



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΤΟΜΕΑΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθύντρια: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ευθυμία ΠΕΤΕΙΝΑΚΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**" ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ
ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΤΕΛΕΥΤΑΙΑΣ ΕΚΛΟΓΗΣ
ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ (ΕΠΙΜΥΕΣ,
ΜΥΕΣ, ΚΟΝΙΚΛΟΥΣ) ΑΠΟ ΠΟΛΥΑΝΘΕΚΤΙΚΑ
ΜΙΚΡΟΒΙΑ "**

Υπό

ΓΕΩΡΓΙΟΥ ΜΙΧΑΗΛ

Κτηνιάτρου

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2013

© 2013 Γεώργιος Μιχαήλ

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

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (10^η/28-11-2007 ΓΣΕΣ):

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ - ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ

1^{ος} Εξεταστής Δρ. Σπυρίδων **Πουρνάρας**

(Επιβλέπων) *Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

2^{ος} Εξεταστής Δρ. Αθανάσιος **Τσακρής**

*Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών*

3^{ος} Εξεταστής Δρ. Χρήστος **Χατζηχριστοδούλου**

*Αναπληρωτής Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

1^{ος} Εξεταστής Δρ. Σπυρίδων **Πουρνάρας**

*Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

2^{ος} Εξεταστής Δρ. Αθανάσιος **Τσακρής**

*Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών*

- 3^{ος} Εξεταστής** Δρ. Χρήστος **Χατζηχριστοδούλου**
Αναπληρωτής Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 4^{ος} Εξεταστής** Δρ. Γεώργιος **Συρογιαννόπουλος**
Καθηγητής Παιδιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 5^{ος} Εξεταστής** Δρ. Νικόλαος **Πιτσίκας**
Αν. Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6^{ος} Εξεταστής** Δρ. Αγγελική **Ρόδη-Burriell**
Καθηγήτρια Κτηνιατρικής Μικροβιολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 7^{ος} Εξεταστής** Δρ. Αλέξανδρος **Γκόβαρης**
Καθηγητής Κτηνιατρικής Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΣΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ, ΠΑΝΤΕΛΗ ΚΑΙ ΑΓΙΟΥΛΑ ΜΙΧΑΗΛ

ΣΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΜΟΥ, ΠΑΝΤΕΛΗ, ΔΗΜΗΤΡΗ ΚΑΙ ΑΓΙΟΥΛΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	9
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	17
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	19
ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑ	19
ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΕ ΖΩΑ : ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΑΡΙΘΜΟΙ	19
ΠΕΙΡΑΜΑ ΣΕ ΖΩΟ - ΠΟΙΑ ΖΩΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ	20
ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΕ ΖΩΑ ΣΕ ΑΡΙΘΜΟΥΣ	23
ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΤΑ ΖΩΑ ΣΤΗΝ ΠΡΑΞΗ	24
ΤΟΜΕΙΣ ΟΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ	24
ΒΑΣΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ	26
ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΚΑΙ ΑΛΛΕΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΕΙΣ	
ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟ ΕΙΔΟΣ ΤΩΝ	
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ/ΣΗΜΕΙΩΝ ΤΕΛΙΚΗΣ ΔΙΑΘΕΣΗΣ	32
ΖΩΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ	
ΚΑΙ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗΣ,	
ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ	33
ΤΟ ΠΟΝΤΙΚΙ ΣΑΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΟ	34
Ο ΑΡΟΥΡΑΙΟΣ ΣΑΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΟ	36
ΤΟ ΚΟΥΝΕΛΙ ΣΑΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΟ	37
ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ – ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ	38
ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	39
ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΤΟΙΧΩΜΑΤΟΣ	39
ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ	40

ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	40
ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ	41
ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ	41
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	43
ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕΤΑΒΙΒΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ	43
ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΤΟΧΗΣ	45
ΠΟΛΥΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΜΙΚΡΟΒΙΑ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	46
ΜΕΘΙΚΙΛΛΙΝΗ-ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΣ ΧΡΥΣΙΖΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΣ (MRSA)	47
ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ MRSA	48
MRSA ΜΕ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΣΤΗΝ ΟΞΑΚΙΛΛΙΝΗ	49
<i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> ΑΝΘΕΚΤΙΚΗ ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ	
ΛΟΓΩ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΩΝ ΚΡC	51
<i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i> ΑΝΘΕΚΤΙΚΟ ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ	53
ΙΔΙΑΙΤΕΡΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΧΩΡΟ	55
ΕΛΛΕΙΨΗ ΝΕΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	57
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	59
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	60
ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	61
ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΕ ΣΤΕΛΕΧΗ OS-MRSA	62
ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	62
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ	63
ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ	63
ΈΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	63
ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΡΑΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΑΓΑΡ	64
ΜΕΘΟΔΟΣ E-TEST	64
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ	65

ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΕ ΣΤΕΛΕΧΗ <i>A. BAUMANNII</i>	66
ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ	66
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ	68
ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΕ ΣΤΕΛΕΧΗ <i>K. PNEUMONIAE</i> ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΥΝ ΚΡC ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΗ	69
ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ	69
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ	69
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	71
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΜΕ OS-MRSA	72
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΜΕ <i>A. BAUMANNII</i>	75
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΜΕ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΡC	76
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	82
ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΓΙΑ ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΕ OS-MRSA	83
ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΓΙΑ ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΕ <i>A. BAUMANNII</i>	85
ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΓΙΑ ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΕ ΚΡC-ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΜΙΚΡΟΒΙΑ	87
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	90
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	108

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΓΕΩΡΓΙΟΥ ΜΙΧΑΗΛ

ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ: Μικρασιατών 79Α

38333, Βόλος

Τηλ:24210-32227

Έτος γέννησης:1969

Έγγαμος με 3 παιδιά

ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Ιούλιος 2007- σήμερα

Υποψήφιος Διδάκτορας

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σχολή Επιστημών Υγείας-Τμήμα Ιατρικής

Κλινικοεργαστηριακός Τομέας

Υποψήφιος Διδάκτορας στο Τμήμα Ιατρικής Μικροβιολογίας υπό την επίβλεψη του Επικ. Καθηγητή κου. Πουρνάρα Σπύρου με θέμα: **«Ανταπόκριση στην Θεραπεία με αντιβιοτικά τελευταίας εκλογής λοιμώξεων σε πειραματόζωα (επίμυες, μύες, κονίκλους) από πολυανθεκτικά μικρόβια»**. Η τριμελής επιτροπή συναποτελείται από τους κ. Τσακρή, Καθηγητή Μικροβιολογίας Τμ. Ιατρικής Πανεπιστημίου Αθηνών και κ. Χατχηχριστοδούλου, Αν. Καθηγητή Επιδημιολογίας Τμ. Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ακαδημαϊκό έτος 1997-1998

The Royal Veterinary College

University of London

Master of Veterinary Medicine

Μάστερ Κτηνιατρικής Ιατρικής

Σπουδές στην Κτηνιατρική Παθολογία-Ιατρική Μικρών Ζώων υπό την επίβλεψη της Dr. S. P. Gregory (Παθολογίας, Χειρουργική Μαλακών Μορίων, Οφθαλμολογίας και Ακτινολογίας) και υπό την επίβλεψη του Dr. M. J. Pead (Νευρολογίας, Ορθοπαιδικής και Νοσημάτων των Αρθρώσεων).

Μέρος του Μεταπτυχιακού τίτλου (Μάστερ) αποτέλεσε και η εργασία μου:

« Αξιολόγηση της συχνότητας ούρησης και του όγκου του ούρου στον φυσιολογικό θηλυκό σκύλο ».

Ακαδημαϊκά έτη 1987-1995

Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Κτηνιατρική Σχολή

Πτυχίο Κτηνιατρικής

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Ιούνιος 2007 – σήμερα

Καθηγητής Εφαρμογών στο Εργαστήριο Παθολογίας και Παρασιτολογίας Αγροτικών Ζώων, στο Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, **ΤΕΙ Λάρισας.**

Σεπτέμβριος 2002 – Ιούνιος 2007

Εργαστηριακός Συνεργάτης στο Τ. Ε. Ι. Λάρισας,

Τμήμα Ζωικής Παραγωγής,

Εργαστήριο Παθολογίας & Παρασιτολογίας Αγροτικών Ζώων.

Σε αυτή τη θέση (περίπου 12 ώρες εβδομαδιαίως) ασχολούμαι με την εργαστηριακή εκπαίδευση φοιτητών όλων των ακαδημαϊκών ετών στο μάθημα της ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΑΣ, ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΡΕΑΤΟΣ και ΛΟΙΜΩΔΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ ΖΩΩΝ.

Απρίλιος 2004 – Σεπτέμβριος 2004

Συμβασιούχος Κτηνίατρος στην Διεύθυνση Κτηνιατρικής Ν. Μαγνησίας

Σε αυτή τη θέση εργάστηκα σαν Κτηνίατρος στο Πρόγραμμα «Έλεγχος και εκρίζωση της Βρουκέλλωσης των αιγών και των προβάτων (καταπολέμηση του Μελιταίου Πυρετού).»

Ιούλιος 2002 - Οκτώβριος 2002

Συμβασιούχος Κτηνίατρος ΕΛ.Γ.Α Λάρισας

Σε αυτή τη θέση εργάστηκα σαν Εκτιμητής Κτηνίατρος για ζημιές και στο Ζωικό Κεφάλαιο Κτηνοτρόφων της περιοχής Θεσσαλίας και στον διοικητικό έλεγχο αιτήσεων για χορήγηση οικονομικών ενισχύσεων.

Μάρτιος 2001- Ιούνιος 2002

Προϊστάμενος Κτηνίατρος στην Κτηνιατρική Κλινική David Cuffe & Associates, London

Σε αυτή τη θέση ασχολήθηκα με την Διαγνωστική Παθολογία και με μια πλατειά γκάμα Χειρουργικών περιπτώσεων. Είχα υπό την επίβλεψη μου 6 άτομα προσωπικό (ένα κτηνίατρο και πέντε νοσοκόμες). Επίσης ασχολήθηκα και με την ιατρική περίθαλψη εξωτικών κατοικίδιων και μικρών τρωκτικών.

Σεπτέμβριος 2000 - Φεβρουάριος 2001

Εργάστηκα σαν Κτηνίατρος σε διάφορα κτηνιατρεία της περιοχής Λονδίνου και Έσσεξ καλύπτοντας θέσεις άλλων κτηνιάτρων σε άδεια ή προσωρινού κενού.

Δεκέμβριος 1998 - Αύγουστος 2000

Κτηνίατρος στην Κτηνιατρική Κλινική Haygate Veterinary Centre, Telford

Ασχολήθηκα με τη Διαγνωστική Παθολογία και με μια ευρεία γκάμα εγχειρήσεων ορθοπεδικών και μαλακών μορίων (Soft tissue). Επίσης και με την ιατρική περίθαλψη εξωτικών και μικρών κατοικίδιων.

Απρίλιος 1998 - Οκτώβριος 1998

Κτηνίατρος σε κτηνιατρική κλινική για έκτακτα περιστατικά στο Icknield Veterinary Centre, Luton.

Ελληνικός Στρατός - Αλεξανδρούπολη 1995-1997

Κτηνίατρος κατά τη διάρκεια της θητείας μου έχοντας υπό παρακολούθηση μου στρατιωτικά σκυλιά.

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΜΕ ΚΡΙΣΗ

1. Labrou M, **Michail G**, Ntokou E, Pittaras TE, Pournaras S, Tsakris A. Activity of Oxacillin versus That of Vancomycin against Oxacillin-Susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates Evaluated by Population Analyses, Time-Kill Assays, and a Murine Thigh Infection Model. **Antimicrob Agents Chemother**. 2012; 56: 3388–3391. **(Impact Factor 4,841)** [The first two authors contributed equally to the publication]
2. Ikonomidis A, **Michail G**, Vasdeki A, Labrou M, Karavasilis V, Stathopoulos C, Maniatis AN, Pournaras S. In Vitro and In Vivo Evaluation of Oxacillin Efficiency on *mecA*-Positive Oxacillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**. 2008; 52: 3905-3908. **(Impact Factor 4,841)**
3. Neou E, **Michail G**, Tsakris A, Pournaras S. Virulence of *Acinetobacter baumannii* exhibiting phenotypic heterogeneous growth against meropenem in a murine thigh infection model. **Antibiotics** 2013, accepted for publication. [The first two authors contributed equally to the publication]

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΜΕ ΚΡΙΣΗ

Γιαμούζης Γ, Παπαμιχάλης Μ, Καραγιάννης Γ, Μιχαήλ Γ. Πειραματικά μοντέλα στην καρδιακή ανεπάρκεια. Μέρος Ι: Φαρμακευτικώς-επαγόμενη χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια. **Καρδιακή Ανεπάρκεια** 2010;7(2):45-54

Μιχαήλ Γ, Αλεξανδρίδης Η, Καραγιάννης Γ, Γιαμούζης Γ. Πειραματικά μοντέλα καρδιακής ανεπάρκειας. Μέρος ΙΙ: Χειρουργικώς-προκαλούμενη χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια. **Καρδιακή Ανεπάρκεια** 2010;7(2):67-79

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

“Investigation of Imepenem efficacy against carbapenem-susceptible but heteroresistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates by experimental pneumonia”. G. Michail, A. Ikonomidis, E. Neou, A. Maniatis, S. Pournaras, 18th **European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)**, Publication, Barcelona 2008.

“Oxacillin versus Vancomycin efficiency against Oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus* Clinical isolates”. M. Lamprou, A. Ikonomidis, S. Giannouli, G. Michail, A. Kyritsis, A. Vasdeki, A. Tsakris, C. Stathopoulos, S.Pournaras, 49th **Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)**, Poster, San Francisco, CA, 2009.

“Meropenem treatment of experimental thigh infections caused by meropenem-heteroresistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates” G. Michail, E. Neou, A.

Tsakris, S. Pournaras, 21st **European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)** and 27th **International Congress of Chemotherapy (ICC)**, Milan 2011.

“Experimental infections caused by oxacillin-susceptible mecA-positive Staphylococcus aureus clinical isolates treated by oxacillin versus vancomycin” **G. Michail**, M. Lamprou, C. Stathopoulos, A. Tsakris, S. Pournaras, 21st **European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)** and 27th **International Congress of Chemotherapy (ICC)**, Milan 2011.

“Activity of Tigecycline Combinations in Experimental Infections Caused by KPC-producing Enterobacteriaceae Clinical Isolates”. **G. Michail**, M. Labrou, S. Manousaka, A. Tsakris, S. Pournaras, **49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)**, Poster, San Francisco, CA, 2012.

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Μιχαήλ Γ., Ξυλούρη-Φραγκιαδάκη Ε. Ορολογική Διερεύνηση της Μυξωμάτωσης του Κουνελιού στην Ελλάδα. Ετήσιο **Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρείας (ΕΖΕ)** τον Οκτώμβριο 2006, Σπάρτη.

Μιχαήλ Γ., Ξυλούρη-Φραγκιαδάκη Ε. Μυξωμάτωση στο Κουνέλι στο **8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιολογίας** που έγινε στην Θεσσαλονίκη 12-14 Μαΐου 2006.

Μπούμπας Γ., Φούντα Α., Καρατόλιας Ν., **Μιχαήλ Γ.**, Θεοδωρίδης Ι. Συχνότητα μόλυνσης σκύλων με είδη της υπεροικογένειας των Filarioidea σε περιοχές του Νομού Λάρισας. **1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Τεχνολογίας Ζωικής Παραγωγής** που έγινε στην Άρτα τον Ιούνιο του 2005.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής Αξιολόγησης και Παρακολούθησης για την σημαντική βοήθεια που μου πρόσφεραν κατά την εκτέλεση της διδακτορικής διατριβής.

Είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων και θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αν. Καθηγητή Μικροβιολογίας κ. Σπυρίδωνα Πουρνάρα, για την ευκαιρία που μου έδωσε αναθέτοντας μου αυτή τη διδακτορική διατριβή, καθώς επίσης και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε δίνοντας μου την δυνατότητα να οργανώσω μια πειραματική μελέτη, καθώς και όλες τις παραμέτρους που συμβάλλουν στην ομαλή λειτουργία ενός πειραματικού εργαστηρίου. Επίσης, για την καθοδήγηση και την μεθοδολογία που μου παρείχε κατά τον σχεδιασμό και την εκτέλεση της συγκεκριμένης μελέτης και για την στήριξη του στην δύσκολη φάση της συγγραφής της διατριβής αυτής. Η συμβολή του στην ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης ήταν καταλυτική.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή Μικροβιολογίας, Δρ. Αθανάσιο Τσακρή για την συνεχή συμπαράσταση και εμπύχωση κατά την διάρκεια αυτής της μελέτης και για την ουσιαστική βοήθεια και συμβουλές του, ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια της.

Ευχαριστώ επίσης τον Αναπληρωτή Καθηγητή Υγιεινής και Επιδημιολογίας, Δρ. Χρήστο Χατζηχριστοδούλου για τις πολύτιμες συμβουλές του στον σχεδιασμό της μελέτης και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Ιδιαίτερη μνεία χρειάζεται η σημαντική συμβουλή του Δρ. Γ. Συρογιαννόπουλου Καθηγητή Παιδιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιου Θεσσαλίας αλλά και του

Αν. Καθηγητή Φαρμακολογίας, Δρ. Νικόλαος Πιτσίκας στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τους Δρ. Αγγελική Ρόδη-Burriell Καθηγήτρια Κτηνιατρικής Μικροβιολογίας και τον Δρ. Αλέξανδρο Γκόβαρη Καθηγητή Κτηνιατρικής Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας για την ολοκλήρωση της συγγραφής της μελέτης και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους.

Τέλος ευχαριστώ ιδιαίτερα την Σ. Μανούσακα, Τεχνολόγο Ζωικής Παραγωγής, Ανώτατου Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Λάρισας για την οργάνωση και ομαλή λειτουργία του πειραματικού εργαστηρίου και την διαχείριση των πειραματοζώων.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΕ ΖΩΑ: ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΑΡΙΘΜΟΙ

Η ανάλυση των κληρονομικών πληροφοριών (DNA) των περίπλοκων ζώων όπως ο άνθρωπος, η μύγα *Drosophila melanogaster*, του ποντικού και του αρουραίου, ήταν ένα από τα πιο σημαντικά επιτεύγματα των τελευταίων ετών. Ωστόσο, σημαντικές εξελίξεις έχουν γίνει και σε άλλους τομείς των βιοεπιστημών, συμπεριλαμβανομένου της νέας γνώσης για την κατασκευή των ριβοσωματίων -των εργοστασίων παραγωγής πρωτεϊνών των κυττάρων- και την πιθανότητα της χρήσης των βλαστοκυττάρων στην θεραπεία ασθενειών. Μια τέτοια νέα γνώση έχει συχνά βοηθήσει να βελτιωθεί η ιατρική περίθαλψη και διατροφή και αύξησε το προσδόκιμο όριο ζωής και βελτίωσε την ποιότητα της.

Η παραπάνω εξέλιξη στις βιοεπιστήμες θα ήταν αδιανόητη χωρίς την χρήση πειραμάτων σε ζώα. Μόλις πρόσφατα έχει γίνει η κατανόηση λειτουργιών των οργανισμών με την βοήθεια πειραμάτων. Σε αυτές περιλαμβάνονται η λειτουργία των οργάνων αίσθησης και του νευρικού, ορμονικού και ανοσοποιητικού συστήματος. Τα πειράματα σε ζώα θα εξακολουθήσουν να είναι απαραίτητα στο μέλλον, για να καταλάβουμε για παράδειγμα τη λειτουργία των γονιδίων, μια και η σημασία του εκάστοτε γονιδίου για όλο τον οργανισμό μπορεί να εκτιμηθεί σε ολόκληρο το ζωντανό οργανισμό.

Πειράματα σε ζώα έχουν χρησιμοποιηθεί για αιώνες για την μελέτη φυσιολογικών λειτουργιών και την ανάπτυξη νέων ιατρικών μεθόδων. Ωστόσο, υπάρχουν και οι πολέμιοι τέτοιων πειραμάτων για το ίδιο χρονικό διάστημα. Τότε όπως και τώρα, κατηγορούν τους επιστήμονες ότι δίνουν μεγαλύτερη αξία στους ανθρώπους από ότι στα ζώα. Κάποια από τα αρχικά πειράματα σήμερα φαίνονται αποκρουστικά αλλά το ίδιο θα μπορεί να λεχθεί και για την χειρουργική του ανθρώπου την ίδια περίοδο. Ο κύριος λόγος είναι γιατί οι χειρουργικές τεχνικές και οι δυνατότητες αναισθησίας ήταν ανεπαρκείς. Η ανακάλυψη της αναισθησίας ήταν μια ευλογία και για

τους ανθρώπους όσο και για τα ζώα και χρησιμοποιείται σαν ρουτίνα στα πειράματα των ζώων.

Από τον 19^ο αιώνα, η κριτική ενάντια στα πειράματα αυτά οδήγησε σε νέους νόμους για την χρήση πειραματοζώων στην έρευνα. Αυτοί οι νόμοι συνεχίζουν να βελτιώνονται και σήμερα όλες οι Ευρωπαϊκές χώρες όπως και η Ελλάδα, έχουν λεπτομερείς κανονισμούς για την χρήση των πειραματοζώων. Αυτό εξασφαλίζει ότι τα πειράματα στα ζώα επιτρέπονται μόνο μέχρι ενός σημείου που είναι αποδεκτό από την κοινωνία και υπό τον κυβερνητικό έλεγχο. Πριν από κάθε πείραμα σε ζώα για βιοιατρικούς σκοπούς στην Ελλάδα όπως και σε όλη την Ευρώπη, χρειάζεται η σύμφωνη γνώμη των Κτηνιατρικών υπηρεσιών της χώρας. Νομικά απαραίτητα πειράματα σε ζώα περιλαμβάνονται για την χρήση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας φαρμάκων στους ανθρώπους. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η αναγκαιότητα για την προστασία του ανθρώπου είναι αρκετός λόγος για την μη απαραίτητο έλεγχο κάθε ενός πειράματος ξεχωριστά. Για να εξασφαλιστούν υψηλά βιοηθικά πρότυπα στον πειραματισμό των ζώων σε ολόκληρη την Ευρώπη, η European Science Foundation, μια ένωση οργανισμών που υποστηρίζουν την έρευνα, έχει δημιουργήσει μια έκθεση για να ελέγξει τα πειράματα στα ζώα. Αυτή υπογραμμίζει τις τρεις κύριες κατευθύνσεις που πρέπει να υπάρχουν σε κάθε έρευνα. Είναι γνωστή σαν τα τρία 'Rs' και έχουν σαν σκοπό την μείωση (Reducing) και την βελτίωση (Refining) των πειραμάτων στα ζώα και την αντικατάσταση (Replacement) τους με άλλους μεθόδους. Παρά όμως όλους αυτούς τους νόμους, πολλοί διατηρούν την επιφύλαξη τους για τα πειράματα στα ζώα και πιστεύουν ότι η νομοθεσία είναι ακόμα αδύναμη.

ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑ ΣΕ ΖΩΟ ΚΑΙ ΠΟΙΑ ΖΩΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ;

Από το 1998 η Ευρωπαϊκή Επιτροπή για την Ευζωία των ζώων χαρακτηρίζει σαν πείραμα το εξής 'Πειραματική διαδικασία είναι κάθε πείραμα ή άλλη επιστημονική διαδικασία που πραγματοποιείται με την χρήση των διαφόρων ειδών ζώων και είναι δυνατόν να τους προκαλέσει **πόννο, ταλαιπωρία ή μόνιμη βλάβη στην υγεία τους**. Στους όρους αυτούς συμπεριλαμβάνονται: η ασθένεια, ο τραυματισμός, το stress (σωματικό ή ψυχολογικό), ο θάνατος. Κάθε πειραματική διαδικασία θεωρείται ότι

εμπίπτει και ρυθμίζεται από το Π.Δ. 160/91 ακόμη και αν συνδυάζεται με άλλες διαδικασίες που επιφέρουν τα παραπάνω αποτελέσματα (Π.Δ. 160/91).

Πειράματα σε ζώα επιτρέπονται μόνο για τους παρακάτω τέσσερις λόγους: έρευνα για την διατήρηση της υγείας των ανθρώπων και των ζώων, ανεύρεση των εφαρμογών που βλάπτουν το περιβάλλον, έλεγχος της ασφάλειας φαρμάκων ή χημικών και βασική έρευνα.

Η επιτροπή για την ευζωία διακρίνει μεταξύ πειραμάτων που χρειάζονται άδεια και σε αυτά που χρειάζονται μόνο σημείωση. Οι νομικοί κανονισμοί έχουν εφαρμογή σε όλα τα είδη των ζώων, συμπεριλαμβανομένων σκωλήκων, εντόμων, ψυχρόαιμων και θερμόαιμων σπονδυλωτών. Πειράματα σε σπονδυλωτά ζώα είναι κάτω από αυστηρούς κανόνες και απαιτούν άδεια, αν υπάρχει η περίπτωση να έχουν σχέση με πόνο, αγωνία ή βλάβη. Η κατάσταση κάτω από την οποία κρατούνται και ζουν αυτά τα ζώα επίσης είναι υπό επιτήρηση.

Σε δημόσιες συζητήσεις, ο όρος 'πειράματα σε ζώα' χρησιμοποιείται συνήθως ευρέως και περιλαμβάνει κάθε χρήση πειραματόζωων για επιστημονικό ή ιατρικό σκοπό. Πειράματα σε ζώα εφαρμόζονται κυρίως σε τρωκτικά, επίμυες και αρουραίους, ενώ λιγότερα πειράματα γίνονται σε ινδικά χοιρίδια. Μεγάλοι πίθηκοι όπως χιμπαντζήδες έχουν να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα για πολλά χρόνια. Οι αριθμοί για άλλα παρόμοια είδη είναι κάτω του 0.1% όλων των πειραμάτων και έχουν μείνει σε αυτά τα επίπεδα στα τελευταία χρόνια.

Τα τρωκτικά, από κοινού με τα κουνέλια, αντιπροσωπεύουν το 80% του συνολικού αριθμού των χρησιμοποιηθέντων ζώων. Η δεύτερη κατά σειρά ομάδα ζώων που χρησιμοποιήθηκε περισσότερο ήταν, όπως και τα προηγούμενα έτη, τα ψυχρόαιμα ζώα και ειδικότερα τα ερπετά, τα αμφίβια και τα ψάρια, με ποσοστό 9.6%, ακολουθούμενη από τα πτηνά, με ποσοστό 6.3%. Η ομάδα των αρτιο- και περιττοδακτύλων που περιλαμβάνει τα άλογα, τους όνους και τις διασταυρώσεις τους (περιττοδάκτυλα), καθώς και τους χοίρους, τα αιγοπρόβατα και τα βοοειδή (αρτιοδάκτυλα), αντιπροσωπεύει το 1.4% του συνολικού αριθμού ζώων που χρησιμοποιήθηκαν στα κράτη μέλη. Τα σαρκοβόρα αντιπροσωπεύουν ποσοστό 0.3% του

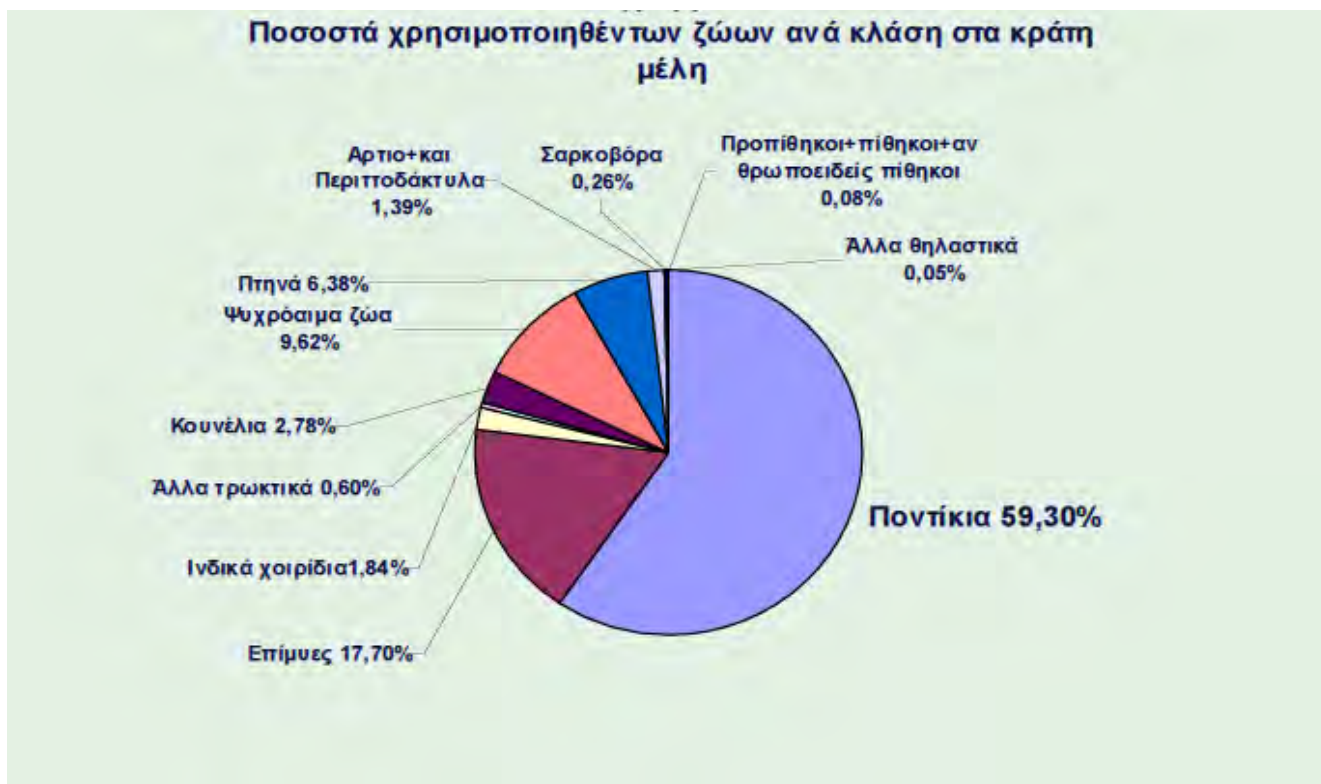
συνολικού αριθμού των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν, ενώ τα πρωτεύοντα θηλαστικά, πλην του ανθρώπου, το 0.08% των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν.

Τα είδη ζώων που προστατεύονται από το Π.Δ. 160/91 (οδηγία 86/609/ΕΟΚ) είναι όλα τα ζώοντα σπονδυλωτά που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς ή άλλους επιστημονικούς σκοπούς, συμπεριλαμβανομένων και ορισμένων μορφών όπως πονύμφες που ζουν ελεύθερες ή αναπαράγονται. Έτσι ως πειραματόζωα χρησιμοποιούνται τα ζώα που αναφέρονται στο άρθρο 21 του Π.Δ. 160/91 και είναι τα εξής:

- Ποντικός *mus musculus*
- Αρουραίος *rattus norvegicus*
- Ινδικό Χοιρίδιο *cavia porcellus*
- Κρίκητος *mescoricetus auratus*
- Κουνέλι *oryctolacus cuniculus*
- Σκύλος *canis familiaris*
- Γάτα *folis catus*
- Ορτύκι *coturnix coturnix*

Ακόμη ως πειραματόζωα χρησιμοποιούνται:

Όρνιθες, περιστέρια και πτηνά εν γένει, χοίροι, αίγες, πρόβατα, βοοειδή και ιπποειδή.



Σύγκριση μεταξύ των αναλογιών κατηγοριών ζώων που χρησιμοποιήθηκαν το 1996, το 1999, το 2002, το 2005 και το 2008

Κατηγορία ειδών	1996(*)	1999	2002(**)	2005(***)	2008(****)
Τρωκτικά – κουνέλια (%)	81,3	86,9	78,0	77,5	82,2
Ψυχρόαιμα ζώα (%)	12,9	6,6	15,4	15,	9,6
Πτηνά (%)		4,7	5	5,4	6,4
Άρτιο – Περιττοδάκτυλα (%)		1,2	1,2	1,1	1,4

Εικόνα 1. (Εκτη έκθεση της επιτροπής στο συμβούλιο και στο Ευρωπαϊκό κοινοβούλιο για τον αριθμό των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν για πειραματικούς και άλλους επιστημονικούς σκοπούς στα κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης, 2010)

ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΕ ΖΩΑ ΣΕ ΑΡΙΘΜΟΥΣ

Ο αριθμός των πειραματόζωων που χρησιμοποιούνται για έρευνα φτάνει στο 0.5% από όλα τα ζώα που θανατώνονται ετησίως. Το 99.5% των ζώων θανατώνονται για άλλους

λόγους, κυρίως για την διατροφή του ανθρώπου. Εκτός από την διατροφή, ζώα θανατώνονται σε μεγάλους αριθμούς για τον έλεγχο των επιβλαβών ζώων αλλά και από τους κυνηγούς.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΤΑ ΖΩΑ ΣΤΗΝ ΠΡΑΞΗ:

ΤΟΜΕΙΣ ΟΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Ποσοστό μεγαλύτερο του 60% των ζώων που χρησιμοποιήθηκε για σκοπούς έρευνας και ανάπτυξης αφορά τους τομείς της ιατρικής, της κτηνιατρικής, της οδοντιατρικής, καθώς και των βασικών βιολογικών μελετών (Εικόνα 2). Η παραγωγή και ο ποιοτικός έλεγχος προϊόντων και συσκευών ιατρικής, κτηνιατρικής και οδοντιατρικής απαίτησε τη χρησιμοποίηση του 14.9% του συνολικού αριθμού των ζώων. Οι τοξικολογικές δοκιμές και άλλες αξιολογήσεις ασφαλείας αντιπροσωπεύουν το 8,7% του συνολικού αριθμού των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν για πειραματικούς σκοπούς. Έχοντας κατά νου ότι η σύγκριση αποβλέπει περισσότερο στον εντοπισμό μεταβολών στις τάσεις, παρά στη συναγωγή επίσημων συμπερασμάτων, η σημαντικότερη μεταβολή από το 2005 έγκειται στο γεγονός ότι ο αριθμός των ζώων που χρησιμοποιούνται για έρευνα και ανάπτυξη στο πλαίσιο της ιατρικής, της οδοντιατρικής και της κτηνιατρικής μειώθηκε εντυπωσιακά από 31% σε 22.8% (σε ότι αφορά τον αριθμό των ζώων η μείωση ήταν από 3.746.028 σε 2.733.706). Αξιοσημείωτη ήταν η δραματική μείωση κατά 800.000 και άνω σε ψυχρόαιμα ζώα σε σύγκριση με την τελευταία έκθεση του 2005. Από την άλλη πλευρά, το ποσοστό ζώων που χρησιμοποιήθηκαν σε βασική βιολογική έρευνα αυξήθηκε από 33% σε 38% (δηλαδή από 4.035.470 σε 4.575.054), καθώς και για «άλλους σκοπούς», από 8% σε 12%. Σημειωτέον ότι τόσο η βασική βιολογία, όσο και η έρευνα και ανάπτυξη στην ιατρική και την κτηνιατρική είναι οι τομείς στους οποίους χρησιμοποιείται ο μεγαλύτερος – με μεγάλη μάλιστα διαφορά - αριθμός ζώων για πειραματικούς σκοπούς στην ΕΕ. Ο αριθμός των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν για τοξικολογικές και άλλες αξιολογήσεις ασφαλείας παρέμεινε πρακτικά ο ίδιος αφότου υποβλήθηκε η τελευταία έκθεση και αντιστοιχεί στο 8.7% του συνολικού αριθμού ζώων που χρησιμοποιήθηκαν για πειραματικούς σκοπούς στην ΕΕ. Αντιστοιχεί δε σε 1.042.153 ζώα. Σημειώθηκε σημαντική αύξηση της χρησιμοποίησης ποντικών και

κουνελιών για την παραγωγή και τον έλεγχο ποιότητας προϊόντων και συσκευών ιατρικής και οδοντιατρικής, αλλά και αύξηση της χρησιμοποίησης ποντικών, χοιροειδών και πτηνών για «βασική βιολογική έρευνα» και «άλλα πειράματα». Πολλά κράτη μέλη επιβεβαίωσαν την άποψη σύμφωνα με την οποία η εν λόγω αύξηση της χρησιμοποίησης ποντικών αποδίδεται στις νέες ερευνητικές δυνατότητες που προσφέρονται από τα διαγονιδιακά είδη. Τα εν λόγω ζωικά μοντέλα χρησιμοποιούνται σε μελέτες υγείας που έχουν ως αντικείμενο τόσο τον άνθρωπο, όσο και τα ζώα. Παρατηρήθηκε επίσης αύξηση για πειραματικούς σκοπούς στους τομείς της ανατομίας και της αυξητικής βιολογίας, της έρευνας στη γενετική και τον καρκίνο, καθώς και στην ανοσολογία και τη μικροβιολογία.

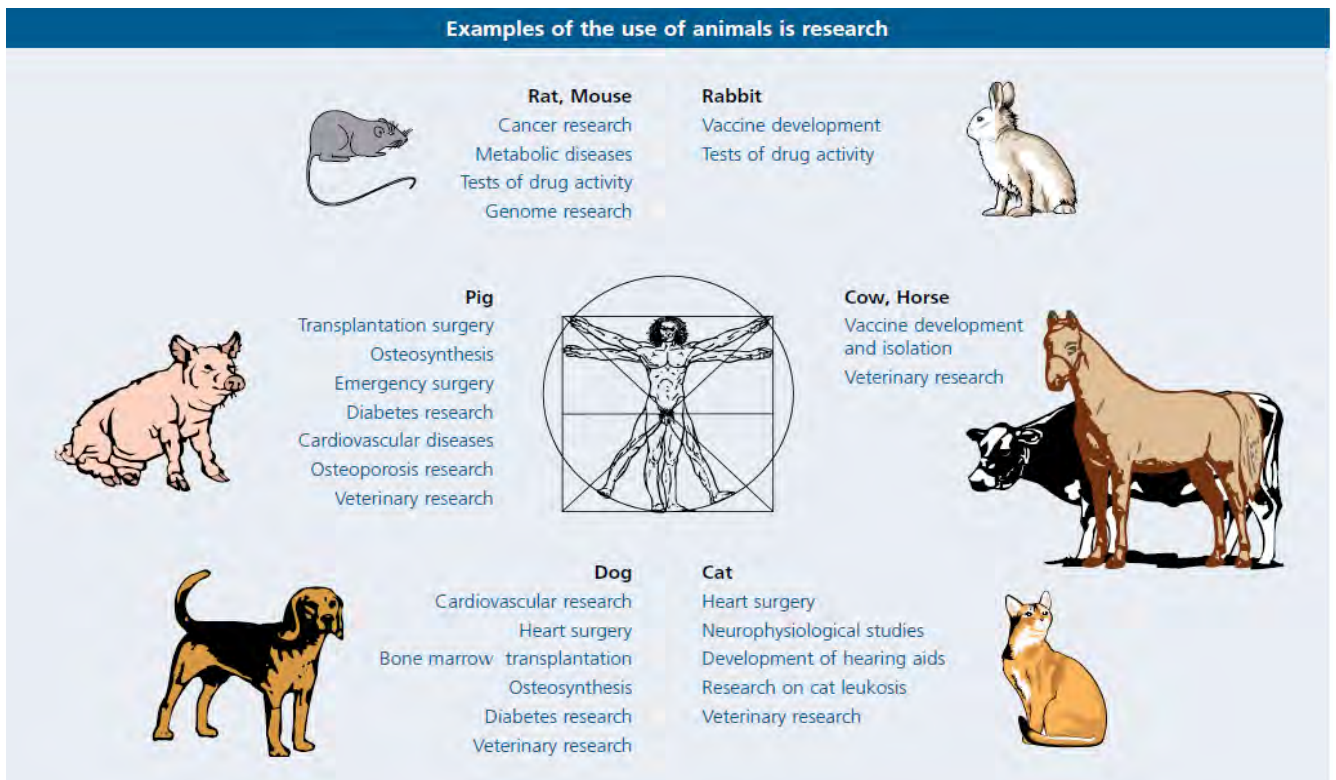


Εικόνα 2. (Εκτη έκθεση της επιτροπής στο συμβούλιο και στο Ευρωπαϊκό κοινοβούλιο για τον αριθμό των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν για πειραματικούς και άλλους επιστημονικούς σκοπούς στα κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης, 2010)

ΒΑΣΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Ο στόχος της βασικής έρευνας είναι να αποκτήσει γνώση που θα μπορέσει να είναι η βάση για την εφαρμοσμένη έρευνα. Η βασική ιατρική ή βιολογική έρευνα δεν έχει ως σκοπό την άμεση ιατρική εφαρμογή, αλλά εξελίσσει την επιστημονική γνώση πάνω στην οποία στηρίζονται όλες οι επακόλουθες έρευνες. Η βασική ιατρική έρευνα χρησιμοποιεί πειραματόζωα για να αναγνωρίσει τις καταστάσεις που έχουν άμεση σχέση με τους ασθενείς. Η αποκτούμενη γνώση βοηθάει στην ανάγνωση των ζωτικών διεργασιών και πως μπορούν αυτές να διαταραχθούν. Παρόλο που πιθανές εφαρμογές των αποτελεσμάτων της βασικής έρευνας δεν μπορούν να προγραμματιστούν και τα άμεσα οφέλη της δεν μπορούν να προβλεφθούν, η βιοιατρική έρευνα χωρίς αυτήν θα ήταν αδύνατη.

Πολλά αποτελέσματα της βασικής έρευνας στηρίζονται στην χρήση κυτταροκαλλιιεργειών. Στην έρευνα για τον καρκίνο, αυτές οι έρευνες έχουν σαν σκοπό να βοηθήσουν στην κατανόηση των κυτταρικών βιολογικών αρχών για τον σχηματισμό των καρκινικών κυττάρων. Παράλληλα όμως με αυτό, η ανάπτυξη του καρκίνου πρέπει να μελετηθεί και σε ζωντανό οργανισμό, στο επονομαζόμενο ζωικό μοντέλο όπως στο ποντίκι. Πειράματα σε ζώα είναι ακόμα απαραίτητα για την έρευνα στις λοιμώδεις νόσους. Εδώ υπάρχει η αναγκαιότητα της αναγνώρισης της παθογένειας και των μηχανισμών ανοσολογικής αντίδρασης. Η γνώση για τη σχέση μεταξύ ιών και των κυττάρων ξενιστών επιτρέπει ειδική θεραπεία για ιογενείς ασθένειες όπως η γρίπη, λοιμώξεις από ερπητοϊούς ή ευλογιάς καθώς και προληπτικά μέτρα. Πειράματα σε ζώα είναι απαραίτητα καθώς η περίπλοκη συσχέτιση της παθογένειας της ασθένειας μπορεί να ερευνηθεί μόνο σε ζωντανούς οργανισμούς. Επίσης, αυτό έχει εφαρμογή σε συγκριτικές έρευνες για την λειτουργία του νευρικού συστήματος, του κυκλοφορικού και του τρόπου δράσης των ορμονών. Υπάρχουν ακόμα δυναμικές εξελίξεις στους τομείς του γενώματος και της έρευνας των βλαστοκυττάρων. Πιστεύεται ότι η έρευνα των κυττάρων αυτών θα οδηγήσει σε νέες θεραπευτικές δυνατότητες στην θεραπεία των νευρολογικών ασθενειών όπως της νόσου του Parkinson ή του καρδιακού εμφράγματος.



Εικόνα 3. (Animal experiments in research, Deutsche Forschungsgemeinschaft, 2007)

Η συμβολή συγκεκριμένων ειδών ζώων στην έρευνα (American Association for Laboratory Animal Science)

Αρμαντίλος..... Εμβόλια για λέπρα

Γάτες..... Έρευνα για το AIDS, διαταραχές οφθαλμών και αυτιών και νευρικού συστήματος

Τσιντσιλά..... Έρευνα για λοιμώξεις έσω ωτός και απώλεια ακοής

Σκύλοι..... Τεχνητή καρδιακή βαλβίδα, εμφύτευση βηματοδότη, αντικατάσταση αρθρώσεων του ισχίου

Ψάρια..... Έρευνα για όραση, καρκίνος ήπατος, ρύθμιση θερμοκρασίας και όγκοι δέρματος

Ινδικά χοιρίδια.....	Διατροφική έρευνα για αβιταμίνωση C
Αστακός.....	Έρευνα για την νόσο του Parkinson
Επίμυες.....	Έρευνα για τον καρκίνο, γήρας, AIDS, ανοσολογία, γενετική, τεχνικές μεταφοράς εμβρύου στους ανθρώπους, κατοικίδιων, παραγωγικών και υπό εξαφάνιση ειδών
Πρωτεύοντα.....	Θεραπεία για πολιομυελίτιδα, AIDS και HIV, καρκίνος, καρδιακές και νευρολογικές ασθένειες, ελονοσία
Περιστερία.....	Στεφανιαία νόσος
Χοίροι.....	Θεραπεία εγκαυμάτων, εξέλιξη της αξονικής τομογραφίας, αντικατάσταση βαλβίδων της καρδιάς
Κουνέλια.....	Μεταμόσχευση κερατοειδούς, φάρμακα για την μείωση της χοληστερόλης και την αρτηριοσκλήρωση
Αρουραίοι.....	Θεραπεία για την παράλυση από βλάβη νεύρων, δοκιμές ασφαλείας προϊόντων, επίδραση της διατροφής στην γήρανση, κατανόηση της απόρριψης στην μεταμόσχευση οργάνων
Πρόβατο.....	Έρευνα στην αρτηριοφλεβική αναστόμωση
Σαλιγκάρια.....	Έρευνες για την μνήμη

Πίνακας 1. Σημαντικές ιατρικές εξελίξεις που βασίστηκαν σε έρευνες σε πειραματόζωα

1900

- Θεραπεία για τις αβιταμινώσεις, όπως ο ραχιτισμός
- Ηλεκτροκαρδιογράφημα σε βάτραχο (ECG) και καρδιακός καθετήρας
- Παθητική ανοσοποίηση κατά του τετάνου και της διφθερίτιδας (κουνέλι, ποντίκι, άλογο σαν δότης του ορού, ινδ. χοιρίδιο)
- Πρώτη πειραματική μεταμόσχευση σε ποντίκι

1920

- Ανακάλυψη των θυρεοειδικών ορμονών
- Ανακάλυψη του ελέγχου από την ινσουλίνη της γλυκόζης του αίματος

1930

- Θεραπευτικά πλεονεκτήματα των σουλφοναμιδών, συνθετικά κατασκευασμένα φάρμακα κατά της σύφιλης
- Εμβολιασμός κατά του τετάνου
- Εξέλιξη των παραγόντων πήξης του αίματος, σύγχρονα αναισθητικά

1940

- Θεραπεία ρευματοειδούς αρθρίτιδας
- Ανακάλυψη των θεραπευτικών πλεονεκτημάτων διαφόρων αντιβιοτικών, συμπεριλαμβανομένου της πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης
- Ανακάλυψη του παράγοντα ρέζους (κουνέλια και πίθηκοι)
- Παράγοντες για τον έλεγχο της ανεκτικότητας των ιστών των μοσχευμάτων

1950

- Από το στόμα εμβολιασμός κατά της πολιομυελίτιδας
- Ανακάλυψη των πρώτων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων κατά του καρκίνου
- Καρδιακός βηματοδότης και εγχείρηση ανοικτής καρδιάς

1960

- Εμβολιασμός κατά της Γερμανικής ιλαράς
- Θεραπευτικά οφέλη της κορτιζόνης
- Ανακάλυψη του ραδιοανοσοφθορισμού για την ανακάλυψη μικρών ποσοτήτων αντισωμάτων, ορμονών και άλλων ουσιών στο σώμα
- Ανακάλυψη των αντιυπερτασικών φαρμάκων

1970

- Εμβολιασμός κατά της ιλαράς, εκρίζωση της ευλογιάς
- Μεταμόσχευση καρδιάς
- Θεραπεία με laser της αποκόλλησης του αμφιβληστροειδούς
- Τα πρώτα αντικά φάρμακα
- Ανακάλυψη των μονόκλωνων αντισωμάτων (ποντίκι)

1980

- Μεταμόσχευση οργάνων (σκύλος, χοίρος)
- Χρήση της κυκλοσπορίνης, ένα αντιβιοτικό για την μείωση της απόρριψης μοσχευμάτων
- Εμβόλια κατά της ηπατίτιδας Β
- Φάρμακα κατά του AIDS (AZT)

- Θεραπεία της κώφωσης με κοχλιακά εμφυτεύματα (γάτα)
- Φάρμακα για την μείωση της χοληστερόλης
- Μελέτες για την καρκινική μετάσταση
- Θεραπεία για την λευχαιμία στα παιδιά

1990

- Βελτίωση της χειρουργικής τεχνικής της ενδοσκοπίας
- Νέες διαγνωστικές και θεραπευτικές προσεγγίσεις του καρκίνου του μαστού
- Διαχωρισμός της κληρονομικότητας και της επίδρασης του περιβάλλοντος στον καρκίνου του μαστού

2000

- Αποκωδικοποίηση του γενώματος της μύγας, του ποντικού, αρουραίου και ανθρώπου

Ποσοστά ζώων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη ασθενειών



Εικόνα 4. Έκτη έκθεση της επιτροπής στο συμβούλιο και στο Ευρωπαϊκό κοινοβούλιο για τον αριθμό των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν για πειραματικούς και άλλους επιστημονικούς σκοπούς στα κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης, 2010

ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΚΑΙ ΑΛΛΕΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΕΙΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟ ΕΙΔΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ / ΣΗΜΕΙΩΝ ΤΕΛΙΚΗΣ ΔΙΑΘΕΣΗΣ

Ο αριθμός των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν για τοξικολογικές δοκιμές και άλλες αξιολογήσεις ασφάλειας για διάφορα προϊόντα ή περιβαλλοντικές δοκιμές ανήλθε σε 1.042.153, δηλαδή στο 8.7% του συνολικού αριθμού ζώων που χρησιμοποιήθηκαν για πειραματικούς σκοπούς στην ΕΕ. Από το σύνολο αυτό, τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν για τοξικολογικές δοκιμές και άλλες αξιολογήσεις ασφάλειας για διάφορα προϊόντα ή συσκευές που χρησιμοποιούνται στην ιατρική, την κτηνιατρική και την οδοντιατρική, αντιπροσωπεύουν ποσοστό 50.8% και, ως εκ τούτου, ήταν ο σκοπός για τον οποίο χρησιμοποιήθηκε ο μεγαλύτερος αριθμός ζώων. Τα ποσοστά ζώων που χρησιμοποιήθηκαν για τοξικολογικές δοκιμές ή άλλες αξιολογήσεις ασφάλειας

βιομηχανικών και γεωργικών προϊόντων αντιπροσωπεύουν αντιστοίχως 7.1% και 7.9% του αριθμού των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο αυτό (βλ. Εικόνα 5). Άλλες τοξικολογικές δοκιμές και αξιολογήσεις ασφάλειας αντιστοιχούν σε άνω του 21%.



Εικόνα 5. (Εκτη έκθεση της επιτροπής στο συμβούλιο και στο Ευρωπαϊκό κοινοβούλιο τον αριθμό των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν για πειραματικούς και άλλους επιστημονικούς σκοπούς στα κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης, 2010)

ΖΩΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

Ο αριθμός των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν σε δοκιμές για την παραγωγή και τον έλεγχο ποιότητας προϊόντων ιατρικής, και κτηνιατρικής αντιπροσωπεύει το 14.9% του συνολικού αριθμού των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν για πειραματικούς σκοπούς. Το μεγαλύτερο ποσοστό ζώων στον συγκεκριμένο τομέα (47%) χρησιμοποιήθηκε για τη συμμόρφωση σε σειρά νομοθετικών πράξεων (εθνικών, ενωσιακών, της νομοθεσίας των χωρών μελών του Συμβουλίου της Ευρώπης και νομοθεσίας εκτός ΕΕ). Το 41.1% των ζώων χρησιμοποιήθηκαν για τη συμμόρφωση σε σειρά ενωσιακών νομοθετικών απαιτήσεων, συμπεριλαμβανομένης της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας. Σε σύγκριση με

την τελευταία έκθεση σημειώνεται σαφής αύξηση του αριθμού των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτόχρονη συμμόρφωση σε σειρά νομοθετικών πράξεων. Από την άλλη πλευρά διαπιστώνεται σαφής αύξηση των δοκιμών που διεξήχθησαν για λόγους συμμόρφωσης σε σειρά ενωσιακών νομοθετικών πράξεων, συμπεριλαμβανομένης της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας. Κατά συνέπεια, παρατηρείται σαφής μείωση του αριθμού των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν για τη συμμόρφωση σε εθνικές νομοθετικές πράξεις, γεγονός θετικό που υποδηλώνει τάση εναρμόνισης των ενωσιακών ρυθμιστικών/κανονιστικών απαιτήσεων.

ΤΟ ΠΟΝΤΙΚΙ ΣΑΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΟ

Τα επίμυες είναι τα πιο διαδεδομένα πειραματόζωα και χρησιμοποιούνται σαν μοντέλα με εκατοντάδες καθιερωμένες εφαρμογές. Είναι συχνή η χρήση τους σαν πειραματόζωα στην βιολογία και την ψυχολογία, κυρίως γιατί είναι θηλαστικά, εύκολα στη διατήρηση και στον χειρισμό, αναπαράγονται γρήγορα και μοιράζονται σε μεγάλο βαθμό ομόλογο με τους ανθρώπους. Το γονιδίωμα του ποντικού έχει ερευνηθεί και πολλά γονίδια του έχουν ανθρώπινα ομόλογα. Επίσης, εκτός του ότι είναι μικρά στο μέγεθος, σχετικά οικονομικά στην διατήρησή τους, πολλές γενεές μπορούν να μελετηθούν σε σύντομο χρονικό διάστημα αφού αναπαράγονται γρήγορα. Τα περισσότερα είναι υβρίδια από διαφορετικά υποείδη, κυρίως του *Mus musculus domesticus* και *Mus musculus musculus*. Τα επίμυες έχουν διάφορα χρώματα τριχώματος, συμπεριλαμβανομένου του μαύρου και του λευκού (αλπινό). Πολλές (αλλά όχι όλες) οι εργαστηριακές σειρές είναι ομόαιμες ώστε να μοιάζουν σχεδόν όμοια γενετικά. Τα διαφορετικά είδη σειρών αναγνωρίζονται με συγκεκριμένο συνδυασμό γραμμμάτων και αριθμών όπως τα C57BL/6 και BALB/c. Η πρώτη τέτοια σειρά παράχθηκε από τον Clarence Cook Little το 1909, ο οποίος προώθησε την ιδέα του ποντικού σαν πειραματόζωο (Crow 2002).

Κατά την διάρκεια των τελευταίων δέκα χρόνων, έγινε δυνατή η δημιουργία σχεδόν κάθε είδους μετάλλαξης στο γονιδίωμα του ποντικού με την βοήθεια δύο προσεγγίσεων, της αντίστροφης γενετικής και της πρόσθιας γενετικής. Στην αντίστροφη γενετική, ο ερευνητής έχοντας απομονώσει το γονίδιο που μελετά, μπορεί να το τροποποιήσει σε επίπεδο οργανισμού και να μελετήσει το αποτέλεσμα της γενετικής επέμβασης με την

παρατήρηση του φαινότυπου. Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει την εισαγωγή γονιδίων σε ολόκληρους οργανισμούς (διαγονιδιακά επίμυες- transgenic mice), την κατευθυνόμενη απενεργοποίηση ή μεταλλαξιογένεση ενδογενών γονιδίων σε όλα (αφαίρεση γονιδίων-knockout) ή σε επιλεγμένα κύτταρα του οργανισμού (ελεγχόμενη έκφραση γονιδιακών μεταλλάξεων-conditional mutants) και προσφέρει ένα *in vivo* σύστημα για την αναγνώριση γονιδίων που καθορίζουν την ομαλή λειτουργία του οργανισμού ή που ευθύνονται για τις ασθένειες του (Douni et al., 2004). Διάφορα μεταλλαγμένα και διαγονιδιακά στελέχη έχουν δημιουργηθεί με διάφορες μεθόδους :

- Το NOD, που εμφανίζει διαβήτη τύπου 1
- MRL, με ασυνήθιστες αναγεννητικές δυνατότητες (JAX mice database, 2010)
- “Waltzing”, που περπατά σε κύκλο από την μετάλλαξη που επηρεάζει το έσω ους
- Ανοσοκατεσταλμένο γυμνό ποντίκι, που δεν έχει τρίχες και θύμο αδένες, δεν παράγει T λεμφοκύτταρα και χρησιμοποιείται στην ανοσολογία και την έρευνα για την μεταμόσχευση οργάνων

Διαγονιδιακές σειρές ποντικών, με εξωγενή γονίδια που τοποθετήθηκαν στο γονιδίωμα τους:

- Μη φυσιολογικά μεγάλα επίμυες, με την εισαγωγή γονιδίου της αυξητικής ορμόνης αρουραίου
- «Όγκο-επίμυες», που παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου

Knockout επίμυες, με ένα συγκεκριμένο γονίδιο να είναι απενεργό για τη μελέτη του γονιδίου ή την μελέτη κάποιας ασθένειας του ανθρώπου:

- Παχύσαρκο ποντίκι, με την έλλειψη της καρβοξυπεπτιδάσης E
- Μυώδες ποντίκι, με την απενεργοποίηση του γονιδίου της μυοστατίνης

Ο ΑΡΟΥΡΑΙΟΣ ΣΑΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΟ

Ο εργαστηριακός αρουραίος είναι αρουραίος του είδους *Rattus norvegicus* (καφέ αρουραίος) που έχει αναπαραχθεί και χρησιμοποιείται για ερευνητικούς σκοπούς. Εργαστηριακοί αρουραίοι έχουν χρησιμοποιηθεί σαν σημαντικά μοντέλα πειραματόζωων στην έρευνα της ιατρικής, της ψυχολογίας και σε άλλα επιστημονικά πεδία. Με τα χρόνια, οι αρουραίοι χρησιμοποιήθηκαν σε πολλά ερευνητικά πρωτόκολλα, στην γενετική, στις ασθένειες, στην ιατρική, στην ασφάλεια των φαρμάκων κ.α. Η ιστορική σημασία αυτού του είδους στην έρευνα, φαίνεται από το μέγεθος της έρευνας πάνω σε αυτό, περίπου 50% περισσότερο από αυτό του ποντικού (Krinke, George J. 2000). Οι επιστήμονες έχουν αναπαράγει πολλά στελέχη ή σειρές από αρουραίους ειδικά σχεδιασμένους για πειράματα. Τα περισσότερα προέρχονται από το αλμπίνο Wistar αρουραίος, που χρησιμοποιείται ευρέως. Άλλα συχνά χρησιμοποιούμενα στελέχη ή σειρές είναι τα Sprague Dawley, Fischer 344, Holtzman albino, Long Evans και Lister black hooded. Οι αρουραίοι είναι γενικά μη διαγονιδιακά ή γενετικά τροποποιημένα είδη, επειδή οι τεχνικές αφαίρεσης του γονιδίου και τα εμβρυικών βλαστοκυττάρων είναι σχετικά δύσκολες στους αρουραίους. Αυτό δυσκόλεψε αρκετά τους ερευνητές που χρησιμοποιούσαν τον αρουραίο στα θέματα της συμπεριφοράς και της φυσιολογίας, πιο σχετικό με τον άνθρωπο και ευκολότερο στην παρατήρηση από ότι το ποντίκι.

Διάφορα στελέχη που έχουν δημιουργηθεί με διάφορες μεθόδους :

- Wistar rat (Clause BT, 1998, Wistar Inst, 2007), η πιο διαδεδομένη σειρά στην εργαστηριακή έρευνα. Με βάση αυτά παράχθηκαν τα Sprague Dawley και Long Evans.
- Lewis rats, χαρακτηρίζονται από την χαμηλή αναπαραγωγή και τον ήπιο χαρακτήρα (Charles River, 2012). Αυτά πάσχουν από διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως αυξημένη πιθανότητα νεοπλάσματος στα επινεφρίδια, στους θυρεοειδής αδένες, στο ενδομήτριο, καθώς και επίσης την τυχαία εμφάνιση σπειραματικής σκλήρυνσης (Charles River, 2012).
- Sprague Dawley, επίσης πολύ διαδεδομένο στην ιατρική έρευνα (Drachman et. al., 1966, Horiuchi et. al., 1976, Sukov and Barth, 1998, Hsu and Lai, 2007).

- Biobreeding Diabetes Prone (BBDP rat) είναι μια σειρά που εμφανίζει αυτοάνοσο Τύπου 1 Διαβήτη. Σαν τα NOD επίμυες, χρησιμοποιούνται σαν πειραματικά μοντέλα και έχουν βοηθήσει πολύ στην έρευνα της παθογένειας του συγκεκριμένου διαβήτη (Mordes et. al.,2007).
- Zucker rat, για την διερεύνηση της παχυσαρκίας και της υπέρτασης (Kurtz et. al 1989, Davis AJ, 1997). Παχύσαρκα Zucker rats παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα λιπιδίων και χοληστερόλης στο αίμα, είναι ανθεκτικά στην ινσουλίνη χωρίς να είναι υπογλυκαιμικά και εμφανίζουν αύξηση του βάρους τόσο από το μέγεθος όσο και από τον αριθμό των λιποκυττάρων (Kava et al., 1990).

ΤΟ ΚΟΥΝΕΛΙ ΣΑΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΟ

Τα κουνέλια είναι μικρά θηλαστικά της οικογένειας *Leporidae*, τάξης *Lagomorpha* (Pearce et al., 2007) και ανευρίσκονται σε πολλά μέρη του κόσμου. Το κουνέλι (*Oryctolagus cuniculus*) είναι φυλογενετικά πλησιέστερο στα πρωτεύοντα από ότι τα τρωκτικά και είναι αρκετά μεγάλο σε μέγεθος για να επιτρέψει των έλεγχο φυσιολογικών αλλαγών χωρίς θανάτωση του (Graur et al., 1996). Ανάμεσα σε πολλές ράτσες κουνελιών, τα λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας χρησιμοποιούνται σε πολλές ερευνητικές δραστηριότητες. Αυτό γιατί είναι λιγότερο επιθετικά και παρουσιάζουν λιγότερα προβλήματα υγείας σε σύγκριση με άλλες ράτσες (Manjeet et al., 2012). Για αυτό το λόγο πολλές ερευνητικές ομάδες διάλεξαν διαγονιδιακά κουνέλια σαν πειραματικά μοντέλα για την έρευνα του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών, της αρτηριοσκλήρυνσης, της καρδιαγγειακής έρευνας και της υπερτροφικής καρδιομυοπάθειας (Sanbe et al., 2005, Bosze and Houdebine, 2006). Τα διαγονιδιακά κουνέλια έχει βρεθεί ότι είναι τα κατάλληλα βιοαντιδραστήρια για την παραγωγή φαρμακευτικών πρωτεϊνών (Houdebine, 1995). Τα διαγονιδιακά κουνέλια είναι πολύτιμα επειδή καλύπτουν το κενό μεταξύ του ποντικού και των μεγαλύτερων αγροτικών ζώων σαν πειραματόζωα. Είναι το μικρότερο ζώο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο γάλα του ή στον ορό, τόσο σε πειραματικό επίπεδο όσο και σαν ευρέως αγροτικό ζώο (Bosze and Houdebine, 2006). Το κουνέλι φέρει διάφορα σημαντικά χαρακτηριστικά που το έκαναν να είναι το πρώτο και κλασσικό μοντέλο για την μελέτη των λιποπρωτεϊνών

και της αρτηριοσκλήρυνσης. Τέτοια μοντέλα κουνελιών περιλαμβάνουν φυσιολογικά κουνέλια που διατρέφονται με τροφή πλούσια σε χοληστερόλη, μεταλλαγμένα κουνέλια σαν μοντέλα για έλεγχο ανωμαλιών των λιποπρωτεϊνών και διαγονιδιακά κουνέλια για την έρευνα στην αρτηριοσκλήρυνση και την δισλιπιδεμία (Fan and Watanabe, 2000 and 2003). Επίσης, πειραματικά μοντέλα κουνελιών έχουν χρησιμοποιηθεί στη έρευνα για την φυματίωση (Manabe et al., 2003, Dorman et al., 2004), στην έρευνα για το AIDS και τον καρκίνο (Dunn et al., 1995, Bosze et al., 2003), την ακρομεγαλία (Costa et al., 1998), την οστεοαρθρίτιδα (Bertone et al., 2004), την παραγωγή μονόκλωνων και πολύκλωνων αντισωμάτων (Raju et al., 2000, Buelow, 2006) και εμβολίων (Soler et al., 2005; 2006).

ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ

Ο όρος αντιμικροβιακά χημειοθεραπευτικά χρησιμοποιείται συχνά για να εκφράσει τις φυσικές ή συνθετικές ουσίες οι οποίες αναστέλλουν ή καταστρέφουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών που ανήκουν στους σχιζομύκητες, ιούς, μύκητες, ρικέτσιες, πρωτόζωα, παρασιτικούς σκώληκες.

Τα αντιμικροβιακά μπορούν να ταξινομηθούν σε διάφορες ομάδες με βάση τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, την αντιμικροβιακή τους δράση, το μηχανισμό δράσης τους κλπ. Κλινικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η ταξινόμηση των αντιμικροβιακών σε βακτηριοκτόνα και βακτηριοστατικά που παρουσιάζεται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2.

ΒΑΚΤΗΡΙΟΚΤΟΝΑ		ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΤΑΤΙΚΑ
Πενικιλίνες	Βανκομυκίνη	Μακρολίδια ²
Κεφαλοσπορίνες	Κυκλοσερίνη	Χλωραμφαινικόλη
Αμινογλυκοσίδες	Νεομυκίνη ¹	Τετρακυκλίνες ²
Νιτροφουράνια	Κινολόνες	Λινκοσαμίδες ²
Τριμεθοπρίμη + Σουλφαδιαζίνη	Βανκομυκίνη	Σουλφοναμίδες
Πολυμυξίνες ¹	Τιαμουλίνη	Ριστοσετίνη ²
Νοβοβιοκίνη ²		
¹ Δρουν τόσο στη φάση πολλαπλασιασμού, όσο και στη φάση ηρεμίας του βακτηριακού κυττάρου		
² Σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις δρουν βακτηριοκτόνα		

ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Παρακάτω αναφέρονται, με βάση το μηχανισμό δράσης τους, τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη και οι ομάδες στις οποίες ανήκουν.

ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΤΟΙΧΩΜΑΤΟΣ

Στην ομάδα αυτή ανήκουν τα β-λακταμικά αντιμικροβιακά (πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες), η βανκομυκίνη, η κυκλοσερίνη, η ριστοσετίνη, η βακιτρακίνη, και η νοβοβιοκίνη, φωσφομυκίνη.

Σε αντίθεση με τα κύτταρα του μακροοργανισμού, τα μικρόβια περιβάλλονται από τοίχωμα που τα προστατεύει από τις μεταβολές της οσμωτικής πίεσης και άλλες

μηχανικές επιδράσεις του περιβάλλοντος. Η λύση του τοιχώματος αυτού καθιστά τα μικρόβια ευάλωτα στις βλαπτικές αυτές επιδράσεις.

Η χημική σύσταση του μικροβιακού τοιχώματος αποτέλεσε τη βάση διαχωρισμού των μικροβίων σε κατά Gram θετικά και κατά Gram αρνητικά. (πίνακας 10). Το τοίχωμα των κατά Gram θετικών αποτελείται κυρίως από το μουκοπεπτίδιο πεπτιδογλυκάνη (μουρεΐνη), ενώ στο τοίχωμα των κατά Gram αρνητικών η ετεροπολυμερής αυτή ουσία αποτελεί μόλις το 4-5%.

Τα αντιμικροβιακά της ομάδας αυτής αναστέλλουν το σχηματισμό σε διάφορα στάδια της πεπτιδογλυκάνης. Έτσι εξηγείται και η ιδιαίτερη δράση τους κυρίως έναντι των κατά Gram θετικών, αλλά και κατά Gram αρνητικών μικροβίων.

ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ

Η σπεκτινομυκίνη, οι λινκোসαμίδες, οι **τετρακυκλίνες**, η χλωραμφαινικόλη, οι **αμινογλυκοσίδες** και τα μακρολίδια δρουν μέσα στο κυτταρόπλασμα αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση σε διάφορα στάδιά της. Διαταράσσουν κυρίως τη ριβοσωμιακή λειτουργία. Τα ριβοσωμάτια των μικροβίων με βάση το μέτρο πυκνότητας κατατάσσονται στην 70S ομάδα, ενώ των θηλαστικών στην 80S. Οι δύο αυτοί τύποι ριβοσωμάτων χωρίζονται σε υποομάδες που διαφέρουν ως προς τη χημική σύνθεση και λειτουργία τους. Έτσι εξηγείται και η επιλεκτική δράση των αντιμικροβιακών στα μικροβιακά κύτταρα χωρίς να δρουν στα κύτταρα του ξενιστή μακροοργανισμού.

Οι αμινογλυκοσίδες, η σπεκτινομυκίνη και οι τετρακυκλίνες, ενώνονται με την 30S ριβοσωμιακή υποομάδα του 70S-μελούς ριβοσώματος των μικροβίων, αναστέλλοντας την παραγωγή πρωτεϊνικής φύσεως ουσιών, όπως π.χ. ένζυμα.

Η χλωραμφαινικόλη, τα μακρολίδια και οι λινκোসαμίδες, δρουν στην υποομάδα 50S, αναστέλλοντας τη δράση της πεπτιδυλοτρανσφεράσης και την παραγωγή διπεπτιδίων.

ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Στην ομάδα αυτή ανήκουν οι σουλφοναμίδες, η νοβοβοικίνη, η τριμεθοπρίμη, η **ριφαμπικίνη** και οι κινολόνες. Οι αντιμικροβιακοί αυτοί παράγοντες παρεμβαίνουν σε κάποιο στάδιο σύνθεσης των πυρηνικών οξέων αναστέλλοντας τη σύνθεσή τους.

ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

Η πολυμυξίνη Β, η αμφοτερικίνη Β, η πολυμυξίνη Ε (**κολιστίνη**), η νυστατίνη και η τυροσετίνη παρεμποδίζουν με διάφορους τρόπους τη λειτουργία της μικροβιακής κυτταρικής μεμβράνης.

Κάτω από το βακτηριακό τοίχωμα βρίσκεται η κυτταροπλασματική μεμβράνη, η οποία έχει όλα τα χαρακτηριστικά ενός βιολογικού φραγμού. Ελέγχει τη διάβαση διάφορων μορίων από και προς το κυτταρόπλασμα, μέσω της παθητικής διάχυσης ή ενεργού μεταφοράς. Διαταραχή της λειτουργίας της προκαλεί καταστροφή του μικροβιακού κυττάρου. Το γεγονός, ότι η δομή της μεμβράνης αυτής διαφέρει μεταξύ μικρό- και μακρο-οργανισμού αποτελεί τη βάση της επιλεκτικής δράσης των αντιμικροβιακών επί των διάφορων μικροβίων.

Έτσι, οι πολυμυξίνες π.χ. καταστρέφουν εκλεκτικά τη λιποπρωτεϊνική δομή της μεμβράνης των κατά Gram αρνητικών μικροβίων, δρώντας ως κατιονικά απορρυπαντικά.

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ

Δεν είναι έκπληξη το γεγονός ότι τα βακτήρια έχουν δείξει εντυπωσιακή ικανότητα να αντέχουν και να προσαρμόζονται στο περιβάλλον εμφανίζοντας διαφορετικούς μηχανισμούς αντοχής στα περισσότερα «παλαιά» και «νέα» αντιμικροβιακά. Το αποτέλεσμα αυτού του φαινομένου είναι ότι πολλά στελέχη βακτηρίων έγιναν ανθεκτικά και σε πολλές περιπτώσεις πολύ-ανθεκτικά σε αυτούς τους αντιμικροβιακούς παράγοντες καθιστώντας έτσι τα φάρμακα αυτά αναποτελεσματικά σαν θεραπεία εκλογής για τις σοβαρές λοιμώξεις που προκαλούν. Η πρώτη εμφάνιση μικροβιακής αντοχής εμφανίστηκε στα τέλη του 1930, αμέσως μετά την είσοδο της πρώτης ομάδας αντιβιοτικών, τις σουλφοναμίδες και πενικιλίνες. Κοινά βακτήρια όπως στέλεχος του *S. aureus* έγιναν ανθεκτικά σε αυτά τα αντιβιοτικά σε πολύ σύντομο χρόνο (Alanis, 2005).

Για το μεγαλύτερο διάστημα, κατά την διάρκεια των πρώτων 25 χρόνων από την εισαγωγή των αντιβιοτικών, η αντοχή ήταν πρόβλημα των νοσηλευόμενων ασθενών. Γρήγορα έγινε αντιληπτό πως αυτά τα μικρόβια όχι μόνο είχαν την ικανότητα να δημιουργούν μηχανισμούς αντοχής στα αντιμικροβιακά αλλά και ότι μπορούσαν να μείνουν ζωντανά και ενεργά στο νοσοκομειακό περιβάλλον, μολύνοντας κυρίως ευπαθείς ομάδες ασθενών (κυρίως στις ΜΕΘ, ανοσοκατασταλμένους, καταβεβλημένους

και χρόνια ασθενείς) που ήταν σε υψηλό κίνδυνο και στους οποίους προκαλούσαν σοβαρές νοσοκομειακές λοιμώξεις (Kollef and Fraser, 2001, Nser et al., 2005, Picazo 2004, Oppenheim 1998, Sipsas et al., 2005).

Η λίστα των βακτηρίων που εμφάνισαν αντοχή είναι εντυπωσιακή, από τον *S. aureus* και την αντοχή του στις σουλφοναμίδες και πενικιλίνες στα 1930 και 1940 (Levy 2002, Rammelkamp 1942), στην ανθεκτική στην πενικιλίνη *Neisseria gonorrhoeae* (PPNG), στον *Haemophilus influenzae* που παρήγαγε β-λακταμάση στα 1970 (Jaffe et al., 1981, Lind 1990, Jorgensen 1993), στους ανθεκτικούς στην μεθικιλίνη *S. aureus* (MRSA) και στην αναζωπύρωση του πολυαθεκτικού *Mycobacterium tuberculosis* στα 1970 και 1980 (Lowy 1998, Deresinski 2005, Lowy 2003, Foster 2004) και σε αρκετά ανθεκτικά στελέχη εντερικών και μη-εντερικών gram-αρνητικών βακτηρίων όπως τα *Shigella* sp., *Salmonella* sp., *Vibrio cholerae*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, κάποια από τα οποία σχετίζονταν με την χρήση αντιμικροβιακών στην ανάπτυξη των ζώων για ανθρώπινη κατανάλωση στα 1980 και 1990 (Waterer and Wunderink 2001, Rupp and Fey 2003, White et al., 2001, Smith et al., 1999, Wegener 1999, Fey et al., 2000).

Επίσης γίναμε μάρτυρες πολύ σοβαρών περιστατικών αντοχής που ήταν δύσκολο να προβλεφθεί, της εξάπλωσης ανθεκτικών βακτηρίων έξω από το περιβάλλον του νοσοκομείου προκαλώντας λοιμώξεις τύπου κοινότητας. Τέτοιες είναι οι περιπτώσεις των στελεχών *Streptococcus* ομάδας A που εμφάνισαν ανοχή στις μακρολίδες (Seppala et al., 1995, Cizman et al., 2001, Martin et al., 2002, Huovinen 2002), του *Streptococcus pneumoniae* που δημιούργησε αντοχή σε διάφορα αντιβιοτικά συμπεριλαμβανομένης της πενικιλίνης και προκάλεσε σοβαρές λοιμώξεις (Nuorti et al., 1998, Whitney et al., 2000, Hofmann et al., 1995, Amsden 2004, Vanderkooi et al., 2005, Jacobs 2004) και στα πιο λοιμογόνα στελέχη MRSA λόγω συγκεκριμένων τοξινών (λευκοκτονίνη Panton-Valentine) (Robinson et al., 2005, Kaplan et al., 2005), όπως επίσης και στους εντεροκόκκους με αντοχή στη βανκομυκίνη (Donskey et al., 2000, DeLisle and Perl 2003).

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Υπάρχουν τουλάχιστον 17 διαφορετικές ομάδες αντιβιοτικών που έχουν παραχθεί μέχρι σήμερα (Alanis, 2005). Δυστυχώς, για κάθε μια από αυτές τις ομάδες υπάρχει τουλάχιστον ένας μηχανισμός αντοχής (και πολλές φορές περισσότεροι του ενός). Στην πράξη, σε μερικές περιπτώσεις, τα βακτήρια δημιούργησαν ταυτόχρονα αντοχές σε δύο ή περισσότερες ομάδες αντιβιοτικών, κάνοντας την θεραπευτική αντιμετώπιση τους ιδιαίτερα δύσκολη, δαπανηρή και σε πολλά περιστατικά σχετίστηκαν με αυξημένη νοσηρότητα και θνητότητα (Levy and Marshal, 2004, Sefton 2002). Γενικά, μπορεί να λεχθεί ότι η αντοχή των βακτηρίων στα αντιβιοτικά έχει την βάση της σε γενετικό επίπεδο. Αυτό σημαίνει ότι στις περισσότερες περιπτώσεις μικροβιακής αντοχής, αλλαγές στην γενετική σύνθεση των προηγούμενων ευαίσθητων βακτηρίων έλαβε χώρα είτε μέσω σημειακών μεταλλάξεων του DNA (mutations) ή με την εισαγωγή νέας γενετικής πληροφορίας. Η έκφραση των γενετικών αυτών αλλαγών σε κυτταρικό επίπεδο, έχει σαν αποτέλεσμα αλλαγές σε έναν ή περισσότερους βιολογικούς μηχανισμούς των βακτηρίων και τελικά καθορίζουν τον συγκεκριμένο τύπο αντοχής που θα εμφανίσουν, με αποτέλεσμα άπειρες πιθανές βιολογικές μορφές αντοχής (Levy and Marshal, 2004, Sefton 2002).

ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕΤΑΒΙΒΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Για να μπορέσει η μικροβιακή αντοχή να επιτευχθεί είναι απαραίτητο να συνεργαστούν δύο βασικά στοιχεία: η παρουσία ενός αντιβιοτικού ικανού να προκαλέσει την αναστολή του μεγαλύτερου αριθμού βακτηρίων σε μια αποικία και μια ετερογενής αποικία βακτηρίων όπου τουλάχιστον ένα από τα βακτήρια φέρει γενετικό υλικό ικανό να εκφράσει την αντοχή στο αντιβιοτικό (Levy and Marshal, 2004). Όταν αυτό συμβεί, τα ευαίσθητα βακτήρια της αποικίας θα πεθάνουν ενώ τα ανθεκτικά στελέχη θα επιβιώσουν. Αυτά τα βακτήρια φέρουν τους γενετικούς καθοριστές που κωδικοποιούν τον τύπο και την ένταση της αντοχής που θα εκφραστεί από το βακτηριακό κύτταρο. Επιλογή αυτών των βακτηρίων έχει σαν αποτέλεσμα την επιλογή των γονιδίων αυτών που τώρα μπορούν να εξαπλωθούν και να μεταφερθούν σε άλλα βακτήρια (Levy and Marshal, 2004).

Η αντοχή στα αντιβιοτικά μπορεί να είναι φυσική (intrinsic) ή επίκτητη (acquired) και μπορεί να μεταφερθεί οριζόντια ή κάθετα. Μολονότι η φυσική μορφή

αντοχής στα αντιβιοτικά επιτεύχθηκε από μία τυχαία γενετική μετάλλαξη σε περιβάλλον με έλλειψη επιλεκτικής πίεσης από την παρουσία αντιβιοτικού και είναι λιγότερο σπάνια από την επίκτητη, μπορεί και αυτή να παίζει ρόλο στην εξέλιξη της αντοχής. Η επίκτητη αντοχή αποτελεί το καλύτερο παράδειγμα ταχύτατης προσαρμογής των βακτηρίων στο νέο οικοσύστημα.

Στο μεγαλύτερο μέρος, ωστόσο, η πίεση επιλογής που αναπτύσσεται από την παρουσία ενός αντιβιοτικού είναι ένα ισχυρό ερέθισμα για να προκαλέσει μια βακτηριακή απάντηση προσαρμογής και είναι η πιο κοινή αιτία βακτηριακής αντοχής στα αντιβιοτικά (Sefton 2002). Ευαίσθητα βακτήρια μπορούν να αποκτήσουν αντοχή σε αντιμικροβιακούς παράγοντες είτε μέσω γενετικής μετάλλαξης είτε μέσω μεταφοράς γονιδίων αντοχής από άλλα βακτήρια. Τα γονίδια αντοχής βρίσκονται φυσιολογικά σε συγκεκριμένα τμήματα στο DNA γνωστά και σαν τρανσποζόνια τα οποία επιτρέπουν στα γονίδια αντοχής εύκολα να μετακινηθούν από ένα πλασμίδιο σε ένα άλλο (Sefton 2002). Μερικά τρανσποζόνια μπορούν να περιέχουν ένα ειδικό, πιο περίπλοκο τμήμα DNA γνωστό σαν «ιντεγκρόνιο», ένα γενετικό στοιχείο ικανό να ενσωματώνει διαφορετικά γονίδια βακτηριακής αντοχής και έτσι μπορεί να διανέμει αντοχή στα βακτήρια. Τα ιντεγκρόνια έχουν αναγνωριστεί και σε gram-αρνητικά και σε gram-θετικά βακτήρια και φαίνεται να διανέμουν αντοχές για πολλά αντιβιοτικά στα βακτήρια που τις φέρουν και τις εκφράζουν (Levy and Marshal, 2004).

Όταν μια γενετική μετάλλαξη συμβεί και δημιουργήσει μια αλλαγή στο βακτηριακό DNA, γενετικό υλικό μπορεί να μεταφερθεί σε άλλα βακτήρια με διάφορους τρόπους. Οι πιο κοινοί μηχανισμοί γενετικής μεταφοράς είναι η σύζευξη (conjugation), η μεταμόρφωση (transformation) και η μεταγωγή (transduction) (Alanis, 2005).

Σύζευξη. Η σύζευξη είναι ο πιο σημαντικός και ο πιο κοινός μηχανισμός μεταφοράς της αντοχής στα βακτήρια. Αυτός ο μηχανισμός φυσιολογικά πραγματοποιείται από πλασμίδια (εξωχρωμοσωμικά, κυκλικά, διπλής έλικας μόρια DNA) που είναι απλούστερα από το χρωμοσωμικό DNA και μπορούν να αντιγράφονται αυτόνομα σε σχέση με το βακτηριακό χρωμόσωμα. Ο μηχανισμός μετάδοσης των πλασμιδίων ανάμεσα στα βακτήρια εξασφαλίζεται με ειδικά ινίδια που σχηματίζονται μεταξύ

βακτηρίων όταν είναι κοντά το ένα στο άλλο ενώνοντας τα προσωρινά και επιτρέπουν την μεταφορά των κομματιών DNA.

Μεταμόρφωση. Η μεταμόρφωση είναι μια άλλη μορφή μετάδοσης γονιδίων βακτηριακής αντοχής και συμβαίνει όταν υπάρχει άμεση πρόσληψη από τα βακτήρια μορίων χρωμοσωμικού DNA (γνωστό και σαν «γυμνό DNA») που έχει προκύψει από την λύση άλλων βακτηρίων και βρίσκεται ελεύθερο στο περιβάλλον. Τα βακτήρια δέκτες απλά εισάγουν το ελεύθερο DNA στο κυτταρόπλασμα τους και το ενσωματώνουν στο δικό τους DNA σχηματίζοντας με ανασυνδυασμό τα «μωσαϊκά» γονίδια.

Μεταγωγή. Η μεταγωγή είναι ο τρίτος μηχανισμός γενετικής μεταφοράς και συμβαίνει μέσω της χρήσης ενός «μεταφορέα», των βακτηριοφάγων (ιοί που είναι ικανοί να προσβάλλουν βακτήρια). Ο ιός που περιέχει το βακτηριακό γονίδιο που κωδικοποιεί την αντιβιοτική αντοχή (το «ανθεκτικό» DNA) μολύνει τα νέα βακτηριακά κύτταρα και εισάγει αυτό το γενετικό υλικό στα προσβεβλημένα βακτήρια.

ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΤΟΧΗΣ

Με οποιοδήποτε τρόπο ένα γονίδιο μεταφέρεται στο βακτήριο, η μικροβιακή αντοχή εμφανίζεται όταν το γονίδιο είναι ικανό να εκφραστεί και να παράγει μια χειροπιαστή βιολογική επίδραση με αποτέλεσμα την απώλεια της δραστηριότητας του αντιβιοτικού. Αυτοί οι μηχανισμοί είναι πολλοί και μπορούν να συνοψιστούν στα εξής:

Αδρανοποίηση ή τροποποίηση του αντιβιοτικού. Η αδρανοποίηση ή τροποποίηση συμβαίνει όταν τα βακτήρια παράγουν ένα ή περισσότερα ένζυμα που χημικά καταστρέφουν ή αλλάζουν το αντιμικροβιακό, καθιστώντας το αναποτελεσματικό εναντίον του βακτηρίου. Αυτός είναι ένας πολύ διαδεδομένος μηχανισμός αντοχής και μάλλον ένας από τους παλαιότερους που επηρεάζει πολλά αντιμικροβιακά, με χαρακτηριστικά τις β-λακταμάσες που υδρολύουν τα β-λακταμικά, τα αμινογλυκοσιδοτροποποιητικά ένζυμα (AMEs) και τις ακετυλοτρανφεράσες της χλωραμφενικόλης (CATs) (Jacoby and Munoz-Price, 2005).

Ενεργή εκροή του αντιβιοτικού. Η ενεργή εκροή του αντιβιοτικού αφορά τα αντιβιοτικά που δρουν στο εσωτερικό του βακτηρίου και λαμβάνει μέρος όταν ένας μικροοργανισμός είναι ικανός να εμφανίζει έναν ενεργό μηχανισμό αποβολής που εξωθεί τα μόρια του αντιβιοτικού στον εξωτερικό χώρο μέχρι να φτάσει την συγκέντρωση κάτω από το επίπεδο που χρειάζεται το αντιβιοτικό για να έχει βακτηριοκτόνο δράση. Αυτό σημαίνει ότι ο μηχανισμός εκροής πρέπει να είναι ισχυρότερος του μηχανισμού εισροής για να είναι αποτελεσματικός. Ο μηχανισμός ενεργητικής αποβολής αναφέρθηκε πρώτη φορά για τις τετρακυκλίνες και τα μακρολίδια αλλά τώρα είναι γενικευμένος για πολλά αντιβιοτικά (Hooper, 2005).

Τροποποίηση του στόχου δράσης. Η τροποποίηση του στόχου δράσης εμφανίζεται όταν ο ενδοκυτταρικός στόχος ή ο υποδοχέας του αντιμικροβιακού φαρμάκου τροποποιείται από τα βακτήρια με αποτέλεσμα στην αδυναμία σύνδεσης και συνεπώς την αδυναμία αντιμικροβιακού αποτελέσματος. Παραδείγματα του μηχανισμού αυτού περιλαμβάνουν την τροποποίηση της δομής των πενικιλινο-δεσμευτικών πρωτεϊνών (PBPs, penicillin-binding proteins) που παρατηρείται σε συγκεκριμένους τύπους αντοχής της πενικιλίνης, μεθυλίωση του ριβοσώματος που προκαλεί την αδρανοποίηση αμινογλυκοσιδών, μακρολιδών ή τετρακυκλινών και την μεταλλαγή της DNA γυράσης και τοποισομεράσης IV προκαλώντας την αντοχή στις φθοριοκινολόνες. Επίσης η αλλαγή του διπεπτιδίου D-Ala-D-Ala σε D-Ala-D-Lac προκαλεί αντοχή των *Enterococcus spp.* στα γλυκοπεπτιδικά (Levy and Marshal, 2004, Sefton, 2002). Είναι ενδεχόμενο ότι περισσότεροι βιολογικοί μηχανισμοί αντοχής θα ανακαλυφθούν στο μέλλον. Το μόνο που μπορεί να κάνει κάποιος είναι να «εύχεται» όσο αυτοί εμφανίζονται, να μπορούμε να χρησιμοποιούμε αυτούς τους νέους μηχανισμούς σαν στόχο για την δημιουργία νέων πιο αποτελεσματικών αντιβιοτικών.

ΠΟΛΥΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΜΙΚΡΟΒΙΑ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η ανεξέλεγκτη χρήση των αντιβιοτικών μείωσε την θνησιμότητα και την θνητότητα που συσχετιζόταν με τις λοιμώδεις ασθένειες. Η εμφάνιση της αντοχής των μικροβίων όμως, προκαλεί σημαντικό πρόβλημα σε παγκόσμιο επίπεδο και είναι προτεραιότητα της επιστημονικής κοινότητας η αντιμετώπισή της (ECDCP, 2010, Boucher et al., 2009,

Lautenbach E and Polk RE, 2007) . Ειδικότερα στην Ελλάδα οι ρυθμοί εμφάνισης της αντοχής στα ευρέως φάσματος αντιβιοτικά είναι από τους υψηλότερους της Ευρώπης (ECDCP, 2010). Ειδικότερα, η εμφάνιση των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες Gram-αρνητικών βακτηρίων έχει αυξηθεί δραματικά και περιλαμβάνει ενδημικά στελέχη στις μονάδες εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ). Στα νοσοκομεία, οι ΜΕΘ θεωρούνται τα τμήματα όπου το πρόβλημα της μικροβιακής αντοχής είναι μεγαλύτερο λόγω του συνδυασμού παραγόντων οι οποίοι είναι δύσκολο να εκτιμηθούν και να προβλεφθούν. Η πολυπαραγοντική επίδραση στην επιδημιολογία και στην αύξηση της επίπτωσης των πολυανθεκτικών μικροοργανισμών (multi-drug resistant organisms, MROs) στη ΜΕΘ περιλαμβάνει την εισαγωγή ΜΡΟs από τη μεταφορά νοσηλευόμενων ασθενών ή τη μεταφορά ασθενών με φορεία ΜΡΟs από την κοινότητα στη ΜΕΘ, τον αποικισμό των επαγγελματιών του χώρου υγείας, την επαγωγή αντοχής από μεταλλάξεις ή γενετική μεταφορά, τη διασπορά ΜΡΟs λόγω αποτυχίας των πρακτικών ελέγχου λοιμώξεων και την επιλογή ανθεκτικών στελεχών από την προϋπάρχουσα φυσιολογική χλωρίδα, κυρίως λόγω της αυξημένης χορήγησης αντιβιοτικών (Bonten MJ and Mascini EM, 2003). Πολύ-ανθεκτικοί μικροοργανισμοί όπως *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* και *Pseudomonas aeruginosa* αναφέρονται ολοένα περισσότερο στον Ελληνικό χώρο. Ανθεκτικοί στη μεθικιλίνη *S. aureus* (MRSA) και ανθεκτικοί στην βανκομυκίνη εντερόκοκκοι (VRE) είναι από τους ευρέως εμφανιζόμενους στα Ελληνικά Νοσοκομεία. Η πολύ-αντοχή αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της θνησιμότητας, της νοσοκομειακής περίθαλψης και του κόστους αυτής και υποσκάπτει το νοσοκομειακό σύστημα (Parakonstantinou et al., 2012).

ΜΕΘΙΚΙΛΛΙΝΗ-ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΣ ΧΡΥΣΙΖΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΣ (MRSA)

Η θεραπεία των λοιμώξεων από *S. aureus* πριν από τη δεκαετία του 1950 περιελάμβανε τη χορήγηση βενζυλοπενικιλίνης (πενικιλίνη G), αλλά από τα τέλη της δεκαετίας του 1950, η εμφάνιση στελεχών ανθεκτικών στη βενζυλοπενικιλίνη είχαν προκαλέσει αυξανόμενη ανησυχία. Τα ανθεκτικά στελέχη παρήγαγαν συνήθως ένα ένζυμο, τη β-λακταμάση, η οποία υδρολύει τη β-λακτάμη. Καταβλήθηκαν προσπάθειες για να συντεθούν παράγωγα της πενικιλίνης που ήταν ανθεκτικά στην υδρόλυση από β-λακταμάση. Αυτό επιτεύχθηκε το 1959 με τη σύνθεση της μεθικιλίνης, στην οποία έχει

αντικατασταθεί η φαινολική ομάδα της βενζυλοπενικιλίνης με μεθοξυ ομάδες. Δυστυχώς, αμέσως μόλις χρησιμοποιήθηκε η μεθικιλίνη κλινικά, αναδύθηκαν στελέχη *S. aureus* ανθεκτικά στη μεθικιλίνη (MRSA) (Chambers, 1997). Η αντοχή δεν οφειλόταν στην παραγωγή της β-λακταμάσης, αλλά στην έκφραση μίας επιπρόσθετης πενικιλινοδεσμευτικής πρωτεΐνης (PBP2a), που αποκτήθηκε από άλλα είδη, τα οποία ήταν ανθεκτικά στην δράση του αντιβιοτικού (Chambers, 1997). Η χρήση διαφόρων τύπων αντιβιοτικών έχει οδηγήσει στην εμφάνιση πολυανθεκτικών στελεχών MRSA (Livermore, 2000), στην εμφάνιση μεταλλάξεων σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες-στόχους και στην απόκτηση και συσσώρευση γονιδίων που επιφέρουν αντοχή στα αντιβιοτικά. Ακόμη και σήμερα, παρά την εισαγωγή νεότερων αντιβιοτικών (π.χ. οξαζολιδιόνες, νταπτομυκίνη, τιγκεκυκλίνη), η θεραπεία εκλογής για λοιμώξεις από MRSA παραμένει η βανκομυκίνη.

Ο κύριος μηχανισμός αντοχής στη μεθικιλίνη του *S. aureus* η πρωτεΐνη PBP2a, έχει χαμηλή συγγένεια με τη μεθικιλίνη και κωδικοποιείται από το *mecA* γονίδιο. Η σύνθεση της PBP2a ρυθμίζεται και διατηρείται κατά κανόνα σε χαμηλό επίπεδο, όμως το επίπεδο σύνθεσης μπορεί να ενισχυθεί αν υπάρξουν μεταλλάξεις στα ρυθμιστικά γονίδια.

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ MRSA

Έχουν περάσει πενήντα χρόνια από τότε που η Patricia Jevons περιέγραψε τα πρώτα ανθεκτικά στη μεθικιλίνη στελέχη του χρυσίζοντα σταφυλόκοκκου (MRSA), μόλις 2 χρόνια μετά την αρχική κλινική χρήση της μεθικιλίνης (Jevons, 1961). Στο μισό αιώνα που ακολούθησε, οι οργανισμοί αυτοί έχουν εξαπλωθεί σε όλο τον κόσμο και παρόλο που έχουμε μάθει πολλά γι' αυτούς, ήταν εντελώς ανέφικτο να εξαλειφθούν ή να αποτραπούν οι σοβαρές λοιμώξεις που συνεχίζουν να προκαλούν. Ο *S. aureus* έχει πολλά χαρακτηριστικά που προκαλούν την επιτυχία του ως ανθρώπινο παθογόνο. Μεταξύ αυτών είναι η παθογένειά του και οι μηχανισμοί διακυτταρικής χημικής επικοινωνίας (quorum sensing), που επιτρέπουν να προκαλέσει ένα ευρύ φάσμα σοβαρών λοιμώξεων στον άνθρωπο-ίσως περισσότερο από οποιαδήποτε άλλα είδη βακτηρίων. Η γενετική ποικιλότητα και η ικανότητα να αποκτά νέα εξωγενή γονίδια, επιτρέπουν να προσαρμοστεί σε μια ποικιλία από μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες και να διαμορφώνει την παθογένειά του. Έχει επίσης τη δυνατότητα να δημιουργήσει

ασυμπτωματική φορεία, το οποίο προάγει την ευρεία διάδοσή του μεταξύ των ανθρώπων-ξενιστών. Τέλος, έχει δείξει μια αξιοσημείωτη τάση να αποκτήσει αντοχή σε πολλούς αντιμικροβιακούς παράγοντες. Όλοι αυτοί οι παράγοντες και μια σειρά από άλλα χαρακτηριστικά βοηθούν να εξηγηθεί γιατί ο οργανισμός αυτός έχει αναπτυχθεί και εξαπλωθεί σε όλο τον κόσμο μέσα σε 50 χρόνια από την πρώτη ταυτοποίησή του.

Από την αρχική περιγραφή τους το 1961, ένας αριθμός κλώνων του MRSA έχουν εξαπλωθεί ευρέως σε όλο τον κόσμο. Δεν είναι σαφές εάν αυτό αποτελεί διαφοροποίηση από έναν κλώνο ή εισαγωγή *SCCmecA* σε πολλούς κλώνους, μερικοί εξ αυτών είναι πιο ικανοί σε επίπεδο διασποράς από τους άλλους. Οι Enright et al (*Enright et al., 2002*) θεωρούν, βάσει της τυποποίησης πολλαπλών γενετικών θέσεων (MLST) με την εφαρμογή του αλγόριθμου BURST σε μία διεθνή συλλογή από 912 MRSA και MSSA στελέχη, ότι υπάρχουν 11 κύριοι MRSA κλώνοι από πέντε ομάδες συναφών γονοτύπων.

Επιπλέον, τα στοιχεία τους δείχνουν ότι η αντοχή στη μεθικιλίνη εμφανίστηκε για πρώτη φορά στον ST τύπο 250, ο οποίος πιθανόν εξελίχθηκε από μια απομόνωση MRSA τύπου ST8 που απέκτησε το *mecA* γονίδιο. Μια μικρή παραλλαγή του ST250 (ST247-MRSA-I), γνωστή ως κλώνος της Ιβηρικής, είναι ένα από τα σημαντικότερα στελέχη που κυκλοφορούν στον κόσμο σήμερα (*Enright et al., 2002*).

MRSA ME ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΣΤΗΝ ΟΞΑΚΙΛΛΙΝΗ (OXACILLIN-SUSCEPTIBLE MRSA, OS-MRSA)

Στελέχη *S. aureus* με MIC στην οξακιλλίνη ≥ 2 mg/L ή που φέρουν το γονίδιο *mecA*, θεωρούνται ανθεκτικά στην οξακιλλίνη. Ωστόσο, τα στελέχη *S. aureus* που φέρουν το γονίδιο *mecA*, μπορεί να έχουν MIC για την οξακιλλίνη που να κυμαίνεται ευρέως, από <2 ως $>1,000$ mg/L. Είναι λοιπόν σαφές ότι η παρουσία του *mec* γονιδίου από μόνη της δεν προσδιορίζει την κλινική έκφραση της αντοχής. Η πληθυσμιακή ανάλυση αυτών των στελεχών έδειξε ότι άλλα στελέχη έχουν ετερογενή αντοχή και άλλα ομοιογενή (*Tomasz et al., 1991, Rohrer et al., 2003, Hososaka et al., 2007*).

Είναι επίσης ευρέως γνωστό ότι η έκφραση της αντοχής των MRSA στην οξακιλλίνη είναι σπάνια ομοιογενής και τις περισσότερες φορές είναι ετερογενής. Η ετερογενής αντοχή στην οξακιλλίνη μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε 4 φαινοτυπικές τάξεις έκφρασης (τάξεις από 1 έως 4), με την τάξη 1 να είναι η περισσότερο ετερογενής

(≤ 1 in 10^8 των αποικιών έχουν υψηλού επιπέδου αντοχή), την τάξη 4 να είναι ομοιογενώς ανθεκτική (≥ 1 in 10^2 ανθεκτικών αποικιών) και τις τάξεις 2 και 3 να έχουν ενδιάμεσους αριθμούς ανθεκτικών αποικιών (Tomasz *et al.*, 1991).

Κατά τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται αυξανόμενη εμφάνιση στελεχών MRSA που έχουν χαμηλές MIC για την οξακιλλίνη (<2 mg/L, OS-MRSA) ενώ φέρουν το *mecA* γονίδιο. Η πρώτη αναφορά εμφάνισης OS-MRSA στην Ελλάδα αφορά κλώνους που προέκυψαν στο κλινικό περιβάλλον του ΠΓΝΑ κατά το 2001 (Petinaki *et al.*, 2002) και διέφεραν αρκετά από στελέχη που υπήρχαν στην περιοχή της Θεσσαλίας τα τελευταία χρόνια. Τα στελέχη είχαν κατηγοριοποιηθεί ως ευαίσθητα στην οξακιλλίνη με την μέθοδο αραιώσεων σε άγαρ και την μέθοδο διάχυσης αντιβιοτικού σε άγαρ, καθώς και από το αυτοματοποιημένο σύστημα Vitek (bioMerieux). Οι MICs για την οξακιλλίνη σε αυτά τα στελέχη κυμαίνονταν από 0.5 έως 1 mg/L. Οι πληθυσμιακές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν ότι τα στελέχη ήταν ετερογενώς ανθεκτικά στην οξακιλλίνη και ανήκαν στην τάξη 1.

Επίσης, στελέχη OS-MRSA έχουν παρατηρηθεί τα τελευταία 10 χρόνια και από αρκετές άλλες περιοχές παγκοσμίως (Hososaka *et al.*, 2007, Forbes *et al.*, 2008, Chen *et al.*, 2009, Saeed *et al.*, 2010). Όσον αφορά τον Ελληνικό χώρο, μία άλλη μελέτη από την Ελλάδα (Chini *et al.* 2008), περιέγραψε από την περιοχή της Πάτρας, στελέχη OS-MRSA. Συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι ανιχνεύθηκαν στελέχη με ST τύπο 30 και 80, οι οποίοι ήταν από τους συχνότερα ανιχνευθέντες κλώνους στην περιοχή, από τα οποία το 14,3% και 8.6% αντιστοίχως, έχουν MIC στην οξακιλλίνη < 2 mg/L και χαρακτηρίζονται ως OS-MRSA. Τέλος, παρατηρήθηκαν και μελετήθηκαν από την ερευνητική μας ομάδα κατά την περίοδο 2006-2008, αρκετά στελέχη OS-MRSA από την περιοχή της Θεσσαλίας.

Πιστευόταν παλαιότερα γενικά ότι τα περισσότερα στελέχη OS-MRSA παρουσιάζουν ετερογενή αντοχή στην οξακιλλίνη, έστω και σε χαμηλή συχνότητα αποικιών και ότι η θεραπευτική χορήγηση β-λακταμών θα μπορούσε να οδηγήσει σε θεραπευτικές αποτυχίες (Sakoulas, 2001). Καθώς όμως η αντοχή στην οξακιλλίνη πρέπει να οφείλεται και σε άλλους άγνωστους παράγοντες, πέραν του *mecA*, οι οποίοι να οδηγούν σε ποικίλα επίπεδα έκφρασης των φαινοτύπων αντοχής, είναι λογικό να υπάρχουν και μη ετερογενή, λειτουργικά ευαίσθητα στην οξακιλλίνη *mecA*-θετικά

στελέχη *S. aureus*. Εφόσον τέτοια στελέχη υπάρχουν, οι θεραπευτικές επιλογές θα ήταν πολύ περισσότερες και θα περιλάμβαναν πενικιλλινασο-ανθεκτικές β-λακτάμες, οι οποίες είναι η καλύτερη θεραπεία έναντι των MSSA (Joukhadar, 2010).

Από τις παραπάνω αναφορές είναι εμφανές ότι στελέχη OS-MRSA υπάρχουν σε πολλές περιοχές παγκοσμίως, κάτι που σημαίνει ότι είναι σύνηθες χαρακτηριστικό μεταξύ των *mecA*-θετικών *S. aureus*. Τέτοια στελέχη μπορεί να είναι πολύ πιο διαδεδομένα και πιθανόν να μην ανιχνεύονται με τις μεθόδους ρουτίνας στα κλινικά εργαστήρια. Επίσης, στον Ελληνικό χώρο φαίνεται από τις προηγούμενες αναφορές να υπάρχουν αυξανόμενα στελέχη OS-MRSA. Το γεγονός αυτό και επειδή τα β-λακταμικά αντιβιοτικά έχουν την πιο ισχυρή μικροβιοκτόνο δράση σε σχέση με άλλες ομάδες αντιβιοτικών, δείχνει ότι είναι σημαντική η διερεύνηση της θεραπευτικής δράσης της οξακιλλίνης έναντι στελεχών OS-MRSA. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν πειραματικές λοιμώξεις στα πλαίσια της παρούσας μελέτης. Επίσης, επειδή η βανκομυκίνη θεωρείται συνήθως θεραπεία εκλογής για τις MRSA λοιμώξεις, κρίθηκε σημαντική η απευθείας σύγκριση της δραστηριότητας της οξακιλλίνης σε σύγκριση με τη βανκομυκίνη.

***KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ΑΝΘΕΚΤΙΚΗ ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ ΛΟΓΩ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΩΝ ΚΡC**

Το 2001, αναφέρθηκε στις Η.Π.Α το πρώτο κρούσμα από *K. pneumoniae* ανθεκτική στις καρβαπενέμες λόγω παραγωγής *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC)(Paterson DL and Bonomo RA, 2005). Το ένζυμο (KPC-1) μια β-λακταμάση τύπου Ambler A, δεν ήταν η πρώτη καρβαπενεμάση που είχε ανακαλυφθεί στις *K. pneumoniae*, αφού στελέχη που έφεραν μεταλλο-β-λακταμάσες ικανές να υδρολύουν καρβαπενέμες είχαν αναφερθεί στην Ιαπωνία από το 1994. Οι KPC κωδικοποιούνται από το γονίδιο *bla_{KPC}*, του οποίου η δυνατότητα για γεωγραφική εξάπλωση κατά μεγάλο ποσοστό εξηγείται από την θέση του μέσα στο Tn3- τύπου τρανσποζόνιο, Tn4401 (Arnold et al., 2011). Αυτό το τρανσποζόνιο είναι το γενετικό στοιχείο που είναι ικανό να εισάγει την διαφοροποίηση στα πλασμίδια των Gram- βακτηρίων. Επιπλέον, τα *bla_{KPC}* ένζυμα είναι εύκολα μεταδιδόμενα και συχνά σχετίζονται με διάφορες μη β-λακταμικές αντοχές που δυσκολεύουν περισσότερο τις θεραπευτικές εναλλακτικές λύσεις για τις κλινικά γενικευμένες λοιμώξεις (Bratu et al.,

2005, Nordmann et al. 2009, Tsakris et al., 2008). Παρόλο που οι *K. pneumoniae* παραμένουν το πιο συχνό βακτήριο που φέρει KPC, τα ένζυμα αυτά έχουν ανακαλυφθεί και σε διάφορα άλλα είδη Gram- βακίλων όπως *E.coli*, *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.* και άλλα (Arnold et al., 2011).

Την τελευταία δεκαετία, εντεροβακτηριακά που παράγουν καρβαπενεμάσες τύπου KPC έχουν γίνει από τα κοινά νοσοκομειακά παθογόνα στις Η.Π.Α αλλά και σε άλλες περιοχές, όπως η **Ελλάδα**, το Ισραήλ, η Κίνα, στην Λατινική Αμερική, Σουηδία, Ιταλία και αλλού (Nordmann et al., 2009, Pournaras et al., 2009, Cornaglia G and Rossolini GM, 2010, Souli et al., 2010). Κλινικές έρευνες έχουν αναφέρει ότι νοσοκομειακές λοιμώξεις που οφείλονται σε KPC *Enterobacteriaceae* συχνά σχετίζονται με θεραπευτική αποτυχία και υψηλή θνησιμότητα (Bratu et al., 2005, Gasink et al., 2009, Nordman et al., 2009, Hirsch and Tam, 2010, Carmeli et al., 2010). Εκτός από αυτές τις αναφορές, έρευνες που σχετίζονται με την αντιμικροβιακή θεραπεία λοιμώξεων από KPC βακτήρια και τα κλινικά αποτελέσματα βασίζονται σε περιορισμένο αριθμό από ασθενείς και έτσι μια αποτελεσματική θεραπεία δεν έχει καθιερωθεί (Hirsch and Tam, 2010).

Κλινικά στελέχη *K. pneumoniae* που παράγουν KPC καρβαπενεμάσες (KPC-KP) μπορεί να εμφανίζονται ευαίσθητα στις καρβαπενέμες, κυρίως στην μεροπενέμη (Anderson et. al., 2007, Nordmann et al., 2009), με τη μέθοδο αραιώσεων σε άγαρ ή τη μέθοδο μικροαραιώσεων σε ζωμό όπως και στα αυτόματα συστήματα (Endimiani et al., 2009, Pillai et al., 2009, Pournaras et al., 2009). Χαρακτηριστικά, έχει αναφερθεί ότι τα αυτόματα συστήματα μπορούν να αναγνωρίσουν έως 87% των KPC-KP στελεχών σαν ευαίσθητα στην μεροπενέμη (Nordmann et al., 2009). Η ανεύρεση του επιπέδου της ευασθησίας των KPC-KP στελεχών στις καρβαπενέμες έχει αποδειχθεί να είναι πολύ δύσκολο λόγω της φαινοτυπικής ετερογένειας που συχνά εμφανίζουν (Bratu et al., 2005, Lomaestro et al., 2005, Nordman et al., 2009). Αυτές οι περιπτώσεις εγείρουν την ανάγκη για συγκρατημένη αξιολόγηση των μεθόδων ευαισθησίας των KPC-KP στελεχών που εμφανίζονται στα κλινικά εργαστήρια. Πολλά στελέχη KPC-KP που παρουσιάζουν ευαισθησία στα αυτόματα συστήματα ευαισθησίας, εμφανίζουν ετερογενείς υποπληθυσμούς (Pournaras et al., 2010). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι σε πολλά στελέχη KPC-KP στην Ελλάδα, η μεροπενέμη έχει την τάση να εμφανίζει μικρότερη MIC

(minimum inhibitory concentration- ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής) από την υμιπενέμη ή την ερταπενέμη (Pournaras et al., 2009, Tsakris et al., 2009).

Στην κλινική πράξη, η θεραπεία λοιμώξεων που οφείλονται σε αυτά τα μικρόβια συχνά απαιτούν την χρήση της τιγκεκυκλίνης σαν φάρμακο τελευταίας εκλογής (Pournaras et al., 2009, Nordman et al., 2009, Hirsch and Tam, 2010). Η τιγκεκυκλίνη είναι φάρμακο που χρησιμοποιείται ευρέως σε λοιμώξεις και από άλλα πολύ-ανθεκτικά Gram- μικρόβια. Η σοβαρότητα αυτών των λοιμώξεων συχνά απαιτεί την χρήση της τιγκεκυκλίνης σε συνδυασμό και με άλλα αντιμικροβιακά (Bratu et al., 2005, Nordmann et al., 2009, Pournaras et al., 2009, Hirsch and Tam, 2010). Πειράματα ευαισθησίας έδειξαν ότι τέτοιοι συνδυασμοί μπορεί να είναι με την κολιστίνη ή την μεροπενέμη (Pournaras et al., 2010, Pournaras et al., 2011). Να σημειωθεί ότι ασθενείς που έλαβαν μονοθεραπεία την κολιστίνη ή την μεροπενέμη δεν παρουσίασαν θετική εξέλιξη, παρόμοια μάλιστα με αυτούς που έλαβαν ακατάλληλη θεραπεία (Weisenberg et al., 2009, Zarkotou et al., 2010, Pournaras et al., 2011, Zarkotou et al., 2011).

Επίσης, έχει παρατηρηθεί *in vitro* συνέργεια με τη χρήση τιγκεκυκλίνης σε συνδυασμό με ριφαμπικίνη, αμικασίνη, αμπικιλίνη/σουλβακτάμη σε ευαίσθητα στελέχη *Klebsiella pneumoniae*, όπως και βακτηριοκτόνος συνέργεια *in vitro* πάλι με τη χρήση τιγκεκυκλίνης σε συνδυασμό με κολιστίνη επίσης σε ευαίσθητα *K. pneumoniae* (Entenza and Moreillon, 2009). Ο συνδυασμός τιγκεκυκλίνης με κολιστίνη έχει δείξει επωφελή προκαταρκτικά αποτελέσματα και σε πειραματικά μοντέλα μικροβιαμίας από στελέχη *K. pneumoniae* (Entenza and Moreillon, 2009).

Αντίθετα, η χρήση της τιγκεκυκλίνης σε *in vivo* πειράματα ανθεκτικών στελεχών *K. pneumoniae* ως μονοθεραπεία έχει περιγραφεί πολύ σπάνια (Tessier and Nicolau, 2012) και σε μικρό αριθμό στελεχών. Στην βιβλιογραφία επίσης δεν εμφανίζονται *in vivo* πειράματα όπου να γίνεται χρήση της τιγκεκυκλίνης σε συνδυασμό με άλλα αντιβιοτικά σε ανθεκτικά στελέχη *K. pneumoniae* που να παράγουν καρβαπενεμάσες. Το έλλειμμα αυτό προσπαθήσαμε να καλύψουμε με την έρευνα που κάναμε σε αυτήν την διδακτορική διατριβή.

***ACINETOBACTER BAUMANNII* ΑΝΘΕΚΤΙΚΟ ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ**

Το *A. baumannii* είναι ένας πολυανθεκτικός νοσοκομειακός παθογόνος μικροοργανισμός που επηρεάζει όλο και περισσότερους σοβαρά άρρωστους ασθενείς. Είναι πολύ ικανό να επιβιώνει και να εξαπλώνεται στο περιβάλλον του νοσοκομείου και να εμφανίζει αντοχή σε αντιμικροβιακούς παράγοντες. Οι καρβαπενέμες, όπως η μηπενέμη και η μεροπενέμη, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στις σοβαρές λοιμώξεις από πολυανθεκτικά *A. baumannii*. Ωστόσο, οι λοιμώξεις από στελέχη ανθεκτικά στις καρβαπενέμες αυξάνονται και συχνά συνδέονται με αυξημένα ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας (Lee et al., 2007, Higgins et al., 2010, Durante-Mangoni et al., 2011). Εξάρσεις λοιμώξεων που προκλήθηκαν από πολυανθεκτικά *A. baumannii* έχουν αναφερθεί σε διάφορες ΜΕΘ παγκοσμίως, και σε πολλές περιπτώσεις τέτοια στελέχη είναι ανθεκτικά σε όλα τα διαθέσιμα αντιμικροβιακά εκτός της κολιστίνης (van Looveren and Goossens, 2004, Higgins et al., 2010, Durante-Mangoni et al., 2011). Επιδημίες από πολυανθεκτικά στελέχη συνήθως ανήκουν σε συγκεκριμένο αριθμό κλώνων, που στην Ευρώπη και την Ελλάδα καλούνται EU κλώνοι I, II, και III (Gogou et al., 2011). Τελευταία, ο όρος διεθνή κλωνικά συμπλέγματα (international clonal complexes-CCs) χρησιμοποιείται, με τους Ευρωπαϊκούς κλώνους να αντιστοιχούν στο CC1, CC2 και CC3, αντίστοιχα (Dijkshoorn, et al., 2007, Diancourt et al., 2010).

Οι μοριακές επιδημιολογικές μελέτες είναι σημαντικά εργαλεία για να περιορίσουν την περαιτέρω εξάπλωση των πολυανθεκτικών *A. baumannii*. Στην Ελλάδα, κλινικά στελέχη *A. baumannii* συχνά εμφανίζουν πολυανθεκτικούς φαινότυπους, αλλά μέχρι τη δεκαετία του 1990 ήταν ευαίσθητα στις καρβαπενέμες (Maniatis et al., 2003). Χαμηλή αντοχή στις καρβαπενέμες σταδιακά άρχισε να εμφανίζεται και ήταν ένα συχνό φαινόμενο στις αρχές του 2000 (Tsakris et al., 2003). Ακολούθως, κλινικά στελέχη *A. baumannii* ανθεκτικά στη μεροπενέμη επικράτησαν στα Ελληνικά νοσοκομεία την τελευταία δεκαετία και προκάλεσαν αρκετές νοσοκομειακές εξάρσεις (Pournaras et al., 2006, Markogiannakis et al., 2008).

Ένα άλλο ανησυχητικό φαινόμενο είναι η ετερογενής αντοχή των *A. baumannii* στα αντιβιοτικά, όπως η κολιστίνη και οι καρβαπενέμες (Hawley et al., 2008, Lee et al., 2011, Ikonomidis et al., 2009), που μπορεί να επηρεάσει τη θεραπεία των αντίστοιχων λοιμώξεων. Έχει περιγραφεί από την ερευνητική μας ομάδα, ότι η παρουσία

μεροπενέμης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσει την εμφάνιση υποπληθυσμών με ετερογενή έκφραση αντοχής, που εκφράζονται ως αποικίες εντός της ζώνης αναστολής γύρω από δίσκους μεροπενέμης (Ikonomidis et al., 2009, Pournaras et al., 2005). Οι αποικίες αυτές μπορεί να περιλαμβάνουν μικροβιακούς υποπληθυσμούς με αντοχή που παραμένει σταθερή λόγω μόνιμων γενετικών αλλαγών (ετεροανθεκτικοί) ή υποπληθυσμούς που επιβιώνουν σε λανθάνουσα φάση υπό την παρουσία μεροπενέμης (εμμένοντα βακτήρια) και γίνονται πάλι ευαίσθητοι σε απουσία μεροπενέμης (Wiuff et al., 2005).

Λόγω του σοβαρού προβλήματος αντοχής των *A. baumannii*, αλλά και της σχετικά πρόσφατης εμφάνισής τους ως συχνά νοσοκομειακά παθογόνα, τα θεραπευτικά σχήματα που ενδείκνυνται για την αποτελεσματική αντιμετώπισή τους δεν είναι επαρκώς καθορισμένα. Επίσης, υπάρχουν ελάχιστες αναφορές αποτελεσμάτων από πειραματικές λοιμώξεις με *A. baumannii* που θεραπεύονται με καρβαπενέμες, όπως η μεροπενέμη (Ko et al., 2004). Επιπλέον, καθώς η ετερογενής αντοχή έχει περιγραφεί πρόσφατα, δεν υπάρχουν καθόλου δεδομένα για τη δραστικότητα της μεροπενέμης σε λοιμώξεις από *A. baumannii* με ετερογενή αντοχή στις καρβαπενέμες.

ΙΔΙΑΙΤΕΡΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΧΩΡΟ

Η αντοχή στις β-λακτάμες είναι πολύ συχνή στα στελέχη *Enterobacteriaceae* στην Ελλάδα. Για παράδειγμα, η αντοχή έναντι της κεφτριαξόνης έφτασε το 97% στα στελέχη *K. pneumoniae* που προκαλούν γενικευμένες λοιμώξεις στις νοσοκομειακές ΜΕΘ το 2010.

Επίσης, η αντοχή στις καρβαπενέμες στα στελέχη των *Enterobacteriaceae* είναι ένα μεγάλο πρόβλημα για την δημόσια υγεία στην Ελλάδα. Στελέχη *E. coli* και *K. pneumoniae* που παράγουν VIM μεταλλο-β-λακταμάσες (MBLs) είναι ενδημικά στα νοσοκομεία από τις αρχές του 2000. Έχουν αναφερθεί και πολλές επιδημίες από *K. pneumoniae* που παράγουν VIM-1 (Poulou et al., 2010), που εμφανίζονται ακόμα και στην κοινότητα. Τελευταία, ένζυμα τύπου KPC είναι διαδεδομένα και εξαπλώνονται ραγδαία (Pournaras et al., 2009). Επιδημικές εξάρσεις στελεχών που συνπαράγουν KPC και VIM έχουν ακόμα εμφανιστεί (Giakkoupi et al., 2009). Είναι επίσης πολύ

ενδιαφέρον, οι καρβαπενεμάσες τύπου OXA, παρόλο που είναι διαδεδομένες στις γειτονικές μας χώρες, δεν έχουν αναφερθεί σε *K. pneumoniae* στην Ελλάδα (Miyakis et al., 2011). Η αντοχή των κλινικών στελεχών *K. pneumoniae* στην μηπενέμη το 2010 έφτασε το 69.8% στις Ελληνικές ΜΕΘ και 27.2 % στις παθολογικές κλινικές αντίστοιχα. Αυτά τα ποσοστά έχουν υπερδιπλασιαστεί τα τελευταία 5 χρόνια (Miyakis et al., 2011). Στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάσες υδρολύουν αποτελεσματικά όλες τις β-λακτάμες, εκτός από τις MBLs που δεν υδρολύουν την αζτρεονάμη. Όμοια με τα στελέχη που παράγουν ESBL, αυτά τα στελέχη συχνά είναι επίσης ανθεκτικά στις αμινογλυκοσίδες και στις κινολόνες (Queenan and Bush, 2007).

Πολυανθεκτικά στελέχη *A. baumannii* και *P. aeruginosa* ανευρίσκονται πολύ συχνά στα Ελληνικά νοσοκομεία (Falagas et al., 2008). Τα στελέχη του *A. baumannii* στις Ελληνικές ΜΕΘ είναι χαρακτηριστικά (>90%) ανθεκτικά στην σιπροφλοξασίνη, κεφεπίμη και αμικασίνη (>80%). Η *P. aeruginosa* ήταν η αρχική δεξαμενή των γονιδίων αντοχής *bla_{VIM}* και οι επιδημίες της προηγήθηκαν των *Enterobacteriaceae* (Tsakris et al., 2000). Άλλες καρβαπενεμάσες που υπήρχαν στα *A. baumannii* περιλαμβάνουν τις τύπου OXA (κλάση D) και ένζυμα τύπου VIM (Tsakris et al., 2008). Η αντοχή στις καρβαπενέμες στα κλινικά στελέχη *A. baumannii* στα Ελληνικά νοσοκομεία ξεπερνά το 70% (90% στις ΜΕΘ). Όσο αφορά την *P. aeruginosa*, η αντοχή στην μεροπενέμη ξεπερνά το 25% και 55% αντίστοιχα (Miyakis et al., 2011).

Οι ανθεκτικοί στην μεθικιλίνη *S. aureus* (MRSA) στην Ελλάδα είναι επίσης πολύ συχνοί. Πάνω από το 50% των ανθεκτικών στην μεθικιλίνη *S. aureus* (MRSA) λοιμώξεων είναι του τύπου της κοινότητας, και κυρίως ανήκουν στον Ευρωπαϊκό επιδημικό κλώνο Panton-Valentine leukocidin (PVL+) (ST80-IV) (Maltezou and Giamarellou, 2006). Τα υπερισχύοντα στελέχη MRSA της κοινότητας (CA-MRSA) είναι επίσης ανθεκτικά στο φουσιδικό οξύ, στην τετρακυκλίνη και συχνά στην σιπροφλοξασίνη. Ιδιαιτερότητες του προβλήματος των MRSA στην Ελλάδα περιλαμβάνουν υψηλά ποσοστά των CA-MRSA και ασυνήθιστα συχνή παρουσία της τοξίνης PVL ανάμεσα στα στελέχη που προέρχονται από το νοσοκομείο (HA-MRSA) (Otter and French, 2010). Τα περιστατικά λοιμώξεων από HA-MRSA είναι σχετικά χαμηλά στις περισσότερες ΜΕΘ της Ελλάδας (Miyakis et al., 2011). Συγκεκριμένα, τα ποσοστά των MRSA στην Ελλάδα δείχνουν μια φθίνουσα πορεία (από 48% το 2007 σε

<40% το 2010), κυρίως λόγω της μείωσης τους στις ΜΕΘ (63.4% έναντι 48.1%) παρά στις παθολογικές κλινικές (39% σε 38.1%). Περιέργως, αυτό συνέβη χωρίς την παρουσία ειδικών πανελλήνιων μέτρων που να στόχευαν στους MRSA. Τέλος, παρόμοια με άλλες χώρες, ευαίσθητα στην οξακιλλίνη MRSA (OS-MRSA) έχουν εμφανιστεί και στην Ελλάδα (Ikonomidis et al., 2008, Labrou et al., 2012).

ΕΛΛΕΙΨΗ ΝΕΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Επειδή δεν υπάρχουν επιτυχείς θεραπείες για τα πολυανθεκτικά αυτά μικρόβια, τη μόνη στρατηγική αντιμετώπιση του προβλήματος αποτελεί η προσπάθεια αυστηρότερης συνταγογράφησης των αντιβιοτικών, η απομόνωση των ασθενών για την μείωση της εξάπλωσης εντός του περιβάλλοντος του νοσοκομείου και η προσπάθεια ανακάλυψης νέων και πιο αποτελεσματικών αντιμικροβιακών. Οι φαρμακοβιομηχανίες φαίνεται να αφήνουν σε δεύτερη μοίρα την προτεραιότητα της ανάπτυξης αντιμικροβιακών λόγω της αλλαγής στην εμπορικότητα, λόγω δύσκολων κανόνων ανάπτυξης αυτών και λόγω των δυσμενών εκτιμήσεων από τους Οργανισμούς Φαρμάκων στην Ευρώπη και Αμερική. Παράδειγμα αυτών αποτελεί το ότι τα τελευταία 5 χρόνια ο παγκόσμιος προϋπολογισμός για την ανάπτυξη αντινεοπλασματικών φαρμάκων θα φτάσει τα 88 δισεκατομμύρια δολάρια.

Πρέπει να τονιστεί ότι έχουν ήδη περάσει πολλά χρόνια από την ανακάλυψη νέας κλάσης συστηματικών αντιμικροβιακών φαρμάκων, με τα τελευταία κυκλοφορήσαντα αντιβιοτικά να δρουν μόνο έναντι Gram-θετικών μικροβίων, ενώ μόνο 10 αντιβιοτικά πρόκειται να αναπτυχθούν μέχρι το 2020 (“10 to 20” initiative). Όσον αφορά τα Gram-αρνητικά μικρόβια, δεν υπάρχουν νέες κατηγορίες αντιμικροβιακών και δεν αναμένεται να εμφανιστούν πριν το 2020. Οι οργανισμοί ECDC/EMA επισημαίνουν το έλλειμμα ανάπτυξης νέων αντιβιοτικών σε σχέση με τα πολυανθεκτικά παθογόνα και η έρευνα έχει οδηγηθεί πια στην βελτίωση των ήδη υπάρχοντων μορίων παρά στην ανεύρεση ενός νέου μορίου με καινούργιο μηχανισμό δράσης.

Για τους λόγους αυτούς, υπάρχει ανάγκη χρήσης αντιβιοτικών που επιλέγουν λιγότερα ανθεκτικά μικρόβια, ώστε να καθυστερήσει η εξάπλωση της αντοχής. Επίσης,

λόγω της έλλειψης νέων αντιβιοτικών, είναι επιτακτική η διερεύνηση της θεραπευτικής δραστηριότητας των υπαρχόντων «παλαιών» αντιβιοτικών, όπως και η διερεύνηση της δραστηριότητας συνδυασμών των διαθέσιμων αντιβιοτικών, τόσο με πειράματα *in vitro* όσο και *in vivo*. Τα πειράματα *in vivo* είναι πολύτιμα για τον σαφή καθορισμό των αντιμικροβιακών δράσεων των αντιβιοτικών και την καλύτερη συσχέτισή τους με την κλινική έκβαση των λοιμώξεων.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η μελέτη αυτή ξεκίνησε με σκοπό να διερευνήσει με πειραματικά ζωικά μοντέλα τη δυνατότητα χρήσης σημαντικών αντιβιοτικών έναντι σημαντικών νοσοκομειακών παθογόνων που ενδημούν στον Ελληνικό χώρο και παρουσιάζουν ιδιαίτερα προβλήματα αντοχής. Με την παρούσα μελέτη, επιχειρήθηκε να συμπληρωθεί ένα κενό στη βιβλιογραφία σχετικά με αποτελεσματικά σχήματα θεραπείας πολυανθεκτικών μικροβίων, που στηριζόταν κατά ένα μεγάλο ποσοστό στα πειράματα *in vitro*.

Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν στελέχη OS-MRSA (όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στελέχη MRSA με φαινοτυπική ευαισθησία στην οξακιλλίνη), που είναι αρκετά συχνά στην Ελλάδα και είναι αυξανόμενα σε πολλές άλλες χώρες. Διερευνήθηκε η δραστηριότητα της οξακιλλίνης, με *in vivo* πειράματα, καθώς οι πενικιλινασο-ανθεκτικές πενικιλίνες είναι θεραπεία εκλογής για τα στελέχη *S. aureus*, λόγω της άριστης φαρμακοκινητικής δράσης τους (σε σχέση με τα γλυκοπεπτιδία) και επιπλέον για το ότι επιλέγουν λιγότερη μικροβιακή αντοχή. Τυχόν καλή δραστηριότητα της οξακιλλίνης θα επέτρεπε τη χρήση της κατά των αντίστοιχων λοιμώξεων. Επίσης, καθώς είναι ευρέως αποδεκτό ότι μέχρι σήμερα, η θεραπεία εκλογής κατά των MRSA λοιμώξεων παραμένει η βανκομυκίνη, η παρούσα μελέτη περιέλαβε πειραματικές λοιμώξεις με απευθείας σύγκριση της οξακιλλίνης με τη βανκομυκίνη.

Ακόμη, μελετήθηκε *in vivo* η δραστηριότητα πολλών αντιβιοτικών τελευταίας εκλογής, ως μονοθεραπείες ή σε συνδυασμούς, για τη θεραπεία εντεροβακτηριακών που παράγουν καρβαπενεμάσες τύπου KPC. Όπως προαναφέρθηκε, τέτοια στελέχη είναι συχνότατα στην Ελλάδα και η κατάλληλη θεραπεία των σοβαρών λοιμώξεων που προκαλούν δεν έχει επαρκώς προσδιοριστεί. Χρησιμοποιήθηκαν η τιγκεκυκλίνη, η ριφαμικίνη, η κολιστίνη, η μεροπενέμη και η γενταμικίνη. Επιλέχθηκαν στελέχη με φαινοτυπική ευαισθησία στη μεροπενέμη, παρά την παραγωγή της καρβαπενεμάσης, τα οποία και είναι πολύ συχνά στην Ελλάδα.

Τέλος, διερευνήθηκε με τα πειραματικά μοντέλα της παρούσας μελέτης, η δραστηριότητα της μεροπενέμης αλλά και η λοιμογόνος δύναμη στελεχών *A. baumannii* που εμφανίζουν ετερογενή έκφραση της αντοχής.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΕ ΣΤΕΛΕΧΗ OS-MRSA

ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Μελετήθηκαν συνολικά με πειραματικές λοιμώξεις 15 στελέχη OS-MRSA, που ήταν μέρος συλλογής από 400 κλινικά στελέχη *Staphylococcus aureus* που απομονώθηκαν από παθολογικά δείγματα ασθενών Κλινικών του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Τα στελέχη αυτά συλλέχθηκαν από τον Νοέμβριο του 2006 έως και τον Ιούλιο του 2007 (πίνακας 3). Στη μελέτη αυτή, επίσης, χρησιμοποιήθηκε σαν στέλεχος ελέγχου το πρότυπο στέλεχος *S. aureus* ATCC 29213.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Χαρακτηριστικά των στελεχών της μελέτης

Isolate	Date of isolation	Ward	Specimen	PVL	OXA MIC (mg/L)	VAN MIC (mg/L)
446	29/12/2006	Outpatient	Pus	+	0.5	0.5
959	04/01/2007	Pediatrics	Trauma	+	0.25	2
970	04/01/2007	Emergency	Pus	+	0.25	1
1117	29/06/2007	Outpatient	Pus	+	0.5	1
1512	09/01/2007	Outpatient	Pus	+	0.125	1
1546	10/01/2007	Pediatrics	Blood	+	0.25	1
2629	19/01/2007	Outpatient	Pus	+	0.25	1
4324	01/02/2007	Hemodialysis	Pus	+	0.25	1
5014	26/07/2007	Urologic	Urine	-	0.5	1
5505	14/05/2007	Orthopedics	Pus	+	1	1
6036	14/11/2006	Pediatrics	Pus	+	0.5	1
6601	19/11/2006	Emergency	Pus	+	0.25	1
7059	25/11/2006	Outpatient	Trauma	+	0.25	1
9131	14/12/2006	Newborn	Trauma	+	0.25	1
9833	18/06/2007	Pathologic	Trauma	+	0.5	1
ATCC29213	-	-	-	-	0.25	1

OXA, oxacillin; VAN, vancomycin

Στα στελέχη αυτά πραγματοποιήθηκαν πειράματα *in vitro* και *in vivo* διερεύνησης των πιθανών μηχανισμών που συμμετέχουν στον φαινότυπο αντοχής, με μεθοδολογίες όπως:

- προσδιορισμός του φαινοτύπου αντοχής τους σε ευρύ φάσμα αντιβιοτικών με τη μέθοδο της διάχυσης των αντιβιοτικών σε άγαρ και με το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK 2
- προσδιορισμός της MIC στην οξακιλλίνη με την μέθοδο της αραιώσης του αντιβιοτικού σε άγαρ και με E-τεστ
- εκτέλεση πειραματικών λοιμώξεων σε επίμυες, που γίνονται ουδετεροπενικά και ακολουθεί μελέτη της αποτελεσματικότητας της θεραπείας με οξακιλλίνη και βανκομυκίνη.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ

Η απομόνωση των συγκεκριμένων στελεχών έγινε σε κατάλληλα κοινά θρεπτικά υλικά, όπως αιματούχο άγαρ, Mueller Hinton άγαρ, Tryptic Soy άγαρ και σε κοινούς θρεπτικούς ζωμούς μετά από επώαση των εμβολιασθέντων θρεπτικών υλικών έγινε σε αερόβιες συνθήκες στους 37⁰ C για 24 ώρες.

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

Η ταυτοποίηση των στελεχών ως *S. aureus* στηρίχθηκε στη μορφολογία των αποικιών, στη χρώση κατά Gram και στον προσδιορισμό των βιοχημικών ιδιοτήτων με το αυτοματοποιημένο σύστημα VITEK 2 (bioMerieux, Marcy l' Etoile, France), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Επίσης, ο προσδιορισμός και η αρχική δοκιμή ευαισθησίας των σταφυλοκοκκικών στελεχών έγινε για διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες με το σύστημα αυτό.

ΈΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Μια πολύ απλή και συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι η μέθοδος δίσκου Kirby-Bauer.

Σε τρυβλία με Muller Hinton άγαρ, επιστρώνουμε με βαμβακοφόρο στυλεό το εναιώρημα του μικροβίου. Τοποθετούμε δίσκους αντιβιοτικών με λαβίδα ή με ειδικό διανεμητή δίσκων και επωάζουμε 18 – 24 ώρες. Τα αντιβιοτικά διαχέονται στο θρεπτικό υλικό και αναστέλλουν την ανάπτυξη του μικροβίου γύρω από το δίσκο, ανάλογα με την ευαισθησία του μικροβίου σε αυτά. Η αναστολή της ανάπτυξης φαίνεται ως ζώνη χωρίς

μικρόβιο, γύρω από το δίσκο. Όσο πιο μεγάλη είναι η ζώνη αναστολής, τόσο πιο ευαίσθητο είναι το μικρόβιο. Υπάρχουν σε πίνακες τα όρια των ζωνών αναστολής, που διαφέρουν ανάλογα με το μικρόβιο και το αντιβιοτικό, και με βάση αυτούς χαρακτηρίζουμε το μικρόβιο ευαίσθητο, μέτρια ευαίσθητο ή ανθεκτικό. Η διάμετρος της ζώνης αναστολής εξαρτάται από διάφορους παράγοντες συμπεριλαμβανομένων των:

- ✓ ποσότητα του αντιβιοτικού που εμπεριέχει ο δίσκος
- ✓ βαθμός ευαισθησίας του βακτηρίου στο αντιβιοτικό
- ✓ φυσικοχημικές ιδιότητες του αντιβιοτικού
- ✓ βάθος (σε mm) του άγαρ στο τρυβλίο
- ✓ συγκέντρωση του βακτηρίου

Όσο η απόσταση από τον δίσκο αυξάνεται, υπάρχει μία λογαριθμική μείωση της συγκέντρωσης του αντιβιοτικού.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΡΑΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΑΓΑΡ

Κατά τη διαδικασία της μεθόδου παρασκευάστηκαν τρυβλία με άγαρ και ενσωματώνουμε αντιβιοτικό σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις (μg/ml ή mg/L). Για κάθε αντιβιοτικό έχουμε πολλά τρυβλία με διαφορετικές συγκεντρώσεις. Εμβολιάζουμε το μικροβιακό εναιώρημα στα τρυβλία και επωάζουμε. Η συγκέντρωση του αντιβιοτικού που αναστέλλει την ορατή ανάπτυξη του μικροβίου είναι η ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (ΕΑΠ ή MIC) του αντιβιοτικού. Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις CLSI οδηγίες (CLSI, 2009).

ΜΕΘΟΔΟΣ E-TEST

Σε μια ταινία πλαστική έχει προστεθεί αντιβιοτικό, που έχει διαβαθμιζόμενη πυκνότητα από τη μία ως την άλλη άκρη της ταινίας. Σχηματίζεται ζώνη αναστολής ελλειπτική, και το σημείο (D) που αυτή τέμνει την ταινία είναι η ΕΑΠ.

Για τα στελέχη των σταφυλοκόκκων προσδιορίστηκε η MIC για τα αντιβιοτικά οξακιλλίνη, βανκομυκίνη και άλλες β-λακτάμες (αμπικιλίνη, αμοξυκιλλίνη/κλαβουλανικό, κεφαμανδόλη, κεφαλεξίνη και ιμιπενέμη) με την χρήση E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden), όπως ορίζεται από τις οδηγίες (NCCLS) και τα ερμηνευτικά

κριτήρια του Ινστιτούτου Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, 2010).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Τον γενετικό χαρακτηρισμό των στελεχών ακολούθησε η διερεύνηση της δραστηριότητας της οξακιλλίνης σε στελέχη OS-MRSA με χαμηλά επίπεδα αντοχής, σε σύγκριση με πληθυσμούς μικροβίων με υψηλότερη αντοχή. Πραγματοποιήθηκε συγκεκριμένο πειραματικό μοντέλο ώστε να μελετηθεί η *in vivo* δράση της οξακιλλίνης παράλληλα με την βανκομυκίνη. Όλες οι μελέτες σε ζώα έχουν εγκριθεί από τη Διεύθυνση Κτηνιατρικής της Περιφέρειας Θεσσαλίας και είναι σύμφωνες με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Σε κάθε πειραματικό μοντέλο χρησιμοποιήθηκαν έξι εβδομάδων θηλυκά Bagg inbred albino c-strain (BALB/c) επίμυες (Harlan, Indianapolis, IN, USA) απαλλαγμένα από συγκεκριμένους παθολογικούς παράγοντες, με βάρος από 23 έως 27g, σε διαφορετικές ομάδες (Hedge *et al.*, 2008). Οι επίμυες καθίστανται ουδετεροπενικοί (ουδετερόφιλα $<100/\text{mm}^3$) με ενέσεις κυκλοφωσφαμίδης ενδοπεριτοναϊκά την τέταρτη ημέρα (150 mg / kg) και την πρώτη ημέρα (100 mg/kg) πριν από τη μόλυνση του μηρού με τα υπό μελέτη στελέχη (Andes *et al.*, 2002, LaPlante *et al.*, 2008). Πραγματοποιήθηκαν λοιμώξεις σε μηρό για κάθε ένα από τα στελέχη, μέσω διαμόλυνσης με ένεση 0.1 ml του βακτηριακού εναιωρήματος συγκέντρωσης $7 \log_{10}$ CFU/ml. Οι λοιμώξεις έγιναν εις τριπλούν για δεκαεννέα ευαίσθητα στην οξακιλλίνη στελέχη (OS-MRSA) που φέρουν το *mecA* γονίδιο, καθώς και για τα στελέχη ελέγχου (control strains) ATCC 29213, SA 1610 και SA 7263. Αφού έγινε η διαμόλυνση των ποντικών, υποβλήθηκαν σε θεραπεία ανά ομάδες είτε με οξακιλλίνη 500 mg/kg/12h ενδοπεριτοναϊκά, είτε με βανκομυκίνη 180 mg/kg/12h υποδόρια, και κάποια παρέμειναν χωρίς θεραπεία για πάνω από 24h. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε επίσης εις τριπλούν με τα στελέχη αυτά αλλά χωρίς θεραπεία με οξακιλλίνη ή βανκομυκίνη, για να χρησιμοποιηθούν ως controls. Τα ζώα υποβλήθηκαν σε ευθανασία μετά την 24-η θεραπεία. Ακολούθως, οι μύες των μηρών αφαιρέθηκαν, ομογενοποιήθηκαν, έγιναν επανειλημμένες αραιώσεις αυτών (1/100, 1/10000) και τέλος επιστρώθηκε ποσότητα 0.1 ml κάθε αραιώσης σε τρυβλία με Mueller-Hinton άγαρ ώστε να προσδιοριστούν οι

αποικίες μικροβίων που επιβίωσαν της θεραπείας. Ο τίτλος μικροβιακών αποικιών που προέκυψε εκφράστηκε ως $\log_{10}\text{CFU}/\mu\text{ύό μηρού}$. Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ένα t-test. Για όλα τα πειράματα η P τιμή ≤ 0.05 θεωρήθηκε ενδεικτική της στατιστικής σημαντικότητας. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Minitab (version 13.31).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΕ ΣΤΕΛΕΧΗ *A. BAUMANNII*

ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ

Χρησιμοποιήθηκαν 5 κλινικά στελέχη *A. baumannii* ευάισθητα στην μεροπενέμη αλλά με φαινοτυπική ετερογένεια και οι αντίστοιχοι 5 ετερογενείς στην μεροπενέμη υποπληθυσμοί (αποικίες που είχαν αναπτυχθεί στην υψηλότερη συγκέντρωση μεροπενέμης κατά την πληθυσμιακή ανάλυση), καθώς και ένα πρότυπο στέλεχος *Escherichia coli* ATCC 25922 σαν στέλεχος ελέγχου. Σε όλα τα στελέχη ελέγχθηκε αρχικά η ευαισθησία τους στα αντιβιοτικά, η γενετική τους σχέση με ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο πεδίο και η ύπαρξη σε αυτά γονιδίων που κωδικοποιούν για τις γνωστές καρβαπενεμάσες τάξεως B και D καθώς και για το ενδογενές γονίδιο *bla_{OXA-51-like}*. Επίσης, ελέγχθηκε η εμφάνιση ετερογένειας και η διατήρηση της αντοχής των ετερογενών πληθυσμών στη μεροπενέμη με πληθυσμιακές αναλύσεις και το προφίλ ανάπτυξης κάθε στελέχους με καμπύλες ανάπτυξης (growth curves).

Στα *in vitro* πειράματα, ανευρέθηκαν τρεις διαφορετικοί γονότυποι μεταξύ των στελεχών, με τον καθένα ετερογενή υποπληθυσμό να ανήκει στον ίδιο γονότυπο με το αντίστοιχο κλινικό στέλεχος. Στον μοριακό έλεγχο με PCR βρέθηκε μόνο το ενδογενές γονίδιο χαμηλής αντοχής στις καρβαπενεμές *bla_{OXA-51-like}*. Στις καμπύλες ανάπτυξης δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ετερογενών υποπληθυσμών και των αντίστοιχων κλινικών στελεχών.

Τα μικροβιολογικά χαρακτηριστικά των στελεχών που μελετήθηκαν, φαίνονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά των στελεχών *A. baumannii* που μελετήθηκαν.

Isolate	Ward	Specimen	^a Susceptibility status to antimicrobials	PFGE	Agar dilution MEM MIC (mg/L)	Highest MEM concentration of growth in population analyses (mg/L)	^b Agar dilution MIC (mg/L) of MEM grown subpopulations
Ab1	ORL	Blood	SAM, CIP, COL, MEM	I	4	16	32
Ab2	Neurosurgery	Blood	GEN, TOB, CIP, SAM, MEM, COL	II	1	8	1
Ab3	Medicine	Urine	GEN, TOB, SAM, MEM, COL	I	2	8	1
Ab4	Pulmonary	Sputum	GEN, SAM, MEM, COL	I	4	16	2
Ab5	Medicine	CSF	GEN, TOB, SAM, MEM, COL	III	2	32	> 32

^a CIP, ciprofloxacin; COL, colistin; GEN, gentamicin; MEM, meropenem; SAM, ampicillin/sulbactam; TOB, tobramycin.

^b Οι MICs αυτές μετρήθηκαν μετά από 7 ανακαλλιέργειες χωρίς την παρουσία αντιβιοτικού.

Πιο αναλυτικά, οι ετερογενείς αποικίες που αναπτύχθηκαν στην υψηλότερη συγκέντρωση μεροπενέμης ανακαλλιεργήθηκαν διαδοχικά για 7 ημέρες. Μετά την 7^η ανακαλλιέργεια προσδιορίστηκαν οι MICs των ετερογενών αποικιών: σε 2 στελέχη παρέμειναν υψηλές MICs, οπότε τα στελέχη προσδιορίζονται πλέον ως αληθώς ετεροανθεκτικά, ενώ 3 στελέχη επέστρεψαν σε χαμηλές MICs, παρόμοιες με των αρχικών κλινικών στελεχών και προσδιορίζονται ως εμμένοντες πληθυσμοί (persisters).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Σε κάθε πειραματικό μοντέλο χρησιμοποιήθηκαν έξι εβδομάδων θηλυκά Bagg inbred albino c-strain (BALB/c) επίμυες (Harlan, Indianapolis, IN, USA) απαλλαγμένα από συγκεκριμένους παθολογικούς παράγοντες, με βάρος από 23 έως 27g, σε διαφορετικές ομάδες (*Hedge et al., 2008*). Οι επίμυες στεγάζονταν σε χώρο με ελεγχόμενο περιβάλλον φωτισμού (12 ώρες μέρα-12 ώρες νύκτα) και θερμοκρασίας και στα κλουβιά τους υπήρχε νερό και φαγητό κατά βούληση (*ad libidum*). Οι επίμυες καθίστανται ουδετεροπενικοί (ουδετερόφιλα $<100/\text{mm}^3$) με ενέσεις κυκλοφωσφαμίδης ενδοπεριτοναϊκά την τέταρτη ημέρα (150 mg / kg) και την πρώτη ημέρα (100 mg/kg) πριν από τη μόλυνση του μηρού με τα υπό μελέτη στελέχη (*Andes et al., 2002, LaPlante et al., 2008*). Οι επίμυες αναισθητοποιήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή ένεση 30μl of ketamine/xylazine (5:1). Πραγματοποιήθηκαν λοιμώξεις σε μηρό για κάθε ένα από τα στελέχη, μέσω διαμόλυνσης με ένεση 0.1 ml του βακτηριακού εναιωρήματος συγκέντρωσης $7 \log_{10}$ CFU/ml. Οι λοιμώξεις έγιναν εις τριπλούν για όλα τα στελέχη. Αφού έγινε η διαμόλυνση των ποντικιών, υποβλήθηκαν σε θεραπεία ανά ομάδες με μεροπενέμη 20 mg/kg/8h (*Ko et al., 2004*), 100 mg/kg/12h (*Morinaga et al., 2008*) και 400mg/kg/8h (*Tam et al., 2009*) ενδοπεριτοναϊκά και αντίστοιχος αριθμός ζώων παρέμειναν χωρίς θεραπεία για 24h. Ακολούθως, οι μύες των μηρών αφαιρέθηκαν, ομογενοποιήθηκαν, έγιναν επανειλημμένες αραιώσεις αυτών (1/100, 1/10000) και τέλος επιστρώθηκε ποσότητα 0.1ml κάθε αραιώσης σε τρυβλία με Mueller-Hinton άγαρ ώστε να προσδιοριστούν οι αποικίες. Ο τίτλος του μηρού που προέκυψε εκφράστηκε ως \log_{10} CFU/μυό μηρού. Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ένα t-test. Για όλα τα πειράματα η P τιμή ≤ 0.05 θεωρήθηκε ενδεικτική της στατιστικής σημαντικότητας. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Minitab (version 13.31).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΕ ΣΤΕΛΕΧΗ *K. PNEUMONIAE* ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΥΝ ΚΡC ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΑΣΗ

ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ

Στα *in vivo* αυτά πειράματα έγινε έλεγχος της δραστηριότητας των τιγκεκυκλίνης (TIG), κολιστίνης (COL), γενταμικίνης (GEN), ριφαμικίνης (RIF) και μεροπενέμης (MER) σε μονοθεραπείες και σε συνδυασμούς τους με τιγκεκυκλίνη έναντι 8 κλινικών στελεχών *Klebsiella pneumoniae* και ενός (1) στελέχους *Escherichia coli* που παράγουν καρβαπενεμάσες τύπου ΚΡC (KPC-producing). Επίσης χρησιμοποιήθηκε σαν στέλεχος ελέγχου το ATCC 25922 *E. coli*. Τα στελέχη αυτά επιλέχθηκαν γιατί εμφάνιζαν χαμηλές MIC για την μεροπενέμη (≤ 4 $\mu\text{g/ml}$). Η ευαισθησία τους στα αντιβιοτικά είχε ελεγχθεί με την μέθοδο διάλυσης σε άγαρ (Reference CLSI 2010).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Σε κάθε πειραματικό μοντέλο χρησιμοποιήθηκαν έξι εβδομάδων θηλυκά Bagg inbred albino c-strain (BALB/c) επίμυες (Harlan, Indianapolis, IN, USA) απαλλαγμένα από συγκεκριμένους παθολογικούς παράγοντες, με βάρος από 23 έως 27g, σε διαφορετικές ομάδες (Hedge *et al.*, 2008). Οι επίμυες στεγάζονταν σε χώρο με ελεγχόμενο περιβάλλον φωτισμού (12 ώρες μέρα-12 ώρες νύκτα) και θερμοκρασίας και στα κλουβιά τους υπήρχε νερό και φαγητό κατά βούληση (*ad libidum*). Οι επίμυες καθίστανται ουδετεροπενικά (ουδετερόφιλα $<100/\text{mm}^3$) με ενέσεις κυκλοφωσφαμίδης ενδοπεριτοναϊκά την τέταρτη ημέρα (150 mg / kg) και την πρώτη ημέρα (100 mg/kg) πριν από τη μόλυνση του μηρού με τα υπό μελέτη στελέχη (Andes *et al.*, 2002, LaPlante *et al.*, 2008). Οι επίμυες αναισθητοποιήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή ένεση 30μl ketamine/xylazine (5:1). Πραγματοποιήθηκαν λοιμώξεις σε μηρό για κάθε ένα από τα στελέχη, μέσω διαμόλυνσης με ένεση 0.1 ml του βακτηριακού εναιωρήματος συγκέντρωσης 7 log₁₀ CFU/ml. Οι λοιμώξεις έγιναν εις τριπλούν για όλα τα στελέχη συμπεριλαμβανομένου και του στελέχους ελέγχου. Αφού έγινε η διαμόλυνση των ποντικών, υποβλήθηκαν σε υποδόρια θεραπεία ανά ομάδες με τιγκεκυκλίνη 50 mg/kg/24h, κολιστίνη 40 mg/kg/8h, γενταμικίνη 5 mg/kg/12h και μεροπενέμη 200 mg/kg/8h και ενδοπεριτοναϊκά ριφαμικίνη 25 mg/kg/6h (Barthold *et al.*, 2010, Pachon-Ibanez *et al.*, 2010, Lenz *et al.*, 2007) και αντίστοιχος αριθμός ζώων παρέμειναν χωρίς

θεραπεία για 24h. Ακολούθως, οι μύες των μηρών αφαιρέθηκαν, ομογενοποιήθηκαν, έγιναν επανειλημμένες αραιώσεις αυτών (1/100, 1/10000) και τέλος επιστρώθηκε ποσότητα 0.1ml κάθε αραιώσης σε τρυβλία με Mueller-Hinton άγαρ ώστε να προσδιοριστούν οι αποικίες. Ο τίτλος του μηρού που προέκυψε εκφράστηκε ως \log_{10} CFU/μυ μηρού. Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ένα t-test. Για όλα τα πειράματα, ένα σχήμα αντιβιοτικού (είτε μονοθεραπείας είτε συνδυασμού) θεωρούνταν αποτελεσματικό όταν υπήρχε στατιστική σημαντική μείωση των αποικιών που μετρήθηκαν (η P τιμή ≤ 0.05 θεωρήθηκε ενδεικτική της στατιστικής σημαντικότητας). Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Minitab (version 13.31).

Ως συνέργεια των αντιβιοτικών που εμφανίστηκε στις πειραματικές λοιμώξεις στους επίμυες ορίστηκε η μεγαλύτερη λογαριθμική μείωση των αποικιών από τον συνδυασμό αντιβιοτικών από ότι οι αντίστοιχες μονοθεραπείες. Ως ανταγωνισμός ορίστηκε η μεγαλύτερη λογαριθμική μείωση των αποικιών από τις μονοθεραπείες από ότι προκάλεσε ο αντίστοιχος συνδυασμός τους (Rishi et al., 2011).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΜΕ OS-MRSA

Στις πειραματικές λοιμώξεις σε επίμυες, πραγματοποιήθηκε συγκεκριμένο πειραματικό μοντέλο ώστε να μελετηθεί η *in vivo* δράση της οξακιλλίνης παράλληλα με την βανκομυκίνη. Παρατηρήθηκε ότι η θεραπευτική ικανότητα της οξακιλλίνης, που αντικατοπτρίζεται σε αποικίες στελεχών που επιβιώνουν υπό θεραπεία, σε σύγκριση με controls χωρίς θεραπεία, ήταν σημαντική στα 10 από τα 15 OS-MRSA στελέχη ($P < 0.05$), ενώ η θεραπευτική ικανότητα της βανκομυκίνης, σε σύγκριση με controls χωρίς θεραπεία, ήταν αποτελεσματική για τα 12 στελέχη. Είναι ενδιαφέρον ότι, σε λοιμώξεις με 3 OS-MRSA στελέχη, στις οποίες η βανκομυκίνη δεν ήταν αποτελεσματική, η θεραπευτική ικανότητα της δικλοξακιλλίνης ήταν σημαντική. Επίσης, η θεραπευτική ικανότητα της οξακιλλίνης ήταν συγκρίσιμη με εκείνη της βανκομυκίνης για 8 από τα στελέχη. Συμπερασματικά, η θετική ανταπόκριση στη θεραπεία με δικλοξακιλλίνη σε ένα σημαντικό μέρος των OS-MRSA στελεχών ενδέχεται να έχει σημαντικές επιπτώσεις για τη θεραπεία των αντίστοιχων λοιμώξεων και να επιτρέψει τη χρήση πενικιλινών αντί της βανκομυκίνης.

Τα παραπάνω αποτελέσματα (**πίνακας 5 και 6**) υποδεικνύουν ότι κάποια από αυτά τα στελέχη πιθανόν απαντούν στην οξακιλλίνη με τρόπο συγκρίσιμο με τη βανκομυκίνη και πιθανώς να έχουν σημαντικές θεραπευτικές εφαρμογές επί λοιμώξεων από στελέχη OS-MRSA, που θα μπορούσαν ίσως να αντιμετωπιστούν με β-λακτάμες. Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι οι αποικίες που αναπτύχθηκαν από τους επιμολυσμένους μηρούς μελετήθηκαν εκ νέου και βρέθηκε ότι έχουν τον ίδιο φαινότυπο αντοχής στα αντιβιοτικά και φέρουν και εκφράζουν το *mecA* γονίδιο, κάτι που αποκλείει την πιθανότητα επιμόλυνσης.

Πίνακας 5. Αποτελέσματα των πειραματικών λοιμώξεων Ι

Isolate	Δlog CFUs/thigh ± SD Untreated controls vs. OXA treatment (P value)*	Δlog CFUs/thigh ± SD Untreated controls vs. VAN treatment (P value)	Δlog CFUs/thigh ± SD VAN vs. OXA treatment (P value)
446	1.416±0.58 (0.016)	1.273±0.85 (0.058)	-0.143±0.917 (0.776)
959	0.643±1.69 (0.502)	4.012±1.422 (0.011)	3.369±1.126 (0.009)
970	2.635±0.573 (0.003)	2.886±1.970 (0.061)	0.251±1.962 (0.815)
1117	1.126±0.774 (0.062)	1.572±0.779 (0.027)	0.446±0.475 (0.157)
1512	2.356±0.389 (0.001)	4.369±0.609 (0.001)	2.438±0.743 (0.007)
1546	0.765±0.956 (0.208)	4.972±1.382 (0.006)	4.207±1.373 (0.009)
2629	1.932±1.289 (0.058)	4.858±0.187 (0.0001)	2.927±1.148 (0.015)
4324	4.750±0.172 (0.0001)	5.248±0.324 (0.0001)	0.498±0.378 (0.078)
5014	0.402±1.018 (0.488)	3.260±0.472 (0.001)	2.858±1.319 (0.023)
5505	3.731±0.947 (0.004)	4.232±0.617 (0.065)	0.012±0.546 (0.981)
6036	2.063±0.263 (0.001)	3.117±0.261 (0.0001)	1.054±0.403 (0.014)
6601	1.452±0.58 (0.015)	4.647±1.038 (0.003)	3.195±0.874 (0.005)
7059	3.952±1.926 (0.026)	5.676±0.272 (0.0001)	1.72±2.16 (0.208)
9131	5.272±0.354 (0.0001)	5.406±0.426 (0.0001)	0.134±0.2 (0.273)
9833	2.757±1.5 (0.035)	3.772±1.65 (0.02)	1.01±2.5 (0.476)
ATCC 29213	5.111±0.627 (0.001)	4.955±0,494 (0.001)	-0.156±0.983 (0.771)
7263 (high-level MRSA control)	0.413±0.179 (0.019)	5.338±0,366 (0.0001)	4.925±0.379 (0.0001)

P value < 0.05 δηλώνει σημαντική διαφορά στις αποικίες που μετρήθηκαν από μολυσμένους μηρούς
OXA, dicloxacillin; VAN, vancomycin

Πίνακας 6. Αποτελέσματα των πειραματικών λοιμώξεων II

Isolate	Avg log CFU ± SD per thigh muscle Untreated controls	Avg log CFU ± SD per thigh muscle OXA treatment	P value OXA treatment efficiency	Avg log CFU ± SD per thigh muscle VAN treatment	P value VAN treatment efficiency	P value OXA vs. VAN activity in mice thigh infections
446	7.27±0.44	5.86±0.43	P= 0.016	6.31±0.37	P= 0.058	P= 0.776
959	7.57±0.34	6.93±1.9	P= 0.502	3.56±1.75	P= 0.011	P=0.009
970	8.66±0.15	6.03±0.60	P= 0.037	5.78±1.95	P= 0.021	P = 0.81
1117	7.88±0.48	6.75±0.43	P= 0.062	6.31±0.37	P= 0.003	P= 0.157
1512	8.66±0.15	6.73±0.56	P= 0.034	4.29±0.48	P= 0.007	P= 0.007
1546	7.55±0.31	6.79±0.82	P= 0.208	3.99±0.52	P= 0.006	P= 0.009
2629	8.26±0.72	6.33±1.14	P= 0.058	3.40±0.43	P< 0.001	P= 0.015
4324	8.74±0.16	4.07±0.01	P= 0.001	3.58±0.37	P< 0.001	P= 0.078
5014	7.25±0.44	6.85±0.82	P= 0.488	3.99±0.52	P= 0.001	P= 0.023
5505	7.71±0.42	3.97±1.08	P= 0.04	3.51±1.10	P< 0.001	P= 0.981
6036	8.77±0.05	6.71±0.26	P= 0.033	5.66±0.26	P= 0.025	P = 0.014
6601	8.81±0.36	7.36±0.30	P= 0.015	4.17±0.84	P= 0.003	P= 0.005
7059	8.92±0.21	4.97±1.91	P= 0.026	3.25±0.25	P< 0.001	P = 0.21
9131	8.72±0.05	3.45±0.35	P= 0.001	3.32±0.39	P< 0.001	P= 0.27
9833	8.92±0.21	6.17±1.45	P= 0.035	5.15±1.64	P= 0.020	P= 0.48
ATCC 29213	8.72±0.05	3.61±0.63	P= 0.001	3.77±0.54	P< 0.001	P= 0.77
7263 (high-level MRSA control)	8.64±0.09	8.22±0.17	P= 0.33	3.30±0.45	P< 0.001	P< 0.001

OXA, oxacillin; VAN, vancomycin

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΜΕ *A. BAUMANNII*

Επίμυες που δεν έλαβαν θεραπεία: Και οι 15 επίμυες που μολύνθηκαν από τα 5 κλινικά στελέχη (εις τριπλούν πειράματα ανά μικρόβιο) και δεν έλαβαν θεραπεία απεβίωσαν πριν την λήξη του 24ώρου. Οι έξι (6) επίμυες που μολύνθηκαν από τους δύο (2) εμμένοντες στην μεροπενέμη υποπληθυσμούς (Ab3 and Ab4) επίσης απεβίωσαν σε λιγότερο από 24 ώρες, ενώ οι 9 επίμυες που μολύνθηκαν από 1 εμμένοντα και 2 ετερογενείς υποπληθυσμούς (Ab1h, Ab2h, Ab5h) επιβίωσαν στο 24ωρο. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τα κλινικά στελέχη έχουν μεγαλύτερη λοιμογόνο δύναμη σε σύγκριση με τους ετερογενείς υποπληθυσμούς.

Επίμυες που έλαβαν θεραπεία με *20 mg/kg μεροπενέμης*. Με την δόση αυτή, 8 στους 15 επίμυες που μολύνθηκαν με τα κλινικά στελέχη και 1 στα 15 από τους ετερογενείς πληθυσμούς πέθαναν σε λιγότερο από τις 24 ώρες. Αυτό επίσης υποδεικνύει την μεγαλύτερη λοιμογόνο δύναμη των κλινικών στελεχών. Καμία σημαντική μείωση των αποικιών που φύτρωσαν δεν παρατηρήθηκε για όλους τους 30 επίμυες που έλαβαν την θεραπεία των 20 mg/kg σε σύγκριση με αυτούς χωρίς θεραπεία ($P>0.05$).

Επίμυες που έλαβαν θεραπεία με *100 mg/kg μεροπενέμης*. Το αποτέλεσμα της θεραπείας με 100 mg/kg μεροπενέμης ήταν το ίδιο τόσο για τα πατρικά στελέχη (13 στα 15) όσο και για τους ετερογενείς υποπληθυσμούς (14 στα 15), επιβίωσαν του 24ώρου παρά την μεγαλύτερη MIC που απαντήθηκε στα τελευταία. Καμία σημαντική μείωση των αποικιών δεν παρατηρήθηκε σε όλους τους 30 επίμυες που έλαβαν την θεραπεία των 100 mg/kg σε σύγκριση με αυτά που δεν έλαβαν θεραπεία ($P>0.05$).

Επίμυες που έλαβαν θεραπεία με *400 mg/kg μεροπενέμης*. Και οι 30 επίμυες που μολύνθηκαν από τα πατρικά στελέχη και τους ετερογενείς πληθυσμούς τους επιβίωσαν με τη θεραπεία που έλαβαν. Σημαντική μείωση ($P<0.05$) των αποικιών παρατηρήθηκε σε 12 από τους 15 επίμυες που μολύνθηκαν με 4 κλινικά στελέχη και σε όλους τους 15 επίμυες που μολύνθηκαν με τους ετερογενείς πληθυσμούς τους, σε σύγκριση με αυτούς που δεν έλαβαν θεραπεία. Για τους τρεις επίμυες που μολύνθηκαν με το κλινικό στέλεχος Ab1, δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική μείωση των αποικιών σε σύγκριση με αυτούς που δεν έλαβαν θεραπεία παρόλο που ήταν ευαίσθητο στη μεροπενέμη, υποδεικνύοντας

την υψηλή αναποτελεσματικότητά της σε σύγκριση με τον αντίστοιχο ετερογενή υποπληθυσμό.

Σε αντίθεση με τα στελέχη *A. baumannii* και οι 12 επίμυες που επιμολύνθηκαν με το στέλεχος *E. coli* ATCC 25922 επιβίωσαν σε όλα τα δοσολογικά σχήματα θεραπείας αλλά και χωρίς θεραπεία.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΜΕ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΡC

Τα στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάσες και χρησιμοποιήθηκαν στην έρευνα μας, εμφάνισαν σχετικά χαμηλή MIC στην μεροπενέμη (1-4 µg/ml) και φαινοτυπική ευαισθησία στις COL, GEN και MER. Ήταν επίσης ανθεκτικά στην RIF (MICs > 32 µg/ml). Και τα 9 στελέχη βρέθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και με προσδιορισμό της αλληλουχίας των γονιδίων (sequencing) να φέρουν το γονίδιο *bla_{KPC-2}*.

Η συμπεριφορά των αντιβιοτικών σαν μονοθεραπείες καθώς και οι συνδυασμοί της TIG εναντίον των ζώων χωρίς θεραπεία παρουσιάζονται στον Πίνακα 7. Η μονοθεραπεία της RIF είχε την καλύτερη απόδοση τόσο στις 24h (88.9% αποτελεσματικότητα) και στις 48h (100%), ακολουθούμενη από την TIG στις 24h (77.8%) και GEN στις 48h (88.9%). Η COL και η MER σαν μονοθεραπείες ήταν αρκετά αναποτελεσματικές, θεραπεύοντας επιτυχώς όχι πάνω από το 33.3% των επίμυων στις 24h και 48h.

Όσον αφορά τους συνδυασμούς της TIG έναντι των ζώων χωρίς θεραπεία, οι συνδυασμοί TIG+GEN και TIG+RIF ήταν οι πιο αποτελεσματικοί (100%) ακολουθούμενοι από τους TIG+MER (88.9%) και TIG+COL (77.8%) στις 24h. Οι συνδυασμοί των TIG+GEN και TIG+RIF κράτησαν την αποτελεσματικότητά τους και στις 48h (100%) ενώ οι TIG+COL και TIG+MER στις 48h εμφάνισαν μερική μείωση της αποτελεσματικότητάς τους (66.7%). Ακόμα, οι συνδυασμοί των TIG+GEN και TIG+RIF επέφεραν τις μεγαλύτερες μειώσεις αποικιών (Δlog) σε σύγκριση με τους άλλους 2 συνδυασμούς που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 7).

Η σύγκριση της αποτελεσματικότητας των μονοθεραπειών έναντι των άλλων μονοθεραπειών στις 24h και 48h θεραπείας παρουσιάζονται στον Πίνακα 8. Όταν συγκρίνουμε τις μονοθεραπείες μεταξύ τους, η TIG εμφάνισε την μεγαλύτερη δραστηριότητα, ήταν υπερέχων έναντι της COL (πιο αποτελεσματική σε 7 στελέχη, 77.8%), της GEN (66.7%) και της MER (66.7%) στις 24 και 48h. Ακόμα, η TIG εμφάνισε ισότιμη αποδοτικότητα με την RIF στις 24h αλλά ήταν ανώτερη της RIF στις 48h. Η RIF ήταν αποτελεσματικότερη των COL, GEN και MER στις 24h (88.9% vs. COL, MER και 66.7% vs. GEN), αλλά στις 48h έχανε μέρος της δραστηριότητας της αν και παρέμενε η πιο αποδοτική από τα άλλα αντιβιοτικά, (44.4% vs. COL, 66.7% vs. MER και 33.3% vs. GEN) (Πίνακας 8).

Η σύγκριση της αποτελεσματικότητας των συνδυασμών της TIG έναντι των μονοθεραπειών στις 24h και 48h θεραπείας παρουσιάζεται στον Πίνακα 9. Εν συντομία, η προσθήκη της COL στην TIG δεν βελτίωσε την δραστηριότητα της TIG, η προσθήκη της GEN στην TIG βελτίωσε την αποδοτικότητα της TIG στα 33.3% (στις 24h) και 44.4% (48h) των στελεχών και ο συνδυασμός TIG+RIF ήταν ανώτερος της TIG στο 44.5% (24h) και 66.7% (48h) των στελεχών. Η προσθήκη της MER στην TIG όχι μόνο δεν βελτίωσε την αποτελεσματικότητα της TIG στα περισσότερα στελέχη, αλλά μείωσε και την αποδοτικότητα της στο 22.2% των στελεχών τόσο στις 24h όσο και στις 48h. Ακόμα, η COL και η MER, οι οποίες ήταν αναποτελεσματικές σαν μονοθεραπείες, απέδωσαν σχετικά καλά όταν προστέθηκαν στην TIG. Είναι επίσης ενδιαφέρον να αναφερθεί ότι η GEN και η RIF που ήταν αποτελεσματικές σαν μονοθεραπείες, εμφάνισαν σαφώς βελτιωμένη απόδοση με την προσθήκη της TIG τόσο στις 24h όσο και στις 48h.

Στον Πίνακα 10 συγκρίνουμε την αποτελεσματικότητα των συνδυασμών της TIG μεταξύ τους μετά από 24h και 48h θεραπείας. Είναι εμφανές ότι οι συνδυασμοί των TIG+GEN και TIG+RIF είναι καθαρά υπερέχοντες έναντι των άλλων δύο συνδυασμών (TIG+COL και TIG+MER) στις 24h και 48h. Δεν υπάρχει διαφορά στην δραστηριότητα μεταξύ των δύο πιο αποτελεσματικών συνδυασμών (TIG+GEN vs. TIG+RIF). Επίσης, δεν υπάρχει διαφορά στην δραστηριότητα μεταξύ των δύο λιγότερο αποδοτικών συνδυασμών (TIG+COL vs. TIG+MER) στις 24h και 48h.

Πίνακας 7. Η συμπεριφορά των αντιβιοτικών σαν μονοθεραπείες καθώς και οι συνδυασμοί της TIG εναντίον των ζώων χωρίς θεραπεία

ISOLATE	T		C		G		M		R		T+C		T+G		T+M		T+R	
	vs. Untreated		vs. Untreated		vs. Untreated		vs. Untreated		vs. Untreated		vs. Untreated		vs. Untreated		vs. Untreated		vs. Untreated	
	Δlog	P value	Δlog	P value	Δlog	P value	Δlog	P value	Δlog	P value	Δlog	P value	Δlog	P value	Δlog	P value	Δlog	P value
24h treatment																		
K 1/4089 ^a	0.16	0.644	-0.001	0.990	-0.05	0.590	0.02	0.558	-2.41	0.002	-0.16	0.071	-1.87	0.003	-1.36	0.004	-4.81	<0.001
K 2/4179	-0.24	0.137	-0.11	0.068	-0.39	0.256	-0.24	0.137	-2.25	<0.001	-3.14	0.023	-4.42	0.007	-1.81	0.077	-3.87	0.007
K 3/3268	-2.51	0.032	0.85	0.002	-1.51	0.002	-0.15	0.182	-2.55	0.002	-2.75	0.109	-4.72	0.004	-1.38	0.004	-4.54	<0.001
K4/3712	-5.23	<0.001	0.41	0.414	-1.38	0.046	-0.60	0.080	-2.66	0.002	-3.45	0.001	-4.20	<0.001	-2.03	0.002	-5.84	<0.001
K5/2458	-2.98	0.003	-0.52	0.052	-1.02	<0.001	-1.33	0.003	-3.03	0.001	-3.80	0.003	-4.86	<0.001	-3.56	0.001	-5.17	<0.001
K6/3189	-5.48	<0.001	-1.11	0.015	-1.36	0.019	-1.12	0.003	-3.48	<0.001	-4.74	0.001	-5.86	<0.001	-4.87	<0.001	-5.71	<0.001
K7/2868	-2.62	0.006	-1.47	0.023	-0.88	0.112	-0.27	0.341	-0.98	0.143	-2.38	0.025	-3.09	<0.001	-2.68	<0.001	-3.45	0.008
K8/3342	-1.55	0.006	-0.44	0.184	-1.96	0.004	-0.84	0.112	-1.55	0.011	-1.04	0.001	-1.90	0.027	-1.27	0.038	-4.20	<0.001
E1/1098	-2.60	0.001	0.12	0.588	-1.52	0.029	-1.77	0.004	-2.44	0.004	-3.11	0.015	-2.52	0.005	-2.67	0.029	-3.10	<0.001
ATCC25922	-2.37	0.003	-0.62	0.394	-0.77	0.305	-4.15	0.001	-1.63	0.004	-4.05	0.015	-5.04	<0.001	-6.05	<0.001	-4.81	<0.001
48h treatment																		
K 1/4089 ^a	0.26	-0.844	-0.10	0.224	-0.24	0.558	-0.67	0.053	-2.10	0.035	-0.18	0.275	-4.28	0.003	-0.11	0.105	-4.47	<0.001
K 2/4179	0.10	0.233	-0.79	0.262	-0.87	0.003	-0.15	0.195	-1.60	0.027	-3.13	0.018	-4.58	0.014	-0.98	0.08	-5.60	<0.001
K 3/3268	-3.70	<0.001	-0.76	0.182	-1.15	0.001	-0.58	0.337	-1.75	0.014	-1.90	0.169	-3.58	0.022	-3.38	<0.001	-3.76	0.001
K4/3712	-5.54	<0.001	-5.22	<0.001	-3.02	0.001	0.01	0.913	-2.27	0.014	-6.10	<0.001	-7.08	<0.001	-5.91	0.001	-7.11	<0.001
K5/2458	-5.67	0.002	-1.67	0.026	-1.90	0.004	-1.24	<0.001	-3.90	0.002	-5.89	0.001	-6.77	<0.001	-5.7	<0.001	-6.19	<0.001
K6/3189	-3.94	<0.001	-0.21	0.495	-2.90	0.028	-1.37	0.011	-3.76	0.002	-4.09	0.015	-5.65	<0.001	-2.7	<0.001	-6.49	<0.001
K7/2868	-2.96	0.010	-2.18	0.014	-2.72	0.036	-0.23	0.161	-2.78	0.003	-2.31	0.015	-4.62	<0.001	-1.44	0.025	-4.66	<0.001
K8/3342	-0.24	0.054	-0.91	0.266	-2.77	<0.001	-0.52	0.217	-3.22	0.002	-1.22	0.015	-2.51	0.003	-1.54	0.058	-3.98	0.002
E1/1098	-4.57	0.008	0.27	0.399	-1.86	0.027	-2.12	0.007	-4.55	<0.001	-0.68	0.457	-4.10	0.010	-3.95	0.001	-5.16	<0.001
ATCC25922	-3.95	0.002	-0.99	0.029	-1.40	0.121	-3.85	<0.001	-2.80	0.024	-5.56	0.002	-6.27	<0.001	-6.23	<0.001	-6.00	<0.001

^aK, *K. pneumoniae*; E, *E. coli*; T, tigecycline; C, colistin; G, gentamicin; M, meropenem; R, rifampicin

^bP value <0.05 δηλώνει σημαντική διαφορά στις αποικίες που μετρήθηκαν από μολυσμένους μηρούς

Πίνακας 8. Η σύγκριση της αποτελεσματικότητας των μονοθεραπειών έναντι των άλλων μονοθεραπειών στις 24h και 48h θεραπείας

ISOLATE	T vs. C		T vs. G		T vs. M		T vs. R		C vs. G		C vs. M		C vs. R		G vs. M		G vs. R		M vs. R	
	Δlog	P value	Δlog	P value	Δlog	P value	Δlog	P value	Δlog	P value	Δlog	P value	Δlog	P value	Δlog	P value	Δlog	P value	Δlog	P value
24h treatment																				
K 1/4089 ^a	0.14	0.723	0.19	0.070	0.11	0.746	1.55	0.023	0.05	0.451	-0.02	0.638	2.41	0.001	-0.07	0.426	2.36	0.001	2.43	0.001
K 2/4179	-0.10	0.262	0.24	0.627	0.04	0.423	1.06	0.005	0.28	0.379	0.07	0.246	2.13	<0.001	-0.20	0.546	1.86	0.009	2.06	0.001
K 3/3268	-3.31	0.025	-2.12	0.048	-2.31	0.049	-0.27	0.126	2.36	<0.001	1.00	<0.001	3.40	0.001	-1.36	0.002	1.04	0.066	2.40	0.002
K4/3712	-4.56	<0.001	-3.57	0.010	-3.92	0.001	-2.16	0.002	1.79	0.010	1.04	0.034	3.07	0.004	-0.79	0.070	1.28	0.090	2.07	0.007
K5/2458	-2.46	0.001	-1.95	0.008	-1.65	0.003	0.05	0.90	0.50	0.055	0.80	0.006	2.51	0.002	0.30	0.140	2.00	0.001	1.70	0.010
K6/3189	-4.37	<0.001	-4.12	0.001	-4.36	0.001	-1.99	0.001	0.25	0.071	0.01	0.977	2.37	0.001	-0.24	0.580	2.12	0.004	2.36	0.002
K7/2868	-2.25	0.017	-0.51	0.487	-1.58	0.017	-1.85	0.002	1.94	0.021	1.17	0.072	2.44	0.022	-0.82	0.247	2.19	0.008	0.47	0.362
K8/3342	-1.70	0.022	-1.22	0.021	-1.55	0.023	1.15	0.004	-0.08	0.658	0.85	0.096	2.88	0.006	-0.58	0.461	1.44	0.017	2.14	0.042
E1/1098	-3.10	0.005	-2.87	0.001	-1.90	0.052	-0.15	0.430	0.29	0.362	1.94	0.001	0.84	0.094	-2.11	0.036	0.63	0.092	1.93	0.009
ATCC25922	-1.75	0.114	-1.61	0.145	1.77	0.007	-0.74	0.079	0.14	0.878	3.52	0.024	1.01	0.170	3.38	0.014	0.87	0.278	-2.51	0.003
48h treatment																				
K 1/4089 ^a	-1.26	0.177	-1.12	0.346	-0.69	0.422	0.38	0.707	0.14	0.727	0.56	0.60	2.00	0.033	0.42	0.467	1.86	0.002	1.44	0.120
K 2/4179	0.90	0.187	0.98	0.001	0.26	0.094	1.70	0.019	0.08	0.892	-0.64	0.371	0.80	0.316	-0.72	0.030	0.73	0.181	1.45	0.030
K 3/3268	-2.69	0.032	-2.50	0.002	-2.82	0.039	-2.10	0.020	0.39	0.436	-0.18	0.091	0.989	0.276	-0.57	0.345	0.60	0.197	1.17	0.247
K4/3712	0.55	0.211	-1.76	0.042	-4.65	0.003	-2.44	0.049	-2.19	0.004	-5.23	<0.001	-2.95	0.006	-3.04	0.003	-0.76	0.236	2.28	0.014
K5/2458	-4.01	0.015	-3.76	0.008	-4.43	0.004	-1.77	0.132	0.24	0.721	-0.42	0.369	2.24	0.001	-0.66	0.073	1.99	0.046	2.66	0.007
K6/3189	-3.73	0.001	-1.05	0.255	-2.57	0.002	-0.18	0.613	2.68	0.009	1.16	<0.001	3.55	0.007	-1.52	0.050	0.87	0.426	2.39	0.018
K7/2868	-2.75	0.015	-2.38	0.020	-2.10	0.044	-1.92	0.029	-2.36	0.031	-1.09	0.184	0.48	0.468	-0.66	0.148	2.17	0.012	0.26	0.571
K8/3342	-0.30	0.018	-0.36	0.025	-0.97	0.024	-1.02	0.317	-0.15	0.562	0.73	0.211	1.66	0.019	-0.74	0.166	0.28	0.475	1.12	0.036
E1/1098	-4.16	0.001	-4.01	0.003	-3.23	0.003	-0.35	0.481	0.54	0.361	1.09	0.027	-0.74	0.232	-2.55	0.019	0.72	0.226	1.37	0.041
ATCC25922	-2.95	0.009	-2.55	0.036	-0.09	0.787	-1.14	0.249	0.41	0.421	2.86	0.001	1.82	0.111	2.45	0.021	1.41	0.275	-1.04	0.190

Πίνακας 9. Η σύγκριση της αποτελεσματικότητας των συνδυασμών της TIG έναντι των μονοθεραπειών στις 24h και 48h θεραπείας

ISOLATE	T vs. T+C		T vs. T+G		T vs. T+M		T vs. T+R		C vs. T+C		G vs. T+G		M vs. T+M		R vs. T+R	
	Δlog	P value	Δlog	P value	Δlog	P value	Δlog	P value	Δlog	P value	Δlog	P value	Δlog	P value	Δlog	P value
24h treatment																
K 1/4089 ^a	0.27	0.534	1.98	0.048	1.48	0.038	2.83	0.002	0.63	0.036	1.79	0.004	1.35	<0.001	1.28	0.006
K 2/4179	2.97	0.026	4.16	0.010	1.57	0.094	1.86	0.044	2.80	0.008	4.22	0.006	1.57	0.094	0.62	0.315
K 3/3268	1.00	0.081	2.21	0.095	-1.13	0.148	1.72	<0.001	3.87	0.013	3.21	0.001	1.14	0.001	1.98	0.001
K4/3712	0.05	0.918	0.80	0.074	-1.37	0.002	0.62	0.125	5.46	0.001	-0.93	0.054	0.47	0.135	2.77	0.002
K5/2458	0.83	0.307	1.88	0.027	0.58	0.364	2.19	0.011	3.28	0.008	3.83	0.001	2.23	0.009	2.14	0.001
K6/3189	-0.74	0.108	0.38	0.136	-0.61	0.014	0.22	0.065	3.63	0.001	4.50	0.001	3.75	0.001	2.22	<0.001
K7/2868	-0.24	0.515	0.46	0.199	0.07	0.843	0.48	0.182	2.01	0.063	0.98	0.100	1.65	<0.001	0.44	0.502
K8/3342	-0.51	0.186	0.35	0.614	-0.28	0.597	2.38	0.008	1.69	0.003	1.57	0.061	1.27	0.024	2.02	0.002
E1/1098	0.52	0.090	0.17	0.559	0.56	0.390	0.18	0.398	3.25	0.005	2.80	<0.001	2.31	0.035	2.96	<0.001
ATCC25922	1.68	0.155	2.67	0.006	3.68	0.010	2.43	0.005	3.43	0.027	4.28	0.006	1.90	0.037	3.17	<0.001
48h treatment																
K 1/4089 ^a	-0.51	0.561	2.17	0.134	-1.58	0.230	2.55	0.008	1.02	0.322	6.65	0.001	-0.60	0.062	2.17	0.033
K 2/4179	3.07	0.004	4.88	0.001	1.15	0.004	5.46	<0.001	2.16	0.040	3.90	0.001	0.90	0.031	3.76	0.001
K 3/3268	-0.90	0.429	-1.21	0.848	-0.18	0.349	0.80	0.016	1.60	0.282	1.84	0.074	9.91	0.015	2.89	0.008
K4/3712	0.97	0.110	1.28	0.153	0.24	0.611	1.56	0.001	0.42	0.053	3.16	0.001	5.04	0.002	3.95	0.003
K5/2458	0.22	0.787	1.10	0.155	0.03	0.964	0.52	0.435	4.23	0.009	4.87	0.001	4.45	0.001	2.29	0.008
K6/3189	0.15	0.871	1.71	0.001	-1.25	0.001	2.55	0.001	3.87	0.014	2.76	0.038	1.32	0.012	2.73	0.003
K7/2868	-0.64	0.342	1.67	0.031	-1.52	0.003	3.88	<0.001	2.11	0.019	4.05	0.001	0.58	0.305	2.48	0.031
K8/3342	0.90	0.076	2.19	0.002	1.21	0.083	0.36	0.541	1.20	0.024	2.55	0.002	1.58	0.054	3.22	0.005
E1/1098	-3.72	0.002	-0.29	0.495	-0.43	0.241	-0.28	0.612	0.45	0.370	3.72	0.001	2.81	0.001	3.68	0.002
ATCC25922	1.62	0.134	2.33	0.007	2.28	0.018	2.06	0.038	4.58	0.006	4.88	0.007	2.38	0.002	3.20	0.007

Πίνακας 10. Σύγκριση της αποτελεσματικότητας των συνδυασμών της TIG μεταξύ τους μετά από 24h και 48h θεραπείας

ISOLATE	T+C vs. T+G		T+C vs. T+M		T+C vs. T+R		T+G vs. T+M		T+G vs. T+R		T+M vs. T+R	
	Δlog	P value	Δlog	P value	Δlog	P value	Δlog	P value	Δlog	P value	Δlog	P value
24h treatment												
K 1/4089 ^a	1.71	0.003	1.20	0.003	3.47	0.005	-0.50	0.085	1.73	0.033	2.37	0.001
K 2/4179	1.70	0.127	-1.19	0.202	-0.07	0.933	-2.88	0.004	-1.76	0.081	1.12	0.308
K 3/3268	1.71	0.151	-1.72	0.089	1.52	0.159	-3.43	<0.001	-0.19	0.147	3.24	<0.001
K4/3712	0.75	0.049	-1.42	0.038	0.56	0.098	-2.17	0.003	-0.91	0.003	1.99	0.003
K5/2458	1.05	0.159	-0.24	0.648	1.37	0.047	-1.23	0.002	0.31	0.168	1.61	0.003
K6/3189	1.12	0.040	0.13	0.615	0.97	0.083	-0.99	0.004	-0.15	0.397	0.84	0.011
K7/2868	0.70	0.245	0.30	0.580	1.69	0.032	-0.90	0.006	-1.17	0.114	1.55	0.026
K8/3342	0.86	0.135	0.23	0.520	0.56	0.311	-0.63	0.092	1.00	0.226	0.52	0.229
E1/1098	-0.35	0.280	0.04	0.942	0.74	0.215	0.39	0.303	-0.64	0.371	1.98	0.034
ATCC25922	0.99	0.230	2.00	0.023	0.76	0.278	1.01	0.032	-0.23	0.290	-1.25	0.027
48h treatment												
K 1/4089 ^a	2.68	0.013	-1.06	0.295	3.03	0.058	-3.82	0.002	0.38	0.378	4.20	<0.001
K 2/4179	1.82	0.045	-1.70	0.078	2.40	0.003	-3.60	0.016	0.59	0.285	4.25	0.003
K 3/3268	0.64	0.151	1.14	0.217	2.29	0.074	0.50	0.515	1.65	0.115	1.15	0.017
K4/3712	0.17	0.588	-0.99	0.110	0.98	0.038	-1.16	0.188	-1.15	0.058	1.19	0.092
K5/2458	0.88	0.067	-0.20	0.635	0.30	0.519	-1.08	0.005	-0.88	0.035	0.50	0.133
K6/3189	1.57	0.174	-1.40	0.187	2.40	0.063	-2.96	<0.001	0.84	0.003	3.80	<0.001
K7/2868	2.31	0.023	-0.87	0.166	1.98	0.041	-3.18	0.002	0.36	0.711	2.76	0.033
K8/3342	1.29	0.068	0.31	0.694	0.96	0.133	-0.98	0.170	1.46	0.137	0.87	0.132
E1/1098	3.42	0.003	3.28	0.005	1.27	0.208	-0.14	0.612	-0.79	0.165	2.79	0.009
ATCC25922	0.71	0.251	0.66	0.191	0.44	0.186	-0.05	0.802	-0.27	0.364	-0.23	0.313

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΓΙΑ ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΕ OS-MRSA

Κλινικά στελέχη *S. aureus* που φέρουν το γονίδιο *mecA* αλλά εμφανίζονται φαινοτυπικά ευαίσθητα στην οξακιλλίνη έχουν πρόσφατα αναφερθεί όλο και περισσότερο (Petinaki E et al., 2002, Kampf G et al., 2003, Hososaka Y et al., 2007, Forbes BA et al., 2008, Ikonomidis et al., 2008, Saeed K et al., 2010). Έχει προταθεί ότι τέτοια στελέχη θα μπορούσαν να ταξινομηθούν ως ένα νέο MRSA είδος, οριζόμενο ως OS-MRSA, τα οποία μπορεί να έχουν ταξινομηθεί εσφαλμένα ως MSSA στην καθημερινή ρουτίνα, εάν πραγματοποιούνταν μόνο φαινοτυπικές δοκιμές ευαισθησίας ρουτίνας στα αντιμικροβιακά. Γενικά πιστευόταν ότι κατά τη θεραπεία OS-MRSA λοιμώξεων, πρέπει να λαμβάνουμε προφυλάξεις, επειδή η αγωγή με β-λακταμικά αντιβιοτικά μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση εξαιρετικά ανθεκτικών MRSA, λόγω της παρουσίας του γονιδίου *mecA* (Sakoulas G et al., 2001). Σε αυτή τη μελέτη, διερευνήσαμε *S. aureus* κλινικά στελέχη που ήταν *mecA* θετικά αλλά παρουσίασαν MICs οξακιλλίνης ≤ 1 mg/L και ήταν ευαίσθητα σε διάφορες β-λακτάμες. Αρχικά, μερικά από τα πρώτα στελέχη της μελέτης είχαν ταξινομηθεί εσφαλμένα ως MSSA στην κλινική πράξη από το πολύ ευαίσθητο σύστημα Vitek 2 (Sakoulas G et al., 2001). Κατά τη διάρκεια της πληθυσμιακής ανάλυσης στη μελέτη μας, αυτά τα στελέχη αναπτύχθηκαν μόνο μέχρι χαμηλές συγκεντρώσεις οξακιλλίνης, κάτι που δείχνει ότι ήταν αληθώς ευαίσθητα στην οξακιλλίνη.

Δεδομένου ότι σταδιακά εμφανίζονται σε όλο τον κόσμο όλο και περισσότεροι "ευαίσθητοι" κλώνοι MRSA, η έρευνα για τη δραστικότητα της οξακιλλίνης (σε σύγκριση με τη θεραπεία εκλογής βανκομυκίνη) κατά των OS-MRSA στελεχών, μπορεί να παράσχει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με πιθανές εναλλακτικές θεραπευτικές επιλογές. Ωστόσο, με βάση την ισχύουσα παραδοχή ότι ορισμένα στελέχη γίνονται πιο ομοιογενώς ανθεκτικά στην οξακιλλίνη όταν εκτίθενται σε αυτή *in vitro* και *in vivo*, σαφώς απαιτούνταν πρόσθετα πειράματα σε ζωικά μοντέλα προκειμένου να τεκμηριωθούν παρόμοιες υποθέσεις.

Στο πλαίσιο αυτό, προχωρήσαμε σε πειράματα που αφορούν άμεσες συγκρίσεις της δραστικότητας της οξακιλλίνης έναντι της βανκομυκίνης. Πραγματοποιήσαμε άμεση σύγκριση των *in vitro* και *in vivo* δραστικότητων της δικλοξακιλλίνης σε σύγκριση με της βανκομυκίνης έναντι 15 OS-MRSA κλινικών στελεχών. Σε *in vitro* βακτηριοκτόνες

δοκιμασίες (time-kill assays) η βανκομυκίνη επέδειξε χαμηλότερη βακτηριοκτόνο δράση από την δικλοξακιλλίνη για τα περισσότερα στελέχη. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι παλαιότερα η βανκομυκίνη φαινόταν πράγματι να θανατώνει στελέχη MSSA λιγότερο γρήγορα από αντισταφυλοκοκκικές πενικιλίνες (*Small PM et al., 1990*). Αυτή η χαμηλή *in vitro* βακτηριοκτόνος δράση της βανκομυκίνης επιφέρει προφανώς τα μέτρια αποτελέσματα που παρατηρούνται στην θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων του *S. aureus* (*Small PM et al., 1990, Levine DP et al., 1991*), κάτι που είναι κοινός τόπος στην αντιμικροβιακή θεραπεία στην κλινική πράξη. Έχει επίσης αναφερθεί ότι η βακτηριοκτόνος δράση των β-λακταμών κατά των MSSA είναι γενικά πιο αποτελεσματική από εκείνη της βανκομυκίνης (*Joukhadar C et al., 2010*).

Σε σχέση με τα παραπάνω, δεν αποτελεί έκπληξη ότι τα στελέχη που απομονώσαμε και φέρουν το γονίδιο *mecA*, τα οποία ήταν λειτουργικά ευαίσθητα στην οξακιλλίνη, ανταποκρίθηκαν ικανοποιητικά σε θεραπεία οξακιλλίνης και *in vivo*. Ειδικότερα, η δικλοξακιλλίνη θεράπευσε επιτυχώς το 66.7% των λοιμώξεων με στελέχη OS-MRSA σε επίμυες, ομοίως με τη βανκομυκίνη, η οποία έδρασε επιτυχώς έναντι του 75% των στελεχών, ενώ η δικλοξακιλλίνη ήταν αποτελεσματική σε λοιμώξεις όπου η βανκομυκίνη απέτυχε. Επιπλέον, η άμεση σύγκριση των δραστηριοτήτων της δικλοξακιλλίνης και της βανκομυκίνης έδειξαν ότι η δικλοξακιλλίνη ήταν ομοίως αποτελεσματική με τη βανκομυκίνη σε περισσότερο από τα μισά στελέχη OS-MRSA που μελετήθηκαν.

Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι τα στελέχη OS-MRSA της μελέτης μας ομοιάζουν λειτουργικά αρκετά με τους MSSA. Αν τα στελέχη αυτά γίνουν συχνότερα στο μέλλον, θα υπάρχουν λοιπόν εύλογες ευνοϊκές θεραπευτικές συνέπειες, με αυξανόμενη χρήση β-λακταμών στις αντίστοιχες λοιμώξεις.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΓΙΑ ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΕ *A. BAUMANNII*

Τα τελευταία χρόνια, στελέχη *A. baumannii* που εμφανίζουν αντοχή στις καρβαπενέμες απομονώνονται όλο και πιο συχνά και αποτελούν ένα σημαντικό θεραπευτικό πρόβλημα σε πολλές περιοχές διεθνώς (Gaynes et al., 2005). Επιπλέον, η ικανότητα των κυττάρων του *A. baumannii* να επιζούν κάτω και από υπερβολικά υψηλές συγκεντρώσεις καρβαπενέμης (φαινοτυπική ανάπτυξη ετερογένειας) μπορεί να έχει επιπτώσεις στην θεραπεία των λοιμώξεων από πολυανθεκτικά *A. baumannii* (Cuenca et al., 2012) και αποτελεί ανησυχητικό φαινόμενο.

Οι παρατηρήσεις προηγούμενης μελέτης μας υποδήλωναν ότι στελέχη *A. baumannii* τα οποία ήταν φαινομενικά ευαίσθητα στην μεροπενέμη με τις συνηθισμένες μεθόδους ευαισθησίας, περιέχουν ένα συγκεκριμένο ποσοστό υποπληθυσμών που είναι φαινοτυπικά ανθεκτικοί στην μεροπενέμη (Ikonomidis et al., 2009). Αυτοί οι υποπληθυσμοί μπορούν να εμφανίζουν σταθερά υψηλή MIC λόγω μόνιμης αλλαγής του γενόματος των και να θεωρούνται ετερογενείς ή απλά να εμμένουν σε μία λανθάνουσα κατάσταση υπό την παρουσία του αντιβιοτικού και να εμφανίζουν ευαίσθητες MIC όταν αναπτύσσονται χωρίς την έκθεση τους στην μεροπενέμη (εμμένοντα) (Balaban et al., 2004).

Η αντοχή των βακτηρίων στα αντιβιοτικά μπορεί να σχετιστεί με ένα βιολογικό κόστος προσαρμογής στις νέες ιδιότητές τους (fitness cost, Fernandez-Rayes et al., 2009). Έχει προταθεί ότι το μέγεθος του κόστους αυτού είναι ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την εμφάνιση της αντοχής, τη σταθερότητά της και τον ρυθμό κατά τον οποίο η αντοχή μπορεί να μειώνεται αν η χρήση του αντιβιοτικού μειωθεί. Ωστόσο, μεταλλαγμένα στελέχη χωρίς μετρήσιμο κόστος έχουν επίσης παρατηρηθεί.

Στην παρούσα έρευνα, ετεροανθεκτικός φαινότυπος παρατηρήθηκε σε δύο (2) στελέχη, που κρατούν την MIC τους στα 32 mg/L ή υψηλότερα, ενώ τρία (3) στελέχη εμφανίζουν εμμένοντα φαινότυπο, με την MIC να επιστρέφει σε επίπεδα ευαισθησίας μετά από 7 καθημερινές καλλιέργειες χωρίς την παρουσία αντιβιοτικού. Για να ερευνήσουμε την υπόθεση ότι η απόκτηση της αντοχής προκαλεί κάποιο κόστος στη κατάσταση των βακτηριακών κυττάρων και να εντοπίσουμε την θεραπευτική απάντηση της μεροπενέμης, επιχειρήσαμε πειραματικές λοιμώξεις ουδετεροπενικών επίμυων. Τρία

(3) διαφορετικά θεραπευτικά δοσολογικά σχήματα μεροπενέμης χρησιμοποιήθηκαν, εφόσον υπάρχει έλλειμμα στη βιβλιογραφία σχετικά με τη χρήση της μεροπενέμης στις λοιμώξεις με *A. baumannii* και επειδή η χρήση των 20 mg/kg, (Ko et al., 2004) παρουσίασε πολύ άσχημη θεραπευτική αντίδραση στις προκαταρτικές μας έρευνες.

Τα αποτελέσματα των πειραματικών λοιμώξεων υποδηλώνουν ότι οι ετερογενείς υποπληθυσμοί του *A. baumannii* έχουν μειωμένη λοιμογόνο δύναμη σε σχέση με τα κλινικά στελέχη, αφού 9/15 επίμυες που μολύνθηκαν από εμμένοντες ή ετεροανθεκτικούς υποπληθυσμούς και δεν έλαβαν θεραπεία επιβίωσαν, ενώ όλα όσα μολύνθηκαν από τα κλινικά στελέχη και επίσης δεν έλαβαν θεραπεία απεβίωσαν. Αυτά τα αποτελέσματα πιθανώς αντανακλούν τις συνέπειες των μεταλλάξεων που επιφέρουν την ετερογένεια ανάπτυξης έναντι στη μεροπενέμη.

Εν κατακλείδι, η *in vitro* έκθεση στη μεροπενέμη μπορεί να αποτελέσει το εύνασμα για μια φαινοτυπική έκφραση ετερογενούς αντοχής του *A. baumannii*. Το φαινόμενο αυτό είναι αναστρέψιμο για κάποια στελέχη που χαρακτηρίζονται **εμμένοντα**, αλλά μπορεί να είναι και σταθερό, όταν σχετίζεται με μόνιμες αλλαγές στο γενετικό υλικό του *A. baumannii* (ετεροαντοχή) (Wiuiff et al., 2005). Ωστόσο, η κλινική σημασία του φαινομένου αυτού παραμένει άγνωστη και γι' αυτό, είναι σημαντική η *in vivo* διερεύνηση της θεραπευτικής ανταπόκρισης λοιμώξεων από τέτοια στελέχη. Τα αποτελέσματα μας μαρτυρούν ότι η σημασία της ετερογένειας στη θεραπεία της λοίμωξης με μεροπενέμη είναι μάλλον ασαφής, καθώς η λοιμογόνο δύναμη των ετερογενών στελεχών είναι σημαντικά μικρότερη από εκείνη των κλινικών στελεχών και επιπλέον, το αποτέλεσμα της θεραπείας φαίνεται να μην επηρεάζεται από τις αυξημένες MIC τους για την μεροπενέμη. Όλα αυτά είναι ενδεικτικά σημαντικού βιολογικού κόστους το οποίο «καταβάλλουν» τα μικρόβια για να αναπτύξουν τον ετερογενή φαινότυπο αντοχής.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΓΙΑ ΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΕ ΚΡC-ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΜΙΚΡΟΒΙΑ

Η χρήση της τυγεκυκλίνης έναντι ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών *K. pneumoniae* είναι πολύ περιορισμένη στη βιβλιογραφία, τόσο ως μονοθεραπεία, αλλά και πολύ περισσότερο σε συνδυασμούς με άλλα αντιβιοτικά. Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί *in vitro* συνέργεια με τη χρήση τυγεκυκλίνης σε συνδυασμό με ριφαμπικίνη, την αμικασίνη, την αμικιλίνη/σουλβακτάμη σε ευαίσθητα στελέχη *Klebsiella pneumoniae*, όπως και βακτηριοκτόνος συνέργεια *in vitro* πάλι με τη χρήση τυγεκυκλίνης σε συνδυασμό με κολιστίνη επίσης σε ευαίσθητα *K. pneumoniae*. Ο συνδυασμός τυγεκυκλίνης με κολιστίνη έχει δείξει επωφελή προκαταρκτικά αποτελέσματα και σε πειραματικά μοντέλα μικροβιαμίας από στελέχη *K. pneumoniae* (Entenza and Moreillon, 2009).

Αντίθετα, η χρήση της τυγεκυκλίνης σε *in vivo* πειράματα ανθεκτικών στελεχών *K. pneumoniae* σε μονοθεραπεία είναι σπάνια (Tessier and Nicolau, 2012) και με λίγα στελέχη προς έρευνα. Στην βιβλιογραφία επίσης δεν εμφανίζονται *in vivo* πειράματα όπου να γίνεται χρήση της τυγεκυκλίνης με συνδυασμό άλλων αντιβιοτικών σε ανθεκτικά στελέχη *K. pneumoniae* που να παράγουν καρβαπενεμάσες (Entenza and Moreillon, 2009). Το έλλειμα αυτό προσπαθήσαμε να καλύψουμε με την έρευνα που κάναμε σε αυτήν την διδακτορική διατριβή.

Ο Bratu et al.,(2005) ανέφερε σε πειράματα *in vitro* ότι ο συνδυασμός της τυγεκυκλίνης με την γενταμικίνη ήταν αδιάφορος για ανθεκτικά στελέχη στις καρβαπενέμες *K. pneumoniae*, ενώ ο Cobo et al., (2007) ανέφερε την ύπαρξη συνέργειας της τυγεκυκλίνης με την κολιστίνη εναντίον στελέχους MBL και ESBL(SHV-12) *K. pneumoniae*.

Στην κλινική πράξη, η θεραπεία λοιμώξεων που οφείλονται σε μικρόβια που παράγουν ΚΡC καρβαπενεμάση συχνά απαιτεί τη χρήση της τυγεκυκλίνης σαν φάρμακο τελευταίας εκλογής (Pournaras et al., 2009, Nordman et al., 2009, Hirsch and Tam, 2010), πολλές φορές σε συνδυασμό και με άλλα αντιμικροβιακά (Bratu et al., 2005, Nordmann et al., 2009, Pournaras et al., 2009, Hirsch and Tam, 2010) όπως η κολιστίνη, η μεροπενέμη, η ριφαμπικίνη ή η γενταμικίνη (Pournaras et al., 2010, Pournaras et al., 2011). Έτσι, επιχειρήθηκε στη μελέτη αυτή να ερευνηθούν και να προσδιοριστούν *in vivo* τα πιο αποτελεσματικά σχήματα θεραπείας, ώστε να μπορέσουν να

χρησιμοποιηθούν στην κλινική πράξη και να αποτελέσουν στα χέρια των κλινικών ιατρών εργαλεία προστασίας έναντι των πολυανθεκτικών αυτών μικροβίων. Επίσης επιλέχθηκε ειδικά η χρήση του ανοσοκατεσταλμένου (ουδετεροπενικού) πρωτοκόλλου για να εφαρμοστεί στις πραγματικές συνθήκες που έχουν να αντιμετωπίσουν στις ΜΕΘ και να αποκαλυφθεί η πραγματική δραστηριότητα των αντιβιοτικών είτε σαν μονοθεραπείες είτε σαν συνδυασμοί.

Η TIG ως μονοθεραπεία, εμφάνισε ισότιμη αποδοτικότητα με την RIF στο πρώτο 24ωρο αλλά ήταν ανώτερη της RIF στο δεύτερο 24ωρο. Επίσης είναι αξιοσημείωτο να αναφερθεί ότι η βακτηριοκτόνος δράση της τυγεκυκλίνης που εμφανίζεται τόσο στατιστικά ($P < 0.05$) όσο και σαν απόλυτη μείωση των αποικιών ($\Delta \log$) από το πρώτο 24ωρο και συνεχίζεται και στο δεύτερο 24ωρο, έχει παρουσιαστεί μόνο μια φορά για αντιβιοτικά όπως οι τετρακυκλίνες που θεωρητικά θεωρούνται βακτηριοστατικά (Tessier and Nicolau, 2012). Η RIF ήταν αποτελεσματικότερη των COL, GEN και MER στο πρώτο 24ωρο αλλά στην συνέχεια έχανε τη δραστηριότητά της, αν και παρέμενε η πιο αποδοτική από τα άλλα αντιβιοτικά.

Η έρευνα μας έρχεται σε αντίθεση με ότι υποστηρίζει ο Wiskirchen et al. (2011) σε ότι αφορά τη δράση της μεροπενέμης και της ριφαμπικίνης σε *in vitro* πάλι συνθήκες. Στο συγκεκριμένο άρθρο έναντι στελεχών KPC η τυγεκυκλίνη όχι μόνο δεν ήταν (*in vitro*) σαν μονοθεραπεία βακτηριοκτόνος αλλά ούτε και βακτηριοστατική, πράγμα που δεν επαληθεύεται στα πειράματα *in vivo* που εφαρμόστηκαν από εμάς σε περισσότερα στελέχη KPC αλλά ούτε και από το άρθρο του Tessier and Nicolau (2012). Επίσης στο ίδιο άρθρο τα *in vitro* πειράματα με συνδυασμό της τυγεκυκλίνης με την μεροπενέμη σε στελέχη KPC με MIC στην μεροπενέμη ≤ 16 $\mu\text{g/ml}$ έφεραν αποτελέσματα με στατιστικά σημαντική διαφορά. Στη δική μας έρευνα *in vivo* με στελέχη ευαίσθητα στη μεροπενέμη, ο συνδυασμός TIG + MER όχι μόνο δεν βελτίωσε την δράση της τυγεκυκλίνης, αλλά η προσθήκη της μεροπενέμης έφερε ανταγωνισμό, με χειρότερα αποτελέσματα έναντι της μονοθεραπείας. Στην ίδια κατεύθυνση είναι και το άρθρο των Roumparas et al. (2010) που αναφέρει ότι σε *in vitro* συνθήκες δεν επαληθεύεται συνέργεια μεταξύ τυγεκυκλίνης και μεροπενέμης σε στελέχη KPC, παρόλο που αυτός ο συνδυασμός είναι η κυριότερη εναλλακτική θεραπευτική λύση εναντίον πολυανθεκτικών Gram-αρνητικών βακίλλων. Επίσης η κολιστίνη στα δικά μας *in vivo* πειράματα δεν επαληθεύει τη θεραπευτική

δράση που επικαλούνται στις *in vitro* έρευνες όταν συνδυάζεται με την τιγκεκυκλίνη (Pournaras et al., 2010).

Από τα πειράματά μας, βρέθηκε ότι οι συνδυασμοί TIG+GEN και TIG+RIF ήταν οι πιο αποτελεσματικοί, ενώ διατήρησαν την αποτελεσματικότητά τους τόσο για 24, όσο και για 48 ώρες. Ακόμα, οι συνδυασμοί των TIG+GEN και TIG+RIF επέφεραν τις μεγαλύτερες μειώσεις αποικιών ($\Delta\log$) σε σύγκριση με τους άλλους δύο συνδυασμούς (TIG+MER, TIG+COL) που χρησιμοποιήθηκαν.

Όσον αφορά τη σύγκριση των μονοθεραπειών με τους συνδυασμούς της τιγκεκυκλίνης, η προσθήκη της COL στην TIG δεν βελτίωσε την δραστικότητα της TIG, η προσθήκη της GEN στην TIG βελτίωσε την αποδοτικότητα της TIG σε 35-45% των στελεχών και ο συνδυασμός TIG+RIF ήταν ανώτερος της TIG στο 45-65% περίπου των στελεχών. Η προσθήκη της MER στην TIG όχι μόνο δεν βελτίωσε την αποτελεσματικότητά της TIG στα περισσότερα στελέχη, αλλά μείωσε και την αποδοτικότητά της στο 20% περίπου των στελεχών και στα δύο 24ωρα και είναι μια σοβαρή απόδειξη της ύπαρξης ανταγωνισμού και φυσικά συστήνει την αποφυγή χρήσης αυτού του συνδυασμού στην κλινική πράξη.

Εν κατακλείδι, οι συνδυασμοί των TIG+GEN και TIG+RIF είναι καθαρά οι κορυφαίοι συνδυασμοί τόσο από πλευράς στατιστικής σημασίας των αποτελεσμάτων ($P < 0.05$) όσο και από πλευράς μείωσης των αποικιών ($\Delta\log$). Επίσης, δεν μπορεί στατιστικά να διακριθεί διαφορά στην δραστικότητα μεταξύ αυτών των δύο πιο αποτελεσματικών συνδυασμών, αλλά μπορεί να διακριθεί μια μικρή ανωτερότητα του συνδυασμού TIG+RIF επειδή η προσθήκη της RIF βελτίωσε την δράση της TIG περισσότερο από ότι η προσθήκη της GEN έναντι της TIG σαν μονοθεραπεία. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σημαντικά για τη θεραπευτική πράξη, καθώς τόσο η TIG όσο και η GEN και RIF ως γνωστόν δεν ενδείκνυνται ως μονοθεραπείες για σοβαρές λοιμώξεις. Αν αποδειχθεί ότι η θεραπευτική συνέργεια των συνδυασμών αυτών είναι επωφελής και στην κλινική πράξη, αυτό θα συμβάλλει σημαντικά στην έκβαση των σοβαρών λοιμώξεων από μικρόβια παραγωγά KPC, που είναι συχνότερες στις ΜΕΘ.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alanis AJ. (2005) Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research*. 36: 697-705.
2. Amsden GW. (2004) Pneumococcal resistance in perspective: how well are we combating it? *Paediatric Infectious Diseases Journal*. 23 (Suppl): S125-S128.
3. Anderson KF, Lonsway DR, rasheed JK, et al. (2007) Evaluation of methods to identify the *K. pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*. 45: 2723-2725
4. Andes D, van Ogtrop ML, Peng J, Craig WA. (2002) *In vivo* pharmacodynamics of a new oxazolidinone (linezolid). *Antimicrob. Agents Chemother*. 46:3484 – 3489
5. Arnold RS, Thom KA, Sharma S, Phillips M, Johnson JK, Morgan DJ. (2011) Emergence of *K. pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-Producing Bacteria. *South Med J*. 104: 40-45
6. Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* **2004**, 305, 1622–5.
7. Barthol SW, Hodzic E, Imai, DM, et al. (2010) Ineffectiveness of Tygecycline against persistent *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob Agent Chemother*. 54: 643-651
8. Beining Guo, Kamilia Abdelraouf, Kimberly R. Ledesma, Michael Nikolaou and Vincent H. Tam. Predicting bacterial fitness cost associated with drug resistance. *J Antimicrob Chemother* **2012**, 67, 928–932.
9. Bertone AL, Pittman DD, Bouxsein ML, Li J, Clancy B, Seeherman HJ. (2004) Adenoviral-mediated transfer of human BMP-6 gene accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *Journal of Orthopaedic Research*. 22:1261-1270.
10. Bonten MJ and Mascini EM (2003) The hidden faces of the epidemiology of antibiotic resistance. *Intensive Care Med*. 29: 1-2

11. Bosze Z and Houdebine LM. (2006) Application of rabbits in biomedical research: A review. *World Rabbit Science*. 14: 1-14.
12. Bosze Z, Hiripi L, Carnwarth JW, Niemann H. (2003) The transgenic rabbit as model for human diseases and as a source of biologically active recombinant proteins. *Transgenic Research*. 12: 541-553.
13. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, et al., (2009) Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 48: 1-12
14. Bratu S, Landman D, Hag R, et al. (2005) Rapid spread of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* in New York City. *Arch intern Med*. 165: 1430-35
15. Buelow R. (2006) Expression of a humanized antibody repertoire in transgenic rabbits. Conference V. Tahoe City USA. *Transgenic Research*. 15: 120.
16. Carmeli Y, Akova M, Cornaglia G, et al. (2010) Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control. *Clin Microbiol Infect*. 16: 102-11
17. Chambers HF. (1997) Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev* 10: 781–791
18. Charles River: Research Animal Models. Charles River eds. 2012
19. Chen FJ, Hiramatsu K, Huang IW, Wang CH, Lauderdale TL. (2009) Pantone-Valentine leukocidin (PVL)-positive methicillin-susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan: identification of oxacillin-susceptible *mecA*-positive methicillin-resistant *S. aureus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. 65:351–357
20. Chini S. et al., (2008) Clonal evolution and antibiotic resistance profile of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Greece during a five-year period, abstr C2-231, p 156. Abstr. 48th Annu. Intersci. Conference Antimicrob. Agents Chemother. (ICAAC). American Society for Microbiology, Washington, DC

21. Cizman M, PokornM, Seme K, Orazem A, Paragi M. (2001) The relationship between trends in macrolide use and resistance to macrolides of common respiratory pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 47: 475-477.
22. Clause BT. The Wistar Institute Archives: Rats (Not Mice) and History. Mendel Newsletter, 1998.
23. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2009) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 8th ed. Approved standard M07-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
24. Cornaglia G and Rossolini GM. (2010) The emerging threat of acquired carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 16:99-101
25. Costa C, Solanes G, Visa J, Bosch F. (1998) Transgenic rabbits overexpressing growth hormone develop acromegaly and diabetes mellitus. *FASEB J*. 12: 1455-1460.
26. Crow JF. (2002) C. C. Little, cancer and inbred mice. *Genetics*. 161: 1357-61.
27. Davis AJ (1997) The Heart of a Zucker. *Research Penn State*. 18: 125-136
28. DeLisle S and Perl TM. (2003) Vancomycin-resistant enterococci. A road map on how to prevent the emergence and transmission of antimicrobial resistance. *Chest*. 123 (suppl): 504S-518S
29. Deresinski S. (2005) Methicillin-resistant *S. aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. *Clinical Infectious Diseases*. 40: 562-573.
30. Diancourt L, Passet V, Nemeč A, et al. (2010) The population structure of *A. baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS ONE*. 5: e10034
31. Dijkshoorn L, Nemeč A, Seifert H. (2007) An increasing threat in the hospital: multidrug resistant *A. baumannii*. *Nat Rev Microbiol*. 5: 939-51

32. Donskey CJ, Chowdhry TK, Hecker MT, Hoyen CK, hanrahan JA, Hujer AM, Rice LB. (2000) Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. *New England Journal of Medicine*. 343: 1925-1932
33. Dorman SE, Hatem CL, Tyagi S, Aird K, Lopez-Molina J, Pitt ML, Manabe YC. (2004) Susceptibility to tuberculosis: clues from studies with inbred and outbred new Zealand White rabbits. *Infections and Immunology*. 72: 1700-1705.
34. Douni E, Alexiou M, Kollias G. (2004) Genetic engineering in the mouse: tuning TNF/TNFR expression. *Methods Mol Med*. 98:137-70
35. Drachman RH, Root RK, Wood WB Jr., (1966) Studies on the effect of experimental nonketotic diabetic mellitus on antibacterial defence. *Journal of Experimental Medicine*. 124: 227-240
36. Dunn CS, Mehtali M, Houdebine LM, Gut JP, Kirn A, Aubertin AM. (1995) Human immunodeficiency virus type 1 infection of human CD4-transgenic rabbits. *Journal of General Virology*. 76: 1327-1336.
37. Durante-Mangoni E and Zarrilli R. (2011) Global spread of drug resistant *A. baumannii*: molecular epidemiology and management of antimicrobial resistance. *Future Microbiol*. 6: 407-22
38. Endimiani A, Hujer AM, Perez F, et al. (2009) Characterization of *bla*_{KPC}-containing *K. pneumonia* isolates detected in different institutions in the Eastern USA. *J Antimicrob Chemother*. 63: 427-437
39. Enright MC, Robinson DA, Randle G et al. (2002) The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 7687–92
40. Entenza GM and Moreillon P. (2009) Tigecycline in combination with other antimicrobials: a review of in vitro, animal and case report studies. *Int J Antimicrob Agents*. 34: 8.e1-e9

41. European Centre for Disease Control and Prevention/European medicines Agency. (2010) The bacterial challenge; time to react. Stockholm, Sweden: European Centre for Disease Prevention and Control, 2009. Available at: http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_react.pdf. Accessed 2010.
42. Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaïou DK, et al. (2008) A pndrug-resistant *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *A. baumannii* infections: characteristics and outcome in a series of 28 patients. *Int J Antimicrob Agents*. 32: 450-4
43. Fan J and Watanabe T. (2000) Cholesterol-fed and transgenic rabbit models for the study of atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 7: 26-32.
44. Fan J and Watanabe T. (2003) Transgenic rabbits as therapeutic protein bioreactors and human disease models. *Pharmacology and Therapeutics*. 99: 261-282.
45. Fernández Cuenca F, Sánchez Mdel C, Caballero-Moyano FJ, Vila J, Martínez-Martínez L, Bou G, Baño JR, Pascual A. Prevalence and analysis of microbiological factors associated with phenotypic heterogeneous resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* **2012**, 39, 472-7.
46. Fernández-Reyes M, Rodríguez-Falcón M, Chiva C, Pachón J, Andreu D, Rivas L. The cost of resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii*: proteomic perspective. *Proteomics*. **2009**, 9, 1632-45.
47. Fey PD, Safranek TJ, RuppME, Dunne EF, Ribot E, Iwen PC, Hinrichs SH. (2000) Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. *New England Journal of Medicine*. 342: 1242-1249.
48. Forbes BA et al. (2008) Unusual form of oxacillin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. 61:387–395
49. Foster TJ. (2004) The *S. aureus* “superbug”. *Journal of Clinical Investigation*. 114: 1693-1696.

50. Gasink LB, Edelstein PH, Lautenbach E, Synnestvedt M, Fishman NO. (2009) Risk factors and clinical impact of *K. pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 30: 1180-85
51. Gaynes, R., J. R. Edwards, and the National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis* 2005, 41, 848–854.
52. Giakkoupi P, Pappa O, Polemis M, et al. (2009). Emerging *K. pneumoniae* isolates coproducing KPC-2 and VIM-1 carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother.* 53: 4048-50
53. Gogou V, Pournaras S, Giannouli M, et al. (2011) Evolution of multidrug-resistant *A. baumannii* clonal lineages: a 10 year study in Greece (2000-09). *J Antimicrob Chemother.* 12: 2767-2772
54. Graur D, Duret L, Gouy M. (1996) Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies). *Nature.* 379: 333-335.
55. Hawley JS, Murray CK, Jorgensen JH. (2008) Colistin heteroresistance in acinetobacter and its association with previous colistin therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 52: 351-2.
56. Hegde SS, Reyes N, Skinner R, Difuntorum S. 2008. Efficacy of telavancin in a murine model of pneumonia induced by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 61:169 –172.
57. Higgins PG, Dammhayen C, Hackel M, et al. (2010) Global spread of carbapenem-resistant *A. baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 65: 233-8
58. Hirsch EB and Tam VH. (2010) Detection and treatment options for *K. pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infections. *J Antimicrob Chemother.* 65: 1119-25
59. Hofmann J, Cetron MS, Farley MM, Baughman WS, Breiman RF. (1995) The prevalence of drug-resistant *S. pneumoniae* in Atlanta. *New England Journal of Medicine.* 333: 481-486.

60. Hooper DC. (2005) Efflux pumps and nosocomial antibiotic resistance: a primer for hospitals epidemiologists. *Clinical Infectious Diseases*. 40: 1811-1817
61. Horiuchi N, Suda T, Sasaki S, Takahashi H, Shimazawa E, Ogata E. (1976) Absence of regulatory effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ on 25-hydroxyvitamin D metabolism in rats constantly infused with parathyroid hormone. *Biochemistry Biophysics Research Communication*. 73: 869-875.
62. Hososaka Y, et al. (2007) Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. *J. Infect. Chemother*. 13:79 – 86
63. Houdebine LM (1995) The production of pharmaceutical proteins from the milk of transgenic animals. *Reproduction and Nutrients Dev*. 35: 609-617.
64. Hsu CC and Lai SC (2007) Matrix metalloproteinase-2,-9 and -13 are involved in fibronectin degradation of rat lung granulomatous fibrosis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *International Journal of Experimental Pathology*. 88: 437-443.
65. Huovinen P. (2002) Macrolide-resistant Group A *Streptococcus*-now in the United States. *New England Journal of Medicine*. 346: 1243-1244.
66. Ikonmidis A, et al. (2008) Investigation of oxacillin efficacy among oxacillin-susceptible, *mecA* positive, *Staphylococcus aureus* clinical isolates by population analyses, bactericidal assays and experimental thigh infections. *Antimicrob. Agents Chemother*. 52:3905–3908
67. Ikonmidis A, Michail G, Vasdeki A, et al. (2008) *In vitro* and *in vivo* evaluations of oxacillin efficiency against *mecA*-positive oxacillin susceptible *S. aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 52: 3905-8
68. Ikonmidis A, Neou E, Gogou V, Vrioni G, Tsakris A, Pournaras S. Heteroresistance to meropenem in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2009, 47, 4055-9.
69. Jacobs MR. (2004) *S. pneumoniae*: epidemiology and patterns of resistance. *American Journal of Medicine*. 117 (Suppl 3A): 3S-15S.

70. Jacoby GA and Munoz-Price LS. (2005) The new β -lactamases. *New England Journal of Medicine*. 352: 380-391
71. Jaffe HW, Biddle JW, Johnson SR, Wiesner PJ. (1981) Infections due to penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in the USA. *Journal of Infectious Diseases*. 144: 191-197.
72. Jevons MP. (1961) Celbenin-resistant staphylococci. *Br. Med. J.* 1: 124-5
73. Jorgensen JH. (1993) Update on mechanisms and prevalence of antimicrobials resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clinical Infectious Diseases*. 17: 1078-1079.
74. Joukhadar C, Pillai S, Wennersten C, Moellering RC Jr, Eliopoulos GM. (2010) Lack of bactericidal antagonism or synergism in vitro between oxacillin and vancomycin against methicillin-susceptible strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54(2):773-7
75. Kampf G, Adena S, Ruden H and Weist K. (2003) Inducibility and potential role of *MecA*-gene-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from colonized healthcare workers as a source for nosocomial infections. *J. Hosp. Infect.* 54:124-9
76. Kaplan SL, Hulten KG, Gonzalez BE, Hammerman WA, Lamberth L, Versalovic J, Mason EO Jr. (2005) Three-year surveillance of community-acquired *S. aureus* infections in children. *Clinical Infectious Diseases*. 40: 1785-1791
77. Kava R, Greenwood MRC, Johnson PR. (1990) Zucker (fa/fa) Rat. *Institute of Laboratory Animal Research Journal*. 32: 236-240
78. Ko WC, Lee HC, Chiang SR, Yan JJ, Wu JJ, Lu CL, Chuang YC. In vitro and in vivo activity of meropenem and sulbactam against a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004, 53, 393-395.
79. Kollef MH and Fraser VJ. (2001) Antibiotic resistance in the intensive care unit. *Annals of Internal Medicine*. 134: 298-314.

- 80.** Krinke, GJ. History, strains and models. In: Bullock GR, Bunton T, eds. The laboratory rat (Handbook of Experimental Animals). Academic Press. 2000: 3-16.
- 81.** Kurtz TW, Morris RC, Pershadsingh HA. (1989) The Zucker fatty rat as a genetic model of obesity and hypertension. *Hypertension*. 13: 896-901.
- 82.** Labrou M, Michail G, Ntokou E, Pittaras TE, Pournaras S, Tsakris A. (2012) Activity of oxacillin versus that of vancomycin against oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus* clinical isolates evaluated by population analyses, time-kill assays, and a murine thigh infection model. *Antimicrob Agents Chemother*. 56: 3388-91
- 83.** LaPlante KL, Leonard SN, Andes DR, Craig WA, Rybak MJ. (2008) Activities of clindamycin, daptomycin, doxycycline, linezolid, trimethoprim-sulfamethoxazole, and vancomycin against community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with inducible clindamycin resistance in murine thigh infection and *in vitro* pharmacodynamic models. *Antimicrob. Agents Chemother*. 52:2156– 2162.
- 84.** Lautenbach E and Polk RE. (2007) Resistant gram-negative bacilli: A neglected health care crisis? *Am J Health Syst Pharm*. 64 (Suppl): S3-S21
- 85.** Lee HY, Chen CL, Wang SB, Su LH, Chen SH, Liu SY, Wu TL, Lin TY, Chiu CH. (2011) Imipenem heteroresistance induced by imipenem in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanism and clinical implications. *Int J Antimicrob Agents*. 37: 302-8.
- 86.** Lee NY, Lee HC, Ko NY, et al. (2007) Clinical and economic impact of multidrug resistance in nosocomial *A. baumannii* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 28: 713-9
- 87.** Lenz MA, Franklin GA, Fairweather M, McClintock ML, et al., (2007) Endogenous IL-10 leads to impaired bacterial clearance and reduced survival in a murine model of chronic peritonitis. *Cytokine*. 40: 207-215

- 88.** Levine DP, Fromm BS, Reddy BR. (1991) Slow response to vancomycin or vancomycin plus rifampin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Ann. Intern. Med.* 115: 674–80
- 89.** Levy SB and Marshal B. (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *National Medicine*. 10 (Suppl): S-122-S129
- 90.** Levy SB. (2002) From tragedy the antibiotic era is born. In : Levy SB ed. The antibiotic paradox: How the misuse of antibiotics destroys their curative powers. 2nd ed. Cambridge, MA: Perseus Publishing; pp 1-14.
- 91.** Lind I. (1990) Epidemiology of antibiotic resistant *Neisseria gonorrhoeae* in industrialised and developing countries. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 69 (Suppl): S555-S561.
- 92.** Livermore DM. (2000) Antibiotic resistance in staphylococci. *Intl. J. Antimicrob. Agents* 16: S3–S10
- 93.** Lowy FD. (1998) Medical progress: *S. aureus* infections. *New England Journal of Medicine*. 339: 520-532.
- 94.** Lowy FD. (2003) Antimicrobial resistance: the example of *S. aureus*. *Journal of Clinical Investigation*. 111: 1265-1273.
- 95.** Maltezou HC and Giamarellou H. (2006) Community-acquired methicillin-resistant *S. aureus* infections. *Int J Antimicrob Agents*. 27: 87-96
- 96.** Manabe YC, Dannenberg AM, Tyagi SK, Hatem CL, Yoder M, Bishai WR. (2003) Different strains of *Mycobacterium tuberculosis* causes various spectrums of disease in the rabbit model of tuberculosis. *Infections and Immunology*. 71; 6004-6011.
- 97.** Maniatis AN, Pournaras S, Orkopoulou S, et al. (2003) Multi-resistant *A. baumannii* isolates in intensive care units in Greece. *Clin Microbiol Infect*. 9: 547-53

- 98.** Manjeet M, Thomas BS, Bhat KM. (2012) Rabbit as an animal model for experimental research. *Dental Research Journal*. 9: 111-118.
- 99.** Markogiannakis A, Fildisis G, Tsiplakou S, et al. (2008). Cross-transmission of multidrug-resistant *A. baumannii* clonal strains causing episodes of sepsis in a trauma intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 29: 410-417
- 100.** Martin JM, Green M, Barbadora KA, Wald ER. (2002) Erythromycin-resistant Group A Streptococci in schoolchildren in Pittsburgh. *New England Journal of Medicine*. 346: 1200-1206.
- 101.** Miyakis S, Pefanis A, Tsakris A. (2011). The challenges of antimicrobial drug resistance in Greece. *Clin Infect Dis*. 53: 177-184
- 102.** Mordes JP, Poussier P, Blackenhorn EP, Greiner DL. (2007) Rat models of Type 1 diabetes: Genetics, environment and autoimmunity. Boca Rton, CRC Press.
- 103.** Morinaga Y, Yanagihara K, Nakamura S, Yamamoto K, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yamada Y, Kohno S, Kamihira S. (2008) In vivo efficacy and pharmacokinetics of tomopenem (CS-023), a novel carbapenem, against *Pseudomonas aeruginosa* in a murine chronic respiratory tract infection model. *J Antimicrob Chemother*. 62: 1326-31
- 104.** Nordmann P, Cuzon G, Naas T. (2009) The real threat of *K. pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*. 9: 228-236
- 105.** Nser S, Di Pompeo C, Soubrier S, Delour P, Lenci H, Durocher A. (2005) First generation fluoroquinolone use and subsequent emergence of multiple drug-resistant bacteria in the intensive care unit. *Critical Care Medicine*. 33; 283-289.
- 106.** Nuorti JP, Butler JC, Crutcher JM, Guevara R, Welch D, Holder P, Elliot JA. (1998) An outbreak of multidrug-resistant pneumococcal pneumonia and bacteremia among unvaccinated nursing home residents. *New England Journal of Medicine*. 338: 1861-1868.

- 107.** Oppenheim BA. (1998) The changing pattern of infections in neutropenic patients. *Journal of Antimicrobials and Chemotherapy*. 41 (Suppl D): 7-11.
- 108.** Otter JA and French GL. (2010) Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *S. aureus* in Europe. *Lancet Infect Dis*. 10: 227-239
- 109.** Pachon-Ibanez ME, Docobo-Perez F, Lopez-Rojas R, et al. (2010) Efficacy of Rifampin and its combinations with imipenem, sulbactam, and colistin in experimental models of infection caused by imipenem-resistant *A. baumannii*. *Antimicrob Agent Chemother*. 54: 1165-1172
- 110.** Papakonstantinou I, Magira E, Nanas S. (2012) The role of colonization with multi-drug resistant pathogens in an adult intensive care unit. *Archives of Hellenic Medicine*. 29: 410-423
- 111.** Paterson DL and Bonomo RA. (2005) extended-spectrum b-lactamases: a clinical update. *Clin Microbial Rev*.18: 657-86
- 112.** Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG (2007) Animal models for implant biomaterial research in bone: A review. *European Cell Material*. 13: 1-10.
- 113.** Petinaki E, Kontos F, and Maniatis AN. (2002) Emergence of two oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* clones in a Greek hospital. *J. Antimicrob. Chemother*. 50: 6. 1090-1091
- 114.** Picazo JJ. (2004) management of the febrile neutropenic patient: a consensus conference. *Clinical Infectious Diseases*. 39 (Suppl): S1-S6.
- 115.** Pillai DR, Melano R, Rawte P, Lo S, et al. (2009) *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, Canada. *Emerg Infect Dis*. 15: 827-829
- 116.** Poulou A, Spanakis N, Pournaras S, et al. (2010) recurrent healthcare-associated community-onset infections due to *K. pneumoniae* producing VIM-1 metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother*. 65: 2538-42

- 117.** Pournaras S, Kristo I, Vrioni G, Ikonomidis A, et al. (2010) Characteristics of Meropenem heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing clinical isolates of *K. pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 48: 2601-4
- 118.** Pournaras S, Markogiannakis A, Ikonomidis A, et al. (2006) Outbreak of multiple clones of imepenem-resistant *A. baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother.* 57: 557-61
- 119.** Pournaras S, Protonotariou E, Voulgari E, Kristo I, Dimitroulia E, Vitti D, et al. (2009) Clonal spread of KPC-2 carbapenemase-producing *K. pneumoniae* in Greece. *J Antimicrob Chemother.* 64: 348-52
- 120.** Pournaras S, Vrioni G, Neou E, Dendrinis J, Dimitroulia E, Poulou A, Tsakris A. Activity of tigecycline alone and in combination with colistin and meropenem against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Enterobacteriaceae* strains by time-kill assay. *Int J Antimicrob Agents.* 2011. 37(3):244-7.
- 121.** Queenan AM and Bush K. (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 20: 440-58
- 122.** Raju TS, Briggs JB, Borge SM, Jones AJ. (2000) Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology.* 10; 477-486.
- 123.** Rammelkamp M. (1942) Resistances of *S. aureus* to the action of penicillin. *Proc R Soc Exp Biol Med.* 51: 386-389.
- 124.** Rishi P, Preet S, Bharrhan S, Verma I. (2011) In vitro and in vivo synergistic effects of cryptdin 2 and ampicillin against Salmonella. *Antimicrob Agents Chemother.* 55: 4176-82.
- 125.** Robinson DA, Kearns AM, Holmes A, Morrison D, Grundmann H, Edwqards G, Enright MC. (2005) Re-emergence of early pandemic *S. aureus* as a community-acquired outbreak. *Lancet.* 365: 1256-1258

126. Rohrer S, Maki H, Berger-Bachi B. (2003) What makes resistance to methicillin heterogeneous? *J. Med. Microbiol.* 52:605– 607
127. Rupp ME and Fey PD. (2003) Extended spectrum b-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs.* 63; 353-365.
128. Saeed K, Dryden M, Parnaby R. (2010) Oxacillin-susceptible MRSA, the emerging MRSA clone in the UK? *J. Hosp. Infect.* 76:267–268
129. Sakoulas G, et al. (2001) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. *J. Clin. Microbiol.* 39:3946 –3951
130. Sanbe A, James J, Tuzcu V, Nas S, Martin L, Gulick J, Robbins J. (2005) Transgenic rabbit model for human troponin I-based hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 111:2330-2338.
131. Sefton AM. (2002) Mechanisms of antimicrobial resistance. *Drugs.* 62:557-566
132. Seppala H, Klaukka T, Lehtonen R, Nenonen E, Huovinen P. (1995) Outpatient use of erythromycin: link to increased erythromycin resistance in Group A streptococci. *Clinical Infectious Diseases.* 21: 1378-1385.
133. Sipsas NV, Bodey GP, Kontoyiannis DP. (2005) Perspectives for the management of febrile neutropenic patients with cancer in the 21st century. *Cancer.* 103: 1103-1113.
134. Small PM, Chambers HF. (1990) Vancomycin for *Staphylococcus aureus* endocarditis in intravenous drug users. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:1227–1231
135. Smith KE, Besser MS, Hedberg CW, Leonon FT, Bender JB, Osterholm MT. (1999) Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota, 1992-1998. *New England Journal of Medicine.* 340: 1525-1532.

- 136.** Soler E, Le Saux A, Guinut F, Passet B, Cohen R, Merle C, Charpilienne A, Houdebine LM. (2005) Production of two vaccinating recombinant rotavirus proteins in the milk of transgenic rabbits. *Transgenic Research*. 14: 833-844.
- 137.** Soler E, Le Saux A, Guinut F, Passet B, Cohen R, Merle C, Charpilienne A, Houdebine LM. (2006) Production of two vaccinating recombinant rotavirus proteins in the milk of transgenic rabbits. Transgenic Animal Research Conference V. Tahoe City USA. *Transgenic Research* 15: 120.
- 138.** Souli M, Galani I, Antoniadou A et al. (2010) An outbreak of infection due to beta-lactamase *K. pneumoniae* carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology and outcomes. *Clin Infect Dis*. 50: 364-373
- 139.** Sukov W and Barth DS (1998) Three-dimensional analysis of spontaneous and thalamically evoked gamma oscillations in auditory cortex. *Journal of Neurophysiology*. 79: 2875-2884.
- 140.** Tam VH, Ledesma KR, Schilling AN, Lim TP, Yuan Z, Ghose R, Lewis RE. (2009) In vivo dynamics of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* selection after suboptimal dosing. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 64: 427-33
- 141.** Tessier PR and Nicolau DP. (2012) Tigecycline displays in vivo bactericidal activity against Extended-Spectrum- β -Lactamase-producing *Enterobacteriaceae* after 72-hour exposure period. *Antimicrob. Agents Chemother*. 57: 640-2
- 142.** The Wistar Institute: History. The Wistar Institute eds. 2007.
- 143.** Tomasz A, Nachman S, and Leaf H. (1991) Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother*. 35:124–129
- 144.** Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Markou F, Ikonomidis A, Pournaras S. (2008) First occurrence of KPC-2 possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek

- hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests. *J Antimicrob Chemother.* 62: 1257-60
- 145.** Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Themeli-Digalaki K, et al. (2009) Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *K. pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 47: 362-367
- 146.** Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, et al. (2000) Outbreak of infections caused by *P. aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *J Clin Microbiol.* 38: 1290-2
- 147.** Tsakris A, Tsioni C, Pournaras S, et al. (2003). Spread of low-level carbapenem-resistant *A. baumannii* clones, in a tertiary care Greek hospital. *J Antimicrob Chemother.* 52: 1046-7
- 148.** Van Looveren M and Goossens H. (2004) Antimicrobial resistance of *Acinetobacter spp.* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 10: 684-704
- 149.** Vanderkooi OG, Low DE, Green K, Powis JE, McGeer A. (2005) Predicting antimicrobial resistance in invasive pneumococcal infections. *Clinical Infectious Diseases.* 40: 1288-1297.
- 150.** Waterer GW and Wunderink RG. (2001) Increasing threat of Gram-negative bacteria. *Critical Care Medicine.* 29 (Suppl): N75-N81.
- 151.** Wegener HC. (1999) The consequences for food safety of the use of fluoroquinolones in food animals. *New England Journal of Medicine.* 340: 1581-1582.
- 152.** Weisenberg SA, Morgan DJ, Espinal-Witter R, Jarone DH. (2009) Clinical outcomes of patients with *K. pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* after treatment with imipenem or meropenem. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 64: 233-5
- 153.** White DG, Zhao S, Sudler R, Ayers S, Friedman S, Meng J. (2001) The isolation of antibiotic resistant *Salmonella* from retail ground meats. *New England Journal of Medicine.* 345: 1147-1154.

- 154.** Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Lexau C, Reingold A, Jorgensen JH, Schuchat A. (2000) Increasing prevalence of multidrug-resistance *S. pneumoniae* in the United States. *New England Journal of Medicine*. 343: 1917-1924.
- 155.** Wiuff C, Zappala RM, Regoes RR, Garner KN, Baquero F, Levin BR. (2005) Phenotypic tolerance: antibiotic enrichment of noninherited resistance in bacterial populations. *Antimicrob Agents Chemother*. 49: 1483–94.
- 156.** Zarkotou O, Pournaras S, Tselioti P, Dragoumanos V, et al. (2011) Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *K. pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. *Clin Microbiol Infect*. 17: 1798-1803
- 157.** Zarkotou O, Pournaras S, Voulgari E, et al. (2010) Risk factors and outcomes associated with acquisition of colistin-resistant KPC-producing *K. pneumoniae*: a matched case-control study. *J Clin Microbiol*. 48: 2271-2274

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Activity of Oxacillin versus That of Vancomycin against Oxacillin-Susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates Evaluated by Population Analyses, Time-Kill Assays, and a Murine Thigh Infection Model

Marla Labrou,^a George Michail,^a Elani Ntekou,^a Theodore E. Pittaras,^b Spyros Pournaras,^a and Athanasios Tsakris^b

Department of Microbiology, Medical School, University of Thessaly, Larissa,^a and Department of Microbiology, Medical School, University of Athens, Athens,^b Greece

We compared the activity of dicloxacillin with that of vancomycin against 15 oxacillin-susceptible, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) clinical isolates. By population analyses, we found that 6 OS-MRSA isolates were able to grow in the presence of up to 8 $\mu\text{g/ml}$ dicloxacillin and 9 isolates were able to grow in 12 to $>32 \mu\text{g/ml}$ dicloxacillin; all isolates grew in up to 2 $\mu\text{g/ml}$ vancomycin. Both drugs exhibited similar bactericidal activities. In experimental infections, the therapeutic efficacy of dicloxacillin was significant ($P < 0.05$ versus untreated controls) in 10 OS-MRSA isolates and vancomycin was effective ($P < 0.05$) against 12 isolates; dicloxacillin had an efficacy that was comparable to that of vancomycin ($P > 0.05$) in 8 isolates. The favorable response to dicloxacillin treatment might suggest that antistaphylococcal penicillins could be used against OS-MRSA infections.

Staphylococcus aureus isolates that carry and express the *mecA* gene are considered methicillin resistant (MRSA) but may exhibit oxacillin MICs ranging from the susceptible range ($\leq 2 \mu\text{g/ml}$) to $>1,000 \mu\text{g/ml}$ (8, 16, 20). It was generally believed that most *mecA*-positive *S. aureus* strains, including those appearing oxacillin susceptible (OS-MRSA), exhibit a degree of oxacillin heteroresistance and the use of β -lactams might lead to treatment failure. However, OS-MRSA isolates with no oxacillin heteroresistance (truly oxacillin susceptible) also appeared (9).

In a previous study, we reported that the activity of oxacillin against four OS-MRSA isolates was intermediate between that against *mecA*-negative *S. aureus* and highly resistant MRSA isolates (9). It was subsequently found that the OS-MRSA isolates of that study harbored specific mutations in their *Fem* proteins that probably conferred atypical oxacillin responsiveness (6). To further investigate these preliminary observations, we tested and report herein the *in vitro* and *in vivo* activities of oxacillin compared with those of vancomycin (treatment of choice for most MRSA infections) against a larger collection of OS-MRSA. The aim of this study was to investigate whether antistaphylococcal β -lactams, which were previously shown to exhibit superior activity than vancomycin against methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) (11), retain activity against MRSA isolates that appear phenotypically susceptible to oxacillin. To the best of our knowledge, the activity of β -lactams has not been tested against OS-MRSA isolates.

Bacterial strains and susceptibility testing. Fifteen vancomycin-susceptible OS-MRSA clinical isolates, collected during 2006 and 2007, were studied. A high-level MRSA isolate (isolate 7263; oxacillin MIC, 256 $\mu\text{g/ml}$) and the *mecA*-negative strain *S. aureus* ATCC 29213 were included as controls. Isolates were stored at -80°C in brain heart infusion broth with 15% glycerol before testing. MIC testing of oxacillin and vancomycin was performed by agar dilution according to CLSI guidelines (4).

Detection of PBP2a and the *mecA* gene and MLST. The study isolates were tested for the *mecA* gene by PCR (12) and for PBP2a

production by the Slidex MRSA agglutination test (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was performed as previously described (21), and banding patterns were compared visually. All isolates were tested for the Pantone-Valentine leukocidin (PVL)-encoding genes *lukS-lukF* (14). Multilocus sequence typing (MLST) was also performed (<http://www.mlst.net>) (5).

Population analysis assays. Isolates were tested by population analyses (PAs) for dicloxacillin and vancomycin. Approximately 10^8 CFU were spread on Mueller-Hinton (MH) agar plates (2% NaCl) containing 0.125 to 32 $\mu\text{g/ml}$ dicloxacillin or vancomycin (9). Colonies were counted after 48 h of growth at 35°C . Analyses were performed in triplicate, and mean CFU counts were plotted on a semilogarithmic graph.

Time-kill assays. Time-killing curves were performed in triplicate by inoculating approximately 10^8 CFU into MH broth containing 20 $\mu\text{g/ml}$ dicloxacillin or 10 $\mu\text{g/ml}$ vancomycin (9, 19). Aliquots were removed at 0, 6, 24, and 48 h postinoculation at 35°C and plated on MH agar plates for CFU enumeration. Bactericidal activity was defined as a $\geq 3\text{-log}_{10}$ reduction, and bacteriostatic activity was defined as the maintenance of, or a $<3\text{-log}_{10}$ reduction of, the total number of CFU/ml in the original inoculum (15).

Murine infection model. An experimental murine thigh infection model was used to test the *in vivo* activity of dicloxacillin versus that of vancomycin. Animal studies were approved by the

Received 17 January 2012. Returned for modification 20 February 2012.

Accepted 9 March 2012.

Published ahead of print 19 March 2012.

Address correspondence to Spyros Pournaras, pournaras@meduath.gr.

M.L. and G.M. contributed equally to this article.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.09103-12

TABLE 1 Characteristics of the study isolates^a

Isolate	PVL	MLST type	PFGE type	OXA MIC (μg/ml)	VAN MIC (μg/ml)	Δlog ₁₀ CFU reduction at:			
						6 h in dicloxacillin time-kill assays	24 h in dicloxacillin time-kill assays	6 h in vancomycin time-kill assays	24 h in vancomycin time-kill assays
446	+	80	Ia	0.5	0.5	3.8	4.2	3.8	5.8
959	+	80	Ia	0.25	2	4.6	5.8	3.5	5.1
970	+	728	Ib	0.25	1	4.9	5.9	3.5	4.7
1117	+	80	Ib	0.5	1	2.4	4.4	3.4	4.9
1512	+	30	Ic	0.25	1	5.4	5.4	4.4	5.9
1546	+	80	Ic	0.25	1	5	5.8	3.6	5.0
2629	+	80	Ib	0.25	1	4.9	6	3.8	6
4324	+	80	Ib	0.25	1	3.6	4.7	3.7	3.8
5014	-	80	II	0.5	1	4.2	5.7	2.7	4.2
5505	+	80	Ib	1	1	3.6	4.4	3	5.4
6036	+	80	Ia	0.5	1	5.1	6	3.8	5.8
6601	+	80	Ib	0.25	1	5	5.4	4	5.2
7069	+	80	Ib	0.25	1	4.9	5.0	3.9	6
9131	+	80	Ib	0.25	1	3.5	4.3	3.9	4.7
9833	+	80	Ib	0.5	1	2.7	4.8	3.3	5.5
ATCC 29213	-	ND	III	0.25	1	5	6	3.5	6
7263	+	ND	IV	256	1	2	2	4.5	5.8

^a OXA, oxacillin; VAN, vancomycin; ND, not determined.

Greek Veterinary Authorities and conformed to the Protocol on the Protection and Welfare of Animals. Six-week-old, specific-pathogen-free, female BALB/c mice (Harlan, Indianapolis, IN) weighing 23 to 27 g were used (7). Mice were rendered neutropenic by injecting cyclophosphamide intraperitoneally on day 4 (150 mg/kg) and day 1 (100 mg/kg) preinoculation (1, 12). High infections were performed in triplicate by injecting approximately 10⁶ CFU, and the mice were treated with either dicloxacillin at 500 mg/kg/12 h intraperitoneally or vancomycin at 180 mg/kg/12 h subcutaneously (7, 12, 18) or they were left untreated; animals were euthanized after 24 h. Thigh muscles were aseptically excised, homogenized, serially diluted and plated on antibiotic-free plates for CFU enumeration. Thigh CFU titer was expressed as log₁₀ CFU/thigh muscle. A *t* test was used for statistical analysis using Minitab software (version 13.31); a *P* value of ≤0.05 was considered statistically significant.

Results. All 15 OS-MRSA isolates carried the *mecA* gene and produced PBP2a; MICs of oxacillin and vancomycin were 0.25 to 1 μg/ml and ≤1 μg/ml, respectively. Two unrelated PFGE types were identified, with the predominant type including 14 isolates and exhibiting three subtypes that differed by 1 or 2 bands from each other. Fourteen isolates were PVL positive and one was PVL negative. MLST results showed that 13 isolates belonged to ST80, one isolate to ST728, and one to ST30. Characteristics of isolates are shown in Table 1.

PAs showed that 6 OS-MRSA isolates grew at up to 8 μg/ml oxacillin and 9 isolates at oxacillin concentrations of 12 to >32 μg/ml; all isolates were clearly susceptible to vancomycin. Results of the PAs are presented in Fig. 1.

Time-killing kinetics showed a ≥3 log₁₀ reduction of CFU/ml, indicating efficient bactericidal activity of dicloxacillin and vancomycin at 24 h for all OS-MRSA. In 10 isolates, the bactericidal activity of dicloxacillin after 6 h of incubation was higher than that of vancomycin. Overall, vancomycin exhibited low killing activity, eliminating most bacterial populations at 24 to 48 h compared with dicloxacillin, which eliminated most

populations at 6 to 24 h in 10 isolates and at 24 to 48 h in 5 isolates. The *mecA*-negative control ATCC 29213 was rapidly killed, and the highly resistant MRSA control remained unaffected by dicloxacillin. The results of the bactericidal assays at 6 and 24 h are shown in Table 1.

The therapeutic efficacy of dicloxacillin, reflected by comparing the number of colonies grown from thighs of treated animals with the number in untreated animals, was significant (*P* < 0.05) in 10 of the 15 OS-MRSA isolates. Similarly, vancomycin was effective (*P* < 0.05 versus untreated controls) against infections caused by 12 OS-MRSA isolates. Interestingly, animals infected by 3 isolates, where vancomycin did not have significant efficacy, responded favorably to dicloxacillin treatment. When directly comparing the efficacy of dicloxacillin with that of vancomycin, a significant difference was not observed (*P* > 0.05) in 8 OS-MRSA infections, while vancomycin was significantly more effective (*P* < 0.05) in the remaining 7 isolates. Vancomycin treated significantly more efficiently than dicloxacillin the infections caused by the high-level MRSA control isolate, while the susceptible ATCC 29213 control responded slightly better to dicloxacillin than vancomycin. The results of the experimental infections are shown in Table 2. It should be noted that colonies yielded by infected thighs were tested again and found to carry and express the *mecA* gene.

Discussion. OS-MRSA clinical isolates have been increasingly reported in several countries (2, 8, 17) and in distant Greek regions (3, 9, 19). It has been shown previously that OS-MRSA may respond to oxacillin (9), possibly providing treatment alternatives. Recently, it has also been implied that some mutant MRSA isolates with relatively low oxacillin MICs may respond to oxacillin treatment in murine infections (10). However, it is generally believed that heterogeneous MRSA isolates may become homogeneously resistant under oxacillin exposure, resulting in treatment failure. In that respect, it has been suggested that oxacillin activity against such isolates should be compared with that of vancomycin, as most clinical

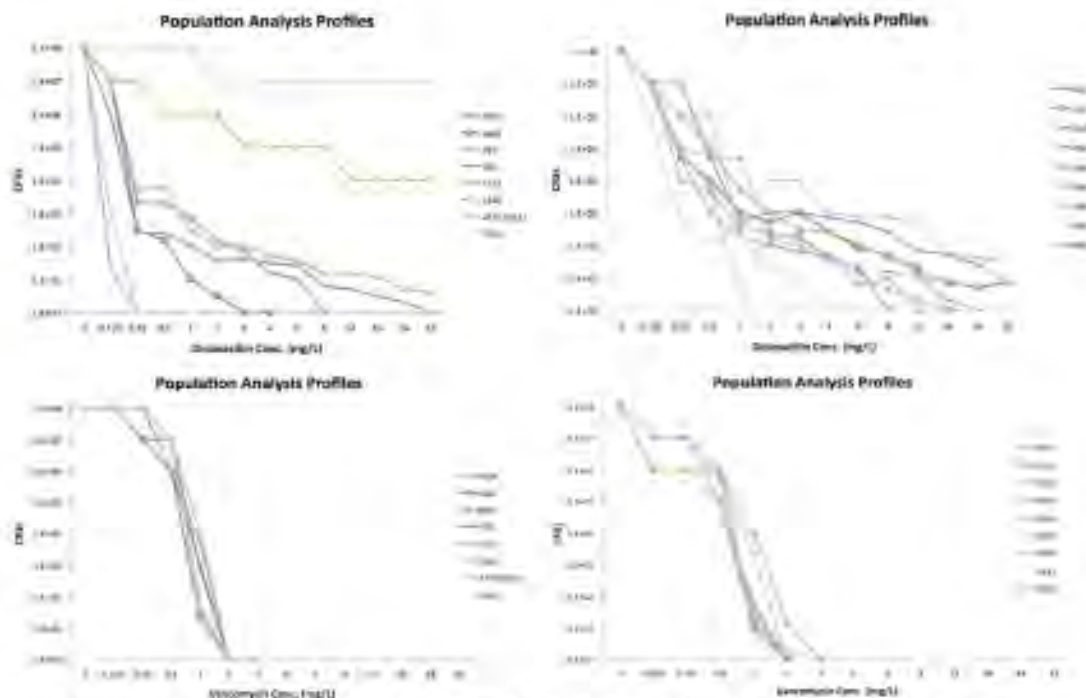


FIG 1 Population analysis assays of the 15 O5-MRSA study isolates and the control isolates using dicloxacillin and vancomycin.

cians who knowingly encounter such strains would utilize vancomycin (9).

In the current study, we directly compared the *in vitro* and *in vivo* activities of dicloxacillin versus vancomycin against 15 O5-

MRSA clinical isolates. In time-kill assays vancomycin exhibited lower bactericidal activity than dicloxacillin in most isolates. It has to be noted that vancomycin was also previously shown to kill MSSA less rapidly than antistaphylococcal penicillins (20). This

TABLE 2 Therapeutic efficacies in murine infections of dicloxacillin and vancomycin versus untreated controls and vancomycin versus dicloxacillin^a

Isolate	Avg log CFU \pm SD per thigh muscle in untreated controls	Avg log CFU \pm SD per thigh muscle in DCX treatment	DCX treatment efficiency (P value)	Avg log CFU \pm SD per thigh muscle in VAN treatment	VAN treatment efficiency (P value)	DCX vs VAN activity in mouse thigh infections (P value)
446	7.6 \pm 0.4	5.9 \pm 0.4	0.016	6.3 \pm 0.4	0.058	0.776
959	7.6 \pm 0.3	6.9 \pm 1.9	0.502	3.6 \pm 1.8	0.011	0.009
970	8.7 \pm 0.2	6.0 \pm 0.6	0.037	5.8 \pm 1.9	0.021	0.315
1117	7.9 \pm 0.5	6.7 \pm 0.4	0.062	6.3 \pm 0.4	0.063	0.157
1512	8.7 \pm 0.2	6.7 \pm 0.6	0.034	4.3 \pm 0.4	0.007	0.007
1546	8.9 \pm 0.3	6.7 \pm 0.8	0.208	3.9 \pm 0.5	0.006	0.009
2629	8.3 \pm 0.7	6.3 \pm 1.1	0.058	3.4 \pm 0.4	<0.001	0.015
4324	8.8 \pm 0.2	4.1 \pm 0.01	0.001	3.6 \pm 0.4	<0.001	0.078
9014	7.2 \pm 0.4	6.8 \pm 0.8	0.488	4.0 \pm 0.5	0.001	0.023
5505	7.7 \pm 0.4	4.0 \pm 1.1	0.04	3.5 \pm 1.1	<0.001	0.981
6036	8.8 \pm 0.1	6.7 \pm 0.3	0.033	5.7 \pm 0.3	0.025	0.014
6601	8.8 \pm 0.4	7.4 \pm 0.3	0.015	4.2 \pm 0.8	0.003	0.005
7059	8.9 \pm 0.2	5.0 \pm 1.9	0.026	3.2 \pm 0.3	<0.001	0.208
9131	8.7 \pm 0.1	3.4 \pm 0.4	0.001	3.3 \pm 0.4	<0.001	0.273
9833	8.9 \pm 0.2	6.2 \pm 1.4	0.035	5.1 \pm 1.6	0.020	0.476
ATCC 29213	8.7 \pm 0.1	3.6 \pm 0.6	0.001	3.8 \pm 0.5	<0.001	0.771
7263	8.6 \pm 0.1	8.2 \pm 0.2	0.33	3.3 \pm 0.5	<0.001	<0.001

^a P value of <0.05 represents significant difference in CFU grown from infected thighs; DCX, dicloxacillin; VAN, vancomycin.

low *in vitro* bactericidal activity of vancomycin probably caused the suboptimal results observed in the treatment of serious *S. aureus* infections (13, 20). It has also been reported that the bactericidal activity of β -lactams against MSSA may be superior to that of vancomycin (11). In that respect, it is not surprising that our *mecA*-carrying isolates, which are functionally oxacillin susceptible, responded sufficiently to oxacillin treatment. In particular, dicloxacillin successfully treated 66.7% of mouse infection due to OS-MRSA isolates, similar to vancomycin, which succeeded against 75% of the isolates, while dicloxacillin was efficient in infections where vancomycin failed. Furthermore, the direct comparison of the activities of dicloxacillin and vancomycin showed that, interestingly, dicloxacillin was similarly efficient with vancomycin in more than half of the OS-MRSA isolates tested.

Overall, our findings suggest that the use of antistaphylococcal penicillins could still be considered when treating OS-MRSA infections. Should OS-MRSA be more common in the future, this observation could have significant implications for the treatment of the respective infections.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was partially funded by the project "Biofilm and infections" of the Research Committee of the University of Thessaly.

REFERENCES

- Andes D, van Ogtrop ML, Peng J, Craig WA. 2002. *In vivo* pharmacodynamics of a new oxazolidinone (linezolid). *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:3484–3489.
- Chen FJ, Hiramatsu K, Huang IW, Wang CH, Lauderdale TL. 2009. Panton-Valentine leukocidin (PVL)-positive methicillin-susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan: identification of oxacillin-susceptible *mecA*-positive methicillin-resistant *S. aureus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 65:351–357.
- Chini S, et al. 2008. Clonal evolution and antibiotic resistance profile of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Greece during a five-year period, abstr C2-231, p 156. Abstr. 48th Annu. Intersci. Conference Antimicrob. Agents Chemother. (ICAAC). American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 8th ed. Approved standard M07-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 38:1008–1015.
- Giannouli S, et al. 2010. Detection of mutations in the FemXAB protein family in oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:626–633.
- Hegde SS, Reyes N, Skinner R, Difuntorum S. 2008. Efficacy of telavancin in a murine model of pneumonia induced by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 61:169–172.
- Hosokawa Y, et al. 2007. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. *J. Infect. Chemother.* 13:79–86.
- Ikonomidis A, et al. 2008. Investigation of oxacillin efficacy among oxacillin-susceptible, *mecA* positive, *Staphylococcus aureus* clinical isolates by population analysis, bactericidal assays and experimental thigh infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:3905–3908.
- Jo DS, Montgomery CP, Yin S, Boyle-Vavra S, Daum RS. 2011. Improved oxacillin treatment outcomes in experimental skin and lung infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing a *vanSR* operon deletion. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:2818–2823.
- Joukhadar C, Pillai S, Wennersten G, Moellering RC, Jr, Eliopoulos GM. 2010. Lack of bactericidal antagonism or synergism *in vitro* between oxacillin and vancomycin against methicillin-susceptible strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:773–777.
- LaPlante KL, Leonard SN, Andes DR, Craig WA, Rybak MJ. 2008. Activities of clindamycin, daptomycin, doxycycline, linezolid, trimethoprim-sulfamethoxazole, and vancomycin against community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with inducible clindamycin resistance in murine thigh infection and *in vitro* pharmacodynamic models. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:2156–2162.
- Levine DP, Fromm BS, Reddy BR. 1991. Slow response to vancomycin or vancomycin plus rifampin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Ann. Intern. Med.* 115:674–680.
- Lina G, et al. 1999. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* 29:1128–1132.
- Pournaras S, et al. 2011. Activity of tigecycline alone and in combination with colistin and meropenem against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing Enterobacteriaceae strains by time-kill assay. *Int. J. Antimicrob. Agents* 37:244–247.
- Rohrer S, Maki H, Berger-Bachi B. 2003. What makes resistance to methicillin heterogeneous? *J. Med. Microbiol.* 52:605–607.
- Saeed K, Dryden M, Pamaby R. 2010. Oxacillin-susceptible MRSA, the emerging MRSA clone in the UK? *J. Hosp. Infect.* 76:267–268.
- Sakiniene E, Collins LV. 2002. Combined antibiotic and free radical trap treatment is effective at combating *Staphylococcus aureus*-induced septic arthritis. *Arthritis Res.* 4:196–200.
- Sakoulas G, et al. 2001. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. *J. Clin. Microbiol.* 39:3946–3951.
- Small PM, Chambers HF. 1990. Vancomycin for *Staphylococcus aureus* endocarditis in intravenous drug users. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:1227–1231.
- van Belkum A, et al. 1998. Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis of *SmaI* macrorestriction fragments: a multicenter study. *J. Clin. Microbiol.* 36:1653–1659.

In Vitro and In Vivo Evaluations of Oxacillin Efficiency against *mecA*-Positive Oxacillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*[†]

Alexandros Ikonomidis,¹ George Michail,¹ Afroditi Vasdeki,¹ Maria Labrou,¹ Vasilis Karavasilis,¹
Constantinos Stathopoulos,² Antonios N. Maniatis,¹ and Spyros Pournaras^{1*}

¹Department of Microbiology, School of Medicine,¹ and Department of Biochemistry and Biotechnology, School of Health Sciences,²
University of Thessaly, Larissa, Greece

Received 17 May 2008/Returned for modification 21 June 2008/Accepted 5 August 2008

Community-type *Staphylococcus aureus* strains that are positive for *mecA* and PBP2a but appear phenotypically susceptible to oxacillin are increasingly reported worldwide. Four *S. aureus* clinical isolates carrying the *mecA* gene with oxacillin MICs of <2 µg/ml were tested for oxacillin efficiency by population analyses and experimental thigh infections. These isolates harbored staphylococcal cassette chromosome *mec* type IV and belonged to two genotypes. Two of the four isolates were found by population analysis to be truly oxacillin susceptible. All four isolates exhibited significant reductions in the numbers of colonies grown after dicloxacillin treatment of experimental thigh infections, as also did a *mecA*-negative *S. aureus* control strain. These observations indicate that some of the phenotypically oxacillin susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* isolates may be at least partially responsive to oxacillin.

Staphylococcus aureus isolates that either have oxacillin MICs higher than 2 µg/ml or harbor the *mecA* gene are considered methicillin resistant (MRSA) by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; formerly NCCLS) (12). Oxacillin resistance in *mecA*-positive isolates is due to the production of an altered form of penicillin-binding protein (PBP), designated PBP2a, which shows low affinity for beta-lactams (2). *S. aureus* strains that carry and express the *mecA* gene may exhibit oxacillin MICs ranging from <2 to >1,000 µg/ml and resistance phenotypes ranging from extremely heterogeneous (frequencies of highly resistant colonies, 10⁻⁷ or lower) to homogeneous (7, 13, 18).

It is generally believed that most *mecA*-positive, oxacillin-susceptible *S. aureus* strains exhibit oxacillin heteroresistance, even at a low frequency, and that the use of beta-lactams might lead to treatment failure (14). However, it is believed that chromosomal factors unrelated to the *mecA* gene, which confer different levels of the oxacillin-heterogeneous phenotype, should exist but remain unknown and are probably pleiotropic, complex, and strain dependent (13). In this context, one could anticipate that a proportion of nonheterogeneous, functionally oxacillin susceptible, *mecA*-positive *S. aureus* (OS-MRSA) strains also exist. The treatment alternatives for such isolates would thus be broadened, possibly including penicillinase-resistant beta-lactams. The aim of this study was to investigate by in vitro and in vivo experiments the characteristics of OS-MRSA strains and the possible efficiency of oxacillin against them, in a region where the rate of *mecA*-positive *S. aureus* is among the highest in Europe (4) and community-type OS-MRSA strains are increasingly isolated.

* Corresponding author. Mailing address: Department of Medical Microbiology, University Hospital of Larissa, Mezourlo, 411 10 Larissa, Greece. Phone: 30 2410 682929. Fax: 30 2410 681570. E-mail: poumaras@med.uth.gr.

[†] Published ahead of print on 11 August 2008.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and susceptibility testing. Four *mecA* gene-carrying *S. aureus* clinical isolates (SA 1306, SA 1326, SA 1552, and SA 4666) that were phenotypically oxacillin susceptible (oxacillin MIC, ≤1 µg/ml) and were collected from October to November 2006 were studied. A low-level (SA 6083; oxacillin MIC, 6 µg/ml; *mecA* positive) and a high-level (SA 2712; oxacillin MIC, 256 µg/ml; *mecA* positive) MRSA clinical isolate from our laboratory collection, as well as *S. aureus* ATCC strain 29213 (methicillin susceptible [MSSA], *mecA* negative), were included for comparison. Species identification was performed with the Vitek 2 system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) using an ID-GP card, and the initial antimicrobial susceptibility status was determined with a GPS-105 card. The oxacillin MIC was estimated by Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden) in Mueller-Hinton agar plates containing 2% NaCl and also by the agar dilution method according to CLSI guidelines (12) using 2-µg/ml increments for concentrations of 2 to 16 µg/ml. Susceptibility to other beta-lactams (ampicillin, amoxicillin-clavulanate, cefamandole, cephalexin, and imipenem) was tested by Etest.

Detection of PBP2a and the *mecA* gene, and typing assays. The Stidex MRSA latex agglutination test (bioMérieux) was performed to detect PBP2a. A PCR specific for the *mecA* gene, sequencing of *mecA*, and PCR typing of the staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) element were carried out with previously described primers and amplification conditions (9, 11). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of SmaI-digested genomic DNA was performed as previously described (19), and bands were compared visually (17). Multilocus sequence typing (MLST) was also performed (3). Sequences of both strands were determined at Lark Technologies, Inc. (Takesley, United Kingdom) and analyzed using DNASTar (Madison, WI) software (Lasergene, version 5.07); MLST types were assigned through the MLST database (<http://www.mlst.net>).

Population analysis assays. Overnight broth cultures were diluted in cation-adjusted Mueller-Hinton broth to a density equivalent to a 4 McFarland standard (approximately 10⁸ CFU). From this starting suspension, 100 µl (approximately 10⁸ CFU), 10 µl (approximately 10⁷ CFU), and 1 µl (approximately 10⁶ CFU) were spread onto Mueller-Hinton agar plates containing dicloxacillin (sodium dicloxacillin monohydrate, Diclocl; Bristol-Myers Squibb) according to the protocol originally described by Tomasz et al. (18). A lower inoculum of approximately 10⁴ CFU was spread for isolates that displayed confluent growth with the starting inocula given above. Dicloxacillin was incorporated into the plates in serial twofold dilutions for concentrations of 0.25 to 128 µg/ml, with 1-µg/ml increments from 1 to 6 µg/ml and 2-µg/ml increments from 6 to 16 µg/ml, in order to detect more precisely the changes in the susceptibilities of the heteroresistant populations. Colonies were counted after 48 h of growth at 35°C. The analysis was performed three times for all isolates, and the median CFU grown in each concentration was counted and plotted on a semilogarithmic graph. The population analysis protocol (18) was also performed after addition of 2% NaCl to the medium. Population analyses of the tested isolates were compared with those of the low- and high-level MRSA isolates and ATCC 29213.

TABLE 1. Characteristics of study isolates and data for experimental thigh infections

Isolate	Date of isolation (mo/day/yr)	Ward ^a	Specimen source	PFGE type	ST	SCCmec type	Oxacillin agar dilution MIC (μg/ml)	Highest oxacillin concn (μg/ml) at which cell growth occurred ^d	Avg log CFU ± SD (%) per g thigh tissue			Susceptibility status defined by Vitek 2 ^e	
									Untreated controls	Treated animals	P (treated vs untreated animals)	OXA	VAN
1306	10/2/06	MED	Sputum	Ia	728	IV	0.5	32	6.55 (8.6)	4.71 (9.7)	<0.001	R	S
1326	10/2/06	DERM	Urine	Ib	728	IV	0.25	0.5	6.6 (6.5)	4.50 (4.3)	<0.001	S	S
1552	10/4/06	HAEM	Pus	II	728	IV	1	64	6.25 (10.3)	3.75 (9.1)	<0.001	R	S
4666	11/1/06	DERM	Pus	Ic	728	IV	1	1	6.53 (8.3)	3.72 (10.4)	<0.001	S	S
6083	11/14/06	OBST	Skin	Ic	728	IV	6	128	7.45 (11.2)	5.02 (6.2)	<0.001	R	S
2712	6/22/07	Surgery	Blood	III	ND ^f	ND	256	>128	6.32 (3.6)	6.25 (8.8)	NS ^g	R	S
29213	NA ^h	ATCC ⁱ	NA	IV	ND	NA	0.125	0.5	6.70 (6.7)	1.18 (12.4)	<0.001	S	S

^a MED, medicine; DERM, dermatology; HAEM, hematology.

^b By population analysis.

^c OXA, oxacillin; VAN, vancomycin; S, susceptible; R, resistant.

^d ND, not determined.

^e NS, not significant.

^f NA, not applicable.

To determine the molecular stability of the *mecA* genotype, the colonies grown in the highest dicloxacillin concentration were tested by PCR for the presence of the *mecA* gene and also for PBP2a production, as described above. Because most clinicians treating infections due to *mecA*-positive *S. aureus* will be utilizing vancomycin, population analysis was also performed for vancomycin in parallel with dicloxacillin.

Oxacillin bactericidal assays. Overnight Mueller-Hinton broth cultures were diluted with cation-adjusted Mueller-Hinton broth, and approximately 10^8 to 10^7 CFU was inoculated into Mueller-Hinton broth containing 20 μg/ml dicloxacillin (14). Viable cells were counted by spreading 0.1-ml aliquots of the broth cultures at 0, 1, 3, 6, 9, 14, 24, 30, 42, and 48 h of incubation at 35°C. The analysis was performed three times for all isolates, and the median CFU grown in each concentration was counted and plotted on a semilogarithmic graph. A bactericidal assay was also performed for vancomycin at 10 μg/ml, as described previously (15).

Mouse thigh infection model. Male Wistar rats (body weight, 300 to 400 g) were utilized for experimental thigh infections following a previously described protocol (6). In brief, a starting inoculum of approximately 10^8 CFU/ml was prepared in Mueller-Hinton broth, and 100 μl was injected into the left thigh of the animal. Sterile water was injected into the right thigh. Two hours after the bacterial inoculation and every 6 h thereafter, dicloxacillin at 200 mg/kg of body weight was administered subcutaneously. The animal was sacrificed at 24 h; the thigh muscle was homogenized; and the number of viable CFU was counted after serial dilution of the homogenate. The infections were carried out in triplicate for the four *mecA*-positive, oxacillin-susceptible isolates as well as for the control strains ATCC 29213, SA 6083, and SA 2712. Also, triplicate control experiments were performed with oxacillin-susceptible, *mecA*-positive isolates that were injected in the left thigh but not treated with dicloxacillin. The colonies grown from the infected thighs were tested for the presence of the *mecA* gene and for production of PBP2a.

Statistical analysis. A *t* test of mean CFU values obtained in the mouse thigh infection model was performed using GraphPad Prism software, version 4.00 (GraphPad Software, Inc.). Data for which the *P* value was <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

The oxacillin MICs of the four study isolates by both Etest and agar dilution ranged from 0.25 to 1 μg/ml. Two of the four isolates were also classified as susceptible to oxacillin by the Vitek 2 system. All isolates were susceptible to vancomycin, teicoplanin, linezolid, and quinupristin-dalfopristin. Two isolates were also susceptible to clindamycin, erythromycin, and fusidic acid, and one was also susceptible to tetracycline. All four isolates were also found by Etest to be susceptible to ampicillin, amoxicillin-clavulanate, cefamandole, cephalixin,

and imipenem. A PBP2a latex agglutination test was positive for the four study isolates. PCR was positive for the *mecA* gene, and its nucleotide sequence in the four isolates was identical to that previously described for several MRSA strains, including *S. aureus* COL (5; GenBank accession number CP000046). The four isolates belonged to two unrelated genotypes, of which the more common strain pattern, which also included the control strain SA 6083, exhibited three subtypes differing from each other by one to two bands (Table 1). It should be noted that PFGE profile I (Table 1) was similar to the PFGE profile of a previously reported strain from southwestern Greece (type C, sequence type 80 [ST-80] [1]). MLST results showed that the four isolates of PFGE type I belong to ST-728 (allelic profile, 1-3-1-14-11-27-10), which is a single-band variant of ST-80. All isolates carried SCCmec type IV, as shown by PCR typing.

Population analysis showed that two of the isolates (SA 1326 and SA 4666) (Table 1) were phenotypically oxacillin susceptible: the highest oxacillin concentrations at which cell growth occurred were 0.5 and 1 μg/ml, respectively. The remaining two isolates (SA 1306 and SA 1552) grew at oxacillin concentrations as high as 32 and 64 μg/ml, respectively. The low-level-resistant isolate, SA 6083, grew at oxacillin concentrations as high as 128 μg/ml, while the populations of the high-level-resistant isolate, SA 2712, remained unaffected up to 128 μg/ml (Fig. 1A). After the addition of 2% NaCl to the medium, the oxacillin-susceptible isolates SA 1326 and SA 4666 grew at oxacillin concentrations as high as 1 and 2 μg/ml, respectively. The colonies grown in the highest dicloxacillin concentration in the population analysis still carried and expressed the *mecA* gene in all isolates, including the nonheterogeneous isolates SA 1326 and SA 4666, suggesting the stability of the *mecA* genotype. Time-kill kinetics showed that at 24 h, oxacillin had bactericidal activity for the oxacillin-susceptible isolates (SA 1306, SA 1326, SA 1552, SA 4666, and ATCC 29213) as well as for the low-level-resistant control, SA 6083, while the high-level oxacillin-resistant control, SA 2712, remained unaffected (Fig. 2). All isolates were susceptible to narrow-spectrum vancomycin in population analyses (Fig. 1B), and time-kill curves

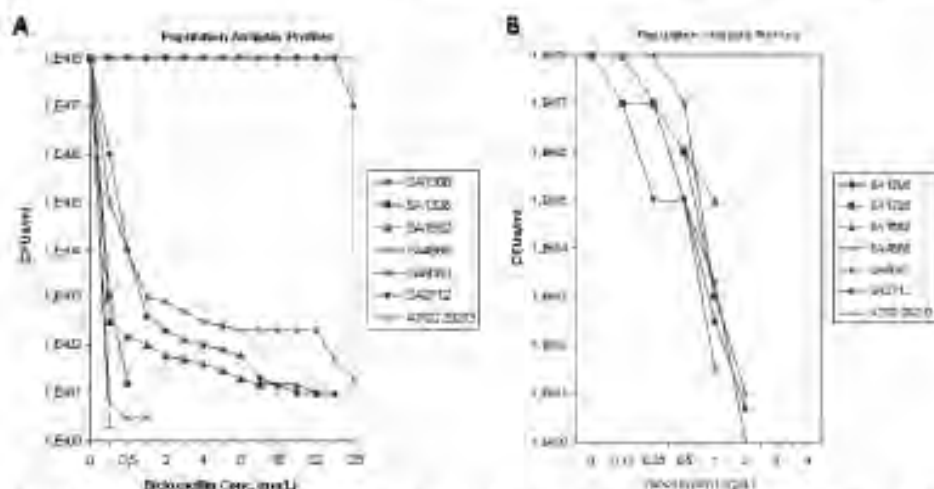


FIG. 1. Population analysis profiles of the study isolates for dicloxacillin (A) and vancomycin (B). Each symbol represents the mean for three replicates.

showed vancomycin bactericidal activity at a level similar to that reported previously for community-associated MRSA (15).

Testing of oxacillin efficiency in the experimental mouse thigh model showed no significant differences in the number of

colonies yielded 24 h after inoculation between the four *mecA*-positive, oxacillin-susceptible isolates and the oxacillin-susceptible, *mecA*-negative isolate (ATCC 29213) (Table 1). For all four study isolates, statistically significantly fewer colonies were obtained from the dicloxacillin-treated animals than from their respective untreated controls ($P < 0.001$). The colonies yielded from all infected thighs also carried and expressed the *mecA* gene and had susceptibility profiles similar to those of the respective clinical isolates.

DISCUSSION

S. aureus clinical isolates that carry the *mecA* gene but appear phenotypically oxacillin susceptible have been increasingly reported recently (7, 14). It has been suggested that such isolates could be classified as a new type of MRSA, designated OS-MRSA, which may be misclassified as MSSA in the daily routine if only susceptibility to antimicrobials is tested (7). It is generally believed that when treating OS-MRSA infections, we should take precautions, because treatment with beta-lactam antibiotics may result in the emergence of highly resistant MRSA, which is attributable to the presence of the *mecA* gene (14). However, new types of hetero-MRSA strains that are phenotypically susceptible to narrow-spectrum cephalosporins and imipenem have recently been observed in hospitals (10). In this study, we investigated *S. aureus* clinical isolates that were *mecA* positive but exhibited oxacillin MICs of ≤ 1 µg/ml and were susceptible to various beta-lactams. Two of the study isolates were misclassified as MSSA by the very sensitive Vitek 2 system (14). During population analysis, these isolates grew at low oxacillin concentrations.

The observations of the present study raise the need for identification of additional putative genetic factors that could play an important role in this degree of heteroresistance. It is evident that any factor playing a role in cell wall synthesis and assembly could represent such a putative factor. For example, the profound disturbance of cell wall metabolism associated

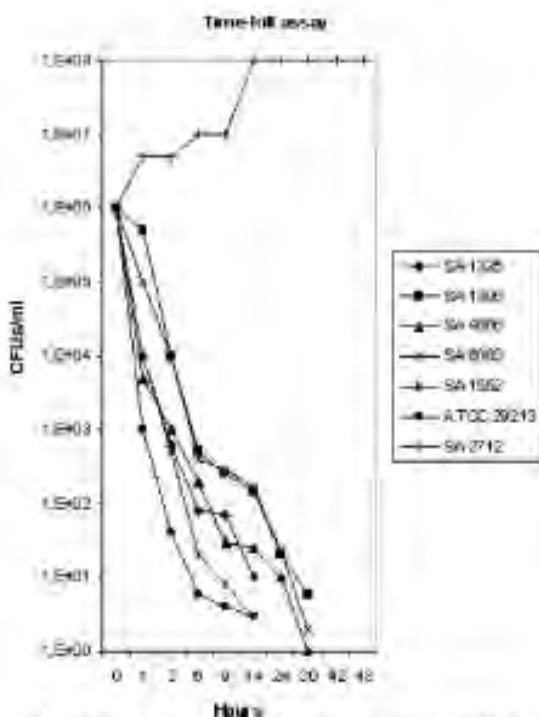


FIG. 2. Oxacillin bactericidal assay of the study isolates in Mueller-Hinton broth with 20 µg/ml dicloxacillin. Each symbol represents the mean for three replicates.

with vancomycin resistance has been correlated previously with suppression of the methicillin resistance level in those bacteria ("seesaw" effect) (16). Furthermore, since oxacillin resistance levels depend strongly on environmental conditions, specific global regulatory networks should exist and play a role in heterogeneous resistance, and their activation or suppression would lead to the pleiotropic effects that allow for "susceptible" or highly resistant subclones (13). Also, alterations in the activity of autolysins, which have been shown to affect the level of methicillin resistance, should be investigated more closely (13). A recent report (8) showed that deletion of the important (but not essential for viability) *FemA* and *FemB* factors, which are involved in cell wall synthesis, could lead to a global transcriptional rearrangement in *S. aureus* involving oxacillin responsiveness. In this context, DNA array analysis showed that specific genes whose expression was down- or upregulated in *FemA-FemB* deletion mutant strains represent major metabolic pathways that have, so far, been considered uncoupled. Finally, it is possible that random gene rearrangements through transposons or insertion sequences could lead to stable genetic alterations that could contribute to heterogeneous expression of oxacillin resistance.

Whatever the underlying reasons, it is evident from our report that although *mecA* detection and expression are prerequisites for methicillin resistance, such a genotype does not guarantee phenotypic methicillin resistance. The effort to elucidate the causes of heteroresistance should be expanded to the detection and characterization of new molecular targets that could be associated with the atypical susceptibility that many nosocomial *S. aureus* strains already exhibit. Elucidation of the origins of heteroresistance to methicillin may also contribute to the discovery of new targets for antibiotics (13).

From the results of the present study, the response of the study isolates to oxacillin apparently lies between that of a fully susceptible strain (ATCC 29213) and that of a highly resistant MRSA strain. Since more "susceptible" MRSA clones are gradually emerging worldwide, investigation of the origins of heteroresistance and of a putative degree of activity for oxacillin, compared with vancomycin, against OS-MRSA strains, may provide some insights on possible therapeutic alternatives. However, based on the current knowledge that some strains become more homogeneously oxacillin resistant when exposed to oxacillin *in vitro* and *in vivo*, additional animal models are clearly needed in order for similar assumptions to be substantiated. In this context, experiments involving larger collections of isolates and direct comparisons of oxacillin versus vancomycin efficiency are currently in progress.

When we compared previously reported OS-MRSA appearances in other regions (7, 14), we noticed that such isolates are quite common in our region. Particularly, during the 1-year period from August 2006 to July 2007, 26 of 167 (15.5%) *mecA*-positive strains were OS-MRSA (oxacillin Etest MICs in 2% NaCl, <2 µg/ml), while from August 2007 to April 2008, the respective proportion dropped to 11.8% (22 of 187). In this context, we are currently screening all *S. aureus* isolates with oxacillin MICs ranging from 0.25 to 16 µg/ml for PBP2a production, in order to annotate OS-MRSA strains correctly. In addition, we are currently investigating genetic factors that

could affect the expression of the oxacillin resistance phenotype in such strains.

REFERENCES

- Aires de Sousa, M., C. Bartzavali, I. Spiliopoulou, I. S. Sanchez, M. I. Crisostomo, and H. de Lencastre. 2003. Two international methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones endemic in a university hospital in Patras, Greece. *J. Clin. Microbiol.* 41:2027–2032.
- Chambers, H. F., and M. Sachdeva. 1990. Binding of beta-lactam antibiotics to penicillin-binding proteins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 161:1170–1176.
- Earight, M. C., N. P. Day, C. E. Davis, S. J. Peacock, and B. G. Spratt. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 38:1006–1015.
- European Antimicrobial Resistance Surveillance System. 2002. Annual report EARSS—2001. European Antimicrobial Resistance Surveillance System, Bilthoven, The Netherlands.
- Gill, S. R., D. E. Fouts, G. L. Archer, E. F. Mongodin, R. T. DeBoy, J. Ravel, I. T. Paulsen, J. F. Kolonay, L. Brinkac, M. Beaman, R. J. Dodson, S. C. Daugherty, R. Madupu, S. V. Angiuoli, A. S. Durkin, D. H. Haft, J. Vamathean, H. Khouiri, T. Uckerback, C. Lee, G. Dimitrov, L. Jiang, H. Qin, J. Weidman, K. Tran, K. Kang, I. R. Hanes, K. E. Nelson, and C. M. Fraser. 2005. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J. Bacteriol.* 187:2428–2438.
- Gossens, W. H., P. Fontijn, and M. F. Michel. 1984. Responses of tolerant and nontolerant *Staphylococcus aureus* strains to methicillin treatment in an experimental infection in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26:829–832.
- Hosozuka, Y., H. Horaki, H. Endo, Y. Suzuki, Z. Nagasawa, Y. Otsuka, T. Nakae, and K. Suzuki. 2007. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. *J. Infect. Chemother.* 13:79–85.
- Hübner, J., A. Jansen, O. Kottig, J. Schäfer, P. A. Majcherowicz, L. G. Harris, G. Bierbaum, M. Heinemann, and B. Berger-Bächi. 2007. Living with an imperfect cell wall: compensation of *femA4B* inactivation in *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics* 8:307.
- Jarrard, S., C. Meagel, J. Thiolouze, G. Lina, H. Meunier, F. Forey, X. Neume, J. Biennac, and F. Vandenesch. 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect. Immun.* 70:631–641.
- Kishi, K., T. Ito, S. Watanabe, K. Okazumi, and K. Hiramoto. 7 May 2008. Recurrence of heterogeneous methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among the MRSA clinical isolates in a Japanese university hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* doi:10.1093/jac/dkn185.
- Milheirico, C., D. C. Oliveira, and H. de Lencastre. 2007. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element type in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:3374–3377.
- NCCLS. 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 6th ed. Approved standard. NCCLS publication M7-A6. NCCLS, Wayne, PA.
- Rohrer, S., H. Maki, and B. Berger-Bächi. 2003. What makes resistance to methicillin heterogeneous? *J. Med. Microbiol.* 52:605–607.
- Sakoulas, G., H. S. Gold, L. Venkataraman, P. C. DeGirokami, G. M. Efopoulos, and Q. Qian. 2001. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. *J. Clin. Microbiol.* 39:3946–3951.
- Shuburne, S. A., D. M. Musker, K. Halton, H. Connor, M. Y. Lu, I. Bheika, and R. J. Hamill. 2004. *In vitro* killing of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* with drug combinations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:4016–4019.
- Sieradzki, K., and A. Tomasz. 1997. Inhibition of cell wall turnover and autolysis by vancomycin in a highly vancomycin-resistant mutant of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 179:2557–2566.
- Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Michelson, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33:2233–2239.
- Tomasz, A., S. Nachman, and H. Leaf. 1991. Stable clones of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:124–129.
- van Belkum, A., W. van Leeuwen, M. E. Kaufmann, E. Cookson, F. Forey, J. Eklund, R. V. Goering, F. Tenover, C. Steward, F. O'Brien, W. Grab, P. Tassios, N. Logakia, A. Morvan, N. El Solh, R. de Ryck, M. Struelens, S. Salmenlinna, J. Vuopio-Varkki, M. Kooistra, A. Talens, M. W. Witte, and H. Verbruggen. 1998. Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis of *Sma*I macrorestriction fragments: a multicenter study. *J. Clin. Microbiol.* 36:1653–1659.



Virulence of *Acinetobacter baumannii* exhibiting phenotypic heterogeneous growth against meropenem in a murine thigh infection model

Evangelia Neou¹, George Michail¹, Athanassios Tsakris², Spyros Pournaras^{1,*}

¹Department of Microbiology, Medical School, University of Thessaly, Larissa, Greece

²Department of Microbiology, Medical School, University of Athens, Athens, Greece

E-Mails: lilianneou@yahoo.com (E. N.); michailgeorge@hotmail.com (G. M.); atsakris@med.uoa.gr (A. T.);
pournaras@med.uth.gr (S. P.)

EN and GM contributed equally to this article

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: pournaras@med.uth.gr; Tel.: +30-2413-502929.

Acinetobacter baumannii may exhibit phenotypic heterogeneous growth under exposure to antibiotics. We investigated the *in vitro* characteristics of *A. baumannii* isolates grown heterogeneously in the presence of meropenem and their virulence evaluated in experimental infections treated with meropenem. Five clinical *A. baumannii* isolates and the respective heterogeneously grown subpopulations were tested by agar dilution MIC testing, PFGE, population analysis using meropenem and growth curves. The virulence of isolates and the therapeutic efficacy of three meropenem dosing schemes was evaluated in a neutropenic murine thigh infection model. The clinical isolates were meropenem-susceptible (MICs 0.25 to 4 mg/liter) and exhibited three distinct PFGE patterns. In all clinical isolates, population analysis yielded heterogeneously grown colonies. After seven subcultures in antibiotic-free media, resistant MIC levels were retained in two isolates (heteroresistant), while three isolates reversed to susceptible MICs (persisters). Clinical isolates and heterogeneous subpopulations had similar growth rates. The heterogeneously grown *A. baumannii* subpopulations had reduced virulence, killing considerably fewer animals than the respective clinical isolates without treatment. The meropenem treatment outcome was similar in infections caused by the clinical and the heterogeneous isolates, irrespective to their MICs. *In vitro* meropenem exposure induces phenotypic heterogeneous growth in *A. baumannii*. Compared with the parental clinical isolates, the heterogeneously grown subpopulations exhibited lower virulence, killing fewer mice and responding equally to meropenem treatment despite their higher MICs.

Keywords: Heteroresistance; persisters; virulence; experimental infections

1. Introduction

Acinetobacter baumannii has been an important nosocomial pathogen for the past 30 years, frequently implicated in ventilator-associated pneumonia, bloodstream infections and urinary tract infections [1]. Ubiquity and propensity to develop antibiotic resistance make *A. baumannii* a common yet difficult-to-treat hospital pathogen [2], which often needs the use of carbapenems as treatment of last resort.

During the last few years, reduced susceptibility or resistance to carbapenems is increasingly observed among *A. baumannii* clinical isolates [3,4]. A further worrisome observation is heteroresistance of *A. baumannii* to antibiotics, such as colistin or carbapenems [5,6,7], which may have implications for the treatment of *A. baumannii* infections. We have previously demonstrated that meropenem pressure on *A. baumannii* can produce subpopulations with heterogeneous expression of resistance, reflected by colonies grown within the zone of inhibition around meropenem disks or Etest strips [7,8]. These colonies may represent truly resistant subpopulations with stable changes in their genome associated with antimicrobial resistance (heteroresistance), or they may be related to subpopulations able to persist in a latent state in the presence of antimicrobials (bacterial persistence) [9]. Inherent heterogeneity of bacterial populations may contribute to their adaptation to fluctuating environments and to the persistence of bacterial infections [10].

So far, there are scarce reports of experimental infections caused by *A. baumannii* and treated with carbapenems, such as meropenem [11]. Also, to the best of our knowledge, there is no data on the therapeutic activity of meropenem against infections caused by *A. baumannii* with phenotypic heterogeneous growth against carbapenems. We present herein the characteristics of *A. baumannii* clinical isolates with phenotypic heterogeneous growth against meropenem as well as their infectivity and the meropenem therapeutic efficacy evaluated in neutropenic murine thigh infections.

2. Results and Discussion

Phenotypic assays

The characteristics of the study isolates are shown in Table 1. All clinical isolates were initially classified as meropenem susceptible by the Vitek2 system and exhibited susceptible agar dilution MICs for meropenem that ranged from 0.25 to 4 mg/L. However, population analysis assays yielded colonies that grew in the presence of meropenem at 8 to 32 mg/L for all clinical isolates. All isolates were susceptible to colistin and exhibited various susceptibility profiles to other antimicrobials.

After seven daily subcultures in antibiotic-free medium, the colonies of two clinical isolates (Ab1 and Ab5) that grew in the highest meropenem concentration, exhibited stable meropenem resistance (heteroresistance). In the remaining three clinical isolates (Ab2, Ab3, Ab4), heterogeneously grown colonies reversed to low meropenem MICs, which were similar to those of the respective clinical isolates (persistence).

Table 1. Characteristics of the study isolates.

Isolate	Ward	Specimen	Resistance status to antimicrobials	PFGE	Agar dilution MEM MIC (mg/L)	Highest MEM concentration of growth in population analyses (mg/L)	^b Agar dilution MIC (mg/L) of MEM grown subpopulations
Ab1	ORL	Blood	SAM, CIP, COL, MEM	I	4	16	32
Ab2	Neurosurgery	Blood	GEN, TOB, CIP, SAM, MEM, COL	II	1	8	1
Ab3	Pathology	Urine	GEN, TOB, SAM, MEM, COL	I	2	8	1
Ab4	Pulmonary	Sputum	GEN, SAM, MEM, COL	I	4	16	2
Ab5	Pathology	CSF	GEN, TOB, SAM, MEM, COL	III	2	32	> 32

^a CIP, ciprofloxacin; COL, colistin; GEN, gentamicin; MEM, meropenem; SAM, ampicillin/sulbactam; TOB, tobramycin.

^b These MICs were estimated after one week daily subcultures in antibiotic-free medium.

The growth rates of the clinical isolates did not differ considerably from those of the heterogeneously grown subpopulations (data not shown).

PFGE and PCR assays. PFGE analysis discriminated three distinct genotypes among the *A. baumannii* clinical isolates, with the patterns of the heterogeneously grown subpopulations to be indistinguishable from those of the respective clinical isolates. PCR was positive only for the intrinsic *bla*_{OXA-51-like} carbapenemase, while

was negative for ISAb_a1 elements upstream of the *bla*_{OXA-51-like} carbapenemase gene and also for genes encoding acquired carbapenemases.

Thigh infection model

Untreated mice. All 15 mice that were infected by the 5 clinical isolates and were not given treatment died in <24h. The 6 untreated mice infected by 2 meropenem-persisting subpopulations (Ab3 and Ab4) also died in <24h, while the 9 mice infected by 1 persister and 2 heteroresistant subpopulations (Ab1h, Ab2h, Ab5h) survived 24h. These results indicate a relatively higher virulence of the clinical isolates compared with the heterogeneously grown subpopulations.

Mice treated with 20 mg/kg meropenem. Under 20 mg/kg meropenem treatment, 8/15 mice infected with clinical isolates, while only 1/15 mice infected with heterogeneous subpopulations died in <24h, also indicating a relatively higher virulence of the clinical isolates. No significant decrease in colonies grown was observed for all 30 mice that received 20 mg/kg treatment compared with untreated ones ($P>0.05$).

Mice treated with 100 mg/kg meropenem. The outcome of 100 mg/kg meropenem treatment was similar for the clinical isolates and the heterogeneously grown subpopulations (13/15 mice infected by clinical isolates and 14/15 mice infected by heterogeneous subpopulations survived 24h), despite the higher MICs of the latter populations. No significant decrease in colonies grown was observed for all 30 mice given 100 mg/kg treatment compared with untreated ones ($P>0.05$).

Mice treated with 400 mg/kg meropenem. All 30 mice infected by the clinical isolates and the heterogeneously grown subpopulations survived 24h under 400 mg/kg meropenem treatment. A significant decrease ($P<0.05$) in colony counts was observed for 12/15 mice infected by 4 clinical isolates and for all 15 mice infected by heterogeneous subpopulations, compared with untreated mice. For the 3 mice infected by the clinical isolate Ab1, no significant decrease in colonies grown was observed despite treatment compared

with untreated ones ($P>0.05$) despite being meropenem susceptible, indicating its higher infectivity compared with the respective heterogeneous subpopulation.

In contrast with the *A. baumannii* isolates, all 12 mice infected by the *E. coli* ATCC 25922 strain survived 24h with 20, 100 and 400 mg/kg meropenem or without treatment.

During the last few years, *A. baumannii* isolates that exhibit carbapenem resistance are increasingly isolated and pose substantial therapeutic problems in many regions worldwide [22]. Furthermore, the ability of *A. baumannii* cells to survive under considerably higher carbapenem concentrations (phenotypic heterogeneous growth) may have implications for the treatment of multiresistant *A. baumannii* infections [23] and poses concerns. The observations of a previous study suggested that *A. baumannii* isolates that are apparently meropenem-susceptible by standard susceptibility testing may contain a certain amount of phenotypically meropenem-resistant subpopulations [7]. These subpopulations may have stably elevated meropenem MICs due to permanent genomic changes and are considered heteroresistant or may simply persist in a latent state in the presence of antimicrobials and exhibit susceptible MICs when they grow without meropenem exposure (persisters) [10].

Drug resistance in bacteria can be associated with a biological fitness cost [24]. It has been proposed that the magnitude of this cost is the primary factor that influences the rate of resistance development, the stability of the resistance, and the rate at which the resistance might decrease if antibiotic use were reduced. However, mutants with no measurable cost have also been observed. It has been proposed that environmental conditions affect fitness cost and the cost of drug resistance can be reduced by regulation of the resistance mechanism or cost compensation [25].

In the present study, heteroresistant phenotype was observed in two isolates, which retained meropenem MICs of 32 mg/L or higher, while three isolates exhibited a persister phenotype, with MICs to return to the susceptible range after seven daily subcultures without antibiotic presence. To investigate the hypothesis that

the acquisition of resistance causes a fitness cost to the bacterial cells and to estimate the therapeutic response of meropenem treatment, we performed experimental neutropenic thigh infections. Three meropenem dosing schemes were used, as there is a paucity of data on *A. baumannii* infections treated with meropenem and the only scheme previously applied on *A. baumannii* [20 mg/L, reference 11] exhibited very poor therapeutic responses in our preliminary experiments.

The results of the experimental infections suggested that heterogeneously grown *A. baumannii* subpopulations have lower virulence compared with the clinical isolates, as 9/15 untreated animals infected by persisters or heteroresistant subpopulations survived, while all untreated mice infected by clinical isolates died. These results probably reflect a fitness cost conferred by mutations related to the expression of the heterogeneous mode of growth against meropenem. The lower virulence of the phenotypic heterogeneous subpopulations is also reflected by the observation that the lowest meropenem dosage (20 mg/kg/8h) conferred survival of 14/15 mice infected by persisters or heteroresistant subpopulations in contrast with only 7/15 mice infected by clinical isolates to survive. Finally, the infection outcome under meropenem treatment was overall not correlated with the meropenem MICs, even in stably resistant heterogeneous populations, further suggesting their impaired virulence.

3. Experimental

Study isolates and susceptibility testing. The study included five *A. baumannii* clinical isolates from our collection and the *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 strains as controls. Susceptibility status to β -lactams, aminoglycosides, quinolones and colistin was performed by the Vitek2 automated system (BioMerieux, Marcy l' Etoile, France) and disk diffusion (12). Agar dilution meropenem MIC testing [12] was performed for the clinical isolates and for subpopulations grown at the highest meropenem concentrations in population analysis assays.

PFGE and PCR assays. Genetic relationship of the isolates was tested by PFGE of *Apal*-digested genomic DNA [7] and the banding patterns were compared visually using previously proposed criteria [13]. PCR for the intrinsic *bla*_{OXA-51-like} allele and for genes encoding known class B and D carbapenemases were performed as described previously [14, 15, 16].

Population analyses. Population analyses using meropenem were performed in triplicate for all isolates. Phenotypically heterogeneous subpopulations were yielded by spreading approximately 10⁸ bacterial CFU on Mueller-Hinton agar plates with meropenem concentrations ranging from 0.5 to 32 mg/liter and incubating the plates for 48 h. *P. aeruginosa* ATCC 27853 was used as control for the population analysis experiments. Colonies grown in the highest drug concentration (heterogeneous subpopulations) were tested for meropenem MIC directly from the population analysis plates and after one week daily subcultures in antibiotic-free medium to test for the stability of the phenotype. One colony of the seventh subculture for each strain (Ab1h, Ab2h, Ab3h, Ab4h and Ab5h) was selected for use in the thigh-infection model along with the respective clinical isolates (Ab1, Ab2, Ab3, Ab4 and Ab5).

Growth curves. Growth curves were determined by diluting 0.1 mL of overnight Mueller–Hinton broth culture of the clinical isolates and heterogeneously resistant subpopulations in 15 mL of broth followed by incubation at 37^o C under constant shaking. The optical density of a 1 mL aliquot of each broth culture was determined at each hour for 16 h.

Thigh infection model. Animal studies were approved by the Ethics Committee of Medical School, University of Thessaly and conformed to the European Union guidelines. In each model, six-week-old, specific-pathogen-free, female Bagg inbred albino c-strain (BALB/c) mice (12- poster) weighing 23 to 27 g were used in each test group [17]. Mice were rendered neutropenic (neutrophils <100/μl) by intraperitoneal cyclophosphamide on day 4 (150 mg/kg) and on day 1 (100 mg/kg) before thigh infection [18], were anaesthetized with ketamine/xylazine and thigh infections were produced by injecting 0.1 ml of bacterial

suspension of 10^7 CFU/ml of each strain 2h before giving meropenem therapy [19]. The infections were done in triplicate for all isolates. After mice were infected, they were given meropenem treatment for 24 h. As therapeutic protocols of experimental infections caused by *A. baumannii* have been scarcely reported, we used three meropenem dosing schemes: i) 20 mg/kg/8h that was applied previously in a study with *A. baumannii* isolates [11], ii) 100mg/kg/12h [20] and iii) 400mg/kg/8h [21], which were both applied on mice infections caused by *P. aeruginosa*. Equal numbers of animals remained untreated as controls. Mice either died from infection or were sacrificed at 24h; thigh muscles were homogenized and plated after serial dilutions, for CFU determination. The thigh CFU count was expressed as log₁₀ CFU/thigh muscle. A t-test was used for statistical analysis. For all experiments, a *P* value of ≤ 0.05 was considered indicative of statistical significance. All statistical analyses were performed using Minitab software (version 13.31).

4. Conclusions

In conclusion, *in vitro* meropenem exposure of *A. baumannii* isolates may induce phenotypic expression of heterogeneous resistance. This phenomenon is reversible for some isolates (persisters), but could also be permanent when associated with stable changes in genome of *A. baumannii* (heteroresistance) [9]. However, the clinical importance of this phenomenon remains unknown. Our results indicate that the effect of the meropenem heterogeneous growth to the infectious process seems to be equivocal, as the virulence of the heterogeneous isolates is lower than that of the clinical isolates, while the meropenem treatment outcome seems not to be affected due to the elevated meropenem MICs.

Conflict of Interest. The authors declare no conflict of interest.

References

1. Fournier PE, Richet H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities., *Clin Infect Dis* **2006**, 42, 692-9.
2. Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* **2006**, 43, 49-56.
3. Bogaerts P, Naas T, Wybo I, Bauraing C, Soetens O, Piérard D, Nordmann P, Glupczynski Y. Outbreak of infection by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-58 in Belgium. *J Clin Microbiol* **2006**, 44, 4189-92.
4. Tsakris A, Tsioni C, Pournaras S, Polyzos S, Maniatis AN, Sofianou D. Spread of low-level carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care Greek hospital. *J Antimicrob Chemother* **2003**, 52,1046-7.
5. Hawley JS, Murray CK, Jorgensen JH. Colistin heteroresistance in *Acinetobacter* and its association with previous colistin therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **2008**, 52, 351-2.
6. Lee HY, Chen CL, Wang SB, Su LH, Chen SH, Liu SY, Wu TL, Lin TY, Chiu CH. Imipenem heteroresistance induced by imipenem in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanism and clinical implications. *Int J Antimicrob Agents* **2011**, 37, 302-8.
7. Ikonomidis A, Neou E, Gogou V, Vrioni G, Tsakris A, Pournaras S. Heteroresistance to meropenem in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* **2009**, 47, 4055-9.
8. Pournaras S, Ikonomidis A, Markogiannakis A, Maniatis AN, Tsakris A. Heteroresistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* **2005**, 55, 1055-6.
9. Wiuff C, Zappala RM, Regoes RR, Garner KN, Baquero F, Levin BR. Phenotypic tolerance: antibiotic enrichment of noninherited resistance in bacterial populations. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**, 49, 1483–94.

10. Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* **2004**, 305, 1622–5.
11. Ko WC, Lee HC, Chiang SR, Yan JJ, Wu JJ, Lu CL, Chuang YC. In vitro and in vivo activity of meropenem and sulbactam against a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **2004**, 53, 393-395.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, seventeenth informational supplement. **2007**, M100-S17.
13. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B, Arbeit R. D. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing, *J Clin Microbiol* **1995**, 33, 2233-9.
14. Pournaras S, Markogiannakis A, Ikonomidis A, Kondyli L, Bethimouti K, Maniatis AN, Legakis NJ, Tsakris A. Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* **2006**, 57, 557-61.
15. Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y. Novel acquired metallo- β -lactamase gene, bla_{SIM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**, 49, 4485-91.
16. Oh EJ, Lee S, Park YJ, Park JJ, Park K, Kim SI, Kang MW, Kim BK. Prevalence of metallo- β -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo- β -lactamase. *J Microbiol Methods* **2003**, 54, 411–418.
17. Hegde SS, Reyes N, Skinner R, Difuntorum S. Efficacy of telavancin in a murine model of pneumonia induced by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2008**, 61, 169–172.

18. Andes D., W. A. Craig. In vivo activities of amoxicillin and amoxicillin-clavulanate against *Streptococcus pneumoniae*: application to breakpoint determinations. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**, 42, 2375–2379.
19. Dudhani RV, Turnidge JD, Nation RL, Li J. fAUC/MIC is the most predictive pharmacokinetic/pharmacodynamic index of colistin against *Acinetobacter baumannii* in murine thigh and lung infection models. *J Antimicrob Chemother* **2010**, 65, 1984-90.
20. Morinaga Y, Yanagihara K, Nakamura S, Yamamoto K, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yamada Y, Kohno S, Kamihira S. In vivo efficacy and pharmacokinetics of tomopenem (CS-023), a novel carbapenem, against *Pseudomonas aeruginosa* in a murine chronic respiratory tract infection model. *J Antimicrob Chemother* **2008**, 62, 1326-31.
21. Tam VH, Ledesma KR, Schilling AN, Lim TP, Yuan Z, Ghose R, Lewis RE. In vivo dynamics of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* selection after suboptimal dosing. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2009**, 64, 427-33.
22. Gaynes, R., J. R. Edwards, and the National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis* **2005**, 41, 848–854.
23. Fernández Cuenca F, Sánchez Mdel C, Caballero-Moyano FJ, Vila J, Martínez-Martínez L, Bou G, Baño JR, Pascual A. Prevalence and analysis of microbiological factors associated with phenotypic heterogeneous resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* **2012**, 39, 472-7.
24. Fernández-Reyes M, Rodríguez-Falcón M, Chiva C, Pachón J, Andreu D, Rivas L. The cost of resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii*: proteomic perspective. *Proteomics*. **2009**, 9, 1632-45.
25. Beining Guo, Kamilia Abdelraouf, Kimberly R. Ledesma, Michael Nikolaou and Vincent H. Tam . Predicting bacterial fitness cost associated with drug resistance. *J Antimicrob Chemother* **2012**, 67, 928–932.

Meropenem treatment of experimental thigh infections caused by meropenem-heteroresistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates

G. Michail¹, E. Neou¹, A. Tsakris², S. Pournaras¹

¹Department of Microbiology, Medical School, University of Thessaly, Mezourlo, Larissa,

²Department of Microbiology, Medical School, University of Athens, Athens

Introduction and Purpose:

Acinetobacter baumannii is an opportunistic pathogen associated with severe hospital infections. Multi-drug resistance of the species often necessitates the use of carbapenems as last resort treatment for such strains.

Carbapenem-heteroresistant subpopulations are manifested as distinct colonies grown within the inhibition halo around discs or Etest strips (1).

In a previous study we investigated by in vitro assays carbapenem heteroresistance, the traits of the heteroresistant subpopulations and the efficacy of carbapenems against heteroresistant *A. baumannii* (2).

The current study investigated the efficacy of meropenem treatment in experimental infections caused by meropenem-heteroresistant *A. baumannii* clinical isolates.

Material - Methods:

The study included 12 strains: native populations of 5 meropenem-susceptible *A. baumannii* strains and the respective 5 meropenem-heterogeneous subpopulations (colonies grown at highest meropenem concentrations in population analyses), as well as a non-heteroresistant meropenem-susceptible isolate (AB13) and the *Escherichia coli* strain ATCC 25922 as controls.

Susceptibility status to β -lactams, aminoglycosides, quinolones and colistin was performed by the Vitek 2 system and disk diffusion, while meropenem was also tested by agar dilution.

Genetic relationship of the isolates was tested by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of *ApelI*-digested genomic DNA (Table 1).

PCR for genes encoding known class B and D carbapenemases and the intrinsic *bla*_{OXA-51-like} allele was performed. Nucleotide sequence of both strands of PCR products was determined and sequence analysis was carried out. (Table 1).

Population analyses with meropenem were performed three times for all isolates (10). The stability of carbapenem MICs of three distinct colonies grown in the highest drug concentration was determined by agar dilution after one week daily subcultures in an antibiotic-free medium and was compared to the respective values of the native populations (Table 1).

Growth curves were determined by diluting 0.1 mL of overnight Mueller-Hinton broth culture of the study isolates in 15 mL of broth followed by incubation at 37°C under constant shaking. The optical density of a 1 mL aliquot of each broth culture was determined at each hour for 18 h.

Animal studies were approved by the Ethics Committee of Medical School, University of Thessaly and conformed to the European Union guidelines. In each model, six-week-old, specific-pathogen-free, female Bagg interof albino c-strain (BALB/c) mice (12) weighing 23 to 27 g were used in each test group (13). Animals were housed in regulation cages with food and water ad libitum. Mice were rendered neutropenic (neutrophils <100/mm³) by injecting cyclophosphamide intraperitoneally on day 4 (150 mg/kg) and on day 1 (100mg/kg) before thigh infection (14). Mice were anaesthetized intraperitoneally with 30 μ l of ketamine/xylazine (5:1) and thigh infections with each of the strains were produced by injecting 0.1 ml of bacterial suspension of 7 log₁₀ CFU/ml 2h before receiving therapy with each agent (15). The infections were done in triplicate for all isolates. After mice were infected, they were treated for 24 h with meropenem at 20 mg/kg/12h (16), 100 mg/kg/12h (17) and 400mg/kg/12h (18) and equal numbers of animals remained untreated as controls. Mice died from infection or sacrificed at 24h, thigh muscles were homogenized, serially diluted and plated for CFU determination. The thigh CFU count was expressed as log₁₀ CFU/thigh muscle. A t-test was used for statistical analysis. For all experiments, a P value of \leq 0.05 was considered indicative of statistical significance. All statistical analyses were performed using Minitab software (version 13.31).

Table 1. Characteristics of the tested isolates

Isolate	Ward	Specimen	*Susceptibility status to antimicrobials other than TMP, MEM and COL	blaOXA-51-like allele	PFGE	Agar MIC (mg/L)	Highest conc. of growth in population analyses (mg/L)	Agar MIC (mg/L) of heterogeneous subpopulations in MEM %
AB5	Cardiology	Sputum	SAM	66	I	4	8	32
AB13 (control)	Medical	Decubitus ulcer	AMK,PTZ, SAM	91	VII	0.5	2	4
AB27	ICU	Bronchial	PTZ, CIP, SAM	91	VII	1	8	>32
AB32	ICU	Bronchial	PTZ, SAM	66	I	2	8	16
AB49	Oncology	Blood	SAM	66	I	4	16	32
AB133	Orthopedic	Pus	AMK, PTZ, SAM	66	IX	2	32	> 32

* These MICs were estimated after one week daily subcultures in antibiotic-free medium.

Results:

Untreated Mice:

- All 15 mice that were left untreated after being infected by the 5 native populations (all experimental infections were done in triplicate), died within <24h.
- The 6 untreated mice that were infected by 2 heterogeneous populations survived 24h, while the 6 mice infected by 3 heterogeneous populations died.

Mice treated with 20 mg/kg meropenem:

- All 15 mice infected by the 5 native populations died within <24h. No significant decrease in colonies grown was observed for all 15 mice that received 20 mg/kg treatment compared with untreated ones (P>0.05).
- In contrast, 10/15 mice infected with heterogeneous populations survived 24h, although colony counts did not differ significantly in treated and untreated animals (P>0.05).

Mice treated with 100 mg/kg meropenem:

- 12 of the 15 mice infected by the 5 native populations died within <24h and 3 mice survived. No significant decrease in colonies grown was observed for all 15 mice that received 100 mg/kg treatment compared with untreated ones (P>0.05).
- In contrast, 14/15 mice infected by the 5 heterogeneous populations survived 24h receiving 100 mg/kg meropenem, although colony counts did not differ significantly in treated and untreated animals (P>0.05).

Mice treated with 400 mg/kg meropenem:

- 28 of the 30 mice that were infected by the 5 native and the 5 heterogeneous populations survived 24h. A significant decrease (P<0.05) in colony counts was observed for 12/15 mice infected by native populations and all 15 mice infected by heterogeneous populations, compared with untreated mice.
- The control strains responded sufficiently to 400 mg/kg meropenem regimens, exhibiting significant reductions in colony counts (P< 0.05).

- All 24 mice infected by the 2 control strains (the non-heteroresistant meropenem susceptible *A. baumannii* and the *E. coli* ATCC 25922) survived 24h regardless of the treatment regimen (20, 100 and 400 mg/kg meropenem) and also without treatment.

- Considerably lower growth rates were observed among 4/5 heterogeneous populations compared with the respective native ones, while in one case the heterogeneous grew similarly with its respective native population.

Conclusions:

- The results of the present study indicate that *A. baumannii* isolates exhibiting heteroresistance are responsive to high meropenem dosages.
- The heterogeneous populations killed considerably less animals than the native populations and had decreased growth rates, suggesting a lower virulence.

REFERENCES

1. Pournaras S, Tsakris A, Michail G, et al. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother. 2010;65:1019-31.
2. Pournaras S, Neou E, Tsakris A, et al. Meropenem-heteroresistance in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2010;48:4719-4884.
3. Pournaras S, Neou E, Tsakris A, et al. Meropenem-heteroresistance in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2010;48:4719-4884.
4. Pournaras S, Neou E, Tsakris A, et al. Meropenem-heteroresistance in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2010;48:4719-4884.
5. Pournaras S, Neou E, Tsakris A, et al. Meropenem-heteroresistance in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2010;48:4719-4884.
6. Pournaras S, Neou E, Tsakris A, et al. Meropenem-heteroresistance in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2010;48:4719-4884.
7. Pournaras S, Neou E, Tsakris A, et al. Meropenem-heteroresistance in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2010;48:4719-4884.
8. Pournaras S, Neou E, Tsakris A, et al. Meropenem-heteroresistance in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2010;48:4719-4884.
9. Pournaras S, Neou E, Tsakris A, et al. Meropenem-heteroresistance in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2010;48:4719-4884.
10. Pournaras S, Neou E, Tsakris A, et al. Meropenem-heteroresistance in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2010;48:4719-4884.
11. Pournaras S, Neou E, Tsakris A, et al. Meropenem-heteroresistance in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2010;48:4719-4884.
12. Pournaras S, Neou E, Tsakris A, et al. Meropenem-heteroresistance in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2010;48:4719-4884.
13. Pournaras S, Neou E, Tsakris A, et al. Meropenem-heteroresistance in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2010;48:4719-4884.
14. Pournaras S, Neou E, Tsakris A, et al. Meropenem-heteroresistance in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2010;48:4719-4884.
15. Pournaras S, Neou E, Tsakris A, et al. Meropenem-heteroresistance in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2010;48:4719-4884.
16. Pournaras S, Neou E, Tsakris A, et al. Meropenem-heteroresistance in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2010;48:4719-4884.
17. Pournaras S, Neou E, Tsakris A, et al. Meropenem-heteroresistance in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2010;48:4719-4884.
18. Pournaras S, Neou E, Tsakris A, et al. Meropenem-heteroresistance in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 2010;48:4719-4884.

Experimental Infections caused by Oxacillin-Susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates Treated by Oxacillin versus Vancomycin

George Michail¹, Maria Labrou¹, Constantinos Stathopoulos², Athanassios Tsakris³, and Spyros Pournaras¹

Department of Microbiology, Medical School, University of Thessaly, Larissa¹, Department of Biochemistry, Medical School University of Patras, Patras², and Department of Microbiology, Medical School, University of Athens, Athens³.

Laboratory of
Medical School
University of Thessaly
Larissa, 41110
Greece
Email:
mml_labrou@med.uoi.gr

Introduction and Purpose:

- ◆ As MRSA are considered *S. aureus* isolates that have either oxacillin MIC higher than 2 mg/L or harbor the *mecA* gene, *Staphylococcus aureus* strains that carry and express *mecA* gene may exhibit oxacillin MICs from < 2 to > 1000 mg/L and resistance phenotypes varying from extremely heterogeneous (presence of highly resistant colonies) to low-level heterogeneity.
- ◆ In a previous study, the activity of oxacillin against four OS-MRSA isolates from our region was intermediate between that against a fully susceptible *S. aureus* strain and a highly resistant MRSA. As OS-MRSA clones are gradually emerging, a possible activity of oxacillin against such isolates, compared with vancomycin that is the treatment of choice for MRSA infections, may broaden therapeutic alternatives possibly including penicillins-resistant beta-lactams. In the previous study, it had been noted that additional novel models are needed for similar comparisons to be made.
- ◆ The aim of this study was to investigate by *in vivo* experimental thigh infections the activity of oxacillin in parallel with vancomycin against a larger collection of OS-MRSA, in a region where OS-MRSA are increasingly isolated.

Methods:

- ◆ **Bacterial strains and susceptibility testing:** Fifteen oxacillin- and vancomycin-susceptible MRSA clinical isolates (oxacillin agar dilution MICs 0.25-4 mg/L, vancomycin MICs 0.5-2 mg/L) collected from October 2006 to July 2007, were studied. A high-level MRSA clinical isolate from our laboratory collection as well as the methicillin-susceptible *S. aureus* strain (ATCC 29213), *mecA*-negative] were used as controls. Species identification was performed with the VITEK 2 automated system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). MIC of oxacillin and vancomycin was tested by E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden) and by agar dilution.
- ◆ **Murine infection model:** Animal studies were approved by the Ethics Committee of Medical School, University of Thessaly and conformed to the European Union guidelines. In each model, six-week-old, specific-pathogen-free, female B6g subed strain-6 strain (DALH) mice (Harlan, Indianapolis, IN, USA) weighing 22 to 27 g were used in each test group. Animals were housed in regulated cages with food and water *ad libitum*. Mice were rendered neutropenic (neutrophils < 100 mm³) by injecting cyclophosphamide intraperitoneally on day 4 (150 mg/kg) and on day 7 (100 mg/kg) before thigh infection. Mice were anaesthetized intraperitoneally with 50 µl of ketamine/xylazine (5:1) and thigh infections with each of the strains were produced by injecting 0.1 ml of bacterial suspension of 10^6 log₁₀ CFU/ml and 2h before they received therapy with each agent. The infections were done in triplicate for the 15 OS-MRSA isolates. The *mecA*-negative ATCC 29213 strain, a low-MIC (16 mg/L) and a high-level (MIC = 256 mg/L) oxacillin-resistant *mecA*-positive strain were used as controls. All mice were infected, they were treated with oxacillin 500 mg/kg (2h intraperitoneally (Stakston 2002), vancomycin 100 mg/kg (2h subcutaneously or left untreated over 24-h (Ander 2002, LaPlante 2008). Animals were sacrificed after 24h treatment. Triplicates were also performed with the oxacillin-susceptible *mecA* positive isolates that were injected in the left thigh but not treated with dicitaxillin, as controls. Thigh muscles were homogenized, serially diluted and plated for CFU determination. The thigh titer was expressed as log₁₀ CFU thigh muscle. A *t*-test was used for statistical analysis. For all experiments, a *P* value of < 0.05 was considered indicative of statistical significance. All statistical analysis were performed using Minitab software (version 13.31).

Results:

- ◆ Oxacillin MICs of the 15 OS-MRSA study isolates by agar dilution ranged from 0.125 to 1 mg/L. All isolates were susceptible to vancomycin with MICs < 1 mg/L. In population analysis seven isolates grew up to 8 mg/L oxacillin, the remaining eight isolates grew at oxacillin concentrations 12-32 mg/L and all isolates were clearly susceptible to vancomycin.
- ◆ The thigh infections in murine revealed that in 10 isolates colonies grown from infected thighs of murine treated with dicitaxillin were significantly reduced (*P* < 0.05) compared with untreated controls, while in five isolates dicitaxillin caused a non-significant reduction of colonies (*P* > 0.05). Dicitaxillin was also effective against the low-level MRSA and ineffective against the high-level MRSA controls. Vancomycin treatment caused in all isolates a significant reduction in colonies grown from infected thighs (*P* < 0.05). In eight study isolates, dicitaxillin exhibited a similar activity (reduction in colonies grown from treated murine) with vancomycin (*P* > 0.05), while in seven isolates vancomycin had significantly higher efficiency than dicitaxillin (*P* < 0.05) (Table).

Table. Activity of dicitaxillin vs. vancomycin against the study isolates in experimental thigh infections.

Isolate	Dicitaxillin MIC (mg/L)	Vancomycin MIC (mg/L)	Mean CFU/ thigh muscle ± SD (Untreated control)	Mean CFU/ thigh muscle ± SD Dicitaxillin Treatment	<i>P</i> value Dicitaxillin vs. Untreated control*	Mean CFU/ thigh muscle ± SD Vancomycin Treatment	<i>P</i> value Vancomycin vs. Untreated control	Δlog ₁₀ Dicitaxillin vs. Vancomycin treatment	<i>P</i> value Vancomycin vs. Dicitaxillin activity in mice infections
848	0.5	0.5	7.27±0.44	5.88±0.43	0.016	6.31±0.37	0.058	+ 0.45	0.776
859	0.25	2	7.57±0.34	6.93±1.90	0.502	3.56±1.75	0.011	- 3.37	0.009
970	0.25	1	8.66±0.15	6.01±0.60	0.037	5.78±1.95	0.021	- 0.25	0.010
1117	0.5	1	7.88±0.48	6.75±0.43	0.062	6.31±0.37	0.003	- 0.44	0.157
1512	0.125	1	8.66±0.15	6.71±0.56	0.044	4.29±0.48	0.007	- 2.43	0.007
1546	0.25	1	7.55±0.31	6.79±0.82	0.208	3.99±0.52	0.006	- 2.80	0.009
2629	0.25	1	8.28±0.72	6.31±1.14	0.058	3.40±0.43	<0.001	- 2.92	0.015
4324	0.25	1	6.74±0.16	4.07±0.01	<0.001	3.58±0.32	<0.001	- 0.49	0.078
5014	0.5	1	7.73±0.44	6.85±0.82	0.488	3.99±0.52	<0.001	- 2.86	0.023
5505	1	1	7.73±0.42	3.37±1.08	0.004	3.51±1.10	<0.001	- 0.46	0.981
6036	0.5	1	8.77±0.05	6.73±0.26	0.033	5.66±0.26	0.025	- 3.05	0.014
8601	0.25	1	8.81±0.30	7.36±0.30	0.015	4.17±0.84	0.003	- 3.19	0.005
7099	0.25	1	8.92±0.21	4.97±1.91	0.026	3.25±0.25	<0.001	- 3.72	0.210
9131	0.25	1	8.72±0.05	3.45±0.35	<0.001	3.32±0.39	<0.001	- 0.13	0.270
9853	0.5	1	8.92±0.21	6.17±1.45	0.035	5.15±1.64	0.020	- 3.01	0.880
ATCC 29213	0.25	1	8.77±0.05	3.51±0.63	0.001	3.77±0.54	<0.001	+ 0.15	0.770
7263	>32	1	8.64±0.09	8.27±0.17	0.330	3.30±0.45	<0.001	4.92	<0.001
1610	6	1.5	8.77±0.01	4.81±0.36	<0.001	3.66±0.64	<0.001	1.34	0.094

* *P* value < 0.05 represents significant difference in CFUs given from infected thighs.

Conclusions:

- ◆ OS-MRSA clinical isolates are increasingly reported in several regions worldwide. It has been shown previously that OS-MRSA isolates may be partially responsive to oxacillin (Kronmüller 2008) and this could provide treatment alternatives for MRSA infections. It has been also reported recently that mutant MRSA (*mecA*-positive) isolates with relatively low oxacillin MICs may be responsive to oxacillin treatment in murine infections (Ar DS 2011). In that respect, it has been supported that oxacillin activity on OS-MRSA should be compared *in vivo* with that of vancomycin. Nevertheless, vancomycin is well known to be less rapidly bactericidal *in vivo* against methicillin-susceptible *S. aureus* than anti-staphylococcal penicillins (Stall P.M. 1999) and to exhibit suboptimal results in the treatment of serious *S. aureus* infections (Lavigne D.P. 1991, Stall P.M. 1999).
- ◆ The results of the present thigh infections in the present study suggest that a significant proportion of OS-MRSA experimental infections may be efficiently treated by oxacillin, similarly with vancomycin. Should OS-MRSA isolates become more common in the future, this observation could broaden treatment alternatives for staphylococcal infections.

References:

1. Anders, M. A., Van Spronsen, J., Peng, and P. A. (2006) The prevalence of methicillin-resistant staphylococcal strains in Europe. *Antonie van Leeuwenhoek* 2002, 80, 389-399.
2. Kronmüller, A., Klotzel, G., Gindl, A., Gellera, M., Kerschbaum, C., Dittmann, A.B., Pannasch, E. In: *Antonie van Leeuwenhoek* 2008, 84, 35-40.
3. Ar DS (2011) Oxacillin activity on methicillin-susceptible staphylococcal strains in murine infections. *Antonie van Leeuwenhoek* 2011, 85, 100-105.
4. LaPlante, C. L., Leonard, S. B., Archer, D. R., Chang, W. A., and Rybak, M. J. (2008) Activity of Oxacillin, Daptomycin, Vancomycin, Linezolid, Clindamycin, Rifampin, and Vancomycin against Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus with Inducible Clindamycin Resistance in Murine Thigh Infections and the Vancomycin-Susceptible Strain ATCC 29213. *Antonie van Leeuwenhoek* 2008, 84, 107-112.
5. Lavigne, P., Pannasch, E., and Rybak, M. J. (1991) *In vivo* response to vancomycin in murine thigh infections with methicillin-resistant staphylococcal strains. *Antonie van Leeuwenhoek* 1991, 61, 113-118.
6. Stall, P. M., and Archer, D. R. (1999) Combined antibiotic and low-dose rifampin treatment is effective in eradicating staphylococcal carriage in murine endocarditis. *Antonie van Leeuwenhoek* 1999, 73, 199-203.

In vivo efficacy of tigecycline alone and in combination with colistin, meropenem and gentamicin against KPC-carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in a mouse thigh infection model

G. Michail¹, M. Labrou¹, E. Ntokou¹, I. Kristo¹, S. Manousaka¹, A. Tsakris² and S. Pournaras¹
Department of Microbiology, Medical School, University of Thessaly, Larissa¹ and Department of Microbiology, Medical School, University of Athens, Athens².

Georgios Michail
 Medical School
 University of
 Thessaly
 Univ. Hospital of
 Larissa
 Larissa, 41110
 Greece
 Email:
 michailgeorge@ho
 gmail.com

Introduction and Purpose:

↪KPC-carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* are endemic in many regions and cause severe and difficult to treat infections associated with therapeutic failure and mortality. Besides these observations studies dealing with antimicrobial treatment of KPC infections and clinical outcomes are based on limited number of case patients and therefore an optimal treatment has not been well established.

↪In vitro studies examining antibiotic combinations and experimental infections are needed to ascertain optimal treatment of KPC infections. The severity of these infections often requires tigecycline in combinations with other antibiotics. Preliminary *in vitro* data from our laboratory indicate that such antibiotic combinations could involve colistin, gentamicin or meropenem (1). It was observed that tigecycline alone exhibits mainly bacteriostatic activity but may exhibit synergic bactericidal activity when combined with colistin (1).

↪In vivo studies relatively to the efficacy of tigecycline against carbapenemase-producing Gram-negative bacteria are not available. We report herein results on the activity of tigecycline alone and in combinations with colistin, meropenem and gentamicin, which may be active against KPC producers, in experimental infections caused by KPC-producing *Enterobacteriaceae*.

Methods:

↪**Bacterial strains and susceptibility testing:** We tested 3 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and 1 *Escherichia coli* clinical isolates exhibiting meropenem MICs 1-4 mg/L and susceptible phenotypes to the remaining antibiotics tested. MICs were determined by broth microdilution. The carbapenemase-negative *E. coli* ATCC 25922 was tested as control. PCR and sequencing showed that all microorganisms carried *bla_{KPC}* gene.

↪**Murine infection model:** Animal studies conformed to the European Union guidelines. Six-week-old, specific-pathogen-free, female Bagg inbred albino c-strain (BALB/c) mice (Harlan, Indianapolis, IN, USA) weighing 23 to 27 g were used in each test group. Animals were housed in regulation cages with food and water *ad libitum*. Mice were rendered neutropenic by injecting cyclophosphamide intraperitoneally on day 4 (150 mg/kg) and on day 1 (100mg/kg) before thigh infection. Mice were anaesthetized intraperitoneally with 30µl of ketamine/xylazine (5:1) and thigh infections with each of the strains were produced by injecting 0.1 ml of bacterial suspension of 10⁷ log₁₀ CFU/ml 2h before they received therapy with each agent. The infections were done in triplicate for the 4 isolates. The *E. coli* ATCC 35922 strain, is used as control. After mice were infected, they were treated with tigecycline 50 mg/kg/24h (2), colistin 40 mg/kg/8h (3), gentamicin 5 mg/kg/12h (4) and meropenem 200 mg/kg/8h alone and tigecycline combined with colistin, gentamicin or meropenem or left untreated over 24-h. Animals were sacrificed after 24-h treatment. Triplicates were also performed with the all the 4 isolates that were injected in the left thigh but not treated with any antibiotic, as controls. Thigh muscles were homogenized, serially diluted and plated for CFU determination. The thigh titer was expressed as log₁₀ CFU/thigh muscle. The efficacy of each antibiotic alone or in combinations was reflected by the reduction of mean CFUs grown after treatment vs. untreated control animals and vs. other regimens. A *t*-test was used for statistical analysis. For all experiments, a *P* value of *P* < 0.05 was considered indicative of statistical significance. Statistical analyses were performed using Minitab software (version 13.31). Colonies grown from the infected thighs were identified phenotypically, their antibiotic resistance phenotype was tested and PCR was performed for the presence of the *bla_{KPC}* gene, to exclude the possibility of contamination.

Results:

Results of the mice infections caused by KPC producers are presented in Tables 1 and 2. In particular:

↪Tigecycline alone was effective (significant reduction of CFU in treated mice vs. untreated controls, *P*<0.05) in infections caused by 2 isolates, colistin and meropenem alone were ineffective in all cases, while gentamicin alone was effective against 1 isolate (Table 1).

↪The combination of tigecycline plus gentamicin was effective (significant reduction of CFU in treated mice vs. untreated controls, *P*<0.05) against all isolates; tigecycline plus meropenem and tigecycline plus colistin were effective against 3 isolates .

↪Tigecycline alone was more effective than colistin alone (significant reduction of CFU between mice treated with each drug, *P*<0.05) in 2 isolates and similarly effective against 2 isolates (Table 2).

↪Tigecycline alone was more effective than gentamicin alone in 2 isolates and similarly effective against 2 isolates.

↪Tigecycline alone was more effective than meropenem in 2 isolates and similarly effective against 2 isolates.

↪The combination of tigecycline plus colistin was more effective than tigecycline alone against 1 isolate and similarly effective against 3 isolates.

↪Tigecycline plus gentamicin was more effective than tigecycline alone against 2 isolates and similarly effective against 2 isolates.

↪Tigecycline plus meropenem was more effective than tigecycline alone against 1 isolate and similarly effective against 3 isolates.

Table 1. Results of the efficacy of the antibiotics alone and in tigecycline combinations versus untreated controls

ISOLATE	log T vs Untr	P value vs Untr	log C vs Untr	P value vs Untr	log G vs Untr	P value vs Untr	log M vs Untr	P value vs Untr	log T+C vs Untr	P value vs Untr	log T+G vs Untr	P value vs Untr	log T+M vs Untr	P value vs Untr
K 1	-0.15	0.64	-0.01	0.74	-0.02	0.84	-0.04	0.12	-0.01	0.03	-1.86	<0.01	-1.34	<0.01
K 2	-0.23	0.13	-0.13	0.07	-0.48	0.33	-0.23	0.14	-3.14	0.02	-4.41	<0.01	-1.81	0.077
K 3	-2.5	0.03	-0.79	0.94	-1.66	<0.01	-0.20	0.18	-2.75	0.11	-4.71	<0.01	-1.38	<0.01
E 1	-2.59	<0.01	-0.49	0.18	-0.27	0.17	-0.69	0.23	-3.11	0.02	-2.52	<0.01	-2.66	0.03

Table 2. Comparison of the efficacy of tigecycline alone versus other antibiotics used as monotherapies and versus tigecycline combinations

ISOLATE	log T vs C	P value vs C	log T vs G	P value vs G	log T vs M	P value vs M	log T vs T+C	P value vs T+C	log T vs T+G	P value vs T+G	log T vs T+M	P value vs T+M
K 1	0.13	0.72	0.18	0.70	0.11	0.75	-0.26	0.53	-1.98	0.05	-1.47	0.04
K 2	-0.1	0.26	0.24	0.63	0.36	0.42	-2.97	0.03	-4.16	0.01	-1.57	0.09
K 3	-3.30	0.02	-2.11	0.05	-2.30	0.04	-1.00	0.08	-2.21	0.09	-1.12	0.15
E 1	-3.10	<0.01	-2.87	<0.01	-1.90	0.05	-0.51	0.23	-0.08	0.54	-0.07	0.87

K, *K. pneumoniae*; E, *E. coli*; T, tigecycline; C, colistin; G, gentamicin; M, meropenem. **P* value < 0.05 indicates significant effect and is shown in bold

Conclusions:

↪The *in vivo* results of the present study indicate that tigecycline as single antibiotic regimen exhibited superior activity from colistin, meropenem and gentamicin for the treatment of experimental thigh infections by KPC-producing *Enterobacteriaceae*.

↪Tigecycline plus gentamicin was more effective than other tigecycline combinations.

↪Such results could have significant implications for the treatment of KPC infections.

Acknowledgement. This work was funded by an Investigator-Initiated Research Grant from Pfizer (WS1394235). The funding source was not involved in the design, execution, result interpretation and publication policy.

References:

- Pournaras S, Vironi G, Neou E, Dendrinos J, Dimitroula E, Poulou A, Tsakris A. Activity of tigecycline alone and in combination with colistin and meropenem against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Enterobacteriaceae* strains by time-kill assay. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 37: 244-247.
- Barthold SV, Hódzic E, Imal DM, Feng S, Yang X, Luft BJ. Ineffectiveness of tigecycline against persistent *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 643-651.
- Pachón-Ibáñez ME, Docobo-Pérez F, López-Rojas R, Domínguez-Herrera J, Jiménez-Mejías ME, García-Curiel A, Pichardo C, Jiménez L, Pachón J. Efficacy of Ritampin and its Combinations with Impenem, Sulbactam, and Colistin in Experimental Models of Infection Caused by Impenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 1165-1172.
- Effect of treatment with methicillin and gentamicin in a new experimental mouse model of foreign body infection. Espersen F, Frimodt-Møller N, Cornelussen L, Ribber U, Rosdahl VT, Skinhøj P. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 2047-2053.