχών *A. baumannii* στην κολιστίνη. Η αυξανόμενη χρήση της κολιστίνης έχει οδηγήσει στην αυξητική τάση της αντοχής σε εθνικό και παγκόσμιο επίπεδο [245, 285]. Έτσι το 58% των στελεχών περίπου παρουσίασε αντοχή στην κολιστίνη, με εύρος στις MICs από 4-16 mg/l, με την πλειονότητα να έχει MIC > 16mg/l. Στον έλεγχο για την παρουσία μεταλλάξεων στα γονίδια *lpxACD* και *pmrCAB*, παρατηρήθηκαν αμινοξικές μεταλλάξεις. Παρόμοιες μεταλλάξεις έχουν αναφερθεί σε στελέχη *A.baumannii* που απομονώθηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας, το χρονικό διάστημα από το 2012 έως το 2014, ενώ τα στελέχη δεν έφεραν το *mcr* γονίδιο.

Τα τελευταία χρόνια στα ελληνικά νοσοκομεία επικράτουν τα *A.baumannii* στελέχη ανθεκτικά στις καρβαπενέμες [245], αποτελώντας τα πιο συχνά παθογόνα στις ΜΕΘ (<http://www.mednet.gr/whonet>). Αξιοσημείωτο είναι ότι σε πολυκεντρική μελέτη που έλαβε χώρα το 2015, με την συμμετοχή πολλών ελληνικών νοσοκομείων απομονώθηκαν σχεδόν αποκλειστικά (>95%) CRAB στελέχη .

Η παραγωγή κυρίως των οξακιλινασών παίζει τον κυριότερο ρόλο στην αντοχή του *A.baumannii*, με πιο συχνή την OXA-23, OXA-40 και OXA-58 [286]. Μέχρι το 2009 η OXA-58, ανιχνεύεται ως η μοναδική καρβαπενέμαση στα στελέχη *A.baumannii*. Σήμερα τα ένζυμα OXA-23 παρουσιάζουν συνεχώς μεγαλύτερη εξάπλωση και τείνουν να κυριαρχούν μεταξύ των CRAB στελεχών με βαθμιαία αντικατάσταση των OXA-58 ενζύμων. Παρόμοια είναι και η παρατήρηση που προέκυψε στην παρούσα μελέτη, όπου η OXA-23 καρβαπενεμάση ανιχνεύτηκε αποκλειστικά και ήταν και η μοναδική στα υπο μελέτη στελέχη. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει και ενισχύει την στροφή προς την εξάπλωση των OXA-23 ενζύμων η οποία πρώτη φορά παρατηρήθηκε, σε μελέτη που διεξείχθει το διάστημα 2010-2011 στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας [287]. Έχει θεωρηθεί ότι οι υψηλότερες καρβαπενέμη MICs των *bla*_{OXA-23}-θετικών στελεχών μπορεί να παρέχουν ένα επιλεκτικό αποτέλεσμα στο νοσοκομειακό περιβάλλον.

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



ST: sequence type.

ΕΙΚΟΝΑ 19. (Liakopoulos et al.,2012), μεταστροφή bla_{OXA-58} σε bla_{OXA-23}

Η επέκταση των στελεχών που ανήκουν στον κλώνο CC2 είναι μεγάλη και σήμερα αποτελούν την πλειοψηφία των CRAB στελεχών παγκοσμίως [286,288]. Η μελέτη μας έδειξε να συμβαδίζει με τα δεδομένα από την υπόλοιπη Ελλάδα, τα οποία παρουσιάζουν τον CC2 κλώνο, ως τον συχνότερο, γεγονός που αποδείχθηκε από εθνική μελέτη, η οποία παρουσίασε ότι από το 2005 ο συγκεκριμένος κλώνος CC2 είναι ο πλέον διαδεδομένος στην Ελλάδα συγκριτικά με τον CC1 κλώνο [274]. Όσον αφορά την κολιστίνη, αποτελεί θεραπεία εκλογής των σοβαρών λοιμώξεων ιδιαίτερα στην ΜΕΘ, μιας και η διασπορά των ανθεκτικών στελεχών *A.baumannii* στις καρβαπενέμες είναι τόσο μεγάλη που περιορίζει σημαντικά τις θεραπευτικές επιλογές. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην τετραετία από το 2011 έως το 2015, η Ελλάδα κατέχει την πρώτη θέση σε νοσοκομειακή κατανάλωση κολιστίνης σε σχέση με άλλες Ευρωπαϊκές χώρες [289], εξαιτίας του επιπολασμού των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες νοσοκομειακών παθογόνων στη χώρα μας. Ως αποτέλεσμα της αυξημένης αυτής χρήσης εμφανίζεται αυξητική τάση στην αντοχή έναντι της κολιστίνης, τόσο σε εθνικό, όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο [245,285].

Συγκεκριμένα η πρώτη μελέτη που υπογράμμισε την ταυτόχρονη εμφάνιση στελεχών CRAB, τα οποία έφεραν το γονίδιο bla_{OXA-23} , συνδυαστικά μάλιστα με αντοχή στην τιγκεκυκλίνη, έγινε σε ελληνικό νοσοκομείο την περίοδο 2011-2013. Η συγκεκριμένη μελέτη κατέδειξε ότι όλα τα

CRCRAB στελέχη αντιστοιχούν στον ST101 τύπο σύμφωνα με την 3LST και ανήκουν στον διεθνή κλώνο CC2, εκφράζοντας ότι η αντοχή στην κολιστίνη σχετίζεται με αμινοξικές αντικαταστάσεις στο *pmrB* γονίδιο οδηγώντας σε πιθανή υπερέκφρασή του [272]. Μελέτη επίσης που έλαβε χώρα κατά την διετία από το 2012 έως το 2014 στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας, η οποία περιελάμβανε επίσης CRCRAB στελέχη, παρείχε λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τους μοριακούς μηχανισμούς που οδηγούν σε αντοχή στην κολιστίνη. Η μελέτη, επιβεβαίωσε ότι όλα τα CRCRAB στελέχη έφεραν το *bla_{OXA-23}* γονίδιο, το οποίο επίσης κατανέμεται στον ST101 τύπο σύμφωνα με την 3LST τεχνική, ο οποίος αντιστοιχεί στον διεθνή κλώνο CC2. Η αντοχή στην κολιστίνη έδειξε μεταλλάξεις στα γονίδια *pmrA* και *pmrC* [273]. Στοιχεία που συμφωνούν και με τα ευρήματα της μελέτη μας. Συγκεκριμένα τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα κολιστίνη-ανθεκτικά στελέχη *A.baumannii*, ανήκαν στον κλώνο ST2 και έφεραν παρόμοιες μεταλλάξεις στα *pmrA* και *pmrC* γονίδια. Ενώ, όλα τα στελέχη που ανήκαν στον κλώνο ST409 παρουσίαζαν ευαισθησία στην κολιστίνη. Η αυξημένη αντοχή στην κολιστίνη των ST2 στελεχών μπορεί να εξηγεί την επικράτηση του συγκεκριμένου κλώνου έναντι των στελεχών που ανήκουν στον ST409. Επιπλέον, η επικράτηση του ST2 κλώνου θα μπορούσε να οφείλεται σε χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τον σχηματισμό βιομεμβρανών και την παθογονικότητα των στελεχών. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες για να αποδειχθεί η συμμετοχή των παραπάνω χαρακτηριστικών στην επικράτηση του ST2 κλώνου, κρίνονται απαραίτητες.

Συνοψίζοντας μπορούμε να πούμε ότι η μελέτη μας, επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών που διεξήχθησαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας, ότι τα CRAB στελέχη που προκαλούν λοιμώξεις τόσο στο νοσοκομείο μας, όσο και άλλα ελληνικά νοσοκομεία, παράγουν σχεδόν αποκλειστικά την OXA-23 οξακιλλινάση και ανήκουν στον διεθνή κλώνο CC2. Επιπρόσθετα η εμφάνιση του νέου ST 409, αποτελεί φαινόμενο το οποίο πρέπει να μας κρατά συνεχώς σε επαγρύπνιση μιας και αυτός ο μικρός υποπληθυσμός περιλαμβάνει στελέχη που είναι ανθεκτικά στις καρβαπενέμες, κάτι που είναι ιδιαίτερα ανησυχητικό. Ιδιαίτερα στην περίπτωση που στο μέλλον ενδέχεται να παρουσιάσει αυξητική τάση, δημιουργώντας ένα επιπλέον πρόβλημα στις ήδη προβληματικές πλέον θεραπευτικές επιλογές συνδυαστικά πάντα με την όλο ένα και μειωμένη ευαισθησία στην κολιστινίνη.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Kempf M, Rolain J-M. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents*. 2012 Feb;39(2):105–14.
- [2] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Jul;21(3):538–82.
- [3] Schaub IG, Hauber FD. A Biochemical and Serological Study of a Group of Identical Unidentifiable Gram-negative Bacilli from Human Sources. *J Bacteriol*. 1948 Oct;56(4):379–85.
- [4] Brisou J, Prevot AR. [Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group]. *Ann Inst Pasteur*. 1954 Jun;86(6):722–8.
- [5] Henriksen SD. *Moraxella*, *Acinetobacter*, and the *Mimeae*. *Bacteriol Rev*. 1973 Dec;37(4):522–61.
- [6] Piechaud, d., m. piechaud, and l. second. 1951. Etude de 26 souches de *Moraxella iwoffi*. *Ann. Inst. Pasteur* 80:97-99.
- [7] Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY. A Study of the *Moraxella* Group II. Oxidative-negative Species (Genus *Acinetobacter*)1. *J Bacteriol*. 1968 May;95(5):1520–41.
- [8] Lessel EF. Minutes of the Subcommittee on the Taxonomy of *Moraxella* and Allied Bacteria., *Int J Syst Bacteriol*, 1971, 21: 213-214.
- [9] Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev*. 1996 Apr;9(2):148–65.
- [10] Juni E. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, The Williams Wilkins Co Baltimore 1984;vol1:p.303-307.
- [11] ROSSAU R, Van Landschoot A, Gillis M, Ley J. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a New Bacterial Family To Accommodate the Genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and Related Organisms. *Int J Syst Bacteriol*. 1991 Apr 1;41.
- [12] Rainey FA, Lang E, Stackebrandt E. The phylogenetic structure of the genus *Acinetobacter*. *FEMS Microbiol Lett*. 1994 Dec 15;124(3):349–53.
- [13] Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics | Microbiology Society [Internet]. [cited 2020 Jan 22]. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-37-4-463>
- [14] Johnson JL, Anderson RS, Ordal EJ. Nucleic acid homologies among oxidase-negative *Moraxella* species. *J Bacteriol*. 1970 Feb;101(2):568–73.
- [15] Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA, editors. *Approved Lists of Bacterial Names (Amended)* [Internet]. Washington (DC): ASM Press; 1989 [cited 2020 Jan 22]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK814/>
- [16] Tjernberg I, Ursing J. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 1989 Jul;97(7):595–605.

- [17] Dijkshoorn L, Van Harsselaar B, Tjernberg I, Bouvet PJ, Vaneechoutte M. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter* genomic species. *Syst Appl Microbiol*. 1998 Mar;21(1):33–9.
- [18] Dolzani L, Tonin E, Lagatolla C, Prandin L, Monti-Bragadin C. Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic-spacer sequences. *J Clin Microbiol*. 1995 May;33(5):1108–13.
- [19] García-Arata MI, Gerner-Smidt P, Baquero F, Ibrahim A. PCR-amplified 16S and 23S rDNA restriction analysis for the identification of *Acinetobacter* strains at the DNA group level. *Res Microbiol*. 1997 Dec;148(9):777–84.
- [20] Nowac A, Kur J. Differentiation of seventeen genospieces of *Acinetobacter* by multiplex polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Mol Cell Probes* 1996; 10: 405-411.
- [21] Koeleman JG, Stoof J, Biesmans DJ, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM. Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis, random amplified polymorphic DNA analysis, and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of *Acinetobacter* genomic species and typing of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 1998 Sep;36(9):2522–9.
- [22] Gerner-Smidt P, Tjernberg I, Ursing J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol*. 1991 Feb;29(2):277–82.
- [23] Diancourt L, Passet V, Nemeč A, Dijkshoorn L, Brisse S. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PloS One*. 2010 Apr 7;5(4):e10034.
- [24] Bouvet PJ, Grimont PA. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann Inst Pasteur Microbiol*. 1987 Oct;138(5):569–78.
- [25] Seifert H, Baginski R, Schulze A, Pulverer G. The distribution of *Acinetobacter* species in clinical culture materials. *Zentralblatt Bakteriologie Int J Med Microbiol*. 1993 Nov;279(4):544–52.
- [26] Wareham DW, Bean DC, Khanna P, Hennessy EM, Krahe D, Ely A, et al. Bloodstream infection due to *Acinetobacter* spp: epidemiology, risk factors and impact of multi-drug resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 2008 Jul;27(7):607–12.
- [27] Nemeč A, Musílek M, Sedo O, De Baere T, Maixnerová M, van der Reijden TJK, et al. *Acinetobacter bereziniae* sp. nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. nov., to accommodate *Acinetobacter* genomic species 10 and 11, respectively. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010 Apr;60(Pt 4):896–903.

- [28] Nemeč A, Krizova L, Maixnerova M, van der Reijden TJK, Deschaght P, Passet V, et al. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Res Microbiol.* 2011 May;162(4):393–404.
- [29] Krizova L, Maixnerova M, Sedo O, Nemeč A. *Acinetobacter albensis* sp. nov., isolated from natural soil and water ecosystems. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015 Nov;65(11):3905–12.
- [30] Kim PS, Shin N-R, Kim JY, Yun J-H, Hyun D-W, Bae J-W. *Acinetobacter apis* sp. nov., isolated from the intestinal tract of a honey bee, *Apis mellifera*. *J Microbiol Seoul Korea.* 2014 Aug;52(8):639–45.
- [31] Bouvet PJM, Grimont PAD. Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1986;36(2):228–40.
- [32] Carr EL, Kämpfer P, Patel BKC, Gürtler V, Seviour RJ. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003 Jul;53(Pt 4):953–63.
- [33] Nemeč A, Musílek M, Maixnerová M, De Baere T, van der Reijden TJK, Vaneechoutte M, et al. *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009 Jan;59(Pt 1):118–24.
- [34] Krizova L, Maixnerova M, Sedo O, Nemeč A. *Acinetobacter bohemicus* sp. nov. widespread in natural soil and water ecosystems in the Czech Republic. *Syst Appl Microbiol.* 2014 Oct;37(7):467–73.
- [35] Álvarez-Pérez S, Lievens B, Jacquemyn H, Herrera CM. *Acinetobacter nectaris* sp. nov. and *Acinetobacter boissieri* sp. nov., isolated from floral nectar of wild Mediterranean insect-pollinated plants. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013 Apr;63(Pt 4):1532–9.
- [36] Anandham R, Weon H-Y, Kim S-J, Kim Y-S, Kim B-Y, Kwon S-W. *Acinetobacter brisouii* sp. nov., isolated from a wetland in Korea. *J Microbiol Seoul Korea.* 2010 Feb;48(1):36–9.
- [37] Radolfova-Krizova L, Maixnerova M, Nemeč A. *Acinetobacter celticus* sp. nov., a psychrotolerant species widespread in natural soil and water ecosystems. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016;66(12):5392–8.
- [38] Nemeč A, Radolfova-Krizova L, Maixnerova M, Vrestiakova E, Jezek P, Sedo O. Taxonomy of haemolytic and/or proteolytic strains of the genus *Acinetobacter* with the proposal of *Acinetobacter courvalinii* sp. nov. (genomic species 14 sensu Bouvet & Jeanjean), *Acinetobacter dispersus* sp. nov. (genomic species 17), *Acinetobacter modestus* sp. nov., *Acinetobacter*

- proteolyticus sp. nov. and *Acinetobacter vivianii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016 Apr;66(4):1673–85.
- [39] Bouvet PJ, Jeanjean S. Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. *Res Microbiol.* 1989 Jun;140(4–5):291–9.
- [40] Cosgaya C, Mari-Almirall M, Van Assche A, Fernández-Orth D, Mosqueda N, Telli M, et al. *Acinetobacter dijkshoorniae* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016 Oct;66(10):4105–11.
- [41] Poppel MT, Skiebe E, Laue M, Bergmann H, Ebersberger I, Garn T, et al. *Acinetobacter equi* sp. nov., isolated from horse faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016 Feb;66(2):881–8.
- [42] Al Atrouni A, Joly-Guillou M-L, Hamze M, Kempf M. Reservoirs of Non-baumannii *Acinetobacter* Species. *Front Microbiol.* 2016;7:49.
- [43] Vaneechoutte M, De Baere T, Nemeč A, Musílek M, van der Reijden TJK, Dijkshoorn L. Reclassification of *Acinetobacter grimontii* Carr et al. 2003 as a later synonym of *Acinetobacter junii* Bouvet and Grimont 1986. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008 Apr;58(Pt 4):937–40.
- [44] Nemeč A, Radolfova-Krizova L. *Acinetobacter guangdongensis* Feng et al. 2014 is a junior heterotypic synonym of *Acinetobacter indicus* Malhotra et al. 2012. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017;67(10):4080–2.
- [45] Li W, Zhang D, Huang X, Qin W. *Acinetobacter harbinensis* sp. nov., isolated from river water. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014 May;64(Pt 5):1507–13.
- [46] Malhotra J, Anand S, Jindal S, Rajagopal R, Lal R. *Acinetobacter indicus* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2012 Dec;62(Pt 12):2883–90.
- [47] Rooney AP, Dunlap CA, Flor-Weiler LB. *Acinetobacter lactucae* sp. nov., isolated from iceberg lettuce (*Asteraceae*: *Lactuca sativa*). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016 Sep;66(9):3566–72.
- [48] Touchon M, Cury J, Yoon E-J, Krizova L, Cerqueira GC, Murphy C, et al. The genomic diversification of the whole *Acinetobacter* genus: origins, mechanisms, and consequences. *Genome Biol Evol.* 2014 Oct 13;6(10):2866–82.
- [49] Li Y, Chang J, Guo L, Wang H, Xie S, Piao C, et al. Description of *Acinetobacter populi* sp. nov. isolated from symptomatic bark of *Populus x euramericana* canker. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015;65(12):4461–8.
- [50] Nemeč A, Dijkshoorn L, Cleenwerck I, De Baere T, Janssens D, Van Der Reijden TJK, et al. *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003 Sep;53(Pt 5):1563–7.

- [51] Nemec A, De Baere T, Tjernberg I, Vaneechoutte M, van der Reijden TJ, Dijkshoorn L. *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001 Sep;51(Pt 5):1891–9.
- [52] Kim D, Baik KS, Kim MS, Park SC, Kim SS, Rhee MS, et al. *Acinetobacter soli* sp. nov., isolated from forest soil. *J Microbiol Seoul Korea*. 2008 Aug;46(4):396–401.
- [53] Vaneechoutte M, Nemec A, Musilek M, van der Reijden TJK, van den Barselaar M, Tjernberg I, et al. Description of *Acinetobacter venetianus* ex Di Cello et al. 1997 sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2009 Jun;59(Pt 6):1376–81.
- [54] Di Cello F, Pepi M, Baldi F, Fani R. Molecular characterization of an n-alkane-degrading bacterial community and identification of a new species, *Acinetobacter venetianus*. *Res Microbiol*. 1997 Apr;148(3):237–49.
- [55] Μανιάτης Α. Ψευδομονάδες – Αερομονάδες – Πλεσιομονάδες - *Acinetobacter*. Στο βιβλίο: *Ιατρική Μικροβιολογία των Αντωνιάδης Α, Αντωνιάδης Γρ, Λεγάκης ΝΙ, Τσελέντης Ι*. Εκδόσεις Πασχαλίδης ΠΧ, Αθήνα 1999, σελ. 121-129.
- [56] Αρσένη-Εμμανουηλίδου Α. *Neisseriaceae* II. Στο βιβλίο: *Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή διάγνωση λοιμώξεων*. Ζήτα Ιατρικές Εκδόσεις, 1994, σελ. 216-232.
- [57] Hugh R. Classical methods for isolation and identification of glucose nonfermenting Gram-negative rods, In Gilardi GL (ed), *Glucose nonfermenting gram-negative bacteria in clinical microbiology*. CRC Press, Inc Boca Raton Fla. 1978; p. 2.
- [58] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Jul;21(3):538–82.
- [59] Pagel JE, Seyfried PL. Numerical taxonomy of aquatic *Acinetobacter* isolates. *J Gen Microbiol*. 1976 Aug;96(2):220–32.
- [60] Mandel AD, Wright K, McKinnon jm. selective medium for isolation of mima and herellea organisms. *J Bacteriol*. 1964 Nov;88(5):1524–5.
- [61] Jawad A, Hawkey PM, Heritage J, Snelling AM. Description of Leeds *Acinetobacter* Medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp., and comparison with *Herellea* agar and Holton’s agar. *J Clin Microbiol*. 1994 Oct;32(10):2353–8.
- [62] Espinal P, Seifert H, Dijkshoorn L, Vila J, Roca I. Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group by MALDI-TOF MS. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Nov;18(11):1097–103.
- [63] Pailhoriès H, Daure S, Eveillard M, Joly-Guillou M-L, Kempf M. Using Vitek MALDI-TOF mass spectrometry to identify species belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus*-

- Acinetobacter baumannii complex: a relevant alternative to molecular biology? *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015 Oct;83(2):99–104.
- [64] Alvarez-Buylla A, Culebras E, Picazo JJ. Identification of Acinetobacter species: is Bruker biotyper MALDI-TOF mass spectrometry a good alternative to molecular techniques? *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* 2012 Mar;12(2):345–9.
- [65] Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I, Elaichouni A, de Vos P, Claeys G, et al. Identification of Acinetobacter genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J Clin Microbiol.* 1995 Jan;33(1):11–5.
- [66] Janssen P, Maquelin K, Coopman R, Tjernberg I, Bouvet P, Kersters K, et al. Discrimination of Acinetobacter genomic species by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Bacteriol.* 1997 Oct;47(4):1179–87.
- [67] Gerner-Smidt P. Ribotyping of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex. *J Clin Microbiol.* 1992 Oct;30(10):2680–5.
- [68] Ehrenstein B, Bernards AT, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Towner KJ, Bouvet PJ, et al. Acinetobacter species identification by using tRNA spacer fingerprinting. *J Clin Microbiol.* 1996 Oct;34(10):2414–20.
- [69] Dolzani, L., E. Tonin, C. Lagatolla, L. Prandin, and C. Monti-Bragadin. 1995. Identification of Acinetobacter isolates in the A. calcoaceticus-A. baumannii complex by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic-spacer sequences. *J. Clin. Microbiol.* 33:1108-1113.
- [70] Chang HC, Wei YF, Dijkshoorn L, Vaneechoutte M, Tang CT, Chang TC. Species-Level Identification of Isolates of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii Complex by Sequence Analysis of the 16S-23S rRNA Gene Spacer Region. *J Clin Microbiol.* 2005 Apr;43(4):1632–9.
- [71] Chu YW, Leung CM, Houang ET, Ng KC, Leung CB, Leung HY, et al. Skin carriage of acinetobacters in Hong Kong. *J Clin Microbiol.* 1999 Sep;37(9):2962–7.
- [72] Vaneechoutte M, Young DM, Ornston LN, De Baere T, Nemec A, Van Der Reijden T, et al. Naturally Transformable Acinetobacter sp. Strain ADP1 Belongs to the Newly Described Species Acinetobacter baylyi. *Appl Environ Microbiol.* 2006 Jan;72(1):932–6.
- [73] Krawczyk B, Lewandowski K, Kur J. Comparative studies of the Acinetobacter genus and the species identification method based on the recA sequences. *Mol Cell Probes.* 2002 Feb;16(1):1–11.
- [74] Yamamoto S, Bouvet PJ, Harayama S. Phylogenetic structures of the genus Acinetobacter based on gyrB sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization. *Int J Syst Bacteriol.* 1999 Jan;49 Pt 1:87–95.

- [75] La Scola B, Gundi VA, Khamis A, Raoult D. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol*. 2006;44(3):827–32.
- [76] Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *blaOXA-51*-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):2974–6.
- [77] Higgins PG, Wisplinghoff H, Krut O, Seifert H. A PCR-based method to differentiate between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2007 Dec;13(12):1199–201.
- [78] *gyrB* multiplex PCR to differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* genomic species 3. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2020 Jan 23]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20881170>
- [79] Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;41(1):11–9.
- [80] Bou G, Cerveró G, Domínguez MA, Quereda C, Martínez-Beltrán J. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem- and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2000 Dec;6(12):635–43.
- [81] Gouby A, Carles-Nurit MJ, Bouziges N, Bourg G, Mesnard R, Bouvet PJ. Use of pulsed-field gel electrophoresis for investigation of hospital outbreaks of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 1992 Jun;30(6):1588–91.
- [82] Allardet-Servent, A., N. Bouzigues, M. J. Charles-Nurit, G. Bourg, A. Gouby, and M. Ramuz. 1989. Use of low-frequency-cleavage restriction endonucleases for DNA analysis in epidemiological investigations of nosocomial bacterial infections. *J. Clin. Microbiol*. 27:2057-2061.
- [83] Seifert H, Dolzani L, Bressan R, van der Reijden T, van Strijen B, Stefanik D, et al. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 2005 Sep;43(9):4328–35.
- [84] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995 Sep;33(9):2233–9.
- [85] McCartney AL. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *Br J Nutr*. 2002 Sep;88 Suppl 1:S29-37.
- [86] Turton JF, Gabriel SN, Valderrey C, Kaufmann ME, Pitt TL. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2007 Aug;13(8):807–15.

- [87] Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Luzon MA, Wisplinghoff H, Rodríguez-Valera F. Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for Characterization of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 2005;43(9):4382–90
- [88] Wisplinghoff H, Hippler C, Bartual SG, Haefs C, Stefanik D, Higgins PG, et al. Molecular epidemiology of clinical *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU isolates using a multilocus sequencing typing scheme. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2008 Jul;14(7):708–15.
- [89] Adams-Haduch JM, Onuoha EO, Bogdanovich T, Tian G-B, Marschall J, Urban CM, et al. Molecular epidemiology of carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in the United States. *J Clin Microbiol*. 2011 Nov;49(11):3849–54.
- [90] Grosso F, Carvalho KR, Quinteira S, Ramos A, Carvalho-Assef APD, Asensi MD, et al. OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii*: a new hotspot of diversity in Rio de Janeiro? *J Antimicrob Chemother*. 2011 Jan;66(1):62–5.
- [91] Karah N, Haldorsen B, Hermansen NO, Tveten Y, Ragnhildstveit E, Skutlaberg DH, et al. Emergence of OXA-carbapenemase- and 16S rRNA methylase-producing international clones of *Acinetobacter baumannii* in Norway. *J Med Microbiol*. 2011 Apr;60(Pt 4):515–21.
- [92] Hamouda A, Evans BA, Towner KJ, Amyes SGB. Characterization of Epidemiologically Unrelated *Acinetobacter baumannii* Isolates from Four Continents by Use of Multilocus Sequence Typing, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and Sequence-Based Typing of blaOXA-51-like Genes. *J Clin Microbiol*. 2010 Jul;48(7):2476–83.
- [93] Tomaschek F, Higgins PG, Stefanik D, Wisplinghoff H, Seifert H. Head-to-Head Comparison of Two Multi-Locus Sequence Typing (MLST) Schemes for Characterization of *Acinetobacter baumannii* Outbreak and Sporadic Isolates. *PloS One*. 2016;11(4):e0153014.
- [94] Κατραμαδου Μ. Λοιμώξεις από *Acinetobacter* spp. Εφαρμοσμένη Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διαγνωστική 2010, 15:148-158.
- [95] Getchell-White SI, Donowitz LG, Gröschel DH. The inanimate environment of an intensive care unit as a potential source of nosocomial bacteria: evidence for long survival of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1989 Sep;10(9):402–7.
- [96] Houang ETS, Chu YW, Leung CM, Chu KY, Berlau J, Ng KC, et al. Epidemiology and Infection Control Implications of *Acinetobacter* spp. in Hong Kong. *J Clin Microbiol*. 2001 Jan;39(1):228–34.
- [97] Seifert H, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Pelzer N, Tjernberg I, Vaneechoutte M. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J Clin Microbiol*. 1997 Nov;35(11):2819–25.

- [98] Corbella X, Pujol M, Ayats J, Sendra M, Ardanuy C, Domínguez MA, et al. Relevance of digestive tract colonization in the epidemiology of nosocomial infections due to multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1996 Aug;23(2):329–34.
- [99] Rosenthal SL. Sources of pseudomonas and acinetobacter species found in human culture materials. *Am J Clin Pathol*. 1974 Dec;62(6):807–11.
- [100] Cunha BA, Klimek JJ, Gracewski J, McLaughlin JC, Quintiliani R. A common source outbreak of *Acinetobacter* pulmonary infections traced to Wright respirometers. *Postgrad Med J*. 1980 Mar;56(653):169–72.
- [101] Sherertz RJ, Sullivan ML. An outbreak of infections with *Acinetobacter calcoaceticus* in burn patients: contamination of patients' mattresses. *J Infect Dis*. 1985 Feb;151(2):252–8.
- [102] Weernink A, Severin WPJ, Tjernberg I, Dijkshoorn L. Pillows, an unexpected source of *Acinetobacter*. *J Hosp Infect*. 1995 Mar 1;29(3):189–99.
- [103] Allen KD, Green HT. Hospital outbreak of multi-resistant *Acinetobacter anitratus*: an airborne mode of spread? *J Hosp Infect*. 1987 Mar;9(2):110–9.
- [104] Pournaras S, Markogiannakis A, Ikonomidis A, Kondyli L, Bethimouti K, Maniatis AN, et al. Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Mar;57(3):557–61.
- [105] Levidiotou S, Galanakis E, Vrioni G, Papamichael D, Nakos G, Stefanou D. A multi-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in a general intensive care unit. *In Vivo* 2002;16:117-122.
- [106] Villegas MV, Hartstein AI. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003 Apr;24(4):284–95.
- [107] Pines O, Gutnick D. Alternate hydrophobic sites on the cell surface of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. *FEMS Microbiol Lett*. 1984 May 1;22(3):307–11.
- [108] Rosenberg E, Kaplan N, Pines O, Rosenberg M, Gutnick D. Capsular polysaccharides interfere with adherence of *Acinetobacter calcoaceticus* to hydrocarbon. *FEMS Microbiol Lett*. 1983 Mar 1;17(1–3):157–60.
- [109] Antunes LCS, Imperi F, Towner KJ, Visca P. Genome-assisted identification of putative iron-utilization genes in *Acinetobacter baumannii* and their distribution among a genotypically diverse collection of clinical isolates. *Res Microbiol*. 2011 Apr;162(3):279–84.
- [110] Vidal R, Dominguez M, Urrutia H, Bello H, Gonzalez G, Garcia A, et al. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii*. *Microbios*. 1996;86(346):49–58.

- [111] Roca I, Espinal P, Vila-Farrés X, Vila J. The *Acinetobacter baumannii* Oxymoron: Commensal Hospital Dweller Turned Pan-Drug-Resistant Menace. *Front Microbiol.* 2012;3:148.
- [112] Cisneros JM, Rodríguez-Baño J. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2002 Nov;8(11):687–93.
- [113] Trottier V, Segura PG, Namias N, King D, Pizano LR, Schulman CI. Outcomes of *Acinetobacter baumannii* infection in critically ill burned patients. *J Burn Care Res Off Publ Am Burn Assoc.* 2007 Apr;28(2):248–54.
- [114] Pedraza F, Andreu A, Saune M, Moreno A, Ramirez L, Garcia L. [A urinary outbreak of *Acinetobacter baumannii* in a spinal cord injury unit.] *Ann Med Interne (Punk)* 1993; 10: 55-58.
- [115] Olut AI, Erkek E. Early prosthetic valve endocarditis due to *Acinetobacter baumannii*: a case report and brief review of the literature. *Scand J Infect Dis.* 2005;37(11–12):919–21.
- [116] Montero A, Ariza J, Corbella X, Doménech A, Cabellos C, Ayats J, et al. Antibiotic combinations for serious infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a mouse pneumonia model. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Dec;54(6):1085–91.
- [117] Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents.* 2005 Jan;25(1):11–25.
- [118] Hawley JS, Murray CK, Jorgensen JH. Colistin Heteroresistance in *Acinetobacter* and Its Association with Previous Colistin Therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Jan;52(1):351–2.
- [119] Ferrara AM. Potentially multidrug-resistant non-fermentative Gram-negative pathogens causing nosocomial pneumonia. *Int J Antimicrob Agents.* 2006 Mar;27(3):183–95.
- [120] Rahal JJ. Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2006 Sep 1;43 Suppl 2:S95-99.
- [121] Petrosillo N, Ioannidou E, Falagas ME. Colistin monotherapy vs. combination therapy: evidence from microbiological, animal and clinical studies. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2008 Sep;14(9):816–27.
- [122] Falagas ME, Makris GC, Dimopoulos G, Matthaiou DK. Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance? *Clin Microbiol Infect.* 2008 Feb 1;14(2):101–4.
- [123] Pournaras S, Ikonomidis A, Markogiannakis A, Maniatis AN, Tsakris A. Heteroresistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 55(6), 1055–1056 (2005).
- [124] Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Oct;51(10):3471–84.

- [125] Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2006 Sep;12(9):826–36.
- [126] Mahillon J, Chandler M. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 1998 Sep;62(3):725–74.
- [127] Sherratt, D. (1989) Tn3 and related transposable elements: site-specific recombination and transposition, in *Mobile DNA II* (Berg, D. and Howe, M., eds.), ASM Press, Washington, DC, pp. 163-184.
- [128] Corvec S, Poirel L, Naas T, Drugeon H, Nordmann P. Genetics and Expression of the Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase Gene blaOXA-23 in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Apr;51(4):1530–3.
- [129] Poirel L, Nordmann P. Genetic Structures at the Origin of Acquisition and Expression of the Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase Gene blaOXA-58 in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Apr;50(4):1442–8.
- [130] Reznikoff WS, Bordenstein SR, Apodaca J. Comparative sequence analysis of IS50/Tn5 transposase. *J Bacteriol*. 2004 Dec;186(24):8240–7.
- [131] Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol*. 2006 Aug;4(8):608–20.
- [132] Hall RM. Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in gram-negative bacteria. *Ciba Found Symp*. 1997;207:192–202; discussion 202-205.
- [133] Integrons: Past, Present, and Future [Internet]. [cited 2020 Jan 23]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4054258/>
- [134] Hall RM, Collis CM. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol*. 1995 Feb;15(4):593–600.
- [135] Partridge SR, Recchia GD, Scaramuzzi C, Collis CM, Stokes HW, Hall RM. Definition of the attI1 site of class 1 integrons. *Microbiol Read Engl*. 2000 Nov;146 (Pt 11):2855–64.
- [136] Paulsen IT, Littlejohn TG, Rådström P, Sundström L, Sköld O, Swedberg G, et al. The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993 Apr;37(4):761–8.
- [137] Preston KE, Graffunder EM, Evans AM, Venezia RA. Survey of plasmid-associated genetic markers in enterobacteriaceae with reduced susceptibilities to cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Jul;47(7):2179–85.

- [138] Hall RM, Brookes DE, Stokes HW. Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. *Mol Microbiol.* 1991 Aug;5(8):1941–59.
- [139] Mazel D, Davies J. Antibiotic resistance in microbes. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 1999 Nov 30;56(9–10):742–54.
- [140] Laraki N, Galleni M, Thamm I, Riccio ML, Amicosante G, Frère JM, et al. Structure of In31, a blaIMP-containing *Pseudomonas aeruginosa* integron phyletically related to In5, which carries an unusual array of gene cassettes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Apr;43(4):890–901.
- [141] Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Jul;43(7):1584–90.
- [142] Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Mar;44(3):622–32.
- [143] Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R, et al. Characterization of the Metallo- β -Lactamase Determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 Reveals the Existence of blaIMP Allelic Variants Carried by Gene Cassettes of Different Phylogeny. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 May;44(5):1229–35.
- [144] Collis CM, Hall RM. Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Mol Microbiol.* 1992 Oct;6(19):2875–85.
- [145] Collis CM, Hall RM. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Jan;39(1):155–62.
- [146] Lévesque C, Brassard S, Lapointe J, Roy PH. Diversity and relative strength of tandem promoters for the antibiotic-resistance genes of several integrons. *Gene.* 1994 May 3;142(1):49–54.
- [147] Barker A, Clark CA, Manning PA. Identification of VCR, a repeated sequence associated with a locus encoding a hemagglutinin in *Vibrio cholerae* O1. *J Bacteriol.* 1994 Sep;176(17):5450–8.
- [148] Nield BS, Holmes AJ, Gillings MR, Recchia GD, Mabbutt BC, Nevalainen KM, et al. Recovery of new integron classes from environmental DNA. *FEMS Microbiol Lett.* 2001 Feb 5;195(1):59–65.
- [149] Rowe-Magnus DA, Guerout A-M, Ploncard P, Dychinco B, Davies J, Mazel D. The evolutionary history of chromosomal super-integrons provides an ancestry for multiresistant integrons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jan 16;98(2):652–7.

- [150] Vaisvila R, Morgan RD, Posfai J, Raleigh EA. Discovery and distribution of super-integrans among pseudomonads. *Mol Microbiol*. 2001 Nov;42(3):587–601.
- [151] Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dodson RJ, et al. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature*. 2000 Aug 3;406(6795):477–83.
- [152] Hayes F. Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science*. 2003 Sep 12;301(5639):1496–9.
- [153] Stanisich, V. A. (1988) Identification and analysis of plasmids at the genetic level. In: Grinsted, J., Bennett, P. M., (eds). *Methods in Microbiology*, Vol. 21, Plasmid Technology 2nd edn. Academic Press: London, pp 11-47. In.
- [154] Waters VL. Conjugative transfer in the dissemination of beta-lactam and aminoglycoside resistance. *Front Biosci J Virtual Libr*. 1999 May 1;4:D433-456.
- [155] Francia MV, Varsaki A, Garcillán-Barcia MP, Latorre A, Drainas C, de la Cruz F. A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev*. 2004 Feb;28(1):79–100.
- [156] Datta N, Hedges RW. Compatibility groups among fi^- R factors. *Nature*. 1971 Nov 26;234(5326):222–3.
- [157] Hedges RW, Datta N. fi^- R Factors giving Chloramphenicol Resistance. *Nature*. 1971 Nov;234(5326):220–1.
- [158] Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods*. 2005 Dec;63(3):219–28.
- [159] Bou G., Cervero G, Dominguez MA, Quereda C, Martinez- Beltran J. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases. *J. Clin. Microbiol*. 2000, 38: 3299–3305.
- [160] Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Mar;51(3):565–74.
- [161] Quale J, Bratu S, Landman D, Heddurshetti R. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2003 Jul 15;37(2):214–20.
- [162] Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980 May 16;289(1036):321–31.

- [163] Jaurin B, Grundström T. ampC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Aug;78(8):4897–901.
- [164] Ouellette M, Bissonnette L, Roy PH. Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Nov;84(21):7378–82.
- [165] Hall BG, Barlow M. Revised Ambler classification of {beta}-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Jun;55(6):1050–1.
- [166] Bush K. Classification of beta-lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b'. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989 Mar;33(3):264–70.
- [167] Bush K. Classification of beta-lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989 Mar;33(3):271–6.
- [168] Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Mar;43(3):573–81.
- [169] Carbonne A, Naas T, Blanckaert K, Couzigou C, Cattoen C, Chagnon J-L, et al. Investigation of a nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a hospital setting. *J Hosp Infect*. 2005 May;60(1):14–8.
- [170] Naas T, Bogaerts P, Bauraing C, Degheldre Y, Glupczynski Y, Nordmann P. Emergence of PER and VEB extended-spectrum beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Jul;58(1):178–82.
- [171] Naas T., Coignard B, Carbonne A, Blanckaert K, Bajolet O, Bernet C, Verdeil X, Astagneau P, Desenclos J, Nordmann P. VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase producing *Acinetobacter baumannii* France. *Emerg. Infect. Dis*. 2006, 12: 1214–1222.
- [172] Pasterán F, Rapoport M, Petroni A, Faccone D, Corso A, Galas M, et al. Emergence of PER-2 and VEB-1a in *Acinetobacter baumannii* Strains in the Americas. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Sep;50(9):3222–4.
- [173] Poirel L., Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P. Outbreak of extendedspectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J. Clin. Microbiol*. 2003, 41: 3542–3547.
- [174] Hujer KM., Hujer AM, Hulten EA , Bajaksouzian S, Adams JM , Donskey CJ, Ecker DJ, Massire C, Eshoo MW, Sampath R, Thomson JM, Rather PM, Craft DW, Fishbain JT, Ewell AJ, Jacobs MR, Paterson DL, Bonomo RA. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-

- resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, 50: 4114–4123. In.
- [175] Naas T, Nordmann P, Heidt A. Intercountry transfer of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* from Romania. *Int J Antimicrob Agents.* 2007 Feb;29(2):226–8.
- [176] Poirel L, Karim A, Mercat A, Le Thomas I, Vahaboglu H, Richard C, et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing strain of *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient in France. *J Antimicrob Chemother.* 1999 Jan;43(1):157–8.
- [177] Vahaboglu H, Oztürk R, Aygün G, Coşkun F, Yaman A, Kaygusuz A, et al. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997 Oct;41(10):2265–9.
- [178] Yong D., Shin J.H., Kim S, Lim Y, Yum YH, Lee K, Chong Y, Bauernfeind A. High prevalence of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase producing *Acinetobacter* spp. in Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, 47:1749–175.
- [179] Chu YW, Afzal-Shah M, Houang ET, Palepou MI, Lyon DJ, Woodford N, et al. IMP-4, a novel metallo-beta-lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Mar;45(3):710–4.
- [180] Vahaboglu H, Coskun F, Tansel O, Ozturk R, Sahin N, Koksali I, et al. Clinical importance of extended-spectrum beta-lactamase (PER-1-type)-producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Med Microbiol.* 2001 Jul;50(7):642–5.
- [181] Cornaglia G., Riccio ML, Mazzariol A, Lauretti L, Fontana R, Rossolini GM. Appearance of IMP-1 metallo-beta-lactamase in Europe. *Lancet*, 1999, 353: 899–900.
- [182] Da Silva GJ, Correia M, Vital C, Ribeiro G, Sousa JC, Leitão R, et al. Molecular characterization of bla(IMP-5), a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiol Lett.* 2002 Sep 24;215(1):33–9.
- [183] Gales AC, Tognim MCB, Reis AO, Jones RN, Sader HS. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003 Jan;45(1):77–9.
- [184] Houang ETS, Chu Y-W, Lo W-S, Chu K-Y, Cheng AFB. Epidemiology of rifampin ADP-ribosyltransferase (arr-2) and metallo-beta-lactamase (blaIMP-4) gene cassettes in class 1 integrons in *Acinetobacter* strains isolated from blood cultures in 1997 to 2000. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Apr;47(4):1382–90.

- [185]. Tsakris A, Ikonomidis A, Pournaras S, Tzouvelekis LS, Sofianou D, Legakis NJ, et al. VIM-1 Metallo- β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis*. 2006 Jun;12(6):981–3.
- [186] Lee K, Lee WG, Uh Y, Ha GY, Cho J, Chong Y. VIM- and IMP-Type Metallo- β -lactamase-Producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean Hospitals. *Emerg Infect Dis*. 2003 Jul;9(7):868–71.
- [187] Lim YM., Shin KS, Kim J. Distinct antimicrobial resistance patterns and antimicrobial resistance-harboring genes according to genomic species of *Acinetobacter* isolates. *J. Clin. Microbiol*, 2007, 45: 902–905.
- [188] Wroblewska MM., Towner KJ, Marchel H, Luczak M. Emergence and spread of carbapenem-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* in a tertiary-care hospital in Poland. *Clin. Microbiol. Infect*. 2007, 13:490–496.
- [189] Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier J-D, et al. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Nov;49(11):4485–91.
- [190] Karthikeyan K, Thirunarayan MA, Krishnan P. Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and armA in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *J Antimicrob Chemother*. 2010 Oct;65(10):2253–4.
- [191] Voulgari E, Politi L, Pitiriga V, Dendrinou J, Poulou A, Georgiadis G, et al. First report of an NDM-1 metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate in Greece. *Int J Antimicrob Agents*. 2016 Dec;48(6):761–2.
- [192] Walsh TR., Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallobeta -lactamases: the quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev*. 2005, 18: 306– 325. In.
- [193] Paton R., Miles RS, Hood J, Amyes SG. ARI-1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 1993, 2: 81–88.
- [194] Scaife W, Young HK, Paton RH, Amyes SG. Transferable imipenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. *J Antimicrob Chemother*. 1995 Sep;36(3):585–6.
- [195] Koh TH, Sng L-H, Wang GCY, Hsu L-Y, Zhao Y. IMP-4 and OXA beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Apr;59(4):627–32.
- [196] Boo TW, Walsh F, Crowley B. First report of OXA-23 carbapenemase in clinical isolates of *Acinetobacter* species in the Irish Republic. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Nov;58(5):1101–2.
- [197] Zhou H, Pi B-R, Yang Q, Yu Y-S, Chen Y-G, Li L-J, et al. Dissemination of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains carrying the ISAbal blaOXA-23 genes in a Chinese hospital. *J Med Microbiol*. 2007 Aug;56(Pt 8):1076–80.

- [198] Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Feb;45(2):583–8.
- [199] Brown S, Amyes S. OXA (beta)-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Jan;57(1):1–3.
- [200] Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Jan;54(1):24–38.
- [201] Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis*. 2010 Jan;16(1):35–40.
- [202] Bertini A, Giordano A, Varesi P, Villa L, Mancini C, Carattoli A. First Report of the Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter baumannii* Isolates in Italy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Jun;50(6):2268–9.
- [203] Bogaerts P, Naas T, Wybo I, Bauraing C, Soetens O, Pierard D, Nordmann P, Glupczynski Y. Outbreak of infection by carbapenem -resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-58 in Belgium. *J. Clin. Microbiol*. 2006, 44:4189–4192.
- [204] Poirel L, Marque S, Heritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. OXA-58, a novel class D -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2005, 49: 202–208.
- [205] Coelho J, Woodford N, Afzal-Shah M, Livermore D. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Feb;50(2):756–8.
- [206] Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, et al. The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett*. 2006 May;258(1):72–7.
- [207] Héritier C, Poirel L, Fournier P-E, Claverie J-M, Raoult D, Nordmann P. Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Oct;49(10):4174–9.
- [208] Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Jul;20(3):440–58, table of contents.
- [209] Poirel L, Lebessi E, Heritier C, Patsoura A, Foustoukou M, Nordmann P. Nosocomial spread of OXA-58-positive carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a paediatric hospital in Greece. *Clin. Microbiol. Infect*. 2006, 12:1138–1141.

- [210] Costa SF, Woodcock J, Gill M, Wise R, Barone AA, Caiaffa H, et al. Outer-membrane proteins pattern and detection of beta-lactamases in clinical isolates of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Brazil. *Int J Antimicrob Agents*. 2000 Jan;13(3):175–82.
- [211] Segal H, Garny S, Elisha BG. Is IS(ABA-1) customized for *Acinetobacter*? *FEMS Microbiol Lett*. 2005 Feb 15;243(2):425–9.
- [212] Perilli M, Felici A, Oratore A, Cornaglia G, Bonfiglio G, Rossolini GM, et al. Characterization of the chromosomal cephalosporinases produced by *Acinetobacter lwoffii* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 Mar;40(3):715–9.
- [213] Hujer KM, Hamza NS, Hujer AM, Perez F, Helfand MS, Bethel CR, et al. Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7 beta-lactamase: defining a unique family of class C enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jul;49(7):2941–8.
- [214] Bou G, Martínez-Beltrán J. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Feb;44(2):428–32.
- [215] Ruiz M, Marti S, Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Vila J. Prevalence of IS(Aba1) in epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *FEMS Microbiol Lett*. 2007 Sep;274(1):63–6.
- [216] Corvec S, Caroff N, Espaze E, Giraudeau C, Drugeon H, Reynaud A. AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Oct;52(4):629–35.
- [217] Nitzan Y, Deutsch EB, Pechatnikov I. Diffusion of beta-lactam antibiotics through oligomeric or monomeric porin channels of some gram-negative bacteria. *Curr Microbiol*. 2002 Dec;45(6):446–55.
- [218] Martí S, Sánchez-Céspedes J, Oliveira E, Bellido D, Giralt E, Vila J. Proteomic analysis of a fraction enriched in cell envelope proteins of *Acinetobacter baumannii*. *Proteomics*. 2006 Apr;6 Suppl 1:S82-87.
- [219] Obara M, Nakae T. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Antimicrob Chemother*. 1991 Dec;28(6):791–800.
- [220] Lee, J. et al. Characterization of a stalled complex on the β -barrel assembly machine. *Proc Natl Acad Sci USA* 13, 8717–8722 (2016).
- [221] Fournier P-E, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, et al. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet*. 2006 Jan;2(1):e7.

- [222] H eritier C, Poirel L, Lambert T, Nordmann P. Contribution of Acquired Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinases to Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Aug;49(8):3198–202.
- [223] Higgins PG, Wisplinghoff H, Stefanik D, Seifert H. Selection of topoisomerase mutations and overexpression of *adeB* mRNA transcripts during an outbreak of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2004 Oct;54(4):821–3.
- [224] Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Dec;45(12):3375–80.
- [225] Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, Lambert T. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Sep;48(9):3298–304.
- [226] Neme  A, Maixnerová M, van der Reijden TJK, van den Broek PJ, Dijkshoorn L. Relationship between the AdeABC efflux system gene content, netilmicin susceptibility and multidrug resistance in a genotypically diverse collection of *Acinetobacter baumannii* strains. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Sep;60(3):483–9.
- [227] Gordon E, Mouz N, Du e E, Dideberg O. The crystal structure of the penicillin-binding protein 2x from *Streptococcus pneumoniae* and its acyl-enzyme form: implication in drug resistance. *J Mol Biol*. 2000 Jun 2;299(2):477–85.
- [228] Neme  A, Dolzani L, Brisse S, van den Broek P, Dijkshoorn L. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *J Med Microbiol*. 2004 Dec;53(Pt 12):1233–40.
- [229] Seward RJ, Lambert T, Towner KJ. Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter* spp. *J Med Microbiol*. 1998 May;47(5):455–62.
- [230] Zarrilli R, Crispino M, Bagattini M, Barretta E, Di Popolo A, Triassi M, et al. Molecular epidemiology of sequential outbreaks of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit shows the emergence of carbapenem resistance. *J Clin Microbiol*. 2004 Mar;42(3):946–53.
- [231] Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis*. 2007;45(1):88–9.
- [232] Su X-Z, Chen J, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T. AbeM, an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Oct;49(10):4362–4.

- [233] Hamouda A, Amyes SGB. Novel *gyrA* and *parC* point mutations in two strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Sep;54(3):695–6.
- [234] Guardabassi L, Dijkshoorn L, Collard JM, Olsen JE, Dalsgaard A. Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *J. Med. Microbiol.* 2000, 49: 929–936.
- [235] Ribera A, Roca I, Ruiz J, Gibert I, Vila J. Partial characterization of a transposon containing the *tet(A)* determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2003 Sep;52(3):477–80.
- [236] Ribera A, Ruiz J, Vila J. Presence of the Tet M Determinant in a Clinical Isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Jul;47(7):2310–2.
- [237] Ruzin A, Keeney D, Bradford PA. AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J Antimicrob Chemother.* 2007 May;59(5):1001–4.
- [238] Peleg AY, Adams J, Paterson DL. Tigecycline Efflux as a Mechanism for Nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Jun;51(6):2065–9.
- [239] Damier-Piolle L, Magnet S, Brémont S, Lambert T, Courvalin P. AdeIJK, a Resistance-Nodulation-Cell Division Pump Effluxing Multiple Antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Feb;52(2):557–62.
- [240] Coyne S, Rosenfeld N, Lambert T, Courvalin P, Périchon B. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Oct;54(10):4389–93.
- [241] Rumbo C, Gato E, López M, Ruiz de Alegría C, Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, et al. Contribution of efflux pumps, porins, and β -lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Nov;57(11):5247–57.
- [242] Chen Q, Li X, Zhou H, Jiang Y, Chen Y, Hua X, et al. Decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter baumannii* mediated by a mutation in *trm* encoding SAM-dependent methyltransferase. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(1):72–6.
- [243] Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Jul;67(7):1607–15.
- [244] Hejnar P, Kolár M, Hájek V. Characteristics of *Acinetobacter* strains (phenotype classification, antibiotic susceptibility and production of beta-lactamases) isolated from

- haemocultures from patients at the Teaching Hospital in Olomouc. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med.* 1999;142:73–7.
- [245] European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARSNet). Stockholm: ECDC; 2015.
- [246] Beceiro A, Llobet E, Aranda J, Bengoechea JA, Doumith M, Hornsey M, et al. Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the *pmrAB* two-component regulatory system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(7):3370–9.
- [247] Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JD, Vinogradov E, Seemann T, et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(12):4971–7.
- [248] Moffatt JH, Harper M, Adler B, Nation RL, Li J, Boyce JD. Insertion sequence ISAba11 is involved in colistin resistance and loss of lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Jun;55(6):3022–4.
- [249] Rolain JM, Roch A, Castanier M, Papazian L, Raoult D. *Acinetobacter baumannii* resistant to colistin with impaired virulence: A case report from France. *J Infect Dis.* 2011;204(7):1146–7.
- [250] López-Rojas R, Domínguez-Herrera J, McConnell MJ, Docobo-Peréz F, Smani Y, Fernández-Reyes M, et al. Impaired virulence and in vivo fitness of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Infect Dis.* 2011 Feb 15;203(4):545–8.
- [251] Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016 Feb 1;16(2):161–8.
- [252] Bitar I, Medvecky M, Gelbicova T, Jakubu V, Hrabak J, Zemlickova H, et al. Complete Nucleotide Sequences of *mcr-4.3*-Carrying Plasmids in *Acinetobacter baumannii* Sequence Type 345 of Human and Food Origin from the Czech Republic, the First Case in Europe. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019 Oct;63(10).
- [253] Van Looveren M, Goossens H, ARPAC Steering Group. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2004 Aug;10(8):684–704.
- [254] Dijkshoorn L, Aucken H, Gerner-Smidt P, Janssen P, Kaufmann ME, Garaizar J, et al. Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *J Clin Microbiol.* 1996 Jun;34(6):1519–25.

- [255] Nemeč A, Dijkshoorn L, van der Reijden TJK. Long-term predominance of two pan-European clones among multi-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in the Czech Republic. *J Med Microbiol.* 2004 Feb;53(Pt 2):147–53.
- [256] van Dessel H, Dijkshoorn L, van der Reijden T, Bakker N, Paauw A, van den Broek P, et al. Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. *Res Microbiol.* 2004 Mar;155(2):105–12.
- [257] Davis KA, Moran KA, McAllister CK, Gray PJ. Multidrug-resistant *Acinetobacter* extremity infections in soldiers. *Emerg. Infect. Dis.*, 2005, 11: 1218–1224.
- [258] Chan P-C, Huang L-M, Lin H-C, Chang L-Y, Chen M-L, Lu C-Y, et al. Control of an outbreak of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007 Apr;28(4):423–9.
- [259] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Acinetobacter baumannii* infections among patients at military medical facilities treating injured U.S. service members, 2002-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2004 Nov 19;53(45):1063–6.
- [260] Murray CK, Roop SA, Hospenthal DR, Dooley DP, Wenner K, Hammock J, et al. Bacteriology of war wounds at the time of injury. *Mil Med.* 2006 Sep;171(9):826–9.
- [261] Scott P, Deye G, Srinivasan A, Murray C, Moran K, Hulten E, et al. An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*-calcoaceticus complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2007 Jun 15;44(12):1577–84.
- [262] Turton JF, Kaufmann ME, Gill MJ, Pike R, Scott PT, Fishbain J, et al. Comparison of *Acinetobacter baumannii* isolates from the United Kingdom and the United States that were associated with repatriated casualties of the Iraq conflict. *J Clin Microbiol.* 2006 Jul;44(7):2630–4.
- [263] Maniatis AN, Pournaras S, Orkopoulou S, Tassios PT, Legakis NJ, Bacterial Resistance Study Group. Multiresistant *Acinetobacter baumannii* isolates in intensive care units in Greece. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2003 Jun;9(6):547–53.
- [264] Tsakris A, Tsioni C, Pournaras S, Polyzos S, Maniatis AN, Sofianou D. Spread of low-level carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones in a tertiary care Greek hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2003 Dec;52(6):1046–7.
- [265] Tsakris A, Ikonomidis A, Pournaras S, Spanakis N, Markogiannakis A. Carriage of OXA-58 but not of OXA-51 beta-lactamase gene correlates with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Nov;58(5):1097–9.

- [266] Papa A, Koulourida V, Souliou E. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a newly established Greek hospital. *Microb. Drug Resist.* 15(4), 257–260 (2009)
- [267] Koulourida V, Martziou E, Tsergouli K, Papa A. Trends in the molecular epidemiology of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary Greek hospital. *Hippokratia.* 2011;15(4):343–5.
- [268] Karageorgopoulos DE, Kelesidis T, Kelesidis I, Falagas ME. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant (including carbapenem-resistant) *Acinetobacter* infections: a review of the scientific evidence. *J. Antimicrob. Chemother.* 62(1), 45–55 (2008).
- [269] Miyakis S, Pefanis A, Tsakris A. The challenges of antimicrobial drug resistance in Greece. *Clin. Infect. Dis.* 53(2), 177–184 (2011).
- [270] Apostolopoulou E, Raftopoulos V, Filntisis G, Kithreotis P, Stefanidis E, Galanis P, et al. Surveillance of device-associated infection rates and mortality in 3 Greek intensive care units. *Am J Crit Care Off Publ Am Assoc Crit-Care Nurses.* 2013 May;22(3):e12-20.
- [271] Samonis G, Maraki S, Vouloumanou EK, Georgantzi GG, Kofteridis DP, Falagas ME. Antimicrobial susceptibility of non-fermenting Gram-negative isolates to isepamicin in a region with high antibiotic resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 2012 Nov;31(11):3191–8.
- [272] Mavroidi A, Likousi S, Palla E, Katsiari M, Roussou Z, Maguina A, et al. Molecular identification of tigecycline- and colistin-resistant carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* from a Greek hospital from 2011 to 2013. *J Med Microbiol.* 2015 Sep;64(9):993–7.
- [273] Oikonomou O, Sarrou S, Papagiannitsis CC et al. Rapid dissemination of colistin and carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in central Greece: mechanisms of resistance, molecular identification and epidemiological data. *BMC Infect. Dis.* 15, 559 (2015).
- [274] Gogou V, Pournaras S, Giannouli M, Voulgari E, Piperaki E-T, Zarrilli R, et al. Evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages: a 10 year study in Greece (2000–09). *J Antimicrob Chemother.* 2011 Dec;66(12):2767–72.
- [275] Arroyo LA, Herrera CM, Fernandez L, Hankins JV, Trent MS, Hancock REW. The pmrCAB operon mediates polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and clinical isolates through phosphoethanolamine modification of lipid A. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Aug;55(8):3743–51.
- [276] Μαρκουλάτος Π, Τζανακάκη Τ, Εργαστηριακές ασκήσεις Μικροβιολογίας-Ιολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. .

- [277] Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JDF, Vinogradov E, Seemann T, et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Dec;54(12):4971–7.
- [278] Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon P, Hansen IM, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2018;23(6).
- [279] Arroyo LA, Herrera CM, Fernandez L, Hankins JV, Trent MS, Hancock REW. The *pmrCAB* operon mediates polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and clinical isolates through phosphoethanolamine modification of lipid A. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Aug;55(8):3743–51.
- [280] El-Shazly S, Dashti A, Vali L, Bolaris M, Ibrahim AS. Molecular epidemiology and characterization of multiple drug-resistant (MDR) clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. 2015 Dec;41:42–9.
- [281] Ikonomidis A, Neou E, Gogou V, Vrioni G, Tsakris A, Pournaras S. Heteroresistance to meropenem in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 2009 Dec;47(12):4055–9.
- [282] Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by Detection of the *blaOXA-51*-like Carbapenemase Gene Intrinsic to This Species. *J Clin Microbiol*. 2006 Aug;44(8):2974–6.
- [283] Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*. 1984 May;37(1):67–75.
- [284] Kanellopoulou M, Stamos G, Petinnelli I, Savala M, Tzimogianni A, Legakis NJ, et al. Subtyping and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. in the intensive care unit of a Greek general hospital. *Int J Antimicrob Agents*. 2001 Aug;18(2):179–83.
- [285] Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in United States and European hospitals (2009-2011). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014 Apr;78(4):443–8.
- [286] Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents*. 2013 Jan;41(1):11–9.
- [287] Liakopoulos A, Miriagou V, Katsifas EA, Karagouni AD, Daikos GL, Tzouveleakis LS, et al. Identification of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* in Greece, 2010 to 2011. *Eurosurveillance*. 2012 Mar 15;17(11):20117.

- [288] Morfin-Otero R, Dowzicky MJ. Changes in MIC within a global collection of *Acinetobacter baumannii* collected as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial, 2004 to 2009. *Clin Ther*. 2012 Jan;34(1):101–12.
- [289] Antimicrobial consumption database (ESAC-Net) [Internet]. European Centre for Disease Prevention and Control. [cited 2020 Jan 24]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/surveillance-and-disease-data/database>