



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Επιδημιολογική επιτήρηση στελεχών *Pseudomonas aeruginosa*, που απομονώθηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας, το έτος 2018»**

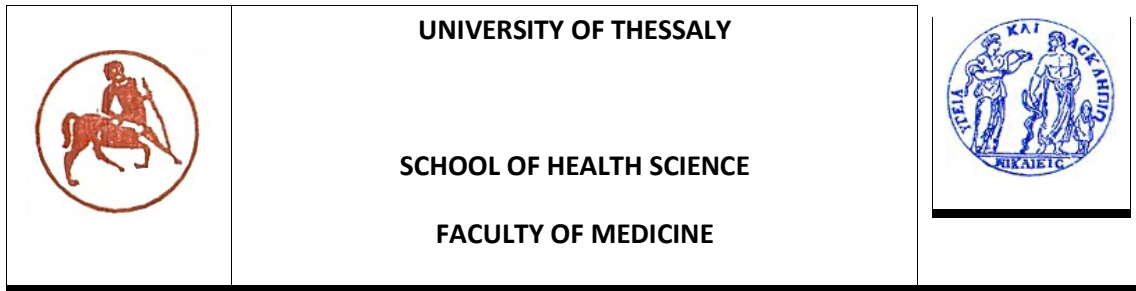
**Βέρρα Αγγελική**

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

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

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

Λάρισα, Μήνας, Έτος (Times New Roman, 12 pt)



**MASTER PROGRAM IN**

**“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”**

**MASTER THESIS**

**« Epidemiological surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in recovered University Hospital of Larissa, during 2018»**

**Verra Aggeliki**

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, Μήνας, (Times New Roman, 12 pt)

<u>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</u>	Σελ
Πρόλογος – Ευχαριστίες	6
Περίληψη	7
ABSTRACT	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
<u>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	10
1. <i>0.aeruginosa</i>	12
1.1 Κατασκευή –Φυσιολογία	13
1.2 Αντιγονική σύσταση	14
1.3 Εργαστηριακή Διάγνωση	14
1.4 Οικολογία- Επιδημιολογία	17
-Βιοτυπία	18
-Λυσιτυπία	18
- Πρωτεϊνοτυπία	19
- Πυοσινοτυπία	19
- Ελεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά	19
- Οροτυπία	19
-Πλασμιδιακή Εικόνα	20
- Ριβοτυπία	20
- rep-PCR	21
- RAPD PCR(Random Amplified Polymorphic DNA PCR)	21
- ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΑΛΛΟΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΠΕΔΙΟ (PFGE-Pulse Field Gel Electrophoresis)	22
- ΠΟΛΥΤΟΠΙΚΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΉ ΑΝΑΛΥΣΗ-MLST (Multilocus Sequence Typing)	24
1.5 Παθογένεια - Λοιμογόνοι Παράγοντες	26
1.6 Κλινικές Εκδηλώσεις	28
1.7 Θεραπεία	37

1.7.1 Αντιψευδομοναδικά β- λακταμικά αντιβιοτικά	37
- Αντιψευδομοναδικές πενικιλίνες	37
- Μονοβακτάμες	38
-Καρβαπενέμες	38
-Αμινογλυκοσίδες	39
-Κινολόνες	39
-Πολυμιξίνες	39
1.7.2 Αντοχή	42
1.7.3 Ενδογενής Αντοχή	43
1.7.4 Επίκτητη Αντοχή	44
1.8 Επιδημιολογία του <i>P. aeruginosa</i> στα Ελληνικά Νοσοκομεία	51
1.9 Σκοπός	53
<u>2.0 ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	
2. Υλικά και Μέθοδοι	55
2.1 Υλικό	55
2.2 Καλλιέργεια Κλινικών Δειγμάτων από τα οποία Απομονώθηκαν Στελέχη <i>P.aeruginosa</i>	56
2.3 Ταυτοποίηση Στελεχών και Μελέτη Ευαισθησίας	56
2.4 Μοριακός Χαρακτηρισμός των <i>P.aeruginosa</i> Στελεχών	56
2.5 Απομόνωση Χρωμοσωμικού DNA (EXTRACTION )	57
2.5.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης	58
2.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης ,PCR για την ανίχνευση Γονιδίων Αντοχής στα Αντιβιοτικά	60
2.6.1 Μοριακή Ανίχνευση Καρβαπεμενασών και Αλληλουχιών Εισδοχής, Χαρακτηρισμός Γενετικού Περιβάλλοντος ΜβLS	62
2.7 Ηλεκτροφόρηση σε Πήκτωμα Αγαρόζης	62
2.8 Καθαρισμός Προϊόντων PCR	64

2.9 Αλληλούχιση (sequencing)	65
2.10 Μοριακή Τυποποίηση Στελεχών με τη Μέθοδο (MLST)	66
2.10.1 Γονίδια της Μεθόδου MLST για την <i>P. aeruginosa</i>	67
2.11 Ηλεκτροφόρηση σε Παλλόμενο Ηλεκτρικό Πεδίο (PFGE)	68
2.11.1 PFGE Τυποποίηση των Στελεχών	69
2.12 Ανάλυση Πλασμιδίων	70
2.12.1 Πρωτόκολλο PFGE S1	71
<b><u>3.0 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u></b>	<b>72</b>
3.1 Έλεγχος Ευαισθησίας	74
3.2 Ανίχνευση Καρβαπεμενασών	76
3.3 Τυποποίηση Στελεχών με MLST	77
3.4 Τυποποίηση Στελεχών με PGFE	78
3.5 Χαρτογράφηση του Γενετικού Περιβάλλοντος των <i>bla<sub>VIM</sub></i> Γονιδίων	79
3.6 Προσδιορισμός της Γενετικής Εντόπισης των <i>bla<sub>VIM</sub></i> Γονιδίων	80
3.6 Τυποποίηση στελεχών με PFGE	82
<b><u>4.0 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ –ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u></b>	<b>81</b>
<b><u>5.0 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u></b>	<b>82</b>

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ (προαιρετικά)

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα στελέχη *Pseudomonas aeruginosa* που είναι ανθεκτικά στις καρβαπενέμες αποτελούν επί του παρόντος σοβαρό πρόβλημα στη διαχείριση λοιμώξεων που σχετίζονται με την υγειονομική περίθαλψη. Οι μεταλλο-β-λακταμάσες (MBL) είναι οι συνηθέστερα αποκτώμενες καρβαπενεμάσες στα στελέχη *P. aeruginosa*. Επομένως, ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν να εξεταστούν τα μοριακά χαρακτηριστικά των καρβαπενέμη-ανθεκτικών *P. aeruginosa* που απομονώθηκαν στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, κατά τη διάρκεια του 2018.

Συνολικά 120 στελέχη *P. aeruginosa* (10 πρώτα στελέχη ανά μήνα), που απομονώθηκαν το 2018, από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας (Ελλάδα) συμπεριλήφθηκαν σε αυτήν τη μελέτη. Η ταυτοποίηση σε επίπεδο ειδών και η δοκιμή ευαισθησίας έναντι διαφόρων αντιμικροβιακών παραγόντων πραγματοποιήθηκε από το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek 2 (BioMerieux, France). Όλα τα στελέχη *P. aeruginosa* τυποποιήθηκαν με PFGE και MLST. Επιπλέον, τα γονίδια που κωδικοποιούν για καρβαπενεμάσες ενισχύθηκαν και αλληλουχήθηκαν εντός των ιντεγκρονίων τους. Για 6 στελέχη αντιπροσωπευτικά διαφορετικών STs, η γενετική θέση των ανιχνευθέντων MBL γονιδίων καθορίστηκε με PFGE ανάλυση του συνολικού DNA που έχει υποστεί πέψη με S1 νουκλεάση, ακολουθούμενη από υβριδισμό με MBL-ειδικούς ανιχνευτές.

Συνολικά 61 (50,8%) από τα 120 στελέχη *P. aeruginosa* παρήγαγαν VIM-τύπου καρβαπενεμάση. Η πληθυσμιακή δομή των καρβαπενεμάση-παραγωγών στελεχών που μελετήθηκε με την MLST μεθοδολογία περιλάμβανε 4 STs. Ο διεθνής κλώνος ST111 ήταν ο πιο διαδεδομένος, αντιπροσωπεύοντας 34 VIM-παραγωγά στελέχη. Είκοσι πέντε VIM-παραγωγά στελέχη κατανεμήθηκαν στους STs 235 (n=15) και 395 (n=10). Τα υπόλοιπα VIM-παραγωγά *P. aeruginosa* ανήκαν στο ST773 (n = 2). Η πλειονότητα των καρβαπενεμάση-παραγωγών *P. aeruginosa* στελεχών παρήγαγε τη VIM-2 MBL (n=50; 82%), ενώ έντεκα στελέχη παρήγαγαν το ένζυμο VIM-4. Άλλα γονίδια που κωδικοποιούν για τις καρβαπενεμάσες, OXA-48, KPC, NDM και IMP, δεν βρέθηκαν. Τα γονίδια τύπου *blaVIM* εντοπίστηκαν σε τρεις κύριους τύπους ιντεγκρονίων, με το In59 (*aacA29a*, *blaVIM-2*, *aacA29b*) να είναι το πιο διαδεδομένο (n=40). Τα δύο άλλα ιντεγκρόνια ήταν το In595 (*blaVIM-4*, *arr-7*, *aacA4*, *blaPSE-1*), και το In1760 (*gcu205*, *blaOXA-10*, *aacA4*, *blaVIM-2*, *smr-2*). Τα S1 ηλεκτροφορητικά προφίλ υπέθεσαν τη χρωμοσωμική εντόπιση των ιντεγκρονίων που έφεραν τα *blaVIM* γονίδια.

Τα ευρήματά μας επιβεβαίωσαν την κλωνική εξάπλωση των ST111 *P. aeruginosa*, που φέρουν το In59 ιντεγκρόνιο, στο UHL. Επίσης, τόνισαν τον σημαντικό ρόλο των κλώνων «υψηλού κινδύνου», όπως οι STs 111 και 235, στην επιτυχή διάδοση και εγκατάσταση σε νοσοκομειακά περιβάλλοντα κλινικά σημαντικών παθογόνων που φέρουν γονίδια αντοχής. Επομένως, η αναγνώριση των καρβαπενεμάση-παραγωγών *P. aeruginosa* υπερ-επιδημικών κλώνων, με τη χρήση μοριακών εργαλείων, αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό βήμα προς την ανίχνευση των οδών μετάδοσης, την ανάπτυξη στοχευμένων στρατηγικών ελέγχου και πρόληψης, και την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητάς τους.

## ABSTRACT

Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates are currently a serious problem in the management of health-care associated infections. Metallo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ Ls) are the most commonly acquired carbapenemases in *P. aeruginosa*. Therefore, the aim of this study was to examine the molecular characteristics of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* detected in a Greek hospital, during 2018.

A total of 120 *P. aeruginosa* (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). All *P. aeruginosa* isolates were typed by PFGE and MLST. Additionally, carbapenemase-encoding genes were amplified and sequenced within their integrons. For 6 strains, representing different STs, the genetic location of the detected M $\beta$ L-encoding genes was defined by PFGE analysis of total DNA digested with S1 nuclease, followed by hybridization with M $\beta$ L probes.

A total of 61 (50.8%) out of 120 *P. aeruginosa* isolates produced VIM-type carbapenemases. The population structure of the carbapenemase-producing isolates studied by MLST comprised 4 sequence types (STs). The international clone ST111 was the most prevalent, accounting for 34 VIM-producing isolates. Twenty VIM-producing isolates were distributed in STs 235 (n=15) and 395 (n=10). The remaining VIM-producing *P. aeruginosa* isolates belonged to ST773 (n=2). The majority of the carbapenemase-producing *P. aeruginosa* isolates (n=50; 82%) produced the VIM-2 M $\beta$ L, while eleven isolates produced the VIM-4 enzyme. No other carbapenemase-encoding genes, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> and *bla*<sub>IMP</sub>, were found. *bla*<sub>VIM</sub> genes were identified in three main integron types, with In59 (*aacA29a*, *bla*<sub>VIM-2</sub>, and *aacA29b*) being the most common (n = 40). The other two integrons were In595 (*bla*<sub>VIM-4</sub>, *arr-7*, *aacA4*, and *bla*<sub>PSE-1</sub> cassettes), and In1760 (*gcu205*, *bla*<sub>OXA-10</sub>, *aacA4*, *bla*<sub>VIM-2</sub>, *smr-2*). In selected isolates, S1 profiling suggested that M $\beta$ L-encoding integrons were integrated into *P. aeruginosa* chromosomes.

Our findings confirmed the clonal spread of ST111 *P. aeruginosa*, carrying the VIM-2-encoding integron In59, in UHL. Also, they highlighted the important role of high-risk clones, as STs 111 and 235, in the successful dissemination and establishment into hospital settings of clinically important pathogens carrying resistance determinants. Therefore, recognition of carbapenemase-producing *P. aeruginosa* hyper-epidemic clones by molecular tools represents an important step towards tracing transmission routes, developing targeted control and prevention strategies, and monitoring their effectiveness.



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο βασικότερος εκπρόσωπος των αζυμωτικών βακτηρίων είναι η *Pseudomonas* και απομονώθηκε το 1882 από τον Gessard [1]. Αργότερα ο Migula (1895) κατέταξε τον *Bacillus pyocyaneus* του Gessard στο γένος των ψευδομονάδων υπό το όνομα *Pseudomonas pyocyanea*. Σήμερα αποκαλείται *Pseudomonas aeruginosa* προς τιμήν του Schroeter, ο οποίος πρώτος περιέγραψε το μικρόβιο υπό το όνομα *Bacterium aeruginosum* (1872) [1]. Έως σήμερα, περισσότερα από 160 είδη ψευδομονάδων έχουν διαχωριστεί και ταυτοποιηθεί αλλά λίγα (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. alcaligenes* και *P. pseudoalcaligenes*) ενδιαφέρουν την Κλινική Μικροβιολογία ως αποικιστές του ανθρώπινου σώματος, ως συμπαραγόντες νόσων ή ως καθαρά παθογόνοι παράγοντες. Το γένος *Pseudomonas* αποτελεί την rRNA ομάδα I και περιλαμβάνει 3 επιμέρους ομάδες: Την ομάδα fluorescent, τα μέλη της οποίας χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να παράγουν τη χρωστική πυοβερνίνη, η οποία φθορίζει κάτω από υπεριώδες φως με μήκος κύματος 400nm. Από τα τρία είδη της ομάδας μόνο η *P. aeruginosa* παράγει τη χαρακτηριστική κυανή, υδατοδιαλυτή χρωστική πυοκυανίνη. Την ομάδα stutzeri, η οποία χαρακτηρίζεται από την ικανότητά των μελών της να αναπτύσσονται αναερόβια σε υλικά που περιέχουν νιτρικά άλατα παράγοντας οξείδιο του αζώτου. Τέλος, την ομάδα alcaligenes, η οποία περιλαμβάνει είδη που δεν μπορούν να διασπάσουν τη γλυκόζη σε υλικό οξείδωσης – ζύμωσης της γλυκόζης (Oxidative - Fermentative glucose medium) [3,4]. Η λέξη *Pseudomonas*, που σημαίνει ψευδή μονάδα αποτελείται από τις Pseudo και monas. Στο γένος *Pseudomonas*, το συχνότερο είδος όπου προκαλεί λοιμώξεις στον άνθρωπο είναι η *Pseudomonas aeruginosa*. Η λέξη Aeruginosa (ae και rucgine) σημαίνει παλαιά σκουριά και αναφέρεται στη πρασινίζουσα σκουριά του χαλκού, με την οποία προσομοιάζεται το πράσινο χρώμα των αποικιών του μικροοργανισμού.

Το βακτηρίδιο *P. aeruginosa* έχει την ονομασία <<βακτήριο του κυανού>> ή <<ψευδομονάς η πυοκυανική >> και αυτό γιατί ο χρωματισμός των αποικιών οφείλεται στη συνδυαστική παραγωγή των χρωστικών πυοκυανίνη (pyocyanine) και πυοβερδίνη (pyoverdine). Η λατινική λέξη verdine παρ'ότι αναφέρεται στο πράσινο χρώμα, επί απουσίας της πυοκυανίνης, η πυοβερδίνη έχει κίτρινο χρώμα

Οι ψευδομονάδες είναι κινητά Gram-αρνητικά βακτηρίδια, έχουν σώμα ευθύ ή ελαφρώς κεκαμένο, διατεταγμένα κατά μονάς ή σε ζεύγη, κινητά, ιδιότητα που τους προσδίδουν οι πολικές βλεφαρίδες που φέρουν [2,5], με μήκος περίπου 1,5-3 μm και 0,5 μm. Μέσω του αναπνευστικού μεταβολισμού χρησιμοποιούν υδατάνθρακες, χρησιμοποιώντας το οξυγόνο ως αποδέκτη ηλεκτρονίων, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα να είναι αζυμωτικά. Παρότι είναι κατά βάση αερόβια, χρησιμοποιώντας νιτρικά ή αργινίνη ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων, μπορούν να αναπτυχθούν και αναερόβια.

Όλα τα στελέχη του είδους, έτσι και η *P. aeruginosa* έχει τις εξής ιδιότητες :

- Παράγει οξειδάση
- Παράγει καταλάση
- Δε ζυμώνει τη γλυκόζη
- Δεν παράγει H<sub>2</sub>S
- Δε διασπά τη λακτόζη
- Αναπτύσσεται στους 42° C
- Διασπά, χωρίς την παραγωγή αερίου και μέσω της οξείδωσης, τη γλυκόζη.
- Το 96-98% των στελεχών υδρολύει την αργινίνη
- >90% των στελεχών παράγει πυοκυανίνη
- Διασπά το γλυκονικό κάλιο ,μέσω της οξείδωσης

### Πίνακας 1: Ταξινόμηση της οικογένειας Pseudomonadaceae

#### rRNA Group I

##### Fluorescent Group

*Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas fluorescens*

*Pseudomonas putida*

##### Stutzeri Group

*Pseudomonas stutzeri*

*Pseudomonas mendocina*

CDC Group Vd-3

##### Alcaligenes Group

*Pseudomonas alcaligenes*

*Pseudomonas pseudoalcaligenes*

*Pseudomonas species*

#### rRNA Group III

##### Acidovorans Group

*Comamonas acidovorans*

*Comamonas testosterone*

*Comamonas terrigena*

##### Facilis-delafieldii Group

*Acidovorax delafieldii*

*Acidovorax facilis*

*Acidovorax temperans*

#### rRNA Group IV

##### Diminuta Group

*Brevundimonas diminuta*

*Brevundimonas vesicularis*

## **rRNA Group II**

### **Pseudomallei Group**

*Burkholderia mallei*

*Burkholderia pseudomallei*

*Burkholderia cepacia*

*Burkholderia gladioli*

*Burkholderia pickettii*

## **rRNA Group V**

*Stenotrophomonas maltophilia*

## **Unknown Nucleic Acid Homology**

*Chryseomonas luteola*

*Flavimonas oryzihabitans*

*Sphingomonas paucimobilis*

*Shewanella putrefaciens*

*Pseudomonas-like group 2*

*CDC group WO-1*

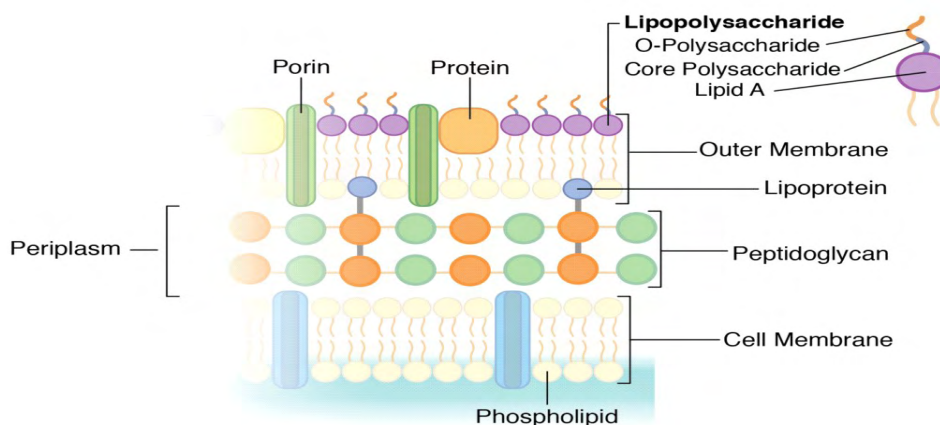
## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### *P. aeruginosa*

#### 1.1 Κατασκευή -Φυσιολογία

Το κυτταρικό τοίχωμα της *P. aeruginosa* αποτελείται από λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης πάχους 5nm, παρόμοιο με αυτό των Gram- αρνητικών βακτηριδίων. Εξωτερικά της πεπτιδογλυκάνης υπάρχουν η λιποπρωτεΐνη η οποία συνδέει και σταθεροποιεί τη πεπτιδογλυκάνη με την εξωτερική στοιβάδα και η εξωτερική μεμβράνη η οποία αποτελείται από πρωτεΐνες και λιποπολυσακχαρίτες (LPS).

Οι (LPS) αποτελούνται στο ένα άκρο από το Α-λιπίδιο, ένα φωσφολιπίδιο που περιέχει γλυκοσαμίνη αντί για γλυκερόλη, στο άλλο άκρο βρίσκεται το Ο-αντιγόνο που είναι μια πλευρική σακχαριδική αλυσίδα και τέλος στη μέση βρίσκεται ο πολυσακχαριδικός πυρήνας. Τα παραπάνω στοιχεία παρουσιάζουν χημικές διαφορές στα μικρόβια αυτού του γένους και είδους και για τον λόγο αυτό χωρίζονται σε ορολογικές ομάδες ή σε ορολογικούς τύπους.



Gram Negative Bacteria Cell Wall

**Εικόνα 2:** Κυτταρικό τοίχωμα Gram –αρνητικού βακτηρίου

*P. aeruginosa* καταστρέφεται στην θερμοκρασία των 55ο C σε μία ώρα. Αντέχει και ζει στο νερό για πολλούς μήνες. Διατηρείται και πολλαπλασιάζεται στις μικρές υγρές συλλογές και στις υγρές επιφάνειες, στα διάφορα θεραπευτικά υγρά, ακόμη και στα διαλύματα των περισσότερων αντισηπτικών ουσιών. Διατηρείται στη θερμοκρασία του κοινού ψυγείου. Είναι ευαίσθητη στις ενώσεις αργύρου και κατά 80% στις ενώσεις υδραργύρου, αλλά όλα τα στελέχη της είναι ανθεκτικά στο ιώδιο και αντέχουν στη φυσική βακτηριοκτόνο δράση του ορού [2].

- **Αντιγονική σύσταση**

Για την ορολογική διάκριση της *P. aeruginosa* σε 17 O-οροτύπους [5], ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) αποτελεί τη βάση. Παρότι υπάρχουν πολλοί ορότυποι που έχουν συνδεθεί με συγκεκριμένη παθογόνο δράση και με αντοχή στα αντιβιοτικά [6], υπάρχει ένας ορότυπος, ο O12, που είναι σχεδόν πάντα πολυανθεκτικός στα αντιβιοτικά και στις ενδοσκοπικές λοιμώξεις. Ο O12 είναι ο επικρατέστερος ορότυπος στην Ελλάδα αλλά και σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες [7].

Οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης της *P. aeruginosa*, οι γνωστές πορίνες, επιτρέπουν τη διέλευση των αντιμικροβιακών ουσιών μέσου αυτών. Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά είναι λιγότερο διαπερατά σε στελέχη με τροποποιημένες λειτουργικά πορίνες [8].

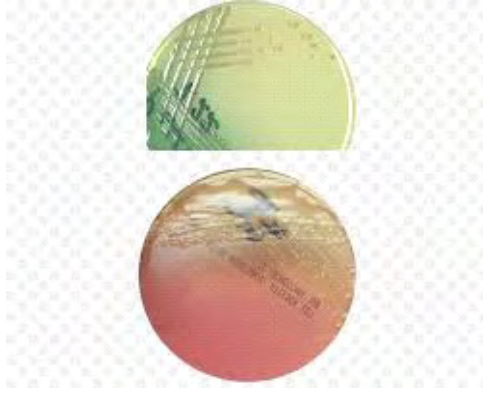
Η βλεφαρίδα της *P. aeruginosa* καθώς και οι βλεφαρίδες των ψευδομονάδων που ανήκουν σε άλλα είδη είναι επίσης αντιγονικές, αλλά εμφανίζουν μεγάλη αντιγονική ετερογένεια και δεν χρησιμοποιούνται για διαχωρισμό οροτύπων.

- **Εργαστηριακή Διάγνωση**

Η διάγνωση των λοιμώξεων που οφείλονται στη *P. aeruginosa*, προϋποθέτουν την καλλιέργεια, την απομόνωση και την ταυτοποίησή της.

Το δείγμα μπορεί να είναι διάφορα βιολογικά υγρά, επίχρισμα, πτώδες συλλογές, κόπρανα, υλικά παρακεντήσεων ή βιοψίες και άλλα. Η συλλογή και η μεταφορά του στο εργαστήριο δεν απαιτεί ειδικές μεθόδους γιατί οι ψευδομονάδες αντέχουν στο υγρό φυσικό περιβάλλον των δειγμάτων για πολλές ώρες και ημέρες. Η *P. aeruginosa* αναπτύσσεται εύκολα σε κοινά πεπτονούχα θρεπτικά υλικά, όπως ο θρεπτικός ζωμός και το θρεπτικό άγαρ. Στο αιματούχο άγαρ μερικά στελέχη προκαλούν αιμόλυση. Αναπτύσσεται επίσης στα εκλεκτικά θρεπτικά υλικά των εντεροβακτηριακών όπως το MacConkey, όπου παράγει άχρωμες αποικίες διότι δεν διασπά τη λακτόζη. Κάπως δυσκολότερα αναπτύσσεται στα πιο εκλεκτικά υλικά όπως το δεσοξυχολικό και το SS άγαρ. Οι αποικίες είναι γυαλιστερές, υδαρείς, κυκλικές,

επιρρέες στο κέντρο σαν αυγά μάτια με κυματοειδή παρυφή και επιφάνεια στίλβουσα και με ιριδισμό στις νεαρές καλλιέργειες που όμως γρήγορα χάνεται. Ο ιριδισμός είναι μεταλλικός και είναι εντονότερος στις περιοχές διάχυτης ανάπτυξης, όπου γρήγορα εμφανίζονται σημεία αυτόλυσης. Στο άνοιγμα του τρυβλίου γίνεται αντιληπτή μία χαρακτηριστική αρωματική οσμή τριμεθυλαμίνης. Η μορφολογία των αποικιών δεν είναι πάντοτε η τυπική. Έχουν διαχωριστεί 6 μορφότυποι αποικιών όπως οι λείες (smooth), οι ξηρές (rough), οι βλενώδεις (mucoid), οι ζελατινώδεις, οι παρόμοιες με αυτές του κολοβακτηριδίου, οι μικρές. Οι βλενώδεις οφείλουν τη μορφή τους στην παραγωγή ενός βλενώδους επιφανειακού πολυσακχαρίτη. Οι μεγάλες αποικίες αναπτύσσονται στις καλλιέργειες των κλινικών δειγμάτων, ενώ οι μικρές στις καλλιέργειες υλικών από το φυσικό περιβάλλον. Οι διαφορές στη μορφολογία των αποικιών συνοδεύονται και από βιολογικές, βιοχημικές, αντιγονικές διαφορές, όπως και από διαφορές στην ευαισθησία στα αντιβιοτικά. Στα υγρά θρεπτικά υλικά σχηματίζει υμένιο στην επιφάνεια του υλικού. Είναι αερόβιο βακτηρίδιο και αναπτύσσεται σε ευρέα όρια θερμοκρασίας από 4ο C-42ο C. Αριστη, όμως, θερμοκρασία ανάπτυξης της είναι 37ο C. Η ικανότητα ανάπτυξης σε 42ο C διαφοροποιεί την *P. aeruginosa* από τα άλλα είδη των ψευδομονάδων. Οι τροφικές απαιτήσεις της ψευδομονάδας είναι μικρές. Από τις χαρακτηριστικότερες ιδιότητες της *P. aeruginosa* είναι η παραγωγή μιας ή περισσότερων χρωστικών. Οι χρωστικές αυτές δεν χρωματίζουν τις αποικίες, αλλά διαχέονται στο θρεπτικό υλικό διότι είναι υδατοδιαλυτές. Σε υγρά θρεπτικά υλικά η χροιά εμφανίζεται κατ' αρχήν στην επιφάνεια. Μετά όμως από ζωηρή ανακίνηση του περιεχομένου της, η χροιά καταλαμβάνει όλη τη στήλη του θρεπτικού 28 υλικού. Οι χρωστικές οι οποίες παράγονται είναι: η πυοκυανίνη (pyocyanin) η οποία είναι φεναζίνη και έχει χροιά κυανοπράσινη. Διαλύεται στο νερό και στο χλωροφόρμιο. Δεν παράγεται πυοκυανίνη από όλα τα στελέχη της *P. aeruginosa*. Άλλα στελέχη παράγουν φθορίζουσα χρωστική, την πυοβερδίνη η οποία δίνει στο άγαρ χροιά κιτρινοπράσινη. Μερικά στελέχη παράγουν ερυθρο-μέλαινα χρωστική, την πυορουμπίνη ή την χρωστική πυομελανίνη, η οποία έχει χροιά καστανομέλαινα. Η παραγωγή χρωστικής είναι αφθονότερη σε θερμοκρασία δωματίου και ευνοείται από ορισμένα θρεπτικά υλικά. Αρκετά στελέχη της *P. aeruginosa*, 10% περίπου, δεν παράγουν χρωστική, ακόμη και αν καλλιεργηθούν σε ειδικά υλικά τα οποία ενισχύουν την παραγωγή χρωστικής[2,5].



**Εικόνα 8** : Αποικίες *Pseudomonas aeruginosa*

- θρεπτικό άγαρ 2) MacConkey

Η ταυτοποίηση της απομονωμένης αποικίας *P. aeruginosa* έχει καλλιεργητικό και βιοχημικό χαρακτήρα. Εκτός της πυοκυανίνης που είναι η πρώτη δοκιμή ,ακολουθεί η δοκιμασία της οξειδάσης και της καταλάσης με ενστάλαξη αντιδραστηρίου επάνω στις απομονωμένες αποικίες. Η *P. aeruginosa* και στις δυο δοκιμασίες είναι θετική. Άλλες ταυτοποιητικές δοκιμές είναι η κινητικότητα, χρώση βλεφαρίδας και η ινδόλη. Σημαντική βοήθεια ταυτοποίησης αποτελούν τα αυτοματοποιημένα συστήματα που χρησιμοποιούνται στην εργαστηριακή ρουτίνα όπως το Vitek και Phoenix.

Οροδιαγνωστική : Ο προσδιορισμός του τίτλου αντισωμάτων (anti-IgG και anti-IgM) στο αίμα σε ασθενείς με ενεργό ψευδομοναδική νόσο ,βοηθάει στην επιτυχία ή όχι της θεραπευτικής αγωγής αλλά και στην εξέλιξη της λοίμωξης. Διαγνωστική αξία έχει η ανεύρεση αντισωμάτων προς την εξωτοξίνη A (ToxA) και προς τη λιπάση ιδιαίτερα σε αναπνευστικές ψευδομοναδικές λοιμώξεις αρχικού σταδίου .

#### • Οικολογία - Επιδημιολογία

Η *P. aeruginosa* είναι ευρέως διαδεδομένη στη φύση και ανευρίσκεται περιβάλλοντα με υγρασία. Ενίοτε αποικίζει το δέρμα, το έξω αυτί, τις ανώτερες αναπνευστικές οδούς και το παχύ έντερο υγιών ανθρώπων. Έχει απομονωθεί από πτύελα και κόπρανα ατόμων, που δεν έχουν νοσηλευτεί σε ποσοστό 5% και 3%, αντίστοιχα. Μετά από παραμονή 72 ωρών των ασθενών σε νοσοκομείο, το ποσοστό απομόνωσης της *P. aeruginosa* στα κόπρανα ανέρχεται σε 20% [9]. Τα ποσοστά φορείας είναι χαμηλά, εκτός από τους ασθενείς με σοβαρά υποκείμενα νοσήματα, των οποίων οι αμυντικοί μηχανισμοί έχουν φυσικώς ή ιατρογενώς κατασταλεί ή έχουν πάρει προηγουμένως αντιβιοτική θεραπεία ή και έχουν εκτεθεί στο νοσοκομειακό περιβάλλον. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, ο αποικισμός από την *P. aeruginosa* συχνά προηγείται της λοίμωξης και οι παράγοντες που προδιαθέτουν στον αποικισμό αυξάνουν επίσης τις πιθανότητες της λοίμωξης [10]. Οι περισσότερες λοιμώξεις από *P. aeruginosa* αποκτώνται μέσα στο νοσοκομείο, όπου αυτή είναι υπεύθυνη για μεγάλο

ποσοστό νοσοκομειακών λοιμώξεων [5]. Έχουν βρεθεί πολλές δεξαμενές του μικροοργανισμού, όπως αναπνευστήρες, ενδοσκόπια και άλλα ιατρικά όργανα, κολλύρια, απολυμαντικά, διαλύματα καθαρισμού χώρων, νεροχύτες, νερό ανθοδοχείων, πισίνες φυσιοθεραπείας και οι περισσότερες από αυτές έχουν σχέση με υγρασία. Η *P. aeruginosa* ευθύνεται για το 10% όλων των Gram-αρνητικών συστηματικών λοιμώξεων και συνδέεται με το 50% της θνητότητας. Πιστεύεται ότι ο μικροοργανισμός μεταδίδεται στους ασθενείς με τα χέρια του νοσηλευτικού προσωπικού ή με μολυσμένα αντικείμενα [11,12]. Θα πρέπει να γίνει αντιληπτό ότι η *P. aeruginosa* είναι ένα θανατηφόρο παθογόνο βακτηρίδιο που προκαλεί λοιμώξεις με ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας σε νοσοκομειακούς ασθενείς, όπως για παράδειγμα 34% σε βακτηριαιμία, 50% σε βακτηριαιμία ουδετεροπενικών ασθενών, 45% σε βακτηριαμική νοσοκομειακή πνευμονία και 69% σε πνευμονία ασθενών με μηχανική υποστήριξη της αναπνοής [13-14]. Η αυξημένη θνησιμότητα αποδίδεται α) στην παραγωγή του βλενώδους εξωπολυσακχαρίτη που παρέχει προστασία στο βακτηρίδιο από τους ανοσιακούς μηχανισμούς του ξενιστή, β) στην παραγωγή από το βακτηρίδιο μεγάλης ποικιλίας ενζύμων και τοξινών που είναι υπεύθυνα για την καταστροφή των ιστών του ξενιστή και την εισβολή της ψευδομονάδας, γ) στην ευπάθεια των ανοσοκατεσταλμένων ασθενών, όπως αυτών με εγκαύματα, κυστική ίνωση, προσθετικές καρδιακές βαλβίδες, παροχετεύσεις, τραχειοστομία, διάφορα υποκείμενα νοσήματα, και δ) στην παγκόσμια εμφάνιση πολυανθεκτικών νοσοκομειακών επιδημικών κλώνων [15,16]. Επίσης, η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών κατά τη διάρκεια της θεραπείας συνδέεται με αύξηση της θνησιμότητας, υψηλότερο ποσοστό δευτεροπαθούς βακτηριαιμίας και αύξηση του χρόνου παραμονής του ασθενή στο νοσοκομείο [15,17]. Η σπουδαιότητα εφαρμογής αξιόπιστων εργαλείων για τον επιδημιολογικό έλεγχο της *P. aeruginosa* αποδεικνύεται από τα αποτελέσματα μεγάλων επιδημιολογικών ερευνών. Σύμφωνα με μελέτη του “European prevalence of infection in Intensive Care (EPIC)” η *P. aeruginosa* ήταν το συχνότερο (28,7%) Gram-αρνητικό είδος που απομονώθηκε από ασθενείς με βρογχοπνευμονία, οι οποίοι νοσηλεύτηκαν σε 1417 μονάδες εντατικής θεραπείας σε 17 χώρες της Δυτικής Ευρώπης [18]. Σύμφωνα με μελέτη του “National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS)”, 39810 στελέχη Gram-αρνητικών βακτηριδίων συλλέχθηκαν στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής μεταξύ 1990 και 1999. Η *P. aeruginosa* υπερίσχυε (17%) μεταξύ των Gram-αρνητικών που συνδέθηκαν αιτιολογικά με νοσοκομειακή πνευμονία σε μονάδες εντατικής θεραπείας [19]. Σύμφωνα με το SENTRY Antimicrobial Surveillance Program η *P. aeruginosa* ήταν το τρίτο σε συχνότητα (10,6%) παθογόνο ανάμεσα σε 4267 στελέχη που απομονώθηκαν από αιμοκαλλιέργειες κατά το έτος 1997 στον Καναδά, Ηνωμένες Πολιτείες και Λατινική Αμερική [20]. Όλα τα παραπάνω στοιχεία καθιστούν αντιληπτή την ανάγκη συνεχούς επιδημιολογικής επιτήρησης της *P. aeruginosa* ώστε να περιοριστούν οι νοσοκομειακές λοιμώξεις, ιδιαίτερα από πολυανθεκτικά στελέχη τα οποία μπορεί να προκαλέσουν επιδημίες. Οι διάφορες μέθοδοι, που έχουν αναπτυχθεί για την επιδημιολογική επιτήρηση, χωρίζονται σε δύο ομάδες, τις φαινοτυπικές και τις γονοτυπικές. Στις φαινοτυπικές μεθόδους ανήκουν η βιοτυπία, η λυσιτυπία, η πρωτεϊνοτυπία, η πυοσινοτυπία, η αντοχοτυπία και η οροτυπία. Στις γονοτυπικές μεθόδους ανήκουν η πλασμιδοτυπία, η ριβοτυπία, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επαναλαμβανόμενων στοιχείων (rep-PCR), η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με τυχαίως ενισχυόμενα τμήματα πολυμορφικού DNA (RAPD-PCR), η ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE-Pulse Field Gel Electrophoresis) Field



Gel Electrophoresis) και τέλος η Πολυτοπική Νουκλεοτιδική Ανάλυση (Multilocus Sequence Typing; MLST)

**Βιοτυπία:** Η βιοτυπία βασίζεται στον προσδιορισμό των βιοχημικών ιδιοτήτων των στελεχών και αποτελεί εύκολη και γρήγορη μέθοδο με την εφαρμογή των εμπορικών συστημάτων βιοχημικής ταυτοποίησης, όπως το API 20NE και το Vitek (GNI). Βασικό μειονέκτημα είναι η μεγάλη ποικιλία μεταβολικών χαρακτηριστικών και η περιορισμένη διακριτική ικανότητα.

**Λυσιτυπία:** Τα περισσότερα στελέχη της *P. aeruginosa* που απομονώνονται στα νοσοκομεία από πάσχοντες και μη από ψευδομοναδική λοίμωξη λύνονται από βακτηριοφάγους. Με τη χρήση ορισμένων λυτικών βακτηριοφάγων που ο καθένας του έχει διαφορετική ειδικότητα προς τα στελέχη των ψευδομονάδων μπορεί να γίνει διαχωρισμός των στελεχών σε λυσιτύπους. Από τις διάφορες σειρές φάγων η πιο γνωστή είναι αυτή του Κεντρικού Εργαστηρίου Υγείας του Λονδίνου (Colindale set), η οποία αποτελεί και σύστημα αναφοράς, γιατί περισσότερα από το 80% των στελεχών ψευδομονάδων είναι ευαίσθητα σ' αυτούς τους φάγους. Βασικά μειονεκτήματα είναι η έλλειψη επαναληψιμότητας και το γεγονός ότι τα βλενώδη στελέχη δεν είναι ευαίσθητα στους φάγους [21].

**Πρωτεϊνοτυπία:** Η πρωτεϊνοτυπία γίνεται με ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης του μικροβιακού κυττάρου.

**Πυροσινοτυπία:** Τα διάφορα στελέχη *P. aeruginosa* παράγουν πυοσίνες δηλαδή βακτηριοσίνες. Ένα και το αυτό στέλεχος μπορεί να παράγει περισσότερες από μία πυοσίνη. Προς τις πυοσίνες αυτές είναι ευαίσθητα τα διάφορα στελέχη ψευδομονάδων. Βάσει της ευαισθησίας αυτής έχει διαμορφωθεί σχήμα πυροσινοτυπίας με τη χρήση προτύπων στελεχών-δεικτών ευαίσθητων το κάθε ένα σε διαφορετική πυοσίνη. Πιο πρακτική είναι η μέθοδος των Fyfe και συν [22]. Χρησιμοποιούνται 13 στελέχη δείκτες και μπορούν να διακριθούν 105 τύποι και 26 υπότυποι. Παρόλο το γεγονός ότι τυποποιούνται πάνω από το 90% των κλινικών στελεχών, αλλά και τα 16 βλενώδη στελέχη ψευδομονάδων, η πυροσινοτυπία δεν χρησιμοποιείται ευρέως γιατί υπάρχουν βασικά μειονεκτήματα, όπως η περιπλοκότητα της τεχνικής και ο πολύς χρόνος που απαιτείται για την εφαρμογή της. Επίσης, η επαναληψιμότητα της μεθόδου απαιτεί αυστηρή προτυποποίηση του ενοφθλμίσματος, ενώ τα υλικά και αντιδραστήρια δεν είναι διαθέσιμα στο εμπόριο.

**Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά:** Με την εφαρμογή του αντιβιογράμματος αναζητούνται ομοιότητες στην εικόνα ευαισθησίας ή αντοχής μεταξύ των απομονωθέντων στελεχών. Μεταξύ των επιδημικών στελεχών παρατηρείται ομοιότητα. Η αντοχοτυπία είναι εύκολη, γρήγορη, προτυποποιημένη μέθοδος και χρήσιμη κατά τη διάρκεια επιδημιών. Παρόλο αυτά, υπάρχουν παράγοντες που καθιστούν ευμετάβλητο το προφίλ ευαισθησίας ή αντοχής στα αντιβιοτικά ενός στελέχους με αποτέλεσμα η αντοχοτυπία να μην είναι αξιόπιστη μέθοδος. Τέτοιοι παράγοντες είναι η απόκτηση ή η απώλεια πλασμιδίου και οι μεταλλάξεις που μπορεί να συμβούν σε ένα στέλεχος κατά τη διάρκεια επιδημίας.

**Οροτυπία:** Για την επιδημιολογική μελέτη των λοιμώξεων από *P. aeruginosa* χρησιμοποιείται η οροτυπία, που είναι η πιο αναπαραγωγίμη και με μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα από τις φαινοτυπικές μεθόδους. Στελέχη που απομονώνονται από πνευμονικές λοιμώξεις σε άτομα με κυστική ίνωση είναι δυνατό να μη φέρουν την Ο-μεταβλητή

σακχαριδική αλυσίδα, με αποτέλεσμα να μην αντιδρούν με τους αντιορούς και να χαρακτηρίζονται ως αταυτοποίητα. Ο λιποπολυσακχαρίτης της *P. aeruginosa* (Ο-σωματικό αντιγόνο) αποτελεί τη βάση για την ορολογική τυποποίηση του μικροοργανισμού. Η τυποποίηση γίνεται με τη χρήση ειδικών αντι-ορών προς τα Ο-αντιγόνα και τη βοήθεια συγκολλητινοαντιδράσεων. Με τον τρόπο αυτό διακρίνονται 17 ορότυποι της *P. aeruginosa*. Σε περιπτώσεις που η Ο-μεταβλητή σακχαριδική αλυσίδα λείπει, όπως σε στελέχη που απομονώνονται από πνευμονικές λοιμώξεις σε ασθενείς με κυστική ίνωση, τα στελέχη δεν αντιδρούν με τους αντι-ορούς ή δεν αντιδρούν με πολλούς αντι-ορούς και χαρακτηρίζονται αταυτοποίητα. Ωστόσο, η οροτυπία της *P. aeruginosa* παραμένει χρήσιμο επιδημιολογικό εργαλείο, διότι έχει δείχθει ότι μερικοί ορότυποι, (Ο6, Ο11, Ο1 και Ο3), εμπλέκονται με μεγαλύτερη συχνότητα σε νοσοκομειακές λοιμώξεις. Επίσης, ο ορότυπος Ο12 χαρακτηρίζεται από ασυνήθιστη πολυαντοχή στα αντιβιοτικά [21]. Τα μειονεκτήματα και οι περιορισμοί των φαινοτυπικών μεθόδων οδήγησαν τους ερευνητές στην ανάπτυξη περισσότερο αξιόπιστων μεθόδων τυποποίησης, που βασίζονται στην ανάλυση του DNA, με αποτέλεσμα πολλά νέα επιδημιολογικά εργαλεία να είναι διαθέσιμα στα κλινικά εργαστήρια. Πρόσφατα έχουν αναπτυχθεί ποικίλες μοριακές τεχνικές. Απ' αυτές, ευρύτερη εφαρμογή έχουν οι τεχνικές που βασίζονται στην PCR, η ριβοτυπία και η ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο ( Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE), που θεωρείται η μέθοδος αναφοράς και αποσκοπεί στην αποτύπωση του γενετικού υλικού και συγκεκριμένα του χρωμοσωματικού DNA της *P. aeruginosa* [23,24].

**Πλασμιδιακή εικόνα:** Τα πλασμίδια είναι εξωχρωμοσωμικά στοιχεία, φέρουν πληροφορίες εκτός του χρωμοσωμικού γονοτύπου και αποκτώνται με διάφορους μηχανισμούς. Παρόλο που κληρονομούνται σταθερά στα θυγατρικά κύτταρα, μπορεί να χαθούν διότι δεν είναι απαραίτητα για τη βιωσιμότητα του κυττάρου. Η πλασμιδοτυπία επιτυγχάνεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης υλικού, που προκύπτει από τη λύση μικροβιακών κυττάρων καλλιέργηματος της ψευδομονάδας. Η λύση γίνεται με SDS και Tris/HCL σε πολύ αλκαλικό περιβάλλον pH (μέθοδος Kado και Li). Η παρουσία πλασμιδίων στο ηλεκτροφόρημα διαβάζεται από την εμφάνιση ταινιών.

Η ανάλυση της πλασμιδιακής εικόνας είναι σχετικά χρήσιμη για την *P. aeruginosa*, επειδή μόνο το 15-20%, των στελεχών της έχουν πλασμίδια [25]. Επίσης, βασικό μειονέκτημα είναι η δυνατότητα να χάνουν ή να αποκτούν πλασμίδια τα στελέχη κατά τη διάρκεια επιδημίας.

**Ριβοτυπία:** Η ριβοτυπία είναι μια μοριακή τεχνική για ταυτοποίηση και χαρακτηρισμό βακτηρίων που χρησιμοποιεί πληροφορίες από φυλογενετικές αναλύσεις που βασίζονται σε rRNA. Είναι μια γρήγορη και συγκεκριμένη μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως στην κλινική διάγνωση και ανάλυση μικροβιακών κοινοτήτων.

Όλα τα βακτήρια έχουν ριβοσωματικά γονίδια, αλλά η ακριβής αλληλουχία είναι μοναδική για κάθε είδος, που χρησιμεύει ως γενετικό αποτύπωμα. Επομένως, ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του συγκεκριμένου γονιδίου 16S και η σύγκριση του με μια βάση δεδομένων θα έδινε ταυτοποίηση του συγκεκριμένου είδους.

Η ριβοτυπία περιλαμβάνει την πέψη του βακτηριακού γονιδιωματικού DNA με συγκεκριμένα περιοριστικά ένζυμα. Κάθε ένζυμο περιορισμού κόβει το DNA σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων, με αποτέλεσμα θραύσματα διαφορετικών μηκών.

Αυτά τα θραύσματα στη συνέχεια εκτελούνται σε ηλεκτροφόρηση πηκτής, όπου διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθος: η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου στο πήκτωμα στο οποίο αιωρούνται και προκαλεί την κίνηση θραυσμάτων DNA (όλα αρνητικά φορτισμένα λόγω της παρουσίας φωσφορικών ομάδων) μέσω μια μήτρα προς το θετικά φορτισμένο τέλος του πεδίου. Τα μικρά θραύσματα κινούνται πιο εύκολα και γρήγορα μέσω της μήτρας, φτάνοντας σε μεγαλύτερη απόσταση από την αρχική θέση από τα μεγαλύτερα θραύσματα.

Μετά τον διαχωρισμό στη μήτρα γέλης, τα θραύσματα DNA μετακινούνται σε μεμβράνες νάιλον και υβριδοποιούνται με επισημασμένο ανιχνευτή rRNA 16S ή 23S. Με αυτόν τον τρόπο μόνο τα θραύσματα που κωδικοποιούν τέτοιο rRNA απεικονίζονται και μπορούν να αναλυθούν. Στη συνέχεια, το σχέδιο ψηφιοποιείται και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της προέλευσης του DNA με σύγκριση με οργανισμούς αναφοράς σε μια βάση δεδομένων υπολογιστή.

Εννοιολογικά, η ριβοτυπία είναι παρόμοια με την ανίχνευση περιοριστικών θραυσμάτων του χρωμοσωμικού DNA με κλωνοποιημένους ανιχνευτές (τυχαία κλωνοποιημένοι ανιχνευτές ή ανιχνευτές που προέρχονται από μια συγκεκριμένη

**rep-PCR:** Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, επαναλαμβανόμενων στοιχείων (rep-PCR), βασίζεται στα ηλεκτροφορητικά μοτίβα μετά την ενίσχυση συγκεκριμένων γονιδιωματικών αλληλουχιών, ώστε να τυποποιηθούν τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη. Συγκεκριμένα, στις rep-PCR μεθόδους χρησιμοποιούνται εκκινητές που υβριδοποιούνται με μη κωδικεύουσες διαγονιδιακές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, οι οποίες βρίσκονται διάσπαρτες σε ολόκληρο το γονιδίωμα των βακτηρίων. Χρησιμοποιώντας την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, οι περιοχές του γονιδιώματος ενισχύονται, με αποτέλεσμα την παραγωγή αμπλικονίων. Τα μεγέθη των αμπλικονίων, που χαρακτηρίζονται ηλεκτροφορητικά μοτίβα, συγκρίνονται ώστε να προσδιοριστεί η γενετική συγγένεια των βακτηριακών στελεχών[27].

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

**RAPD PCR(Random Amplifield Polymorphic DNA PCR) :** Μία παραλλαγή της μεθόδου PCR είναι η RAPD-PCR δηλαδή η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με τυχαίως ενισχυόμενα τμήματα πολυμορφικού DNA. Η τυποποίηση με RAPD βασίζεται στην παράλληλη ενίσχυση μιας ομάδας τμημάτων DNA με τη χρήση τυχαίων, μικρών εκκινητών,

των οποίων οι αλληλουχίες δεν αντιστοιχούν σε κάποια συγκεκριμένη αλληλουχία στο γονιδίωμα και υβριδίζονται σε τυχαίες θέσεις για να αρχίσει ο πολυμερισμός του DNA. Η εγγύτητα, ο αριθμός και η θέση των σημείων έναρξης ποικίλλουν από μικροοργανισμό σε μικροοργανισμό οπότε η μέθοδος παράγει διαφορετικά αποτυπώματα DNA για διαφορετικά στελέχη. Η διαδικασία ενίσχυσης στην RAPD χαρακτηρίζεται από χαμηλή ειδικότητα-αυστηρότητα, εφόσον χρησιμοποιούνται χαμηλές θερμοκρασίες υβριδισμού.

Η μέθοδος πρωτοεμφανίστηκε το 1990 όταν ο Williams και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν 10μερείς τυχαίους εκκινητές για την ενίσχυση τμημάτων DNA. Τα συμπεράσματα στα οποία κατέληξαν ήταν ότι τα αποτυπώματα RAPD μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αξιόπιστοι γενετικοί μάρτυρες για γενετική χαρτογράφηση και για αποτύπωση του DNA καθώς και για απομόνωση και γρήγορη ταυτοποίηση χρωμοσωμικών τμημάτων DNA (Williams et al. 1990). Ταυτόχρονα αλλά ανεξάρτητα οι Welsh και McClelland παρατήρησαν ότι χρησιμοποιώντας έναν μόνο, τυχαία επιλεγόμενο, εκκινητή και δύο αρχικούς κύκλους, μη-αυστηρών συνθηκών PCR, ακολουθούμενους από πολλούς κύκλους αυστηρών συνθηκών PCR, κατάφεραν να παράγουν ένα διακριτό και επαναλήψιμο αριθμό προϊόντων, χαρακτηριστικών των υπό εξέταση γονιδίων. Ο μηχανισμός που πρότειναν ήταν ότι σε επαρκώς χαμηλές θερμοκρασίες, οι εκκινητές αναμένονται να υβριδοποιηθούν σε αρκετές θέσεις του γονιδιώματος με μερικές βεβαίως παράταιρες συνδέσεις (mismatches). Μερικές από τις θέσεις αυτές βρίσκονται σε απόσταση μερικών εκατοντάδων ζευγών βάσεων και σε αντίθετους κλώνους, οπότε οι ενδιάμεσες ακολουθίες μπορούν να ενισχυθούν μέσω της αντίδρασης PCR. Ο βαθμός που αυτές οι αλληλουχίες θα ενισχυθούν εξαρτάται από την ικανότητα εκκίνησης στις θέσεις υβριδισμού του εκκινητή και από την ικανότητα επέκτασης της αλυσίδας. Στους αρχικούς κύκλους θα επικρατήσουν τα προϊόντα που υβριδίζονται πιο εύκολα με τον εκκινητή. Στους τελευταίους κύκλους θα επικρατήσουν τα προϊόντα που ενισχύονται πιο εύκολα (Welsh and McClelland 1990). Τέλος το κυριότερο μειονέκτημα της RAPD είναι η χαμηλή ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητά της ,δεδομένου ότι χρησιμοποιούνται πολύ χαμηλές θερμοκρασίες υβριδοποίησης.

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

**ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΑΛΛΟΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΠΕΔΙΟ (PFGE-Pulse Field Gel Electrophoresis) :** Η ηλεκτροφόρηση σε γέλη ,υπό την επίδραση παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου (PFGE), έχει θεωρηθεί ως το « χρυσό πρότυπο» μεταξύ των μοριακών μεθόδων τυποποίησης για μια πλειάδα κλινικά σημαντικών βακτηριακών ειδών. Για πολλά χρόνια η PFGE υπήρξε το πρωταρχικό εργαλείο, τυποποίησης για τη διερεύνηση της μετάδοσης από νοσοκομείο σε νοσοκομείο παθογόνων στελεχών , επιδημιολογικής επιτήρησης στη δεκαετία του 1990 (Arbeit et al, 1999,Prevost et al,1991, Gordillo et al,1993,

Tenover et al,1995, ) και χρησιμοποίησης ,με επιτυχία , σε μεγάλης κλίμακας κλινικές μελέτες (McDougal et al,2003). Σήμερα η μέθοδος χρησιμοποιείται εκτενώς για την τυποποίηση και την επιδημιολογική έρευνα των παθογόνων βακτηρίων [25].

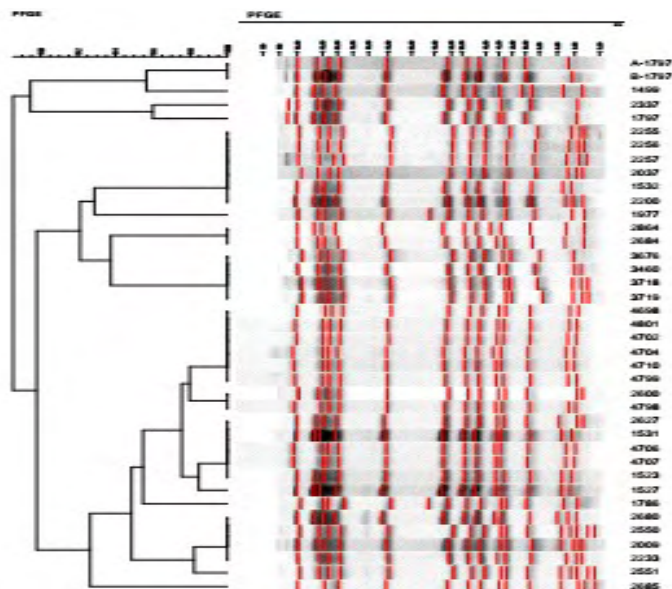
Η PFGE χρησιμοποιείται όταν τα ηλεκτροφορούμενα τμήματα DNA λόγω πολύ μεγάλου μεγέθους δεν μπορούν να διαχωριστούν σε απλή ηλεκτροφόρηση. Τέτοιες είναι οι περιπτώσεις ολόκληρων χρωμοσωμάτων αλλά και των θραυσμάτων που έχουν παραχθεί μετά από πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες χαμηλής συχνότητας σε ολικό DNA (συνήθως βακτηρίων) Για τη διενέργεια της PFGE ,ένα εξαιρετικά καθαρισμένο γενωμικό δείγμα DNA, διασπάται με μια ενδονουκλεάση περιορισμού που αναγνωρίζει σπάνια εμφανιζόμενες θέσεις περιορισμού στο γονιδίωμα των αντιστοιχών βακτηριακών ειδών. Τα προκύπτοντα 5–20 - θραύσματα (διακριτές ζώνες) περιορισμού, κυμαίνονται περίπου σε 10–800 χιλιάδες ζευγών βάσεων (kbp), μπορούν να διακριθούν σε πήκτωμα αγαρόζης με ηλεκτροφόρηση υπό παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο κατά την οποία ο προσανατολισμός του ηλεκτρικού πεδίου μεταβάλλεται περιοδικά. Τα διαχωρισμένα θραύσματα DNA μπορούν να απεικονιστούν στο πήκτωμα ως ζωνώσεις , οι οποίες σχηματίζουν ένα συγκεκριμένο ηλεκτροφορητικό μοτίβο επί γέλης ,το PFGE μοτίβο. Τα εν λόγω θραύσματα περιορισμού ,διαχωρίζονται με ένα μεγεθοεξαρτώμενο τρόπο και η μέθοδος αποδίδει σχετικά λίγες ζώνες στη γέλη ,πράγμα που καθιστά την ανάλυση των αποτελεσμάτων ευκολότερη. Συνεπώς οι ενθέσεις ή οι ελλείψεις κινητών γενετικών στοιχείων ,καθώς και τα μεγάλα γεγονότα ανασυνδυασμού εντός του γονιδιωματικού DNA οδηγούν σε αλλαγές στα ηλεκτροφορητικά μοτίβα της PFGE.

Επίσης, η PFGE μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των πλασμιδίων. Η PFGE έχει καλύτερη διακριτική ικανότητα από τη συμβατική ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και επιτρέπει τον διαχωρισμό μεγάλων πλασμιδίων .Οι κυκλικές μορφές των πλασμιδίων κινούνται πολύ αργά μέσα στο πήκτωμα αγαρόζης. Μόνο οι γραμμικές μορφές μπορούν να κινηθούν με ρυθμούς που επιτρέπουν τον ακριβή προσδιορισμό του μεγέθους.Το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο πρωτόκολλο για την PFGE ανάλυση του πλασμιδιακού προφίλ χρησιμοποιεί την S1 νουκλεάση για τη γραμμικοποίηση του πλασμιδικού DNA, επιτρέποντας την ανίχνευση μεγάλων πλασμιδίων μέχρι 600 kb.

Τέλος η συγκεκριμένη τεχνική είναι επίπονη και χρονοβόρα, χρειάζεται έμπειρο προσωπικό, δεν επιτρέπει τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων και το αποτέλεσμα εξαρτάται από την απόκτηση ή την απώλεια κινητών γενετικών στοιχείων.



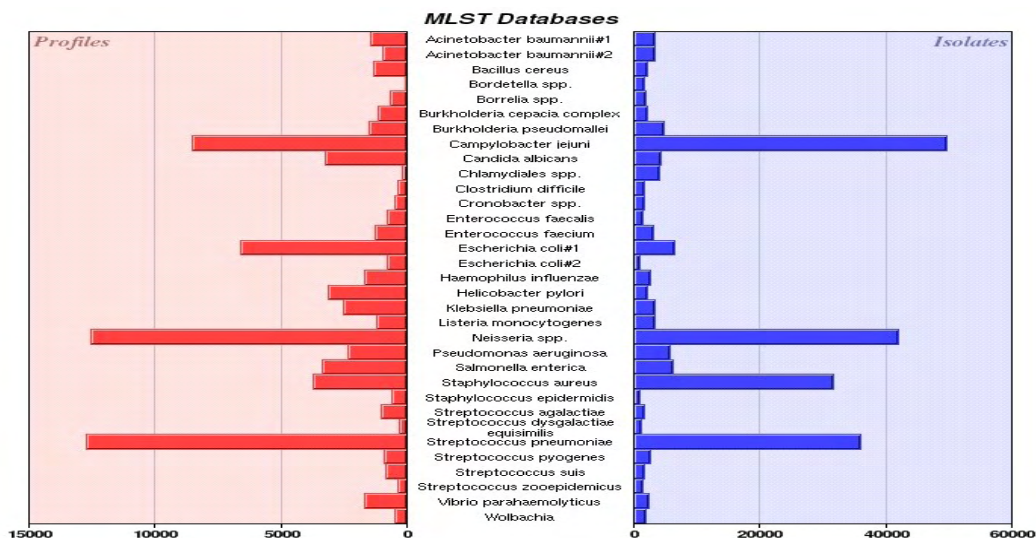
**Εικόνα 3:** Συσκευή ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο.



**Εικόνα 4:** Ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE)

**ΠΟΛΥΤΟΠΙΚΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ-MLST (Multilocus Sequence Typing) :** Η τυποποίηση πολυτοπικής αλληλούχισης (MLST) επινοήθηκε για να ξεπεραστεί η ελλιπής ή η μερική συγκρισιμότητα των προαναφερθέντων μεθόδων μεταξύ των διαφόρων εργαστηρίων. Το πρώτο σήμα της MLST αναπτύχθηκε το 1998 για τη *Neisseria meningitidis*, ενώ λίγο αργότερα, η εν λόγω μέθοδος επεκτάθηκε σε άλλα βακτηριακά είδη και με την πάροδο του χρόνου, έχει γίνει ένα πολύ δημοφιλές εργαλείο για παγκόσμιες επιδημιολογικές μελέτες, καθώς και για μελέτες σχετικά με την μοριακή εξέλιξη των παθογόνων (Maiden et al, 1998, Urwin & Maiden, 2003).

Στην MLST , τα στελέχη ταυτοποιούνται σύμφωνα με τις διαφορές αλληλουχίας σε έναν αριθμό προσεκτικά επιλεγμένων γενετικών τόπων. Οι DNA κωδικές αλληλουχίες 7 διαφορετικών μεταβολικών γονιδίων (house-keeping genes) μεγέθους περίπου 450 ζευγών βάσεων ενισχύονται με PCR και κατόπιν αλληλουχούνται. Για κάθε γενετικό δείκτη οι διαφορετικές αλληλουχίες των εξεταζόμενων στελεχών αντιμετωπίζονται ως διαφορετικά αλληλόμορφα γονίδια και κάθε στέλεχος καθορίζεται από την αλληλική κατατομή των χρησιμοποιούμενων δεικτών (allelic profile). Για κάθε γονίδιο-στόχο σε έκαστη μοναδική αλληλουχία (αλληλόμορφο) αποδίδεται ένας αριθμός και με βάση το συνδυασμό των επτά γονιδίων (αλληλικό προφίλ), προσδιορίζεται ο τύπος της αλληλουχίας (ST), στον οποίο ανήκει κάθε βακτηριακό στέλεχος. Οι αλληλουχίες των αλληλομόρφων και προφίλ των διάφορων STs είναι διαθέσιμα σε μεγάλες κεντρικές βάσεις δεδομένων, προσβάσιμες μέσω του διαδικτύου (<http://pubmlst.org/databases.shtml>). Αυτές οι βάσεις δεδομένων παρέχουν on-line λογισμικό (eBurst) για τον προσδιορισμό της γενετικής συγγένειας μεταξύ βακτηριακών στελεχών μέσα σε ένα είδος ,καθώς και πληροφορίες προέλευσης των στελεχών του κάθε ST που έχουν απομονωθεί από κάθε χώρα. Η προσεκτική επιλογή των γονιδίων-στόχων είναι απαραίτητη, έτσι ώστε η MLST να μπορεί να διακρίνει μεταξύ στενά συγγενών στελεχών. Ανεπιθύμητη εξελικτική επιλογή μεταξύ των MLST-στόχων μπορεί να δώσει τη λανθασμένη εντύπωση ότι ένα παθογόνο είναι γενετικά μονομορφικό, ενώ αυτό δεν συμβαίνει.



**Εικόνα 5** : MLST Databases

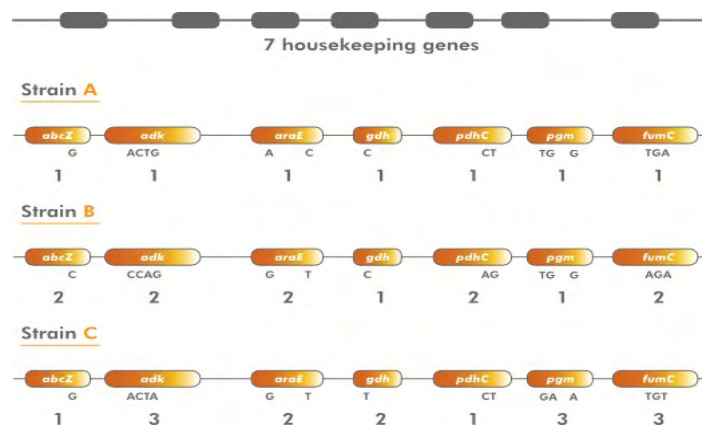
Στην περίπτωση της *P. aeruginosa* η MLST βασίζεται στην εύρεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας επτά γονιδίων (housekeeping genes) :

*acsA* (Acetyl coenzyme A synthetase )

*aroE* (Shikimate dehydrogenase )

*guaA* (GMP synthase )

*mutL* (DNA mismatch repair protein)  
*nuoD* (NADH dehydrogenase chain C,D)  
*ppsA* (Phosphoenolpyruvate synthase)  
*trpE* (Anthralite synthetase component I)



**Εικόνα 6:** Τυποποίηση πολυτοπικής αλληλούχησης (MLST)

## 1.5 Παθογένεια- Λοιμογόνοι Παράγοντες

Η *P. aeruginosa* είναι ένα ευκαιριακά παθογόνο βακτηρίδιο που μπορεί να προκαλέσει σοβαρές λοιμώξεις στον άνθρωπο, σπανιότερα σοβαρές λοιμώξεις σε υγιείς ανθρώπους. Ευνοείται συνήθως πρώτον από τη καταστροφή των φυσιολογικών φραγμών (π.χ χειρουργικές επεμβάσεις, ουροκαθετήρες, ενδοτραχειακή διασωλήνωση) και δεύτερον από τη διατάραξη των αμυντικών ανοσολογικών μηχανισμών (π.χ κυστική ίνωση, ουδετεροπενία, υπογαμμασφαιριναιμία, ανοσοανεπάρκεια).

Με την προσκόλληση και τον αποικισμό του βακτηρίου σε βλεννογόνο ή δέρμα ξεκινάει η λοίμωξη, της οποίας η επέκταση εντοπισμένη ή μη, γίνεται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος και είναι ικανή να οδηγήσει μέχρι και τον θάνατο.

Οι παράγοντες που καθορίζουν την παθογένεση της *P. aeruginosa* διαχωρίζονται σε κυτταρικούς και εξωκυττάρους [5]. Στους κυτταρικούς παράγοντες συναντάμε τις φίμπριες (type 4 pilli) και τον λιποπολυσακχαρίτη (LPS), ενώ στους εξωκυττάρους παράγοντες,

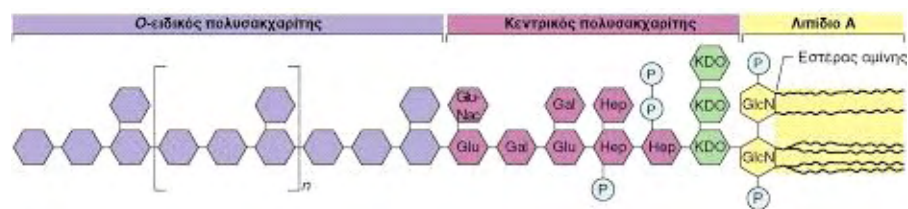


ένζυμα, τοξίνες, το πολυσακχαριδικό έλυτρο (alginate- γλυκοκάλυκας) και τέλος το εξωκυττάριο πολυσακχαρίτη (slime).

Οι φίμπριες (type 4 pilli) έχουν βραχέα, λεπτά πρωτεϊνικά εξαρτήματα με αριθμό >1000/κύτταρο και λειτουργούν ως προσκολλητίνες στα επιθηλιακά κύτταρα. Παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό της βιομεμβράνης, στη πρόσληψη DNA, στη μεταφορά των ηλεκτρονίων και τέλος στην κινητικότητα του βακτηριδίου.

Ενίσχυση της προσκόλλησης των βακτηριδίων στα επιθηλιακά κύτταρα, επιτυγχάνεται με την εξωτοξίνη S (ExoS), την βλεφαρίδα και με μια νευραμινιδάση που παράγει η *P. aeruginosa*, η οποία αφαιρεί ρίζες σιαλικού οξέως από τον υποδοχέα των προσκολλητίνων.

Ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) ως το κύριο συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης, δρα ως ενδοτοξίνη και μπορεί να προκαλέσει λευκοπενία και λευκοκυττάρωση, καταπληξία, πυρετό ολιγουρία, ενδαγγειακή πήξη και σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας στους ενήλικες.



**Εικόνα 7** : Δομή του λιποπολυσακχαρίτη LPS

Παράγοντας λοιμογονικότητας της *P. aeruginosa* είναι το Type III Secretion System (TTSS). Είναι καθοριστικό και ανευρίσκεται σε αρκετά Gram –αρνητικά βακτήρια όπως *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia spp.* Θεωρείται ένα από τα πολυπλοκότερα συστήματα έκκρισης πρωτεϊνών ( αποτελείται από περισσότερες των 20 πρωτεϊνών) και μέσω αυτού η *P. aeruginosa* εκκρίνει και παράγει λοιμογόνους παράγοντες άμεσα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του ξενιστή. Το σύστημα αποτελείται από την συσκευή στόχευσης, την ανεξάρτητη συσκευή έκκρισης και τις δραστικές πρωτεΐνες. Η *P. aeruginosa* μέσω του συστήματος TTSS παράγει τέσσερις δραστικές πρωτεΐνες : ExoS, ExoT, ExoU, και ExoY. Οι πρωτεΐνες ExoS και ExoT έχουν δράση ADP-ριβοζυλάσης, η ExoU είναι φωσφολιπάση και αποτελεί κυτταρολυτικό παράγοντα ενώ η ExoY έχει δράση αδενυλικής κυκλάσης. Τα γονίδια exoT και exoY ανευρίσκονται σχεδόν σε όλα τα κλινικά στελέχη, όμως σε σημαντικό αριθμό στελεχών τα γονίδια exoS και exoU απουσιάζουν.

Άλλοι παράγοντες που συμβάλλουν στην παθογονικότητα και τοξικότητα της *P. aeruginosa* είναι η κυτταροτιξίνη, η αλκαλική πρωτεάση, η φωσφολιπάση C, η πυοκυανίνη και ο σχηματισμός βιομεμβρανών.

Ο σχηματισμός βιομεμβράνης παρέχει την δυνατότητα προσκόλλησης των βακτηρίων στις επιφάνειες και την προστασία τους από τις αντιμικροβιακές ουσίες. Στη διαδικασία

σχηματισμού βιομεμβράνης παρατηρείται το φαινόμενο Quorum sensing (*Trends Microbiol* 2005, 13: 27). Το Quorum (απαρτία) sensing (ευαισθησία) είναι ο τρόπος επικοινωνίας και συνεργασίας των μικροβιακών κυττάρων προκειμένου να εκφράσουν την επιθετική τους ή την αμυντική τους συμπεριφορά έναντι δυσμενών παραγόντων του περιβάλλοντος και των αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή ανθρώπου ή ζώων [2,5,12,13].

## **1.6 Κλινικές Εκδηλώσεις**

Η *P. aeruginosa* σπάνια προκαλεί νόσο σε υγιείς ξενιστές. Κάθε συλλογή υγρού ακόμη και αντισηπτικών διαλυμάτων είναι μια πιθανή εστία ανάπτυξης της ψευδομονάδας και ως εκ τούτου μια πιθανή πηγή διασποράς αυτής στους ευπαθείς νοσηλευόμενους αρρώστους. Πολλές νοσοκομειακές λοιμώξεις και θανατηφόρες επιδημίες έγιναν στα νοσοκομεία από μόλυνση νοσηλευτικών υγρών, ενδοσκοπικών οργάνων, ενδαγγειακών γραμμών και άλλων υλικών από *P. aeruginosa*. Ιδιαίτερα επικίνδυνοι θεωρούνται οι διϋγρυντήρες που προσαρμόζονται στους αναπνευστήρες παροχής οξυγόνου. Ψευδομονάδες βρέθηκαν στο υγρό της δεξαμενής από το οποίο γίνονται τα σταγονίδια που παραμένουν στον αέρα σε αριθμούς μεγάλους μέχρι και 10<sup>5</sup> cfu/ml. Ο κίνδυνος ανάπτυξης πνευμονικής νόσου είναι ιδιαίτερα σοβαρός στα παιδιά που πάσχουν από κυστική ίνωση και που τελικά πεθαίνουν, στη μεγαλύτερη πλειονότητά τους, από αναπνευστική ψευδομοναδική νόσο. Ψευδομονάδες βρέθηκαν και σε διϋγρυντήρα παροχής οξυγόνου σε μονάδα αιμοκάθαρσης. Επίσης, βρέθηκαν και σε οφθαλμιατρικά φάρμακα από μόλυνση του ισότονου διαλύματος NaCl που χρησιμοποιήθηκε για τη διάλυση τους [2,12]. Προδιαθεσικοί παράγοντες για την ανάπτυξη ενδονοσοκομειακής λοίμωξης είναι η ύπαρξη μεταβολικών, αιματολογικών, κακοήθων και άλλων νόσων και η εφαρμογή θεραπευτικών αγωγών που ελατώνουν τη φυσική άμυνα του οργανισμού. Σ' αυτά προστίθενται και τοπικοί παράγοντες που μειώνουν την τοπική ακεραιότητα όπως οι καθετηριασμοί, οι παρακεντήσεις, οι ενδοφλέβιες εγχύσεις και η τραχειοτομία. Οι λοιμώξεις της κατώτερης αναπνευστικής οδού από *P. aeruginosa* εκδηλώνονται σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Η πρωτοπαθής ή μη μικροβιαμική πνευμονία είναι συνέπεια εισρόφησης εκκρίσεων των ανωτέρων αεραγωγών και αναπτύσσεται κυρίως σε ασθενείς με χρόνια πνευμονική νόσο, συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια ή AIDS και είναι συνηθέστερη στις μονάδες εντατικής θεραπείας που χρησιμοποιούν μηχανικούς αναπνευστήρες. Αντίθετα, η μικροβιαμική πνευμονία επιπλέκει κακοήθεις καταστάσεις του αιμοποιητικού, ειδικά μετά από χημειοθεραπεία που προκαλεί βαριά ουδετεροπενία. Η χρόνια λοίμωξη του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος από *P. aeruginosa* είναι συχνή στους ασθενείς με κυστική ίνωση. Τυπικά, παρουσιάζεται σε μεγάλα παιδιά ή νεαρούς ενήλικους και προκαλείται σχεδόν αποκλειστικά από βλεννώδη στελέχη. Η πρωτοπαθής ή μη μικροβιαμική πνευμονία που προκαλεί η *P. aeruginosa* μπορεί να έχει την εικόνα μιας οξείας, επικίνδυνης για τη ζωή λοίμωξης που χαρακτηρίζεται από πυρετό, ρίγη, σοβαρή δύσπνοια, κυάνωση, παραγωγικό βήχα, φοβία, σύγχυση και άλλα σημεία βαριάς συστηματικής τοξίνωσης. Η ακτινογραφία του θώρακα τυπικά δείχνει αμφοτερόπλευρη βρογχοπνευμονία με οζώδεις διηθήσεις και με μικρές περιοχές ακτινοδιαύγειας. Οι πλευριτικές συλλογές είναι συνήθεις, ενώ το εμπύημα είναι σχετικά σπάνιο και περιστασιακά εμφανίζεται λοβώδης πύκνωση. Οι παθολογικές αλλοιώσεις περιλαμβάνουν κυψελιδική

νέκρωση, εστιακές αιμορραγίες και μικροαποστημάτια. Οι σπηλαιώδεις βλάβες είναι ιδιαίτερα κοινές στους ασθενείς με AIDS που έχουν πνευμονία από *P. aeruginosa*. Η μικροβιακή πνευμονία από *P. aeruginosa*, τυπικά συνοδεύεται από ουδετεροπενία, αρχίζει ως λοίμωξη του αναπνευστικού, αλλά στη συνέχεια η εισβολή στην κυκλοφορία του αίματος και η επακόλουθη μεταστατική διασπορά δημιουργεί χαρακτηριστικές αλλοιώσεις στους πνεύμονες και σε άλλα σπλάχνα. Η κυψελιδική αιμορραγία και νέκρωση είναι συχνές. Οι ακτινογραφίες του θώρακα χαρακτηριστικά εμφανίζουν μία βαθμιαία μετάβαση από την πνευμονική αγγειακή συμφόρηση στο 21 διάμεσο οίδημα, κατόπιν στο πνευμονικό οίδημα και τέλος στη διάχυτη νεκρωτική βρογχοπνευμονία με σχηματισμό σπηλαίων. Ο ασθενής κατά κανόνα πεθαίνει 3-4 ημέρες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων. Τα βλεννώδη στελέχη της *P. aeruginosa* προσβάλλουν την κατώτερη αναπνευστική οδό των ασθενών με κυστική ίνωση, συμβάλλοντας στις οξείες αναζωπυρώσεις και στη χρόνια εξέλιξη που χαρακτηρίζουν την πνευμονική εντόπιση στα άτομα αυτά. Στους ασθενείς με κυστική ίνωση υπάρχει αντιστοιχία μεταξύ αποικισμού από *P. aeruginosa* και νόσου των βρόγχων. Δεν είναι σαφές αν η δημιουργία βλεννώδους βύσματος προηγείται της λοίμωξης ή αντιστρόφως, αλλά ανεξάρτητα από αυτό, η απόφραξη των αεραγωγών φαίνεται ότι αρχίζει με βρογχιολίτιδα, η οποία προκαλεί βλεννώδη βυσμάτωση και προδιαθέτει στη λοίμωξη από *P. aeruginosa*. Η τελευταία δημιουργεί περισσότερα βύσματα βλέννας, χρόνια διαπύηση, βρογχεκτασία, ατελεκτασία και τελικά ίνωση. Η διεργασία αυτή εξελίσσεται σε πνευμονική ανεπάρκεια, υποξαιμία και διαταραχή της καρδιοπνευμονικής δυναμικής που καταλήγει σε υπέρταση και σε πνευμονική καρδιά [12]. Οι κλινικές εκδηλώσεις των λοιμώξεων των κατώτερων αναπνευστικών οδών από *P. aeruginosa* στην κυστική ίνωση ποικίλουν ανάλογα με τη βαρύτητα και με τη διάρκεια της υποκείμενης πνευμονοπάθειας και ανάλογα με τη συχνότητα και την ένταση των οξέων επεισοδίων. Στην αρχή της νόσου, οι ασθενείς μπορεί να παρουσιάζουν υποτροπιάζοντα συμπτώματα από το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα συνοδεύόμενα από παρατεταμένο βήχα. Τα επεισόδια της πνευμονίας εκδηλώνονται αργότερα, με επίμονο βήχα μεταξύ των οξέων επεισοδίων. Τελικά, οι ασθενείς παρουσιάζουν χρόνια παραγωγικό βήχα, ανορεξία, απώλεια σωματικού βάρους, καθυστέρηση της ανάπτυξης και μειωμένη δραστηριότητα. Άλλα πιθανά συμπτώματα είναι η δύσπνοια, η ταχύπνοια και η ευερεθιστότητα. Οι οξείες αναζωπυρώσεις τυπικά συνοδεύονται από χαμηλό πυρετό και επιδείνωση των αναπνευστικών συμπτωμάτων. Τα φυσικά σημεία περιλαμβάνουν ενδείξεις δυσθρεψίας, αύξηση της προσθοπίσθιας διαμέτρου, μεσοπλεύριες εισολκές, κυάνωση, εισπνευστικό και εκπνευστικό συριγμό, ρόγχους ξηρούς και υγρούς, διάταση της κοιλιάς και πληκτροδακτυλία χεριών και ποδιών. Τα εργαστηριακά παθολογικά ευρήματα περιλαμβάνουν λευκοκυττάρωση με στροφή προς τα αριστερά και υποξαιμία, με ή χωρίς υπερκαπνία [12]. Η *P. aeruginosa* προκαλεί μία από τις συνηθέστερες και πιο επικίνδυνες για τη ζωή Gram-αρνητικές λοιμώξεις του αίματος σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Η μικροβιαία από *P. aeruginosa* είναι μία από τις συχνές νοσοκομειακές λοιμώξεις και πολλές φορές είναι ιατρογενής. Είναι είτε πρωτοπαθής (χωρίς ανιχνεύσιμη πηγή), είτε δευτεροπαθής από ξεχωριστή εξωαγγειακή εστία. Η μικροβιαία από *P. aeruginosa* σχετίζεται με υποκείμενες καταστάσεις όπως αιματολογικές κακοήθειες, ουδετεροπενία, ανεπάρκειες ανοσοσφαιρινών, σοβαρά εγκαύματα, δερματίτιδα, σακχαρώδη διαβήτης, AIDS και νεογνική πρωϊμότητα. Οι προδιαθεσικοί ιατρογενείς παράγοντες περιλαμβάνουν τη χημειοθεραπεία του καρκίνου, την εισαγωγή οργάνων ή καθετήρων στην ουροποιογεννητική

οδό, την τοποθέτηση ενδοαγγειακών συσκευών, την πρόσφατη χειρουργική επέμβαση, τη θεραπεία με στεροειδή και τη χορήγηση αντιβιοτικών. Τα κλινικά χαρακτηριστικά της μικροβιαμίας από *P. aeruginosa* είναι όμοια με εκείνα άλλων μορφών μικροβιαμίας. Οι συνήθεις πρωτογενείς εστίες λοίμωξης περιλαμβάνουν τις ουροφόρες οδούς, τη γαστρεντερική οδό, τους πνεύμονες, ενδοαγγειακές εστίες, το δέρμα και τα μαλακά μόρια. Πυρετός, ταχύπνοια, ταχυκαρδία και κατάπτωση είναι συνήθη. Μπορεί να παρουσιαστεί απώλεια 22 προσανατολισμού, σύγχυση ή βυθιότητα. Η υπόταση μπορεί να εξελιχτεί σε δυσίατη καταπληξία. Μερικές φορές αναπτύσσονται επιπλοκές με τη μορφή νεφρικής ανεπάρκειας, συνδρόμου αναπνευστικής δυσχέρειας των ενηλίκων ή διάχυτης ενδοαγγειακής πήξης. Ο ίκτερος εμφανίζεται συχνότερα στη μικροβιαμία από *P. aeruginosa* παρά από άλλες μορφές Gram-αρνητικής σηψαιμίας [12]. Οι παθογνωμονικές δερματικές βλάβες που αποτελούν το γαγγραινώδες έκθυμα αναπτύσσονται σε μικρό ποσοστό ασθενών με μικροβιαμία από *P. aeruginosa*. Οι βλάβες αρχίζουν με τη μορφή μικρών αιμορραγικών φυσαλίδων, οι περιβάλλονται από ερυθρηματώδη άλω και υφίστανται κεντρική νέκρωση με επακόλουθη εξέλκωση. Εμφανίζονται μεμονωμένα ή κατά μικρές ομάδες σε περίνεο, γλουτούς, άκρα, μασχάλες και αλλού. Βλάβες τύπου εκθύματος παρατηρούνται ενίοτε στους βλεννογόνους του στόματος και των ούλων. Η ιστολογική εξέταση δείχνει ότι οι βλάβες αυτές περιέχουν πολλά βακτηρίδια που έχουν εισβάλει στα αιμοφόρα αγγεία, αλλά λίγα φλεγμονώδη κύτταρα. Τα βακτηρίδια γίνονται εύκολα ορατά με χρώση κατά Gram και μπορούν να καλλιεργηθούν από δείγματα αναρροφήσεων [12]. Η *P. aeruginosa* προσβάλλει φυσικές καρδιακές βαλβίδες στους τοξικομανείς, αλλά και προσθετικές βαλβίδες. Πηγή των στελεχών της *P. aeruginosa* που προσβάλλουν τους τοξικομανείς φαίνεται ότι είναι το στάσιμο νερό που μολύνει τα σύνεργα της ένεσης. Επιπλέον, οι ξένες προσμίξεις της ηρωίνης είναι δυνατόν να προκαλέσουν βλάβες στις γλωχίνες των βαλβίδων ή στο τοιχωματικό ενδοκάριο, με επακόλουθη ίνωση. Οι παράγοντες αυτοί, σε συνδυασμό με την προφανή προτίμηση του μικροοργανισμού στο ενδοκάριο του ανθρώπου, εξηγούν πιθανώς τη σχέση μεταξύ ενδοκαρδίτιδας από *P. aeruginosa* και ενδοφλέβιας χρήσης ναρκωτικών. Η ιδιαίτερα συχνή έκθεση της τριγλώχινας βαλβίδας σε τραυματισμούς και σε βακτηρίδια ευθύνεται προφανώς για τα υψηλά ποσοστά συμμετοχής της σε σχέση με ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών. Στην ενδοκαρδίτιδα από *P. aeruginosa* μπορεί να προσβληθούν οι βαλβίδες της πνευμονικής αρτηρίας, η μιτροειδής και η αορτική ή το τοιχωματικό ενδοκάριο αμφοτέρων των κόλπων. Η πολυβαλβιδική λοίμωξη είναι συνήθης. Η συμμετοχή της τριγλώχινας ή της δεξιάς πλευράς συνδέεται συχνά με σηπτικά πνευμονικά έμβολα. Η ενδοκαρδίτιδα της δεξιάς πλευράς από *P. aeruginosa* συνήθως έχει υποξεία εμφάνιση, ενώ η εμφάνιση της νόσου της αριστερής πλευράς μπορεί να είναι περισσότερο οξεία ή ακόμα και κεραυνοβόλος. Ο πυρετός είναι σχεδόν μόνιμο σύμπτωμα και συνήθως ανακαλύπτονται φυσήματα με τις πρώτες εκδηλώσεις ή λίγο αργότερα. Τα σηπτικά πνευμονικά έμβολα που συνοδεύουν τη νόσο της δεξιάς πλευράς προκαλούν βήχα, πλευριτικό θωρακικό πόνο, παραγωγή πτυέλων, πνευμονικές διηθήσεις (με ή χωρίς σχηματισμό αποστημάτων) και πλευριτική συλλογή υγρού. Οι λοιμώξεις της αριστερής πλευράς μπορεί να εμφανιστούν σαν επίμονη καρδιακή ανεπάρκεια ή μεγάλα συστηματικά έμβολα. Είναι πιθανόν να δημιουργηθούν μυκητιακά ανευρύσματα, εγκεφαλίτιδα και εγκεφαλικά αποστήματα. Μερικές φορές, ανευρίσκονται σηπτικά έμφρακτα στο σπλήνα, αλλά οι εκδηλώσεις από το δέρμα και τα μαλακά μόρια είναι σχετικά σπάνιες. Η διάγνωση της ενδοκαρδίτιδας από *P. aeruginosa* βασίζεται στη θετική καλλιέργεια του

αίματος χωρίς να υπάρχει εξωκαρδιακή πηγή, στις ενδείξεις βαλβιδικής δυσλειτουργίας ή εκπλαστήσεων από το ηχοκαρδιογράφημα, στις ενδείξεις σηπτικών πνευμονικών αλλοιώσεων στην ακτινογραφία του θώρακα (σε νόσο της δεξιάς πλευράς) και στην ανακάλυψη των πραγματικά κατεστραμμένων βαλβίδων κατά τη διάρκεια της εγχείρησης[12, 20]. Οι λοιμώξεις του ΚΝΣ από *P. aeruginosa* περιλαμβάνουν τη μηνιγγίτιδα και το εγκεφαλικό απόστημα. Αυτές οι λοιμώξεις οφείλονται σε επέκταση από γειτονικούς στις μήνιγγες ιστούς, σε άμεσο ενοφθαλμισμό του υπαραχνοειδούς χώρου ή του εγκεφάλου από τραυματισμό ή εγχείρηση της κεφαλής και σε μικροβιαμική διασπορά από μακρινή θέση, όπως ουροφόρος οδός, πνεύμονας ή καρδιακή βαλβίδα. Όπως οι λοιμώξεις άλλων ανατομικών περιοχών από την *P. aeruginosa*, οι λοιμώξεις του ΚΝΣ διαπιστώνονται σχεδόν αποκλειστικά σε ασθενείς με κατασταλαμένους του τοπικούς ή συστηματικούς ανοσολογικούς αμυντικούς μηχανισμούς. Τα κλινικά σημεία της μηνιγγίτιδας από *P. aeruginosa*, όπως εκείνα άλλων μορφών οξείας μικροβιακής μηνιγγίτιδας, περιλαμβάνουν πυρετό, κεφαλαλγία, αυχενική δυσκαμψία, σύγχυση και βυθιότητα. Η εισβολή της νόσου μπορεί να είναι οξεία ή ακόμα και κεραυνοβόλος, ιδιαίτερα σε ασθενείς με μικροβιαμία, με συνεχώς επιδεινούμενη κατάσταση, καταπληξία, κόμα και σύντομο θάνατο. Σε ασθενείς χωρίς μικροβιαμία, η μηνιγγίτιδα ή το εγκεφαλικό απόστημα από *P. aeruginosa* μπορεί να εκδηλωθούν πιο ύπουλα, με ελάχιστα συστηματικά συμπτώματα. Η εμφάνιση αυτή είναι ιδιαίτερα συνήθης στις λοιμώξεις που οφείλονται σε πρόσφατη νευροχειρουργική επέμβαση, σε καρκίνο της κεφαλής ή του τραχήλου ή σε άμεση επέκταση από παραμηνιγγική εστία χρόνιας λοίμωξης. Ενίοτε, η μηνιγγίτιδα από *P. aeruginosa* ακολουθεί μία πορεία υποξεία ή με υποτροπές, η οποία πιστεύεται ότι οφείλεται στην ασυνεχή απελευθέρωση βακτηριδίων από μία κυψελιδώδη περιοχή λοίμωξης. Χρόνια ή υποτροπιάζουσα μηνιγγίτιδα μπορεί να προέλθει από μία μεταβολή της ανατομικής του κρανίου, οφειλόμενη σε όγκο του ΚΝΣ, τραυματική βλάβη, νευροχειρουργική επέμβαση, ένθεση στερεού σώματος ή διαρροές ΕΝΥ[12]. Η σπονδυλική οστεομυελίτιδα που οφείλεται στην *P. aeruginosa* έχει σχέση με επιπλακείσα λοίμωξη των ουροφόρων οδών, με επεμβάσεις στο ουροποιηγεννητικό σύστημα και με τοξικομανία. Λοιμώξεις των σπονδύλων που συσχετίζονται με πηγή της ουροφόρας οδού αναπτύσσονται συχνότερα στους ηλικιωμένους και συνήθως αφορούν την ιεροσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης. Οι λοιμώξεις που συσχετίζονται με τοξικομανία τυπικά εμφανίζονται σε νεότερους ασθενείς και είναι δυνατόν να προσβάλουν την τραχηλική ή την ιεροσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης. Τα συμπτώματα της σπονδυλικής οστεομυελίτιδας από *P. aeruginosa* μπορεί να αναπτύσσονται εβδομάδες ή και μήνες πριν από τη διάγνωση. Γενικά αναφέρεται πόνος του τραχήλου ή της ράχης, ενώ ο πυρετός και τα συστηματικά συμπτώματα είναι σχετικά σπάνια. Η τοπική ευαισθησία και η περιορισμένη κινητικότητα της προσβεβλημένης μοίρας της σπονδυλικής στήλης είναι τυπικά ευρήματα. Μπορεί να εμφανιστεί λευκοκυττάρωση, η ΤΚΕ σχεδόν πάντοτε είναι πολύ υψηλή και οι αιμοκαλλιέργειες μερικές φορές είναι θετικές. Η αιτιολογική διάγνωση προϋποθέτει την καλλιέργεια υλικού που λαμβάνεται με βελόνα ή με βιοψία της προσβεβλημένης σπονδυλικής στήλης, υπό ακτινολογική καθοδήγηση. Μερικές φορές απαιτείται ανοικτή βιοψία [12]. Οι λοιμώξεις της ηβικής σύμφυσης από *P. aeruginosa* συνδέονται με εγχειρήσεις της πυέλου και με ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών. Για τη λήψη υλικού προς καλλιέργεια είναι απαραίτητη η αναρρόφηση ή η βιοψία με βελόνα. Η σημασία της θετικής καλλιέργειας είναι ουσιώδης για τη διάκριση των λοιμώξεων από *P. aeruginosa* και των άλλων πυογόνων λοιμώξεων από την

οστίτιδα του ηβικού οστού, η οποία θεωρείται μη λοιμώδης κατάσταση που επιπλέκει εγχειρήσεις ή τραυματισμούς της πυέλου και τοκετούς [12]. Η οστεοχονδρίτιδα του άκρου ποδός από *P. aeruginosa* είναι συνέπεια βαθέως τραύματος του άκρου ποδός, κυρίως σε παιδιά. Ο μικροοργανισμός προσβάλλει τις μικρές αρθρώσεις και οστά του άκρου ποδός, συμπεριλαμβανομένων των εγγύς φαλάγγων, των μεταταρσίων, των μεταταρσιοφαλαγγικών αρθρώσεων, των οστών του τάρσου και της πτέρνας. Η *P. aeruginosa* δείχνει ιδιαίτερη προτίμηση στους χόνδρους. Η αναρρόφηση από την προσβεβλημένη άρθρωση συνήθως αποδίδει πυώδες υλικό στο οποίο μπορεί να βρεθεί η *P. aeruginosa* με χρώση κατά Gram και με καλλιέργεια [12]. Η *P. aeruginosa* είναι ένας από τους συνηθέστερους αιτιολογικούς παράγοντες για μία ποικιλία άλλων, λιγότερο ειδικών, συνδρόμων, που αφορούν μη αιματογενείς λοιμώξεις των οστών και των αρθρώσεων και συνοπτικά αναφέρονται ως χρόνια επινεμητική οστεομυελίτιδα. Οι λοιμώξεις αυτές είναι δυνατόν να οφείλονται, για παράδειγμα, σε σύνθετα κατάγματα, στη μόλυνση που συνοδεύει την ανοιχτή ανάταξη και σταθεροποίηση κλειστών καταγμάτων, στη στερνοτομή που εκτελείται σε καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις, σε επέκταση από παρακείμενα μολυσμένα ισχαιμικά έλκη που έχουν σχέση με περιφερική αγγειοπάθεια ή με σακχαρώδη διαβήτη και σε φλέγμονα γενικότερα. Η χρονιότητα, η αργή εξέλιξη και η ετερογένεια αυτών των λοιμώξεων εξηγούν την ποικιλία των κλινικών εκδηλώσεων και τη συχνή ανάγκη για περίπλοκη μακροχρόνια αντιμετώπιση [12]. Έχουν περιγραφεί λοιμώξεις από *P. aeruginosa* σχεδόν για κάθε τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα του ανθρώπου. Η γαστρεντερική λοίμωξη από *P. aeruginosa* είναι συνηθέστερη σε βρέφη και σε ενήλικες με αιματολογικές κακοήθειες νόσους και ουδετεροπενία. Επιπλέον, ο ασυμπτωματικός αποικισμός του παχέος εντέρου, που οφείλεται σε παρατεταμένη έκθεση στο νοσοκομειακό περιβάλλον και στην επιλεκτική πίεση των αντιβιοτικών, μπορεί να αποτελέσει μία σιωπηλή πηγή μικροοργανισμών οι οποίοι εισβάλουν ακολούθως στην κυκλοφορία του αίματος, κατά τη διάρκεια σοβαρής ουδετεροπενίας, λόγω χημειοθεραπείας ή άλλων μορφών ανοσοκαταστολής. Η *P. aeruginosa* προκαλεί νεκρωτική εντεροκολίτιδα σε βρέφη και μία παρόμοια νόσο στους ουδετεροπενικούς ασθενείς με καρκίνο. Οι συνηθέστερες θέσεις προσβολής είναι ο τελικός ειλεός, το τυφλό και το παχύ έντερο. Οι παθολογοανατομικές βλάβες είναι αιμορραγικά και νεκρωτικά έλκη τα οποία εκκινούν από το βλεννογόνο του εντέρου και επεκτείνονται μέσα στον υποβλεννογόνο χιτώνα. Μπορεί να παρατηρηθεί εισβολή των βακτηριδίων στα αγγεία του υποβλεννογόνιου χιτώνα, σε συνδυασμό με μικροβιαμία, τοπική επέκταση στο μυϊκό και στον ορογόνο χιτώνα και επακόλουθη διάτρηση που οδηγεί σε περιτονίτιδα. Νεκρωτικά έλκη ενίοτε ανευρίσκονται επίσης στο στοματοφάρυγγα, στον οισοφάγο, στο στόμαχο ή στην αρχική μοίρα του λεπτού εντέρου. Η τυφλίτιδα, μία νόσος που αναπτύσσεται συχνότερα σε ασθενείς με λευχαιμία, περιλαμβάνει τοπικές βλάβες του τυφλού που έχουν σχέση με νέκρωση ή με γάγγραινα και που μερικές φορές καταλήγουν σε διάτρηση, μικροβιακή περιτονίτιδα και πρόιμο θάνατο. Η *P. aeruginosa* είναι το βακτηρίδιο που ανευρίσκεται συχνότερα σε αυτή την κατάσταση. Ο μικροοργανισμός αυτός συγκαταλέγεται επίσης στα παθογόνα που απομονώνονται συχνότερα από αποστήματα του πρωκτού ουδετεροπενικών ασθενών με καρκίνο. Οι βλάβες αυτές, οι οποίες μπορεί να συνοδεύονται από ελάχιστα σημεία και συμπτώματα, πρέπει να αναζητούνται επισταμένως στους επιρρεπείς ασθενείς, επειδή είναι δυνατόν να αποτελέσουν την αφετηρία επικίνδυνης για τη ζωή σηψαιμίας αν δεν παροχετευτούν χειρουργικά [12]. Η *P. aeruginosa* έχει ενοχοποιηθεί για επιδημίες μέτριας έως βαριάς διάρροιας σε παιδιά, για

έναν τύπο εντερικού πυρετού που μερικές φορές αποκαλείται πυρετός της Σαγκάης και για μία νόσο σαν τη χολέρα η οποία αποδίδεται σε μία υποτιθέμενη και ακόμα άγνωστη εντεροτοξίνη της ψευδομονάδας[ 22]. Η *P. aeruginosa* είναι ένα από τα συνηθέστερα αίτια επιπλεγμένων και νοσοκομειακών λοιμώξεων των ουροφόρων οδών. Οι λοιμώξεις αυτές μπορεί να προέλθουν από καθετηριασμό, εισαγωγή οργάνων, χειρουργική επέμβαση, απόφραξη των ουροφόρων οδών και κυστεοουρητηρική παλινδρόμηση, μπορεί να δημιουργηθούν από μόνιμες εστίες (π.χ. προστάτης ή λίθοι) και μπορεί να είναι χρόνιες ή υποτροπιάζουσες. Οι ουροφόρες οδοί είναι πιθανόν να γίνουν στόχος αιματογενούς διασποράς σε ασθενείς με μικροβαιμία από *P. aeruginosa*, αλλά περισσότερο συχνά αποτελούν την πηγή της μικροβαιμίας. Οι χρόνιες ουρολοιμώξεις από *P. aeruginosa* είναι σχετικά συνήθεις σε ασθενείς με μόνιμους καθετήρες Foley, με τροποποιημένη ανατομία των ουροφόρων οδών λόγω επεμβάσεων εκτροπής των ούρων και με παραπληγία. Μερικές ασυνήθιστες μορφές προσβολής των ουροφόρων οδών, χαρακτηριστικές της *P. aeruginosa*, είναι οι ελκωτικές βλάβες της νεφρικής πυέλου, των ουρητήρων και της ουροδόχου κύστης, οι οποίες προκαλούν εσχαροποίηση και απόπτωση της κυστικής μεμβράνης μέσα στα ούρα και εισβολή των βακτηριδίων στα νεφρικά αιμοφόρα αγγεία, η οποία δημιουργεί αλλοιώσεις όπως το έκθυμα, συνοδευόμενες από ψευδομοναδική σηψαιμία[12]. Η μικροβαιμία από *P. aeruginosa* μπορεί να συνδυάζεται με γαγγραινώδες έκθυμα. Η *P. aeruginosa* σχεδόν πάντοτε μπορεί να αναπτυχθεί σε καλλιέργειες υλικού από τις δερματικές βλάβες. Λιγότερο συνήθεις δερματικές εκδηλώσεις της σήψης από *P. aeruginosa* είναι φυσαλιδώδεις ή φλυκταινώδεις βλάβες, πομφόλυγες, υποδόρια οζίδια, εν τω βάθει αποστήματα και φλέγμονας (κυτταρίτιδα). Οι μεταστατικές βλάβες του δέρματος ή των βλεννογόνων επιπλέκουν τη σήψη από ψευδομονάδα και ενίοτε προκαλούν μαζική νέκρωση ή γάγγραινα των άκρων, του περινέου, του προσώπου και του στοματοφάρυγγα. Πρωτοπαθής πυοδερματίτιδα από *P. aeruginosa* δημιουργείται όταν υπάρχει λύση της συνέχειας του δέρματος λόγω τραυματισμού, εγκαύματος, δερματίτιδας ή έλκους οφειλόμενου σε περιφερική αγγειοπάθεια ή σε κατάκλιση. Οι συνθήκες υγρασίας σαν αυτές που υπάρχουν στο περίνεο ή κάτω από τις βρεφικές πάνες, ευνοούν την ανάπτυξη πυοδερματίτιδας από *P. aeruginosa*. Η *P. aeruginosa* προκαλεί διάχυτα κνησμώδη κηλιδοβλατιδώδη και φυσαλιδοφλυκταινώδη εξανθήματα που έχουν σχέση με έκθεση σε θερμά λουτρά, θερμοπηγές, υδρομασάζ και κολυμβητικές πισίνες. Οι περισσότερες περιπτώσεις δερματίτιδας από *P. aeruginosa* εκδηλώνονται στα πλαίσια επιδημίας από κάποια κοινή πηγή [12]. Η *P. aeruginosa* ανευρίσκεται συχνά στον έξω ακουστικό πόρο, ιδιαίτερα σε συνθήκες υγρασίας και ύπαρξης φλεγμονής ή διαβροχής. Επιπλέον, ο μικροοργανισμός αυτός είναι το κυρίαρχο παθογόνο σε περιπτώσεις έξω ωτίτιδας, μιας συνήθως καλοήθους φλεγμονώδους διεργασίας η οποία προσβάλλει τον έξω ακουστικό πόρο. Αυτή η αυτοπεριοριζόμενη κατάσταση δημιουργεί περιβάλλον κατάλληλο για την ανάπτυξη της *P. aeruginosa* η οποία, με τη σειρά της, φαίνεται να συμβάλλει στη φλεγμονώδη διεργασία. Το αυτί είναι επώδυνο ή απλώς κνησμώδες, υπάρχει πυώδες έκκριμα και εκλύεται πόνος με έλξη του πτερυγίου. Ο εξωτερικός πόρος εμφανίζεται οιδηματώδης και πλήρης υπολειμμάτων τα οποία συχνά αποκρύπτουν τον τυμπανικό υμένα. Η *P. aeruginosa* ενίοτε εισχωρεί στο επιθήλιο που επικαλύπτει το έδαφος του έξω ακουστικού πόρου στη συμβολή του οστού με το χόνδρο και εισβάλλει στα υποκείμενα μαλακά μόρια. Η επακόλουθη διεισδυτική διεργασία, η οποία περιλαμβάνει μαλακά μόρια, χόνδρο και φλοιώδη ουσία του οστού, τυπικά είναι αργή αλλά καταστροφική. Επονομαζόμενη κακοήθης έξω ωτίτιδα, η

κατάσταση αυτή [23] εμφανίζεται κυρίως σε ηλικιωμένους μη διαβητικούς ασθενείς. Σχεδόν όλες οι περιπτώσεις κακοήθους έξω ωτίτιδας οφείλονται στην *P. aeruginosa*. Από το έξω ους, η λοίμωξη επεκτείνεται στην οπισθογναθική χώρα ή στο χώρο της παρωτίδας και εισέρχεται στις μαστοειδείς κυψέλες και στο κροταφικό οστό. Η επεκτεινόμενη οστεομυελίτιδα στη βάση του κρανίου συχνά προσβάλλει τα έβδομο, ένατο, δέκατο και ενδέκατο κρανιακά νεύρα. Μπορεί να προσβληθεί ο σφηραγγώδης κόλπος και το αντίπλευρο λιθοειδές. Το μέσον ους συνήθως παραμένει ελεύθερο, ενώ η μηνιγγίτιδα και το εγκεφαλικό απόστημα είναι σπάνιες επιπλοκές. Η ωταλγία και η ωτόρροια είναι συνήθη συμπτώματα της κακοήθους έξω ωτίτιδας. Η παράλυση του προσωπικού νεύρου συχνά εμφανίζεται νωρίς, ενώ οι παραλύσεις άλλων κρανιακών νεύρων παρουσιάζονται αργότερα. Μπορεί να υπάρξει απώλεια της ακοής, το πτερύγιο του αυτιού συνήθως είναι επώδυνο και η ύπαρξη τρισμού είναι ένδειξη κροταφογναθικής συμμετοχής. Τα γενικά συμπτώματα, όπως πυρετός και απώλεια σωματικού βάρους, είναι σχετικά σπάνια. Η κλινική εξέταση σχεδόν πάντοτε αποκαλύπτει ανωμαλίες του έξω ακουστικού πόρου, όπως οίδημα, ερύθημα, πυώδες έκκριμα, συντρίμματα και κοκκιώδη ιστό στο τοίχωμα του πόρου. Ο τυμπανικός υμένας συχνά είναι κρυμμένος και μερικές φορές υπάρχει διάτρησή του. Η φλεγμονή μπορεί να επεκταθεί στο πτερύγιο καθώς και στην περιωτική, οπισθογναθιαία και μαστοειδή χώρα. Η αμφοτερόπλευρη νόσος είναι σπάνια, αλλά μπορεί να συμβεί. Η λευκοκυττάρωση του περιφερικού αίματος είναι σχετικά σπάνια στην κακοήθη έξω ωτίτιδα, ενώ η ΤΚΕ συνήθως είναι πολύ υψηλή. Το ΕΝΥ ενίοτε παρουσιάζει λεμφοκυττάρωση και αύξηση του επιπέδου των πρωτεϊνών. Η αξονική τομογραφία (CT) ή η πολυτομογραφία του μαστοειδούς και του κροταφικού οστού τυπικά αποκαλύπτουν οστικές διαβρώσεις και σχηματισμό νέου οστού, ενώ το έδαφος του κρανίου μπορεί να έχει περιοχές πύκνωσης των μαλακών μορίων που αντιστοιχούν σε περιοχές φλέγμονα. Η μαγνητική τομογραφία (MRI) μπορεί να σκιαγραφήσει τη συμμετοχή των μαλακών μορίων με μεγαλύτερη ευαισθησία και ακρίβεια από τη CT. Επιπλέον, τα σπινθηρογραφήματα οστών με τεχνήτιο 99m και με γάλλιο 67 συχνά δίνουν θετικά αποτελέσματα. Οι καλλιέργειες δειγμάτων από τον έξω ακουστικό πόρο και από χειρουργικές λήψεις σχεδόν πάντοτε είναι θετικές για *P. aeruginosa* [12]. Η *P. aeruginosa* εμπλέκεται συχνά σε χρόνιες διαπηθικές ωτίτιδες παιδιών και ενηλίκων, όπου είτε είναι το μοναδικό μικροβιακό είδος, είτε συγκαταλέγεται στα μικρόβια που απομονώνονται από το μέσο και έξω ους, στην πλειονότητα των περιπτώσεων, και πιστεύεται ότι παίζει βασικό παθογενετικό ρόλο [12]. Η *P. aeruginosa* προκαλεί βακτηριδιακή κερατίτιδα ή έλκος του κερατοειδούς και ενδοφθαλμίτιδα στον άνθρωπο. Η κερατίτιδα από *P. aeruginosa* μπορεί να δημιουργηθεί ακόμα και από μικροτραυματισμό του κερατοειδούς, ο οποίος διασπά την ακεραιότητα της επιπολής επιθηλιακής στοιβάδας και επιτρέπει την είσοδο βακτηριδίων στο υποκείμενο ινώδες υπόστρωμα. Το έλκος του κερατοειδούς μπορεί να επιπλέξει τη χρήση φακών επαφής, κυρίως όταν πρόκειται για μακροχρόνια εφαρμογή μαλακών φακών. Το διάλυμα διατήρησης των φακών επαφής ή οι φακοί οι ίδιοι μπορεί να είναι πηγή του μικροοργανισμού, ο οποίος πιθανώς εισάγεται στον οφθαλμό από σημεία μικροτραυματισμού του κερατοειδούς από τους φακούς. Ασθενείς που έχουν υποστεί σοβαρά εγκαύματα, έχουν υποβληθεί σε ακτινοβολία των οφθαλμών ή σε τραχειοστομία, έχουν εκτεθεί στο περιβάλλον μονάδας εντατικής θεραπείας ή και βρίσκονται σε κώμα είναι επίσης επιρρεπείς σε έλκη του κερατοειδούς από *P. aeruginosa*. Η κερατίτιδα από *P. aeruginosa* συνήθως αρχίζει με τη μορφή μικρού κεντρικού έλκους, επεκτείνεται ομόκεντρα μέχρι να καλύψει [24] μεγάλο τμήμα του



κερατοειδούς, του σκληρού και του ινώδους υποστρώματος και σε μερικές περιπτώσεις δημιουργεί διάτρηση στον οπίσθιο κερατοειδή. Το έλκος του κερατοειδούς από *P. aeruginosa* μπορεί να επεκταθεί γρήγορα και να καλύψει ολόκληρο το κερατοειδή μέσα σε 2 ημέρες ή λιγότερο, ή να έχει υποξεία εξέλιξη διάρκειας αρκετών ημερών. Η ενδοφθαλμίτιδα από την *P. aeruginosa* μπορεί να επιπλέξει διεισδυτικά τραύματα του οφθαλμού, ενδοφθαλμικές εγχειρήσεις, αιματογενή διασπορά από άλλες θέσεις λοίμωξης από *Pseudomonas* ή οπίσθια διάτρηση έλκους του κερατοειδούς. Κατά κανόνα είναι μία ταχέως εξελισσόμενη κατάσταση που απειλεί την όραση και απαιτεί άμεση θεραπευτική παρέμβαση[12].

## 1.7 ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η εμπειρική θεραπεία με αντιβιοτικά για υπογία *P. aeruginosa* περιλαμβάνει μονοθεραπεία και συνδυασμένη θεραπεία. Ωστόσο, η θεραπεία των μολύνσεων από *P. aeruginosa* αποτελεί μια μεγάλη πρόκληση λόγω της ικανότητας αυτού του βακτηρίου να αντιστέκεται σε πολλά από τα διαθέσιμα σήμερα αντιβιοτικά. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (Π.Ο.Υ.) ανέφερε πρόσφατα τη *P. aeruginosa* ανθεκτικό σε καρβαπενέμη ως ένα από τα τρία βακτηριακά είδη στα οποία υπάρχει κρίσιμη ανάγκη για την ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών για τη θεραπεία λοιμώξεων. Επιπλέον, η υπερβολική χρήση αντιβιοτικών κατά τη διάρκεια της θεραπείας επιταχύνει την ανάπτυξη στελεχών *P. aeruginosa* ανθεκτικών σε πολλαπλά φάρμακα, οδηγώντας στην αναποτελεσματικότητα της εμπειρικής αντιβιοτικής θεραπείας έναντι αυτού του μικροοργανισμού .

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

Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά ένα τετραμελή β- λακταμικό δακτύλιο που περιέχει άζωτο και παρεμβαίνουν στη σύνθεση του βακτηριακού τοιχώματος ,αναστέλλοντας κυρίως τις σταυρο-συνδέσεις των πεπτιδικών αλυσίδων και του κυτταρικού τοιχώματος. Περιλαμβάνουν τέσσερις υποκατηγορίες i) πενικιλίνες ii) τις κεφαλοσπορίνες iii) τις καρβαπενέμες και iv) τις μονοβακτάμες. Οι β- λακατάμες είναι βακτηριοκτόνες, έχουν μεγάλο θεραπευτικό δείκτη και οι περισσότερες από αυτές αποβάλλονται αναλλοίωτες στα ούρα, γεγονός που τις καθιστά απολύτως κατάλληλες για τη θεραπεία ουρολοιμώξεων. Ωστόσο κάνουν ανεπιθύμητες αλλεργικές αντιδράσεις ,με το πιο συχνό το ερυθματώδες κηλιδοβλατιδώδες εξάνθημα με κνησμό.

### 1.7.1 Αντιψευδομοναδικά β- λακταμικά αντιβιοτικά

Αντιβιοτικά με αντιψευδομοναδική δράση βρίσκουμε στις β-λακτάμες (πενικιλίνες, κεφλοσπορίνες, μονοβακτάμες, καρβαπενέμες), στις αμινογλυκοσίδες, στις κινολόνες και στις πολυμιξίνες.

**Αντιψευδομοναδικές πενικιλίνες:** Στις αντιψευδομοναδικές πενικιλίνες διακρίνουμε δύο βασικές ομάδες, οι οποίες έχουν μελετηθεί και εφαρμοστεί θεραπευτικά, τις

καρβοξυπενικιλίνες, που περιλαμβάνουν την καρμπενικιλίνη και την τικαρσιλλίνη, και τις ουρεϊδοπενικιλίνες, που περιλαμβάνουν την μεζλοκιλλίνη, την αζλοκιλλίνη και την πιπερακιλλίνη. Η τικαρσιλλίνη είναι τουλάχιστον 2-4 φορές πιο δραστική από την καρμπενικιλίνη, αλλά η διασταυρούμενη αντοχή αποτελεί κανόνα. Η υψηλή αντοχή που παρατηρείται στην τικαρσιλλίνη δεν επιτρέπει την χρήση της σε εμπειρική θεραπεία. Οι καρβοξυπενικιλίνες δεν κυκλοφορούν στην Ελλάδα. Οι ουρεϊδοπενικιλίνες θεωρούνται πενικιλίνες τέταρτης γενιάς και χορηγούνται ενδομυϊκά και ενδοφλέβια. Η μεζλοκιλλίνη έχει περιορισμένη δραστικότητα έναντι της *P. aeruginosa*. Η πιπερακιλλίνη εμφανίζεται 2 φορές πιο δραστική από την αζλοκιλλίνη. Όλες οι αντιψευδομοναδικές πενικιλίνες περνούν ελάχιστα στις βρογχικές εκκρίσεις, γεγονός που πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη στη θεραπεία πνευμονικών λοιμώξεων, ιδιαίτερα σε ασθενείς με κυστική ίνωση. Επίσης, για την αντιμετώπιση των ψευδομοναδικών λοιμώξεων μπορεί να χρησιμοποιηθούν και αντιψευδομοναδικές πενικιλίνες σε συνδυασμό με αναστολείς β-λακταμασών, όπως πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη και τικαρσιλλίνη-κλαβουλανικό οξύ. Ο συνδυασμός τικαρσιλλίνη-κλαβουλανικό οξύ δεν αποδίδει ιδιαίτερα, σε αντίθεση με το συνδυασμό πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη, γιατί το κλαβουλανικό οξύ επάγει την παραγωγή AmpC κεφαλοσπορινάσης από την *P. aeruginosa* [29, 30]. Αντιψευδομοναδικές κεφαλοσπορίνες: Έχουν αναπτυχθεί τρεις ομάδες κεφαλοσπορινών με αντιψευδομοναδική δράση. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι κεφαλοσπορίνες 3ης γενιάς, όπως η κεφταζιντίμη, η κεφοπεραζόνη και η κεφσουλοδίνη. Η κεφταζιντίμη είναι η πιο δραστική κεφαλοσπορίνη έναντι της *P. aeruginosa*. Η κεφοπεραζόνη φαίνεται να έχει παρόμοια αντιψευδομοναδική δράση με την αζλοκιλλίνη και την πιπερακιλλίνη. Η κεφσουλοδίνη είναι μία στενού φάσματος κεφαλοσπορίνη με δράση κυρίως έναντι της *P. aeruginosa*. Στην δεύτερη ομάδα ανήκουν οι κεφαλοσπορίνες 4ης γενιάς, όπως η κεφεπίμη και η κεφπιρόμη. Όλα τα αντιβιοτικά της ομάδας έχουν ευρύ φάσμα δράσης που περιλαμβάνει αερόβια και αναερόβια βακτήρια, όπως και την *P. aeruginosa*. Στην τρίτη ομάδα ανήκουν οι ονομαζόμενες κατεχολικές κεφαλοσπορίνες, οι οποίες εισέρχονται στο βακτηριακό κύτταρο διαμέσου του συστήματος μεταφοράς σιδήρου και έτσι παρακάμπτουν το μηχανισμό άμυνας που εκφράζεται ως μειωμένη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης. Για άγνωστους λόγους, κανείς από τους αντιμικροβιακούς παράγοντες της τρίτης ομάδας δε χρησιμοποιήθηκε στην κλινική πράξη[29, 30].

**Μονοβακτάμες:** Η αζτρεονάμη είναι η μόνη διαθέσιμη μονοβακτάμη με αντιψευδομοναδική δράση. Είναι 2 φορές λιγότερο δραστική από την κεφταζιντίμη και αποτελεί ήπιο επαγωγέα χρωμοσωμικών β-λακταμασών. Συγκεντρώνεται ικανοποιητικά στο φλεγμένων εγκεφαλονωτιαίο υγρό, στις βρογχικές εκκρίσεις και στον προστατικό ιστό. Χορηγείται εναλλακτικά σε ασθενείς με γνωστή αλλεργία σε β-λακτάμες[29, 30].

**Καρβαπενέμες:** Οι καρβαπενέμες κατέχουν το ευρύτερο φάσμα αντιμικροβιακής δράσης μεταξύ των β-λακταμικών αντιβιοτικών. Συνήθως δεν υπάρχει διασταυρούμενη αντοχή μεταξύ των καρβαπενεμών και των υπολοίπων ομάδων αντιμικροβιακών. Σε αντίθεση με τα άλλα β-λακταμικά αντιβιοτικά, τα οποία 32 χρησιμοποιούν ως αρχικό στόχο την πενικιλινοδοσμευτική πρωτεΐνη 3 (PBP-3) του βακτηριακού τοιχώματος, οι καρβαπενέμες, ιμιπενέμη και μεροπενέμη, χρησιμοποιούν τις πενικιλινοδοσμευτικές πρωτεΐνες 2 και 1 ή 2 και 3 με αποτέλεσμα την ταχεία λύση του βακτηριακού κυττάρου. Η ιμιπενέμη και η

μεροπενέμη έχουν παρόμοια φαρμακοκινητική με σχεδόν ίδιες συγκεντρώσεις σε διάφορους ιστούς και υγρά του οργανισμού. Μοναδική, αλλά σημαντική εξαίρεση αποτελεί η αδρανοποίηση της ιμιπενέμης, όχι όμως και της μεροπενέμης, από τη νεφρική αφυδροπεπτιδάση, γεγονός που αντιμετωπίζεται με την ταυτόχρονη χορήγηση σιλαστατίνης με την ιμιπενέμη. Νεότερες καρβαπενέμες, όπως μπιαπενέμη και πανιπενέμη, έχουν ισχυρότερη *in vitro* δραστηριότητα έναντι της *P. aeruginosa*, συμπεριλαμβάνοντας και στελέχη ανθεκτικά στην ιμιπενέμη και τη μεροπενέμη. Η ντοριπενέμη είναι μία νέα καρβαπενέμη με ιδιότητες παρόμοιες με τη μεροπενέμη, αλλά με ισχυρότερη *in vitro* δραστηριότητα έναντι της *P. aeruginosa*. Απαιτούνται κλινικές μελέτες για την εδραίωση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειάς της κατά τη χρήση για την αντιμετώπιση σοβαρών νοσοκομειακών λοιμώξεων [29-31].

**Αμινογλυκοσίδες:** Οι αμινογλυκοσίδες αποτελούν σημαντικό όπλο για την αντιμετώπιση των ψευδομοναδικών λοιμώξεων γιατί έχουν βασικά πλεονεκτήματα. Η εξαιρετική και ταχεία βακτηριοκτόνος δράση τους, που εξαρτάται από τη συγκέντρωση, είναι καθοριστικός παράγοντας για την πρόγνωση σοβαρών λοιμώξεων σε ουδετεροπενικούς ασθενείς ή σε απειλητικές για τη ζωή νοσοκομειακές λοιμώξεις των μονάδων εντατικής θεραπείας, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια του πρώτου 24ώρου. Έχουν περιορισμένη τάση να αναπτύξουν αντοχή κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Έχουν συνεργική δράση όταν συνδυάζονται με αντιψευδομοναδικές πενικιλίνες και κεφαλοσπορίνες *in vitro* και *in vivo*. Επίσης, δεν παρατηρείται το φαινόμενο του ενοφθαλμισμού κατά τον εργαστηριακό έλεγχο της αντιμικροβιακής τους δραστηριότητας. Όλες οι αμινογλυκοσίδες μοιράζονται τα ίδια μειονεκτήματα, όπως νεφροτοξικότητα, ωτοτοξικότητα, νευρομυϊκός αποκλεισμός, φτωχή κινητικότητα στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, σε τμήματα του οφθαλμού και στον προστάτη. Επίσης, παρατηρείται *in vivo* αδρανοποίηση σε υψηλή συγκέντρωση πενικιλινών και κεφαλοσπορινών[29, 30, 32].

**Κινολόνες:** Μεταξύ των διαθέσιμων φλουοροκινολονών, η σιπροφλοξασίνη είναι η πιο δραστηριότητα έναντι της *P. aeruginosa*. Συνεργική ή αθροιστική δράση με αμικασίνη ή αντιψευδομοναδικές β-λακτάμες, συμπεριλαμβανομένης και της ιμιπενέμης, έχει αναφερθεί σε ποσοστό μικρότερο από 50% στις *P. aeruginosa* που ελέγχθηκαν *in vitro*. Μεταξύ των νεότερων κινολονών ( π.χ. λεβοφλοξασίνη, λομεφλοξασίνη, ρουφλοξασίνη, γκρεπαφλοξασίνη, μοξιφλοξασίνη, γκατιφλοξασίνη, σπαρφλοξασίνη, κλιναφλοξασίνη και τροβαφλοξασίνη) μόνο οι 2 τελευταίες έχουν αντιψευδομοναδική δράση, ενώ οι υπόλοιπες έχουν ενδιάμεση ή φτωχή δραστηριότητα. Ένα χρόνο μετά την εισαγωγή της τραβοφλοξασίνης στην αγορά της Αμερικής, αναφέρθηκε ηπατοτοξικότητα που οδήγησε σε θάνατο, με αποτέλεσμα ο FDA (Food and Drug Administration) να περιορίσει τη χρήση της μόνο σε νοσοκομειακές λοιμώξεις με ειδικές ενδείξεις[29, 30, 32].

**Πολυμυξίνες:** Οι πολυμυξίνες είναι μία ομάδα πολυπεπτιδικών αντιβιοτικών, που περιλαμβάνει 5 διαφορετικές χημικές ενώσεις (πολυμυξίνες Α-Ε). Μόνο η πολυμυξίνη Β και η πολυμυξίνη Ε (κολιστίνη) έχουν χρησιμοποιηθεί στην κλινική πράξη. Η κολιστίνη έχει εξαιρετική βακτηριοκτόνο δράση έναντι της *P. aeruginosa*[39]. Συνοψίζοντας, η εκλογή αντιβιοτικού με αντιψευδομοναδική δραστηριότητα περιλαμβάνει αμινογλυκοσίδες (π.χ. γενταμικίνη, τομπραμυκίνη, νετιλμικίνη, αμικακίνη), ορισμένες κεφαλοσπορίνες τρίτης

γενιάς (π.χ. κεφταζιδίμη, κεφοπεραζόνη), ορισμένες πενικιλίνες εκτεταμένου φάσματος (π.χ. τικαρσιλλίνη, τικαρσιλλίνη/κλαβουλανικό, πιπερακιλλίνη, πιπερακιλλίνη/ταζοβακτάμη, μεζλοκιλλίνη, αζλοκιλλίνη), καρβαπενέμες (π.χ. ιμιπενέμη, μεροπενέμη), μονοβακτάμες (π.χ. αζτρεονάμη) και φθοριοκινολόνες (π.χ. σιπροφλοξακίνη, οφλοξακίνη, ενοξακίνη, λομεφλοξακίνη, νορφλοξακίνη). Πρέπει να τονιστεί ότι, μερικές φορές, εξαιτίας της ποικίλης αντιμικροβιακής δραστηριότητας εναντίον της *P. aeruginosa* ή των ιδιαίτερων φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων τους, τα διάφορα μέλη μιας συγκεκριμένης τάξης αντιβιοτικών δεν είναι πάντοτε ισότιμα στη θεραπεία των λοιμώξεων από *P. aeruginosa*. Για παράδειγμα, η σιπροφλοξακίνη εμφανίζει κάπως υψηλότερη αποτελεσματικότητα *in vitro* εναντίον πολλών κλινικών στελεχών της *P. aeruginosa* από τις άλλες φθοριοκινολόνες. Αντίθετα, ορισμένα πολυανθεκτικά στελέχη της *P. aeruginosa* παρουσιάζουν διασταυρούμενη αντοχή σε αντιβιοτικά διαφορετικών τάξεων. Έτσι, οι τοπικοί τύποι ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά πρέπει να κατευθύνουν την αρχική επιλογή αντιβιοτικού, ενώ η οριστική αντιβιοτική θεραπεία θα καθοριστεί μετά τον προσδιορισμό της ευαισθησίας του συγκεκριμένου λοιμογόνου στελέχους[30]. Στις περισσότερες σοβαρές και απειλητικές για τη ζωή λοιμώξεις από *P. aeruginosa* πρέπει να χορηγούνται συγχρόνως δύο αντιβιοτικά, στα οποία το μολυσματικό στέλεχος είναι ή μπορεί να είναι ευαίσθητο. Συνήθως είναι κατάλληλος ο συνδυασμός αμινογλυκοσίδης και β-λακταμικού αντιβιοτικού. Στόχοι της συνδυασμένης θεραπείας είναι να επιτευχθεί αθροιστική ή συνεργική βακτηριοκτόνος δράση, να γίνει εκμετάλλευση των φαρμακολογικών δυνατοτήτων και αντιστάθμιση των φαρμακολογικών περιορισμών του κάθε φαρμάκου και να προληφθεί η εμφάνιση αντοχής στα αντιβιοτικά. Ειδικά στις οξείες λοιμώξεις, τα αντιβιοτικά πρέπει να χορηγούνται στη μέγιστη δοσολογία που κρίνεται ασφαλής. Επιπλέον, όταν οι θέσεις της λοίμωξης είναι σχετικά απρόσιτες (π.χ. ΚΝΣ ή η καρδιά), μπορεί να χρειαστούν οι μέγιστες ή ακόμα μεγαλύτερες δόσεις προκειμένου να επιτευχθούν θεραπευτικές συγκεντρώσεις στους προσβληθέντες ιστούς. Για τις σχετικά αθόρυβες, αυτοπεριοριζόμενες και συχνά χρόνιες λοιμώξεις από *P. aeruginosa* (π.χ. ορισμένες περιπτώσεις χρόνιας επινεμητικής οστεομυελίτιδας ή κακοήθους έξω ωτίτιδας), μπορεί να χορηγηθεί ένας μόνο αντιμικροβιακός παράγων. Μία φθοριοκινολόνη από το στόμα (π.χ. σιπροφλοξασίνη ή οφλοξακίνη) πιθανώς να ήταν κατάλληλη σε αυτές τις περιπτώσεις, μολονότι μία τέτοια από του στόματος θεραπεία πρέπει να παρατείνεται όταν επιδιώκεται η εκρίζωση της λοίμωξης. Επιπλέον, ορισμένες ουρολοιμώξεις από *P. aeruginosa* οι οποίες περιορίζονται στις κατώτερες ουροφόρες οδούς, είναι πιθανόν να αντιμετωπισθούν με βραχυχρόνια θεραπεία ενός μόνο αντιβιοτικού, δραστικού κατά της *P. aeruginosa*[35]. Η κατάλληλη διάρκεια της αντιβιοτικής θεραπείας για τη λοίμωξη που προκαλεί η *P. aeruginosa* εξαρτάται από τον τύπο, τη θέση και τη βαρύτητα της λοίμωξης. Ο ακριβής και μακρόπνοος καθορισμός θεραπευτικών οδηγιών είναι μερικές φορές προβληματικός. Ίσως, είναι πιο αποδοτικό να προσαρμόζεται η διάρκεια της θεραπείας σύμφωνα με τις συγκεκριμένες συνθήκες του περιστατικού, συμπεριλαμβανομένης της αρχικής απάντησης στη θεραπεία. Γενικά, οι χρόνιες λοιμώξεις που συνδέονται με εκτεταμένη ιστική βλάβη, με αλλοίωση της φυσιολογικής ανατομίας, με ξένο ή προθετικό σώμα και με όχι άριστη κατανομή του αντιβιοτικού στη θέση της λοίμωξης, απαιτούν θεραπεία που θα διαρκέσει εβδομάδες ή και μήνες μάλλον παρά ημέρες. Οι περισσότερες οξείες λοιμώξεις μπορούν να αντιμετωπιστούν με επιθετική θεραπεία μικρότερης διάρκειας. Οι λοιμώξεις από *P. aeruginosa* των κατωτέρων αεροφόρων οδών σε ασθενείς με κυστική

ίνωση αποτελούν ειδικό πρόβλημα επειδή αντιπροσωπεύουν μακρόβιες, χρόνιες καταστάσεις που επιπλέκονται από οξείες αναζωπυρώσεις και επιδεινούμενη πορεία [30]. Η αντιβιοτική θεραπεία για τις οξείες αναζωπυρώσεις συντελεί στην κλινική βελτίωση. Μία περισσότερο επιθετική προσέγγιση με περιοδικές χορηγήσεις αντιμικροβιακής θεραπείας μπορεί να περιορίσει την εξέλιξη της νόσου. Ο συχνός καθαρισμός των πνευμόνων είναι ουσιώδης για την αντιμετώπιση αυτής της νόσου, ενώ έχει εφαρμοστεί με καλά αποτελέσματα η περιοδική πλύση των βρόγχων, για την ανακούφιση των συμπτωμάτων από τα βύσματα βλέννας. Σε μερικές περιπτώσεις έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί με καλά αποτελέσματα αντιβιοτικά σε μορφή ψεκαζόμενου διαλύματος. Η άριστη αντιμετώπιση των λοιμώξεων από *P. aeruginosa* συχνά απαιτεί χειρουργική παρέμβαση μαζί με την αντιμικροβιακή θεραπεία. Η παρουσία νεκρωτικού ιστού ή προθετικού ή ξένου υλικού έχει ανάγκη χειρουργικού καθαρισμού (π.χ. στην κακοήθη έξω ωτίτιδα και σε μερικές περιπτώσεις χρόνιας οστεομυελίτιδας ή οστεοχονδρίτιδας). Το κυψελιδοποιημένο πύον απαιτεί παροχέτευση (π.χ. πύαρθρο της στερνοκλειδικής άρθρωσης, εγκεφαλικό απόστημα και ενδοφθαλμίτιδα). Η ενδοκαρδίτιδα της αριστερής πλευράς είναι ένδειξη πρώιμης αντικατάστασης βαλβίδας. Η διάτρηση του εντέρου απαιτεί λαπαροτομή και εκτομή του εντέρου (π.χ. στη νεκρωτική εντεροκολίτιδα). Τέλος, η απόφραξη ουροφόρου οδού μπορεί να χρειαστεί κατάλληλη χειρουργική επέμβαση[12]. Λαμβάνοντας υπόψη την αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισης πολυανθεκτικών στελεχών *P. aeruginosa* στα νοσοκομεία και, κατά συνέπεια, τον περιορισμό των θεραπευτικών επιλογών, θα πρέπει οι γιατροί που συνταγογραφούν αντιψευδομοναδικά αντιβιοτικά να συνυπολογίζουν όλους τους παρακάτω παράγοντες[33]: 1. τα τοπικά επιδημιολογικά δεδομένα αντοχής και τους φαινότυπους αντοχής. 2. την πηγή της λοίμωξης, π.χ. λοίμωξη κοινότητας ή νοσοκομειακή λοίμωξη. 3. την ύπαρξη σοβαρών υποκείμενων παραγόντων κινδύνου, π.χ. ουδετεροπενία, μηχανικός αερισμός. 4. τη διάρκεια της νοσηλείας και του μηχανικού αερισμού. 5. το είδος της αντιμικροβιακής θεραπείας στο πρόσφατο παρελθόν. 6. τις απαιτούμενες φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές παραμέτρους για την επίτευξη της υψηλότερης δραστηριότητας και την αποφυγή της εμφάνισης αντοχής κατά τη διάρκεια της θεραπείας. 7. την *in vitro* συνέργεια ενός συνδυασμού αντιψευδομοναδικών αντιμικροβιακών. 8. τα *in vivo* αποτελέσματα της αντιψευδομοναδικής μονοθεραπείας έναντι του συνδυασμού μίας αντιψευδομοναδικής β-λακτάμης και μιας αμινογλυκοσίδης. 9. την εφαρμογή των θεραπευτικών συναινετικών συμφωνιών, “therapeutic consensus agreements”, έναντι της *P. aeruginosa* βασιζόμενη τόσο στον περιορισμό της χρήσης επιλεγμένων αντιβιοτικών, όσο και στη συνεχή κυκλική χρήση των αντιβιοτικών, ανάλογα πάντα με τις ιδιαιτερότητες του νοσοκομείου. Η συνεχώς αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισης πολυανθεκτικών στελεχών *P. aeruginosa* στις νοσοκομειακές λοιμώξεις δημιούργησε την ανάγκη εφαρμογής νέων συνδυασμών δύο ή και περισσότερων αντιβιοτικών. Συνδυασμοί που εφαρμόστηκαν στην κλινική πράξη με θετικά αποτελέσματα σε πολυανθεκτικά στελέχη είναι η κεφεπίμη με την αμικασίνη και η πολυμυξίνη Β με ένα ή περισσότερα αντιβιοτικά από τις αμινογλυκοσίδες, κινολόνες και β-λακτάμες. Υπάρχουν και συνδυασμοί που έχουν δοκιμαστεί *in vitro* και παρουσίασαν συνεργική ή αθροιστική δράση. Τέτοιοι συνδυασμοί είναι οι παρακάτω: τικαρσιλλίνη με τομπραμυκίνη και ριφαμπικίνη, κεφαλοσπορίνες με κινολόνες, κεφταζιμίμη με κολιστίνη, μακρολίδες με τομπραμυκίνη με τριμεθοπρίμη και ριφαμπικίνη, πολυμυξίνη Β με ριφαμπικίνη, και πολυμυξίνη Β με ιμιπενέμη. Σε μερικούς συνδυασμούς συμπεριλαμβάνονται αντιβιοτικά, όπως η ριφαμπικίνη και οι μακρολίδες, τα

οποία από μόνα τους δεν έχουν αντιψευδομοναδική δράση. Ο τρόπος δράσης τους δεν είναι πλήρως εξακριβωμένος[34]. Όλες οι λοιμώξεις που προκαλεί η *P. aeruginosa* είναι αντιμετωπίσιμες και – με την πιθανή εξαίρεση των λοιμώξεων του πνεύμονα σε ασθενείς με κυστική ίνωση – δυνητικά ιάσιμες. Ωστόσο, η ετερογένεια αυτών των λοιμώξεων ευθύνεται για τις σημαντικές διαφορές της βραχυπρόθεσμης και μακροπρόθεσμης πρόγνωσης. Στο ένα άκρο του φάσματος βρίσκονται οι οξείες κεραυνοβόλες λοιμώξεις, όπως η μικροβιακή πνευμονία, η σηψαιμία, η σήψη εγκαυμάτων και η μηνιγγίτιδα, οι οποίες συνοδεύονται από εξαιρετικά υψηλή θνησιμότητα παρά την κατάλληλη θεραπεία. Στο άλλο άκρο του φάσματος είναι οι περισσότερο χρόνιες και αθόρυβες λοιμώξεις, συμπεριλαμβανομένων ορισμένων περιπτώσεων χρόνιας επινεμητικής οστεομυελίτιδας, κακοήθους έξω ωτίτιδας και λοιμώξεων των κατωτέρων αεραγωγών σε ασθενείς με κυστική ίνωση. Μολονότι οι τελευταίες λοιμώξεις δεν ανήκουν σ' αυτές που απειλούν άμεσα τη ζωή, συχνά είναι δυσχερής η εκρίζωσή τους και όπως συμβαίνει με την κυστική ίνωση των πνευμόνων μπορεί μακροπρόθεσμα να καταλήξουν σε θάνατο.

### 1.7.2 ANTOXH

Η *P. aeruginosa* εμφανίζει αντοχή σε μια ποικιλία αντιβιοτικών, συμπεριλαμβανομένων των αμινογλυκοσιδών, κινολονών και β-λακταμών. Γενικά, οι κύριοι μηχανισμοί του *P. aeruginosa* που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της επίθεσης με αντιβιοτικά μπορούν να ταξινομηθούν σε ενδογενή, επίκτητη και προσαρμοστική αντίσταση. Η εγγενής αντίσταση του *P. aeruginosa* περιλαμβάνει χαμηλή διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης, έκφραση αντλιών εκροής που εξαλείφουν τα αντιβιοτικά εκτός του κυττάρου και την παραγωγή ενζύμων αδρανοποίησης με αντιβιοτικά. Η επίκτητη αντίσταση της *P. aeruginosa* μπορεί να επιτευχθεί είτε με οριζόντια μεταφορά γονιδίων αντοχής είτε με μεταλλαγμένες μεταβολές. Η προσαρμοστική αντίσταση του *P. aeruginosa* περιλαμβάνει το σχηματισμό βιοφίλμ στους πνεύμονες μολυσμένων ασθενών, όπου το βιοφίλμ χρησιμεύει ως φράγμα διάχυσης για τον περιορισμό της πρόσβασης στα βακτηριακά κύτταρα από τα αντιβιοτικά. Επιπροσθέτως, ανθεκτικά στο πολλαπλασιασμό φάρμακα κύτταρα που μπορούν να επιβιώσουν επίθεση με αντιβιοτικά μπορούν να σχηματιστούν στο βιοφίλμ. Αυτά τα κύτταρα ευθύνονται για παρατεταμένες και επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις σε ασθενείς με CF (Κυστική Ίνωση). Η ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών ή εναλλακτικών θεραπευτικών στρατηγικών για τη θεραπεία μολύνσεων από *P. aeruginosa* απαιτείται επειγόντως για τους ασθενείς των οποίων οι μολύνσεις είναι ανθεκτικές στα συμβατικά αντιβιοτικά. Τα νέα αντιβιοτικά με νέους τρόπους δράσης έχουν διερευνηθεί τα τελευταία χρόνια, όπως και οι νέες οδοί χορήγησης και η ανθεκτικότητα στην τροποποίηση από τα βακτηριακά ένζυμα. Μερικά από αυτά τα νεότερα αντιβιοτικά εμφανίζουν εξαιρετική *in vitro* αντιβακτηριακή δράση έναντι της *P. aeruginosa* καθώς και χαμηλότερη ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) σε σύγκριση με τα συμβατικά αντιβιοτικά.

### **1.7.3 Ενδογενής Αντοχή**

Η ενδογενής αντοχή στα αντιβιοτικά ενός βακτηριακού είδους αναφέρεται στην έμφυτη ικανότητα του να μειώνει την αποτελεσματικότητα ενός συγκεκριμένου αντιβιοτικού μέσω εγγενών δομικών ή λειτουργικών χαρακτηριστικών. Η *P. aeruginosa* έχει δειχθεί ότι διαθέτει υψηλό επίπεδο εγγενούς αντοχής στα περισσότερα αντιβιοτικά μέσω περιορισμένης διαπερατότητας εξωτερικής μεμβράνης, συστήματα εκροής που αντλούν αντιβιοτικά εκτός του κυττάρου και παραγωγή ενζύμων αδρανοποίησης αντιβιοτικών όπως β-λακταμάσες. Η χαμηλή διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης επιτρέπει την είσοδο μεγαλύτερων ενώσεων και αντιβιοτικών στο κύτταρο με τη βοήθεια καναλιών πρωτεϊνών πορίνης και καθιστά τα βακτήρια ανθεκτικά. Η ενδογενής αντίσταση διεξάγεται με τη βοήθεια συστημάτων εκροής πολλαπλών φαρμάκων, όπως το οπερόνιο MexAB-OrpM και MexXY-OrpM, μαζί με την αδρανοποίηση β-λακταμών ενζύμου με υδρόλυση.

Η ικανότητα των βακτηρίων να προσαρμόζονται και να αναπτύσσουν αντοχή έναντι οποιουδήποτε αντιβιοτικού οφείλεται σε: α) συσσώρευση νέων μεταλλαγών σε ήδη υπάρχοντα γονίδια και β) απόκτηση νέων γονιδίων αντοχής μέσω μηχανισμών οριζόντιας μεταφοράς εξωγενούς γενετικού υλικού.

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 με 1) μετάβαση-“transition”, μιας πουρίνης από μια άλλη πουρίνη (π.χ. A→G), είτε με την αντικατάσταση μιας πυριμιδίνης από μια άλλη (π.χ. T→C), 2) με μεταστροφή-“transversion”, κατά την οποία μια πουρίνη αντικαθίσταται από μια πυριμιδίνη ή το αντίστροφο.

### **1.7.4 Επίκτητη Αντοχή**

Η επίκτητη αντοχή των βακτηρίων οφείλεται στην απόκτηση νέου γενετικού υλικού μέσω μηχανισμών οριζόντιας μεταφοράς.

Ο συνηθέστερος μηχανισμός ανάπτυξης αντοχής είναι η απόκτηση εξωγενών γονιδίων αντοχής. Πολλά από τα κλινικά σημαντικά αντιβιοτικά αποτελούν μεταβολικά προϊόντα μικροβίων του περιβάλλοντος. Τα αντίστοιχα γονίδια αντοχής αποτελούν μέρος του γενετικού υλικού των παραγωγών μικροοργανισμών. Από αυτή τη δεξαμενή, τα βακτήρια μπορούν να αποκτήσουν γονίδια αντοχής μέσω των μηχανισμών οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού. Η μετακίνηση ενός γονιδίου αντοχής μπορεί να γίνει με τη βοήθεια κινητών γενετικών μονάδων (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

4) τα πλασμίδια

Τα εξωγενή γονίδια αντοχής είναι συνήθως άγνωστης προέλευσης και τα προϊόντα τους έχουν ως ρόλο την απενεργοποίηση των αντιβιοτικών, την εκροή τους από το κύτταρο ή την προστασία του στόχου δράσης του αντιβιοτικού. Σε ορισμένες περιπτώσεις τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν παραλλαγές ενζύμων που ήδη υπάρχουν στο χρωμόσωμα. Η κατηγορία των εξωγενών γονιδίων αντοχής περιλαμβάνει γονίδια για αντοχή έναντι των κινολόνων, των τετρακυκλινών, της χλωραμφαινικόλης, της τριμεθοπρίμης, των αμινογλυκοσιδών, των σουλφοναμιδών και των β-λακταμικών αντιβιοτικών. Η ανταλλαγή των γενετικών πληροφοριών μεταξύ των βακτηρίων μπορεί να συμβεί μέσω διαφόρων μηχανισμών, όπως είναι:

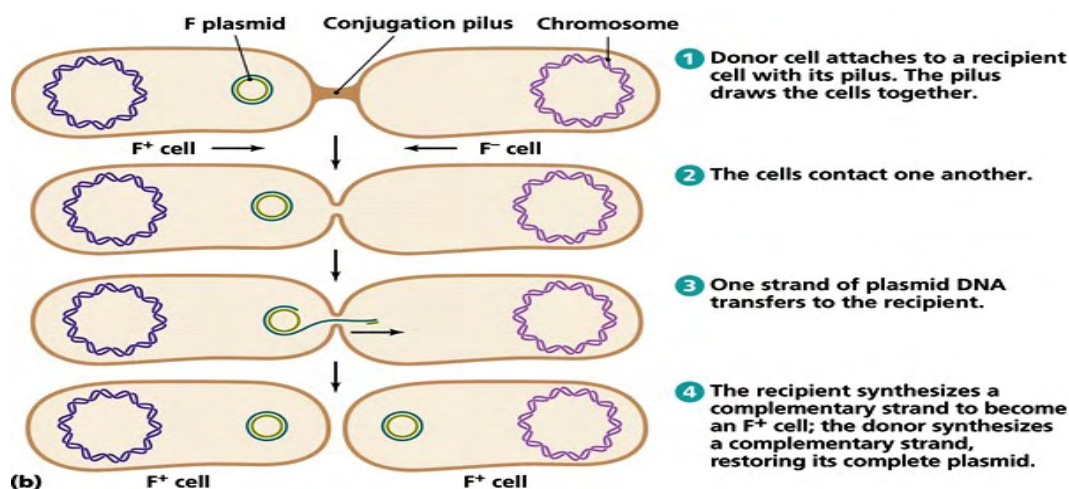
α) Η μεταμόρφωση (transformation), κατά την οποία το βακτήριο δέκτης προσλαμβάνει εξωκυττάριο DNA. Για να λάβει χώρα ο μετασχηματισμός, τα βακτήρια δέκτες πρέπει να βρίσκονται σε κατάσταση ικανότητας (competence), η οποία μπορεί να συμβεί ως απόκριση σε περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η πείνα και η κυτταρική 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 DNάση. Η μεταγωγή συμβαίνει είτε με τον λυτικό, είτε με τον λυσογόνο κύκλο.

Τόσο στη μεταγωγή, όσο και στη 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.





**Εικόνα 10:** . 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.

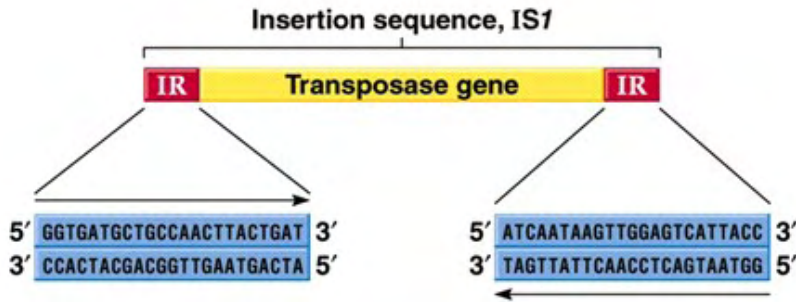
Η σημασία των μεταθετών στοιχείων αντικατοπτρίζεται από το γεγονός ότι τα περισσότερα κλινικά σημαντικά γονίδια αντοχής σχετίζονται με τέτοιες δομές.

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 πανομοιότες, 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 [35], ενώ τα τρανσποζόνια φέρουν γονίδια που κωδικοποιούν άλλες λειτουργίες, όπως π.χ. αντοχή στα αντιβιοτικά [36].

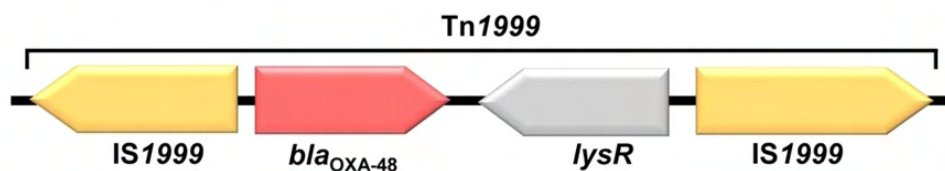
α) Οι αλληλουχίες εισδοχής (ISs) αποτελούν τον πιο απλό τύπο μεταθετών στοιχείων. Είναι δομές μικρού μεγέθους (0,5-2 kb) που αποτελούνται από μικρές τερματικές IRs, που οριοθετούν ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame:ORF) που κωδικοποιεί την τρανσποζάση.

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.



**Εικόνα 11:** Αλληλουχία 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.



**Εικόνα 12:** Απεικόνιση σύνθετου τρανσποζονίου

Με τον όρο πολύπλοκα μεταθετά στοιχεία περιγράφονται τα τρανσποζόνια που δεν ανήκουν στην κατηγορία των σύνθετων μεταθετών στοιχείων. Τα πολύπλοκα τρανσποζόνια στερούνται πρότυπης δομής και παρουσιάζουν πιο πολύπλοκη γενετική δομή από τα σύνθετα μεταθετά στοιχεία. Σε αντίθεση με τα σύνθετα, τα πολύπλοκα τρανσποζόνια αφορίζονται από βραχείες IRs, μήκους 15-40 bp, ανάλογα με το τρανσποζόνιο. Οι IRs αφορίζουν γονίδια που κωδικοποιούν λειτουργίες απαραίτητες για τη μετάθεση, καθώς και γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά. Κανένα τμήμα του πολύπλοκου τρανσποζονίου 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\_ανασυνδασμού *attI*, και μία περιοχή υποκινητών, *Pc*, που ευθύνεται για την μεταγραφή των 2) Τα ιντεγκρόνια είναι γενετικά στοιχεία τα οποία αναγνωρίζουν και

ενσωματώνουν γονίδια υπο τη μορφή κασετών λειτουργώντας ως φυσικά εργαλεία γενετικού ανασυνδυασμού.

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 [37].

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 (*intI*) και το κύριο σημείο ανασυνδυασμού *attI* [38]. Η 3'CS περιοχή, στο άλλο άκρο, είναι συντηρημένη σε μικρότερο βαθμό [39]. Συνήθως όμως, περιλαμβάνει μέρος του γονιδίου *gacEΔ1* (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) [40].

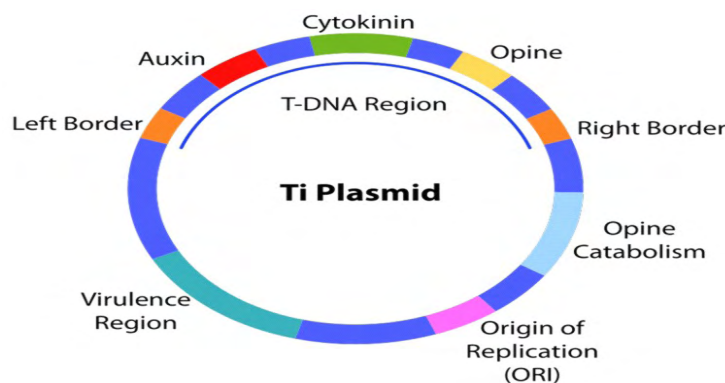
Τα γονίδια-κασέτες στερούνται δικού τους υποκινητή, καθώς στις περισσότερες κασέτες λιγότερες από 10 βάσεις χωρίζουν το πρώτο κωδικόνιο έναρξης από το 5' άκρο της κασέτας. Οι κασέτες ενσωματώνονται στο *attI* σημείο με συγκεκριμένη κατεύθυνση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η έκφραση των γονιδίων-κασετών να 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 [41,42].

Τα χρωμοσωμικά ιντεγκρόνια, γνωστά και ως 'super-integrans', εντοπίστηκαν για πρώτη φορά στο γένωμα του *Vibrio cholerae* [43]. Τα χρωμοσωμικά ιντεγκρόνια αποτελούν έναν ξεχωριστό τύπο ιντεγκρονίων που απαντούν σε χρωμοσώματα και άλλων βακτηριακών ειδών [44,45,46].

Οι ιντεγκράσες αυτών των χρωμοσωματικών ιντεγκρονίων είναι συγγενικές με αυτές των κινητών ιντεγκρονίων, αλλά τα χρωμοσωμικά ιντεγκρόνια παρουσιάζουν δύο χαρακτηριστικά που τα διακρίνουν από τα κινητά ιντεγκρόνια: α) τα χρωμοσωμικά ιντεγκρόνια φέρουν μεγάλο αριθμό γονιδίων-κασετών (>20 κασέτες) και οι *attC* (VCRs) περιοχές των ενδογενών κασετών παρουσιάζουν εκτεταμένη ομοιότητα μεταξύ τους, β) τα

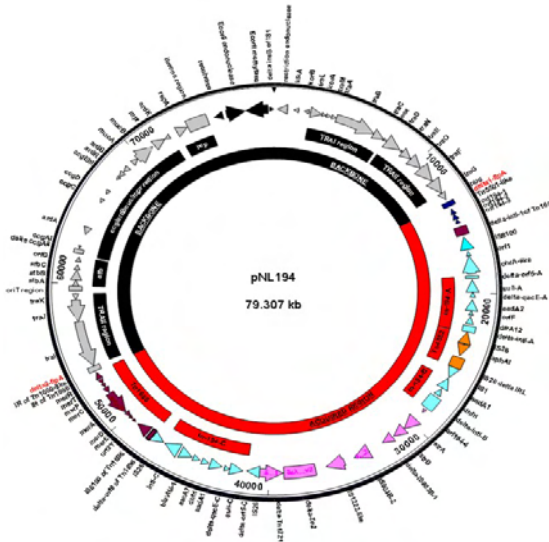
χρωμοσωματικά ιντεγκρόνια έχουν εντοπιστεί μόνο σε χρωμοσώματα και ποτέ δεν έχει βρεθεί να σχετίζονται με κινητά γενετικά στοιχεία [151].

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 βακτηρίου επιτρέποντας την εισβολή και την επιβίωση σε ζωικούς οργανισμούς [47,48]. Τα πλασμίδια που μέχρι στιγμής έχουν χαρακτηριστεί συνίστανται από δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA ποικίλου μεγέθους.

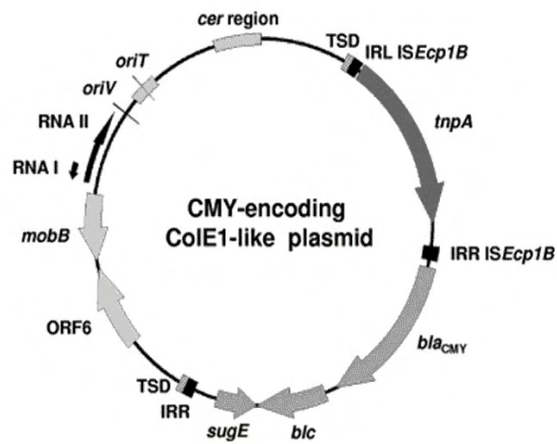


**Εικόνα 13:** Απεικόνιση Πλασμιδίου

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 της 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.



**Εικόνα 14:** . Απεικόνιση συζευτικού πλασμιδίου.



**Εικόνα 15:** Απεικόνιση μη-συζευτικού πλασμιδίου.

Η επίκτητη αντοχή συνεπάγεται τη μεταφορά πλασμιδίων, προφίλ στοιχείων DNA και τρανσποζονών μέσω μεταγωγής, μεταμόρφωσης και σύζευξης. Αυτή η οριζόντια μεταφορά δείχνει την αντίσταση β-λακτάμης και αμινογλυκοσίδης της *P. aeruginosa*. Η χημική τροποποίηση των αμινογλυκοσίδων μεταβάλλει τη συγγένεια μιας υπομονάδας 30S του σακχάρου ριβόζης στο στόχο. Τα αντιβιοτικά φάρμακα όπως η κεφαλοσπορίνη, η καρβαπενέμη και η πενικιλίνη, βοηθούν στη διαδικασία ανάπτυξης ιδιοτήτων αντίστασης στην περίπτωση της *P. aeruginosa*. Η αντίσταση στην μεταλλαγή εμφανίστηκε λόγω του σχηματισμού βιοφίλμ και της δράσης των παραγόντων που βλάπτουν το DNA. Η συχνότητα μετάλλαξης βρέθηκε να αυξάνεται κατά 10 φορές, μεγαλύτερη από 100 φορές και 70 φορές αν η αντίσταση προκαλείται από μεροπενέμη, σιπροφλοξασίνη και εάν υπάρχει κάποια μετάλλαξη στα γονίδια αντίστοιχα. Η μείωση της ρύθμισης των αντιοξειδωτικών ενζύμων προκαλεί βλάβη στο DNA στα βιοφίλμ. Η διαλογή βιβλιοθήκης ασθενών με κυστική ίνωση (CF) περιγράφει ότι υπάρχουν διάφοροι μεταλλάκτες που παίζουν σημαντικό ρόλο κατά τα πρώτα στάδια της μόλυνσης, οι *mutL* και *mutS* είναι οι υπερ-μεταλλάκτες που βρίσκονται ευρέως. Η μετάλλαξη στα γονίδια *mexR*, *mexZ* και *nhxB* οφείλεται στην υπερέκφραση της αντλίας εκροής MexAB-*OppM*, MexXY-*OppM* και MexCD-*OppJ* αντίστοιχα. Το *OppD* είναι μια πορίνη που καταστέλλει την πρόσληψη της ιμιπενέμης και οδηγεί στην κλινική αντίσταση. Η αμπ-β λακταμάση, η AmpD μεταλλάσσουν και ελέγχουν τη δραστηριότητα του ρυθμιστή AmpR.

## **1.8 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ *P. aeruginosa* ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑ**

Από τη δεκαετία του 80, οι καρβαπενέμες, συμπεριλαμβανομένης της ιμιπενέμης, της μεροπενέμης και αργότερα της δοριπενέμης, συνιστάται ως θεραπεία τελευταίας γραμμής για λοιμώξεις που προκαλούνται από *P. aeruginosa* [87-90]. Αντοχή στο μεροπενέμη αλλά όχι στην ιμιπενέμη έχει συσχετιστεί με την υπερέκφραση του συστήματος εκροής MexA-MexB-*OppM* [91,92]. Παρ' αυτά, ο σημαντικότερος μηχανισμός εμφάνισης αντοχής στις καρβαπενέμες είναι η παραγωγή β-λακταμασών που υδρολύουν τις καρβαπενέμες, και ονομάζονται καρβαπενεμάσες. Διαφορετικές κατηγορίες καρβαπενεμασών έχουν βρεθεί σε καρβαπενέμη-ανθεκτικά στελέχη *P. aeruginosa* σε όλο τον κόσμο, κυρίως μεταλλο-β-λακταμάσες (MBL) συμπεριλαμβανομένων των VIM και IMP [93-102]. Οι μεταλλο-β-λακταμάσες (MβL) είναι οι συνηθέστερα αποκτώμενες καρβαπενεμάσες στο *P. aeruginosa*. Τα MβLs είναι ένζυμα εξαρτώμενα από το ψευδάργυρο ένζυμα, και χαρακτηρίζονται συνήθως από την ικανότητα να υδρολύουν όλες τις β-λακτάμες (με εξαίρεση τις μονοβακτάμες), συμπεριλαμβανομένων των καρβαπενεμών. Η δραστηριότητα τους δεν επηρεάζεται από τους διαθέσιμους σήμερα αναστολείς των β-λακταμασών (δηλαδή το κλαβουλανικό οξύ, τη ταζομπακτάμη, τη σουλμπακτάμη ή την αβιβακτάμη). Σε αντίθεση με τα *bla<sub>NDM</sub>* γονίδια, τα *bla<sub>VIM</sub>* και *bla<sub>IMP</sub>* εντοπίζονται ως γονιδιακές κασέτες σε ιντεγκρόνια τάξης 1 ή, πιο σπάνια, σε ιντεγκρόνια τάξης 2 ή 3 [113-115]. Αυτά τα ιντεγκρόνια συχνά περιέχουν επίσης γονιδιακές κασέτες που προσδίδουν αντοχή σε άλλα αντιβιοτικά, όπως οι αμινογλυκοσίδες και η τριμεθοπρίμη. Ωστόσο, αντοχή στις καρβαπενέμες μπορεί να προκύψει από την απενεργοποίηση της πορίνης *OppD* [103].

Τα στελέχη *P. aeruginosa* που είναι ανθεκτικά στις καρβαπενέμες αποτελούν επί του παρόντος σοβαρό πρόβλημα στη διαχείριση λοιμώξεων που σχετίζονται με την υγειονομική περίθαλψη. Η μελέτη της μοριακής επιδημιολογίας των καρβαπενέμη-ανθεκτικών *P. aeruginosa* (CRPA; Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*) στην Ελλάδα ξεκίνησε την περίοδο 1994-1995 σε μια μελέτη 11 ελληνικών νοσοκομείων. Η PFGE ανάλυση ταξινόμησε τα 88 στελέχη *P. aeruginosa* σε πολλαπλούς παλσότυπους. Ωστόσο, μόνο το 21% των στελεχών ήταν CRPA [104]. Κατά την περίοδο 1996-1998, μία έξαρση *P. aeruginosa* στελεχών που μεταφέρουν το *bla*<sub>VIM-1</sub> γονίδιο έλαβε χώρα στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης (ΑΧΕΠΑ). Όλα τα VIM-παραγωγά στελέχη ανήκαν στον ίδιο ορότυπο, O:12, και η XbaI-PFGE ανάλυση αποκάλυψε ότι όλα ανήκαν επίσης σε έναν μοναδικό παλσότυπο, εκτός από ένα *bla*<sub>VIM-1</sub>-αρνητικό στέλεχος [106-111]. Ωστόσο, ένα CRPA στέλεχος, που απομονώθηκε κατά την έξαρση του 1997, έφερε μία νέα παραλλαγή του *bla*<sub>VIM</sub> γονιδίου, το *bla*<sub>VIM-2</sub> (με 90% νουκλεοτιδική ομοιότητα), το οποίο είχε προηγουμένα απομονωθεί στη Γαλλία [112] (Πίνακας 33). Η *bla*<sub>VIM-2</sub> γονιδιακή κασέτα εντοπίστηκε σε ένα ιντεγκρόνιο τάξης 1. Το 2001, τα CRPA στελέχη που φέρουν τη *bla*<sub>VIM-2</sub> γονιδιακή κασέτα κυριαρχούσαν μεταξύ 15 Ελληνικών νοσοκομείων [107,111]. Στις περισσότερες περιπτώσεις, το *bla*<sub>VIM-2</sub> ήταν είτε το μοναδικό γονίδιο στην μεταβλητή περιοχή του τάξης 1 ιντεγκρονίου In56, είτε ήταν πίσω από μία *aacA29* γονιδιακή κασέτα, όπως περιγράφεται στο In59. Από το 1999 έως το 2001, τα CRPA στελέχη που φέρουν το *bla*<sub>VIM-2</sub> ανιχνεύονται στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας (UHL). ευρήματα που αποκάλυψαν ότι τα VIM-παραγωγά *P. aeruginosa* στελέχη είχαν ήδη εγκατασταθεί στα Ελληνικά νοσοκομεία, υπογραμμίζοντας την ανάγκη για περιορισμό της χρήσης καρβαπενέμης και τη προσαρμογή των μέτρων ελέγχου των λοιμώξεων [113].

Gene isolated	Year of isolation	City of isolation	Institution of isolation	Reference
VIM-1	1996	Thessaloniki	AHEPA University Hospital	[59]
VIM-2	1997	Thessaloniki	AHEPA University Hospital	[60]
VIM-4	2001	Larissa	University Hospital of Larissa	[63]
VIM-17	2004	Thessaloniki	Hippokration General Hospital of Thessaloniki	[77]
VIM-4*	2005	Larissa	University Hospital of Larissa	[83]
KPC	2013	Thessaloniki	Hippokration General Hospital of Thessaloniki	[99, 100]

\*With concurrent resistance mechanisms of efflux pump overproduction and porin deficiency

Πίνακας 33: Γονίδια που κωδικοποιούν για καρβαπενεμάσες και απομονώθηκαν για πρώτη φορά σε CRPA στελέχη, στην Ελλάδα.

Το 2001 μια νέα *bla*<sub>VIM</sub> παραλλαγή, το *bla*<sub>VIM-4</sub>, απομονώθηκε στην περιοχή της Θεσσαλίας, από το εγκεφαλονωτιαίο υγρό ενός 25-χρονου ασθενούς που νοσηλεύτηκε στο UHL, μετά

από νευροχειρουργική επέμβαση (Πίνακας 33). Το *bla<sub>VIM-4</sub>* ήταν το μοναδικό γονίδιο στη μεταβλητή περιοχή του τάξης 1 ιντεγκρονίου, και διέφερε μόνο ένα αμινοξύ από το *bla<sub>VIM-1</sub>*.

Κατά τη διάρκεια του 2001-2002, στο UHL, η συχνότητα των CRPA έφτασε το 35% και επικρατούσαν τα *P. aeruginosa* στελέχη που παράγουν VIM-2 ή VIM-4. Στη κεντρική Ελλάδα, σύμφωνα με το σχήμα MLST Oxford, οι ST111 και ST235 είναι οι κυρίαρχοι κλώνοι μεταξύ των *P. aeruginosa* στελεχών που παράγουν VIM [111].

## 1.9 ΣΚΟΠΟΣ

Τα τελευταία στοιχεία που δημοσιεύθηκαν από το ίδρυμά μας αφορούσαν στελέχη *P. aeruginosa* που παράγουν καρβαπενεμάση και συλλέχθηκαν στην κεντρική Ελλάδα, το 2011. Ωστόσο, είναι σημαντικό να παρακολουθούμε και να μελετούμε συνεχώς τη μοριακή επιδημιολογία του ανθεκτικών στην καρβαπενέμη *P. aeruginosa* στελεχών, η οποία εξελίσσεται συνεχώς σε παγκόσμιο επίπεδο, ιδιώς σε ενδημικές περιοχές καθώς αυτές οι περιοχές αποτελούν την εστία τέτοιων στελεχών. Επομένως, στόχος αυτής της εργασίας ήταν να εξετάσει τα μοριακά χαρακτηριστικά των καρβαπενέμη-ανθεκτικών *P. aeruginosa* που απομονώθηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας, κατά τη διάρκεια του 2018. Επίσης, αναλύσαμε τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά των απομονωμένων στελεχών.



## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 2.1 ΥΛΙΚΟ

Στην μελέτη μας χρησιμοποιήθηκαν 120 κλινικά στελέχη *P. aeruginosa*, τα οποία απομονώθηκαν από ισάριθμους ασθενείς, οι οποίοι νοσηλεύτηκαν σε διάφορες κλινικές του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και εξυπηρετεί την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας, κατά το έτος 2018. Πιο συγκεκριμένα, στην πειραματική μελέτη συμπεριλήφθησαν τα πρώτα δέκα απομονωθέντα στελέχη *P. aeruginosa* 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 ανά κλινικό δείγμα.

ΚΛΙΝΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ
ΑΙΜΑ	26(21,7%)
ΒΡΟΓΧΙΚΕΣ ΕΚΚΡΙΣΕΙΣ	14( 11.7% )
ΟΥΡΑ	16(13,3%)
ΠΤΥΕΛΑ	22(18,3%)

**ΠΙΝΑΚΑΣ 17.** Διασπορά των στελεχών *P. aeruginosa* ανά είδος κλινικού δείγματος.

#### 2.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΣΤΕΛΕΧΗ *P. aeruginosa*.

Τα κλινικά δείγματα καλλιεργήθηκαν σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα και συγκεκριμένα σε MacConkey άγαρ και Αιματούχο άγαρ. Κατόπιν του εμβολιασμού, οι καλλιέργειες επώαστηκαν σε 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.

## 2.3 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ

Η ταυτοποίηση όλων των στελεχών υπό μελέτη πραγματοποιήθηκε βάσει του αυτοματοποιημένου συστήματος VITEK 2 (bioMérieux, 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 στα διάφορα αντιβιοτικά πραγματοποιήθηκε επίσης με το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK -2 (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France. Τα δεδομένα ερμηνεύτηκαν σύμφωνα με τα κριτήρια (έκδοση 10.0) της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για τη δοκιμή ευαισθησίας σε αντιμικροβιακά φάρμακα (EUCAST) ([www.eucast.org](http://www.eucast.org)).

## 2.4 ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ *P.aeruginosa* ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Όλα τα στελέχη υποβλήθηκαν σε φαινοτυπική ανίχνευση των MβLs χρησιμοποιώντας τη δοκιμή συνέργειας διπλού δίσκου (DDST) [49]. Η DDST πραγματοποιήθηκε τοποθετώντας στο τρυβλίο έναν δίσκο ιμιπενεμέμης (10 μg; IMP) και έναν κενό δίσκο σε απόσταση 10 mm (άκρη σε άκρη). Στον κενό δίσκο προστέθηκαν 10 μl διαλύματος EDTA 0,5 M. Στη συνέχεια, τα γονίδια που κωδικοποιούν για καρβαπενεμάσες (bla<sub>KPC</sub>, bla<sub>VIM</sub>, bla<sub>IMP</sub>, bla<sub>NDM</sub> και bla<sub>OXA-48</sub>) ανιχνεύθηκαν με PCR ενίσχυση [50-56]. 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 υπό μελέτη προϊόντος.

### 2.5.1 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 ΜΗ άγαρ
- 2) Λυτικό ρυθμιστικό διάλυμα (Lysis Buffer)
- 3) Πρωτεϊνάση K

## ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε στην μελέτη μας ήταν η εξής :

1. Καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους σε τρυβλία MH ή Blood (OXI MacConkey), και επώαση στους 37° C για 16-18 h.
2. Με βαμβακοφόρο στυλέο λαμβάνω ποσότητα κυττάρων και επαναιωρώ σε 1ml Φ.Ο.(0,9% NaCl<sub>2</sub>)
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 φυγοκεντρούμε στις 12,000 rpm για 5 min, και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέα σωληνάρια.

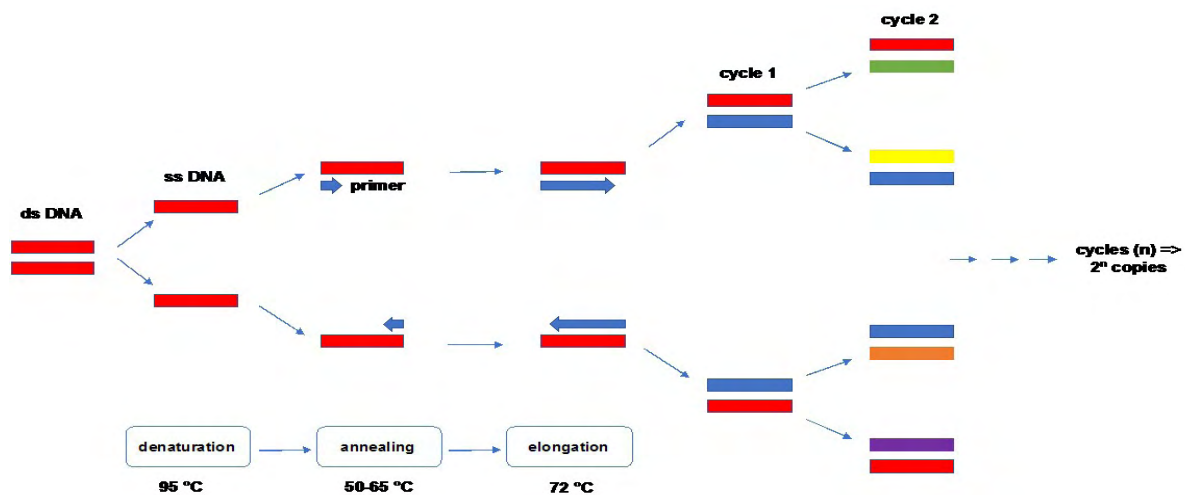
### **2.5.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase Chain Reaction, PCR)**

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[57]. 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, επειδή πρέπει να βρίσκονται σε μονόκλωνη μορφή.

**2.Στάδιο αναδιάταξης ή υβριδισμού των εκκινητών (primer annealing)** κατά τη διάρκεια του σταδίου 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 18.** 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 απεσταγμένο νερό)
- 3)Taq DNA πολυμεράση 5U/μl (πρόκειται για το ένζυμο που θα επιτελέσει τα επαναλαμβανόμενα στάδια του πολλαπλασιασμού)
- 4)10xTaq Buffer με KCL (ρυθμιστικό δ/μα ενίσχυσης)
- 5)MgCl<sub>2</sub>: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 το καθένα, τα οποία είναι απαραίτητα για τη σύνθεση νέων κλώνων από την DNA πολυμεράση

9)DNA Engine Peltier Thermal Cyclor

10)Συσκευή καθέτου νηματικής ροής κλάσης II

11)Αυτόματος αναδευτήρας vortex

12)Σωληνάρια erpendorf για PCR

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

14)Αποστειρωμένα ρύγχη.

### ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Σε erpendorf 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 erpendorf 23,5 μl του master mix και 1,5 μl από κάθε μικροβιακό DNA. Τέλος τοποθετούμε τα μικροσωληνάρια (erpendorf) 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:

<b>ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ</b>	<b>ΠΟΣΟΤΗΤΑ(μl)</b>
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 <sub>2</sub> O	18.05
DNA βακτηρίου	1.5
<b>Τελικός όγκος</b>	<b>25</b>

**ΠΙΝΑΚΑΣ 19.** Απαιτούμενα αντιδραστήρια και οι συγκεντρώσεις τους για την διεξαγωγή της PCR .

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

Η PCR στη μελέτη μας χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των γονιδίων που σχετίζονται με αντοχή της *P. aeruginosa* στις καρβαπενέμες. Τα γονίδια που ελέγηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν τα ακόλουθα: *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*. Ακολουθούν οι πίνακες με τις αλληλουχίες των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και οι συνθήκες υπό τις οποίες έλαβε χώρα η PCR για κάθε γονίδιο χωριστά

<b>ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ</b>	<b>ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ</b>
	<b>5' → 3'</b>
<i>bla<sub>KPC</sub>F</i>	TCGCTAAACTCGAACAGG
<i>bla<sub>KPC</sub>R</i>	TTAGTGCCCGTTGACGCCCAATCC
<i>bla<sub>NDM</sub>F</i>	TGGCAGGACACTTCCTATC
<i>bla<sub>NDM</sub>R</i>	AGATTGCCGAGCGAGCGACTTG
<i>bla<sub>IMP</sub>F</i>	GAAGGCGTTTATGTTTCATAC
<i>bla<sub>IMP</sub>R</i>	GTATGTTTCAAGAGTGATGC
<i>bla<sub>OXA-48</sub>F</i>	TTGGTGGCATCGATTATCGG
<i>bla<sub>OXA-48</sub>R</i>	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC
<i>bla<sub>VIM</sub>F</i>	AGTGGTGAGTATCCGACA
<i>bla<sub>VIM</sub>R</i>	ATGAAAGTGCGTGGAGAC

**ΠΙΝΑΚΑΣ 20.** Εκκινήτες για την ανίχνευση γονιδίων που κωδικοποιούν για καρβαπενεμάσες.

Συνθήκες Γονίδια	Αρχική αποδιάταξη	Αποδιάταξη	Αναδιάταξη	Επιμήκυνση	Κύκλοι	Τελική επιμήκυνση
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	95° C ► 5m	95° C ► 30s	55°C ► 30s	72° C ► 60s	35	72° C ► 10m
<i>bla<sub>NDM</sub></i>	95° C ► 5m	95° C ► 30s	50°C ► 30s	72° C ► 60s	35	72° C ► 10m
<i>bla<sub>IMP</sub></i>	95° C ► 5m	95° C ► 30s	55°C ► 30s	72° C ► 60s	35	72° C ► 10m
<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	95° C ► 5m	95° C ► 30s	58°C ► 30s	72° C ► 60s	35	72° C ► 10m
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	95° C ► 5m	95° C ► 30s	52°C ► 40s	72° C ► 50s	35	72° C ► 10m

**ΠΙΝΑΚΑΣ 21.** Συνθήκες διεξαγωγής PCR.

### 2.6.1. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΕΙΣΔΟΧΗΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΜΒLS

Η μελέτη του γενετικού περιβάλλοντος των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις VIM ΜΒLS πραγματοποιήθηκε με PCR. Οι μεταβλητές περιοχές των τάξης 1 ιντεγκρονίων με γονίδια τύπου *bla<sub>VIM</sub>* ενισχύθηκαν σε δύο μέρη, από το 5' συντηρημένο τμήμα (5'CS) έως το *bla<sub>VIM</sub>*, και από το *bla<sub>VIM</sub>* έως το 3' συντηρημένο τμήμα (3'CS).[59]Ολόκληρες οι συστοιχίες των γονιδίων-κασετών υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση με τη χρήση της ABI 3500 πλατφόρμας (Applied Biosystems, Foster City, CA). Η βάση δεδομένων Integrall (<http://integrall.bio.ua.pt>) χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση και αντιστοίχιση των αλληλουχιών των ιντεγκρονίων [58].

### 2.7. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική για την ανάλυση των νουκλειικών 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 φως 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 H<sub>2</sub>O 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 αραιώση του 10x TBE buffer σε συγκέντρωση 1x, με ανάμειξη 100ml 10x TBE και 900ml H<sub>2</sub>O (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. Ακολουθώς προσθέτουμε 2ml 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.

## **2.8. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ PCR ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ**

Ο καθαρισμός των PCR προϊόντων, είναι απαραίτητη διαδικασία προκειμένου τα προϊόντα να αλληλουχηθούν με επιτυχία. Με την διαδικασία αυτή από το DNA απομακρύνονται οι εκκινητές, τα dNTPs, τα ένζυμα, τα άλατα, και όλα τα συστατικά και οι προσμίξεις της αντίδρασης. Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε σε όλα τα υπό μελέτη δείγματα DNA (PCR amplicons) των στελεχών *P. aeruginosa* 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 (B<sub>2</sub>/B<sub>3</sub>)

2) Wash buffer ( $W_1$ )

4) Ισοπροπανόλη 100%

5) Αιθανόλη 96%-100%

6) Φυγόκεντρος Mini Spin (για σωληνάρια τύπου eppendorf)

## **ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**

Ο καθαρισμός του DNA επιτελείται σε τρία στάδια:

**1<sup>ο</sup> Στάδιο: Δέσμευση του DNA:** Σε κάθε προϊόν PCR (20μl) προσθέσαμε τετραπλάσιο όγκο αραιωμένου Binding Buffer ( $B_2$ ) 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<sup>ο</sup> Στάδιο: Καθαρισμός του DNA:** Προσθέτουμε σε κάθε στήλη 650μl Wash buffer ( $W_1$ ), το οποίο περιέχει αιθανόλη 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 σωληνάριο έκλουσης Pure Link (1.7ml), και απορρίπτουμε τους παλιούς σωλήνες συλλογής του διηθήματος.

**3<sup>ο</sup> Στάδιο: Εκλούση DNA:** Στη συνέχεια προσθέτουμε 50μl Elution buffer ( $E_1$ ) στο κέντρο κάθε στήλης, ώστε η στήλη να διαβραχεί και έτσι να αποδεσμευτεί όλη η ποσότητα DNA, επάζοντας 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 το καθαρισμένο προϊόν PCR, το οποίο μπορεί να ελεγχθεί μετά το πέρας της διαδικασίας με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. 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).

## **2.9 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 [60]. 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 καθεμία 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 δυνατό 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 [61].

## **2.10 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. Κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν σε απαραίτητες μεταβολικές αντιδράσεις. Συγκεκριμένοι εκκινητές έχουν σχεδιαστεί προκειμένου να ενισχύσουν τμήματα (~500bp αυτών των γονιδίων) και 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 την *P. aeruginosa*, 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](http://www.mlst.net) και [www.pubmlst.org](http://www.pubmlst.org), που προέρχονται από το Imperial College, London και το Oxford University αντίστοιχα.

### 2.10.1 ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ MLST ΓΙΑ ΤΗΝ *P. aeruginosa*

Στην μελέτη μας καθορίσαμε τον MLST (ST) τύπο, σύμφωνα με το σχήμα τυποποίησης του Ινστιτούτου Pasteur[62] χρησιμοποιώντας τα εξής παρακάτω επτά γενετικά σταθερά γονίδια (απαραίτητα για την επιβίωση) της *P. aeruginosa*:

- 1) *acsA* (συνθετάση του ακέτυλο-συνενζύμου A )
- 2) *aroE* (αφυδρογονάση του σικιμικού οξέως)
- 3) *guaA* (συνθάση του GMP)
- 4) *mutL* (πρωτεΐνη επιδιόρθωσης του DNA)
- 5) *nuoD* (αφυδρογονάση I του NADH)
- 6) *ppsA* (συνθάση του φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικού οξέος)
- 7) *trpE* (αθραυλική συνθάση)

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. Οι αλληλουχίες των εκκινητών καθώς και οι συνθήκες της PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την τυποποίηση στελεχών *P. aeruginosa* με την μέθοδο MLST αναφέρονται στους παρακάτω πίνακες.

<b>EKKINHTEΣ</b>	<b>ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ</b>	<b>ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΙΟΝΤΟΣ</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ</b>
<b>acsA:F</b>	ACCTGGTGTACGCCTCGCTGAC	842bp	[61], [63]
<b>acsA:R</b>	GACATAGATGCCCTGCCCCCTTGAT	842bp	[61], [63]
<b>aroE:F</b>	TGGGGCTATGACTGGAAACC	1052bp	[61], [63]
<b>aroE:R</b>	TAACCCGGTTTTGTGATTCCTACA	1052bp	[61], [63]
<b>guaA:F</b>	CGGCCTCGACGTGTGGATGA	897bp	[61], [63]
<b>gluaA:R</b>	GAACGCCTGGCTGGTCTTGTCTTA	897bp	[61], [63]
<b>mutL:F</b>	CCAGATCGCCGCCGGTGAGGTG	898bp	[61], [63]
<b>mutL:R</b>	CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC	898bp	[61], [63]
<b>nuoD:F</b>	ACCGCCACCCGTA CTG	1042bp	[61], [63]
<b>nuoD:R</b>	TCTCGCCCATCTTGACCA	1042bp	[61], [63]
<b>ppsA:F</b>	GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG	989bp	[61], [63]
<b>ppsA:R</b>	GGGTTCTCTTCTTCCGGCTCGTAG	989bp	[61], [63]
<b>trpE:F</b>	GCGGCC CAGGGTCGTGAG	811bp	[61], [63]
<b>trpE:R</b>	CCCGGCGCTTGT TGATGGTT	811bp	[61], [63]

**ΠΙΝΑΚΑΣ 22.** Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της MLST.

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

**ΠΙΝΑΚΑΣ 23.** Συνθήκες διεξαγωγής των PCR, housekeeping γονιδίων.

## 2.11 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΑΛΛΟΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΠΕΔΙΟ (PFGE)

Επιπλέον, για την μελέτη της κλωνικής συγγένειας των στελεχών της παρούσας μελέτης έγινε τυποποίηση με ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulse field Gel Electrophoresis [PFGE]) του χρωμοσωμικού DNA όλων των στελεχών που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης μετά από πέψη τους με το ένζυμο *ApaI* [64]. Ακολούθησε ανάλυση των γενετικών αποτυπωμάτων των στελεχών οπτικά, εφαρμόζοντας διεθνώς αποδεκτά κριτήρια [65]. Την PFGE [66] 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 αγαρόζης, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η μηχανική ρήξη του DNA. Τα κύτταρα πέπτονται με πρωτεϊνάση 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 [66]. 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 βακτηριακών στελεχών ανθεκτικών στα αντιβιοτικά. [67]

### 2.11.1 PFGE ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Τα στελέχη τυποποιήθηκαν με μακροπεριοριστική πέψη του γενωμικού DNA με το περιοριστικό ένζυμο *ApaI* και την ακόλουθη ανάλυση των νουκλειικών 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% αгарόζη χαμηλού σημείου τήξεως (LMT-Low Melting Temperature Agarose) σε 50 ml H<sub>2</sub>O και διατηρήθηκε στους 55° C για 30 λεπτά.

5) 150μl όγκου αгарόζης αναμείχθηκε με ίδιο όγκο δείγματος και παρασκευάστηκαν 13 πλακίδια μείγματος αгарόζης-μικροβίου (από 100μl), ανάμεσα σε πλαστικές επιφάνειες (εκμαγείο). 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 διάλυμα 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) Εγινε πέψη μισού πλακιδίου από κάθε στέλεχος σε 20 μl 10x digestion buffer με 10Units περιοριστικού ενζύμου *Apa I*, στους 37° C σε ολονύκτια επώαση.

10)Εν συνεχεία τοποθετήθηκαν για 10 λεπτά στους 4° C και επώστηκαν 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 αгарόζη 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

13) 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 φώς.

## **2.12 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ**

Για τον καθορισμό των γενετικών μονάδων των γονιδίων *bla<sub>VIM</sub>*, τα πλασμιδιακά περιεχόμενα των αντιπροσωπευτικών κλινικών στελεχών που παράγουν VIM-τύπου καρβαπενεμάσες 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 αгарόζης, 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 αгарόζη, 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 πήκτωμα αгарόζης και στη συνέχεια ηλεκτροφορούνται σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Κατά την ηλεκτροφόρηση, η τάση δεν κινείται συνεχώς προς μια κατεύθυνση, αλλά αλλάζει περιοδικά μεταξύ τριών κατευθύνσεων. Το DNA κινείται αλλάζοντας συνεχώς διαδρομή και ο διαχωρισμός των DNA τμημάτων 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.



### 2.12.1 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 αγαρόζη 1.6% σε H<sub>2</sub>O, η οποία ψύχεται στους 55° C.
5. Αναμειχθηκαν 150 μl βακτηριακού εναιωρήματος με 150 μl 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 5ml λυσοζύμης 100mg/ml και 2μl RNAase 10mg/ml, στους 37° C για 18 ώρες χωρίς ανακίνηση.
7. Το Lysis Solution αντικαταστάθηκε με 1ml ESP με την προσθήκη 20μl πρωτεϊνάση K (50mg/ml). Τα πλακίδια επώστηκαν στους 50°C χωρίς ανακίνηση.
8. Αφαιρέθηκε το ESP/PrK διάλυμα και ακολούθησε πλύσιμο των πλακιδίων με 1ml ρυθμιστικού διαλύματος TE σε RT (θερμοκρασία δωματίου), ολονύκτια, χωρίς ανακίνηση.
9. Την επόμενη μέρα έγιναν πλύσεις των πλακιδίων με 1ml ρυθμιστικού διαλύματος TE, 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 τα πλακίδια τοποθετήθηκαν στους 4°C για 10 λεπτά και επώστηκαν σε 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 15 λεπτά.
12. Αμέσως μετά, απομακρύνθηκε το TE διάλυμα και κάθε πλακίδιο καλύφθηκε από 150μl διαλύματος 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 12 s- 65s για 12h

Χρόνος εκτέλεσης 24 ώρες

14. Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολούθησε βαφή με 0.5  $\mu\text{g/ml}$  βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) σε απεσταγμένο νερό για τουλάχιστον 45 λεπτά και η παρατήρηση έγινε κάτω από υπεριώδες φώς.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από το σύνολο των 120 στελεχών που ερευνήθηκαν κατά την διάρκεια της μελέτης, το 20% (n= 24) προήλθαν από τη ΜΕΘ, το 20% (n=24) από τις Παθολογικές κλινικές, οι οποίες περιλαμβάνουν. Επίσης προήλθαν από τον Χειρουργική σε ποσοστό 10,8% (n=13), και Πνευμονολογική σε ποσοστό 7,5% (n=9). Από το Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών (ΤΕΠ) προήλθε το 10,8% (n=13), ενώ τα *P. aeruginosa* που απομονώθηκαν από ασθενείς της Παιδιατρικής κλινικής ήταν το 7.5% (n=9). Οι υπόλοιπες κλινικές ανέφεραν το 23,4% των στελεχών (n=28). Τα στελέχη προήλθαν από αίμα (n = 26, 21,7%), πτύελα (n = 22, 18,3%), ούρα (n = 16, 13,3%), αναπνευστικές εκκρίσεις (n = 14, 11,7%) και άλλο υλικό (42 35,0%). Ακολουθούν οι πίνακες με τη διασπορά των κλινικών στελεχών στις διάφορες κλινικές (Πίνακας 24), καθώς και με την διασπορά των απομονωθέντων στελεχών ανά κλινικό δείγμα (Πίνακας 25).

ΚΛΙΝΙΚΗ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ
ΜΕΘ	24 (20%)
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ	24 (20 %)
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΕΣ	13 (10.8%)
ΤΕΠ	13 (10.8%)
ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΕΣ	9 (7,5%)
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΕΣ	9 (7,5%)
ΛΟΙΠΕΣ	28 (23,4%)
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>120</b>

**ΠΙΝΑΚΑΣ 24.** Διασπορά των στελεχών *P. aeruginosa* ανά κλινική του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

ΚΛΙΝΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ
ΑΙΜΑ	26(21,7%)
ΒΡΟΓΧΙΚΕΣ ΕΚΚΡΙΣΕΙΣ	14( 11.7%)
ΟΥΡΑ	16(13,3%)
ΠΤΥΕΛΑ	22(18,3%)
ΔΙΑΦΟΡΑ	42(35%)

**ΠΙΝΑΚΑΣ 25.** Διασπορά των στελεχών *P. aeruginosa* ανά είδος κλινικού δείγματος.

### 3.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ

Η πλειοψηφία των στελεχών *P. aeruginosa* ήταν ανθεκτικά σε κεφταζιδίμη (n=93, 77,5%), κεφεπίμη (n=87, 72,5%), μιπενέμη (n=115, 95,8%), μεροπενέμη (n=96, 80,0%), πιπερακιλλίνη (n=114, 95,0%) και πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη (n=109, 90,8%). Μόνο 62 (51,7%) στελέχη ήταν ανθεκτικά στην αζτρεονάμη. Εκατόν οκτώ (90,0%) των στελεχών *P. aeruginosa* επίσης εμφάνιζαν αντοχή στη λεβοφλοξασίνη, 104 (86,7%) ήταν ανθεκτικά στην σιπροφλοξασίνη, 92 (76,7%) ήταν ανθεκτικά στην τομπραμυκίνη, 78 (65,0%) ήταν ανθεκτικά στην αμικακίνη και 70 (58,3%) ήταν ανθεκτικά στη γενταμικίνη. Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 25, Πίνακας26), φαίνονται αναλυτικά τα αποτελέσματα του ελέγχου ευαισθησίας των στελεχών *P. aeruginosa*.

Antimicrobial agent	Range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
Piperacillin	4 - >128	>128	>128
Piperacillin-tazobactam	4 - >128	>128	>128
Ceftazidime	≤1 - >64	32	>64
Cefepime	<1 - >64	32	>64
Aztreonam	<1 - >64	16	>64
Imipenem	1 - >32	>16	>16

Meropenem	1 - >32	>32	>32
Ciprofloxacin	≤0.25 - >4	>4	>4
Levofloxacin	≤0.12 - >8	>8	>8
Amikacin	≤2 - >64	>64	>64
Gentamicin	≤1 - >16	>16	>16
Tobramycin	≤1 - >16	>16	>16

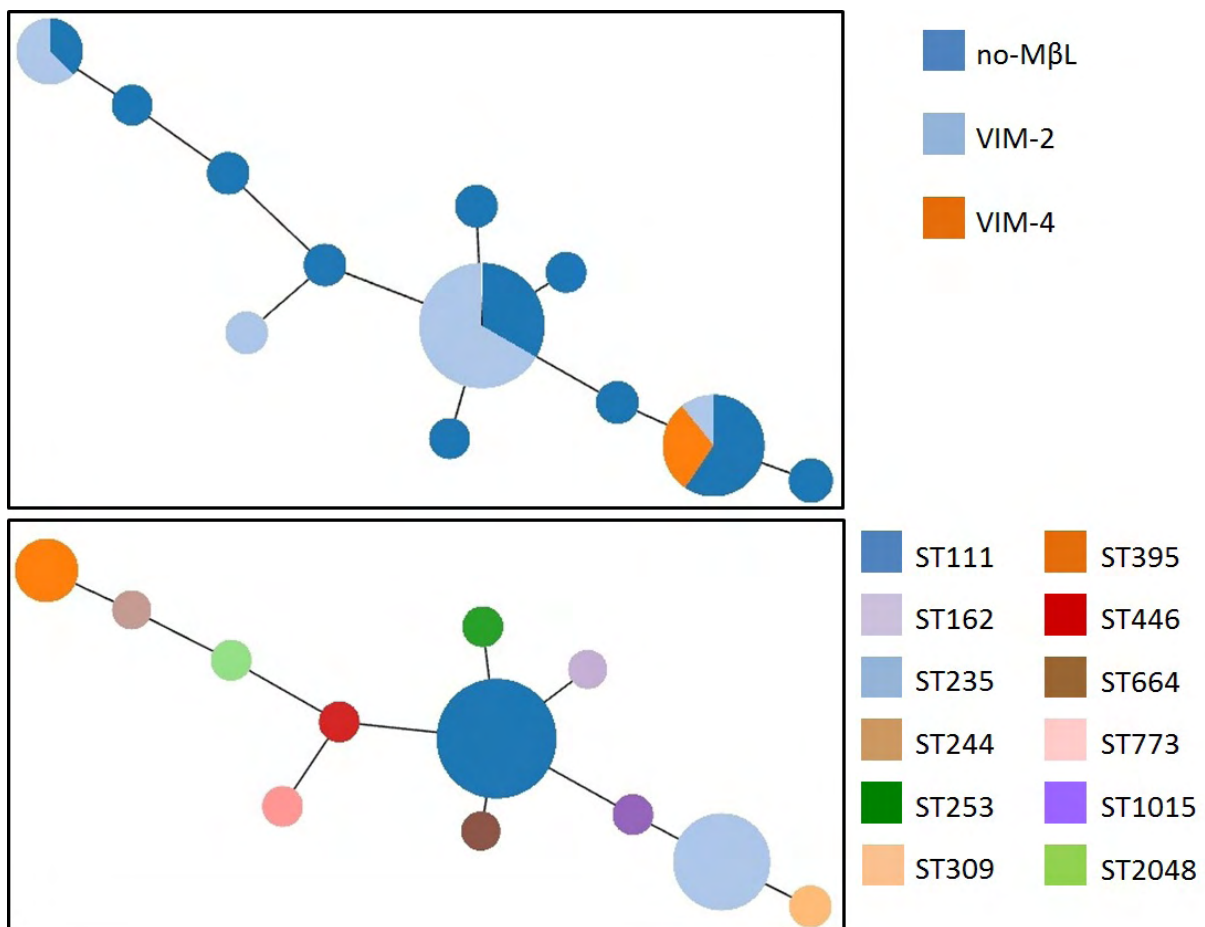
**ΠΙΝΑΚΑΣ 26.** Οι ευαισθησίες Η ευαισθησία των *P. aeruginosa* στα διάφορα αντιβιοτικά, συμπεριλαμβάνοντας το εύρος των MICs και τις MIC<sub>50</sub> και MIC<sub>90</sub> τιμές

<b>ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ</b>	<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ</b>
<b>Πιπερακιλλίνη (Piperacillin)</b>	114 (95,0%)
<b>Πιπερακιλλίνη-Ταζομπακτάμη (Piperacillin-tazobactam)</b>	109 (90,8%)
<b>Κεφταζιδίμη (Ceftazidime)</b>	93 (77,5%)
<b>Κεφεπίμη (Cefepime )</b>	87 (72,5%)
<b>Αζτρεονάμη (Aztreonam)</b>	62 (51,7%)
<b>Ιμιπενέμη (Imipenem)</b>	115 (95,8%)
<b>Μεροπενέμη (Meropenem)</b>	96 (80,0%)
<b>Λεβοφλοξασίνη (Levofloxacin)</b>	108 (90,0%)
<b>Σιπροφλοξασίνη (Ciprofloxacin)</b>	104 (86,7%)
<b>Τομπραμυκίνη (Tobramycin)</b>	92 (76,7%)
<b>Αμικακίνη (Amikacin)</b>	78 (65,0%)
<b>Γενταμικίνη (Gentamicin)</b>	70 (58,3%)

**ΠΙΝΑΚΑΣ 27.** Ποσοστά αντοχής των στελεχών *P. aeruginosa*

### 3.2. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΩΝ

Σε 70 από τα στελέχη, η δοκιμή EDTA-μεροπενέμης φάνηκε να είναι θετική, υποδεικνύοντας τη παραγωγή μέταλλο-β-λακταμάσης (MβL). Ωστόσο, ο PCR έλεγχος έδειξε ότι 61 από τα 70 στελέχη, που ήταν θετικά στο τεστ EDTA-μεροπενέμης, ήταν θετικά για την παρουσία *bla*<sub>VIM</sub> γονιδίων. Άλλοι τύποι γονιδίων, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> και *bla*<sub>OXA-48</sub>, που κωδικοποιούν για καρβαπενεμάσες δεν εντοπίστηκαν. Είκοσι δύο από τα VIM-παραγωγά στελέχη ανακτήθηκαν από θετικές καλλιέργειες αίματος. Τα VIM-παραγωγά στελέχη συλλέχθηκαν από όλες τις κλινικές, με την πλειονότητα των στελεχών να προέρχονται από ασθενείς που νοσηλεύτηκαν στη Παθολογική κλινική (n = 17), στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (n = 12) και στο Τμήμα Επείγοντων Περιστατικών (n = 9)



**ΕΙΚΟΝΑ 28:** MSP δέντρο των 120 *P. aeruginosa*, που απομονώθηκαν στο UHL κατά τη διάρκεια του έτους 2018, δείχνοντας τύπους ακολουθίας (STs) και περιεχόμενο carbapenemase. Κάθε κύκλος αντιστοιχεί σε ένα ST. Η περιοχή κάθε κύκλου είναι ανάλογη με τον αριθμό των απομονωμένων στελεχών.

### 3.3. ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ MLST

Η τυποποίηση των στελεχών *P. aeruginosa* έγινε με τη μέθοδο MLST σύμφωνα με το σχήμα του Ινστιτούτου Pasteur (MLST<sup>P</sup>), η οποία ανέδειξε ότι τα καρβαπενεμάση-παραγωγά *P.*

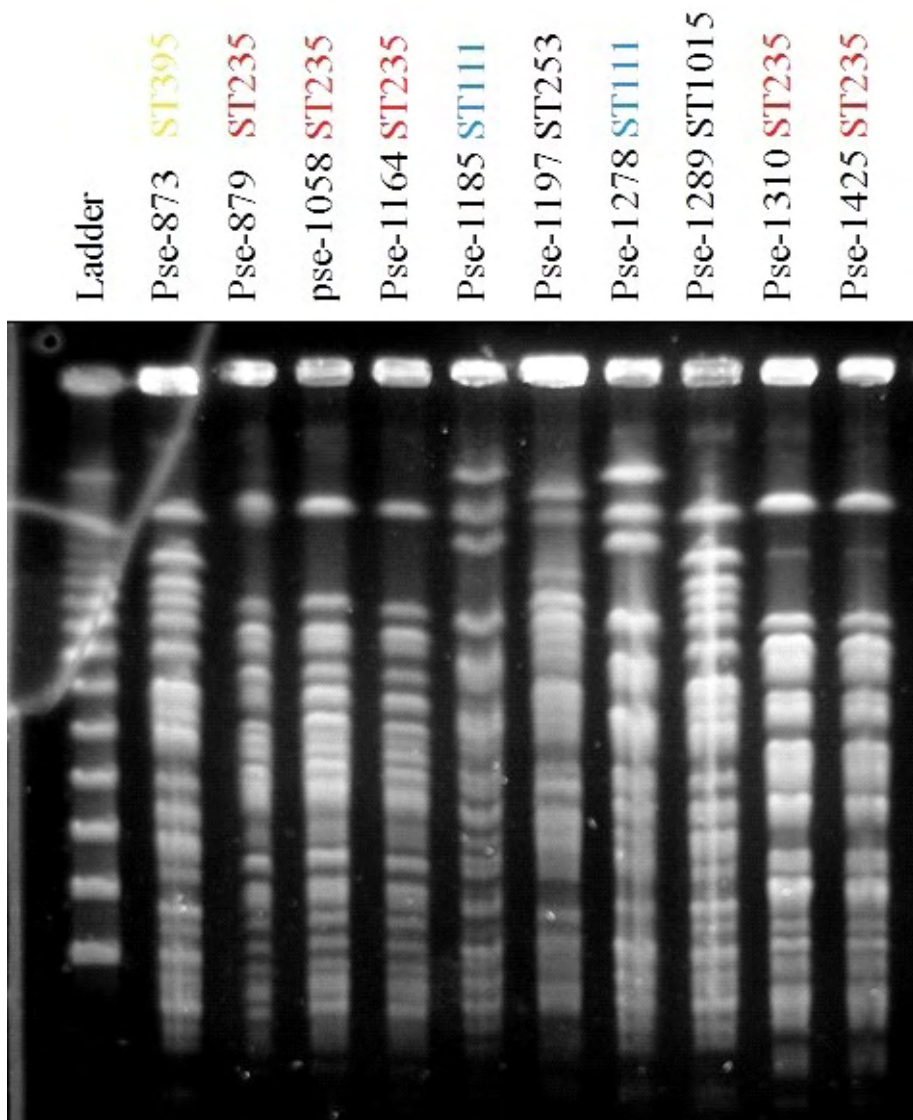
*aeruginosa* στελέχη περιλάμβαναν 4 STs. Ο ST111 ήταν ο πιο διαδεδομένος, συμπεριλαμβάνοντας 34 VIM-παραγωγά στελέχη (Πίνακας 29). Είκοσι πέντε VIM-παραγωγά στελέχη κατανεμήθηκαν στα STs 235 (n=15) και 395 (n=10). Οι STs 111, 235 και 395 έχουν θεωρηθεί ως «κλώνοι υψηλού κινδύνου». Τα υπόλοιπα VIM-παραγωγά *P. aeruginosa* στελέχη ανήκαν στον ST773 (n=2). Ωστόσο, υψηλότερη γενετική ποικιλομορφία βρέθηκε στην ομάδα των στελεχών που δεν παράγουν καρβαπενεμάση (Πίνακας 29). Αυτή η ομάδα στελεχών (n=59) περιελάμβανε 11 κλώνους, με STs 235 (n=14) και 111 (n=11) να περιλαμβάνουν 25 από τα στελέχη.

ST	MβL	No. of isolates	Integrans with <i>bla</i> <sub>VIM</sub> genes
ST111	VIM-2	34	In59
	-	17	-
ST162	-	1	-
ST235	VIM-2	4	In59
	VIM-4	11	In595
	-	22	-
ST244	-	1	-
ST253	-	2	-
ST309	-	3	-
ST395	VIM-2	10	In1760
	-	6	-
ST446	-	2	-
ST664	-	1	-
ST773	VIM-2	2	In59
ST1015	-	2	-
ST2048	-	2	-

**Πίνακας 29.** Πληθυσμιακή δομή των 120 *P. aeruginosa* στελεχών, που ανακτήθηκαν από το UHL κατά τη διάρκεια του 2018.

### 3.4. ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ PGFE

Την MLST ακολούθησε η τυποποίηση των στελεχών με την PGFE χρησιμοποιώντας το περιοριστικό ένζυμο ApaI για την μακροπεριοριστική πέψη του γενωμικού DNA. 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 10 στελεχών από τα 120 που ερευνήθηκαν. Τα ευρήματα επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την MLST τυποποίηση. Όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα, συγκεκριμένα τα στελέχη στις θέσεις 3, 4, 10 και 11 ανήκουν στον κλώνο ST235, ενώ τα στελέχη στις θέσεις 7 και 9 ανήκουν στον κλώνο ST111.



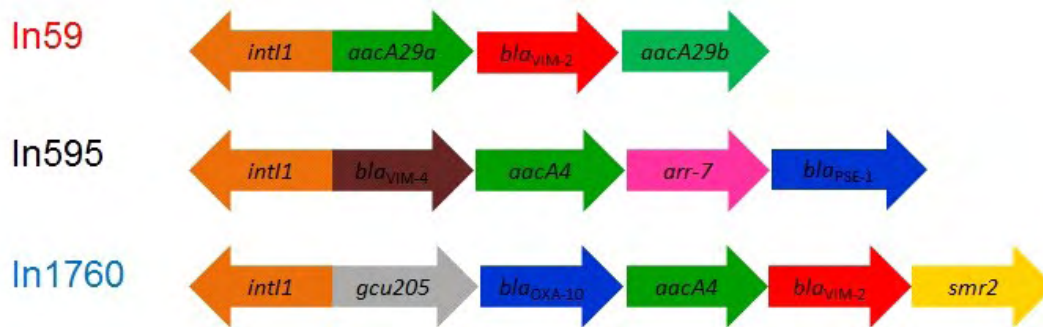
**ΕΙΚΟΝΑ 30:** PFGE τυποποίηση αντιπροσωπευτικών *P. aeruginosa* στελεχών .

### 3.5 ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΤΩΝ *bla*<sub>VIM</sub> ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Ο χαρακτηρισμός των περιοχών, που περικλείουν τα γονίδια που κωδικοποιούν για καρβαπενεμάσες, μέσω χαρτογράφησης με PCR και προσδιορισμό της αλληλουχίας, έδειξε ότι τα *bla*<sub>VIM</sub> γονίδια εντοπίστηκαν σε τρεις κύριους τύπους τάξης 1 ιντεγκρονίων (Πίνακας 27) (Εικόνα 30). Το πιο κοινό ιντεγκρόνιο ήταν το In59 που βρέθηκε σε 40 *P. aeruginosa* στελέχη, συμπεριλαμβανομένων 34 ST111, 4 ST235 και 2 ST773 στελέχη. Το In59 έφερε τις *aacA29a*, *bla*<sub>VIM-2</sub> και *aacA29b* γονιδιακές κασσέτες. Ωστόσο, τα 11 εναπομείναντα ST235 VIM-παραγωγά στελέχη έφεραν το τάξης 1 ιντεγκρόνιο In595, το οποίο συμπεριλαμβάνει τη σειρά των *bla*<sub>VIM-4</sub>, *arr-7*, *aacA4*, *bla*<sub>PSE-1</sub> γονιδίων κασσετών. Το In595 έχει προηγουμένως περιγραφεί στη Σκανδιναβία, όπου εντοπίστηκε σε δύο MBL-παραγωγά στελέχη που εισήχθησαν από την Ελλάδα και την Κύπρο. Ένα από τα δύο παραπάνω στελέχη άνηκε επίσης στον ST235. Τέλος, μεταξύ των ST395 VIM-παραγωγών στελεχών, το τάξης 1



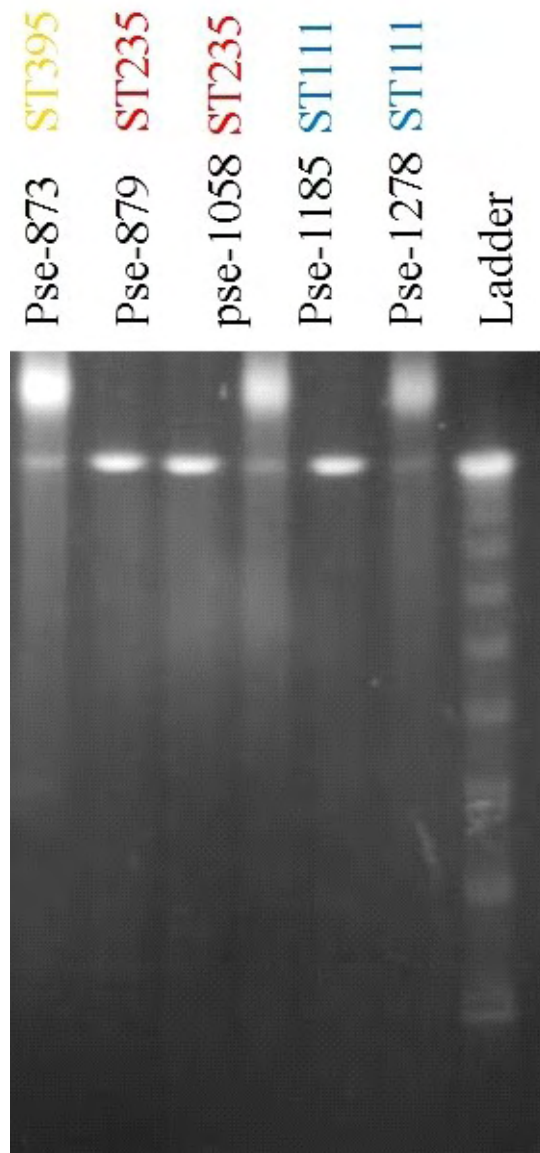
ιντεγκρόνιο In1760, του οποίου η μεταβλητή περιοχή περιλάμβανε τις *gcu205*, *bla<sub>OXA-10</sub>*, *aacA4*, *bla<sub>VIM-2</sub>* και *smr-2* κασσέτες, εντοπίστηκε.



**ΕΙΚΟΝΑ 31:** Γενετικό περιβάλλον των *bla<sub>VIM</sub>* γονιδίων

### 3.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΕΝΤΟΠΙΣΗΣ ΤΩΝ *bla<sub>VIM</sub>* ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Ο προσδιορισμός της γενετικής θέσης των *bla<sub>VIM</sub>* γονιδίων, πραγματοποιήθηκε με την πέψη ολικού DNA, χρησιμοποιώντας την S1 νουκλεάση και ακολουθώντας το πρωτόκολλο PFGE S1, για 6 αντιπροσωπευτικά στελέχη που έφεραν το συγκεκριμένο γονίδιο. DNA ζώνες που θα μπορούσαν να αποδοθούν σε πλασμιδιακά μόρια δεν βρέθηκαν (Εικόνα 32).



**ΕΙΚΟΝΑ 32:** Απεικόνιση της πλασμιδιακής ανάλυσης με PFGE S1, αντιπροσωπευτικών στελεχών.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη, τα μοριακά χαρακτηριστικά των καρβαπενέμη-ανθεκτικών *P. aeruginosa* στελεχών που ανακτήθηκαν κατά τη διάρκεια του προγράμματος επιτήρησης στο UHL, το 2018, εξετάστηκαν. Το 50,8% των στελεχών επιβεβαιώθηκε ότι παρήγαγε VIM-τύπου καρβαπενεμάσες. Η πλειονότητα (80,3%) των στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάση ανήκε στους «κλώνους υψηλού κινδύνου», ST111 και ST235, ενώ υψηλότερη γενετική ποικιλομορφία βρέθηκε στην ομάδα των στελεχών που δεν παράγουν καρβαπενεμάση. Οι κλώνοι ST111 και ST235 έχουν προηγουμένως συσχετισθεί με τη

παραγωγή VIM-τύπου μεταλλο-β-λακταμασών σε *P. aeruginosa* στελέχη τόσο από ελληνικά νοσοκόμεια όσο και από νοσοκμεία Ευρωπαϊκών χωρών. Επιπλέον, βρέθηκαν τρεις κύριοι τύποι τάξης 1 ιντεγκρονών, που φέρουν *bla*<sub>VIM</sub> γονίδια. Το In59, το οποίο περιγράφηκε για πρώτη φορά στη Γαλλία το 1998, ήταν ο πιο κοινός τύπος ιντεγκρονίων που βρέθηκε στα στελέχη *P. aeruginosa* των STs 111, 235 και 773. Επιπλέον, το ιντεγκρόνιο In595, που κωδικοποιεί τη VIM-4 MβL, εντοπίστηκε σε 11 ST235 *P. aeruginosa*, ενώ το ιντεγκρόνιο In1760, που κωδικοποιεί το ένζυμο VIM-2, βρέθηκε μεταξύ των ST395 στελεχών.

Συμπερασματικά, τα ευρήματά μας που συμφωνούν με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών [2], υπογράμμισαν τον σημαντικό ρόλο των κλώνων «υψηλού κινδύνου», όπως οι STs 111 και 235, στην επιτυχή διάδοση κλινικά σημαντικών παραγόντων αντοχής. Επιπλέον, τα *bla*<sub>VIM</sub> εντοπίστηκαν σε τάξης 1 ιντεγκρόνια, τα οποία συχνά συνδέονται με μεταφερόμενες δομές. Επομένως, η αναγνώριση των υπερ-επιδημικών κλώνων *P. aeruginosa* που παράγουν καρβαπενεμάσες, με τη χρήση μοριακών εργαλείων, αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό βήμα προς την ανίχνευση των οδών μετάδοσης, την ανάπτυξη στοχευμένων στρατηγικών ελέγχου και πρόληψης, και την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητάς τους.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Κουμεντάκου Ειρήνη. Ψευδομονάδες – νόσοι εκ ψευδομονάδων, Οικολογία και Μικροβιολογία των ψευδομονάδων. Πρακτικά 6ου Εθνικού Συνεδρίου Μικροβιολογίας. Αθήνα 1974.
- [2] Αντιγόνη Αρσένη. Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή διάγνωση των λοιμώξεων, Ψευδομονάδες, 4η έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις «Ζήτα», 1994.
- [3] Cohen J, Powderly WG. Infectious Diseases, Pseudomonas and Miscellaneous Gram-negative Bacilli. 2nd edition, Mosby. 2004.
- [4] Koneman WE, Allen DS, Janda MW, Schreckenberger CP, Winn CW. Color atlas and textbook of Diagnostic Microbiology. 5th edition, Lippincott Williams & Wilkins 1997.
- [5] Παπαπαναγιώτου Ι, Κυριαζοπούλου – Δαλαϊνα Β. Ιατρική Μικροβιολογία και ιολογία. 1η έκδοση University Studio Press. Θεσσαλονίκη, 2001.
- [6] Legakis NJ, Aliferopoulou M, Papavasiliou J, Papapetropoulou M. Serotypes of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical specimens in relation to antibiotic susceptibility. *J Clin. Microbiol.* 1982, 16: 458
- [7] Pitt TL, Livermore DM, Pitcher D, Vatopoulos AC, Legakis NJ. Multiresistant serotype O12 *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for a common strain in Europe. *Epidem. Infect.* 1989, 103:565-567.
- [8] Mutharia MI, Nicas IT, Hancock ER. Outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* serotype strains. *J Infect. Dis.* 1982, 146:770-779.
- [9] Todar K. Todar's Online Textbook of Bacteriology, Bacterial Diseases of Humans, Opportunistic Infections by *Pseudomonas aeruginosa*. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. 2002
- [10] . Harrison's. Principles of Internal Medicine. 14th edition, McGraw – Hill. 2000.
- [11] Αντωνιάδης Α, Αντωνιάδης ΓΡ, Λεγάκης Ν, Τσελέντης Ι. Ιατρική Μικροβιολογία. Εκδόσεις Πασχαλίδη. 1999.
- [12] Wenzel R, Brewer T, Butzler J-P. Οδηγός Ελέγχου Λοιμώξεων στο Νοσοκομείο. Επίσημη έκδοση της Διεθνούς Εταιρείας Λοιμώξεων (International Society for Infectious Diseases, ISID), 2002.
- [13] . Siegman-Igra Y, Ravona R, Primerman H, and Giladi M. (1998). *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: an analysis of 123 episodes, with particular emphasis on the effect of antibiotic therapy. *International journal of Infectious Diseases.* 1998, 2:211-5.
- [14] Rello J, Rue M, Jubert P, Muses G, Sonora R, Valles J, Niederman SM. Survival in patients with nosocomial pneumonial pneumonia: impact of the 115 severity of illness and the etiologic agent. *Critical Care Medicine.* 1997, 25:1862-7.

- [15] . Pollack M. *Pseudomonas aeruginosa*. In principles and Practice of infectious Diseases, 4th edn, (Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R., Eds), pp. 1980- 2003. Churchill Livingstone, London, UK. 1995.
- [16] Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos MG, and Samore HM. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999, 43:379-82.
- [18] Vincent LJ, Bihari LD, Suter MP, Bruining AH, White J, NicolasChanoin M, Wolff M, Spencer CR, Hemmer M. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe: results of the European prevalence of infection in intensive care (EPIC) Study. *JAMA*. 1995, 74:639- 44
- [19] Centers for Disease Control and Prevention. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1990-May 1999. *Am J Infect Control*. 1999, 27:520-32
- [20] Diekema JD, Pfaller AM, Jones NR, Doerm VG, Winokur LP, Gales CA, Sader SH, Kugler K, Beach M. Survey of blood-stream infections due to Gram-negative bacilli: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada and Latin America for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Clin Infect Dis*. 1997, 29:595-607.
- [21] Pitt LT. Epidemiological typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1988, 7:238-247.
- [22] . Fyfe M, Harris G, Govan J. Revised pyocin typing method for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. 1984, 20:47-50.
- [23] Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 11th ed, Mosby. 2002.
- [24] Maslow J, Slutsky A, Arbeit R. Application of Pulsed-Field Gel Electrophoresis to Molecular Epidemiology.
- [25] Ogle WJ, Vasil LM. Molecular approaches to epidemiologic typing of *Pseudomonas aeruginosa*. In: Fick RB, ed. *Pseudomonas aeruginosa, the opportunist, pathogenesis and disease*. Boca-Raton, FL: CRC press. 1993.
- [26] McCartney AL. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *Br J Nutr*. 2002 Sep;88 Suppl 1:S29-37.
- [27] Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2020 Jan 24]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6373014>

- [28] Subtyping and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. in the intensive care unit of a Greek general hospital. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2020 Jan 24]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11516942>
- [29] Giamarellou H and Antoniadou A. Antibiotic Therapy, Part II (Antipseudomonal antibiotics). *Medical Clinics of North America*. 2001, 85(1); 19-42.
- [30] Χαλεβελάκης ΓΕ, Λεγάκης ΝΙ, Περόγαμβρος ΤΗ. Αντιβιοτικά και Συνήθεις Λοιμώξεις. Μέρος ΙΙ, Αντιβιοτικά. Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης. 1997.
- [31] Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ, Noreddin AM, Karlowsky JA. Comparative review of the carbapenems. *Drugs*. 2007, 67(7): 1027-52. 38.
- [32] Cedric MA, Playfair HLJ, Ivan RM, Derek W, Rosamund W. *Medical Microbiology. Antimicrob Agents Chemother*. 1993, Mosby Europe Limited.
- [33] Giamarellou H. Prescribing guidelines for severe *Pseudomonas* infections. *J Antimicrob Chemother*. 2002, 49:229-233.
- [34] Rahal JJ. Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin Infect Dis*. 2006, 43:S95-99.
- [35] [Mahillon J, Chandler M. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 1998 Sep;62(3):725–74.
- [36] 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.
- [37] 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.
- [38] 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.
- [39] Collis CM, Hall RM. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 Jan;39(1):155–62.
- [40] 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.
- [41] Collis CM, Hall RM. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 Jan;39(1):155–62.
- [42] 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.

- [43] 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.
- [44] 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.
- [45] Rowe-Magnus DA, Guerout A-M, Ploncard P, Dychinco B, Davies J, Mazel D. The evolutionary history of chromosomal super-integrans provides an ancestry for multiresistant integrans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jan 16;98(2):652–7.
- [46] Vaisvila R, Morgan RD, Posfai J, Raleigh EA. Discovery and distribution of super-integrans among pseudomonads. *Mol Microbiol.* 2001 Nov;42(3):587–601.
- [47] Hayes F. Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science.* 2003 Sep 12;301(5639):1496–9.
- [48] 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.
- [49] Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structure at the origin of acquisition of the beta-lactamase *bla*<sub>KPC</sub> gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 1257-63.
- [50] Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structure at the origin of acquisition of the beta-lactamase *bla*<sub>KPC</sub> gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;
- [51] Kotsakis SD, Papagiannitsis CC, Tzelepi E, Legakis NJ, Miriagou V, Tzouvelekis LS. GES-13, a  $\beta$ -lactamase variant possessing Lys-104 and Asn-170 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 1331-3.
- [52] Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>NDM-1</sub>, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 5046-54.
- [53] Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 15-22.
- [54] Curran B, Jonas D, Grundmann H et al. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 5644-9.

- [55] Papagiannitsis CC, Medvecky M, Chudejova K, *et al.* Molecular Characterization of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* of Czech origin and evidence for clonal spread of extensively resistant Sequence Type 357 expressing IMP-7 metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; **61**: e01811-17.
- [56] Moura A, Soares M, Pereira C, Leitão N, Henriques I, Correia A. NTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. *Bioinformatics* 2009; **25**: 1096-8.
- [57] Μαρκουλάτος Π, Τζανακάκη Τ, Εργαστηριακές ασκήσεις Μικροβιολογίας-Ιολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. .
- [58] Moura A, Soares M, Pereira C, Leitão N, Henriques I, Correia A. NTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. *Bioinformatics* 2009; **25**: 1096-8.
- [59] Papagiannitsis CC, Medvecky M, Chudejova K, *et al.* Molecular Characterization of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* of Czech origin and evidence for clonal spread of extensively resistant Sequence Type 357 expressing IMP-7 metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; **61**: e01811-17.
- [60] 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.
- [61] El-Shazly S, Dashti A, Vali L, Bolaris M, Ibrahim AS. Molecular epidemiology and characterization of multiple drug-resistant (MDR) clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis.* 2015 Dec;41:42–9.
- [62] Ikonomidis A, Neou E, Gogou V, Vrioni G, Tsakris A, Pournaras S. Heteroresistance to meropenem in carbapenem-susceptible *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 2009 Dec;47(12):4055–9.
- [63] Breidenstein EBM, de la Fuente-Nunez C, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol* 2011; **19**: 419-26.
- [64] 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.
- [65] Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2020 Jan 24]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6373014>



- [66] 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.
- [67] Subtyping and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. in the intensive care unit of a Greek general hospital. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2020 Jan 24]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11516942>
- [68] Breidenstein EBM, de la Fuente-Nunez C, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol* 2011; **19**: 419-26.
- [69] Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol* 2011; **2**: 65.
- [70] Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002; **34**: 634-40.
- [71] Stokes H and Hall R. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol*. 1989, 3: 1669-1683.
- [72] Martinez-Freijo P, Fluit AC, Schmidt F-J, Grek VSC, Verhoef J, Jones ME. Class 1 integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *J. Antimicrob. Chemother*. 1998, 42: 689-696.
- [73] Koeleman JGM, Stoof J, Van Der Bijl MW, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Savelkoul PHM. Identification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* by integrase gene PCR. *J. Clin. Microbiol*. 2001, 39: 8-13.
- [74] Levesque C, Piche L, Larose C, Roy P. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1995, 39:185-191.
- [75] Shaw KJ, Rather PN, Hare RS and Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familiar relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev*. 1993, 57: 138-163.
- [76] R. EW Hancock. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other non-fermentative Gram-negative bacteria. *Clin Inf Dis*. 1998, 27:S93-9.
- [77] Livermore DM. Interplay of impermeability and chromosomal  $\beta$ -lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992, 36:2046-48.
- [78] Horii T, Muramatsu H, Morita M, Maekawa M. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with urinary tract infections during antibiotic therapy. *Microb Drug Resist* 2003, 9:223-9.
- [79] Zanetti G, Bally F, Grueb G, et al. Cefepime versus imipenem-cilastatin for treatment of nosocomial pneumonia in intensive care unit patients: a multicenter, evaluator-blind, prospective, randomized study. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003, 47:3442-7.

- [80] Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999, 43:1379-82. 119
- [81] Jaccard C, Troillet N, Harbarth S, Zanetti G, Avmon D, Schneider R, Chiolerio R, Ricou B, Romand J, Huber O, Ambrosetti P, Praz G, Lew D, Bille J, Glauser MP, Cometta A. Prospective randomized comparison of imipenem-cilastatin and piperacillin-tazobactam in nosocomial pneumonia or peritonitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998, 42:2966-72.
- [ 82] Cometta A, Baumgartner JD, Lew D, Zimmerli W, Pittet D, Chopart P, Schaad U, Herter C, Eggimann P, Huber O, et al. Prospective randomized comparison of imipenem monotherapy with imipenem plus netilmicin for treatment of severe infections in nonneutropenic patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994, 38:1309-13.
- [83]Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis.* 2002, 34:634-40.
- [ 84] Robert A, Bonomo and Dora Szabo. Mechanisms of multidrug resistant in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis.* 2006, 43:S49-56.
- [85] Denton M, Kerr K, Mooney L, Keer V, Rajgopal A, Brownlee K, Arundel P, Conway S. Transmission of colistin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* between patients attending a pediatric cystic fibrosis center. *Pediatr Pulmonol.* 2002, 34:257-61.
- [86] Deplano A, Denis O, Poirel L, Hocquet D, Nonhoff C, Byl B, Nordmann P, Vincent JL, Struelens MJ. Molecular characterization of an epidemic clone of panantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 2005, 43:1198-204.
- [87] 3. Kahan FM, Kropp H, Sundelof JG, Birnbaum J (1983) Thienamycin: development of imipenem-cilastatin. *J Antimicrob Chemother* 12(Suppl D):1–35
- [88] Birnbaum J, Kahan FM, Kropp H, MacDonald JS (1985) Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics. Discovery and development of imipenem/cilastatin. *Am J Med* 78(6A):3–21
- [89] Yourassowsky E, Van der Linden MP, Lismont MJ, Crokaert F, Glupczynski Y (1989) Bactericidal activity of meropenem against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 24(Suppl A): 169–174
- [90] Tsuji M, Ishii Y, Ohno A, Miyazaki S, Yamaguchi K (1998) In vitro and in vivo antibacterial activities of S-4661, a new carbapenem. *Antimicrob Agents Chemother* 42(1):94–99
- [91] Kohler T, Michea-Hamzhepour M, Epp SF, Pechere JC (1999) Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. *Antimicrob Agents Chemother* 43(2):424–427

- [92] Poole K, Krebs K, McNally C, Neshat S (1993) Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J Bacteriol* 175(22):7363–7372
- [93] 14. Castanheira M, Deshpande LM, Costello A, Davies TA, Jones RN (2014) Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009–11 in 14 European and Mediterranean countries. *J Antimicrob Chemother* 69(7):1804–1814. <https://doi.org/10.1093/jac/dku048>
- [94]. Riera E, Cabot G, Mulet X, Garcia-Castillo M, del Campo R, Juan C, Canton R, Oliver A (2011) *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. *J Antimicrob Chemother* 66(9):2022–2027. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr232>
- [95] Yong D, Toleman MA, Bell J, Ritchie B, Pratt R, Ryley H, Walsh TR (2012) Genetic and biochemical characterization of an acquired subgroup B3 metallo-beta-lactamase gene, blaAIM-1, and its unique genetic context in *Pseudomonas aeruginosa* from Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 56(12):6154–6159. <https://doi.org/10.1128/AAC.05654-11>
- [96] Nascimento AP, Ortiz MF, Martins WM, Morais GL, Fehlberg LC, Almeida LG, Ciapina LP, Gales AC, Vasconcelos AT (2016) Intraclonal genome stability of the Metallo-beta-lactamase SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277, an endemic clone disseminated in Brazilian hospitals. *Front Microbiol* 7:1946. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01946>
- [97]. Wendel AF, Kolbe-Busch S, Ressina S, Schulze-Robbecke R, Kindgen-Milles D, Lorenz C, Pfeffer K, MacKenzie CR (2015) Detection and termination of an extended low-frequency hospital outbreak of GIM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST111 in Germany. *Am J Infect Control* 43(6):635–639. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2015.02.024> 19.
- Sun F, Zhou D, Wang Q, Feng J, Feng W, Luo W, Zhang D, Liu Y, Qiu X, Yin Z, Chen W, Xia P (2016) The first report of detecting the blaSIM-2 gene and determining the complete sequence of the SIM-encoding plasmid. *Clin Microbiol Infect* 22(4):347–351. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.001>
- [98] Mataseje LF, Peirano G, Church DL, Conly J, Mulvey M, Pitout JD (2016) Colistin-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 654 with blaNDM-1 arrives in North America. *Antimicrob Agents Chemother* 60(3):1794–1800. <https://doi.org/10.1128/AAC.02591-15>
- [99] Maltezou HC (2009) Metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance? *Int J Antimicrob Agents* 33(5):405 e401–405 e407. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.09.003>
- [100] Hagihara M, Crandon JL, Urban CM, Nicolau DP (2013) KPC presence in *Pseudomonas aeruginosa* has minimal impact on the in vivo efficacy of carbapenem therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 57(2):1086–1088. <https://doi.org/10.1128/AAC.01748-12> 23.
- Sevillano E, Gallego L, Garcia-Lobo JM (2009) First detection of the OXA-40

carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. *Pathol Biol* 57(6):493–495. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.05.002>

[101] Tada T, Shimada K, Satou K, Hirano T, Pokhrel BM, Sherchand JB, Kirikae T (2017) Metallo-beta-lactamases (DIM-1, NDM-1, VIM-2) and a 16S rRNA methyltransferase (RmtB4, RmtF2) producing *Pseudomonas aeruginosa* in Nepal. *Antimicrob Agents Chemother*. <https://doi.org/10.1128/AAC.00694-17>

[102] Riera E, Cabot G, Mulet X, Garcia-Castillo M, del Campo R, Juan C, Canton R, Oliver A (2011) *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. *J Antimicrob Chemother* 66(9):2022–2027. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr232>

[103] Tassios PT, Gennimata V, Spaliara-Kalogeropoulou L, Kairis D, Koutsia C, Vatopoulos AC, Legakis NJ (1997) Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* serogroup O:11 outbreak in an intensive care unit. *Clin Microbiol Infect* 3(6):621–628

[104] Pitt TL, Livermore DM, Pitcher D, Vatopoulos AC, Legakis NJ (1989) Multiresistant serotype O 12 *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for a common strain in Europe. *Epidemiol Infect* 103(3):565–576

[105] Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM (1999) Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 43(7):1584–1590

[106] Xiong J, Hynes MF, Ye H, Chen H, Yang Y, M'Zali F, Hawkey PM (2006) bla(IMP-9) and its association with large plasmids carried by *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the People's Republic of China. *Antimicrob Agents Chemother* 50(1):355–358. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.355-358.2006>

[107] Poirel L, Nordmann P (2002) Acquired carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support. *Curr Pharm Biotechnol* 3(2):117–127

[108] Cornaglia G, Mazzariol A, Lauretti L, Rossolini GM, Fontana R (2000) Hospital outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo-beta-lactamase. *Clin Infect Dis* 31(5):1119–1125. <https://doi.org/10.1086/317448>

[109] Corvec S, Poirel L, Decousser JW, Allouch PY, Drugeon H, Nordmann P (2006) Emergence of carbapenem-hydrolysing metallo-beta-lactamase VIM-1 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates in France. *Clin Microbiol Infect* 12(9):941–942. [https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.1532\\_1.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.1532_1.x)

- [110] Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, Palepou MF, Babini GS, Douboyas J, Livermore DM (2000) Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *J Clin Microbiol* 38(3):1290–1292
- [111] Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, Nordmann P (2000) Characterization of VIM-2, a carbapenemhydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integronborne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 44(4):891–897
- [112] Pournaras S, Tsakris A, Maniati M, Tzouvelekis LS, Maniatis AN (2002) Novel variant (bla(VIM-4)) of the metallo-beta-lactamase gene bla(VIM-1) in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 46(12):4026–4028
- [113] Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. Η αυξανόμενη απειλή κλώνων υψηλού κινδύνου *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Resist Updat* 2015; 21-22: 41-59.
- [114]. Bebrone C. Metallo-β-λακταμάσες (ταξινόμηση, δραστηριότητα, γενετική οργάνωση, δομή, συντονισμός ψευδαργύρου) και την υπεροικογένειά τους. *Biochem Pharmacol* 2007; 74: 1686-701.
- [115] Τζουβελέκης Λ.Σ., Μαργογιαννάκης Α, Ψυχογιού Μ, Τασίος ΡΤ, Daikos GL. Καρμπενέμες σε *Klebsiella pneumoniae* και άλλα *Enterobacteriaceae*: εξελισσόμενη κρίση παγκόσμιων διαστάσεων. *Clin Microbiol Rev.* 25: 682-707.