



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΤΟΜΕΑΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
Διευθύντρια: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ευθυμία Πετεινάκη**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΝΕΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ
GRAM-ΘΕΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ
ΩΣ ΜΕΤΡΟ
ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΠΙΔΗΜΙΩΝ**

υπό

Ανθή Δ. Νταμάνη

Χημικός

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση
του Διδακτορικού Διπλώματος

2013

© 2013 Ανθή Δ. Νταμάνη

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).

Ανθή Δ. Νταμάνη, Διδακτορική Διατριβή

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

- | | |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1^{ος} Εξεταστής
Επιβλέπουσα | ΕΥΘΥΜΙΑ ΠΕΤΕΙΝΑΚΗ
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας
του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας |
| 2^{ος} Εξεταστής | ΚΩΝ/ΝΟΣ ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ
Καθηγητής Πνευμονολογίας
του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας |
| 3^{ος} Εξεταστής | ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΣΑΚΕΛΛΑΡΙΔΗΣ
Καθηγητής Φαρμακολογίας
του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας |
| 4^{ος} Εξεταστής | ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΠΙΤΣΙΚΑΣ
Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας
του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας |
| 5^{ος} Εξεταστής | ΚΩΝ/ΝΟΣ ΔΗΜΑΣ
Λέκτορας Φαρμακολογίας
του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας |
| 6^{ος} Εξεταστής | ΛΟΥΚΙΑ ΖΕΡΒΑ
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας
του Τμήματος Ιατρικής του Εθνικού Καποδιστριακού
Πανεπιστημίου Αθηνών |
| 7^{ος} Εξεταστής | ΙΡΙΣ ΣΠΗΛΙΟΠΟΥΛΟΥ
Καθηγήτρια Μικροβιολογίας
του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών |

Ανθή Δ. Νταμάνη, Διδακτορική Διατριβή

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την εκπόνηση αυτής της Διατριβής, την διαμόρφωση και την ολοκλήρωση της, υπήρξε πολύτιμη βοήθεια από πολλούς, στους οποίους εκφράζω την βαθειά μου ευγνωμοσύνη.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Καθηγητές Κων/νο Γουργουλιάνη και Νικόλαο Σακελλαρίδη, οι οποίοι με τίμησαν με την συμμετοχή τους στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή αυτής της Διατριβής. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Καθηγήτρια Ίριδα Σπηλιοπούλου, τους Αναπληρωτές Καθηγητές Λουκία Ζέρβα και Νικόλαο Πιτσικά καθώς και τον Λέκτορα Κων/νο Δήμα, οι οποίοι δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή. Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω προσωπικά στην κ. Σπηλιοπούλου για τις πολύτιμες υποδείξεις της.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της Διατριβής μου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Έφη Πετεινάκη, για την ευκαιρία και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση της εκπόνησης μιας Διδακτορικής Διατριβής. Την ευχαριστώ για το θέμα της Διατριβής, που το αγάπησα με τα χρόνια και το έκανα «δικό» μου, για την καθοδήγηση, την επιστημονική επίβλεψη, τις γνώσεις της που μοιράστηκε μαζί μου και την κατανόηση όλα αυτά τα χρόνια. Ελπίζω και εγώ να υπήρξα αντάξια των προσδοκιών που είχε για μένα.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω το ερευνητικό προσωπικό του εργαστηρίου μας Δήμητρα Κλάψα, Ζωή Φλώρου, Αποστόλη Λιακόπουλο και Μαρία Σταυροπούλου για το κλίμα συνεργασίας, σύμπτωσης και αλληλοβοήθειας που επικράτησε καθ' όλη την διάρκεια της κοινής μας πορείας.

Εκ μέρους του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους Διευθυντές των Εργαστηρίων όλων των Νοσοκομείων οι οποίοι μερίμνησαν για την συλλογή και την αποστολή του κλινικού τους υλικού που ήταν απαραίτητο για την μελέτη μας.

Θέλω να ευχαριστήσω θερμά την αδελφή μου Ελένη Νταμάνη, Διευθύντρια ΕΣΥ του Εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του ΠΓΝ Λάρισας, που πάντα στάθηκε δίπλα μου, όποτε την χρειαζόμουν, με τις γνώσεις της και τις πολύτιμες παρατηρήσεις της που ήταν γόνιμες για την έρευνα μου.

Και βέβαια το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένεια μου, τον Γιώργο και τις κόρες μας, που πάντα στήριζαν με εμπιστοσύνη όλες τις επιλογές μου. Μου έδωσαν τον ελεύθερο χρόνο που χρειαζόμουν, αλλά που με κράτησε μακριά τους, για να ασχοληθώ τόσο με τα πειράματα μου όσο και με το διάβασμα και την συγγραφή αυτής της Διατριβής που ήταν επίπονη και μακροχρόνια. Ελπίζω δε, για τις κόρες μου να αποτελέσει πηγή έμπνευσης και δημιουργίας και για την δική τους ζωή.

Ένα κρυφό ευχαριστώ, σαν χαιρετισμό, οφείλω στον πατέρα μου που έφυγε νωρίς και μου δίδαξε ότι η προσπάθεια και ο αγώνας για να γινόμαστε πάντα καλύτεροι πρέπει να είναι μια σταθερή στάση ζωής.

Ανθή Δ. Νταμάνη

Λάρισα, Φεβρουάριος 2013

Ανθή Δ. Νταμάνη, Διδακτορική Διατριβή

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

1989: Πτυχίο Χημικού από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης-ΑΠΘ. Έκτοτε, μέλος της Ένωσης Ελλήνων Χημικών.

1995: Τρίμηνο επιδοτούμενο Σεμινάριο του ΕΛΚΕΠΑ με τίτλο « Ένταξη στο Φυσικό Αέριο»

2002: Τρίμηνο Σεμινάριο Πληροφορικής του ΤΕΙ Λάρισας με τίτλο «Πληροφορική Τεχνολογία»

2004: Τρίμηνο επιδοτούμενο Σεμινάριο του ΟΑΕΔ με τίτλο «Διαχείριση Στερεών Αποβλήτων»

2008 έως Σήμερα: Υποψήφια διδάκτορας Μικροβιολογίας στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με θέμα «Εφαρμογή νέων μεθόδων τυποποίησης Gram-θετικών μικροοργανισμών ως μέτρο διερεύνησης και ελέγχου επιδημιών». Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Ευθυμία Πετεινάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Ξένη Γλώσσα: Αγγλικά, κάτοχος των πτυχίων: ECCE-University of Michigan και TOEIC-Hellenic American Union.

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

1990: Χημικό εργαστήριο του εργοστασίου ΕΛΒΑΚ στη Λάρισα. Ποιοτικός, ποσοτικός και μικροβιολογικός έλεγχος στην επεξεργασία φρούτων για παραγωγή μαρμελάδας και κομπόστας μετά από χημική αποφλοιώση των φρούτων.

1991-1995: Μικροβιολογικό-Βιοχημικό Εργαστήριο στην Λάρισα. Αντικείμενο της εργασίας μου υπήρξε όλο το εύρος των εργασιών και απαιτήσεων ενός Μικροβιολογικού Εργαστηρίου. Έμφαση στους βιοχημικούς και ορμονικούς προσδιορισμούς σε κλινικά δείγματα όπως αίμα, ούρα, κολπικά επιχρίσματα, ουρόλιθοι κ.α.

2001-2002: Κτηνιατρικό Εργαστήριο Λάρισας, Υπουργείο Γεωργίας. Αντικείμενο της εργασίας μου υπήρξε ο προσδιορισμός απαγορευμένων αντιβιοτικών και φαρμάκων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφία Υψηλής Ανάλυσης-HPLC, για πρώτη φορά στην ελληνική επικράτεια,

στα πλαίσια Ευρωπαϊκού Προγράμματος Ελέγχου Απαγορευμένων Καταλοίπων Φαρμάκων.

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

1995-2011: Εργαστηριακός και Επιστημονικός Συνεργάτης στο ΤΕΙ Λάρισας στα Τμήματα Ιατρικών Εργαστηρίων και Γενικό Τμήμα Θετικών Επιστημών. Έχω διδάξει τα μαθήματα «Ανόργανη και Οργανική Χημεία στα Ιατρικά Εργαστήρια», «Τεχνολογία Εργαστηριακών Οργάνων», «Κλινική Χημεία» και «Ηλεκτροχημεία».

2000: Εισηγήτρια σε Σεμινάριο του ΟΑΕΔ Λάρισας, διάρκειας 40 ωρών, με τίτλο «Χρήση χημικών προϊόντων στον καθαρισμό» σε υποψήφιους στεγνοκαθαριστές.

2005-2006: Ως εκπαιδευτικό προσωπικό στο Β' Δημόσιο ΤΕΕ για υποψήφιους Νοσηλευτές.

2005-2007: Ως εκπαιδευτικό προσωπικό στο 1^ο ΙΕΚ Λάρισας στην ειδικότητα των «Τεχνικών Φαρμάκου και Καλλυντικών» για υποψήφιους Βοηθούς Φαρμακοποιών.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Linezolid-resistant enterococci in Greece: epidemiological characteristics. Spiliopoulou I, **Damani A**, Chini V, Zerva L, Kolonitsiou F, Anastassiou ED, Petinaki E. *Chemotherapy* 2011; 57(3):181-185. (5 citations)
2. Dissemination of two international linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones in Greek hospitals. Liakopoulos A, Spiliopoulou I, **Damani A**, Kanellopoulou M, Schoina S, Papagragas E, Marangos M, Fligou F, Zakynthinos E, Makris D, Protonariou E, Tsiapara F, Filos K, Diza E, Anastassiou ED, Petinaki E. *J Antimicrob Chemother.* 2010 May; 65(5):1070-1. (11 citations)
3. Macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* in Central Greece: prevalence, mechanism and molecular identification. Malli E, Tatsidou E, **Damani A**, Pantelidi K, Petinaki E, Skoulakis C, Drougka E, Spiliopoulou I. *Int J Antimicrob Agents.* 2010 Jun; 35(6):614-5. Epub 2010 Mar 4 (5 citations)
4. Necrotizing pneumonia in Greece caused by a USA400 (ST1) *Staphylococcus aureus* harboring SCCmec type V. Neocleous Ch, **Damani A**, Gerogianni I,

Gourgoulisanis K, Petinaki E. *Infection*. 2010 Feb; 38(1):76-7. Epub 2009 Dec 7. (1 citation)

5. A newly described vancomycin-resistant ST412 *Enterococcus faecium* predominant in Greek hospitals. **Damani A**, Klapsa D, Panopoulou M, Spiliopoulou I, Pantelidi K, Malli E, Kolonitsiou F, Grapsa S, Alepopoulou E, Frantzidou F, Vlahaki E, Koutsia-Carouzou C, Malamou-Lada H, Zerva L, Kartali-Ktenidou S, Anastassiou ED, Maniatis AN, Petinaki E. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010 Mar;29(3):329-31. Epub 2009 Dec 17. (3 citations)
6. Linezolid-resistant *Staphylococcus cohnii*. Greece. Petinaki E, Kanellopoulou M, **Damani A**, Foka A, Spiliopoulou I, Skalmoutsou N, Raitsiou B, Valakis K, Papafragas E. *Emerg Infect Dis*. 2009 Jan;15(1):116-8. (5 citations)
7. Level of *Streptococcus pyogenes* in patients with recurrent tonsillitis and tonsillar hypertrophy. Skoulakis Ch, Tigiroglou E, Gkarelis K, Klapsa D, **Damani A**, Papadakis Ch, Petinaki E. *Scand J Infect Dis*. 2008;40(11-12):899-903. (6 citations)

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Emergence of Linezolid-Resistant Staphylococci in Greece. I. Spiliopoulou, M. Kanellopoulou, **A. Damani**, A. Foka, V. Chini, E. Papafragas, E. Anastassiou, E. Petinaki. 48th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA) 46th Annual Meeting, October 25-28/2008, Washington, DC, USA
2. Παγκόσμιοι Επιδημικοί κλώνοι βανκομυκίνη-ανθεκτικού *Enterococcus faecium* σε ελληνικά νοσοκομεία. **A. Νταμάνη** (ομιλήτρια), Χ. Νεοκλέους, Δ. Κλάψα, Μ. Πανοπούλου, Ι. Σπηλιοπούλου, Φ. Κολονίτσιου, Σ. Γράψα, Ε. Αλεποπούλου, Κ. Κουράκη, Δ. Κρίκου, Ε. Βλαχάκη, Χ. Κούτσια-Καρούζου, Λ. Ζέρβα, Σ. Καρτάλη-Κτενίδου, Ε. Αναστασίου, Α. Μανιάτης, Ε. Πετεινάκη. 4^ο Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας & Νοσοκομειακών Λοιμώξεων, Φεβρουάριος 12-14/2009, 22, Αθήνα.
3. Νέοι κλώνοι μεθικιλίνη-ανθεκτικών στελεχών *Staphylococcus aureus* σε παιδιά και ενήλικες στην Ελλάδα κατά τη διετία 2006-2007. Ε. Δρούγκα, Β. Χίνη, Α. Φωκά, Ε.

Λεμπέση, Ι. Χριστοδουλίδη, Σ. Λεβειδιώτου, Θ. Παναγέα, **A. Νταμάνη**, Α. Βογιατζή, Κ. Καλλέργη, Α. Μαυρίδης, Ε. Αναστασίου, Ε. Πετεινάκη, Ι. Σπηλιοπούλου. 4^ο Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας & Νοσοκομειακών Λοιμώξεων, Φεβρουάριος 12-14/2009, 22, Αθήνα.

4. Μελέτη πολυανθεκτικών στελεχών *Klebsiella pneumoniae* που απομονώθηκαν στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών. Σ. Βαμβακοπούλου, Ε. Πετεινάκη, Χ. Μπαρτζάβαλη, **A. Νταμάνη**, Ι. Σπηλιοπούλου, Ε. Αναστασίου, Μ. Χριστοφίδου 4^ο Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας & Νοσοκομειακών Λοιμώξεων, Φεβρουάριος 12-14/2009, 22, Αθήνα.
5. Prevalence of EBV and CMV in tonsils among patients with recurrent tonsillitis and tonsillar hypertrophy in Greece. Ε. Τιγρογλου, D. Klapsa, **A. Damani**, Α. Liakopoulos, C. Skoulakis, Ε. Petinaki. 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), May 16-19/2009, Helsinki, Finland
6. Prevalence of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, herpes simplex virus type 1,2 and papilloma virus in pregnant woman in central Greece. D. Klapsa, H. Skentou, M. Stavropoulou, **A. Damani**, F. Anastassiadou, I. Messinis, Ε. Petinaki., 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), May 16-19/2009, Helsinki, Finland
7. Molecular characterization of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis*. I. Spiliopoulou, **A. Damani**, S. Schoina, Α. Liakopoulos, Μ. Marangos, Ε. Malli, L. Leonidou, V. Maroulis, D. Velissaris, F. Fligou, K. Filos, ED. Anastassiou, Ε. Petinaki. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), April 10-13/2010 Vienna, Austria
8. Molecular identification of macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* clones in Central Greece. Tatsidou Ε, Malli Ε, **A. Damani**, Κ. Pantelidi, Ε. Drougka, I. Spiliopoulou, Ε. Petinaki. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), April 10-13/2010 Vienna, Austria

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ανθή Δ. Νταμάνη, Διδακτορική Διατριβή

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μοριακή τυποποίηση αντιπροσωπευτικών στελεχών Gram-θετικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα ασθενών από διαφορετικές περιοχές της χώρας μας, με στόχο να χαρτογραφηθούν οι επικρατέστεροι κλώνοι ανά μικροοργανισμό και να συγκριθούν με παγκόσμιους επιδημικούς κλώνους.

Ο χαρακτηρισμός των παθογόνων στελεχών των μικροοργανισμών διαδραματίζει έναν κεντρικό ρόλο στην επιδημιολογία των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων δημιουργώντας τις απαραίτητες πληροφορίες για τον προσδιορισμό, τον εντοπισμό και την παρέμβαση κατά την διάρκεια των επιδημικών εξάρσεων. Από το 1998 προτάθηκε η μέθοδος του Πολυτοπικού Προσδιορισμού Αλληλουχίας **MLST** (**M**ulti **L**ocus **S**equences **T**yping) ως μια προσέγγιση που βασίζεται στην αλληλούχηση νουκλεοτιδίων και μπορεί να εφαρμοστεί σε πολλά βακτηριακά παθογόνα. Η MLST συνδυάζοντας τις εξελίξεις υψηλής απόδοσης στην αλληλούχηση και την βιοπληροφορική, με τις καθιερωμένες τεχνικές χειρισμού των βακτηριακών πληθυσμών, παρέχει ένα συγκρίσιμο, αναπαραγώγιμο και επεκτάσιμο σύστημα τυποποίησης που αντανάκλα την πληθυσμιακή και εξελικτική βιολογία των παθογόνων μικροοργανισμών. Τα σχήματα της MLST που έχουν εφαρμοστεί σε μια μεγάλη ποικιλία προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών παθογόνων καθώς και τα δεδομένα που συνάγονται, έχουν συμβάλει τόσο στην νοσοκομειακή επιδημιολογική επιτήρηση όσο και σε θεμελιώδεις μελέτες της βιολογίας των παθογόνων μικροοργανισμών. Η μέθοδος αναπαράγει νουκλεοτιδικές αλληλουχίες εσωτερικών γονιδιακών θραυσμάτων των 400-600 (bp) σε επτά διατηρημένα γονίδια (housekeeping genes). Πρόκειται για σταθερά εσωτερικά γονίδια του χρωμοσώματος που σχετίζονται με βασικές μεταβολικές λειτουργίες του βακτηριακού κυττάρου και είναι απαραίτητα για την επιβίωση του. Επειδή βασίζεται στον βραδέως εξελισσόμενο γονιδιωματικό «πυρήνα» των βακτηρίων, η MLST παρέχει δεδομένα κατάλληλα τόσο για μελέτες τοπικής όσο και παγκόσμιας επιδημιολογίας των παθογόνων μικροοργανισμών. Στις διαφορετικές αλληλουχίες κάθε γονιδιακού θραύσματος που μελετάται, εκχωρούνται διαφορετικοί αριθμοί αλληλόμορφων γονιδίων και κάθε στέλεχος ορίζεται από τα αλληλόμορφα των επτά γονιδιακών τόπων (αλληλόμορφο προφίλ) του σχήματος. Σε κάθε μοναδικό αλληλόμορφο προφίλ (ή γονότυπο) εκχωρείται ένας τύπος αλληλουχίας (Sequence Type-ST), ο οποίος αποτελεί έναν κατάλληλο και ξεκάθαρο τρόπο χαρακτηρισμού ενός στελέχους ή ενός κλώνου βακτηρίου. Οι βάσεις δεδομένων, που περιλαμβάνουν την μέθοδο της MLST καθώς και τα συναφή δεδομένα αλληλουχίας χιλιάδων στελεχών, είναι ελεύθερα προσβάσιμες μέσω του Διαδικτύου, σε δύο ιστότοπους που τα ερευνητικά τους κέντρα εδράζονται στο Imperial College London (<http://www.mlst.net/>) και στο Oxford University (<http://pubmlst.org/>).

Για τον σκοπό αυτό μελετήθηκαν 575 στελέχη Gram-θετικών βακτηρίων, που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα ασθενών όπως αίμα, πύον, ούρα, κόπρανα, κολπικά επιχρίσματα κ.ά. από επτά μεγάλα νοσοκομεία της χώρας μας, κατά την χρονική περίοδο 2008-2011. Συγκεκριμένα χαρακτηρίστηκαν 186 στελέχη VRE *Enterococcus faecium*, 30 στελέχη Linezolid Resistant *Enterococcus faecalis*, 126 στελέχη *Staphylococcus aureus* (MRSA & MSSA), 35 στελέχη Linezolid Resistant *Staphylococcus epidermidis*, 80 στελέχη *Streptococcus pyogenes* και 118 στελέχη *Streptococcus agalactiae*.

Αρχικά τα κλινικά στελέχη υποβλήθηκαν στις καθιερωμένες τεχνικές χειρισμού των βακτηρίων που περιλαμβάνουν την καλλιέργεια, τις βιοχημικές δοκιμασίες για την ταυτο-

ποίηση τους σε επίπεδο γένους και είδους και τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά (VITEK-2, E-test). Η απομόνωση του γενετικού υλικού - DNA - των υπό μελέτη στελεχών των βακτηρίων, πραγματοποιήθηκε μέσω της εκχύλισης τους με το αυτόματο σύστημα Magstration, προκειμένου να γίνει η τυποποίηση τους.

Η μοριακή τυποποίηση των βακτηριακών στελεχών της μελέτης μας πραγματοποιήθηκε με την μοριακή μέθοδο της MLST. Πρωταρχικά κάθε τυποποιημένο σχήμα της MLST διερευνήθηκε εργαστηριακά, για την βέλτιστη ανίχνευση και ενίσχυση των γονιδίων του, μέσω αλλαγών εργαστηριακών παραμέτρων όπως πχ ποσοτικών και θερμοκρασιακών αλλαγών. Η ενίσχυση όλων των γονιδιακών θραυσμάτων πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR). Σε επόμενο στάδιο ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των ενισχυμένων γονιδίων σε πήκτωμα αγαρόζης και καθαρισμός του DNA. Η ανάλυση αλληλουχίας κάθε γονιδιακού θραύσματος πραγματοποιήθηκε με την τροποποιημένη κατά Sanger μέθοδο και προσδιορίστηκε με την χρήση εξειδικευμένων προγραμμάτων βιοπληροφορικής (Mega 5.0, ClustalW), που σε συνδυασμό με τις βάσεις δεδομένων της MLST, τα στελέχη των βακτηρίων της μελέτης ταξινομήθηκαν σε STs τύπους. Σε ορισμένα είδη βακτηρίων προσδιορίστηκαν εκτός των γονιδίων των σχημάτων της MLST και χαρακτηριστικοί παθογονικοί γενετικοί τόποι.

Οι κυριότεροι πληθυσμιακά κλώνοι που εντοπίστηκαν ανά βακτήριο είναι: στον ***E. faecium*** οι ST412, ST17, ST203, στον ***E. faecalis*** οι ST28, ST6, ST9, στον ***S. aureus*** οι ST80, ST225, ST239, στον ***S. epidermidis*** οι ST22, ST2, ST35, στον ***S. pyogenes*** οι ST36, ST28, ST101 και στον ***S. agalactiae*** οι ST1, ST22 και ST17.

Η μελέτη της γενετικής συγγένειας των κλώνων πραγματοποιήθηκε, μέσω της εφαρμογής προγράμματος του αλγορίθμου eBURST, που δίνει την δυνατότητα της ταξινόμησης των κλώνων των βακτηρίων σε κλωνικά συμπλέγματα με παρόμοια γενετικά χαρακτηριστικά και της σύγκρισης τους με παγκόσμιους επιδημικούς κλώνους.

Η σύγκριση των κλώνων μας με παγκόσμιους επιδημικούς κλώνους έδειξε ότι στα ελληνικά νοσοκομεία κυκλοφορούν παθογόνοι επιδημικοί κλώνοι παγκόσμιας εμβέλειας και είναι αναγκαίο να παρθούν αυστηρότερα μέτρα πρόληψης και μείωσης των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων για την υγεία και την προστασία τόσο των ασθενών όσο και του προσωπικού σ' έναν τόσο ευαίσθητο χώρο όπως είναι το Νοσοκομείο.

Η παρούσα μελέτη θα αποτελέσει μια βάση σύγκρισης για μελλοντικές επιδημιολογικές μελέτες στους Gram-θετικούς κόκκους στην Ελλάδα δεδομένου ότι σε ένα παγκοσμιοποιημένο περιβάλλον η μετακίνηση πληθυσμού (ταξίδια, σπουδές, εργασία) επηρεάζει άμεσα την επιδημιολογία των λοιμώξεων καθώς και την παρακολούθηση της διασποράς των κλώνων και της διαφοροποίησής τους με τον χρόνο.

Abstract

Implementing new methods of typing

Gram-positive microorganisms

as a measure of investigation and control of epidemics

The purpose of this study was the molecular typing of representative strains of Gram-positive bacteria isolated from clinical specimens of patients from different regions of our country, in order to map the predominant clones per microorganism and compare them with global epidemic clones.

The characterization of pathogenic isolates plays a pivotal role in the epidemiology of infectious diseases, generating the information necessary for identifying, tracking and intervening against disease outbreaks. In 1998 multi-locus sequence typing (MLST) was proposed as a nucleotide sequence-based approach that could be applied to many bacterial pathogens. It combined developments in high-throughput sequencing and bioinformatics with established population genetics techniques to provide a portable, reproducible, and scalable typing system that reflected the population and evolutionary biology of bacterial pathogens. MLST schemes have been developed for a variety of prokaryotic and eukaryotic pathogens and the generated data have contributed to both epidemiological surveillance and fundamental studies of pathogen biology. Multi-locus sequence typing (MLST) is a well-established method and has become the method of choice for molecular typing, to study bacterial populations exhibiting sufficient nucleotide diversity in a small number of genomic loci. Characterization of isolates of bacterial pathogens on the basis of sequence variation is carried out by multilocus sequence typing (MLST), which generates approximately 450-600 bp of nucleotide sequence for internal fragments of seven housekeeping loci for each isolate. Because it is based on the slowly evolving genomic "core," MLST provides data that are well suited to studies of global epidemiology and population biology of bacterial pathogens. The different sequences at each locus are assigned different allele numbers, and each strain is defined by the alleles at the seven loci (the allelic profile). Each unique allelic profile (or genotype) is assigned a sequence type (ST), which is a convenient and unambiguous descriptor for the strain (or clone). Databases containing MLST and associated data from hundreds or thousands of isolates can be accessed via the internet on two main web servers located at Imperial College London (<http://www.mlst.net>) and Oxford University (<http://pubmlst.org/>).

For this purpose, a total number of 575 Gram-positive strains were isolated from clinical specimens such as blood, urine, feces, vaginal swabs etc from seven hospitals of our country, between 2008 and 2011 period. Specifically 186 strains VRE *Enterococcus faecium*, 30 strains Linezolid Resistant *Enterococcus faecalis*, 126 strains *Staphylococcus aureus* (MRSA & MSSA), 35 strains Linezolid Resistant *Staphylococcus epidermidis*, 80 strains *Streptococcus pyogenes* and 118 strains *Streptococcus agalactiae*, were analysed in an attempt to determine, investigate and control the spread of pathogenic strains.

Initially the isolates were subjected on standard laboratory methods that include bacteria culture, biochemical characterization to the genus and species level and the

Ανθή Δ. Νταμάνη, Διδακτορική Διατριβή

antibiotic susceptibility testing confirmed by analysis with a Vitek 2 instrument and E-test. The isolation of the genetic material –DNA- of the isolates was performed by extracting with automatic system Magstration in order to type them.

Primarily each standard scheme of MLST was investigated in laboratory for the optimum detection and amplification of genes through changes of laboratory parameters such as eg quantitative and temperature changes. The amplification of all gene fragments was carried out using the Polymerase Chain Reaction (PCR). In the next step followed electrophoresis of the amplified genes on agarose gel and purification of DNA. Sequence analysis of each gene fragment was performed by the modified Sanger method and determined using specialized programs bio-informatics (Mega 5.0, ClustalW). The isolates were classified into Sequence Types-STs in combination with databases of MLST.

The main population clones identified per bacterium, are: in *E. faecium* ST412, ST17, ST203, in *E. faecalis* ST28, ST6, ST9, in *S. aureus* ST80, ST225, ST239, in *S. epidermidis* ST22, ST2, ST35, in *S. pyogenes* ST36, ST28, ST101 and *S. agalactiae* ST1, ST22 and ST17.

The study of the genetic relatedness of clones made through the implementation of an algorithm eBURST, which enables the classification of clones of bacteria in clonal complexes with similar genetic traits and the comparison with global epidemic clones.

The comparison of our clones with global epidemic clones showed that pathogenic clones worldwide epidemic are circulating in Greek hospitals and it is necessary to be taken stringent measures to prevent and reduce nosocomial infections for the health and protection of both patients and staff in such a sensitive area such as the Hospital.

This study will provide a basis of comparison for future epidemiological studies in Gram-positive cocci in Greece since in a globalized environment, population movement (travel, study, work) directly affects the epidemiology of infections and monitoring the spread of clones and diversification with time.

Ανθή Δ. Νταμάνη

2013

**ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΝΕΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ GRAM-ΘΕΤΙΚΩΝ
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΩΣ ΜΕΤΡΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΠΙΔΗΜΙΩΝ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. ΕΥΘΥΜΙΑ ΠΕΤΕΙΝΑΚΗ - Επιβλέπουσα

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας
του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

2. ΚΩΝ/ΝΟΣ ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ

Καθηγητής Πνευμονολογίας
του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

3. ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΣΑΚΕΛΛΑΡΙΔΗΣ

Καθηγητής Φαρμακολογίας
του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Στις κόρες μου Λίνα και Μικαέλα

Στον Γιώργο

~Μέσα στη θλίψη της απέραντης μετριότητας που μας πνίγει από παντού, παρηγοριέμαι ότι κάπου, κάποιои πεισματάρηδες, αγωνίζονται να εξουδετερώσουν την φθορά.~

Μικρά Έψιλον

Οδυσσέας Ελύτης

Ανθή Δ. Νταμάνη

2013

**ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΝΕΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ GRAM-ΘΕΤΙΚΩΝ
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΩΣ ΜΕΤΡΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΠΙΔΗΜΙΩΝ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: 21

Συνολικός αριθμός σελίδων: 224

Αριθμός εικόνων: 51

Αριθμός πινάκων: 47

Αριθμός διαγραμμάτων: 13

Αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών: 457

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή	1
1.1.1. Πρόγραμμα Ελέγχου Νοσοκομειακών Λοιμώξεων	2
1.1.2. Επιδημιολογική Διερεύνηση Νοσοκομειακών Λοιμώξεων	5
1.1.3. Επιδημιολογία Gram θετικών βακτηρίων	5
1.1.3.1. Εντερόκοκκοι	5
1.1.3.2. Σταφυλόκοκκοι	7
1.1.3.3. Στρεπτόκοκκοι	11
1.1.4. Δυνατότητες αποτελεσματικής εφαρμογής μοριακών τεχνικών	13
1.1.5. Χαρακτηριστικά και μέθοδοι τυποποίησης βακτηρίων	14
1.2.0 Φαινοτυπικές μέθοδοι ταυτοποίησης βακτηρίων	16
1.2.1. Μικροσκόπηση παρασκευασμάτων	16
1.2.2. Καλλιέργεια μικροβίων	17
1.2.3. Βιοχημικές δοκιμασίες ταυτοποίησης	18
1.2.4. Δοκιμασίες ευαισθησίας στα αντιβιοτικά-Αντιβιογράμμα	19
1.2.5. Ορολογικές δοκιμασίες	23
1.2.6. Λυσιτυπία	24
1.3.0. Μοριακές μέθοδοι τυποποίησης βακτηρίων	25
1.4.0. Μοριακές τεχνικές τυποποίησης χωρίς ενίσχυση του DNA	26
1.4.1. Μοριακές τεχνικές με χρήση περιοριστικών ενζύμων και προτύπων ζώνωσης	26
1.4.1.1. Πολυμορφισμός Μήκους Περιοριστικών Ενζύμων-RLFP	26
1.4.1.2. Ηλεκτροφόρηση σε Παλλόμενο Ηλεκτρικό Πεδίο-PFGE	28
1.4.2. Southern Blot - Ριβοτυπία - Northern Blot	32
1.4.2.1. Ιχνηθέτες -Probes στην Υβριδοποίηση και την Διαγνωστική	34
1.4.3. Τυποποίηση μέσω πλασμιδίων	35
1.5.0. Μοριακές τεχνικές τυποποίησης βακτηρίων με ενίσχυση του DNA	36
1.5.1. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης PCR	36
1.5.1.1. Βασικές αρχές της PCR	37
1.5.1.2. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της PCR	40
1.5.2. Άλλες μέθοδοι ενίσχυσης του DNA εκτός PCR	41
1.6.0. Μοριακές Μέθοδοι-Παραλλαγές της PCR	42
1.6.1. Multiplex PCR	43
1.6.2. AFLP	43
1.6.3. Nested PCR	44
1.6.4. Ευρέος φάσματος PCR	44
1.6.5. Repetitive elements PCR system	47
1.6.6. Real Time PCR	48
1.7.0. Ανάλυση των προϊόντων της PCR μετά την ενίσχυση	49
1.7.1. Ανάλυση με ανάστροφο υβριδισμό	49
1.7.2. Ανάλυση με μικροσυστοιχίες DNA	49
1.7.3. Ανάλυση του DNA με αλληλούχιση (Sequencing)	51

1.7.3. Μέθοδος Sequencing κατά Sanger	51
1.8.0. Τυποποίηση βακτηρίων με αλληλούχιση (Sequencing)	53
1.8.1. Μονοτοπικός Προσδιορισμός Αλληλουχίας SLST	54
1.8.2. Πολυτοπικός Προσδιορισμός Αλληλουχίας MLST	57
1.9.0. Μικροβιακός κλώνος και μηχανισμοί εξέλιξης του	60
1.10.0. Μικροβιακή Εξέλιξη και Συστηματική	68
1.10.1. Κριτήρια επιλογής γονιδίων	68
1.10.2. Φυλογενετικά δέντρα και δενδρογράμματα	68
1.10.3. Διαγράμματα κλωνικών συμπλεγμάτων BURST	70
1.11.0. Σκοπός Διδακτορικής Διατριβής	73

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Υλικά και μέθοδοι

2.1.0. Συλλογή και προέλευση στελεχών Gram θετικών βακτηρίων	77
2.2.0. Φαινοτυπικές δοκιμασίες για την ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους	78
2.2.1. Χρώση κατά Gram	78
2.2.2. Δοκιμασία παραγωγής καταλάσης	79
2.2.3. Δοκιμασία υδρόλυσης αισκουλίνης	79
2.2.4. Δοκιμασία παραγωγής ηκτάσης	79
2.2.5. Δοκιμασίες ταυτοποίησης στρεπτόκοκκων	80
2.3.0. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά	81
2.3.1. Δοκιμασία των δίσκων	81
2.3.2. Έλεγχος ευαισθησίας με VITEK-2	82
2.3.3. Δοκιμασία E-test	82
2.4.0. Απομόνωση γενετικού υλικού	83
2.5.0. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης	84
2.6.0. Πολυτοπικός Προσδιορισμός Αλληλουχίας (MLST)	85
2.6.1. <i>Enterococcus faecium</i>	86
2.6.2. <i>Enterococcus faecalis</i>	90
2.6.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	95
2.6.4. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	99
2.6.5. <i>Streptococcus pyogenes</i>	103
2.7.0. Nested PCR	107
2.7.1. <i>Streptococcus agalactiae</i>	109
2.8.0. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR	114
2.9.0. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR	115
2.10.0. Ανάλυση Αλληλουχίας (Sequencing)	117
2.11.0. Εκχώρηση αλληλόμορφου προφίλ και Τύπου Αλληλουχίας	119
2.12.0. Εφαρμογή κλωνικής μελέτης eBURST	120
2.13.0. Προγράμματα Βιοπληροφορικής και Γενετικές Βάσεις Δεδομένων	122

Αποτελέσματα

3.1. <i>Enterococcus faecium</i>	125
3.2. <i>Enterococcus faecalis</i>	129
3.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	132
3.4. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	138
3.5. <i>Streptococcus pyogenes</i>	140
3.6. <i>Streptococcus agalactiae</i>	144

Συζήτηση

4.1. <i>Enterococcus faecium</i>	150
4.2. <i>Enterococcus faecalis</i>	154
4.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	155
4.4. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	161
4.5. <i>Streptococcus pyogenes</i>	164
4.6. <i>Streptococcus agalactiae</i>	167

Συμπεράσματα	171
---------------------------	-----

Παράρτημα	174
------------------------	-----

Π1. Εικόνες Ηλεκτροφόρησης των γονιδίων	175
------------------------------------------------------	-----

Π2. Νεώτερες μέθοδοι στην Αλληλούχιση του DNA	177
------------------------------------------------------------	-----

Π3. ABC μεταφορείς	182
---------------------------------	-----

Βιβλιογραφικές Αναφορές	186
--------------------------------------	-----

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ανθή Δ. Νταμάνη, Διδακτορική Διατριβή

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το 1854, ενώ μια επιδημία χολέρας μάστιζε την περιοχή του Σόχο στο Λονδίνο, ο John Snow διερεύνησε την έξαρση, για τον εντοπισμό της θέσης των κρουσμάτων, μ' έναν χάρτη της περιοχής. Από την κατανομή των κρουσμάτων και τα ερωτήματα στους περίοικους κατέληξε ότι η πηγή της λοίμωξης ήταν μια δημόσια αντλία νερού. Αυτή είναι η πρώτη ιστορικά καταγεγραμμένη επιδημιολογική έρευνα και ο Snow χαιρετίστηκε ως ο ιδρυτής της επιστήμης της Επιδημιολογίας. ⁽¹⁾

Οι ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις αποτελούν τα τελευταία χρόνια ένα μείζον πρόβλημα και πηγή αυξημένης νοσηρότητας και θνησιμότητας των νοσηλευόμενων ασθενών. Μόνο στις ΗΠΑ αφορά δύο εκατομμύρια ασθενείς κάθε χρόνο, οι οποίοι αποτελούν περίπου το 5% των νοσηλευόμενων ασθενών με 88.000 θανάτους και 4,5 εκατομμύρια δολάρια κόστος των ασφαλιστικών ταμείων. ^(2 3) Παρότι που ως αιτία των λοιμώξεων αναγνωρίζονται και οι ιοί, οι μύκητες και τα παράσιτα, τα πολυανθεκτικά βακτήρια αποτελούν την κύρια αιτία των νοσοκομειακών λοιμώξεων.

Στα βακτήρια με το μεγαλύτερο πρόβλημα πολυαντοχής στα αντιβιοτικά συγκαταλέγονται, τα Gram-θετικά νοσοκομειακά βακτήρια, όπως εντερόκοκκοι ανθεκτικοί στην βανκομυκίνη (VRE), σταφυλόκοκκοι ανθεκτικοί στην μεθικιλίνη (MRSA) και προσφάτως σταφυλόκοκκοι μετρίως ευαίσθητοι στα γλυκοπεπτιδία. Η κατανόηση της σχέσης των στελεχών των νοσοκομειακών λοιμώξεων αποτελεί σημαντικό στοιχείο για την μελέτη και την επιδημιολογία των λοιμώξεων.

Η τυποποίηση των παθογόνων στελεχών σκοπό έχει την διερεύνηση, εάν τα στελέχη του ίδιου είδους είναι ταυτόσημα, συγγενικά ή είναι εντελώς διακριτά. Τα προηγούμενα χρόνια για να απαντηθούν τα ερωτήματα αυτά, γινόταν σύγκριση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των απομονωμένων στελεχών. Ο μεταβολισμός συγκεκριμένων ουσιών (βιοχημικές ιδιότητες), οι ορολογικές διαφορές αυτών, η τυποποίηση με βακτηριοφάγους και η αντοχή στα αντιμικροβιακά φάρμακα, είναι φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τα οποία μελετούσαν κατά την διερεύνηση των νοσοκομειακών λοιμώξεων. Η προσέγγιση αυτή, έχει αλλάξει τις δύο τελευταίες δεκαετίες με την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών, κυρίως αυτών που βασίζονται στην ανάλυση του DNA των μικροοργανισμών.

Οι μοριακές μεθοδολογίες έχουν προσθέσει σημαντικές πληροφορίες για την συγγένεια των βακτηριακών στελεχών των νοσοκομειακών λοιμώξεων. Η αποδεδειγμένη κλωνικότητα των παθογόνων, μας δίνει την δυνατότητα αναγνώρισης της πηγής (περιβάλλον, άλλοι ασθενείς, προσωπικό), τον διαχωρισμό των λοιμογόνων από τα μη λοιμογόνα στελέχη και τον χαρακτηρισμό των λοιμώξεων από κοινή πηγή ως λοιμώξεων ενδογενούς αιτιολογίας ενώ των λοιμώξεων από άλλον ασθενή ή το άψυχο περιβάλλον ως λοιμώξεων εξωγενούς αιτιολογίας.

Μια επιδημία μπορεί να επιβεβαιωθεί μόνο με την τεκμηρίωση της κλωνικότητας του βακτηριακού αιτίου και της μετακίνησης του από την κοινή πηγή προς στους ασθενείς (επιδημίες κοινής πηγής). Στη μεγάλη πλειοψηφία τα επιδημικά επεισόδια οφείλονται στην διασπορά ενός επιδημικού βακτηριακού κλώνου είτε αυτός προέρχεται από κοινή πηγή ή μεταδίδεται μολυσματικά από ασθενή σε ασθενή ή από το προσωπικό των κλινικών στους ασθενείς λόγω ελλικών κανόνων υγιεινής.

1.1.1 ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ

Τις τελευταίες δεκαετίες η εμφάνιση πολυανθεκτικών βακτηρίων στα νοσοκομεία και κυρίως στις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ), αποτελεί ένα ιδιαίτερα ανησυχητικό φαινόμενο, καθώς περιορίζονται οι δυνατότητες κατάλληλης και αποτελεσματικής θεραπείας των λοιμώξεων. Στις περισσότερες των περιπτώσεων οι λοιμώξεις που προκαλούνται από τα πολυανθεκτικά βακτήρια είναι όμοιες με αυτές που προκαλούνται από τα ευαίσθητα στελέχη. Με άλλα λόγια πολυανθεκτικά βακτήρια προκαλούν νοσοκομειακές λοιμώξεις όπως βακτηριαίμια, πνευμονία, ουρολοίμωξη, λοίμωξη χειρουργικών τραυμάτων κ.α. Παρόλα αυτά οι επιλογές που υπάρχουν σε ότι αφορά την θεραπεία των συγκεκριμένων λοιμώξεων από πολυανθεκτικά βακτήρια είναι πολύ περιορισμένες έως και ανύπαρκτες. Μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει αύξηση της διάρκειας της νοσηλείας, του κόστους νοσηλείας αλλά κυρίως αύξηση της θνητότητας όταν η λοίμωξη οφείλεται σε πολυανθεκτικά βακτήρια. ^(4, 5, 6) Μια άλλη συνέπεια της εμφάνισης πολυανθεκτικών βακτηρίων είναι η μεταβολή της αντιμικροβιακής πολιτικής που εφαρμόζεται σε μια μονάδα, γεγονός που επηρεάζει τελικά δυσμενώς την φυσιολογική χλωρίδα των νοσηλευόμενων ασθενών. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ένας φαύλος κύκλος που με την σειρά του δημιουργεί τις κατάλληλες προϋποθέσεις για την διευκόλυνση του αποικισμού με ανθεκτικά βακτήρια όλων των ασθενών που βρίσκονται υπό αντιμικροβιακή αγωγή.

Η εμφάνιση πολυανθεκτικών βακτηρίων σε μία μονάδα είτε λόγω μη ορθολογικής χρήσης των αντιβιοτικών είτε λόγω νοσηλείας ενός ασθενούς που έχει λοίμωξη είτε είναι αποικισμένος από άλλο νοσοκομείο, δεν προδικάζει απαραίτητα την εμφάνιση μιας επιδημίας. Η μετάδοση και η παραμονή των βακτηρίων αυτών καθορίζονται από ποικίλους παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί διακρίνονται σ' αυτούς που σχετίζονται:

➤ με την νοσηλεία των ασθενών: Η χαμηλή συμμόρφωση του ιατρονοσηλευτικού προσωπικού στην υγιεινή των χεριών, η ελλιπής χρήση γαντιών, ποδιάς, μάσκας, η μη τήρηση κανόνων υγιεινής του περιβάλλοντος, ο συνωστισμός, ο αυξημένος δείκτης αποικισμού σε μία μονάδα και ο χαμηλός δείκτης νοσηλευτών/ασθενών αποτελούν μερικούς από τους καθοριστικούς παράγοντες.

➤ με τον ίδιο τον ασθενή: Η χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων, η σοβαρότητα της κύριας νόσου, οι συνυπάρχουσες παθολογικές καταστάσεις, η ηλικία, η κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς και η χρήση καθετήρων.

Με τις υπάρχουσες συνθήκες, η ραγδαία εξάπλωση των πολυανθεκτικών μικροβίων, καθιστά την **πρόληψη** της ενδοноσοκομειακής διασποράς των πολυανθεκτικών μικροβίων απολύτως αναγκαία και ουσιώδη και προβάλλει επιτακτική η χρήση μέτρων μείωσης της διασποράς τους. Η λήψη μέτρων για την πρόληψη της μετάδοσης των παθογόνων αυτών απαιτεί συντονισμένες ενέργειες και συνεργασία όλου του προσωπικού του νοσοκομείου, ιατρικού, νοσηλευτικού και διοικητικού. Από την προηγούμενη δεκαετία, οργανισμοί όπως Infectious Diseases Society of America και Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) κ.α. έχουν δημοσιεύσει **κατευθυντήριες οδηγίες** που αφορούν την πρόληψη της μετάδοσης των νοσοκομειακών παθογόνων. ^(5, 6, 7)

Τα βασικά στοιχεία για την πρόληψη της μετάδοσης των παθογόνων περιλαμβάνουν:

➤ **Διοικητικά μέτρα**

Η Διοίκηση μεριμνά για την τήρηση των κατευθυντηρίων οδηγιών και την συνεργασία μεταξύ όλων των εμπλεκόμενων φορέων του νοσοκομείου. Επίσης είναι υπεύθυνη για την λειτουργία της Επιτροπής Νοσοκομειακών Λοιμώξεων (**ΕΝΛ**) με την οποία θα πρέπει να έχει άριστη συνεργασία για την επίλυση όλων των προβλημάτων. Η Διοίκηση πρέπει να παρέχει πλήρη υποστήριξη των μέτρων που λαμβάνονται από την Επιτροπή. Ο πρωταρχικός ρόλος της ΕΝΛ είναι **η μείωση των παραγόντων κινδύνου** των νοσοκομειακών λοιμώξεων που δημιουργούνται στο νοσοκομείο για την προστασία των ασθενών, των εργαζόμενων και των επισκεπτών, μέσω του Προγράμματος Ελέγχου Νοσοκομειακών Λοιμώξεων (**ΠΕΝΛ**), το οποίο για να είναι αποτελεσματικό πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες λειτουργίες:

- Καταγραφή των επιδημιών
- Εκπαίδευση
- Υγεία των εργαζομένων στο νοσοκομείο
- Ανασκόπηση της χρήσης των αντιβιοτικών σε σύγκριση με τα δεδομένα της ευαισθησίας των μικροβίων
- Ανάπτυξη διαδικασιών και πολιτικών ελέγχου λοιμώξεων
- Εκτίμηση νέων προϊόντων
- Εκτίμηση της ποιότητας μέσω επιδημιολογικών προγραμμάτων του νοσοκομείου.

➤ **Υγιεινή χεριών**

Η υγιεινή των χεριών συχνά χαρακτηρίζεται ως ο μόνος και σημαντικότερος παράγοντας για την ελάττωση της μετάδοσης των παθογόνων μικροοργανισμών μεταξύ των ασθενών. Αποτελεί το βασικό στοιχείο όλων των μέτρων προφύλαξης. Ο όρος υγιεινή των χεριών περιλαμβάνει, από το πλύσιμο των χεριών με απλό σαπούνι και νερό, το αντισηπτικό πλύσιμο, την επάλειψη με αντισηπτικό παράγοντα και την χειρουργική αντισηψία των χεριών. Εφαρμόζεται πριν και μετά την επαφή με τον ασθενή ή το περιβάλλον που γειτνιάζει άμεσα σ' αυτόν, ανεξάρτητα αν χρησιμοποιήθηκαν γάντια. Επίσης συνιστάται μετά από νοσηλευτικές διαδικασίες στον ίδιο ασθενή αλλά και σε διαφορετικά σημεία του σώματός του, προς αποφυγή μόλυνσης. Η ΕΝΛ πρέπει να καταβάλλει κάθε προσπάθεια για την συμμόρφωση του προσωπικού, μέσω της εκπαίδευσης, της επιτήρησης, μέσω αφισών υπενθύμισης, εξασφάλισης εξοπλισμού και επάρκειας προσωπικού. Στην ίδια κατηγορία περιλαμβάνονται μέτρα όπως η χρήση γαντιών, μάσκας και προστατευτικών γυαλιών.

➤ **Υγιεινή περιβάλλοντος**

Με το όρο αυτό εννοούνται όλα τα άψυχα αντικείμενα που βρίσκονται στο άμεσο ή ευρύτερο περιβάλλον, όπως το ξενοδοχειακό περιβάλλον αλλά και ιατρικές συσκευές και όργανα με τα οποία έρχεται σε επαφή ο ασθενής.

➤ **Απομόνωση ασθενών**

Αν είναι εφικτό συνιστάται η τοποθέτηση των ασθενών με λοιμώξεις από πολυανθεκτικά βακτήρια σε μονόκλινα δωμάτια, σε συνδυασμό με τις προφυλάξεις επαφής. Εάν αυτό δεν είναι εφικτό, επιλέγεται η τοποθέτηση ανά ομάδες, να γίνεται δηλαδή διαχωρισμός (cohorting) όλων των ασθενών με το ίδιο πολυανθεκτικό βακτήριο. Στην περίπτωση αυτή είναι απαραίτητη η αποκλειστική απασχόληση του νοσηλευτικού προσωπικού με την συγκεκριμένη ομάδα.

➤ Εκπαίδευση

Αποτελεί ένα από τα βασικά στοιχεία των παρεμβάσεων που στόχο έχουν την μείωση της επίπτωσης των λοιμώξεων από πολυανθεκτικά βακτήρια σε ένα νοσοκομείο. Αποτελεί μία από τις βασικές υποχρεώσεις της ΕΝΛ και σκοπός της εκπαίδευσης είναι ουσιαστικά η ενθάρρυνση της αλλαγής συμπεριφοράς, μέσω της κατανόησης του προβλήματος που δημιουργεί η παρουσία πολυανθεκτικών βακτηρίων σε μία μονάδα. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η εκπαίδευση του προσωπικού σε θέματα υγιεινής των χεριών και του περιβάλλοντος καθώς επίσης στα μέτρα προφύλαξης και απομόνωσης ασθενών. Η συνεχής εκπαίδευση με την επιτήρηση φαίνεται ότι έχουν πολύ καλά αποτελέσματα στην συμμόρφωση με τις κατευθυντήριες οδηγίες για τον έλεγχο των λοιμώξεων. Πρέπει να επισημανθεί ότι η αυστηρή εφαρμογή των παραπάνω κανόνων στη Δανία, που ξεκίνησε όταν η παρουσία των MRSA στελεχών βρισκόταν στο 30%, κατάφερε να την μειώσει σε ποσοστό <1% ! ⁽⁸⁾

➤ Επιδημιολογική επιτήρηση των πολυανθεκτικών βακτηρίων

Μέσω της επιδημιολογικής επιτήρησης είναι δυνατή η ανίχνευση νέων πολυανθεκτικών βακτηρίων, η παρακολούθηση του επιπολασμού και της επίπτωσης αυτών και τέλος η καταγραφή της αποτελεσματικότητας των διαφόρων παρεμβάσεων. Η επιδημιολογική επιτήρηση διακρίνεται σε παθητική και ενεργητική. Με τον όρο **παθητική επιδημιολογική επιτήρηση** εννοούμε ότι μελετώνται όλα τα κλινικά δείγματα που αποστέλλονται στο μικροβιολογικό εργαστήριο και προέρχονται από ασθενείς με κάποια μορφή λοίμωξης. Υπάρχει έτσι η δυνατότητα παρακολούθησης της αντοχής καθώς και η εύρεση νέων μηχανισμών αντοχής που μπορεί τυχόν να προκύψουν. Στην **ενεργητική επιδημιολογική επιτήρηση** γίνεται συστηματική λήψη καλλιιεργειών από όλους τους νοσηλευόμενους ασθενείς (ή από συγκεκριμένους ασθενείς ορισμένες φορές) για την ανίχνευση εκείνων των ασθενών που είναι αποικισμένοι με πολυανθεκτικά βακτήρια. Τα σημεία από όπου λαμβάνονται καλλιιεργείες είναι ο φάρυγγας, το γαστρικό υγρό, το περίνεο και το δέρμα. Σκοπός της ενεργητικής επιτήρησης είναι η ανεύρεση των αποικισμένων ασθενών, η πρωτογενής προφύλαξη των ασθενών που δεν έχουν αποικισθεί καθώς και η δευτερογενής προφύλαξη για τους ήδη αποικισμένους ασθενείς (προφύλαξη από την ενδογενή λοίμωξη). Απώτερος σκοπός αποτελεί η μείωση της νοσηρότητας και θνησιμότητας που σχετίζεται με συγκεκριμένους μικροοργανισμούς. Στα στελέχη που προκύπτουν από την επιδημιολογική επιτήρηση, έχει μεγάλη σημασία να γίνεται προσδιορισμός κλωνικής συσχέτισης. Η γνώση αυτή παρέχει πληροφορίες για την οριζόντια μετάδοση πολυανθεκτικών βακτηρίων και μπορεί να βοηθήσει στον εντοπισμό της αρχικής πηγής.

Πέραν όλων αυτών, η καταγραφή των νοσοκομειακών λοιμώξεων παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την αναγνώριση των μολυσμένων ασθενών, της ανεύρεσης του αρχικού σημείου της λοίμωξης και την αναγνώριση των παραγόντων κινδύνου που συμβάλλουν στις νοσοκομειακές λοιμώξεις. Όταν η μηνιαία συχνότητα για μια συγκεκριμένη λοίμωξη υπερβαίνει το 95% των ορίων αξιοπιστίας που βασίζεται στην συχνότητα προηγούμενων ετών, για τον ίδιο μήνα, υπάρχει πιθανότητα επιδημίας και μια διερεύνηση είναι απολύτως δικαιολογημένη. Σε άλλες περιπτώσεις με μια «έξυπνη» παρατήρηση μιας δυνητικής ομάδας λοιμώξεων από τους κλινικούς ιατρούς ή τους νοσηλευτές ή τους εργαστηριακούς πρέπει να υποκινήσει μια αρχική διερεύνηση. Με την αναγνώριση του προβλήματος, τα δεδομένα της

καταγραφής επιτρέπουν στο νοσοκομείο να θεσπίσει τα κατάλληλα μέτρα παρέμβασης και να αξιολογήσει την αποτελεσματικότητά τους. Επίσης από τα δεδομένα της καταγραφής δίνεται η δυνατότητα στην ΕΝΛ να παρακολουθεί τις τάσεις των λοιμώξεων και την αύξηση της συχνότητας αυτών.

1.1.2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ

Η επιδημιολογική διερεύνηση των νοσοκομειακών λοιμώξεων αποσκοπεί στη κατάταξη των στελεχών των μικροοργανισμών σε είδη, τα οποία είναι μεταξύ τους ταυτόσημα, συγγενικά ή εντελώς διαφορετικά. Επίσης διερευνάται η πηγή των μολύνσεων ώστε να γνωρίζουμε εάν πρόκειται για ενδημικές λοιμώξεις ή για σποραδικές. Συνήθως μια επιδημιολογική διερεύνηση ξεκινά όταν σημειώνεται αύξηση του αριθμού κρουσμάτων που οφείλονται σε συγκεκριμένα παθογόνα είδη μικροβίων ή παρατηρείται αύξηση των πασχόντων ασθενών που οφείλονται σε λοιμώξεις. Έναυσμα επιδημιολογικής διερεύνησης αποτελεί η παρατήρηση συγκεκριμένου προφίλ αντιμικροβιακής αντοχής στα στελέχη που έχουν απομονωθεί. Σημαντικά σημεία κατά την επιδημιολογική διερεύνηση είναι καταρχήν η αναγνώριση της ύπαρξης του προβλήματος, η δημοσιοποίηση των περιπτώσεων, η ολοκλήρωση της ανεύρεσης των κρουσμάτων, η καταγραφή καθώς και η ανασκόπηση των κρουσμάτων σε σχέση με τον χρόνο και τον τόπο εκδήλωσης των λοιμώξεων. Είναι πολύ σημαντικό το εργαστήριο να βρίσκεται σε συνεχή εγρήγορση και βάσει συγκεκριμένων κριτηρίων να σημάνει την αρχή της διερεύνησης.

Η βασική έρευνα περιλαμβάνει συλλογή πληροφοριών και δειγμάτων, εργαστηριακή τυποποίηση, αναγνώριση του παθογόνου μικροβίου και προσδιορισμό της κλωνικότητας του. Στις περιπτώσεις ερευνών case-control, τα χαρακτηριστικά των προσβεβλημένων ατόμων συγκρίνονται με αυτά των μη προσβεβλημένων. Τελικώς αναδύεται η υπόθεση η οποία αφορά την επιδημιολογία της λοίμωξης, συμπεριλαμβανομένων της εκδήλωσης, της πιθανής δεξαμενής των μικροβίων καθώς και των ενδιάμεσων ξενιστών των μικροβίων. ⁽⁹⁾

Μια άλλη εφαρμογή της επιδημιολογικής διερεύνησης αναφέρεται στην χαρτογράφηση ενός ευρύτερου πληθυσμού βακτηρίων όπως π.χ. εάν ο *S. aureus*, που θεωρείται αίτιο σοβαρών νοσοκομειακών λοιμώξεων στην Ελλάδα, ανήκει σε έναν ή σε περισσότερους κλώνους.

Είναι προφανές ότι η σύγκριση στελεχών του ίδιου είδους τα οποία απομονώνονται από διαφορετικούς ασθενείς, από τρόφιμα ή από περιβαλλοντικά δείγματα, πρέπει να βασίζεται σε σαφή κριτήρια που να επιτρέπουν την κατάταξη τους σε ταυτόσημα, συγγενή ή διαφορετικά στελέχη.

1.1.3. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ GRAM-ΘΕΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

1.1.3.1. Εντερόκοκκοι

Οι εντερόκοκκοι είναι Gram-θετικοί σφαιρικοί κόκκοι που διατάσσονται σε ομάδες ή σε αλυσίδες. Στην δεκαετία του '30 κατατάχτηκαν σαν στρεπτόκοκκοι της ομάδας D ενώ τους δόθηκε η επίσημη κατάταξη του γένους τους ως εντερόκοκκοι το 1984, μετά από μελέτες υ-

βριδισμού που έδειξαν μια πιο μακρινή συγγένεια με τους στρεπτόκοκκους. Ανευρίσκονται σαν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του πεπτικού σωλήνα σε πολλούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπινου, καθώς και στο έδαφος, το νερό και τα τρόφιμα. Στον πεπτικό σωλήνα του ανθρώπου αποτελούν το 1% της φυσιολογικής χλωρίδας. ⁽¹⁰⁾ Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους είναι στους 35°C με όρια διακύμανσης από 10°C έως 45°C. ⁽¹¹⁾ Είναι ισχυρά βακτήρια και έχουν αντοχή σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων, οξέων και χημικών απολυμαντικών όπως είναι το χλώριο και η αλκοόλη, τα οποία αποτελούν σημαντικά χαρακτηριστικά για την επιβίωση και την εξάπλωση τους σε νοσοκομειακό περιβάλλον. ⁽¹²⁾ Επίσης φαίνεται ότι είναι σε θέση να επιβιώνουν σε χαμηλά επίπεδα απορρυπαντικών, γεγονός που εξηγεί γιατί οι ανεπαρκείς διαδικασίες καθαρισμού στα νοσοκομεία ευνοούν λοιμώξεις από εντερόκοκκους.

Σήμερα οι λοιμώξεις των εντερόκοκκων, καταλαμβάνουν την δεύτερη θέση μετά την *E. coli*, προκαλώντας περίπλοκες κοιλιακές και δερματικές λοιμώξεις, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, χειρουργικές λοιμώξεις, βακτηριαιμία καθώς και ενδοκαρδίτιδα. Με αυξανόμενη συχνότητα ανευρίσκονται σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, καρκίνο, μεταμοσχευμένους ασθενείς καθώς και ασθενείς που εμφανίζουν παρατεταμένη νοσηλεία. ^(13, 14) Αυτές οι λοιμώξεις είναι δύσκολο να αντιμετωπιστούν, ιδίως στις περιπτώσεις που τα στελέχη έχουν αναπτύξει αντοχή σε αντιβιοτικά, απειλώντας την ζωή, κυρίως των ασθενών που βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή. Κατά την δεκαετία του '90 ο *E. faecalis* αντιπροσώπευε την πλειοψηφία των εντεροκοκκικών νοσοκομειακών λοιμώξεων σε σχέση με τον *E. faecium*, η αναλογία αυτή όμως έχει μεταβληθεί κατά την τελευταία δεκαετία. ^(15, 16) Έρευνα που διεξήχθη σε περισσότερα από 15.000 στελέχη εντερόκοκκων, έδειξε ότι ο μιν *E. faecalis* επιδεικνύει αντοχή στην αμπικιλίνη λιγότερο από 2%, ο δε *E. faecium* 83% στην αμπικιλίνη και επιπλέον 52% στην βανκομυκίνη. Στις ΗΠΑ οι πρώτες αναφορές για αύξηση των επιδημικών εξάρσεων εξαιτίας του ανθεκτικού στην αμπικιλίνη *E. faecium* (AREfm) δημοσιεύτηκαν από τις αρχές της δεκαετίας του '80 ^(17, 18, 19, 20) ενώ για την βανκομυκίνη, το «αντιβιοτικό της έσχατης λύσης», είχαμε τα πρώτα κρούσματα στην Ευρώπη το 1988 και στις ΗΠΑ το 1989. ^(21, 22, 23, 24, 25, 26) Στην Ελλάδα το πρώτο περιστατικό *E. faecium* ανθεκτικού στην βανκομυκίνη (VRE) καταγράφηκε το 1999 στο ΠΓΝΑ «Ευαγγελισμός». ⁽²⁷⁾

Υπάρχει μια αξιοσημείωτη διαφορά στην επιδημιολογία του VRE μεταξύ Ευρώπης και ΗΠΑ. Στις ΗΠΑ ο αποικισμός με VRE των νοσηλευόμενων ασθενών αυξήθηκε γρήγορα κατά την δεκαετία του '90 μέχρι την τρέχουσα κατάσταση της ενδημικής παρουσίας του σε πολλά νοσοκομεία, παράλληλα όμως δεν υπήρχε αποικισμός σε υγιή πληθυσμό. ⁽²⁸⁾ Έχει προταθεί ότι η αύξηση του VRE στα νοσοκομεία των ΗΠΑ οφείλεται στη υπερβολική χρήση του ως αντιβιοτικού. ⁽²⁹⁾ Στην Ευρώπη αντίθετα τα ποσοστά επικράτησης του VRE στα νοσοκομεία παρέμεναν χαμηλά μέχρι το 2000 ^(30, 31) ενώ η μεγάλη δεξαμενή του VRE, κατά την δεκαετία του '90, βρισκόταν μεταξύ του υγιούς πληθυσμού της κοινότητας και των ζώων αγροκτήματος. Για τον λόγο αυτό συνδέθηκε η παρουσία του VRE στην Ευρώπη με την πιθανότητα της μαζικής χρήσης της αβοπαρσίνης (avoparcin) στην κτηνοτροφία. ^(32, 33, 34, 35, 36, 37) Το avoparcin είναι ένα αντιμικροβιακό γλυκοπεπτιδίο όπως και η βανκομυκίνη και έχει χρησιμοποιηθεί σαν αυξητικός παράγοντας στον γεωργοκτηνοτροφικό κλάδο σε πολλές ευ-

ρωπαϊκές χώρες από την δεκαετία του '70. Εξαιτίας των παραπάνω διαπιστώσεων εκτιμήθηκε ότι το *avoparcin* αποτελεί απειλή για την μετάδοση του VRE από τον γεωργοκτηνοτροφικό κλάδο προς τα νοσοκομεία και γι' αυτό η ΕΕ απαγόρευσε την χρήση του τον Απρίλιο του 1997. (38, 39)

Οι δύο εξεταζόμενοι εντερόκοκκοι ανήκουν στην ομάδα των βακτηρίων που επιτηρούνται σε ευρωπαϊκό επίπεδο για την αντιμικροβιακή τους αντοχή. Η επιτήρηση πραγματοποιείται υπό την αιγίδα της European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) στην οποία συμμετέχει και η Ελλάδα.



Εικόνα 1: Παρουσία των διεισδυτικών στελεχών VRE *fm* στις ευρωπαϊκές χώρες. (Έκθεση 2010/ EARS-Net). Τα ελληνικά νοσοκομεία κατέχουν το ποσοστό 10-25% παρουσίας του VRE *fm*. Τα ίδια ποσοστά αντιστοιχούν και για την παρουσία του *E. faecalis* στην Ελλάδα.

Η πολυανθεκτικότητα των εντερόκοκκων στα αντιβιοτικά, η αντοχή τους σε δυσμενείς συνθήκες καθώς και οι επιδημίες που προκαλούν, τους έχουν καταστήσει σπουδαία νοσοκομειακά παθογόνα. Ειδικά ο *E. faecium* προκαλεί πολύ σοβαρή ανησυχία στην ιατρική κοινότητα που έχει ονομάσει αυτό το μικρόβιο "supergerm" δηλαδή σούπερ μικρόβιο και η επιδημιολογία του αποτελεί μεγάλο πεδίο έρευνας κατά την τελευταία δεκαετία.

1.1.3.2. Σταφυλόκοκκοι

Οι σταφυλόκοκκοι είναι Gram-θετικοί κόκκοι που διατάσσονται σε ακανόνιστους σχηματισμούς σαν τσαμπιά σταφυλιού. Ακίνητοι, ασπορογόνοι, αερόβιοι, προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί, παράγουν το ένζυμο καταλάση και έτσι διακρίνονται από τους εντερόκοκκους και τους στρεπτόκοκκους. Στο γένος των σταφυλόκοκκων υπάγονται πολλά είδη, αυτά όμως που αφορούν την παρούσα μελέτη είναι ο *Staphylococcus aureus* και ο *Staphylococcus epidermidis* που διακρίνονται μεταξύ τους ως προς την παραγωγή ηηκτάσης (κοαγκουλάσης), ενζύμου που προκαλεί πήξη του αίματος, χαρακτηριζόμενοι ο μιν

S. aureus κοαγκουλάση θετικός (Cg⁺), ο δε *S. epidermidis* κοαγκουλάση αρνητικός (Cg⁻) σταφυλόκοκκος. ⁽⁴⁰⁾

• **Staphylococcus aureus ή χρυσιζων σταφυλόκοκκος:** από την ανακάλυψη του, κατά την διάρκεια της δεκαετίας του 1880, μέχρι σήμερα έχει αναδειχθεί σε ένα δυνητικό παθογόνο που μπορεί να προκαλέσει σοβαρές λοιμώξεις, από μικρές μολύνσεις του δέρματος μέχρι μετεγχειρητικές λοιμώξεις τραυμάτων, βακτηριαιμία, μηνιγγίτιδα, οστεομυελίτιδα, ενδοκαρδίτιδα, σύνδρομο τοξικού σοκ (TSS), σηψαιμία και νεκρωτική πνευμονία. Οι παράγοντες κινδύνου για αποικισμό από MRSA περιλαμβάνουν: προηγούμενη έκθεση σ' ένα ή περισσότερα αντιβιοτικά, παρατεταμένη διάρκεια της θεραπείας, παραμονή σε μονάδα εντατικής θεραπείας ή μονάδα εγκαυμάτων, επεμβατικές διαδικασίες, σοβαρή υποκείμενη νόσο, χειρουργικά τραύματα ή εγκαυματα και η επαφή με ασθενείς αποικισμένους με MRSA. ⁽⁴¹⁾ Συχνά απαντάται ως μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος και των ρινικών κοιλοτήτων, που είναι η κύρια οικοθέση του, και εκτιμάται ότι το 20% του ανθρώπινου πληθυσμού είναι επί μακρόν φορείς του. ⁽⁴²⁾

Πριν την εισαγωγή των αντιβιοτικών το ποσοστό θνησιμότητας εξαιτίας των λοιμώξεων του *S. aureus* ήταν περίπου 80%. Στις αρχές της δεκαετίας του 1940 οι λοιμώξεις που προκαλούσε, υποβάλλονταν σε θεραπεία με την νεοανακαλυφθείσα πενικιλίνη αλλά ήδη τα πρώτα στελέχη με αντοχή στην πενικιλίνη απομονώθηκαν από το 1942, πρώτα στα νοσοκομεία και αργότερα στην κοινότητα. ⁽⁴³⁾ Η αντοχή στην πενικιλίνη προέκυψε από την απόκτηση ενός πλασμιδίου που κωδικοποιούσε το ένζυμο πενικιλινάση, που υδρολύει το αντιβιοτικό. Μέχρι το 1960, το 80% όλων των στελεχών έφεραν αντοχή στην πενικιλίνη. Με την απόκτηση των γονιδίων *mecA* και *VanA*, ο *S. aureus* απέκτησε επιπλέον αντοχή στην μεθικιλίνη (MRSA) και την βανκομυκίνη αντίστοιχα. ^(44, 45) Ο MRSA σήμερα φέρει πλέον αντοχή σε όλες τις διαθέσιμες πενικιλίνες και σε άλλα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Η παρουσία του *SCCmec* (**S**taphylococcal **C**assette **C**hromosome **mec**) είναι σχεδόν καθολική σ' όλα τα στελέχη MRSA και υπάρχουν πέντε κύριοι τύποι *SCCmec* (types I-V). Ο πρώτος κλώνος MRSA (*SCCmec type I*) απομονώθηκε στο Ηνωμένο Βασίλειο από το 1961. ⁽⁴⁶⁾ Παρ' όλα αυτά ο MRSA παρέμενε ένα ασυνήθιστο εύρημα, ακόμα και στα νοσοκομεία, μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του '90, όπου υπήρξε μια έξαρση της παρουσίας του, ενώ τώρα πλέον η παρουσία του είναι ενδημική. ⁽⁴⁷⁾ Η έξαρση αυτή συσχετίστηκε με την αναγνώριση νέων κλώνων του MRSA που συχνά αποκαλούνται **C**ommunity-**A**ssociated (CA-MRSA) διότι προκαλούν λοιμώξεις στην κοινότητα, σε αντιδιαστολή με τα στελέχη του MRSA που κυκλοφορούν στο νοσοκομειακό περιβάλλον και ορίζονται ως **H**ospital-**A**ssociated (HA-MRSA). ^(48, 49, 50, 51) Ενισχύοντας περαιτέρω την παθογονική τους συμπεριφορά, κάποια στελέχη του MRSA παράγουν μια ειδική εξωτοξίνη του *S. aureus*, το PVL (Panton-Valentine leukocidin) το οποίο συνδέεται με λοιμώξεις του δέρματος, των μαλακών μορίων και την νεκρωτική πνευμονία. ^(52, 53) Το PVL είναι μια λευκοσιδίνη που μπορεί να "λύσει" τα ανθρώπινα ουδετερόφιλα και να αδρανοποιήσει τα μιτοχόνδρια που καταλήγουν σε απόπτωση. Σε ζωικά μοντέλα έχει δείξει ότι είναι δερμονεκρωτικό εξηγώντας πιθανόν έτσι τις χαρακτηριστικές δερματικές βλάβες που σχετίζονται με λοιμώξεις CA-MRSA στελεχών και προσομοιάζουν με δάγκωμα αράχνης. ⁽⁵⁴⁾ Παθογονικά χαρακτηριστικά που συνδέονται επίσης με την εμφάνιση των CA-MRSA στελεχών θεωρούνται τα γενετικά κινητά στοιχεία: ACME (arginine catabolic

mobile element) που αποτελεί μοναδικό χαρακτηριστικό για τον USA300 κλώνο, που επικρατεί στις ΗΠΑ, οι ρυθμιστές παγκόσμιων γονιδίων *agr*, *sarA* και *saeRS*, η έκκριση της α-τοξίνης και των a-type phenol soluble modulins (PSMs), καθώς και η αντλία NorB που δίνει πιθανώς πλεονέκτημα προσαρμογής στο βακτήριο. ⁽⁵⁵⁾

Τα στελέχη CA-MRSA φαίνεται ότι διαδίδονται ταχέως στον γενικό πληθυσμό και επηρεάζουν ασθενείς με ή χωρίς έκθεση στο νοσοκομειακό περιβάλλον, δημιουργώντας ακόμα και κρίσεις δημόσιας υγείας σε τμήματα επειγόντων περιστατικών των νοσοκομείων στις ΗΠΑ. Μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2004-2005 στο San Francisco έδειξε ότι το 90% αυτών των λοιμώξεων είχαν έναρξη στην κοινότητα και συνολικά 1,300,000 λοιμώξεις αυτής της αιτιολογίας συνέβησαν στις ΗΠΑ σ' αυτό το χρονικό διάστημα. ^(56, 57, 58) Εικάζεται ότι κάποιες από τις CA-MRSA λοιμώξεις προέρχονται από νοσοκομειακά στελέχη, μέσω της διαχείρισης σύνθετων HA-MRSA λοιμώξεων στο σπίτι.

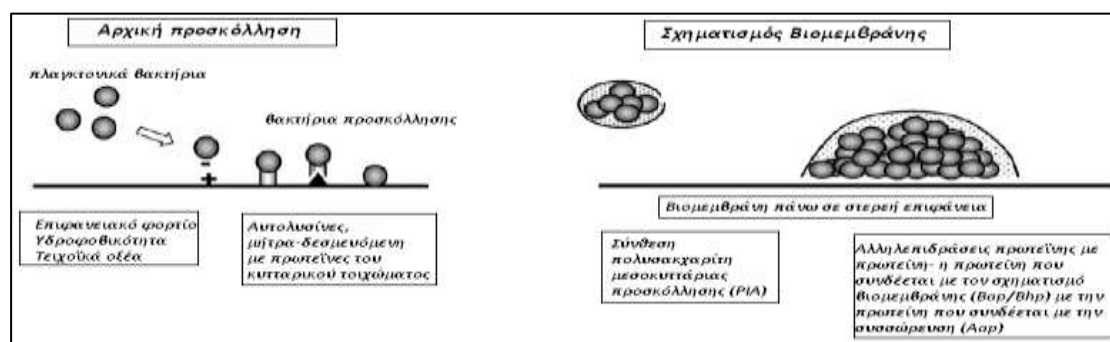


Εικόνα 2: Παρουσία των διεισδυτικών στελεχών MRSA στις ευρωπαϊκές χώρες. (Έκθεση 2010/EARS-Net). Τα ελληνικά νοσοκομεία κατέχουν το ποσοστό 25-50% παρουσίας του MRSA.

Συμπερασματικά τα στελέχη CA-MRSA έχουν μια σύνθετη επιδημιολογία που προέκυψε από νοσοκομειακά στελέχη που "δραπέτευσαν", χαρακτηριζόμενα και ως άγρια (feral) στελέχη HA-MRSA και κυκλοφόρησαν στον γενικό πληθυσμό. ^(59, 60) Μεγάλες δεξαμενές αυτών των νέων στελεχών βρίσκονται εκτός των νοσοκομείων αλλά είναι πλέον προφανές ότι οποιαδήποτε προσπάθεια επιτήρησης και ελέγχου των λοιμώξεων εντός των νοσοκομείων δεν πρόκειται να επιτύχει αν δεν συνοδευτεί με ανάλογη προσπάθεια ελέγχου της εξάπλωσης τους μέσα στην κοινότητα. Κυκλοφορούν σχετικά λίγα αντιβιοτικά κατάλληλα για την θεραπεία MRSA λοιμώξεων αλλά έχουν σημαντικούς περιορισμούς στην χρήση τους, η δε ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών τάξεων έχει περιοριστεί σημαντικά. Ήδη υπάρχουν αναφορές νέων αντοχών στο καθένα από τα λίγα αυτά αντιβιοτικά, εγείροντας την δυσοίωνη πιθανότητα, στο άμεσο μέλλον, της ύπαρξης αθεράπευτων MRSA λοιμώξεων - untreatable multidrug resistant - MRD *S. aureus*. ^(61, 62, 63) Πρέπει να επισημανθεί όμως ότι ο χαμηλός

επιπολασμός του MRSA στις Κάτω Χώρες και την Σκανδιναβία αποδίδεται σε χαμηλή αντιβιοτική πίεση επιλογής και διαλογή ασθενών MRSA υψηλού κινδύνου, πριν ή κατά τον χρόνο εισαγωγής τους στο νοσοκομείο με εφαρμογή της πολιτικής «search and destroy». Αποτελεσματικότερες διαδικασίες απολύμανσης και εφαρμογή των κατευθυντηρίων οδηγιών πρόληψης, κυρίως στην υγιεινή των χεριών, βοήθησαν στην αποτροπή της εξάπλωσης του MRSA στο νοσοκομειακό περιβάλλον. Η αυστηρή εφαρμογή των παραπάνω κανόνων στη Δανία, που ξεκίνησε όταν ο επιπολασμός βρισκόταν στο 30%, κατάφερε να τον μειώσει σε ποσοστό <1% ! (64, 65, 8)

• **Staphylococcus epidermidis** ή **λευκός σταφυλόκοκκος**: ανευρίσκεται επί του δέρματος του ανθρώπου όπου αποτελεί μόνιμο μέλος της μικροβιακής του χλωρίδας εξ ου και το όνομα του. Αποικίζει τους βλεννογόνους του αναπνευστικού, τη μύτη, το μάτι και το αυτί. Συνήθως δεν είναι παθογόνος αλλά οι ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς διατρέχουν μεγάλο κίνδυνο λοίμωξης εξ αιτίας του. Οι λοιμώξεις που προκαλεί μπορεί να προέρχονται είτε από το νοσοκομειακό περιβάλλον είτε από την κοινότητα αλλά την μεγαλύτερη απειλή την αντιμετωπίζουν οι ασθενείς των νοσοκομείων. Οι λοιμώξεις εξ αιτίας του μπορεί να οφείλονται είτε στην ανεξέλεγκτη χρήση των αντιβιοτικών είτε στην χρήση ισχυρών απολυμαντικών που έχει σαν συνέπεια την παραγωγή ανθεκτικών στελεχών. Ο *S. epidermidis* προκαλεί μεγάλη ανησυχία κυρίως για ασθενείς που φέρουν καθετήρα ή άλλα χειρουργικά εμφυτεύματα εξαιτίας της βιομεμβράνης που αναπτύσσει σ' αυτές τις συσκευές και που αποτελεί μεγάλο παράγοντα παθογένειας. (66) Μια πιθανή αιτία δημιουργίας της βιομεμβράνης είναι η αλληλεπίδραση επιφανειακών πρωτεϊνών του βακτηρίου με το αίμα και εξωκυττάρια πρωτεΐνες. Η κάψουλα που δημιουργείται είναι γνωστή ως πολυσακχαρίτης μεσοκυττάρια πρόσφυσης (PIA) και επιτρέπει σε νεοεισερχόμενα βακτήρια να συνδέονται στην ήδη υπάρχουσα βιομεμβράνη δημιουργώντας έτσι ένα πολυστρωματικό μόρφωμα. Σε τέτοια μορφώματα μειώνεται ο μεταβολικός ρυθμός των βακτηρίων που σε συνδυασμό με την διαταραχή της διάχυσης των αντιβιοτικών λόγω του μορφώματος, καθιστούν εξαιρετικά δύσκολη έως αδύνατη την εξάλειψη της λοίμωξης. (67)



Εικόνα 3: Παράγοντες που εμπλέκονται στην αρχική προσκόλληση στις επιφάνειες και τον τρόπο σχηματισμού της βιομεμβράνης από τους σταφυλόκοκκους. (68)

Τα αντιβιοτικά είναι σε μεγάλο βαθμό αναποτελεσματικά για την εκκαθάριση της βιομεμβράνης και πολλές φορές συνιστάται η αφαίρεση και η αντικατάσταση των μολυσμένων εμφυτευμάτων, αν και η πρόληψη είναι η ιδανική περίπτωση. Το προσεκτικό πλύσιμο των χεριών έχει αποδειχθεί ότι μειώνει σημαντικά την εξάπλωση της λοίμωξης.

1.1.3.3. Στρεπτόκοκκοι

Οι στρεπτόκοκκοι είναι Gram-θετικοί κόκκοι, σφαιρικοί ή ωοειδείς που διατάσσονται σε στρεπτές μικρές ή μακριές αλυσίδες. Είναι ακίνητοι, ασπορογόνοι, αερόβιοι και εκλεκτικά αναερόβιοι. Δεν παράγουν καταλάση διακρινόμενοι έτσι από τους σταφυλόκοκκους και ζυμώνουν την γλυκόζη. Εξετάζονται δύο είδη στρεπτόκοκκων ο *Streptococcus pyogenes* και ο *Streptococcus agalactiae*. Κατατάσσονται στους β-αιμολυτικούς στρεπτόκοκκους, βάσει του είδους της αιμόλυσης που προκαλούν (πλήρης διαύγαση) όταν αναπτύσσονται σε αιματούχο άγαρ. Διακρίνονται από άλλους στρεπτόκοκκους δίνοντας ο μιν *S.agalactiae* θετική την αντίδραση CAMP (συνεργιστικό φαινόμενο με *S. aureus*), ο δε *S. pyogenes* θετική την αντίδραση με Bacitracin (εμφανίζει ευαισθησία στο αντιβιοτικό μπασιτρασίνη).

• ***Streptococcus pyogenes***: γνωστός και σαν Group A ***Streptococcus (GAS)*** ή β-αιμολυτικός στρεπτόκοκκος. Είναι ένα σημαντικό ανθρώπινο παθογόνο, αιτιολογικός παράγοντας των στρεπτοκοκκικών λοιμώξεων της ομάδας A, που οι δράσεις του έχουν μελετηθεί για δεκαετίες. Τις περισσότερες φορές προκαλεί μια ήπια μορφή λοίμωξης με μόλυνση των ανώτερων αναπνευστικών οδών ή μόλυνση του δέρματος, με αποτέλεσμα φαρυγγίτιδα ή μολυσματικό κηρίο (impetigo) αντίστοιχα. ⁽⁶⁹⁾ Η δράση του δεν είναι άμεσα διεισδυτική και φλεγμονώδης και φαίνεται ότι αρχικά προκαλεί μια τοπική λοίμωξη, που μέσω των τοξινών που παράγονται εξελίσσεται είτε σε μια σοβαρή διεισδυτική νόσο είτε μπορεί να οδηγήσει σε κατάσταση ασυμπτωματικής φορείας. Από τα μέσα της δεκαετίας του '90 υπάρχει μια σημαντική αύξηση του αριθμού των αναφορών που περιγράφουν σοβαρές εκδηλώσεις διεισδυτικών λοιμώξεων εξαιτίας του GAS όπως αρθρίτιδα, κυτταρίτιδα, σηψαιμία, βλάβη καρδιακών βαλβίδων, σπειραματονεφρίτιδα, ρευματικός πυρετός, νεκρωτική περιτονίτιδα (NF), σύνδρομο στρεπτοκοκκικού τοξικού σοκ (STSS). Οι παράγοντες που συνέβαλαν στην παγκόσμια αναβίωση αυτού του παθογόνου παραμένουν ακόμα άγνωστοι και υπό εντατική διερεύνηση. Η συχνότητα των λοιμώξεων που προκαλούνται από τον *S. pyogenes* ποικίλει εξαρτώμενη και από κλιματικές και χωρικές συνθήκες. Στις εύκρατες ζώνες η φαρυγγίτιδα είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη κατά τους χειμερινούς μήνες ενώ το μολυσματικό κηρίο (impetigo), που απαντά σπανιότερα, ευνοείται από καιρικές συνθήκες ζέστης και υγρασίας ταυτόχρονα. Το αντίθετο συμβαίνει στις τροπικές περιοχές όπου επικρατεί το μολυσματικό κηρίο. Έτσι το κλίμα είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για τις διάφορες μορφές της στρεπτοκοκκικής νόσου, η οποία με τη σειρά της δημιουργεί χωρικές και χρονικές αποστάσεις μεταξύ των στελεχών του *S. pyogenes* που προκαλούν φαρυγγίτιδα ή λοιμώξεις του δέρματος.

Επί του παρόντος οι διαθέσιμες μέθοδοι πρόληψης είναι είτε ανεπαρκείς είτε αναποτελεσματικές όπως πιστοποιείται από την νοσηρότητα και την θνητότητα που συνδέονται μ' αυτό το παθογόνο. Η επικράτηση σοβαρών GAS ασθενειών είναι τουλάχιστον 18.1 εκ. περιπτώσεις παγκοσμίως, με 1.78 εκ. νέων περιπτώσεων να προστίθενται κάθε χρόνο. Η εκτίμηση είναι ότι 517.000 θάνατοι οφείλονται σε σοβαρές ασθένειες που προκαλεί ο GAS (ρευματικό πυρετό, ρευματική καρδιακή νόσο, μεταστρεπτοκοκκική σπειραματονεφρίτιδα και διεισδυτικές λοιμώξεις). Η μεγαλύτερη επιβάρυνση οφείλεται στην ρευματική καρδιακή νόσο με 282.000 νέα κρούσματα και 233.000 θανάτους κάθε χρόνο. ⁽⁷⁰⁾ Επιπλέον, υπάρχουν περισ-

σότερες από 111 εκατομύρια διαδεδομένες περιπτώσεις GAS πυοδέρματος, και πάνω από 616 εκ. ετησίως περιστατικών GAS φαρυγγίτιδας, με δεδομένο ότι στοιχεία που προέρχονται από τον αναπτυσσόμενο κόσμο είναι ανεπαρκή και ελλιπή. ⁽⁶⁹⁾ Τα στοιχεία αυτά υπογραμμίζουν την ανάγκη της ενίσχυσης των στρατηγικών ελέγχου και την ανάπτυξη νέων στρατηγικών πρωτοβάθμιας πρόληψης. Τα παραπάνω επιδημιολογικά δεδομένα κινητοποίησαν παγκόσμιους και εθνικούς οργανισμούς όπως την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας, το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων των ΗΠΑ και φαρμακοβιομηχανίες για την αναγκαιότητα παρασκευής ενός προληπτικού και ασφαλούς εμβολίου για τον GAS. ^(71, 72, 73) Η ωφέλεια της χρήσης ενός προληπτικού εμβολίου είναι πολλαπλή και προφανής. Σε πρώτο επίπεδο είναι η μείωση της χρήσης των αντιβιοτικών για απλές αμυγδαλίτιδες και φαρυγγίτιδες, ειδικά σε νεαρότερες ηλικίες κατά τους χειμερινούς μήνες. Σε δεύτερο επίπεδο θα υπάρχει μείωση σοβαρών νοσηρών καταστάσεων τόσο για τους ασθενείς όσο και η επακόλουθη οικονομική επιβάρυνση των Δημόσιων Συστημάτων Υγείας. Παλιότερες προσπάθειες που έγιναν σ' αυτή την κατεύθυνση δεν ευοδώθηκαν. Πρόσφατες δημοσιεύσεις δείχνουν βελτιωμένες εκθέσεις του εμβολίου που στηρίζονται σε νεότερες τεχνικές μοριακού χαρακτηρισμού των στελεχών του *S. pyogenes*.

Σ αυτά τα πλαίσια, η ακριβής ταυτοποίηση και τυποποίηση του GAS, είναι απαραίτητες για επιδημιολογικές και παθογενετικές μελέτες των στρεπτοκοκκικών ασθενειών. Ήδη από το 1928 η Rebecca Lancefield ανέπτυξε ένα σύστημα προσδιορισμού οροτύπου βασιζόμενη στις αντιγονικές διακυμάνσεις της επιφανειακής πρωτεΐνης M του GAS. Αν και έχουν αναπτυχθεί και άλλα πρόσθετα συστήματα προσδιορισμού οροτύπων όπως οι T και OF τυποποιήσεις, προσφέροντας πολύτιμα και πρακτικά υποκατάστατα τυποποίησης, η τυποποίηση M θεωρήθηκε ο χρυσός κανόνας. Ωστόσο η περιορισμένη προσφορά αντιορών και το υψηλό ποσοστό μη τυποποιήσιμων στελεχών (ιδίως από τροπικές περιοχές) αποτελούν προκλήσεις της τυποποίησης M. Τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκαν αρκετές μοριακές τυποποιητικές μέθοδοι εναλλακτικά ή και σε συνδυασμό με την τυποποίηση M όπως η MLST, μέθοδος που αναπτύσσεται στην παρούσα διατριβή.

- ***Streptococcus agalactiae***: Απομονώθηκε πρώτη φορά το 1887 από αγελάδες που έπασχαν από μαστίτιδα και το 1933 ταξινομήθηκε από την Lancefield στην ομάδα B των β-αιμολυτικών στρεπτόκοκκων-Group B *Streptococcus*-(GBS). Μετά το 1935 άρχισε να ενοχοποιείται ως ανθρώπινο παθογόνο βακτήριο αλλά μέχρι το 1975 ήταν σπάνιες οι αναφορές ως αιτίου επιλόχειων, κυρίως, και λιγότερο νεογνικών λοιμώξεων. Έκτοτε παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση των ανακοινώσεων και μάλιστα βαρέων λοιμώξεων όπως η σηψαιμία και η μηνιγγίτιδα των νεογνών. ⁽⁷⁴⁾ Ο στρεπτόκοκκος B μπορεί να προκαλέσει και άλλα νοσήματα στα βρέφη, όπως σηπτική αρθρίτιδα, οστεομυελίτιδα, επιπεφυκίτιδα, παραρινοκολπίτιδα, μέση ωτίτιδα, ενδοκαρδίτιδα, περιτονίτιδα και ομφαλίτιδα ή και αποσηματικές συλλογές σε μεγαλύτερα βρέφη. Τα βακτήρια αυτά μπορούν να αποικίσουν το έντερο και το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα αυξάνοντας τον κίνδυνο της πρόωρης ρήξης μεμβρανών κατά την κύηση και μετάδοση τους στο έμβρυο. Το American College of Obstetricians and Gynecologists, η American Academy of Pediatrics και το Centers for Disease Control συνιστούν όλες οι έγκυες γυναίκες που βρίσκονται μεταξύ 35-37ης εβδομάδας κύησης να ελέγ-

χονται για GBS. Γυναίκες θετικές στον έλεγχο συστήνεται να παίρνουν προφυλακτική αντιβίωση.

Ο *S. agalactiae* αποτελεί παθογόνο μικρόβιο που προκαλεί ένα μεγάλο φάσμα λοιμώξεων, με επίκεντρο τις λοιμώξεις των νεογνών. Αυτές διακρίνονται, ανάλογα με το χρόνο της εκδήλωσης, σε λοιμώξεις οξείας και χρόνιας εισβολής:

Λοίμωξη οξείας εισβολής: (πρώιμη εμφάνιση νόσου) από το στρεπτόκοκκο B, εμφανίζεται τις πρώτες πέντε ημέρες της ζωής του νεογνού ως σηψαιμία και οφείλεται σε οποιονδήποτε ορότυπο. Η συχνότητα της νόσου εκτιμάται ότι κυμαίνεται από 0,7-3,7 ανά χίλιες γεννήσεις. Είναι επίσης δυνατόν να συνυπάρχει μηνιγγίτιδα και πνευμονία. Η πρόγνωση είναι βαριά, ιδιαίτερα στα νεογνά με πολύ χαμηλό βάρος, η θνησιμότητα μπορεί να φτάσει έως το 50%.

Λοίμωξη χρόνιας εισβολής: (όψιμη εμφάνιση νόσου) αναφέρεται σχεδόν αποκλειστικά στην μηνιγγίτιδα. Παρατηρείται μετά τις πρώτες 5 περίπου ημέρες έως και μερικές εβδομάδες μετά τη γέννηση, σε υγιή νεογνά. Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου κυμαίνεται μεταξύ 0.5-1.0 ανά χίλιες γεννήσεις. Στο ιστορικό του νεογνού δεν αναφέρονται επιπλοκές κατά τον τοκετό ή άλλοι, πλην της ηλικίας, προδιαθεσικοί παράγοντες. Σε αντίθεση οι μητέρες είναι σπάνια αποικισμένες από το στρεπτόκοκκο B.

Η προέλευση του στελέχους που προκαλεί τη νόσο είναι συνήθως νοσοκομειακή, δεδομένου ότι από μελέτες έχει αποδειχτεί ότι σημαντικό ποσοστό ατόμων από το προσωπικό του νοσοκομείου είναι φορείς του στρεπτόκοκκου B. Η μεταφορά των στρεπτοκόκκων στα νεογνά γίνεται κατά τη διαδικασία της νοσηλείας των νεογνών ιδιαίτερα με μολυσμένα χέρια. Τα κλινικά σημεία και συμπτώματα της μηνιγγίτιδας είναι συνάρτηση της ωριμότητας του νεογνού. Η θνητότητα είναι χαμηλή μετά από έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία.

1.1.4. ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΕΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ

Η σταδιακή ενσωμάτωση των μοριακών τεχνικών τυποποίησης των μικροβίων στην συμβατική επιδημιολογική επαγρύπνηση, έχει να επιδείξει σημαντική αποτελεσματικότητα και σε ότι αφορά τη μείωση του κόστους της συνολικής επιδημιολογικής έρευνας, παρά την αύξηση των νοσοκομειακών λοιμώξεων. Η αποτελεσματικότητα αυτή μεγιστοποιείται κυρίως με την συνεργασία του εργαστηρίου και του τμήματος, του επιφορτισμένου με την παρακολούθηση των λοιμώξεων και την διεξαγωγή της επιδημιολογικής έρευνας των λοιμώξεων του νοσοκομείου. Οι μοριακές τεχνικές μπορούν να είναι πολύ αποτελεσματικές κατά την ιχνηλασία των λοιμώξεων, εξ αιτίας της γενετικής συγγένειας των παθογόνων και επιτρέπουν τον έλεγχο του προσωπικού, του εμπλεκόμενου στην θεραπεία των ασθενών, ανιχνεύοντας την πηγή των νοσοκομειακών λοιμώξεων. Η αποτελεσματικότητα των μοριακών τεχνικών τυποποίησης των μικροβίων είναι επαρκώς τεκμηριωμένη και πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι η χρήση τους, έχει σημαντικά θετική επίπτωση τόσο στους ρυθμούς εκδήλωσης των ενδημικών νοσοκομειακών λοιμώξεων, που οφείλονται σε πολυανθεκτικά μικρόβια, όσο και στο συνολικό κόστος αυτών. Σαν παράδειγμα μπορούμε να αναφέρουμε το Memorial Hospital in Chicago, Illinois, το οποίο θέσπισε ένα πρόγραμμα μοριακής τυποποίησης για γρήγορο προσδιορισμό της κλωνικότητας των παθογόνων. Το συγκεκριμένο Νοσοκομείο

μελέτησε επιδημιολογικά δεδομένα για ένα διάστημα 24 μηνών, πριν την εφαρμογή του προγράμματος και 60 μήνες μετά την εφαρμογή του. Μετά την εφαρμογή του προγράμματος, ο αριθμός των πασχόντων ασθενών από νοσοκομειακή λοίμωξη μειώθηκε κατά 23%, ενώ η χρονική διάρκεια της λοίμωξης μειώθηκε κατά 13% ανά 1000 ασθενείς. Ο ρυθμός εκδήλωσης των λοιμώξεων μειώθηκε κατά 43%, κάτω από το εθνικό μέσο όρο και περίπου 50 θάνατοι αποφεύχθηκαν κατά την διάρκεια μιας πενταετίας. Το κόστος της εφαρμογής του προγράμματος υπολογίστηκε σε 400.000 δολάρια ανά έτος. Στόχος του προγράμματος ήταν, αφ' ενός μεν η εξοικονόμηση ενός από τα πέντε δολάρια τα οποία ξοδεύονται για νοσηλεία, αφ' ετέρου δε η μείωση του αριθμού των νοσοκομειακών λοιμώξεων. (75, 76, 77) Η δυνατότητα εξοικονόμησης χρημάτων γίνεται ρεαλιστική, κυρίως με την ενσωμάτωση του μοριακού ελέγχου στις ενδημικές νοσοκομειακές λοιμώξεις, λόγω έγκαιρης αναγνώρισης των παθογόνων καθώς και έγκαιρης λήψης των αναγκαίων μέτρων. Στις περιπτώσεις των σποραδικών νοσοκομειακών λοιμώξεων με την έγκαιρη αναγνώριση της κλωνικότητας και την πιστοποίηση, της μη συγγένειας των παθογόνων, αποφεύγεται η άσκοπη κινητοποίηση ολόκληρου μηχανισμού. Η μείωση του κόστους επιτυγχάνεται επίσης με την άμεση αναγνώριση της μετάδοσης μιας λοίμωξης από άτομο σε άτομο, η οποία είναι η πλέον αποτελεσματική έναντι της παραδοσιακής νοσοκομειακής εγρήγορσης.

Στο μέλλον πιθανότατα, αυτοί οι εξοικονομηθέντες πόροι, μπορούν να διατίθενται για ερευνητική ανάπτυξη μοριακών εξετάσεων που θα αποσκοπούν στην έγκαιρη αναγνώριση των ανθεκτικών νοσοκομειακών παθογόνων. Ήδη έχει πιστοποιηθεί η δυνατότητα μοριακής εξέτασης, άμεσης και ευαίσθητης, σε δείγματα κοπράνων, για την ανεύρεση ατόμων με αποικισμό εντέρου από εντερόκοκκους ανθεκτικούς στην Vancomycin (VRE). Επίσης είναι ήδη διαθέσιμο εμπορικό kit για τον προσδιορισμό σταφυλόκοκκων ανθεκτικών στην μεθικιλίνη (MRSA). Πρόσφατη μελέτη δείχνει ότι η χρήση της PCR έναντι της κλασσικής καλλιέργειας, μειώνει τον χρόνο προσδιορισμού των MRSA κατά τέσσερις φορές, γεγονός εξαιρετικά σημαντικό κυρίως για ασθενείς των Μονάδων Εντατικής Θεραπείας καθώς και των χειρουργημένων ασθενών. (78)

Συνεπώς, η ενσωμάτωση των μοριακών τεχνικών προσδιορισμού των μικροβίων, πρέπει να συμπεριλαμβάνεται μεταξύ των κατευθυντήριων γραμμών της επιδημιολογίας για την διερεύνηση και τον έλεγχο των λοιμώξεων, είναι ιατρικά χρήσιμη και οικονομικά δικαιολογημένη.

1.1.5. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Μικροβιακή Τυποποίηση που αφορά μία επιδημία, ονομάζεται το σύνολο των τεχνικών μέσω των οποίων :

- Μελετώνται οι ομοιότητες μεταξύ των στελεχών (isolates) που απομονώνονται από ασθενείς που εμπλέκονται σε μία επιδημία.
- Κατατάσσονται τα στελέχη, με βάση την ομοιότητα, σε κλώνους.
- Τεκμηριώνεται η κλωνική διασπορά, συγκεκριμένου κλώνου ενός μικροοργανισμού, στα κρούσματα της επιδημίας.
- Διαχωρίζονται οι σποραδικές λοιμώξεις από τις επιδημικές λοιμώξεις.

Οι τεχνικές τυποποίησης βασίζονται στην μελέτη της ομοιότητας των στελεχών και βάσει αυτών επιτυγχάνεται η ιεραρχική ταξινόμηση τους.

Για την επιλογή των μεθόδων τυποποίησης λαμβάνονται υπ' όψιν συγκεκριμένα **χαρακτηριστικά** τα οποία είναι σημαντικά για την αξιολόγηση των μεθόδων τυποποίησης. Κατ' αρχήν όλες οι μεθοδολογίες θα πρέπει να είναι βαθμονομημένες και να χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Είναι σημαντικό οι μέθοδοι να μπορούν, πέρα από κάθε αμφιβολία, να τυποποιούν το κάθε απομονωμένο στέλεχος ενός μικροβίου και να έχουν μεγάλη διακριτική ικανότητα κατά την τυποποίηση. Η διακριτική ικανότητα των μεθόδων να ικανοποιεί το βασικό ερώτημα κατά την διάρκεια των επιδημιών, εάν δηλαδή τα βακτήρια είναι επιδημιολογικά συγγενή ή όχι. Επίσης οι μέθοδοι πρέπει να είναι αναπαραγωγίμες και επαναλήψιμες, τόσο σε επίπεδο εργαστηρίου όσο και σε δια-εργαστηριακό επίπεδο. Χαμηλή επαναληψιμότητα πιθανώς υποκρύπτει είτε σημαντικές τεχνικές διακυμάνσεις της μεθόδου, είτε βιολογικές διακυμάνσεις που εμφανίζονται από τους *in vivo* ή *in vitro* χειρισμούς των βακτηρίων. Το εργαστήριο πρέπει να εφαρμόζει όλες τις απαραίτητες πρακτικές, ώστε να αποφεύγονται οι κάθε είδους επιμολύνσεις και να αναλύονται πάντα, παράλληλα με τα δείγματα, ένας θετικός και ένας αρνητικός μάρτυρας. Το κόστος, ο ειδικός εξοπλισμός, ο οποίος πιθανώς απαιτείται, η εκπαίδευση του προσωπικού, είναι επίσης χαρακτηριστικά τα οποία λαμβάνονται σοβαρά υπ' όψιν.

Συνοψίζοντας, η **αξιολόγηση μιας τεχνικής τυποποίησης**, πρέπει να ικανοποιεί τα εξής κριτήρια:

- Τυποποιητική ικανότητα, που εκφράζεται με την δυνατότητα της μεθόδου να εφαρμόζεται σε όλα τα προς τυποποίηση στελέχη (*isolates*).
- Αναπαραγωγιμότητα, που εκφράζει την ικανότητα της μεθόδου να δίνει πάντα τα ίδια αποτελέσματα.
- Διακριτική ικανότητα, που εκφράζει την ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει τους βακτηριακούς κλώνους.
 - Ευκολία στην εφαρμογή και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.
 - Κόστος εφαρμογής μιας συγκεκριμένης τεχνικής.
 - Δυνατότητα να δημιουργεί δεδομένα, ικανά να αποθηκεύονται στο Διαδίκτυο (*Internet*) δημιουργώντας βάσεις δεδομένων, προσβάσιμες και συγκρίσιμες στην επιστημονική κοινότητα.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για επιδημιολογικούς σκοπούς, κύρια ταξινομούνται σε δυο κατηγορίες:

- ❖ Φαινοτυπικές μέθοδοι για την κατάταξη των βακτηρίων σε είδη
- ❖ Μοριακές μέθοδοι για την κατάταξη των στελεχών των βακτηρίων σε κλώνους

Οι μοριακές μέθοδοι ταξινομούνται επίσης σε δυο κατηγορίες:

- ❖ Μέθοδοι χωρίς ενίσχυση του DNA των βακτηρίων
- ❖ Μέθοδοι με ενίσχυση του DNA των βακτηρίων

1.2. ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Οι πρώιμες Μέθοδοι Τυποποίησης των βακτηρίων βασίζονται σε ένα σύνολο φαινοτυπικών χαρακτηριστικών. Από τις πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους είναι η **Βιοτυπία** η οποία βασίζεται σε χαρακτηριστικές ιδιότητες του βακτηρίου όπως είναι η μορφολογία, οι συνθήκες καλλιέργειας, οι διατροφικές απαιτήσεις, ένα πλήθος βιοχημικών δοκιμασιών και φυσικά η ευαισθησία των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά. Η βιοτυπία χρησιμοποιείται για την κατάταξη των βακτηρίων σε είδη, αλλά όχι για τον διαχωρισμό των βακτηρίων του ίδιου είδους.

1.2.1. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΗΣΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ

Οι μικροοργανισμοί είναι δυνατόν να αναγνωρισθούν σε παρασκευάσματα τα οποία ετοιμάζονται απ' ευθείας από τα βιολογικά υλικά του ασθενούς.

➤ **Άμεσο νωπό παρασκεύασμα**

Είναι δυνατή η ανίχνευση του μικροοργανισμού με άμεση εξέταση (χωρίς χρώση) του κλινικού δείγματος στο μικροσκόπιο. Η συγκεκριμένη μέθοδος ενδείκνυται για την ανίχνευση μυκήτων και παρασίτων. Επίσης μας πληροφορεί για την παρουσία στο κλινικό δείγμα πυσσφαιρίων, ερυθρών αιμοσφαιρίων κ.α.

➤ **Κεχρωσμένο παρασκεύασμα**

Η χρώση βακτηριακών παρασκευασμάτων μας δίνει το πλεονέκτημα της μεγαλύτερης διακριτικής ικανότητας και παρέχει μια πρώτη διαφοροδιαγνωστική δυνατότητα που αφορά το μέγεθος, την μορφολογία και τον τρόπο χρώσης του μικροοργανισμού με συγκεκριμένες χρωστικές π.χ. χρώση Gram.

➤ **Χρώσεις ρουτίνας:** η Gram χρώση καθιστά ορατό ένα ευρύ φάσμα βακτηρίων και είναι η βασικότερη χρώση η οποία προσφέρει ουσιαστική βοήθεια, στο Κλινικό Μικροβιολογικό Εργαστήριο, αφού διαχωρίζει τα βακτήρια σε δυο κύριες ομάδες: Gram-θετικά βακτήρια (μπλε χρώμα στο παρασκεύασμα) και Gram-αρνητικά βακτήρια (κόκκινο χρώμα στο παρασκεύασμα). Η διαφορά στο χρώμα αντανακλά ουσιαστικές διαφορές στην σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων.

➤ **Ειδικές χρώσεις:** Οι χρώσεις αυτές χρησιμοποιούνται σε ορισμένα είδη βακτηρίων, τα χαρακτηριστικά των οποίων δεν αναδεικνύονται με την συνήθη χρωστική.

- Χρώση Ziehl-Neelsen χρησιμοποιείται στα οξυάντοχα βακτήρια όπως είναι το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης.
- Χρώση Neisser χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις υπόνοιας διφθερίτιδας,
- Χρώσεις ανοσοφθορισμού χρησιμοποιούνται σε ένα ευρύ φάσμα βακτηρίων για την ανάδειξη ιδιαίτερων χαρακτηριστικών.

Η μικροσκόπηση ενώ συμβάλλει στην άμεση και ταχεία διάγνωση, ωστόσο προϋποθέτει την επιλογή της κατάλληλης χρώσης και εμπειρία στην αναγνώριση των μορφολογικών χαρακτηριστικών του βακτηρίου. Η μέθοδος όμως χαρακτηρίζεται από χαμηλή ευαισθησία διότι απαιτείται ικανός αριθμός κυττάρων για την αναγνώριση.

1.2.2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ

Για την καλλιέργεια των βακτηρίων χρησιμοποιούνται υλικά καλλιέργειας, εμπλουτισμένα με οργανικά θρεπτικά συστατικά ως πηγές ενέργειας, για την ανάπτυξη των βακτηρίων. Το κλινικό δείγμα (ΕΝΥ, ούρα, πύο, πτύελα κ.α.) εμβολιάζεται στο θρεπτικό υλικό ενός τρυβλίου, το οποίο εν συνεχεία επωάζεται για 24 ώρες στους 37°C. Το επιδιωκόμενο αποτέλεσμα είναι η ανάπτυξη μεμονωμένων αποικιών του μικροοργανισμού, οι οποίες διαφέρουν, μεταξύ των μικροοργανισμών, ως προς το σχήμα, την όψη, το χρώμα και την οσμή. Οι μεμονωμένες αποικίες των βακτηρίων που θεωρούνται παθογόνα, ανακαλλιεργούνται προκειμένου να επιτύχουμε καθαρές καλλιέργειες των βακτηρίων. Η καθαρή καλλιέργεια είναι απαραίτητη για την οριστική ταυτοποίηση των μικροοργανισμών με την χρήση βιοχημικών δοκιμασιών, για τον έλεγχο ευαισθησίας στη αντιβιοτικά αλλά και για την εφαρμογή μοριακών τεχνικών τυποποίησης. Σε καλλιέργειες όπου ο αρχικός αριθμός των μικροβιακών κυττάρων είναι μικρός, γίνεται εμπλουτισμός του αριθμού των κυττάρων με καλλιέργεια του κλινικού δείγματος σε υγρό θρεπτικό υλικό και εν συνεχεία ανακαλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό υλικό.

➤ **Εμπλουτισμένα θρεπτικά υλικά:** Είναι ευρέως φάσματος και για τα συνηθέστερα παθογόνα βακτήρια είναι:

- ❖ *Θρεπτικός ζωμός* – κυρίως για τον εμπλουτισμό μικρού αριθμού βακτηριακών κυττάρων.
- ❖ *Αιματούχο Άγαρ* – γενικό θρεπτικό υπόστρωμα για όλα σχεδόν τα βακτήρια τα οποία μπορούν να καλλιεργηθούν.
- ❖ *Άγαρ του Schadler*–για αναερόβια μικρόβια, υλικό εμπλουτισμένο με αιμίνη και βιταμίνη K.

➤ **Υλικά καλλιέργειας που περιέχουν δείκτες:** Τα υλικά αυτά έχουν την δυνατότητα να αναδείξουν συγκεκριμένες μεταβολικές ιδιότητες των βακτηρίων.

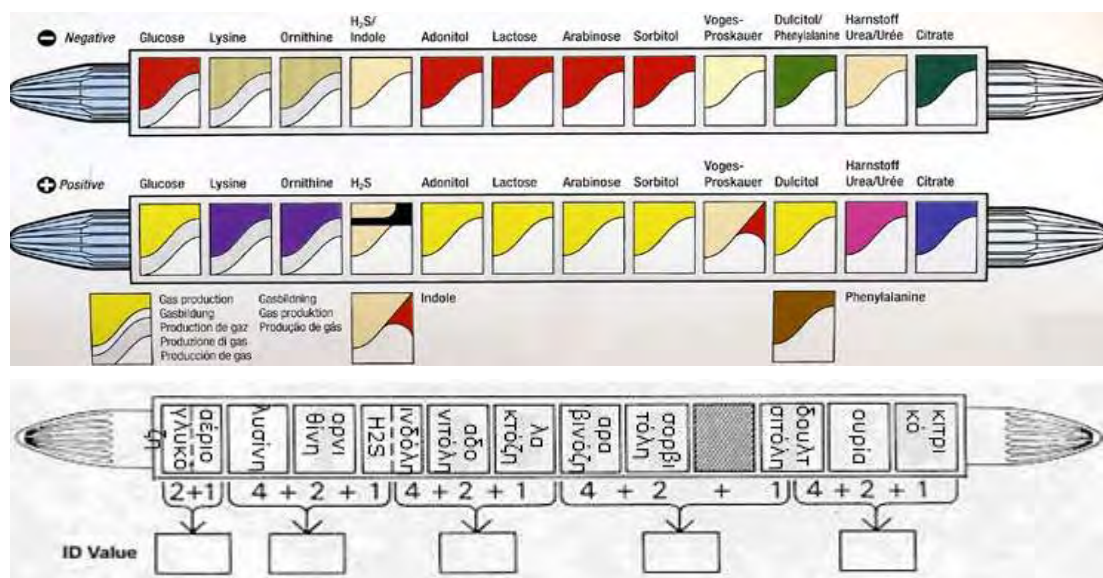
➤ **Επιλεκτικά υλικά** – Πρόκειται για υλικά τα οποία έχουν την δυνατότητα να ευνοούν την ανάπτυξη κάποιων βακτηρίων και συγχρόνως να αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων. Ένα επιλεκτικό θρεπτικό υλικό είναι το *MacConkey*, το οποίο αναστέλλει την ανάπτυξη των Gram-θετικών βακτηρίων, ενώ επιτρέπει την ανάπτυξη των Gram-αρνητικών βακτηρίων.

➤ **Ειδικά θρεπτικά υλικά** – Πρόκειται για θρεπτικά υλικά τα οποία προορίζονται για μικροοργανισμούς με υψηλές και σύνθετες διατροφικές απαιτήσεις, π.χ. το υλικό θρεπτικό υπόστρωμα *Lowenstein-Jensen* για το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης.

Η καλλιέργεια αποτελεί το **gold standard** της προσέγγισης των βακτηριακών λοιμώξεων. Δυστυχώς όμως είναι μια μέθοδος χρονοβόρα και υπάρχουν βακτήρια τα οποία δεν μπορούν να καλλιεργηθούν καθόλου ή μόνο με μεγάλη δυσκολία όπως τα μυκοβακτηρίδια, τα χλαμύδια, οι ρικέτσιες κ.α.

1.2.3. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

Κάθε βακτήριο παρουσιάζει έναν συνδυασμό μεταβολικών αντιδράσεων, ο οποίος είναι χαρακτηριστικός για τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό. Ο συνδυασμός αυτών των μεταβολικών δοκιμασιών μεταφράζεται με ένα χαρακτηριστικό σύνολο βιοχημικών αντιδράσεων, συγκεκριμένο για κάθε είδος μικροοργανισμού. Ο έλεγχος των βιοχημικών αντιδράσεων μπορεί να γίνει είτε σε ειδικά θρεπτικά υλικά ή με απλές ενζυμικές αντιδράσεις. Μερικές από τις πλέον εύχρηστες δοκιμασίες είναι οι δοκιμασίες καταλάσης και οξειδάσης. Για την διενέργεια των βιοχημικών δοκιμασιών είναι απαραίτητες οι καθαρές καλλιέργειες. Προκειμένου να ελεγχθεί ένας μεγάλος αριθμός βιοχημικών χαρακτηριστικών για κάθε υπό μελέτη βακτήριο και η όλη διαδικασία να γίνει σε σύντομο χρονικό διάστημα, έχουν αναπτυχθεί αυτόματα συστήματα βιοχημικής ταυτοποίησης, τα οποία χρησιμοποιούνται στα νοσοκομειακά εργαστήρια. (Εικόνα 4)



Εικόνα 4. Ένας τύπος συστήματος ταχείας βιοχημικής ταυτοποίησης βακτηρίων. Κάθε σωληνάριο περιέχει υλικά για την εκτέλεση 15 βιοχημικών δοκιμασιών. Το πρώτο σωληνάριο υποδεικνύει αρνητικές τιμές ενώ το δεύτερο σωληνάριο θετικές τιμές στις βιοχημικές δοκιμασίες. Στο τρίτο, η τιμή της κάθε θετικής δοκιμασίας τοποθετείται σε κύκλο και οι τιμές προστίθενται. Τα επιμέρους αθροίσματα συνθέτουν τον ταυτοποιητικό αριθμό του βακτηρίου (ID value). Οι βιοχημικές δοκιμασίες στη σειρά είναι: γλυκόζη, παραγωγή αερίου, λυσίνη, ορνιθίνη, H₂S, ινδόλη, αδονιτόλη, λακτόζη, αραβινόζη, σορβιτόλη, δουλτσιτόλη, ουρία, κιτρικό οξύ.

Τα συστήματα αυτά διενεργούν ταυτόχρονα πολλές βιοχημικές δοκιμασίες και έχουν την δυνατότητα ταυτοποίησης εντός 4-24 ωρών.

Το όλο σύστημα ονομάζεται και **αριθμητική ταυτοποίηση**, διότι το αποτέλεσμα της κάθε δοκιμασίας χαρακτηρίζεται από έναν αριθμό. Στην απλούστερη μορφή του, ένα θετικό αποτέλεσμα θα έχει τιμή 1, ενώ ένα αρνητικό την τιμή 0. Στα περισσότερα εμπορικά kits, στα αποτελέσματα δίνονται τιμές από 1 έως 4, αναλόγως της σχετικής σημασίας και αξιοπιστίας της κάθε δοκιμασίας. Το σύνολο των αριθμών που προκύπτει, συγκρίνεται με βάση δεδομένων που περιέχει αποτελέσματα για όλους τους γνωστούς μικροοργανισμούς.

Ένας σημαντικός περιορισμός των βιοχημικών δοκιμασιών είναι ότι οι μεταλλάξεις, οι μεταλλάξεις και η απόκτηση πλασμιδίων, μπορεί να έχουν ως συνέπεια την δημιουργία στελεχών με διαφορετικά βιοχημικά χαρακτηριστικά.

1.2.4. ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ-ΑΝΤΙΒΙΟΓΡΑΜΜΑ

Σκοπός της δοκιμασίας στα αντιβιοτικά είναι ο έλεγχος της ευαισθησίας του μικροοργανισμού σε διάφορα αντιβιοτικά, ώστε να εφαρμοστεί τελικώς το πλέον κατάλληλο από αυτά. Οι δοκιμασίες ευαισθησίας στα αντιβιοτικά, ανάλογα με την περίπτωση, μπορούν να διενεργούνται με διάφορες τεχνικές.

1.2.4.1. Δοκιμασία διάχυσης δίσκων (Kirby-Bauer)

Μέθοδος διάχυσης δίσκων εμποτισμένων σε αντιβιοτικά, γνωστή και ως Kirby-Bauer από τους Bauer, Kirby και συνεργάτες τους, που το 1966 δημοσίευσαν μία εργασία-σταθμό. ⁽⁷⁹⁾ Με την εργασία τους αυτή επιχείρησαν να προτυποποιήσουν την μέθοδο ελέγχου ευαισθησίας με δίσκους αντιβιοτικών, σε μια εποχή που επικρατούσε χάος στα μικροβιολογικά εργαστήρια, λόγω έλλειψης μιας ευρέως αποδεκτής μεθόδου. Το Ινστιτούτο CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) (<http://www.clsi.org>), υιοθετώντας τα βασικά στοιχεία της μεθόδου των Kirby-Bauer, έθεσε τα πρότυπα που θα πρέπει να ακολουθούνται αυστηρά και δημοσιεύει ετήσιες οδηγίες, ώστε να λαμβάνονται ακριβή και αναπαραγώγιμα αποτελέσματα. Εν συντομία η αρχή της μεθόδου έχει ως εξής: μικροβιακό εναιώρημα ενοφθαλμίζεται στην επιφάνεια κατάλληλου θρεπτικού υλικού. Εν συνεχεία τοποθετούνται δίσκοι από διηθητικό χαρτί, εμποτισμένοι με κατάλληλη συγκέντρωση αντιβιοτικού. Με την διαβροχή του δίσκου, το αντιβιοτικό διαχέεται στο θρεπτικό υλικό, βάση της αρχής ότι μία ουσία μετακινείται από περιοχές υψηλής συγκέντρωσης σε περιοχές χαμηλής συγκέντρωσης, εξαρτώμενη από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του υλικού. Όσο αυξάνεται η απόσταση από το δίσκο, μειώνεται (λογαριθμικά) η συγκέντρωση του αντιβιοτικού. Ταυτόχρονα με την διάχυση του αντιβιοτικού, αναπτύσσεται στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού και το βακτήριο που ενοφθαλμίστηκε. Η ζώνη αναστολής της ανάπτυξης του βακτηρίου σχηματίζεται όταν η συγκέντρωση του αντιβιοτικού, είναι ίση ή μεγαλύτερη, από την ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (MIC) του αντιβιοτικού, επιδρώντας έτσι σε ένα αρκετά μεγάλο βακτηριακό πληθυσμό για να επιτύχει την αναστολή της ανάπτυξης τους. Η διάμετρος της ζώνης αναστολής, από μόνη της δεν σημαίνει τίποτα, πλην όμως συγκρίνεται με ζώνες αναστολής σε πίνακες που συντάσσει ετησίως το CLSI. ^(80, 81) Από την σύγκριση αυτή χαρακτηρίζεται το βακτήριο ως ευαίσθητο, μετρίως ευαίσθητο ή ανθεκτικό. Η σύγκριση αφορά, τις διαμέτρους των ζωνών αναστολής, με εκείνες που προτείνει το CLSI, για κάθε αντιβιοτικό, ανάλογα με το είδος του βακτηρίου. Το CLSI, έχοντας αναλύσει μεγάλο αριθμό στελεχών, με παρόμοιο ρυθμό ανάπτυξης, διαφορετική όμως ευαισθησία, έχει στατιστικά συσχετίσει την διάμετρο ζώνης αναστολής με την ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (MIC) του αντιβιοτικού. Σύμφωνα με το CLSI, **οι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η ζώνη αναστολής**, είναι :

- Το θεραπευτικό υπόστρωμα: θα πρέπει να έχει ομοιόμορφο πάχος 4mm. Το πάχος του υλικού είναι καθοριστικό για την διάχυση του αντιβιοτικού (σε αυτό το πάχος το αντιβιοτικό διαχέεται σε τρεις κατευθύνσεις, περιμετρικά και σε βάθος) και την τελική διαμόρφωση της ζώνης αναστολής. Σε υλικό με μικρότερο πάχος έχουμε μεγαλύτερες ζώνες αναστολής (διάχυση σε δύο κατευθύνσεις), ενώ σε υλικό με μεγαλύτερο πάχος από 4mm, η διάχυση γίνεται κυρίως σε βάθος, με αποτέλεσμα την διαμόρφωση μικρών ζωνών αναστολής.

- Το μικροβιακό εναιώρημα: θα πρέπει να έχει θολερότητα ίση με 0,5 της κλίμακας McFarland (περίπου 10^8 κύτταρα/ml), η οποία επιτυγχάνεται με σύγκριση, του εναιωρήματος που έχουμε παρασκευάσει, με ένα πρότυπο διάλυμα, μπροστά από ένα λευκό χαρτί με γραμμές ή χρησιμοποιώντας ένα φωτόμετρο.

- Το pH του υλικού: θα πρέπει να είναι 7.2-7.4 σε θερμοκρασία δωματίου. Σε μικρότερο pH ορισμένα αντιβιοτικά είναι λιγότερο δραστικά, ενώ άλλα παρουσιάζουν μεγαλύτερη δραστηριότητα. Το αντίθετο συμβαίνει σε pH μεγαλύτερο από 7.4.

- Οι δίσκοι των αντιβιοτικών: πρέπει να διατηρούνται, ανάλογα με το είδος του αντιβιοτικού, σε θερμοκρασίες από -14°C έως 8°C . Ιδιαίτερα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά θα πρέπει να καταψύχονται (ιμπενέμη, κεφαχλόρη, κλαβουλανικό παρουσιάζουν μεγαλύτερη σταθερότητα όταν καταψύχονται). Πριν την χρήση, φέρονται σε θερμοκρασία δωματίου.

- Το είδος του θεραπευτικού υλικού: για μη απαιτητικά βακτήρια, προτείνεται το άγαρ Mueller-Hinton, διότι έχει καλή επαναληψιμότητα αποτελεσμάτων από παρτίδα σε παρτίδα και μικρή συγκέντρωση αναστολέων σουλφοναμίδης, τριμεθοπρίμης και τετρακυκλίνης. Για απαιτητικά μικρόβια προτείνεται το ίδιο υπόστρωμα, εμπλουτισμένο με 5% απινιδωμένο αίμα προβάτου (για στρεπτόκοκκους και μηνιγγιτιδόκοκκους). Για αιμόφιλο, το υλικό είναι Haemophilus Test Medium και για γονόκοκκο το GC άγαρ.

Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου Kirby-Bauer προσμετράται η τεχνική απλότητα, η μεγάλη επαναληψιμότητα, το σχετικά χαμηλό κόστος, η μη απαίτηση ειδικού εξοπλισμού καθώς και η επίδειξη μεγάλης ευελιξίας στην επιλογή αντιβιοτικών. Επίσης η μέθοδος δύναται να αναδείξει μηχανισμούς αντοχής (π.χ. την επαγωγίμη αντοχή στην κλινδαμυκίνη, όταν υπάρχει αντοχή στην ερυθρομυκίνη του β-αιμολυτικού στρεπτόκοκκου). Στα μειονεκτήματα της μεθόδου θα πρέπει να αναφέρουμε, ότι δεν είναι προτυποποιημένη για όλα τα μικρόβια, ότι δεν ενδείκνυται για τα αναερόβια βακτήρια και σε πολλές περιπτώσεις δεν αποφεύγεται ο προσδιορισμός της MIC. ^(82, 83)

1.2.4.2. Δοκιμασία αραιώσεων σε ζυμό-Προσδιορισμοί MIC και MBC

Με την μέθοδο αυτή γίνεται προσδιορισμός, της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας ενός αντιβιοτικού (**M**inimum **I**nhibitory **C**oncentration **MIC**), που ορίζεται ως η μικρότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που δεν επιτρέπει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, καθώς και της ελάχιστης βακτηριοκτόνου πυκνότητας ενός αντιβιοτικού (**M**inimum **B**actericidal **C**oncentration **MBC**) και ως τέτοια ορίζεται, η μικρότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που προκαλεί τον θάνατο στο 99,9% των μικροβιακών κυττάρων ή αλλιώς επιτρέπει την επιβίωση του 0,01% των κυττάρων του αρχικού εναιωρήματος. Η MIC προσδιορίζεται με την παρασκευή σειράς αραιώσεων του αντιβιοτικού, σε ζυμό. Συνήθως χρησιμο-

ποιούνται 5-8 υποδιπλάσιες αραιώσεις του αντιβιοτικού, οι οποίες αντιπροσωπεύουν αντίστοιχες θεραπευτικές συγκεντρώσεις (π.χ. 1, 2, 4, 8, 16 µg/ml). Στην συνέχεια, ενοφθαλμίζεται το εναιώρημα του εξεταζόμενου μικροοργανισμού (και εδώ χρησιμοποιείται εναιώρημα πυκνότητας 0,5 της κλίμακας McFarland). Τα σωληνάκια ελέγχονται για ανάπτυξη του βακτηρίου μετά από επώαση 17-24h στους 37°C και γίνεται προσδιορισμός της MIC. Η μικρότερη συγκέντρωση αντιβιοτικού που δεν επιτρέπει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού ορίζεται ως MIC (ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα του φαρμάκου). Η MIC δεν παριστάνει μία απόλυτη τιμή. Η πραγματική MIC μπορεί να βρίσκεται μεταξύ της ελάχιστης συγκέντρωσης που αναστέλλει την ανάπτυξη και της αμέσως προηγούμενης αραιώσης, που επιτρέπει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Εκτός από αυτή την τεχνική, μπορεί να γίνει προσδιορισμός της MIC των κρίσιμων συγκεντρώσεων (breakpoint MIC), όπου χρησιμοποιούνται 1-3 κρίσιμες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού ή συγκεντρώσεις ανάμεσα από τις συνήθως χρησιμοποιούμενες (π.χ. 4, **6**, 8, **12**, 16 µg/ml). Με τον τρόπο αυτό μπορούμε να ελέγξουμε πολλά αντιβιοτικά ταυτόχρονα. Έχοντας υπό όψιν τις συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού, που επιτυγχάνονται στο αίμα καθώς και την MIC του φαρμάκου, καθορίζονται τρεις κατηγορίες ευαισθησίας των βακτηρίων που ερμηνεύονται ως εξής:

- **ευαίσθητοι (susceptible S):**

μικροοργανισμοί που αναστέλλεται η ανάπτυξη τους από πυκνότητες αντιβιοτικού που επιτυγχάνονται στο αίμα κατά την συνήθη θεραπευτική αγωγή.

- **μετρίως ευαίσθητοι (intermediate I):**

μικροοργανισμοί που αναστέλλεται η ανάπτυξη τους, όταν το φάρμακο χορηγείται στην μέγιστη ανεκτή δοσολογία.

- **ανθεκτικοί (resistant R):**

μικροοργανισμοί που δεν αναστέλλεται η ανάπτυξη τους από πυκνότητες αντιβιοτικού που επιτυγχάνονται συνήθως στο αίμα.

Η CLSI καθορίζει, ανάλογα με το αντιβιοτικό και τον μικροοργανισμό, δύο κρίσιμες συγκεντρώσεις, την μικρή (c) και την μεγάλη (C). Αν η MIC, του υπό έλεγχο μικροοργανισμού, είναι μικρότερη ή ίση της c ($MIC \leq c$), τότε είναι ευαίσθητος, αν η $MIC > C$ είναι ανθεκτικός και αν είναι μικρότερος ή ίσος της C ($c < MIC \leq C$), τότε είναι μετρίως ευαίσθητος για το συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Τα αποτελέσματα της MIC θα πρέπει να συνοδεύονται από την ερμηνεία τους προς τους κλινικούς γιατρούς, για την επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής, πάντα σύμφωνα με τα κριτήρια της CLSI.

Με την μέθοδο των αραιώσεων του αντιβιοτικού, μπορεί να υπολογιστεί τόσο η MIC, όσο και η MBC (ελάχιστη βακτηριοκτόνος πυκνότητα του αντιβιοτικού). Στην σειρά των αραιώσεων συμπεριλαμβάνονται πάντα, ένας θετικός μάρτυρας (μόνο μικροβιακό εναιώρημα) και ένας αρνητικός μάρτυρας (μόνον θρεπτικό υλικό). Οι αραιώσεις που ελέγχονται για τον προσδιορισμό της MIC, είναι οκταπλάσια αραιώση πάνω από την αναμενόμενη τιμή της MIC, και από 1/2 έως 1/4 αραιώση, κάτω της αναμενόμενης τιμής της. Μετά τον προσδιορισμό της MIC, προσδιορίζεται και η MBC, με ανακαλλιέργεια 10ml ζυμού, σε στερεό θρεπτικό υλικό, από το πρώτο σωληνάριο αραιώσης, που δεν παρουσίασε κάποια ορατή ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 24h για τα Gram⁽⁺⁾ βακτήρια, 48h για τους σταφυλόκοκκους και 72h για τα άλλα βακτήρια. Για να υπολογιστεί η

MBC, πρέπει να καθοριστεί αρχικά ο κρίσιμος αριθμός αποικιών (rejection value), κάτω από τον οποίο η αντίστοιχη συγκέντρωση του αντιβιοτικού θα θεωρηθεί βακτηριοκτόνος. Για να βρεθεί αυτή η τιμή, πρέπει να είναι γνωστή η συγκέντρωση του εναιωρήματος που εμβολιάστηκε, σε Μονάδες Παραγωγής Αποικιών (**C**olony **F**orming **U**nits), ήτοι σε cfu/ml:

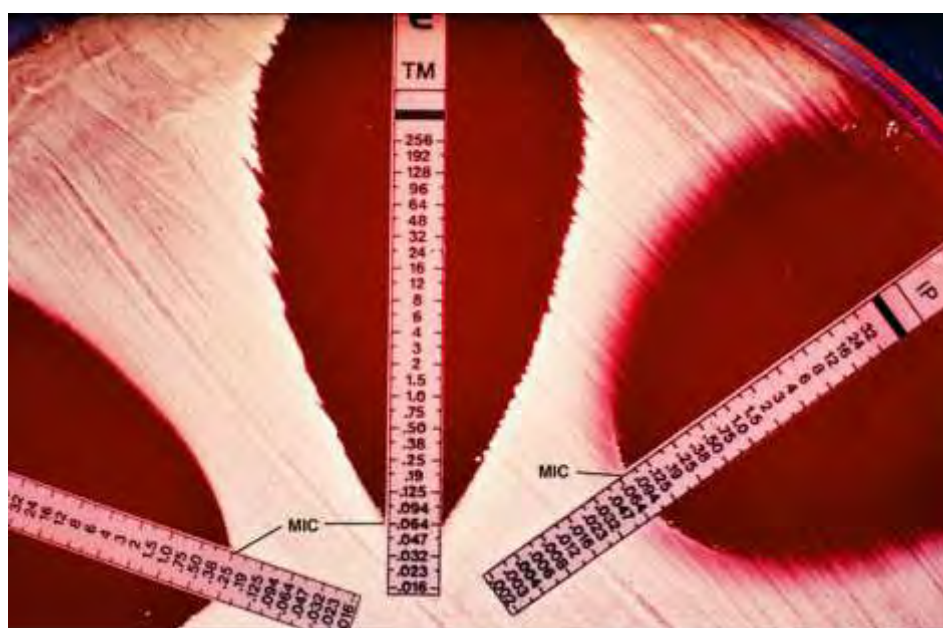
$$\text{cfu/ml} = \text{αριθμός αποικιών} \times \text{ποσότητα ενοφθαλισμού} \times \text{αραίωση}$$

Η συγκέντρωση αυτή (cfu/ml), στην συνέχεια αντιστοιχίζεται στον πίνακα Pearson και βρίσκεται ο κρίσιμος αριθμός αποικιών. Η μικρότερη συγκέντρωση αντιβιοτικού που δίνει αριθμό αποικιών μικρότερο του κρίσιμου, είναι η τιμή της MBC.

Οι δοκιμασίες διαδοχικών αραιώσεων σε ζυμό για τον καθορισμό των MIC και MBC μπορούν να διενεργηθούν, τόσο σε σωληνάρια ως μακρομέθοδος (διότι απαιτείται μεγάλος όγκος $\geq 1\text{ml}$), όσο και σε πλάκες μικροτιτλοποίησης όπου χρησιμοποιούνται μικροί όγκοι των 0,05-0,2 ml και έχουν αυτοματοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό. Όταν η μέθοδος πραγματοποιείται σε πλάκες μικροτιτλοποίησης, η θολερότητα της ανάπτυξης ελέγχεται μετά από επώαση σε αναλυτή, συνδεδεμένο με υπολογιστή, στον οποίο εκτυπώνονται και τα αποτελέσματα της MIC.

1.2.4.3. Δοκιμασία E (E-test)

Πρόκειται για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (MIC) ενός αντιβιοτικού, με την χρήση μιας ταινίας εμποτισμένης με μια σταθερή διαβάθμιση της συγκέντρωσης του αντιβιοτικού. Η ταινία τοποθετείται σε επιφάνεια τρυβλίου, προεπιστρωμένου με εναιώρημα του υπό εξέταση μικροοργανισμού. Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων, γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ενώ ο καθορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (MIC) του αντιβιοτικού, γίνεται σύμφωνα με τα κριτήρια του CLSI. Το εναιώρημα, ο ενοφθαλισμός και η επώαση πραγματοποιούνται στις ίδιες συνθήκες, όπως και κατά την μέθοδο των Kirby-Bauer.



Εικόνα 5. E-test στα αντιβιοτικά ιμιπενέμη και τριμεθοπρίμη.

1.2.4.4. Δοκιμασία αραιώσεων των αντιβιοτικών σε άγαρ

Χρησιμοποιείται ως μέθοδος αναφοράς σε ερευνητικά εργαστήρια καθώς και σε μεγάλα κλινικά εργαστήρια νοσοκομείων. Έχει το πλεονέκτημα ότι μπορούν να ελεγχθούν ταυτόχρονα πολλά μικροβιακά στελέχη, η μικροβιακή ετερογένεια και τυχόν επιμολύνσεις. Χαρακτηρίζεται από μεγάλη αναπαραγωγιμότητα και επειδή αποτελεί μέθοδο αναφοράς, μέσω αυτής μπορούν να ελεγχθούν η ακρίβεια και η αξιοπιστία άλλων τεχνικών ελέγχου ευαισθησίας στα αντιβιοτικά. Επίσης ελέγχεται και η *in vitro* δραστικότητα νέων αντιμικροβιακών ουσιών. Η μέθοδος εκτελείται σε τρυβλία με άγαρ Mueller-Hinton, με ενσωματωμένο το αντιβιοτικό. Η ενσωμάτωση του αντιβιοτικού γίνεται, μετά από αποστείρωση του άγαρ, σε θερμοκρασία 45-50°C. Το αντιβιοτικό εγχέεται στο άγαρ, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Μετά την παρασκευή τους, τα τρυβλία φυλάσσονται στους 4°C μέχρι και 4 εβδομάδες.

Σε κάθε τρυβλίο, ενοφθαλμίζεται συγκεκριμένο μικροβιακό εναιώρημα με την μορφή μιας κηλίδας 5-8mm (10^4 CFU/κηλίδα), οπότε σε κάθε τρυβλίο διαμέτρου 100 mm μπορούν να τοποθετηθούν μέχρι 30-35 κηλίδες, που αντιπροσωπεύουν διαφορετικό στέλεχος ή μικροοργανισμό. Μετά από επώαση στους 37°C για 18-24 ώρες, γίνεται η ανάγνωση των αποτελεσμάτων. Προσδιορίζεται η μικρότερη πυκνότητα του αντιβιοτικού η οποία αναστέλλει την ορατή ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Η παρουσία μιας αποικίας ή μιας πολύ μικρής ανάπτυξης δεν λαμβάνεται υπόψη. Ο έλεγχος επαναλαμβάνεται, όταν παρατηρείται ανάπτυξη μικρού αριθμού αποικιών σε πυκνότητες που απέχουν πολύ από την τιμή της MIC, όπως και όταν παρατηρείται αναστολή ανάπτυξης σε μικρές συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού και ανάπτυξη σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.

Σε όλες τις δοκιμασίες ευαισθησίας στα αντιβιοτικά, είτε αυτές στηρίζονται στην διάχυση είτε στην αραιώση, οι μέθοδοι θα πρέπει να προτυποποιούνται προσεκτικά, έτσι ώστε να είναι αναπαραγώγιμες και κυρίως επαναλήψιμες, τόσο σε επίπεδο του ίδιου εργαστηρίου, όσο και μεταξύ άλλων εργαστηρίων. Στις περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες, το αντιβιογράμμα έχει περιορισμένη αξία, διότι μικροοργανισμοί με ελάχιστη γενετική σχέση μπορούν να εμφανίζουν το ίδιο φαινότυπο αντοχής σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά.

1.2.5. Ορολογικές δοκιμασίες

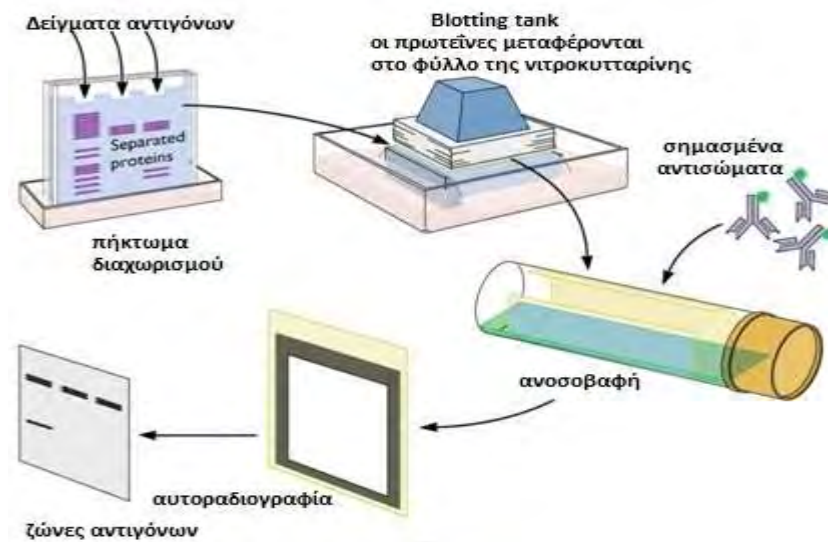
Οι ορολογικές μέθοδοι τυποποίησης μικροοργανισμών στηρίζονται στην ανίχνευση αντιγόνων των βακτηρίων, με την χρήση ειδικών αντιορών. Οι αντιοροί προέρχονται συνήθως από ζώα που μολύνθηκαν πειραματικά από συγκεκριμένα βακτήρια, τα οποία στη συνέχεια προκάλεσαν ανοσολογική απάντηση και ανάπτυξη αντισωμάτων στα πειραματόζωα.

Αντιοροί κυκλοφορούν στο εμπόριο για την ταυτοποίηση των σημαντικότερων μικροοργανισμών ιατρικής σημασίας. Η μέθοδος αυτή καλείται **Οροτυπία** και χρησιμοποιεί άγνωστο μικροοργανισμό, που απομονώνεται από ασθενή, σε ορολογικές δοκιμασίες με γνωστούς πολυδύναμους ή μονοδύναμους αντιορούς. ⁽⁸⁴⁾ Οι ορολογικές δοκιμασίες στην οροτυπία, μπορούν να διενεργηθούν με διάφορους τρόπους όπως: δοκιμασία συγκόλλησης σε πλάκα ή σε σωληνάριο, δοκιμασία σύνδεσης συμπληρώματος, με ανοσοφθορισμό άμεσο και έμμεσο και με την ανοσοχημική δοκιμασία **ELISA** (**E**nzyme-**L**inked **I**mmuno**S**orbent

Assay). Η **ELISA** είναι μία μέθοδος με ευρεία χρήση, ταχεία και αυτοματοποιημένη, τόσο ως προς την διαδικασία, όσο και ως προς την ανάγνωση των αποτελεσμάτων. Στην άμεση ELISA, αντισώματα γνωστής ειδικότητας τοποθετούνται και προσκολλώνται σε βύθισμα μιας μικροπλάκας. Στην συνέχεια το άγνωστο βακτήριο προστίθεται σε κάθε βύθισμα. Η αντίδραση με αντισώματα γνωστής ειδικότητας, ταυτοποιεί το άγνωστο βακτήριο.

Άλλη ορολογική δοκιμασία τυποποίησης είναι η **Western Blot** (Εικόνα 6) η οποία κυρίως χρησιμοποιείται για την ανίχνευση αντισωμάτων στον ορό ασθενών με AIDS και στην διάγνωση της νόσου Lyme, που προκαλείται από το βακτήριο *Borrelia burgdorferi*.

Η μέθοδος περιλαμβάνει διαχωρισμό των πρωτεϊνών, γνωστού βακτηρίου ή ιού, με ηλεκτροφόρηση SDS ή PAGE, ανάλογα με το μοριακό βάρος και το φορτίο των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες εν συνεχεία μεταφέρονται σε μεμβράνη, με αποτύπωση. Η μεμβράνη καλύπτεται με ορό του ασθενούς. Εάν στο ορό υπάρχουν αντισώματα έναντι κάποιας πρωτεΐνης που βρίσκεται στην μεμβράνη, γίνεται αντίδραση. Στην επόμενη φάση η μεμβράνη καλύπτεται με αντιανθρώπινο ορό, ραδιοσημασμένο (αντισώματα έναντι ανοσοσφαιρίνης του ανθρώπου), ή συνδεδεμένο με ένζυμο. Στην τελική φάση, με την προσθήκη υποστρώματος του ενζύμου, διακρίνεται το σημείο σύνδεσης πρωτεΐνης-αντισώματος σαν έγχρωμη ζώνη ή γίνεται η εμφάνιση του με αυτοραδιογραφία.



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση των φάσεων της μεθόδου Western Blot.

Οι ορολογικές δοκιμασίες, έχουν χρησιμοποιηθεί για δεκαετίες πέραν των διαγνωστικών αναγκών και για την ταξινόμηση των μικροοργανισμών. Παραμένουν σημαντικές οι δοκιμασίες τυποποίησης σε ορισμένα είδη μικροοργανισμών όπως *Salmonella*, *Legionella*, *Shigella* και *Streptococcus pneumoniae*. Επίσης οι ορολογικές δοκιμασίες χρησιμοποιούνται και για επιδημιολογικούς σκοπούς, σε περιπτώσεις διαφοροποίησης μικροοργανισμών του ίδιου είδους, όπως είναι η *Klebsiella* και η *Pseudomonas*.

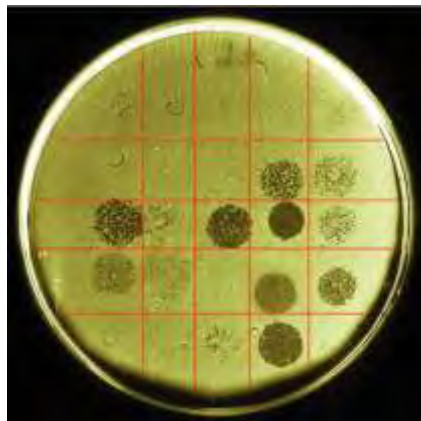
1.2.6. Λυσιστυπία

Η λυσιστυπία είναι μια μέθοδος η οποία χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της πηγής και την παρακολούθηση μιας επιδημίας. Η λυσιστυπία με φάγους διενεργείται προκειμένου να

διαπιστωθεί σε ποιούς φάγους είναι ευαίσθητος ένας μικροοργανισμός. Οι βακτηριοφάγοι ή φάγοι είναι ιοί των βακτηρίων, οι οποίοι συνήθως προκαλούν την λύση των βακτηριακών κυττάρων που μολύνουν. Είναι εξαιρετικά εξειδικευμένοι και μολύνουν ένα συγκεκριμένο είδος και ενίοτε μόνο ένα συγκεκριμένο στέλεχος ενός βακτηρίου.

Ένα βακτηριακό στέλεχος, είναι δυνατόν, να είναι ευαίσθητο σε δύο διαφορετικούς φάγους, ενώ ένα άλλο να είναι ευαίσθητο και στους δύο αυτούς αλλά και σε έναν τρίτο φάγο. (85, 86, 87) Με την λυσιτυπία ανιχνεύονται επίσης και οι πηγές τροφιμογενών λοιμώξεων.

Η διαδικασία έχει ως εξής: Σε τρυβλίο με άγαρ αναπτύσσεται ένα ταπήτιο βακτηρίου. Πάνω στο ταπήτιο τοποθετούνται σταγόνες, που η κάθε μια από αυτές περιέχει και έναν διαφορετικό φάγο. Στα σημεία που ο φάγος μολύνει τα βακτήρια και η μόλυνση αυτή συνοδεύεται με την λύση των βακτηριακών κυττάρων, εμφανίζονται κενά στην βακτηριακή ανάπτυξη, τα οποία ονομάζονται πλάκες.



Εικόνα 7. Λυσιτυπία στελέχους *Salmonella enterica*.

Με την δοκιμασία αυτή μπορεί να πιστοποιηθεί π.χ. ότι ένα βακτήριο το οποίο απομονώθηκε από ένα χειρουργικό τραύμα, παρουσιάζει την ίδια ευαισθησία με φάγο που απομονώθηκε από τον χειρουργό ή τις νοσηλεύτριες του χειρουργείου. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να προσδιοριστεί η πηγή μιας λοίμωξης.

1.3. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Οι μικροβιολόγοι αναζητούσαν πάντα ταχύτερους και αποτελεσματικότερους τρόπους ανίχνευσης και τυποποίησης των παθογόνων μικροοργανισμών. Οι μέθοδοι της Μοριακής Βιολογίας εισήχθησαν στο κλινικό εργαστήριο πριν πολλά χρόνια και αποτελούν σήμερα ισχυρά διαγνωστικά εργαλεία. Η εισαγωγή της μοριακής τεχνογνωσίας, από την βασική εργαστηριακή έρευνα στο κλινικό εργαστήριο, διήρκεσε πολλές δεκαετίες. (88, 89) Οι τεχνικές αυτές άλλαξαν ριζικά τον τρόπο ανίχνευσης και τυποποίησης των μικροοργανισμών και σήμερα εφαρμόζονται, είτε απ' ευθείας στα κλινικά δείγματα, είτε μετά από ανάπτυξη των μικροοργανισμών στις καλλιέργειες. Οι μοριακές δοκιμασίες αρχικά χρησιμοποιήθηκαν από τους μικροβιολόγους για την μελέτη μικροοργανισμών διατροφικά απαιτητικών και δύσκολα καλλιεργούμενων, καθώς και στην διερεύνηση σημαντικών επιδημιών. Η προοδευτική μείωση του κόστους και της δυσκολίας εφαρμογής των μοριακών τεχνικών, βοήθησε στην εξά-

πλωση της χρήσης τους στην Διαγνωστική Μικροβιολογία. Τα τελευταία χρόνια, η χρήση μοριακών τεχνικών στην τυποποίηση των βακτηρίων, έχει δημιουργήσει πολύ μεγάλο ενδιαφέρον για την χρήση αυτών των τεχνικών σε επιδημιολογικές μελέτες και στον έλεγχο των νοσοκομειακών λοιμώξεων. Στις μελέτες αυτές υπάρχουν κάποιες παραδοχές, οι οποίες συνοψίζονται ως εξής :

- τα επιδημιολογικά συγγενή στελέχη, προέρχονται από κοινό πρόγονο.
- τα επιδημιολογικά συγγενή στελέχη έχουν τον ίδιο γονότυπο, όταν έχουν έναν κοινό πρόγονο.
- τα επιδημιολογικά μη συγγενή στελέχη, διαθέτουν διαφορετικό γονότυπο.

Από τις παραδοχές αυτές υπάρχουν κάποιες εξαιρέσεις, κυρίως σε ότι αφορά τα επιδημιολογικά μη συγγενή στελέχη, τα οποία μπορεί να έχουν παρόμοιο ή μη διακριτό μεταξύ τους γονότυπο. Αυτό οφείλεται είτε στο γεγονός ότι υπάρχουν περιορισμένες γονοτυπικές διαφοροποιήσεις μέσα στα είδη είτε οφείλεται στην αδυναμία των μεθόδων να διαχωρίσουν γονοτυπικά τα στελέχη. Γνωρίζουμε ότι κατά την διάρκεια των νοσοκομειακών επιδημιών συμβαίνουν μεταλλάξεις, μεταφορά γενετικού υλικού μέσω πλασμιδίων κ.α. Συνεπώς είναι σημαντικό να γνωρίζουμε εάν σχετίζονται γενετικά τα στελέχη μεταξύ τους αλλά και εκείνα που δεν σχετίζονται, πώς διαφοροποιούνται μεταξύ τους γενετικά.

Οι μοριακές μέθοδοι μελέτης των μικροοργανισμών, ομαδοποιούνται σε δυο μεγάλες κατηγορίες:

- μέθοδοι χωρίς ενίσχυση του DNA των μικροοργανισμών
- μέθοδοι με ενίσχυση του DNA των μικροοργανισμών μέσω της αντίδρασης PCR

1.4. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ χωρίς ενίσχυση του DNA

Οι μοριακές τεχνικές τυποποίησης μικροοργανισμών, χωρίς την ενίσχυση του DNA, είναι οι πρωιμότερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές, στην μελέτη της αλληλουχίας του γονιδιώματος των μικροοργανισμών και έχουν την δυνατότητα να ανιχνεύσουν παραλλαγές του DNA, οι οποίες είναι αδύνατον να ανιχνευθούν μέσω των τεχνικών μελέτης των φαινοτυπικών χαρακτήρων. Έχουν περιγραφεί πολλές μέθοδοι αυτής της κατηγορίας, οι οποίες διαχωρίζονται αδρά σε:

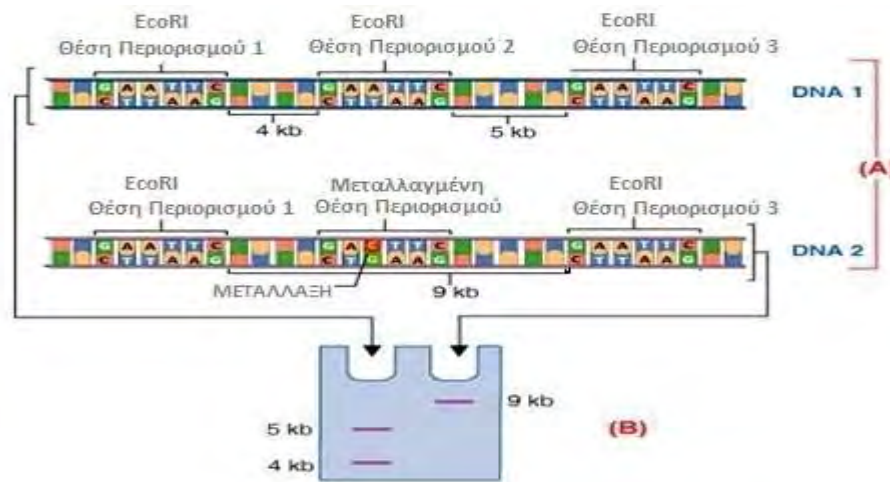
- Μοριακές τεχνικές με χρήση περιοριστικών ενζύμων και προτύπων ζώνωσης
 - A.** RFLP (**R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism)
 - B.** PFGE (**P**ulse **F**ield **G**el **E**lectrophoresis)
- Μοριακές τεχνικές βασιζόμενες σε αντιδράσεις Υβριδισμού
Southern Blot – Ριβοτυπία - Northern Blot
- Τυποποίηση μέσω Πλασμιδίων (Plasmid Typing)

1.4.1. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΖΩΝΩΣΗΣ

1.4.1.1. Πολυμορφισμός Μήκους Περιοριστικών Ενζύμων - RFLP (R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism)**

Περιοριστικά ένζυμα

Το χρωμόσωμα του βακτηριακού κυττάρου αποτελεί τον θεμέλιο λίθο της ταυτότητας και της μοναδικότητας του μικροοργανισμού. Είναι ο στόχος της ανάλυσης όλων των μοριακών τεχνικών. Από τις πλέον πρώιμες προσεγγίσεις είναι οι μοριακές τεχνικές αυτής της κατηγορίας, που χαρακτηρίζονται από την χρήση περιοριστικών ενζύμων. Τα περιοριστικά ένζυμα είναι περιοριστικές ενδονουκλεάσες, οι οποίες αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες βάσεων σε διπλή έλικα DNA και διασπούν (τέμνουν) και τις δύο έλικες σε συγκεκριμένες θέσεις. Από τους βιολόγους και τους βιοχημικούς έχουν χαρακτηριστεί ως εξειδικευμένα νυστέρια και θαυμαστά δώρα της φύσης. Ανακαλύφθηκαν από τους **Werner Arber**, **Hamilton Smith** και **Daniel Nathans**, οι οποίοι και μοιράστηκαν το **βραβείο Νόμπελ Φυσιολογίας-Ιατρικής το 1978**.



Εικόνα 8. Δράση του ενζύμου EcoRI σε τμήμα αλληλόμορφων του ίδιου γονιδίου.

A-DNA 1: αναγνώριση των θέσεων περιορισμού, τομή του DNA 1 σε τρεις θέσεις και παραγωγή δύο τμημάτων του DNA μεγέθους 4 kb και 5 kb στην ηλεκτροφόρηση **(B)**

A-DNA 2: κατάργηση μιας θέσης περιορισμού λόγω μετάλλαξης με συνέπεια την παραγωγή ενός τμήματος DNA μεγέθους 9 kb στην ηλεκτροφόρηση **(B)**

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες έχουν βρεθεί, στις Επικράτειες των Βακτηρίων και των Αρχαίων και εμπλέκονται στον μηχανισμό άμυνας των μικροοργανισμών, έναντι των βακτηριοφάγων που εισβάλλουν στα κύτταρα. (⁹⁰, ⁹¹) Εντός του μικροοργανισμού οι ενδονουκλεάσες διασπούν εκλεκτικά το ξένο DNA, μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται περιορισμός ή πέψη. Το DNA του οικοδεσπότη-κυττάρου προστατεύεται, από την δράση των δικών του περιοριστικών ενζύμων, με μεθυλίωση σε συγκεκριμένες θέσεις, μέσω μιας μεθυλοτρανσφεράσης. (⁹²) Συνολικά οι δύο αυτές διαδικασίες (διάσπαση και προστασία) αποτελούν μέρος ενός **Συστήματος Περιορισμού - Τροποποίησης (Restriction - Modification, RM system)** και υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι τα συστήματα αυτά αποτελούν κινητά γενετικά στοιχεία, με ισχυρά ιδιοτελή γνωρίσματα (selfish mobile elements), έχουν ευρεία διάδοση μεταξύ των προκαρυωτικών οργανισμών και επίδραση στην εξέλιξη αυτών. (⁹³, ⁹⁴, ⁹⁵) Η αξιοσημείωτη εξειδίκευση των περιοριστικών ενζύμων στην τομή του DNA, χρησιμοποιείται σε διάφορες τεχνικές χειρισμού του DNA, με πλήθος εφαρμογών όπως εισαγωγή γονιδίων σε πλασμίδια κατά την διαδικασία κλωνοποίησης και μελέτες έκφρασης πρωτεϊνών.

Επίσης χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό αλληλόμορφων γονιδίων σε μελέτες σημειακών μεταλλάξεων γνωστών ως **SNP** (**S**ingle **N**ucleotide **P**olymorphisms). Η μέθοδος ανάλυσης πολυμορφισμών αυτής της κατηγορίας, καλείται **Πολυμορφισμός Μήκους Περιοριστικών Ενζύμων-RFLP** (**R**estriction **f**ragments **l**ength **p**olymorphism).

Η μέθοδος στηρίζεται στην διαφοροποίηση του ηλεκτροφορητικού αποτελέσματος μέσω της δράσης των περιοριστικών ενζύμων, όταν υπάρχει μετάλλαξη του DNA από προσθήκη, αφαίρεση ή αλλαγή κάποιου ζεύγους βάσεων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ή την κατάργηση θέσης αναγνώρισης της ειδικής αλληλουχίας αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων και την τροποποίηση του μήκους των τμημάτων DNA που προκύπτουν από την δράση τους. Η ανάλυση της δράσης των περιοριστικών ενζύμων γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, των προϊόντων πέψης των περιοριστικών ενζύμων. Το πρότυπο ζώνωσης θραυσμάτων DNA που λαμβάνεται από την ηλεκτροφόρηση, είναι χαρακτηριστικό για το είδος του μικροοργανισμού και για το χρησιμοποιούμενο κάθε φορά ένζυμο περιορισμού.

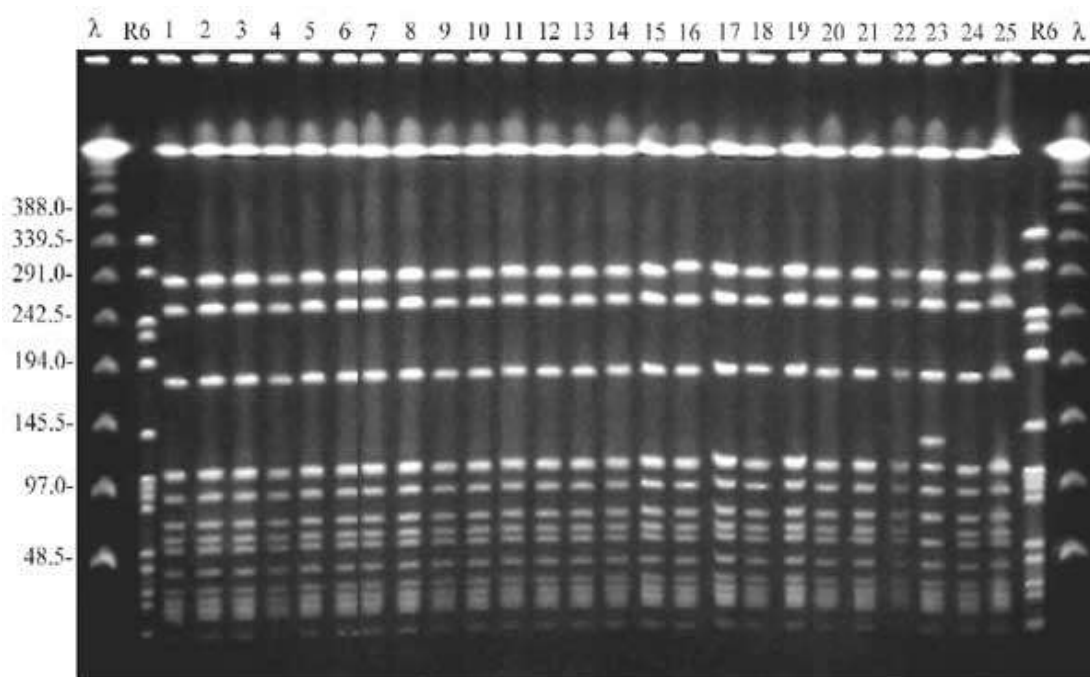
Διαφοροποιημένη η RFLP συνδυάζει την χρήση των περιοριστικών ενζύμων με στοχευμένες αλληλουχίες γονιδίων που χρησιμοποιούν σημασμένους ιχνηθέτες-probes για μεγαλύτερη εξειδίκευση της μεθόδου. Οι σημασμένοι ιχνηθέτες προσδιορίζονται μετέπειτα μέσω βημάτων της μεθόδου Southern Blot. Υπό αυτή την μορφή η μέθοδος χρησιμοποιείται για διερεύνηση του test πατρότητας και για την ταυτοποίηση αγνώστων αποτυπωμάτων σε τόπους εγκλήματος.

1.4.1.2. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΑΛΛΟΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΠΕΔΙΟ PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis)

Η δράση των περιοριστικών ενζύμων στο ακέραιο χρωμοσωμικό DNA (intact DNA), έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλου αριθμού θραυσμάτων DNA με μικρό μήκος. Η ανάλυση όλων αυτών των θραυσμάτων DNA αποτελεί από μόνη της μία πρόκληση. Για τον λόγο αυτό προτάθηκε αρχικά η χρήση περιοριστικών ενζύμων σπάνιας κοπής (η αλληλουχία αναγνώρισης βρίσκεται σπάνια στο γονιδίωμα των μικροοργανισμών), που τέμνουν το DNA σε μεγάλα τμήματα. Στην κλασική ηλεκτροφόρηση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης, δεν επιτυγχάνεται όμως ικανοποιητικός διαχωρισμός τμημάτων με μέγεθος μεγαλύτερο των 40-50kb. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα μεγάλα τμήματα DNA, λόγω του μεγέθους τους, αναδιπλώνονται σχηματίζοντας ογκώδεις τριτοταγείς δομές, που εμποδίζουν την διέλευση τους μέσω των μικρών «κενών» των μορίων της αγαρόζης. Οι περιορισμοί αυτοί μπορούν να ξεπεραστούν, χρησιμοποιώντας αγαρόζη πολύ χαμηλής συγκέντρωσης και ηλεκτρικό ρεύμα με χαμηλή ένταση. Υπό αυτές τις συνθήκες είναι δυνατός ο διαχωρισμός τμημάτων DNA με μέγεθος έως ~200kb.

Για να αρθούν αυτοί οι περιορισμοί, το 1983 επινοήθηκε από τους **Schwartz DC** και **Canton CR** μία νέα τεχνική ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης, η οποία διενεργείται σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (^{96, 97}), όπου γίνεται περιοδική αλλαγή της κατεύθυνσης του ηλεκτρικού ρεύματος, με περιοδική αλλαγή των πόλων της πηγής του ρεύματος. (^{98, 99}) Το τελικό αποτέλεσμα των μεταβολών της πολικότητας του ηλεκτρικού πεδίου είναι ο διαχωρι-

σμός των μεγάλων τμημάτων του DNA, μεγέθους έως και 12Mb, προς μία κατεύθυνση και εμφάνιση διακριτών ζωνών. Στην PFGE τα μόρια του DNA επαναπροσανατολίζονται συνεχώς κατά την μετακίνηση τους στο πήκτωμα αγαρόζης. Επίσης οι ηλεκτρικοί παλμοί, διαφορετικής διάρκειας, επιτυγχάνουν τον επαναπροσανατολισμό των μεγάλων τμημάτων του DNA. Μακράς διάρκειας παλμοί εξυπηρετούν την μετακίνηση μεγαλύτερων τμημάτων και το αντίστροφο. Όταν ο χρόνος επαναπροσανατολισμού ενός μορίου DNA είναι μικρότερος από την διάρκεια του ηλεκτρικού παλμού, ο διαχωρισμός των τμημάτων είναι εξαιρετικά επιτυχής. Το μέγεθος, ο αριθμός των ζωνών αλλά και το είδος της ενδονουκλεάσης που χρησιμοποιείται, είναι χαρακτηριστικός για κάθε στέλεχος του μικροοργανισμού. Η ηλεκτροφορητική εικόνα (**Εικόνα 9**) ενός στελέχους μικροοργανισμού είναι χαρακτηριστική και ονομάζεται πρότυπο ζώνωσης θραυσμάτων DNA ή ηλεκτροφορητικό «δακτυλικό» αποτύπωμα (fingerprints).



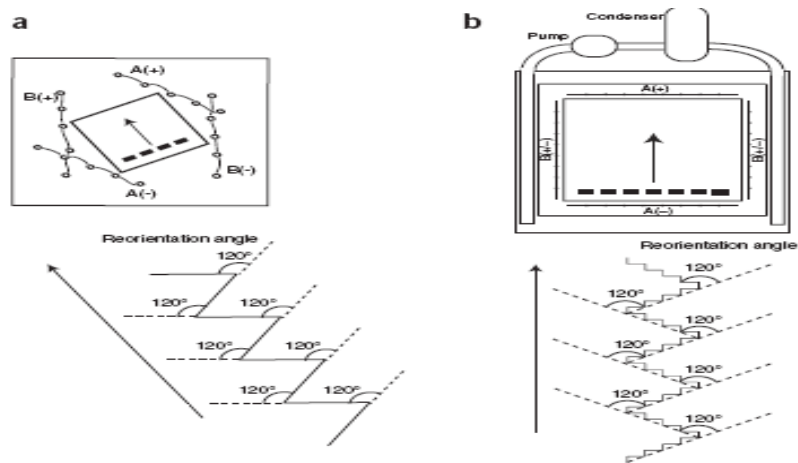
Εικόνα 9. Ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο.

λ- ladder και **R6** - DNA πρότυπου στελέχους *Streptococcus pneumoniae* το οποίο επεξεργάστηκε, όπως και τα δείγματα, με ενδονουκλεάση *Sma*I και χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Το gel περιλαμβάνει 25 στελέχη MRSA. Όλα τα στελέχη ανήκουν σε δείγματα μιας επιδημίας, τα οποία είναι γονοτυπικά όμοια, πλην του στελέχους 23, το οποίο διαφέρει κατά μία ζώνη και χαρακτηρίζεται από στενή γονοτυπική συγγένεια με τα υπόλοιπα στελέχη της επιδημίας. ⁽¹⁰⁰⁾

Οι διαφοροποιήσεις στην μεθοδολογία της PFGE αφορούν στον τρόπο επίτευξης της περιοδικής αλλαγής κατεύθυνσης του ηλεκτρικού πεδίου. ⁽¹⁰¹⁾ Υπάρχουν δυο κυρίως τρόποι προσέγγισης της μεθόδου:

- **PFGE με αναστροφή του ηλεκτρικού πεδίου**, όπου το ηλεκτρικό πεδίο αναστρέφεται περιοδικά κατά 180°.
- **CHEF (contour-clamped homogenous electric field)**. Λειτουργεί περισσότερο πολύπλοκα, με πολλά ηλεκτρόδια και αλλαγή του ηλεκτρικού πεδίου κατά 120° περιοδικά.

Από τις δυο μεθόδους χρησιμοποιείται κυρίως η **CHEF** (Εικόνα 10) τα τελευταία χρόνια, μέσω της οποίας γίνεται η εκτίμηση επιδημιών οφειλομένων σε διάφορους μικροοργανισμούς.



Εικόνα 10. Σχηματικό διάγραμμα **συσσκευής CHEF** για την δημιουργία παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Τα βέλη υποδεικνύουν την κατεύθυνση της κίνησης του DNA. Με την συνεχή γραμμή αναπαρίσταται η κίνηση του DNA κατά την διάρκεια ενός ηλεκτρικού παλμού. Με τις διακεκομμένες γραμμές φαίνεται η κατεύθυνση του ηλεκτρικού πεδίου κατά την διάρκεια του ηλεκτρικού παλμού.

Η ευαισθησία της συσκευής CHEF εξαρτάται από σειρά παραγόντων: ⁽¹⁰²⁾

- Από τον βαθμό ομοιομορφίας των ηλεκτρικών πεδίων
- Από τον μέσο όρο της διάρκειας των ηλεκτρικών παλμών, που δημιουργούν ανά δύο τα ηλεκτρικά πεδία
- Από τις γωνίες που δημιουργούν τα δύο ηλεκτρικά πεδία, ως προς το πήκτωμα
- Από τα σχετικά δυναμικά των ηλεκτρικών πεδίων

Η ερμηνεία και η χρήση των αποτελεσμάτων της PFGE, σαν σημαντικών πληροφοριών για την τυποποίηση των νοσοκομειακών παθογόνων, προϋποθέτει την κατανόηση και την σύγκριση των αποτελεσμάτων της PFGE καθώς και την γνώση, ότι τυχαία γενετικά συμβάντα μπορούν να τροποποιήσουν αυτά τα αποτελέσματα. Κατά την διάρκεια μιας επιδημίας, τυχαία γενετικά συμβάντα όπως μετάλλαξη, παρεμβολή ή διαγραφή τμήματος DNA, τροποποιούν με κατάργηση ή δημιουργία θέσεων αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων και κατά συνέπεια και το πρότυπο ζώνωσης της PFGE. Έχουν θεσπιστεί κατάλληλες ερμηνευτικές οδηγίες για την συσχέτιση των περιοριστικών τμημάτων της PFGE, τα οποία παρατηρούνται μεταξύ των στελεχών, ώστε αυτά να θεωρηθούν στελέχη της συγκεκριμένης επιδημίας. Οι οδηγίες αυτές εστιάζονται στον αριθμό των συμβάντων που απαιτούνται, ώστε το τελικό αποτέλεσμα να είναι η διακύμανση των περιοριστικών τμημάτων στην PFGE.

Σύμφωνα με τις οδηγίες, για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της PFGE, που προτάθηκαν από τον **Tenover et al** ^(103, 104, 105), στελέχη τα οποία διαφέρουν στην PFGE κατά τρία τμήματα περιορισμού, καταγράφονται ως έχοντα ισχυρή συγγένεια, διότι απαιτείται μόνο ένα γενετικό συμβάν. Εάν η διαφορά του αριθμού των περιοριστικών τμημάτων είναι 4-6 περιοριστικά τμήματα, το πιθανότερο είναι, αυτό να οφείλεται σε δυο γενετικά συμβάντα. Όταν η διαφορά των περιοριστικών τμημάτων στην PFGE, είναι μεγαλύτερη από επτά περιο-

ριστικά τμήματα, απαιτούνται τρία ή και περισσότερα γενετικά συμβάντα τα οποία τροποποιούν γενετικά τα στελέχη των μικροοργανισμών μεταξύ τους.

Συμπερασματικά: στελέχη με διαφορές στην PFGE, μέχρι τρία περιοριστικά τμήματα, είναι συγγενή μεταξύ τους και προέρχονται από κοινό κλώνο του μικροοργανισμού, ενώ στελέχη με διαφορές στην PFGE πάνω από τρία περιοριστικά τμήματα, αντιπροσωπεύουν στελέχη με αδύναμη έως ασήμαντη επιδημιολογική σχέση.

Σε αρκετές μελέτες, με την χρήση της PFGE, έχει τεκμηριωθεί ότι ένα μοναδικό γενετικό συμβάν, όπως παρεμβολή ή διαγραφή τμήματος DNA μέσω της δράσης πλασμιδίων και βακτηριοφάγων, καταγράφεται σε στελέχη μιας επιδημίας τα οποία απομονώνονται στην διάρκεια 1-3 μηνών. ^(106, 107) Με την καταγραφή δύο γενετικών συμβάντων στην PFGE, μέσω διαφοροποίησης του αριθμού των τμημάτων στην ηλεκτροφόρηση, η συσχέτιση της συγγένειας των στελεχών τοποθετείται στην «γκρίζα περιοχή», όταν μάλιστα τα στελέχη απομονώνονται σε διάρκεια 3-6 μηνών. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι ίσως τα στελέχη αυτά είναι συγγενή, αλλά το πιθανότερο είναι να μην έχουν συγγένεια με τα στελέχη της επιδημίας. Τα τελευταία χρόνια έχουν δημιουργηθεί εμπορικά προγράμματα επεξεργασίας δεδομένων της PFGE, με αλγόριθμους που διευκολύνουν της ανάλυση των αποτελεσμάτων. ⁽¹⁰⁸⁾

Η ευρεία χρήση της PFGE σε πλήθος επιδημιολογικών μελετών, έχει δείξει την μεγάλη διακριτική ικανότητα της μεθόδου. Τα αποτελέσματα της PFGE είναι αναπαραγώγιμα και επαναλήψιμα, κυρίως όταν πρόκειται για το ίδιο εργαστήριο (intra laboratory) και αφορά μια συγκεκριμένη επιδημιολογικά περίοδο. Θεωρείται μέθοδος επιλογής για την επιδημιολογική μελέτη των μικροοργανισμών. Παρά ταύτα παρουσιάζει μία σειρά περιορισμών:

- Η μέθοδος θεωρείται πολύπλοκη και ο χρόνος για την ολοκλήρωση της ανάλυσης είναι σημαντικά παρατεταμένος (αρκετές μέρες).
- Η εφαρμογή της μεθόδου απαιτεί συγκεκριμένο εξοπλισμό και πολύ καλή εκπαίδευση του προσωπικού.
- Δεν εφαρμόζεται σε όλα τα είδη των βακτηρίων.
- Τα πρότυπα ζώνωσης που λαμβάνονται, μέσω της PFGE, μας πληροφορούν μόνο για το μέγεθος αλλά όχι για την αλληλουχία των τμημάτων.
- Στην πραγματικότητα δεν γνωρίζουμε εάν τα τμήματα DNA του ίδιου μήκους είναι και γενετικά ίδια.
- Τροποποίηση μίας θέσης περιορισμού μπορεί να σημαίνει πολύ περισσότερα, από την διαφορά των προτύπων ζώνωσης.
- Η συγγένεια των στελεχών πρέπει να εκλαμβάνεται κυρίως σαν ένας οδηγός, παρά σαν μια πραγματική φυλογενετική σχέση μεταξύ των στελεχών.

Για την μελέτη των επιδημιών, με την χρήση των αποτελεσμάτων της PFGE, έχει δημιουργηθεί στις Η.Π.Α., από την **CDC** (**C**enter for **D**isease **C**ontrol and **P**revention) σε συνεργασία με την **APHL** (**A**ssociation of **P**ublic **H**ealth **L**aboratories), μια βάση δεδομένων, με την ονομασία PulseNet (<http://www.cdc.gov/pulsenet/>). ⁽¹⁰⁹⁾ Με εισαγωγή εικόνων της PFGE στην βάση δεδομένων, γίνεται η σύγκριση τους σε τοπικό, περιφερειακό και κρατικό επίπεδο και με άμεσο τρόπο τεκμηριώνεται η συγγένεια των στελεχών που έχουν μελετηθεί καθώς και η πηγή αυτών.

1.4.2. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ βασιζόμενες σε αντιδράσεις ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ Southern Blot - Ριβοτυπία - Northern Blot

Σε αντίθεση με την PFGE όπου χρησιμοποιούνται ένζυμα σπάνιας κοπής, η μέθοδος Southern Blot έχει την δυνατότητα, με εύχρηστο τρόπο, της παρουσίασης μεγάλου αριθμού προϊόντων επεξεργασίας λόγω της δράσης των περιοριστικών ενζύμων.

Η μέθοδος **Southern Blot** είναι μία αρκετά πολύπλοκη μέθοδος και στην όλη διαδικασία διακρίνουμε τα εξής στάδια:

➤ **Πέψη του απομονωθέντος DNA.**

Για τη πέψη του DNA χρησιμοποιούνται περιοριστικά ένζυμα, τα οποία αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες του DNA, που βρίσκονται με αρκετή συχνότητα στο γονιδίωμα. Το αποτέλεσμα είναι η παραγωγή μεγάλου αριθμού περιοριστικών τμημάτων, ποικίλου μεγέθους βάσεων.

➤ **Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης.**

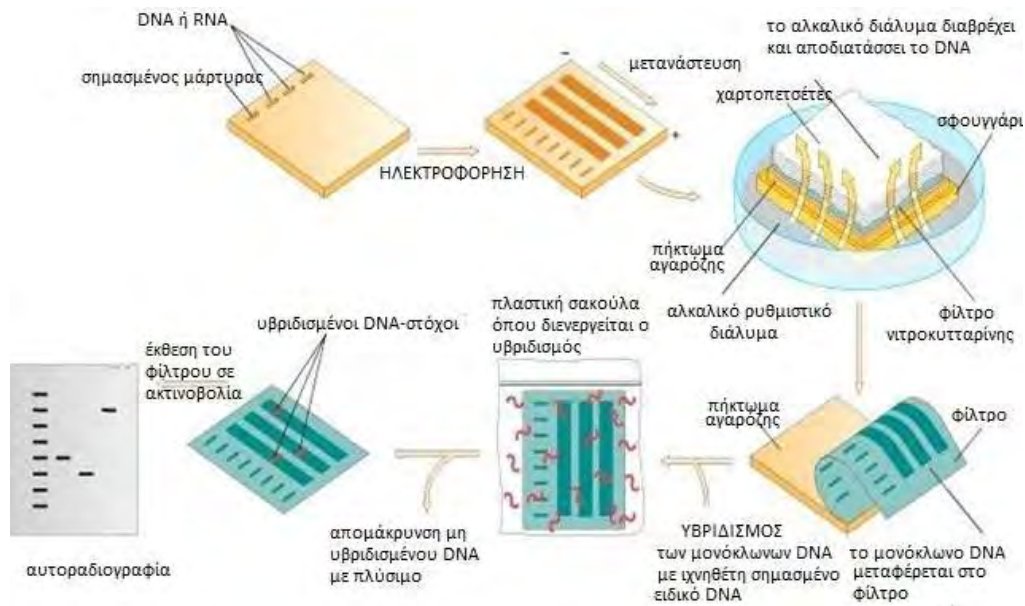
Μετά την διαδικασία της πέψης με περιοριστικά ένζυμα, ο μεγάλος αριθμός τμημάτων του DNA διαχωρίζεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα (gel) αгарόζης, όπου η ταχύτητα μετανάστευσης εξαρτάται από το μέγεθος των τμημάτων του DNA. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό τμημάτων DNA με μέγεθος από 100 bp έως 20 kb. Όταν το μέγεθος των τμημάτων είναι μεγαλύτερο από 40 kb, η ανάλυση είναι μικρή.

➤ **Τεχνική αποτύπωσης ή στύπωμα κατά Southern.**

Η τεχνική αποτύπωσης κατά Southern, της οποίας το όνομα προέρχεται από τον εμπνευστή της, **Edwin M. Southern**, και όχι από γεωγραφική περιοχή (¹¹⁰), επιτυγχάνεται με την επίστρωση επί της αгарόζης ενός φύλλου νιτροκυτταρίνης ή nylon, πάνω στο οποίο μεταφέρονται τα διαχωρισμένα τμήματα-κλάσματα του DNA, με στύπωμα. Η πηκτή αгарόζης στηρίζεται σε ένα στρώμα σφουγγαριού (**Εικόνα 11**), το οποίο βρίσκεται εμβαπτισμένο σε αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα. Το διάλυμα απορροφάται, δια μέσω της πηκτής αгарόζης και της νιτροκυτταρίνης, με χαρτοπετσέτες που τοποθετούνται πάνω στην νιτροκυτταρίνη. Καθώς το ρυθμιστικό αλκαλικό διάλυμα προσροφάται μέσω της αгарόζης, αποδιατάσσει το DNA και μεταφέρει τα μονόκλινα πλέον κλάσματα, από την πηκτή αгарόζης στο φύλλο της νιτροκυτταρίνης, όπου εκεί τα κλάσματα προσκολλώνται ισχυρά. Η μεταφορά αυτή θεωρείται αναγκαία για να διατηρηθεί το DNA σε μία σταθερή κατάσταση, ενόσω εξελίσσεται η επόμενη φάση του υβριδισμού.

➤ **Υβριδισμός σημασμένου ιχνηθέτη με τα διαχωρισμένα κλάσματα του DNA**

Το φύλλο νιτροκυτταρίνης που περιέχει τα μονόκλινα κλάσματα του DNA, μεταφέρεται μέσα σε πλαστική σακούλα με ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει *σημασμένο DNA*, ως ιχνηθέτη, ειδικού για την αναζητούμενη αλληλουχία του DNA. Το φύλλο νιτροκυτταρίνης εκτίθεται για μακρύ χρονικό διάστημα στον ιχνηθέτη, σε συνθήκες που ευνοούν τον υβριδισμό του ιχνηθέτη με το DNA-στόχο. Εν συνεχεία παραλαμβάνεται το φύλλο νιτροκυτταρίνης και πλένεται προσεκτικά, ώστε πάνω του να παραμείνουν μόνο τα μόρια του ιχνηθέτη που έχουν υβριδιστεί με το DNA-στόχο.



Εικόνα 11. Σχηματική παρουσίαση των σταδίων της μεθόδου **Southern Blot**. (βλέπε κείμενο)

Η τεχνική της υβριδοποίησης στηρίζεται στη ιδιότητα του DNA να αποδιατάσσεται. Ήδη από το 1960-1961 οι Murmur, Doty και Schildkaut (¹¹¹, ¹¹²) έδειξαν ότι οι συμπληρωματικές έλικες του DNA, που συγκρατούνται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων, μπορούν να αποχωρισθούν με θερμότητα σε αλκαλικό περιβάλλον και να υφίστανται υπό μορφή μονόκλωνου DNA. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται αποδιάταξη του DNA. Στο στάδιο αυτό, αν προστεθεί σημασμένος ιχνηθέτης (μικρό τμήμα μονόκλωνου-σημασμένου DNA), εξουδετερωθεί το αλκαλικό pH και μειωθεί η θερμοκρασία, γίνεται σύνδεση του ιχνηθέτη με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες DNA στο αποδιαταγμένο μόριο-στόχος. Οι τεχνικές υβριδοποίησης είναι οι πρώτες ιστορικά τεχνικές, που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση μικροοργανισμών σε κλινικά δείγματα. Το 1968 ο David Kohne με τεχνικές υβριδοποίησης, κατάφερε πρώτος να απομονώσει ένα από τα μόρια rRNA στην *E. Coli*, που χρησιμοποιούνται έως και σήμερα, σαν «παγκόσμιοι ιχνηθέτες» μιας και έχουν ομολογία με όλα τα βακτήρια. (¹¹³)

Η ειδικότητα μιας αντίδρασης υβριδοποίησης εξαρτάται από την θερμοκρασία, την συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος, το pH, την συγκέντρωση και το μέγεθος του ιχνηθέτη. Οι συνθήκες υβριδοποίησης μπορούν να προσαρμοστούν έτσι ώστε, να απομακρύνονται οι εν μέρει συμπληρωματικές αλληλουχίες και να παραμένουν μόνο οι απολύτως συμπληρωματικές αλληλουχίες, σε σταθερή δίκλωνη μορφή και αυτό ονομάζεται **αυστηρή υβριδοποίηση**.

Κάτω από χαλαρές συνθήκες που αναφέρονται ως συνθήκες **υβριδοποίησης ελαττωμένης αυστηρότητας**, αλληλουχίες που είναι παρόμοιες αλλά όχι απολύτως συμπληρωματικές, μπορούν να παραμείνουν ενωμένες. Η υβριδοποίηση υπό συνθήκες ελαττωμένης αυστηρότητας είναι χρήσιμη στην ταυτοποίηση ομόλογων γονιδίων, μεταξύ των ειδών ή μελών στενά σχετιζόμενων οικογενειών γονιδίων, στα οποία οι αλληλουχίες είναι παρόμοιες αλλά όχι ταυτόσημες. (¹¹⁴) Μια θετική αντίδραση υβριδοποίησης αναγνωρίζεται, από το ειδικό σήμα της ένωσης, με την οποία έχει σημειωθεί ο ιχνηθέτης.

Ανάλογες αντιδράσεις υβριδισμού, πραγματοποιούνται ανάμεσα σε δύο οποιεσδήποτε μονόκλωνες αλυσίδες νουκλεϊκών οξέων όπως DNA με DNA, DNA με RNA και RNA με RNA, με την προϋπόθεση ότι διαθέτουν συμπληρωματικές αλληλουχίες. Η ικανότητα ενός μονόκλωνου μορίου νουκλεϊκού οξέος να σχηματίζει διπλή έλικα με ένα συμπληρωματικό μόριο, αξιοποιείται για την ανίχνευση ειδικών αλληλουχιών τόσο στο DNA όσο και στο RNA. Ένας από τους συνήθεις στόχους για την Southern Blot, αποτελούν οι αλληλουχίες του rRNA και η μέθοδος αυτή αναφέρεται ως **Ριβοτυπία**. Στις περιπτώσεις που στόχος στην αντίδραση υβριδοποίησης, είναι ένα μόριο mRNA για την ανίχνευση ειδικών αλληλουχιών του mRNA, η αποτύπωση καλείται **Northern Blot**. Στην τεχνική αυτή ένα μόριο mRNA υποβάλλεται σε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και ο ιχνηθέτης είναι συνήθως ένα μονόκλωνο μόριο DNA.

Οι αντιδράσεις υβριδοποίησης για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των μικροοργανισμών μπορούν να επιτελεσθούν με τρεις τεχνικές:

- Υβριδοποίηση σε στερεή φάση
- Υβριδοποίηση in situ (¹¹⁵, ¹¹⁶, ¹¹⁷, ¹¹⁸)
- Υβριδοποίηση σε υγρή φάση (¹¹⁹, ¹²⁰)

1.4.2.1. Ιχνηθέτες-Probes στην Υβριδοποίηση και την Διαγνωστική

Η βασική αρχή που λαμβάνεται υπ' όψιν για την επιλογή του σωστού ιχνηθέτη είναι να υβριδοποιείται με την αλληλουχία του DNA στόχου, και όχι με άλλες αλληλουχίες που πιθανόν να βρίσκονται στο εξεταστέο δείγμα. Ένας ιχνηθέτης είναι ένα βραχύ, μονόκλωνο μόριο DNA, ένα ολιγονουκλεοτίδιο με μήκος που κυμαίνεται συνήθως από 10 έως 1000 νουκλεοτίδια. Παλαιότερα οι διαθέσιμοι ιχνηθέτες προέρχονταν από φυσικές πηγές. Σήμερα με την πρόοδο που έχει σημειωθεί στην χημεία των νουκλεοτιδίων, μικρά μόρια DNA μπορούν να συντεθούν στο εργαστήριο. Σε κάθε μικροοργανισμό υπάρχει τουλάχιστον μία μοναδική αλληλουχία, που τον διακρίνει από τους άλλους μικροοργανισμούς και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ιχνηθέτης στην αντίδραση υβριδοποίησης. Ο ιχνηθέτης που επιλέγεται, μπορεί να αποτελεί τμήμα DNA που δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνη, συνήθως όμως πρόκειται για αλληλουχία που κωδικοποιεί μία χαρακτηριστική ιδιότητα του βακτηρίου όπως μία τοξίνη, έναν λοιμογόνο παράγοντα ή επίτοπους της εξωτερικής μεμβράνης. Η χρήση των αλληλουχιών αυτών προϋποθέτει κατ' αρχήν την κλωνοποίηση, ενώ στην συνέχεια μπορεί να μην χρησιμοποιηθεί παρά μόνο ένα μέρος των χαρακτηριστικών αλληλουχιών.

Ένα σημαντικό τμήμα στην τεχνολογία υβριδοποίησης, είναι η άμεση ή έμμεση σήμανση του ιχνηθέτη με ένα ανιχνεύσιμο μόριο-σηματοδότη:

➤ Στην **άμεση σήμανση**, το μόριο-σηματοδότης προσδένεται σταθερά σε ενδιάμεση ή στην τελική περιοχή του ιχνηθέτη και η ανίχνευση γίνεται, χωρίς άλλο βήμα, μετά την υβριδοποίηση. (¹²¹)

➤ Στην **έμμεση σήμανση** η μονάδα σηματοδότησης προσδένεται στον ιχνηθέτη. Στην μονάδα μπορεί να προσκολληθεί ειδικά σημασμένη πρωτεΐνη, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί σε επόμενο βήμα.

Οι μέθοδοι σηματοδότησης (άμεση και έμμεση) χωρίζονται σε ενζυματικές, χημικές ή συνθετικές. Το πρώτο είδος σήμανσης ιχνηθετών που χρησιμοποιήθηκε είναι ο ραδιενεργός φώσφορος ^{32}P και το ραδιενεργό θείο ^{35}S . Μετά την υβριδοποίηση η αποκάλυψη γίνεται είτε με αυτοραδιογραφία είτε με μέτρηση του ραδιενεργού σήματος. Η χρήση ραδιενεργών ιχνηθετών δεν θεωρείται πλέον εύχρηστη, κυρίως λόγω βραχείας ημιζωής των ισotόπων αλλά και για λόγους προστασίας του περιβάλλοντος. Τα τελευταία χρόνια γίνεται χρήση μη ραδιενεργών ουσιών όπως η βιοτίνη, η στρεπταβιδίνη και η διγοξυγενίνη.

Η τεχνολογία των Ιχνηθετών και της Υβριδοποίησης βρήκε ευρύτατη εφαρμογή στην Διαγνωστική Μικροβιολογία και αποτελεί ένα απαραίτητο εργαλείο στην ταχεία διάγνωση, με όλα τα ευεργετικά αποτελέσματα τόσο για τον ασθενή όσο και για τις Εθνικές Οικονομίες. Αποτελέσματα όπως περισσότερο στοχευμένες θεραπείες, μικρότερη παραμονή μολυσματικών ασθενών στους θαλάμους (φυματίωση), είναι μερικά από τα πλεονεκτήματα της εφαρμογής των Ιχνηθετών στην Διάγνωση. Η τεχνολογία των ιχνηθετών έχει εφαρμοσθεί στην ανίχνευση των μυκοβακτηριδίων, για την επιβεβαίωση της καλλιέργειας *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellular*, *M. gordonae*. (¹²², ¹²³)

1.4.3. ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΣΩ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ-Plasmid Typing

Μια από τις αρχικές προσπάθειες για την εφαρμογή μοριακών τεχνικών στην τυποποίηση των μικροοργανισμών είναι η μέθοδος τυποποίησης μέσω πλασμιδίων. (¹²⁴, ¹²⁵, ¹²⁶) Τα πλασμίδια είναι εξωχρωμοσωμικά κινητά γενετικά στοιχεία των μικροοργανισμών. Συνήθως είναι κυκλικά μόρια δίκλωνου DNA, τα οποία συνδέονται με πρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης. Τα πλασμίδια περιέχουν 5 έως 100 γονίδια που δεν είναι κρίσιμα για την επιβίωση του μικροοργανισμού, υπό φυσιολογικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Μπορούν να αποκτηθούν ή να απολεσθούν χωρίς να προκληθεί βλάβη στο μικροβιακό κύτταρο. Υπό ορισμένες συνθήκες τα πλασμίδια αποτελούν πλεονέκτημα για τους μικροοργανισμούς. Τα πλασμίδια πολλές φορές διαθέτουν γονίδια αντίστασης στα αντιβιοτικά, τα λεγόμενα γονίδια αντοχής, αντοχή στα τοξικά μέταλλα, στην παραγωγή τοξινών και στην σύνθεση ενζύμων. Έχουν την δυνατότητα να μεταφέρονται από ένα βακτήριο στο άλλο και το DNA των πλασμιδίων χρησιμοποιείται ευρέως στην βιοτεχνολογία. Η μεταφορά του γενετικού υλικού γίνεται μέσω του μηχανισμού της σύζευξης και τα πλασμίδια που καθοδηγούν την σύζευξη, μεταφέρονται μεταξύ των κυττάρων κατά την διάρκεια της σύζευξης. (¹²⁷) Κατά την μέθοδο ανάλυσης πλασμιδίων, μετά την απομόνωση του DNA των πλασμιδίων, ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και σύγκριση του με πρότυπες ηλεκτροφορήσεις ζώνωσης, το οποίο εξαρτάται από τον αριθμό των πλασμιδίων, το μέγεθος αυτών και το είδος των μικροοργανισμών. Σε ορισμένους μικροοργανισμούς ανευρίσκονται πλασμίδια μεγάλου μεγέθους 100–150kb, καθιστώντας την ηλεκτροφορητική αποτύπωση των πλασμιδίων πολύ δύσκολη. Στις περιπτώσεις αυτές στην μέθοδο προστίθεται στάδιο, κατά το οποίο γίνεται κατεργασία του DNA των πλασμιδίων, με περιοριστικά ένζυμα. Η χρήση των περιοριστικών ενζύμων στην ανάλυση πλασμιδίων είναι αρκετά συνήθης στους σταφυλόκοκκους και εντερόκοκκους, των οποίων τα πλασμίδια είναι μικρότερα από 50kb. Η χρήση των περιοριστικών ενζύμων στην ανάλυση πλασμιδίων αυξάνει την διακριτική ικανότητα της μεθόδου. Η ανάλυση πλασμιδίων

γενικά δεν θεωρήθηκε ιδιαίτερα χρήσιμη μέθοδος μελέτης της συγγένειας των μικροοργανισμών, με εξαίρεση την περίπτωση κατά την οποία, σε μία κατάσταση νοσοκομειακής επιδημίας, από την ανάλυση πλασμιδίων πιστοποιείται η ύπαρξη τουλάχιστον τριών κοινών πλασμιδίων σε στελέχη της επιδημίας. Πρόκειται κυρίως για σταφυλόκοκκους κατά κοαγκουλάση αρνητικούς, την *Klebsiella pneumoniae* και άλλων Gram αρνητικών βακτηριδίων, που με αρκετή σιγουριά τα στελέχη τους μπορούν να χαρακτηριστούν ως συγγενή επιδημιολογικά χωρίς περαιτέρω διερεύνηση. Επίσης η ανάλυση πλασμιδίων είναι σημαντική κυρίως για την εκτίμηση της διασποράς πλασμιδίων και μεταθετονίων (τρανσποζονίων) κατά την διάρκεια μιας επιδημίας, όταν μάλιστα παρατηρείται διασπορά πολυανθεκτικών στελεχών και τα στελέχη αυτά παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο ζώνωσης στην PFGE. (128, 129, 130)

1.5. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ με ενίσχυση του DNA

Στις μοριακές τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί ευρύτατα τα τελευταία χρόνια για την ανίχνευση και την τυποποίηση των μικροοργανισμών, το DNA-στόχος των λοιμογόνων παραγόντων και των κυτταρικών δομών, βρίσκεται συνήθως σε ποσότητες τόσο μικρές, ώστε να μην αποφεύγεται η καλλιέργεια, στις περισσότερες περιπτώσεις. Η ελάχιστη ποσότητα τους ήταν το μόνιμο μειονέκτημα των εκάστοτε μεθόδων τυποποίησης, μοριακών και μη. Ο πολλαπλασιασμός, πολύ μικρών ποσοτήτων νουκλεϊκών οξέων, πριν από μια δοκιμασία ληυβριδοποίησης αποτέλεσε μία διαδικασία που απλουστεύει και διευκολύνει τις δοκιμασίες υβριδοποίησης. Ο πολλαπλασιασμός των νουκλεϊκών οξέων επιτεύχθηκε με την μέθοδο της PCR.

1.5.1. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η **PCR** (**P**olymerase **C**hain **R**eaction) είναι μία βιοχημική *in vitro* αντίδραση, η οποία επιτρέπει την σύνθεση μεγάλου αριθμού αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA-στόχου. (131) Αναπτύχθηκε από τον Kary B. Mullis το 1983 και είναι μία θεμελιώδης και συγχρόνως απλή μέθοδος ενίσχυσης ή αύξησης του αριθμού των ειδικών νουκλεϊκών θραυσμάτων που βρίσκονται σ' ένα δείγμα. Το 1989 κρίθηκε «η μέγιστη επιστημονική ανακάλυψη της χρονιάς». (132) Ο **Kary B. Mullis** τιμήθηκε με το **βραβείο Nobel Χημείας** το **1993**. Μόλις σε λίγα χρόνια και μετά από σημαντικές βελτιώσεις, κυρίως από τον Saiki RK (133) έγινε η πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την ενίσχυση-πολλαπλασιασμό των νουκλεϊκών οξέων, κυρίως του DNA.

Η PCR ως τεχνική κατέστη δυνατή, με την χρήση θερμοανθεκτικής DNA-πολυμεράσης για την ενίσχυση ειδικών τμημάτων DNA μέσα σε ένα δείγμα, όπου υπάρχουν και διαφορετικά μόρια DNA, άσχετα προς το DNA-στόχο. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο η PCR βρήκε θαυμάσια εφαρμογή στην μικροβιολογία τόσο για την τυποποίηση και την επιδημιολογική μελέτη των μικροοργανισμών, όσο και για την βασική έρευνα, η οποία τα τελευταία χρόνια γνωρίζει θεαματική ανάπτυξη. Η PCR χρησιμοποιείται στην ανίχνευση πολύ μικρών ποσοτήτων βακτηρίων ή ιών τόσο σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα όσο και σε δείγματα τροφίμων. Αξιοσημείωτο είναι ότι με την χρήση της PCR, για την ανίχνευση του ιού HIV στο αί-

μα ασθενούς, αρκεί μία αλληλουχία του ιού προς 100.000 ισοδύναμες αλληλουχίες του ανθρώπινου γενώματος. Η ανίχνευση των ειδικών αλληλουχιών του ιού HIV περιορίστηκε σε μερικές ώρες, είτε ως εξωκυττάρια μόρια RNA είτε ως μόρια DNA ενδοκυττάριου προϊόντος, ενώ με την κλασική έρευνα για την καλλιέργεια του ιού απαιτούνταν αρκετές ημέρες και για την ανίχνευση των ειδικών αντισωμάτων αρκετές εβδομάδες, ανάλογα με την πορεία της νόσου. ^(134, 135) Επίσης η παραγωγή των ειδικών ιχνηθετών DNA, σε μεγάλες ποσότητες για τις αντιδράσεις υβριδοποίησης, έγινε εφικτή μέσω της χρήσης της PCR. ^(136, 137)

Τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη των αντιδραστηρίων της PCR σε εμπορικά kits, η αύξηση της σύνθεσης ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων με χαμηλό κόστος, η αύξηση των διαθέσιμων πληροφοριών για ειδικές αλληλουχίες του DNA, μέσω τεχνικών αλληλούχισης (Sequencing), επέτρεψε την επίλυση αρχικών προβλημάτων εφαρμογής της μεθόδου, στα διαγνωστικά και ερευνητικά εργαστήρια.

Μια πολύ ενδιαφέρουσα προσέγγιση της μεθόδου, είναι η χρήση της PCR σε αρχειοθετημένα δείγματα ιστών με παραφίνη, καθώς και η ανάλυση μουσειακών και παλαιοντολογικών δειγμάτων. ^(138, 139) Πρόσφατη προσέγγιση είναι ο πολλαπλασιασμός *in situ* του DNA, σε μονιμοποιημένα κύτταρα και ιστούς. ^(140, 141) Έτσι αποκτώνται γνώσεις της διάταξης των παθογόνων μικροοργανισμών στους ιστούς κατά την διάρκεια της προσβολής. Οι αναδρομικές μελέτες με την χρήση της PCR παρέχουν πληροφορίες για την συχνότητα και την ταυτότητα λοιμωδών νοσημάτων προηγούμενων χρόνων. Η εφαρμογή της PCR, ως ειδικής και ευαίσθητης μεθόδου, γνωρίζει μεγάλη αύξηση τα τελευταία χρόνια και στη μελέτη και ανίχνευση ιών, μυκήτων και παρασίτων. ^(142, 143, 144)

1.5.1.1. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ της PCR

Η πολλαπλή αντιγραφή ή ενίσχυση (amplification) του DNA έχει κεντρική θέση στις διάφορες μελέτες της Μοριακής Βιολογίας και της Γενετικής. Η πολλαπλή αντιγραφή του DNA *in vitro* επικεντρώνεται, στην επιδιωκόμενη αύξηση του αριθμού των αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας του DNA. Για να επιτευχθεί αυτό απαιτείται:

➤ **μία μήτρα**, η οποία είναι η αλληλουχία-στόχος ή DNA-στόχος που πρέπει να ενισχυθεί ή να πολλαπλασιαστεί. Εξαιρετικά σημαντικό σημείο είναι η γνώση της αλληλουχίας του DNA-στόχου.

➤ **μία DNA πολυμεράση**, ένα ένζυμο που θα επιτελέσει τα επαναλαμβανόμενα βήματα πολλαπλασιασμού. Οι DNA πολυμεράσες είναι ένζυμα τα οποία καταλύουν τον πολυμερισμό των ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) μέσα στην αλυσίδα του DNA. Είναι ένζυμα γνωστά για τον ρόλο τους στην αντιγραφή του DNA, όπου η DNA-πολυμεράση «διαβάζει» την άθικτη αλυσίδα DNA, την οποία χρησιμοποιεί ως πρότυπο για την σύνθεση νέας αλυσίδας DNA. Η δράση της πολυμεράσης ασκείται στο 3' άκρο της νέας αλυσίδας και η επιμήκυνση γίνεται στην κατεύθυνση 5' - 3'. Καμία από τις γνωστές πολυμεράσες δεν έχουν την δυνατότητα να δημιουργήσουν *de novo* DNA. Οι πολυμεράσες μπορούν να προσθέσουν νουκλεοτιδία μόνο σε προϋπάρχον 3' - OH άκρο, με απαραίτητη την παρουσία αρχικών ολιγονουκλεοτιδίων. Στην βιολογική δράση αρκετών πολυμερασών, όχι όλων, συμπεριλαμβάνεται και η επιδιόρθωση των λαθών κατά την διάρ-

κεια της αντιγραφής του DNA. Η δράση αυτή καλείται *proofreading* (διόρθωση κειμένου). Οι πολυμεράσες κατατάσσονται, με βάση την ομολογία που παρουσιάζουν οι αλληλουχίες τους, σε οικογένειες A, B, C, D, X, Y και RT, ενώ με βάση την προέλευση τους σε προκαρυωτικές (Pol I, II, III, IV, V) και ευκαρυωτικές (Pol α , β , γ , δ , ϵ , κ) DNA πολυμεράσες. Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι στην οικογένεια A ανήκουν οι *Escherichia coli* DNA pol I, *Thermus aquaticus* DNA pol I και *Bacillus stearothermophilus* DNA pol I. ⁽¹⁴⁵⁾

➤ **αλληλουχίες πολλαπλασιασμού ή εκκινητές (*primers*)** είναι ολιγονουκλεοτίδια που συνδέονται με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες πριν και μετά από το DNA-στόχο και λειτουργούν ως σημείο εκκίνησης της σύνθεσης των αντιγραφόμενων κλώνων του DNA. Για τον σχεδιασμό των εκκινητών λαμβάνονται υπ' όψιν κάποιοι κανόνες, ώστε να αποφεύγονται λάθη ή ενίσχυση μη επιθυμητών αλληλουχιών.

➤ **νουκλεοτίδια (dNTPs)**, πρόκειται για ελεύθερα 5' τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια, (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), τα οποία είναι απαραίτητα για την σύνθεση νέων κλώνων από την DNA πολυμεράση. Η μέθοδος εξελίσσεται σε κύκλους αντιδράσεων, όπου σε κάθε κύκλο αντίδρασης, η ολοκλήρωση του προηγούμενου σταδίου αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την ικανοποιητική ολοκλήρωση του επομένου.

Ένας κύκλος PCR περιλαμβάνει τρία στάδια: **(Εικόνα 12)**

α) Στάδιο αποδιάταξης (*denaturation*) του DNA, που λαμβάνει χώρα με θέρμανση του μίγματος μέχρι περίπου στους 95°C, για την αποδιάταξη τόσο του DNA-στόχου, όσο και των εκκινητών που πρέπει να βρίσκονται σε μονόκλωνη μορφή.

β) Στάδιο ανασύνδεσης ή υβριδισμού (*annealing*) των εκκινητών, όπου λαμβάνει χώρα αντίδραση υβριδισμού μεταξύ των εκκινητών και των συμπληρωματικών τμημάτων του DNA-στόχου. Κατά την διάρκεια του σταδίου ανασύνδεσης, το μίγμα ψύχεται σε θερμοκρασία που κυμαίνεται από 40°C έως 70°C, ανάλογα με το πρωτόκολλο. Στο στάδιο αυτό, ο ένας εκκινητής υβριδοποιείται στο 3'-άκρο της συμπληρωματικής αλληλουχίας-στόχου του ενός κλώνου, ενώ ο άλλος εκκινητής υβριδοποιείται στο 3'-άκρο της συμπληρωματικής αλληλουχίας-στόχου του άλλου κλώνου.

γ) Στάδιο επιμήκυνσης (*extension*) όπου λαμβάνει χώρα συνεχής επιμήκυνση των εκκινητών με προσθήκη των ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs), συμπληρωματικών προς την αλληλουχία-στόχο. Η διαδικασία επιμήκυνσης επιτελείται από μία DNA πολυμεράση. Η συνήθης θερμοκρασία του σταδίου επιμήκυνσης είναι περίπου 72°C. Μετά από κάθε κύκλο σύνθεσης, το DNA θερμαίνεται έτσι ώστε να αποδιαταχθεί ξανά και να βρίσκεται σε μονόκλωνη μορφή. Κάθε νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA, λειτουργεί ως πρότυπο για την σύνθεση επόμενων αλυσίδων. Θεωρητικά με την συμπλήρωση του πρώτου κύκλου έχουμε διπλασιασμό του DNA-στόχου και ο πολλαπλασιασμός εξελίσσεται εκθετικά.

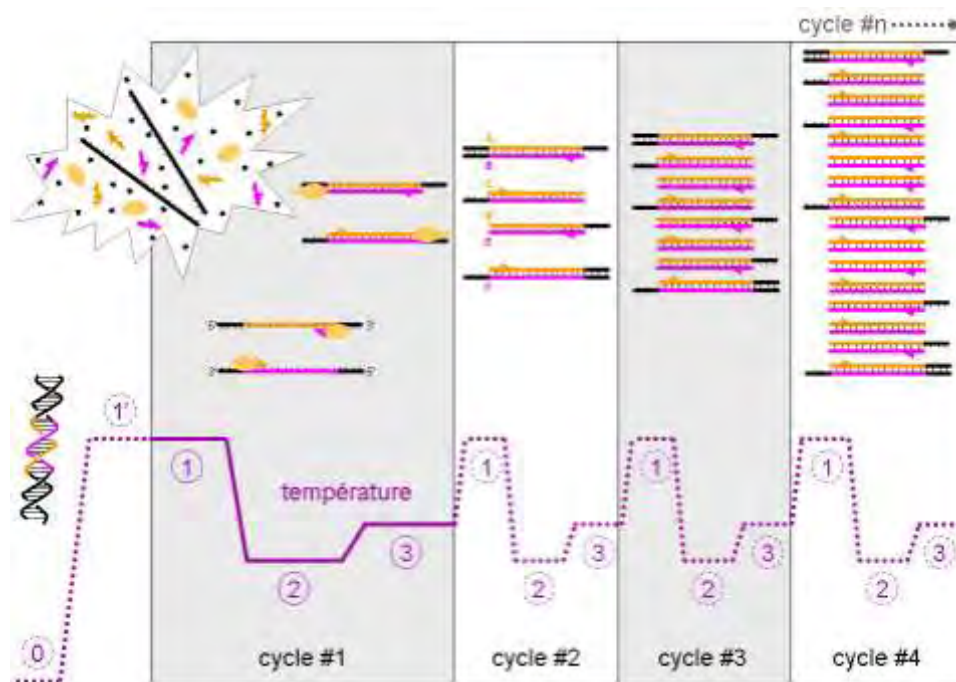
Ένα τυπικό πρωτόκολλο PCR, περιλαμβάνει 30-40 θερμικούς κύκλους. ^(146, 147) Κατά την διάρκεια των θερμικών κύκλων οι αντιδράσεις επέκτασης ενός εκκινητή καταλήγουν σε διαφορετικές αποστάσεις από την αρχή του κάθε εκκινητή, με αποτέλεσμα στα προϊόντα πολλαπλασιασμού να περιέχονται εκτός του DNA-στόχου και έλικες DNA με απροσδιόριστο μήκος (μη ειδικό προϊόν PCR).

Μετά τον δεύτερο κύκλο όμως έχουμε την συσσώρευση ενός ειδικού προϊόντος πολλαπλασιασμού, το οποίο περιλαμβάνει μόνο την αλληλουχία-στόχο και γίνεται συν το χρόνο το

κυρίαρχο προϊόν. Πρόκειται για το προϊόν της PCR, το λεγόμενο **amplicon**. Κάθε φορά που συμπληρώνεται ένας κύκλος, θεωρητικά διπλασιάζεται η αλληλουχία του DNA-στόχου, με αποτέλεσμα να έχουμε εκθετική αύξηση του ειδικού προϊόντος.

Αρχικά για τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό των ειδικών εκκινητών, κατά το δεύτερο σταδίο επέκτασης των εκκινητών, χρησιμοποιήθηκε η DNA pol I, η οποία απομονώθηκε από την *Escherichia coli*. Η πολυμεράση αυτή απεδείχθη εξαιρετικά ευάλωτη στους 95°C, και γρήγορα καταστρεφόταν. Σε κάθε κύκλο έπρεπε να προστίθεται και νέα ποσότητα του ενζύμου.

Η διεργασία της PCR διευκολύνθηκε πολύ με την ανακάλυψη και χρήση θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών, (των πολυμερασών **Taq** και **Pfu**) που είναι ανθεκτικές στην θερμοκρασία αποδιάταξης του DNA και διατηρούν την λειτουργία τους. Οι θερμοανθεκτικές πολυμεράσες απομονώθηκαν από μικροοργανισμούς που ζουν σε θερμές πηγές και πίδακες ζεστού νερού και ατμού. Το ένζυμο *Taq* πολυμεράση, (μία DNA pol I) απομονώθηκε από ένα θερμόφιλο βακτήριο, το *Thermus aquaticus* (**Taq**) που ζει σε θερμές πηγές με μέση θερμοκρασία 70°C έως 75°C. Θεωρείται ένα "θαυματουργό ένζυμο", με δραστηριότητα 800bp/min στους 75°C και διάρκεια ημιζωής 40 λεπτά στους 95°C, με αποτέλεσμα να αντέχει σε συνεχείς αυξομειώσεις της θερμοκρασίας κατά την διάρκεια των επαναλαμβανόμενων θερμικών κύκλων της PCR.



Εικόνα 12. Σχηματική παράσταση των επαναλαμβανόμενων θερμικών κύκλων σε μία αντίδραση ενίσχυσης του DNA με την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης. **1η φάση:** αποδιάταξη (denaturation), **2η φάση:** ανασύνδεση εκκινητών (annealing) **3η φάση:** επιμήκυνση (extension)

Με την χρήση της *Taq* πολυμεράσης, απλουστεύεται η διαδικασία, διότι το ένζυμο προστίθεται μαζί με τα υπόλοιπα αντιδραστήρια του πρωτοκόλλου. Επί πλέον η εκτέλεση των αντιδράσεων ανασύνδεσης και επέκτασης σε υψηλότερες θερμοκρασίες μειώνει τον πολλαπλασιασμό των μη ειδικών προϊόντων. ⁽¹⁴⁸⁾ Ένα πρόβλημα με την πολυμεράση *Taq* είναι ότι δεν διαθέτει μηχανισμό διορθωτικής ανάγνωσης, συνεπώς κάνει περισσότερα λάθη απ' ότι το ένζυμο της *Escherichia coli*. Η χρήση της DNA πολυμεράσης **Pfu** του υπερθερμόφιλου

Αρχαίου *Pyrococcus furiosus* (άριστη θερμοκρασία αύξησης, 100^o C) είναι επίσης πολύ διαδεδομένη και διαθέτει ακόμη μεγαλύτερη θερμική σταθερότητα από την πολυμεράση *Taq*. Η πολυμεράση *Pfu* διαθέτει μηχανισμό διορθωτικής ανάγνωσης, κάτι που την καθιστά ένζυμο πρώτης επιλογής σε περιπτώσεις που απαιτείται μεγάλη πιστότητα.

Επειδή η τεχνική PCR περιλαμβάνει έναν μεγάλο αριθμό επαναλαμβανόμενων βημάτων αυτό είχε ως αποτέλεσμα την αυτοματοποίηση της όλης διαδικασίας της PCR, με την δημιουργία θερμικών κυκλοποιητών και δυνατότητα προγραμματισμού διαφόρων πρωτοκόλλων, έτσι ώστε μετά από προγραμματισμό των επιθυμητών θερμοκρασιών και χρόνων, η διαδικασία να εκτελείται αυτόματα, χωρίς την παρέμβαση του χειριστή ή την ανάγκη προσθήκης αντιδραστηρίων. Για την αντιμετώπιση της ζήτησης θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης στα πλαίσια της αναπτυσσόμενης εμπορικής χρήσης της PCR και των μεθόδων αλληλούχισης του DNA, τα γονίδια των αντίστοιχων ενζύμων κλωνοποιήθηκαν στην *Escherichia coli* και έγινε δυνατή η παραγωγή τους σε μεγάλες ποσότητες. Έτσι τώρα το κόστος της μεθόδου PCR αποτελεί κλάσμα μόνο του κόστους που είχε η τεχνική αυτή όταν πρωτοαναπτύχθηκε.

1.5.1.2. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ της PCR

Η PCR έχει τρία κύρια **πλεονεκτήματα** σε σχέση με την κλωνοποίηση του DNA σε κύτταρα:

➤ **χρόνος:** με την χρήση της PCR μπορούν να παραχθούν περισσότερα από 10⁵ αντίγραφα ενός τμήματος του DNA, μέσα σε λίγες ώρες. Το στάδιο της αποδιάταξης διαρκεί 1 λεπτό, το στάδιο ανασύνδεσης των εκκινητών 3-5 λεπτά και το στάδιο επιμήκυνσης 1-5 λεπτά. Έτσι για περίπου 30 κύκλους μιας αντίδρασης PCR απαιτούνται 3-6 ώρες. Η κλωνοποίηση σε κύτταρα έχει μεγαλύτερο κόστος και απαιτεί μέρες ή και βδομάδες για την παραγωγή του ίδιου αριθμού αντιγράφων.

➤ **ισχύς:** η PCR έχει την δυνατότητα να πολλαπλασιάζει τμήματα του DNA, που έχουν υποστεί εκτεταμένη αποικοδόμηση λόγω της επίδρασης του χρόνου, ή άλλων στοιχείων ή βρίσκονται σε θέσεις μη προσπελάσιμες π.χ. ιστούς μονιμοποιημένους σε φορμαλίνη.

➤ **ευαισθησία:** η PCR παράγει αντίγραφα του DNA-στόχου σε ποσότητες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν εάν στο μίγμα υπάρχει, τουλάχιστον θεωρητικά, έστω και ένα αντίγραφο αυτού. Έχουν αναπτυχθεί πρωτόκολλα για τον πολλαπλασιασμό ενός DNA-στόχου που προέρχεται από ένα μόνο κύτταρο. Η ευαισθησία είναι που κατέστησε την PCR να έχει τόσες πολλές εφαρμογές σε ένα ευρύ φάσμα επιστημών.

Παρά τα ελκυστικά χαρακτηριστικά της η PCR δεν είναι μέθοδος αφεγάδιαστη και ανάλογα με την εφαρμογή της, πολλές φορές η απόδοση της κρίνεται μη αποδεκτή για τον πολλαπλασιασμό του DNA. Οι **περιορισμοί της PCR** εντοπίζονται στα σημεία:

➤ **στην αλληλουχία-στόχο:** είναι απαραίτητη η ακριβής γνώση της αλληλουχίας-στόχου, ώστε να συντεθούν οι εκκινητές. Αυτό σημαίνει ότι πολλές φορές απαιτείται προηγουμένως η κλωνοποίηση σε κύτταρα, τουλάχιστον για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας στα όρια του DNA-στόχου. Ένας επίσης σημαντικός περιορισμός της αποτελεί το μέγεθος των DNA-στόχων, που μπορούν να ενισχυθούν με αξιοπιστία. Στις αλληλουχίες με μέγεθος έως 5kb η ενίσχυση θεωρείται γενικά αξιόπιστη, καλύτερα όμως ενισχύονται αλληλουχίες με

μήκος 200-1000 βάσεων. Ωστόσο πρόσφατα αναπτύχθηκαν πρωτόκολλα για την ενίσχυση μεγαλύτερων τμημάτων, η «PCR μεγάλου μήκους» (*long PCR*), που επιτρέπει τον χειρισμό μεγάλων τμημάτων μεγέθους 20kb ή και περισσότερων.

➤ **στην δράση της *Taq* πολυμεράσης:** η ακρίβεια της δράσης της *Taq* πολυμεράσης η οποία περιλαμβάνει, σε ποσοστό έως και 40% των νεοσυντεθέντων κλώνων, κάποιο σφάλμα στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων που εισάγονται από αυτή. Αυτό οφείλεται στην έλλειψη μηχανισμού *proofreading* (διόρθωση κειμένου). Συνήθως πρόκειται για αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου. Επομένως το τελικό μίγμα της αντίδρασης θα περιέχει μεγάλο ποσοστό αντιγράφων τα οποία είναι σχεδόν όμοια, αλλά όχι απολύτως όμοια μεταξύ τους. Κατ' ανάλογο τρόπο πολλαπλασιάζονται και οι επιμολύνσεις του DNA-στόχου, που δεν επιθυμούμε να πολλαπλασιαστούν.

➤ **στους εκκινητές:** πρέπει να έχουν μήκος 20-30 νουκλεοτίδια, (για την ενίσχυση DNA πλασμιδίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν βραχύτεροι εκκινητές). Η αλληλουχία των εκκινητών δεν πρέπει να περιλαμβάνει επαναλήψεις νουκλεοτιδίων σε σειρά (π.χ. του τύπου CACACACA) κυρίως λόγω της συχνής παρουσίας τους στο γονιδίωμα, με αποτέλεσμα να μειώνεται η ειδικότητα της πολλαπλής αντιγραφής. Επίσης θα πρέπει να διασφαλίζεται η απουσία συμπληρωματικότητας μεταξύ των εκκινητών, γιατί το αντίθετο μειώνει την αποδοτικότητα της πολλαπλής αντιγραφής.⁽¹⁴⁹⁾

1.6. ΆΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ του DNA εκτός PCR

Πλην της κλασσικής αντίδρασης ενίσχυσης των ειδικών αλληλουχιών του DNA με PCR, αναπτύχθηκαν και άλλες τεχνικές ενίσχυσης οι οποίες δεν στηρίζονται στην χρήση θερμοανθεκτικής πολυμεράσης. Η ανάπτυξη των μεθόδων αυτών επετεύχθη τα τελευταία χρόνια και αποδείχθηκαν εξαιρετικά χρήσιμα στην Διαγνωστική Μικροβιολογία.

Οι κυριότερες από αυτές είναι:

ο **ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΛΙΓΑΣΗΣ LCR** (*Ligase Chain Reaction*)

Η αλυσιδωτή αντίδραση λιγάσης ή όπως διαφορετικά λέγεται δοκιμή πρόσθεσης λιγάσης, ^(150, 151) είναι επίσης μία τεχνική για την ανίχνευση ή ενίσχυση μιας αλληλουχίας-στόχου.

Όπως και η PCR η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε επαναλαμβανόμενους κύκλους, των τριών σταδίων: στάδιο αποδιάταξης (denaturation), στάδιο υβριδισμού (annealing) των ολιγονουκλεοτιδίων (probes), και στάδιο σύνδεσης των ολιγονουκλεοτιδίων (ligation). Όπως και στην PCR, κρίσιμο σημείο της αντίδρασης είναι η γνώση της αλληλουχίας-στόχου που πρόκειται να αναγνωρισθεί ή ενισχυθεί. Αλλαγή έστω και μιας βάσης στο σημείο δράσης της λιγάσης, μπορεί να ακυρώσει την σύνδεση των ολιγονουκλεοτιδίων. Αντίθετα από την PCR η οποία ενισχύει την αλληλουχία του DNA-στόχου, με την χρήση εκκινητών και μεμονωμένων νουκλεοτιδίων, η LCR αλυσιδωτή αντίδραση λιγάσης χρησιμοποιεί μια θερμοανθεκτική λιγάση για να ενώσει δύο ολιγονουκλεοτίδια τα οποία βρίσκονται το ένα ακριβώς δίπλα στο άλλο, στην αλληλουχία-στόχο. ^(152, 153)

ο **ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ TAS και NASBA**

Βασιζόμενα στην μεταγραφή **TAS** (*Transcription Based Amplification Systems*) και τα Συστήματα Ενίσχυσης βασιζόμενα στην αλληλουχία των νουκλεϊκών οξέων **NASBA** (**N**ucleic **A**cid **S**equen**B**-**A**mplification).

Τόσο η **τεχνική TAS**, όσο και η **τεχνική NASBA** διέπονται από την ίδια αρχή και τα τελευταία χρόνια υπάρχουν διαθέσιμα εμπορικά kits. Εν συντομία απαιτείται η δράση τριών ενζύμων, της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT), μιας RNaseH και της T7 DNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης. Ένα ολιγονουκλεοτίδιο που περιέχει αλληλουχία-υποκινητή στο 5' άκρο, για την RNA πολυμεράση, χρησιμοποιείται από κοινού με την αντίστροφη μεταγραφάση για την δημιουργία cDNA. Μετά την αποδιάταξη ένα δεύτερο ολιγονουκλεοτίδιο, συμπληρωματικό του υποκινητή της RNA πολυμεράσης, ανασυνδέεται στην έλικα του DNA. Στην συνέχεια προστίθεται αντίστροφη μεταγραφάση για την σύνθεση διπλής έλικας DNA (dsDNA). Με την επανάληψη των κύκλων αυτών και την χρήση της RNA πολυμεράσης μπορούν να παραχθούν 10-10000 αντίγραφα RNA. Αν και είναι λιγότερο ισχυρή σε σχέση με την PCR, ωστόσο διαθέτει τεχνικά προσόντα τα οποία την καθιστούν ελκυστική εναλλακτική επιλογή. Λειτουργεί σε συνθήκες ισοθερμικές και το κυριότερο, η όλη διαδικασία γίνεται σε ένα σωληνάριο, ελαχιστοποιώντας τον κίνδυνο επιμόλυνσης. Με την εφαρμογή των τεχνικών αυτών κατέστη δυνατή η μελέτη των RNA ιών και σε μικρότερο βαθμό η μελέτη των rRNA-στόχων των παθογόνων βακτηρίων και μυκήτων.

ο **ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ Qb ρεπλικάσης**

Η μέθοδος ενίσχυσης με την χρήση της Qb ρεπλικάσης αντλεί το όνομα από το ένζυμο ρεπλικάση του βακτηριοφάγου Qb. Πρόκειται για μία πολυμεράση, (ειδική του φάγου Qb), η οποία έχει την ιδιότητα να κατευθύνει την ενίσχυση του RNA, από ένα RNA-στόχο. ⁽¹⁵⁴⁾ Ως τεχνική είναι παρόμοια της PCR, με την διαφοροποίηση ότι η ενίσχυση του RNA χρησιμοποιείται για την ανίχνευση αυτού, παρά για την ποσοτική του ενίσχυση.

1.6. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ-ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ της PCR

Μέσα από την ευρεία εφαρμογή της PCR στην Διαγνωστική Μικροβιολογία, έγιναν πολλές τροποποιήσεις της βασικής αντίδρασης της μεθόδου με απώτερο σκοπό την βελτιστοποίηση της ειδικότητας και της ευαισθησίας της τεχνικής. Με τις διάφορες παραλλαγές της PCR, έγινε εφικτή η χρήση της σε ένα ευρύτατο φάσμα ανίχνευσης μικροοργανισμών. ⁽¹⁵⁵⁾

Μεταξύ των παραλλαγών της βασικής τεχνικής που χρησιμοποιούνται στην Έρευνα και την Διαγνωστική είναι:

- Multiplex-PCR
- AFLP (**A**mplified **F**ragment **L**ength **P**olymorphism)
- Διπλή ή Εμφωλεάζουσα PCR (Nested PCR)
- Ευρέος φάσματος PCR (Broad-range PCR)
- Repetitive-elements PCR system
- Real Time PCR

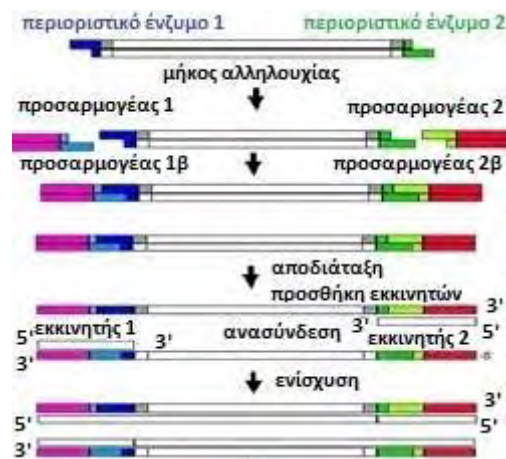
1.6.1. Multiplex-PCR

Η ανάγκη να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα της PCR και συγχρόνως να μειωθεί το κόστος της αντίδρασης, σε αυτή την παραλλαγή της PCR, χρησιμοποιούνται αντί του ενός ζεύγους εκκινητών, πολλαπλά ζεύγη εκκινητών για πολλαπλούς DNA-στόχους στην ίδια αντίδραση. (156, 157)

Το κρίσιμο σημείο αυτής της τεχνικής είναι ο σχεδιασμός των πολλαπλών ζευγών των εκκινητών, οι οποίοι θα πρέπει να έχουν παρόμοια έως ίδια θερμοκρασία στο στάδιο ανασύνδεσης (annealing), ώστε να είναι δυνατή η απαιτούμενη αντίδραση. Το δεύτερο σημαντικό σημείο στον σχεδιασμό του πρωτοκόλλου, είναι τα τμήματα του DNA-στόχου που πρόκειται να ενισχυθούν, να έχουν διαφορετικό μέγεθος βάσεων, ώστε το παραγόμενο προϊόν να είναι ορατό στην ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR. Μειονέκτημα της μεθόδου είναι η πιθανή αντίδραση μεταξύ των ζευγών των εκκινητών μεταξύ τους, κυρίως όσο αυξάνεται ο αριθμός των εκκινητών.

1.6.2. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Η AFLP είναι μία μέθοδος τυποποίησης η οποία αξιοποιεί τον συνδυασμό της χρήσης των περιοριστικών ενζύμων και της PCR. (158, 159, 160) Η διαδικασία της μεθόδου περιλαμβάνει κατ' αρχήν την τομή του DNA με δύο ενδονουκλεάσες, εκ των οποίων η μία ενδονουκλεάση τέμνει, «κόβει» με μεγαλύτερη συχνότητα από την άλλη. Η στρατηγική αυτή παράγει έναν μεγάλο αριθμό τμημάτων DNA.



Εικόνα 13. Μετά την τομή του DNA με δύο διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα, στην επόμενη φάση λαμβάνουν μέρος μόνο τα τμήματα του DNA του οποίου τα άκρα αναγνωρίστηκαν και από τα δύο ένζυμα. Μέσω λιγάσης προστίθενται οι προσαρμογείς 1 και 2, που με τις αλληλουχίες αναγνώρισης αποτελούν τις συμπληρωματικές αλληλουχίες των εκκινητών 1 και 2 για την ενίσχυση των συγκεκριμένων τμημάτων DNA.

Μόνο ένα ειδικό υποσύνολο των τμημάτων αυτών χρησιμοποιείται για την απομόνωση και την ταυτοποίηση στην επόμενη φάση της μεθόδου που είναι η PCR. Αυτό το ειδικό υποσύνολο δημιουργείται με την τελική ένωση των ειδικών τμημάτων και ένα ολιγονουκλεοτίδιο-προσαρμογής (adapter sequence), μέσω μιας λιγάσης, επεκτείνοντας την ήδη γνωστή

αλληλουχία των τμημάτων με μία εκ των προτέρων γνωστή αλληλουχία του προσαρμογέα. Χρησιμοποιούνται δύο προσαρμογείς για έναν DNA-στόχο.

Ο σχεδιασμός των εκκινητών της εκλεκτικής PCR, γίνεται με βάση την γνωστή αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδίων-προσαρμογέων ώστε να επιτυγχάνεται αυστηρός υβριδισμός στο στάδιο ανασύνδεσης των εκκινητών (annealing) της εκλεκτικής PCR.

1.6.3. Διπλή ή Εμφωλεάζουσα PCR (Nested PCR)

Η ανάγκη για εξαιρετικά ειδική και ευαίσθητη PCR, είχε ως αποτέλεσμα τον σχεδιασμό της διπλής ή εμφωλεάζουσας PCR. Το πρωτόκολλο της μεθόδου περιλαμβάνει δύο ζεύγη εκκινητών. Με το πρώτο ζεύγος των εκκινητών (amplified primers) ενισχύεται η αλληλουχία-στόχος, ενώ το δεύτερο ζεύγος των εκκινητών (sequencing primers), στοχεύει σε μία εσωτερική αλληλουχία του στόχου και λειτουργεί μόνο στα ενισχυμένα τμήματα όπου η αλληλουχία είναι απολύτως ακριβής. Έτσι αυξάνεται η ακρίβεια της αρχικής PCR. Το τελικό αποτέλεσμα διακρίνεται για την υψηλού βαθμού ακρίβεια, ειδικότητα και ευαισθησία. Ίσως το μόνο μειονέκτημα της διπλής PCR αποτελεί η πιθανή επιμόλυνση από τους πρόσθετους χειρισμούς των δειγμάτων. Η Nested PCR χρησιμοποιείται με επιτυχία για την ανίχνευση μικροοργανισμών που βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες στο αίμα και ιστούς, όπως στις λοιμώξεις που οφείλονται σε *Bartonella* και *Rickettsia*. ^(161, 162)

1.6.4. Ευρέος φάσματος PCR (Broad-range PCR)

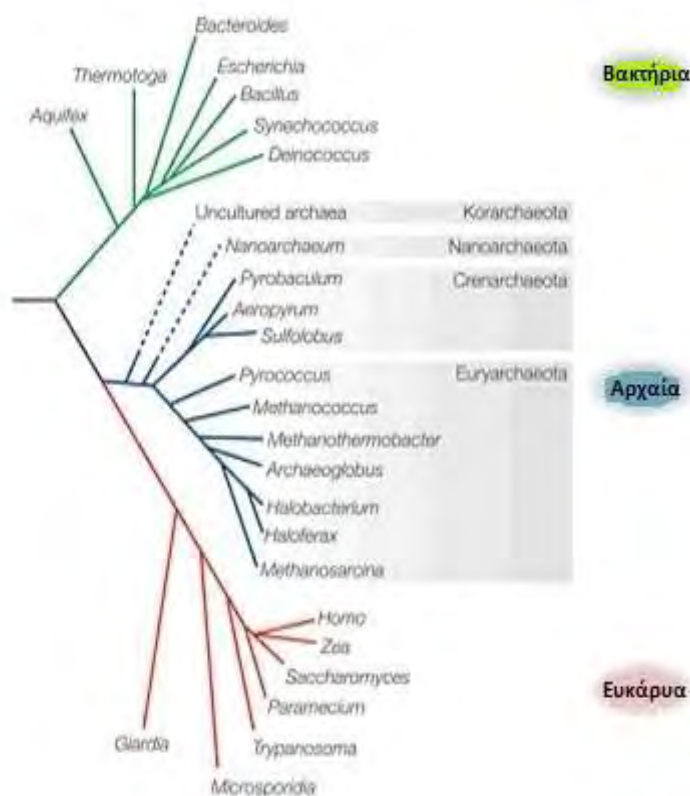
Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα της PCR θεωρείται η μοναδικότητα της αλληλουχίας του DNA-στόχου. Στις περισσότερες των περιπτώσεων είναι επιθυμητή και κυρίως αναγκαία αυτή η μοναδικότητα των εκκινητών σε επίπεδο είδους, για την αποφυγή διασταυρούμενων αντιδράσεων με άλλα συγγενικά είδη. Σε ορισμένες όμως περιπτώσεις θεωρήθηκε αναγκαίο και προτάθηκε ένα σύστημα τυποποίησης, που να στηρίζεται στην PCR και να ανιχνεύει μία ευρεία ομάδα μικροοργανισμών, επιλύοντας έτσι διάφορα διαγνωστικά προβλήματα σε επείγουσες κυρίως καταστάσεις, αλλά και για την τυποποίηση απαιτητικών μικροβίων ή και εκείνων που δεν καλλιεργούνται στο εργαστήριο. Η ευρέος φάσματος PCR αναπτύχθηκε ακριβώς γι' αυτό τον σκοπό και ως μόρια-στόχοι χρησιμοποιούνται οι αλληλουχίες των ριβοσωματικών RNA (rRNA). Οι αλληλουχίες του rRNA είναι εξαιρετικά συντηρημένες με πληροφορίες φυλογενετικής φύσης. Μετά από πειράματα, το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στις αλληλουχίες των υπομονάδων των προκαρυωτικών rRNA. Γενικά τα μόρια RNA που παράγονται στα προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα είναι μονόκλινα μόρια. Παρ' όλο που τα RNA είναι μονόκλινα, έχουν την τάση να σχηματίζουν μεγάλου βαθμού αναδιπλώσεις προς δευτεροταγείς δομές, που είναι πολύ σημαντικές για την λειτουργία τους. ⁽¹⁶³⁾ Οι δευτεροταγείς αυτές δομές, από τις οποίες η πλέον σημαντική είναι η δομή "θηλιάς-φουρκέτας" (hairpin loop), είναι αποτέλεσμα του σχηματισμού ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων σ' ένα μόνο μόριο RNA. Το rRNA συντίθενται ως ένα πρωτογενές μετάγραφο RNA, το οποίο υφίσταται επεξεργασία (ωρίμανση) σε επιμέρους υπομονάδες ριβοσωμάτων με διαφορετικό μέγεθος για τα ευκαρυωτικά και προκαρυωτικά κύττα-

ρα. Το διαφορετικό μέγεθος των υπομονάδων, αντανακλάται στην διαφορετική ταχύτητα καθίζησης στην υπερφυγόκεντρο (μονάδες S, Svedbergs). Τα μόρια rRNA συνδέονται με ειδικές πρωτεΐνες σχηματίζοντας τις δύο υπομονάδες του ριβοσώματος, την μεγάλη και μικρή υπομονάδα, που παρέχουν τον βασικό μηχανισμό με τον οποίο επιτελείται η σύνθεση των πρωτεϊνών του κυττάρου. Οι διαφορές των προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών rRNAs φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

	rRNA	Υπομονάδα	Μέγεθος	Ριβόσωμα
Προκαρυωτικά	23S, 5S	μεγάλη	50S	70S
	16S	μικρή	30S	
Ευκαρυωτικά	28S, 5.8S	μεγάλη	60S	80S
	18S	μικρή	40S	

Πίνακας 1. Διαφορές προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών rRNAs.

Βάσει της μελέτης της ομολογίας των αλληλουχιών των προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών rRNAs, κατέστη δυνατή η ταξινόμηση των διαφόρων οργανισμών. Οι οργανισμοί ταξινομούνται, αναλογα του κυτταρικού τους τύπου, σε τρεις Επικράτειες (Domain): την Επικράτεια των Βακτηρίων, των Αρχαίων και των Ευκαρυωτικών.



Εικόνα 14. Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των τριών Επικρατειών

Δεδομένου ότι τα ριβοσώματα υπάρχουν σε όλα τα κύτταρα, χρησιμοποιούνται στις μελέτες των φυλογενετικών σχέσεων των μικροοργανισμών. ⁽¹²⁷⁾

Εκτός από τα rRNAs, οι τρεις Επικράτειες διαφέρουν στη δομή των λιπιδίων της μεμβράνης, στα μόρια του tRNA και την ευαισθησία στα αντιβιοτικά.

Σε ότι αφορά την ανάπτυξη της ευρέος φάσματος PCR, τα πειράματα επικεντρώθηκαν στην αλληλουχία του οπερονίου του rRNA και ειδικότερα των γονιδίων **16S** της μικρής υπομονάδος του ριβοσώματος και **23S** της μεγάλης υπομονάδος.



Εικόνα 15. Γραφική αναπαράσταση του οπερονίου rRNA. Οι κωδικοποιούσες αλληλουχίες οργανώνονται σε τρεις διακριτές αλληλουχίες: με **16S** να κωδικοποιεί για την μικρή ριβοσωματική υπομονάδα, ενώ οι **23S** και **5S** κωδικοποιούν για την μεγάλη υπομονάδα.

Αναπτύχθηκαν εκκινητές με αλληλουχία-στόχο rRNA ή DNA. (^{164, 165, 166, 167}) Τα γονίδια του οπερονίου rRNA περιλαμβάνουν περιοχές υψηλά συντηρημένες, κατάλληλες για εφαρμογή της ευρέος φάσματος PCR σε επίπεδο γένους, ενώ περιοχές μεταβαλλόμενες (διαγονιδιακές περιοχές) χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση μικροοργανισμών σε επίπεδο είδους.

Ειδικότερα το **γονίδιο 16S** εμφάνισε αξιοσημείωτη σταθερότητα κατά την διάρκεια της εξέλιξης, σωρεύοντας ελάχιστες μεταλλάξεις και έχει όλα εκείνα τα χαρακτηριστικά, για να ονομάζεται από τους ερευνητές "γονίδιο χρονοκάψουλα" ή "καθολικό" ή και "παγκόσμιο γονίδιο". Για τον σχεδιασμό παγκόσμιων εκκινητών χρησιμοποιούνται αυτές οι υπερσυντηρημένες αλληλουχίες του γονιδίου που βρίσκονται σε όλα τα βακτήρια. Η εφαρμογή αυτής της μεθόδου συνέβαλλε στην ανίχνευση των αιτίων της βακτηριακής μηνιγγίτιδας, ενδοκαρδίτιδας, λοιμώξεων αίματος και μυκοβακτηριδίων. (^{168, 169, 170, 171, 172, 173, 174})

Σχετικά πρόσφατα, το ενδιαφέρον των ερευνητών εστίαστηκε στην αλληλουχία του οπερονίου rRNA, το οποίο βρίσκεται μεταξύ των γονιδίων **16S** και **23S**. Ο σχεδιασμός των εκκινητών στοχεύει στις υπερσυντηρημένες αλληλουχίες των γονιδίων **16S** και **23S** με σκοπό την ενίσχυση της διαγονιδιακής περιοχής του οπερονίου. Αυτό το τμήμα χαρακτηρίζεται από μεταβλητότητα ειδική του γένους των βακτηρίων. (¹⁷⁵)

Εκτός του γονιδίου **16S** του rRNA, στόχος της μεθόδου αποτέλεσε και η μεγάλη υπομονάδα των ριβοσωματίων, ειδικότερα το **γονίδιο 23S**. Οι Anthony *et al* (¹⁷⁶) παρατήρησαν μεγαλύτερη μεταβλητότητα του γονιδίου **23S** (σε σχέση με το γονίδιο **16S**) μεταξύ των παθογόνων ειδών ενός γένους, κυρίως εκείνων που αφορούν τις λοιμώξεις του ανθρώπου.

Μολονότι το γονίδιο **16S** χρησιμοποιήθηκε με μεγάλη επιτυχία στην τυποποίηση πολλών μικροοργανισμών, σε ορισμένα βακτήρια η διακριτική ικανότητα του **16S** δεν είναι επαρκής για την τυποποίηση, όπως στις περιπτώσεις των *Burkholderia cenocepacia* και *B. Multivorans*. Στις περιπτώσεις αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί ως στόχοι της μεθόδου άλλα γονίδια που διαθέτουν συντηρημένες και μεταβαλλόμενες περιοχές. Τέτοιοι εναλλακτικοί στόχοι απετέλεσαν τα γονίδια της RNA πολυμεράσης, της πρωτεΐνης θερμικού σοκ (heat-shock protein, HSP), και του παράγοντα επιμήκυνσης Tu (*tuf*). (^{177, 178})

Στα πλεονεκτήματα της εφαρμογής της μεθόδου είναι η δυνατότητα με μία μόνο PCR να ανιχνεύονται όλα τα μέλη μιας μεγάλης ομάδος μικροοργανισμών που ανήκουν στο ίδιο γένος. Μειονέκτημα βεβαίως αποτελεί η κάθε είδους πιθανή επιμόλυνση των δειγμάτων, δημιουργώντας προβληματισμούς στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. ^(179, 180) Η ανάλυση των αποτελεσμάτων μπορεί να γίνει με αλληλούχιση των νουκλεοτιδίων, με υβριδισμό ή με χρήση μικροσυστοιχιών DNA.

1.6.5. ΣΥΣΤΗΜΑ PCR ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ του DNA

(Repetitive-elements PCR system)

Σε πολλά είδη μικροοργανισμών παρατηρούνται επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA, οι οποίες βρίσκονται σε όλο το μήκος του γονιδιώματος του μικροοργανισμού. Χρησιμοποιώντας αυτές τις επαναλήψεις για τον σχεδιασμό των εκκινητών PCR, επιτυγχάνεται η ενίσχυση των αλληλουχιών που βρίσκονται μεταξύ αυτών των επαναλήψεων. Το μέγεθος των τμημάτων που τελικώς ενισχύονται ποικίλει σε μέγεθος και μέσω της ηλεκτροφόρησης αυτών σε πήκτωμα αгарόζης, δημιουργείται ένα μοναδικό ειδικό profile (fingerprints) για τους διάφορους μικροοργανισμούς. Έχουν σχεδιαστεί ανάλογα σχήματα τυποποίησης για νοσοκομειακά παθογόνα όπως η *E.coli*, η *Salmonella typhimurium* ⁽¹⁸¹⁾, ο *S.aureus* ^(182, 183) και οι εντερόκοκκοι. ⁽¹⁸⁴⁾

Μία ανάλογη μέθοδος, που χρησιμοποιείται για την τυποποίηση νοσοκομειακών παθογόνων μικροοργανισμών, βασίζεται στην PCR και τους πολυμορφισμούς τύπου **VNTR** (**V**ariable **N**umber **T**andem **R**epeats). Οι πολυμορφισμοί τύπου VNTR οφείλονται σε βραχείες επαναλήψεις μικρών αλληλουχιών σε σειρά, όπου με το τέλος της μιας επανάληψης αρχίζει η επομένη. Παρατηρούνται σε όλο το μήκος του γονιδιώματος και ο αριθμός αυτών των επαναλήψεων ποικίλει από αλληλόμορφο σε αλληλόμορφο και από βακτήριο σε βακτήριο. Τα διαφορετικά μεγέθη και ο διαφορετικός αριθμός των επαναλήψεων ποικίλει, στα γενετικά ανόμοια στελέχη. Με τον σχεδιασμό των εκκινητών, οι οποίοι έχουν σημανθεί με φθορίζουσες ουσίες, υπάρχει δυνατότητα ενίσχυσης των περιοχών που παρουσιάζουν τις επαναλήψεις και με τον ακολουθούμενο ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των προϊόντων PCR λαμβάνεται ένα συγκεκριμένο ηλεκτροφορητικό πρότυπο, χαρακτηριστικό των μικροοργανισμών. Τυπικά αναλύονται πολλές περιοχές του γονιδιώματος με VNTR, για την τυποποίηση των μικροοργανισμών. ^(185, 186)

Οι εν σειρά επαναλήψεις ποικίλου αριθμού μέσω της μεθόδου **Spoligo-Typing**, χρησιμοποιείται για την τυποποίηση του *Mycobacterium tuberculosis*.

Η μέθοδος Spoligotyping χρησιμοποιεί τις συντηρημένες επαναλήψεις της αλληλουχίας του γονιδιώματος, ως εκκινητές της PCR, για την ενίσχυση ενδιάμεσων ολιγονουκλεοτιδίων (**spacer oligo**nucleotides, εξ ου και η ονομασία Spoligotyping της μεθόδου). Τα προϊόντα της PCR χρησιμοποιούνται σε αντίδραση υβριδισμού με συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, συμπληρωματικά των γνωστών αλληλουχιών των «ενδιάμεσων ολιγονουκλεοτιδίων». Τα προϊόντα της PCR, μετά την αντίδραση υβριδισμού, διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση, δημιουργώντας ένα συγκεκριμένο profile, ειδικό για κάθε μικροοργανισμό που χρησιμοποιείται στην τυποποίηση αυτών. ^(187, 188)

1.6.6. ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ DNA ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟ-Real Time PCR

Η Real-Time PCR είναι μία επαναστατική μέθοδος με ευρύτατη εφαρμογή στην Κλινική Διαγνωστική Μικροβιολογία. (¹⁸⁹, ¹⁹⁰) Κατέστη δυνατή: I. με την τεχνολογική αναβάθμιση της ταχύτητας εναλλαγής των θερμοκρασιών μιας αντίδρασης PCR II. των μικρότερων χρησιμοποιούμενων όγκων III. την μεγάλη ομοιογένεια του μίγματος και IV. την δυνατότητα παρουσίας στο ίδιο μίγμα φθορίζοντων μορίων για την ανίχνευση των προϊόντων της PCR.

Στην Real-Time PCR επιτυγχάνεται συνδυασμός της μεθοδολογίας της PCR με την μέτρηση του φθορίζοντος σήματος των προϊόντων, μετά από κάθε κύκλο ενίσχυσης. Κύριος σκοπός της Real-Time PCR είναι ο ακριβής προσδιορισμός και η μέτρηση μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA σε ένα δείγμα, έστω και αν η συγκεκριμένη αλληλουχία DNA βρίσκεται σε πολύ μικρές ποσότητες. Κατά την διάρκεια της ενίσχυσης μέσω της PCR, η ένταση του φθορίζοντος σήματος εξαρτάται από το ποσό της αρχικής αλληλουχίας του DNA. Επίσης το τελικό προϊόν χαρακτηρίζεται και από τον προσδιορισμό της θερμοκρασίας στην οποία το προϊόν ρευστοποιείται («λιώνει») όταν βρίσκεται υπό μορφή διπλής έλικας. Οι δυνατότητες της PCR διευρύνθηκαν με την χρήση ενός άλλου ενζύμου, της ανάστροφης τρανσκριπτάσης (Reverse Transcriptase), η οποία δημιουργεί συμπληρωματικό cDNA (complementary cDNA) από RNA πρότυπο (η ανάστροφη τρανσκριπτάση χρησιμοποιείται από τους ρετροϊούς για την δημιουργία DNA από το RNA του ιού). Το cDNA χρησιμοποιείται στην αντίδραση της Real-Time PCR για την ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης των γονιδίων. Τα χαρακτηριστικά της επίδοσης της μεθόδου, ως προς την ευαισθησία και την ειδικότητα, είναι ισοδύναμα με την κλασσική PCR σε συνδυασμό με την Southern Blot. Επειδή τόσο η ενίσχυση όσο και ο προσδιορισμός του DNA λαμβάνει χώρα στο ίδιο κλειστό χώρο, ο κίνδυνος επιμόλυνσης είναι σχεδόν αμελητέος, πάντα σε σύγκριση με την κλασσική PCR. Επίσης οι απαραίτητοι χειρισμοί απαιτούν την μικρότερη ενασχόληση του προσωπικού ανά μονάδα χρόνου και δείγματος και θεωρείται πιο απλή και περισσότερο αποτελεσματική σε σύγκριση με την κλασσική PCR. Σημαντικό πλεονέκτημα αυτής της παραλλαγής της PCR, είναι η μεγάλη ταχύτητα με την οποία εξελίσσεται η όλη αντίδραση. Λόγω αυτών των πλεονεκτημάτων η Real-Time PCR χρησιμοποιείται στη ανίχνευση και τυποποίηση πλήθους παθογόνων μικροοργανισμών. (¹⁹¹) Η δυνατότητα ευαισθητού και ειδικού προσδιορισμού, μέσω της τεχνολογίας της Real-Time PCR, στηρίζεται στην χρήση ολιγονουκλεοτιδίου, με σήμανση φθορίζοντων ομάδων και στα δύο άκρα του.

Οι τεχνικές της Real-Time PCR ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με το είδος των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται:

- 5' nuclease-TagMan probe
- molecular beacon probe
- FRET hybridization probes.

Και οι τρεις τεχνικές της Real-Time PCR στηρίζονται σε ένα φαινόμενο μεταφοράς ενέργειας υπό μορφή φωτός, μεταξύ των δύο γειτονικών φθορίζουσών ομάδων, φαινομένου γνωστού ως **F**luorescence **R**esonance **E**nergy **T**ransfer (**FRET**) και τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιούνται στην διαδικασία αυτή καλούνται FRET probes. Πρόκειται συνήθως για μικρού μήκους ολιγονουκλεοτίδια τα οποία συνδέονται και στα δύο άκρα τους, με φθορίζου-

σες ομάδες (fluorophores). Η 5' φθορίζουσα ομάδα, συνδεδεμένη με το 5' άκρο του ολιγονουκλεοτιδίου, ονομάζεται **δότης (reporter R)**, ενώ η 3' φθορίζουσα ομάδα, συνδεδεμένη με το 3' άκρο του ολιγονουκλεοτιδίου, ονομάζεται **δέκτης (quencher Q)**. Πριν την δράση της DNA πολυμεράσης, είτε γίνεται σύνδεση του ολιγονουκλεοτιδίου με το τμήμα-στόχος του DNA, είτε όταν δεν υπάρχει σύνδεση και όσο το ολιγονουκλεοτίδιο είναι ακόμη ακέραιο και η απόσταση μεταξύ των δύο άκρων του είναι μικρή, έχουμε μεταφορά ενέργειας υπό μορφή ακτινοβολίας από τον ανιχνευτή-δότη (reporter R) προς τον ανιχνευτή-δέκτη (quencher Q). Η ακτινοβολία του δότη είναι μικρού μήκους κύματος χρώματος πρασίνου, προς τον δέκτη που εκπέμπει σε μεγαλύτερο μήκος κύματος συνήθως κόκκινου χρώματος, έτσι ώστε να μη υπάρχει εκπομπή φθορίζοντος σήματος από το FRET ολιγονουκλεοτίδιο.

Κύριο τεχνικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η ανάπτυξη ενός ομοιογενούς μίγματος αντίδρασης. Στο μίγμα αυτό τα φθορίζοντα μόρια, για την ανίχνευση του ενισχυμένου προϊόντος της PCR, είναι παρόντα στον ίδιο χώρο που εξελίσσεται η αντίδραση. Επιπλέον, μετά το τέλος του κάθε κύκλου, πραγματοποιείται στον κυκλοποιητή μια εκτίμηση του φθορισμού που εκπέμπεται. Το αποτέλεσμα είναι η δυνατότητα παρατήρησης της αντίδρασης να εξελίσσεται σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR).

1.7. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ

Μετά την αντίδραση της PCR, τα προϊόντα της ενίσχυσης θα πρέπει να αναλυθούν. Ο πιο απλός τρόπος ανάλυσης είναι η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτή αгарόζης και η πληροφορία που αντλείται αφορά μόνον στο μέγεθος των προϊόντων της ενίσχυσης. Άλλες τεχνικές ανάλυσης όπως ανάλυση με χρήση ανάστροφου υβριδισμού, ανάλυση με μικροσυστοιχίες και αλληλούχιση (sequencing) των προϊόντων, έχουν κερδίσει τα τελευταία χρόνια έδαφος κυρίως λόγω της αυτοματοποίησης και των σύνθετων πληροφοριών που μας παρέχουν.

1.7.1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΑΝΑΣΤΡΟΦΟ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟ

Αντίθετα με ότι γίνεται στην Southern blot μέθοδο, όπου ο υβριδισμός έπεται της αποτύπωσης των τμημάτων DNA σε ταινία νιτροκυτταρίνης, στον ανάστροφο υβριδισμό έχουμε τον ιχνηθέτη που μας ενδιαφέρει, στην μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης και εν συνεχεία προστίθεται το προϊόν της PCR που έχει ενισχυθεί για την αντίδραση υβριδισμού. Έχουν σχεδιαστεί μεμβράνες νιτροκυτταρίνης με πολλούς ακινητοποιημένους ιχνηθέτες, έναντι μικροοργανισμών κυρίως των νοσοκομειακών λοιμώξεων.

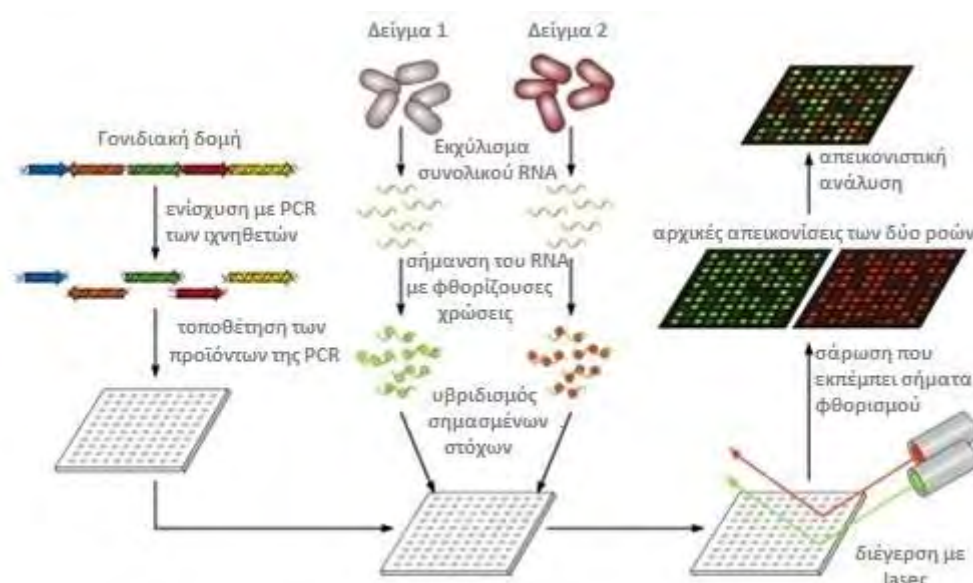
1.7.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ DNA

Microarray-based identification of bacteria

Οι μικροσυστοιχίες DNA (ή όπως διαφορετικά λέγονται μικροσυστοιχίες γονιδίων ή DNA chips), είναι διατάξεις μικροσκοπικών σημείων που αντιπροσωπεύουν μοναδικά DNA ολιγο-

νουκλεοτίδια (features), τα οποία βρίσκονται ακινητοποιημένα με ομοιοπολικούς δεσμούς σε μία στερεή επιφάνεια, συνήθως γυάλινη, και μπορούν να συνδεθούν με μόρια-στόχους.

Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών DNA χρησιμοποιείται ποσοτικά στην έκφραση των γονιδίων ή ποιοτικά στην ανίχνευση αυτών. Στην αρχική τεχνολογία των μικροσυστοιχιών ενσωματώθηκαν τεχνολογίες όπως υβριδισμός κατά Southern Blot και η σήμανση. Διάφορα τεχνολογικά επιτεύγματα όπως η βιομηχανοποίηση της παραγωγής, η αυτοματοποίηση και η ενσωμάτωση της βιοπληροφορικής, επέτρεψαν στην τεχνολογία των μικροσυστοιχιών να βελτιωθεί ραγδαία τα τελευταία χρόνια στους τομείς της αποτελεσματικότητας, διακριτικής ικανότητας, ευαισθησίας, ειδικότητας και αναπαραγωγιμότητας. (192, 193) Όλες αυτές οι βελτιώσεις είχαν ως αποτέλεσμα η μέθοδος από καθαρά ερευνητική να βρει ευρεία εφαρμογή και στα διαγνωστικά εργαστήρια, με πλούσια βιβλιογραφία τα τελευταία δέκα χρόνια. (194)



Εικόνα 16. Ανάλυση με μικροσυστοιχίες

Στις μικροσυστοιχίες DNA, ως ιχνηθέτες (probes) χρησιμοποιούνται dsDNA (double strain DNA) και cDNA (complementary DNA) τα οποία τοποθετούνται σε στερεή επιφάνεια, σε ποσότητα λίγων νανολίτρων (nl), δημιουργώντας μια προεξοχή 100-150 μm (features).

Η πυκνότητα των προεξοχών είναι της τάξης 10.000 - 30.000 ανά πλακίδιο. Οι ιχνηθέτες, που είναι προϊόντα PCR, προσκολλώνται με ισχυρούς ετεροπολικούς δεσμούς μεταξύ των θετικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων του DNA και των επενδυμένων αρνητικών φορτίων της επιφάνειας των πλακιδίων. Το μέγεθος των ιχνηθετών κυμαίνεται από 200-800bp για dsDNA, ενώ των ολιγονουκλεοτιδίων cDNA από 25-80 bp. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι ανάλογη του μεγέθους των ιχνηθετών ενώ η ειδικότητα είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους αυτών.

Στόχοι της αντίδρασης μπορεί να είναι μόρια DNA ή RNA, ως προϊόντα της Ευρέος φάσματος PCR ή της Multiplex PCR, τα οποία εν συνεχεία σημαίνονται με φθορίζουσα χρωστική. Ο υβριδισμός που επιτυγχάνεται μεταξύ των ιχνηθετών και των στόχων εξαρτάται από την αλληλουχία αμοιτέρων και είναι αντανάκλαση τις πολυμορφίας των γονιδίων με αποτέλεσμα την αλλαγή της έντασης του φθορίζοντος χρώματος.

1.7.3. ΑΝΑΛΥΣΗ του DNA με ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ - Sequencing

Η Αλληλούχηση του DNA ή γονιδίων του είναι ο προσδιορισμός της σειράς των βάσεων (νουκλεοτιδίων) σ' ένα δείγμα DNA. Είναι η ανάγνωση του γενετικού κώδικα. Η τεχνολογία της αλληλούχησης του DNA έδωσε τρομερή ώθηση στην αξιοποίηση των μοριακών μεθόδων. Η γνώση των εναλλακτικών μορφών των γονιδίων, η αλληλούχηση *de novo* των διαφόρων ειδών, η ανεύρεση μεθυλιωμένων περιοχών του γονιδιώματος, κατέστη δυνατή χάρη στην τεχνολογία Αλληλούχησης του DNA. Η γνώση της αλληλουχίας είναι απαραίτητη τόσο στην βασική έρευνα, όσο και σε εφαρμογές πλήθους επιστημονικών πεδίων όπως στην διάγνωση, την βιοτεχνολογία και την εγκληματολογία.

Οι αρχικές προσπάθειες αλληλούχησης του DNA έγιναν στην δεκαετία του '70, κυρίως από ακαδημαϊκούς ερευνητές με πολύπλοκες εργαστηριακές τεχνικές που βασιζόνταν στην χρωματογραφία δύο κατευθύνσεων. Η αρχική προσπάθεια εστιάστηκε στην αλληλούχηση του RNA και αρχικά επετεύχθη η πλήρης ανάλυση της αλληλουχίας ενός γονιδίου και εν συνεχεία ολόκληρου του γονιδιώματος του βακτηριοφάγου MS2 από τον Walter Fiers μεταξύ του 1972-1976. (195, 196)

Η τεχνολογία Αλληλούχησης πρώτης γενιάς στηρίχθηκε στην μέθοδο ανάλυσης αλληλουχίας που αναπτύχθηκε το 1975 από τον **Frederick Sanger** και συνεργάτες στο Ηνωμένο Βασίλειο (μέθοδος διακοπής πολυμερισμού ή μέθοδος τερματισμού) και σχεδόν παράλληλα το 1977 στις Η.Π.Α. οι **Maxam and Gilbert** ανέπτυξαν την δική τους μέθοδο ανάλυσης, την χημική ανάλυση αλληλουχίας. Για τον λόγο αυτό οι δύο ομάδες μοιράστηκαν το **βραβείο Nobel Χημείας το 1980**.

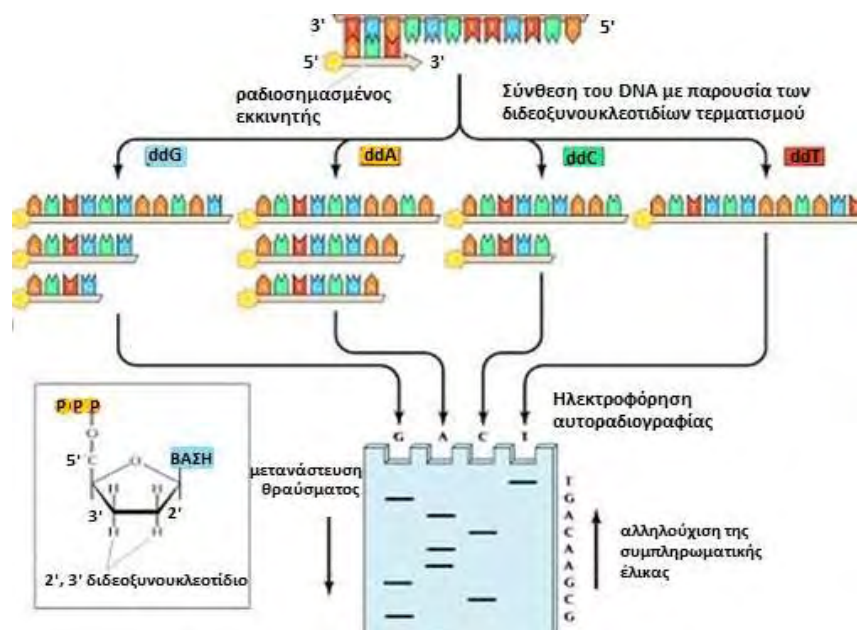
Αρχικά, και στις δύο μεθόδους δημιουργούνται ραδιενεργά τεμάχια DNA που καταλήγουν σε μία από τις τέσσερις βάσεις. Τα τεμάχια αυτά υποβάλλονται κατόπιν σε ηλεκτροφόρηση, ώστε να διαχωριστούν στο πήκτωμα μόρια με διαφορά μήκους ενός νουκλεοτιδίου. Και οι δύο μέθοδοι απαιτούν τέσσερις ξεχωριστές αντιδράσεις για τον καθορισμό μιας αλληλουχίας. Κάθε αντίδραση θα δώσει όλα τα μόρια DNA που καταλήγουν σε μία από τις τέσσερις βάσεις του DNA: αδενίνη (A), γουανίνη (G), κυτοσίνη (C) και θυμίνη (T). Οι σχετικές θέσεις των μορίων μετά την ηλεκτροφόρηση εντοπίζονται με αυτοραδιογραφία και η ανάγνωση των αλληλουχιών γίνεται απευθείας από το πήκτωμα.

Η διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων, αφορά τον τρόπο με τον οποίο δημιουργούνται τα τυχαία μόρια DNA που καταλήγουν σε μία από τις τέσσερις βάσεις του DNA. Στην μέθοδο Maxam και Gilbert, χρησιμοποιούνται τέσσερις διαφορετικές χημικές ουσίες που η κάθε μία τέμνει το DNA σε θέσεις που αντιστοιχούν σ' ένα από τα τέσσερα νουκλεοτίδια. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από πολυπλοκότητα και χρήση τοξικών αντιδραστηρίων, αλλά μολονότι ξεπεράστηκε από την μέθοδο Sanger, χρησιμοποιείται ακόμη σε κάποιες περιπτώσεις.

1.7.3.1. Μέθοδος Sequencing κατά Sanger

Μέθοδος διακοπής πολυμερισμού ή μέθοδος τερματισμού, έτυχε ευρύτατης εφαρμογής ακριβώς επειδή μιμείται την φυσική διαδικασία της αντιγραφής του DNA. Στη μέθοδο αυτή, η αλληλουχία προσδιορίζεται με τη δημιουργία ενός αντιγράφου του μονόκλωνου DNA-

στόχου και με τη βοήθεια του ενζύμου DNA πολυμεράση. Το ένζυμο αυτό αναγνωρίζει ως υποστρώματα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια και τα προσθέτει σε έναν εκκινητή (sequencing primer). Η αλληλούχηση διενεργείται σε τέσσερις διαφορετικούς δοκιμαστικούς σωληνίτες G, A, T και C σωληνάρια, όπου στο κάθε σωληνάρια προστίθενται και τα τέσσερα δεοξυνουκλεοτίδια dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), DNA πολυμεράση, ο εκκινητής και μόνον ένα είδος διδεοξυνουκλεοτιδίου, διαφορετικού για κάθε σωληνάρια π.χ. για το G-σωληνάρια χρησιμοποιείται το διδεοξυνουκλεοτίδιο ddGTP και ούτω καθ' εξής. Κλειδί της μεθόδου αποτελεί η χρήση των αντίστοιχων διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs) σε κάθε σωληνάρια. Ένα κανονικό δεοξυνουκλεοτίδιο έχει μια υδροξυλομάδα (OH⁻) στον άνθρακα 3', ενώ το αντίστοιχο του διδεοξυνουκλεοτιδίου, η ομάδα αυτή απουσιάζει με επακόλουθη αδυναμία δημιουργίας φωσφοδιεστερικού δεσμού. Έτσι όταν κατά την διαδικασία της επιμήκυνσης ενσωματωθεί ένα διδεοξυνουκλεοτίδιο, η επέκταση της αλυσίδας διακόπτεται, λόγω αδυναμίας ενσωμάτωσης νέων νουκλεοτιδίων. Έτσι το διδεόξυ-ανάλογο δρα ως ειδικό αντιδραστήριο τερματισμού της σύνθεσης της αλυσίδας. Με τον τρόπο αυτό λαμβάνονται τεμάχια ποικίλου μήκους, ανάλογα με τις συνθήκες επώασης. Κατόπιν γίνεται ηλεκτροφόρηση των μορίων αυτών και προσδιορίζονται με αυτοραδιογραφία οι θέσεις των ραδιενεργών ζωνών. Στοιχίζοντας τις τέσσερις στήλες με τα ddNTPs και σημειώνοντας τη θέση κάθε τεμαχίου σε σχέση με το γειτονικό του, μπορούμε να διαβάσουμε την αλληλουχία του αντίγραφου DNA απευθείας από το πήκτωμα. (Εικόνα 17) Η ανάγνωση της αλληλουχίας γίνεται από κάτω προς τα πάνω. Είναι σημαντικό να θυμάται κανείς ότι η αλληλουχία η οποία προκύπτει είναι συμπληρωματική της αρχικής αλληλουχίας DNA προς ανάλυση.



Εικόνα 17. Μέθοδος Sanger: Ο τρόπος της σήμανσης στην κλασική μέθοδο Sanger μπορεί να γίνει με τρεις διαφορετικούς τρόπους, με την χρήση ραδιενεργούς φωσφόρου (³²P) των εκκινητών, των δεοξυνουκλεοτιδίων ή των διδεοξυνουκλεοτιδίων.

Μια από τις σημαντικότερες τροποποιήσεις της κλασικής μεθόδου Sanger είναι η **σήμανση των διδεοξυνουκλεοτιδίων με φθορίζουσα ουσία** (dye terminator sequencing)

(**Εικόνα 18**) και μάλιστα με διαφορετική φθορίζουσα ουσία για κάθε είδος διδεοξυνουκλεοτιδίου.

Η εξέλιξη αυτή έδωσε την δυνατότητα όλες οι αντιδράσεις να γίνονται σε ένα σωληνάριο και όχι σε τέσσερα όπως απαιτείται στην περίπτωση της σήμανσης του εκκινήτη. Με την εξέλιξη αυτή, έγινε δυνατή η ανάλυση αλληλουχίας τμημάτων DNA, μεγέθους από 800bp έως το πολύ 1000bp. ⁽¹⁹⁷⁾ Παρά τα πλεονεκτήματα της τροποποιημένης μεθόδου Sanger, η Ανάλυση Αλληλουχίας παρέμεινε μέθοδος με μεγάλο κόστος και μικρή παραγωγικότητα. Έτσι απαιτήθηκαν 10 χρόνια και 3 δις δολάρια για την ολοκληρωμένη αποκωδικοποίηση του ανθρώπινου γονιδιώματος. ⁽¹⁹⁸⁾



Εικόνα 18. Τροποποίηση της κλασικής ανάλυσης αλληλουχίας κατά Sanger. Στο ίδιο σωληνάριο γίνεται ανάλυση αλληλουχίας με την χρήση dNTPs και ddNTPs με διαφορετική τελική σήμανση το καθένα. Τα διαφορετικού μήκους παραγόμενα τμήματα DNA, διαχωρίζονται με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση και η θέση του ddNTPs αναγνωρίζεται μετά από διέγερση με ακτίνα laser.

Λόγω της μεγάλης οικονομικής επιβάρυνσης των μοριακών μεθόδων εξ αιτίας της αλληλούχισης, τα τελευταία χρόνια γίνεται μεγάλη προσπάθεια στην εξεύρεση νέων τεχνολογιών με στόχο την μείωση του κόστους και την μεγαλύτερη παραγωγικότητα. Οι τεχνολογίες αυτές χαρακτηρίζονται ως τεχνολογίες Ανάλυσης Αλληλουχίας δευτέρας, τρίτης και επόμενης γενιάς και είναι οι:

- Sequencing by synthesis
- Pyro-sequencing
- Sequencing by reversible dye terminators
- Sequencing by ligation
- Single Molecule sequencing

Λόγω της μεγάλης σημασίας τους στην τυποποίηση των βακτηριακών γονιδιωμάτων μέσω της πλήρους αλληλούχισης τους μελλοντικά, οι αρχές των παραπάνω τεχνικών αναφέρονται στο **Παράρτημα** της παρούσας Διατριβής.

1.8. ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΜΕ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ

Nucleotide sequence-based analysis

Ο ακριβής προσδιορισμός της γενετικής συγγένειας των βακτηριακών παθογόνων, αποτελεί τον κυρίαρχο σκοπό της μοριακής επιδημιολογίας και της μελέτης της εξέλιξης των παθογόνων μικροοργανισμών. Η πλέον ακριβής γνώση γενετικής ταυτότητας των μικροοργανισμών αντλείται από την αλληλούχιση του DNA. Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλ-

ληλουχίας ολόκληρου του γενώματος αρκετών μικροβιακών ειδών είναι επίτευγμα κυρίως των τελευταίων χρόνων και οδήγησε στην ανάπτυξη μεθόδων τυποποίησης που στηρίζονται στον προσδιορισμό της αλληλουχίας DNA ενός ή πολλαπλών γενετικών τόπων. Τα αποτελέσματα αυτών των μεθόδων είναι απολύτως αναπαραγώγιμα, επαναλήψιμα και κυρίως άμεσα συγκρίσιμα. Επίσης η ερμηνεία είναι εύκολη, αντικειμενική και κατάλληλη για την δημιουργία βάσεων δεδομένων με παγκόσμια προσβασιμότητα. Δεν είναι τυχαίως ο χαρακτηρισμός των μεθόδων τυποποίησης, με βάση την αλληλουχία, ως μιας παγκόσμιας γλώσσας.

Στα πλεονεκτήματα της τυποποίησης μικροοργανισμών με βάση την αλληλούχιση γονιδίων μπορούμε να αναφέρουμε:

- Την ταχύτητα των μεθόδων
- Το αναμφίβολο των αποτελεσμάτων
- Την ευκολία διακίνησης ηλεκτρονικών δεδομένων
- Την χρήση κοινής ονοματολογίας των τυποποιημένων στελεχών
- Την άμεση εξαγωγή των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των στελεχών

Οι περισσότερες από τις υπάρχουσες μοριακές τεχνικές τυποποίησης των μικροοργανισμών παρουσιάζουν δυσκολία σύγκρισης των αποτελεσμάτων, μεταξύ των διαφόρων εργαστηρίων, όπως έχει ήδη επισημανθεί σε ότι αφορά στο κύριο μειονέκτημα της PFGE όπως και όλων των μεθόδων που βασίζονται στη σύγκριση προτύπων ζώνωσης θραυσμάτων DNA. ⁽¹⁹⁹⁾

Με αυτό το σκεπτικό, μέθοδοι που βασίζονται στην Αλληλούχιση γονιδίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν αναμφίβολα για την σύγκριση των μικροοργανισμών που απομονώνονται και τυποποιούνται σε διαφορετικά μικροβιολογικά εργαστήρια. ⁽²⁰⁰⁾ Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα των μοριακών τεχνικών που βασίζονται στην Ανάλυση Αλληλουχίας είναι η δημιουργία δεδομένων τα οποία μπορούν να αποθηκευθούν, δημιουργώντας ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων, προσβάσιμες στην διεθνή επιστημονική κοινότητα.

Τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκαν τεχνικές που βασίζονται στην Ανάλυση Αλληλουχίας τμημάτων DNA ενός συγκεκριμένου γενετικού τόπου-μονοτοπικός προσδιορισμός αλληλουχίας-**SLST**, (**S**ingle **L**ocus **S**equence **T**yping) και τεχνικές ανάλυσης αλληλουχίας πολλαπλών γενετικών τόπων-πολυτοπικός προσδιορισμός αλληλουχίας-**MLST**, (**M**ulti **L**ocus **S**equence **T**yping)

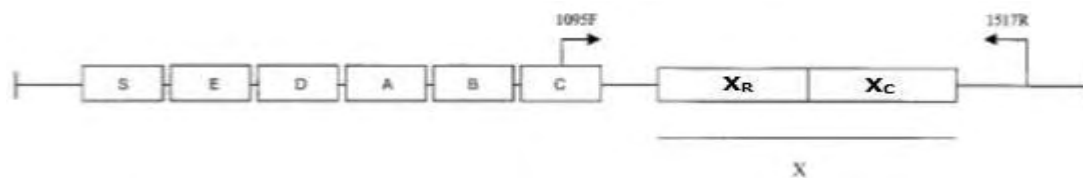
1.8.1. ΜΟΝΟΤΟΠΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA

SLST (**S**ingle-**L**ocus **S**equence **T**yping)

Η SLST βασίζεται στον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ενός γονιδίου ή μιας περιοχής του γονιδιώματος του μικροοργανισμού, που παρουσιάζει ποικιλομορφία μεταξύ των διαφόρων στελεχών ενός είδους. Έχει εφαρμοστεί με μεγάλη επιτυχία στην τυποποίηση του *Staphylococcus aureus*, κυρίως στελεχών MRSA και βασίζεται στην ανάλυση αλληλουχίας τμήματος του γονιδίου της πρωτεΐνης A, του **spa γονιδίου** (**s**taphylococ**co**cus **p**rotein **A**) ως **Spa Typing**. Το συγκεκριμένο γονίδιο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη A του σταφυλόκοκκου, η οποία πρωτεΐνη εμφανίζει μεγάλη ικανότητα αντίδρασης με IgG αντισώματα.

Το κυτταρικό τοίχωμα των στελεχών *Staphylococcus aureus* περιέχει την πρωτεΐνη A. Το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης αυτής συνδέεται με την πεπτιδογλυκάνη του κυτταρικού τοιχώματος με ομοιοπολικό δεσμό ενώ το υπόλοιπο τμήμα παραμένει ελεύθερο. Έχει τη μοναδική ιδιότητα να συνδέεται μη ειδικά με το Fc τμήμα των ανοσοσφαιρινών IgG1, IgG2 και IgG4, ενώ έχει αποδειχθεί ότι ορισμένες IgM ανοσοσφαιρίνες και IgA2 αντιδρούν επίσης με την πρωτεΐνη A. Η ένωση της πρωτεΐνης A με το Fc τμήμα των ανοσοσφαιρινών προκαλεί διάφορα βιολογικά φαινόμενα, όπως αναστολή της οψωνικής δράσης των αντισωμάτων, απελευθέρωση ισταμίνης από τα λευκοκύτταρα και διέγερση των B λεμφοκυττάρων του ανθρώπου.

Πολλές πρωτεΐνες επιφανείας των σταφυλόκοκκων έχουν δομικά χαρακτηριστικά, που περιλαμβάνουν ένα ελεύθερο αμινοτελικό άκρο (N-terminal), ένα υδρόφοβο διαμεμβρανικό τμήμα και μια περιοχή πρόσδεσης στο καρβοξυτελικό άκρο. Η τριτοταγής δομή του αμινοτελικού άκρου στην επιφάνεια του βακτηριακού κυττάρου δίνει την ικανότητα σε μερικές από αυτές τις πρωτεΐνες να δρουν ως προσκολλητινές. Ο γενετικός τόπος του γονιδίου *spa* χαρακτηρίζεται ως εξαιρετικά πολυμορφικός εξ αιτίας της X περιοχής η οποία περιλαμβάνει ποικίλο αριθμό (3-17) επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών μήκους 24bp (VNTR-**V**ariable **N**umber **T**andem **R**epeats). Η περιοχή αυτή βρίσκεται στο 3' άκρο του γονιδίου, το οποίο κωδικοποιεί για το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης, το δεσμευμένο στο κυτταρικό τοίχωμα. Η περιοχή X αποτελείται από την X_R (περιοχή των επαναλήψεων) και X_C που αντιστοιχεί στο μεμβρανικό τμήμα. (201, 202)

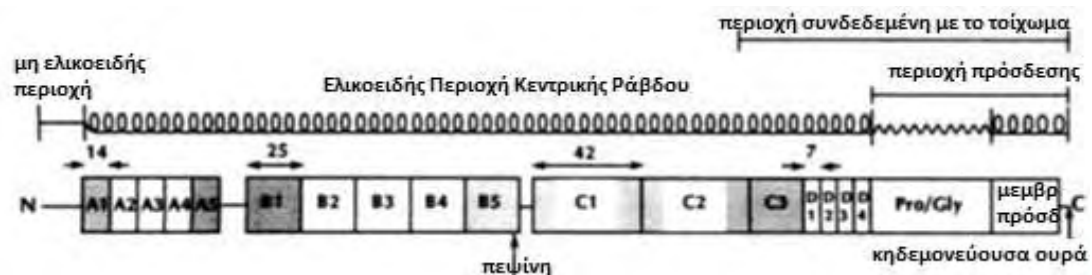


Εικόνα 19. Το γονίδιο της πρωτεΐνης A του *Staphylococcus aureus*. Οι A-D περιοχές του γονιδίου κωδικοποιούν για τμήματα της πρωτεΐνης που ενώνονται με IgG ανοσοσφαιρίνες. Η E-περιοχή είναι ομόλογη των A-D περιοχών, η X-περιοχή του γονιδίου η οποία κωδικοποιεί το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης A και περιλαμβάνει την περιοχή X_r με τις βραχείες επαναλήψεις αλληλουχιών σε σειρά. (203)

Τα ακολουθούμενα πρωτόκολλα για την *spa* τυποποίηση πρέπει να εναρμονίζονται με τα προτεινόμενα από τον SeqNet.org με έδρα το Institute of Hygiene, University Hospital Munster, Germany. Μετά την ανάλυση αλληλουχίας του *spa* γονιδίου διαφόρων στελεχών, γίνεται σύγκριση των αλληλουχιών μέσω του προγράμματος [Ridom StaphType](http://Ridom.StaphType) (Ridom bioinformatics). Πρόκειται για ένα λογισμικό πολύ αποδοτικό, που επιτρέπει την αναγνώριση των αλληλουχιών γρήγορα και με ικανοποιητικά αποτελέσματα. (204) Για κάθε στέλεχος εισάγονται οι αλληλουχίες και των δύο κατευθύνσεων του γονιδίου. Το πρόγραμμα ανιχνεύει αυτομάτως τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και δίνει τον *spa* τύπο. Στην συνέχεια τα αποτελέσματα και τα επιδημιολογικά δεδομένα αποθηκεύονται στην βάση δεδομένων (<http://www.seqnet.org>). Αν προκύψει κάποιος τύπος που δεν υπάρχει στην βάση δεδομένων, τότε ο ερευνητής τον υποβάλλει διαδικτυακά (<http://www.ridom.de/>) και λαμβάνει τον τελικό χαρακτηρισμό του νέου τύπου (οι οποίοι χαρακτηρίζονται από το γράμμα t και έναν αριθμό π.χ. *spa* type t032). Η συγκεκριμένη ιστοσελίδα περιλαμβάνει πάνω από

1200 *sra* τύπους, που αποτελούνται από συνδυασμό περίπου 100 διαφορετικών αλληλουχιών και δεδομένα από περισσότερα από 13.000 στελέχη από όλη την Ευρώπη. Το βασικό πλεονέκτημα είναι ότι η SLST βασίζεται σε ένα δομικό γονίδιο, το οποίο έχει την ιδιότητα να εμφανίζει σημαντικές παραλλαγές της αλληλουχίας του με το πέρασμα μικρού χρονικού διαστήματος. Έτσι αυτή η τεχνική τυποποίησης χρησιμοποιείται για την διερεύνηση της επιδημιολογίας στελεχών σε περιορισμένο χώρο και χρόνο (συρροές κρουσμάτων, επιδημικά κύματα, μελέτες κρουσμάτων στην κοινότητα συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος).

Η SLST έχει εφαρμοστεί επίσης με μεγάλη επιτυχία στην τυποποίηση των στελεχών του *Streptococcus pyogenes* (Group A *Streptococcus*-GAS) μέσω ανάλυσης της αλληλουχίας του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη M. Για δεκαετίες η τυποποίηση των GAS βασιζόταν σε ορολογικές μεθόδους και ειδικότερα στην αντιγονικότητα των πρωτεϊνών M και T. Η πρωτεΐνη M αποτέλεσε την βάση για ορολογική τυποποίηση με ιζηματινο-αντίδραση, ενώ η πρωτεΐνη T χρησιμοποιήθηκε σε ορολογικές αντιδράσεις συγκολλητινο-αντίδρασης. ⁽²⁰⁵⁾ Η πρωτεΐνη M θεωρείται ο κυριότερος παράγοντας παθογονικότητας των πυογόνων στρεπτόκοκκων και αποτελείται από μία υπερέλικα, αποτελούμενη από δύο ελισσόμενες α-έλικες. Στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης βρίσκεται μία υπερμεταβλητή περιοχή, στην οποία στηρίζεται η διαφορετική αντιγονική αντίδραση ανάμεσα στα στελέχη που κατατάσσονται σε διαφορετικούς ορότυπους.



Εικόνα 20. Τα χαρακτηριστικά τμήματα της πρωτεΐνης M των στρεπτόκοκκων της ομάδος A. Τα τμήματα σε κουτιά A1-A5, B1-B5, C1-C3, D1-D4, αναπαριστούν τμήματα της αλληλουχίας με επαναλήψεις, μικρών αλληλουχιών εν σειρά μήκους 14, 25, 42 και 7, αντίστοιχα για A,B,C,D. Τα σκιασμένα τμήματα υποδεικνύουν διαφοροποιήσεις έναντι των κεντρικών επαναλήψεων. Το τμήμα Pro/Gly αντιστοιχεί σε περιοχή της πρωτεΐνης πλούσιας σε προλίνη-γλυκίνη και βρίσκεται εντός του στρώματος της πεπτιδογλυκάνης.

Με την ευρεία χρήση της M-οροτυπίας έχουν προσδιοριστεί 95 διαφορετικοί M-ορότυποι παγκοσμίως. Επίσης δόθηκε η δυνατότητα να αναγνωριστούν ορότυποι που σχετίζονται με ρευματικά μεταστρεπτοκοκκικά σύνδρομα ή με συγκεκριμένες στρεπτοκοκκικές λοιμώξεις, όπως νεκρωτική περιτονίτιδα και το σύνδρομο στρεπτοκοκκικού τοξικού shock. Η ορολογική τυποποίηση, παρά την ευρεία της χρήση, παρουσιάζει διάφορα προβλήματα κυρίως λόγω του περιορισμού στην παραγωγή και διαθεσιμότητα των M-αντιορών, στην δυσκολία της ερμηνείας των αποτελεσμάτων, στην απομόνωση στελεχών που δεν τυποποιούνται με κανέναν από τους διαθέσιμους αντιορούς και ανεύρεση συνεχώς νέων M-τύπων. Για τους λόγους αυτούς κρίθηκε απαραίτητη η ανάπτυξη τεχνικής τυποποίησης των στρεπτόκοκκων, που να βασίζεται στην αλληλούχιση του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη M, του **γονιδίου *emm***.

Η τεχνική βασίζεται στην ανάλυση της αλληλουχίας ενός τμήματος του γονιδίου *emm*, περίπου 250bp, της υπερμεταβλητής περιοχής του γονιδίου, που αντιστοιχεί στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Η μέθοδος περιλαμβάνει την απομόνωση του συγκεκριμένου στελεχούς, την τυποποίηση του σε επίπεδο είδους, την εκχύλιση του DNA και εν συνεχεία την ενίσχυση της συγκεκριμένης περιοχής του γονιδίου με την χρήση ειδικών εκκινητών και πρωτοκόλλου όπως συστήνεται από την ιστοσελίδα του CDC, αναφορικά με την τυποποίηση των στρεπτόκοκκων που έχουν ελεγχθεί ότι παρουσιάζουν τα βέλτιστα αποτελέσματα. (http://cdc.gov/ncidod/biotech/strep/M-ProteinGene_Typing.htm) Στην συνέχεια ο ερευνητής μπορεί να συγκρίνει αυτόματα την αλληλουχία που βρήκε, με την βάση δεδομένων της ιστοσελίδας και την χρήση παράλληλα του προγράμματος Blast και του αλγόριθμου Clustalw.

Η απάντηση αποστέλλεται με την μορφή μηνύματος ηλεκτρονικού ταχυδρομείου (email), η οποία περιλαμβάνει την αντιστοίχιση της συγκεκριμένης αλληλουχίας και συγκρίσεις με την καλύτερη (μεγαλύτερη) βαθμολογία. Η βαθμολογία στηρίζεται στις διαφορές που εντοπίζονται στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων και στο αριθμό των επί πλέον νουκλεοτιδίων ή των ελλείψεων που καταγράφονται σε κάθε θέση της αλληλουχίας. Όσο περισσότερες είναι οι ελλείψεις ή οι διαφορές, τόσο μικρότερη η τελική βαθμολογία. Η χρήση της τυποποίησης αυτής οδήγησε σε μικρό χρονικό διάστημα στον διπλασιασμό των τύπων που έχουν αναγνωρισθεί σε σχέση με την κλασική M-οροτυπία. Το σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου συνίσταται στο γεγονός ότι στηρίζεται σε ένα δομικό γονίδιο, το οποίο αποτελεί ισχυρό παράγοντα παθογονικότητας για έναν μικροοργανισμό που ευθύνεται κυρίως για λοιμώξεις στην κοινότητα (φάρυγγο-αμυγδαλίτιδες αλλά και διεισδυτικές λοιμώξεις μαλακών μορίων κλπ) και δυνατότητα ισχυρής συσχέτισης των *emm*-τύπων με διάφορες λοιμώξεις και σύνδρομα (^{205, 206}).

1.8.2. ΠΟΛΥΤΟΠΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA MLST (Multi Locus Sequence Typing)

Ο Πολυτοπικός Προσδιορισμός Αλληλουχίας DNA (MLST) είναι μια μέθοδος τυποποίησης, η οποία τα τελευταία χρόνια εφαρμόζεται σε βακτήρια και μύκητες, με σκοπό το χαρακτηρισμό των στελεχών τους σε μοριακό επίπεδο. Προτάθηκε το 1998 ως μια παγκόσμια και καθοριστική μέθοδος για το χαρακτηρισμό και την τυποποίηση βακτηρίων, με εφαρμογή αρχικά στη *Neisseria meningitides* (²⁰⁷). Το αρχικό λογισμικό αναπτύχθηκε από τον Man-Suen Chan (Πανεπιστήμιο της Οξφόρδης) και η σημερινή έκδοση στο Διαδίκτυο από τον David Aanensen (Imperial College). Η πρόταση της MLST ως παγκόσμια προσέγγιση έγινε εφικτή χάρη σε τρεις κατακτήσεις της μοριακής μικροβιολογίας:

- α) την ενισχυμένη γνώση στη βακτηριακή εξέλιξη και τη βιολογία πληθυσμών
- β) την αυξημένη διαθεσιμότητα και το μειωμένο κόστος της αλληλούχισης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και
- γ) την ανάπτυξη της τεχνολογίας της πληροφορικής, ειδικότερα των υπηρεσιών διαδικτύου (Internet), που προσφέρουν γρήγορη και οικονομική ανταλλαγή πληροφοριών.

Η κύρια ιδέα της MLST είναι η παροχή ενημερωμένων βάσεων δεδομένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, στις οποίες υπάρχει ελεύθερη πρόσβαση. Αυτές οι βάσεις δεδομένων μπορούν να θεωρηθούν ως ένα κοινό «λεξικό», που επιτρέπει την άμεση σύγκριση των βακτηριακών στελεχών, χωρίς να απαιτείται η δαπανηρή και προβληματική ανταλλαγή στελεχών ή αντιδραστηρίων. Με αυτήν την έννοια αποτελούν τη βάση μιας κοινής γλώσσας για την βακτηριακή τυποποίηση (208).

Η μέθοδος MLST χρησιμοποιεί ως μέσο για την ανάλυση αλληλουχίας DNA, γονίδια βασικού μεταβολισμού. Τα γονίδια αυτά βρίσκονται στο χρωμόσωμα των βακτηρίων και οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν, συμμετέχουν σε μεταβολικές αντιδράσεις απαραίτητες υπό οιοσδήποτε συνθήκες αύξησης των βακτηρίων. Τα γονίδια αυτά αποκαλούνται και γονίδια κυτταρικής οικονομίας (housekeeping genes) και βρίσκονται σε όλα τα βακτηριακά κύτταρα. Τα γονίδια βασικού μεταβολισμού, δεν υπόκεινται σε πίεση επιλογής και για τον λόγο αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μελέτες τυποποίησης και σε μελέτες φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των στελεχών ενός είδους βακτηρίων.

Για κάθε είδος μικροοργανισμού έχουν επιλεγεί συγκεκριμένα γονίδια και η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει την απομόνωση του στελέχους, την ταυτοποίησή του σε επίπεδο είδους, εκχύλιση του DNA από τα βακτηριακά κύτταρα και την ενίσχυση του, μέσω της PCR, ενός εσωτερικού τμήματος του επιλεγέντος γονιδίου περίπου 450bp. Για κάθε είδος γονιδίου χρησιμοποιούνται κατάλληλοι εκκινητές για την αντίδραση της PCR. Η όλη διαδικασία επαναλαμβάνεται για το κάθε γονίδιο χωριστά. Μετά την ενίσχυση των εσωτερικών τμημάτων των γονιδίων ακολουθεί η αλληλούχιση τους (sequencing). Το είδος των γονιδίων που μελετώνται για κάθε βακτήριο, οι ειδικοί εκκινητές και τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται έχουν επιλεγεί μετά από μελέτες και βρίσκονται σε ιστοσελίδα των βάσεων δεδομένων MLST, έτσι ώστε όλοι οι ερευνητές να αναφέρονται στα ίδια τμήματα των DNA-στόχων. Για κάθε γονίδιο οι διαφορετικές αλληλουχίες προσδιορίζονται ως ξεχωριστά αλληλόμορφα γονίδια (alleles) και σημαίνονται με έναν αριθμό. Τα γονίδια τα οποία παρουσιάζουν έστω και μία διαφορά στην αλληλουχία τους θεωρούνται διαφορετικά αλληλόμορφα και το κάθε στέλεχος χαρακτηρίζεται από τον διαφορετικό συνδυασμό των αλληλόμορφων των επτά χρησιμοποιούμενων γονιδίων και κατατάσσεται σε ένα τύπο (allelic profile ή sequence type, ST). Επειδή υπάρχουν πολλά πιθανά αλληλόμορφα για κάθε γενετικό τόπο, είναι απίθανο ένας πανομοιότυπος συνδυασμός αλληλόμορφων (sequence type, ST) να προκύψει τυχαία. (207) Έτσι τα στελέχη με το ίδιο ST τύπο θεωρούνται μέλη του ίδιου κλώνου. (209) Σε μια MLST αγνοείται ο αριθμός των νουκλεοτιδικών διαφορών και οι αλληλουχίες δίνουν διαφορετικούς αριθμούς αλληλόμορφων αν διαφέρουν σε έναν ή σε περισσότερους νουκλεοτιδικούς τόπους. Το σκεπτικό είναι ότι ένα μοναδικό γενετικό γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ενός νέου αλληλόμορφου μπορεί να συμβεί είτε με σημειακή μετάλλαξη (αλλαγή ενός μόνου νουκλεοτιδίου) είτε με ανασυνδυασμένη αντικατάσταση (που συχνά επιφέρει αλλαγές πολλαπλών τόπων). Σταθμίζοντας ανάλογα με τον αριθμό των νουκλεοτιδικών διαφορών μεταξύ των αλληλόμορφων αυτό θα σημαίνει ότι το δεύτερο αλληλόμορφο έχει μια πιο μακρινή συσχέτιση, με το αυθεντικό αλληλόμορφο, απ' ότι το πρώτο. Αυτό θα ίσχυε αν όλες οι νουκλεοτιδικές διαφορές γίνονταν με μετάλλαξη και όχι αν οι διαφορές γίνονταν με ανασυνδυασμένη αντικατάσταση.

Τα περισσότερα είδη βακτηρίων έχουν επαρκή διαφοροποίηση στα γονίδια κυτταρικής οικονομίας –διατηρημένα γονίδια- (housekeeping genes) παρέχοντας πάρα πολλά αλληλόμορφα ανά γονιδιακό τόπο και επιτρέποντας έτσι δισεκατομμύρια συνδυασμούς αλληλόμορφων προφίλ, με την χρήση των επτά γονιδίων κυτταρικής οικονομίας. Σαν αριθμητικό παράδειγμα μπορούμε να αναφέρουμε ότι τριάντα αλληλόμορφα γονίδια ανά γενετικό τόπο εμφανίζουν έναν συνδυασμό είκοσι δισεκατομμυρίων γονότυπων προς επίλυση.

Η MLST βασίστηκε στις αρχές της **MLEE** (**M**ulti**L**ocus **E**nzyme **E**lectrophoresis), από την οποία διαφέρει στο ότι ο στόχος των διατηρημένων γονιδίων επιτυγχάνεται άμεσα με την αλληλούχιση του DNA τους ενώ στην MLEE επιτυγχάνεται έμμεσα μέσω της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας των γονιδιακών προϊόντων τους.

Όλα τα δεδομένα τα οποία αφορούν την MLST τεχνική, το είδος των γονιδίων που αναλύονται για κάθε μικροοργανισμό, οι εκκινητές για κάθε γονίδιο, οι αλληλουχίες αναφοράς των αλληλόμορφων, οι αλληλόμορφοι ή αλληλικοί τύποι (STs) για κάθε μικροοργανισμό και των στελεχών αυτού που έχουν τυποποιηθεί μέσω της τεχνικής, καθώς και τα επιδημιολογικά δεδομένα, βρίσκονται κυρίως σε δύο ιστοσελίδες που εδρεύουν στο Imperial College, London (<http://www.mlst.net/>) και στο Oxford University (<http://pubmlst.org/>). Οι βάσεις δεδομένων που φιλοξενούνται σε αυτές τις δύο ιστοσελίδες είναι διαφορετικές και διατηρούν τις αλληλουχίες αναφοράς των αλληλόμορφων γονιδίων, τις λίστες των STs για συγκεκριμένους μικροοργανισμούς. Επίσης παρέχουν μέσω των ιστοσελίδων όλα τα απαραίτητα εργαλεία (προγράμματα-αλγόριθμους) για την τυποποίηση και επεξεργασία των δεδομένων των ερευνητών.

Η εφαρμογή της μεθόδου MLST είναι τεράστια τα τελευταία χρόνια και παρέχει δεδομένα σε επιστήμονες και ερευνητές της δημόσιας υγείας, της κτηνιατρικής, της επιστημονικής κοινότητας καθώς και στους επιστήμονες της βιομηχανίας τροφίμων.

Τα δεδομένα της τυποποίησης μέσω της μεθόδου MLST χρησιμοποιούνται σε μελέτες φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των στελεχών που απομονώνονται σε τοπικό, περιφερειακό, εθνικό και παγκόσμιο επίπεδο.

Η MLST αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο τυποποίησης και μελέτης των φυλογενετικών σχέσεων των μικροοργανισμών. Διαθέτει όμως ένα μειονέκτημα, θεωρείται αρκετά ακριβή λόγω κυρίως του αριθμού των γονιδίων που πρέπει να αναλυθούν, συνήθως επτά ως δέκα γονίδια. Επίσης, εξ αιτίας των καλά διατηρημένων αλληλουχιών των γονιδίων κυτταρικής οικονομίας (housekeeping genes), σε κάποιες περιπτώσεις δεν είναι δυνατή η διαφοροποίηση των στελεχών. Για να βελτιωθούν οι διακριτικές δυνατότητες της μεθόδου MLST, οι μελέτες στρέφονται στον πολυτοπικό προσδιορισμό αλληλουχιών γονιδιακών τόπων που κωδικοποιούν λοιμογόνους παράγοντες – **MVLST** - (**M**ulti-**V**irulence-**L**ocus **S**equencing **T**yping).

Η MVLSΤ διευρύνει το όφελος της MLST με την χρήση των λοιμογόνων γονιδίων και αρχικά η τεχνική σχεδιάστηκε για επιδημιολογική διερεύνηση στελεχών *Listeria monocytogenes* (²¹⁰, ²¹¹) Σε μία επιδημία η πληθυσμιακή γενετική δεν είναι ο μόνος σημαντικός παράγοντας αλλά κυρίως οι τοξικοί και λοιμογόνοι παράγοντες των μικροβιακών πληθυσμών αποτελούν σημαντικούς παράγοντες και τις κύριες αιτίες της διασποράς των λοιμώξεων. Αυτοί οι λοιμογόνοι παράγοντες πρέπει να αναδεικνύονται μέσω των γενετικών μελετών, διότι τα γονίδια των λοιμογόνων παραγόντων συχνά ανασυνδυάζονται και διασπεί-

ρονται μεταξύ των στελεχών πέραν από ένα αναμενόμενο πληθυσμιακό γενετικό πλαίσιο. Έτσι είναι πλέον σημαντικό να ανευρεθούν στελέχη πχ της *Escherichia coli* που φέρουν γονίδια παθογονικότητας παρά η γνώση που βασίζεται στην πληθυσμιακή γενετική για την εξελικτική επικράτηση συγκεκριμένων κλώνων αυτού του είδους. Σε αυτό πλαίσιο έχουν ήδη μελετηθεί με την μέθοδο MVLST λοιμογόνα στελέχη *Vibrio cholerae* ⁽²¹²⁾ και *Chlamydophila pecorum*. ⁽²¹³⁾

1.9. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΣ ΚΛΩΝΟΣ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΟΥ

Η τεκμηρίωση της μικροβιακής συνάφειας των κρουσμάτων μίας επιδημίας προϋποθέτει την κατανόηση της έννοιας του **μικροβιακού κλώνου**. Όπως είναι γνωστό, οι μικροοργανισμοί δεν αναπαράγονται φυλετικά αλλά πολλαπλασιάζονται με διχοτόμηση και συνεπώς η γενετική πληροφορία μεταβιβάζεται κάθετα στους απογόνους. Οι απόγονοι αυτοί απαρτίζουν τον μικροβιακό κλώνο, που αποτελεί το σύνολο των απογόνων μιας απομόνωσης (isolate) από έναν ασθενή ή μία εστία του περιβάλλοντος. Συνεπώς οι μικροοργανισμοί που εμπλέκονται σε μία επιδημία συνήθως είναι μέλη ενός μικροβιακού κλώνου.

Ως **μικροβιακός κλώνος** ορίζεται:

- **Μικροβιολογικά** ως ομάδα επιδημιολογικά σχετιζόμενων βακτηριακών στελεχών ενός είδους από ανεξάρτητες πηγές και διαφορετικό χρόνο, με συγκεκριμένες όμως φαινοτυπικές και γενετικές ομοιότητες οι οποίες να εξηγούνται μόνο από την κοινή τους προέλευση.
- **Επιδημιολογικά** ως σύνολο στελεχών ενός βακτηριακού είδους που απομονώθηκαν από επιδημιολογικά άμεσα ή έμμεσα σχετιζόμενα περιστατικά και μπορούν να θεωρηθούν απόγονοι κοινού βακτηριακού προγόνου.

Η θεωρητική αυτή αρχή, της απόλυτης ομοιότητας των μελών ενός κλώνου, περιορίζεται από δύο γενετικές λειτουργίες: τις μεταλλάξεις ή μεταλλαγές και τον γενετικό ανασυνδυασμό όπου γίνεται οριζόντια μεταφορά γενετικού υλικού. Οι μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό αφορούν την προσθήκη, την αφαίρεση ή την αλλαγή κάποιου ζεύγους βάσεων του DNA. Οι μεταλλάξεις μπορούν να συμβούν κατά την διαδικασία του πολλαπλασιασμού και την διαδικασία της διασποράς του μικροβιακού κλώνου. Η ικανότητα της μεταφοράς γενετικού υλικού μεταξύ μικροβιακών κυττάρων του ίδιου είδους αλλά και μεταξύ μικροβιακών κυττάρων διαφορετικών ειδών, αποτελεί μία σημαντική ιδιότητα των μικροοργανισμών, τόσο στην εξέλιξη και την προσαρμογή τους στο περιβάλλον, όσο και στην διαμόρφωση των διαφορών των μελών ενός μικροβιακού κλώνου. Για την ανάγκη κατανόησης της εξέλιξης των μικροοργανισμών και των διαφορών μεταξύ των μικροβιακών κλώνων, το γενετικό υλικό των μικροοργανισμών διακρίνεται σε **σταθερό γενετικό υλικό** και **πρόσθετο ή κινητό γενετικό υλικό**.

➤ **Σταθερό γενετικό υλικό** χαρακτηρίζεται το τμήμα του γενετικού κώδικα το οποίο κωδικοποιεί τις βασικές δομές και λειτουργίες ενός μικροοργανισμού. Τα γονίδια αυτά βρίσκονται στο χρωμόσωμα των βακτηρίων και οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν συμμετέχουν σε μεταβολικές αντιδράσεις απαραίτητες υπό οιοσδήποτε συνθήκες αύξησης των βακτηρίων. ⁽²¹⁴⁾ Αποκαλούνται και **γονίδια κυτταρικής οικονομίας ή διατηρημένα γονίδια**

(**housekeeping genes**) και βρίσκονται σε όλα τα βακτηριακά κύτταρα. Το σταθερό γενετικό υλικό διαφοροποιείται μέσω μεταλλάξεων (mutation) που εμφανίζονται με χαρακτηριστικό ρυθμό ή μέσω της διαδικασίας του γενετικού ανασυνδυασμού (recombination) με αντικατάσταση μικρών χρωμοσωμικών τμημάτων σε ομόλογα τμήματα συγγενικών στελεχών. (215)

➤ **Το πρόσθετο ή κινητό γενετικό υλικό** προέρχεται συνήθως από άλλους μικροοργανισμούς και χαρακτηρίζεται από την ιδιότητα της οριζόντιας μετακίνησης μεταξύ των μικροοργανισμών. Στο πρόσθετο γενετικό υλικό περιλαμβάνονται τα πλασμίδια, τα μεταθετόνια ή τρανσποζόνια (transposons, tns), γονίδια που μεταφέρονται με φάγους καθώς και γονίδια παθογονικότητας και ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Στα κινητά στοιχεία του γενετικού κώδικα οφείλεται η συνεχής εξέλιξη των μικροοργανισμών και η εμφάνιση ανθεκτικών στα αντιβιοτικά μικροοργανισμών και στελεχών με νέους μηχανισμούς παθογονικότητας μέσω του φαινομένου της οριζόντιας μεταφοράς του γενετικού υλικού.

Η **οριζόντια μεταφορά γενετικού υλικού** ως φαινόμενο αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1959 σε δημοσίευση στην Ιαπωνία, η οποία αφορούσε την μεταφορά αντοχής στα αντιβιοτικά μεταξύ διαφορετικών μικροοργανισμών. (216, 217) Στα μέσα της δεκαετίας του 1980 γίνεται εκ νέου αναφορά από τον Syvanen *et al* (218) στον μηχανισμό μεταφοράς γονιδίων, ο οποίος αναφέρεται ως εξαιρετικά σημαντικός βιολογικός μηχανισμός για την εξελικτική ιστορία των ειδών από τις απαρχές της ζωής στην Γη.

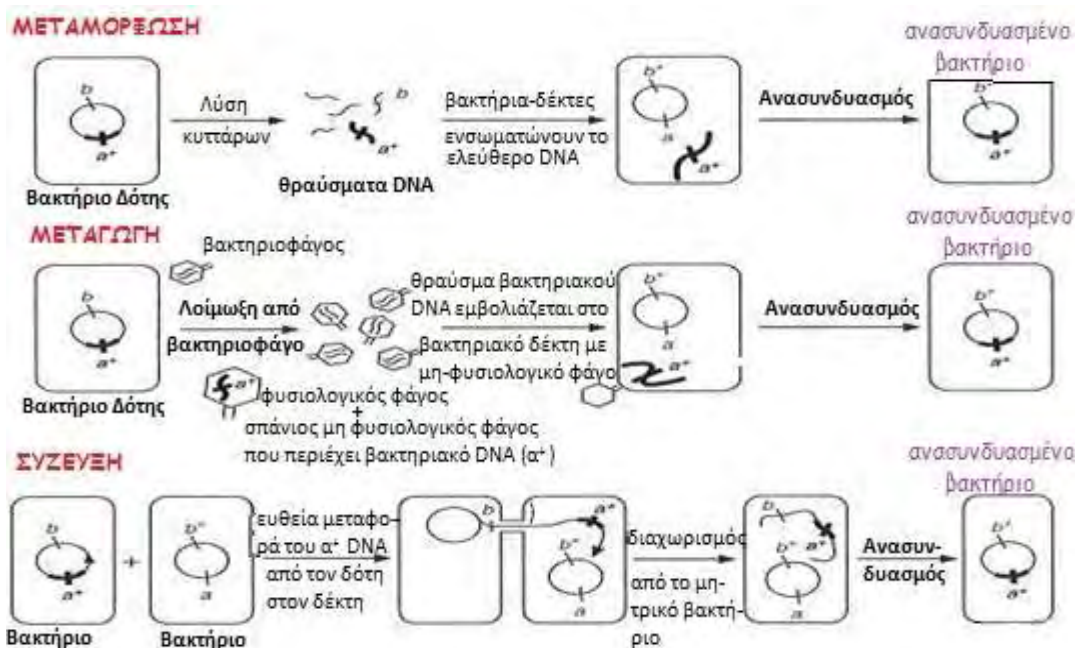
Στα βακτήρια ο **γενετικός ανασυνδυασμός (Recombination)** (214) που έχει σαν αποτέλεσμα την οριζόντια μεταφορά γονιδίων, αφορά την μεταφορά DNA από ένα χρωμόσωμα δότη σε ένα κύτταρο-δέκτη. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων επιτυγχάνεται είναι:

- *Μετασχηματισμός ή Μεταμόρφωση (transformation)*
- *Μεταγωγή (transduction)*
- *Σύζευξη (conjugation)*

• Το φαινόμενο του **μετασχηματισμού (transformation)** (**Εικόνα 21A**) αφορά την ικανότητα ορισμένων μικροοργανισμών να ενσωματώνουν ελεύθερο DNA από το περιβάλλον. Το ελεύθερο DNA προέρχεται από νεκρά και λυμένα μικροβιακά κύτταρα του περιβάλλοντος. Οι πνευμονιόκοκκοι αποτελούν παράδειγμα μικροβιακού είδους με μεγάλη ικανότητα μεταμόρφωσης.

• Η μεταφορά γενετικού υλικού μέσω των ιών, κυρίως φάγων, ονομάζεται **μεταγωγή (transduction)** (**Εικόνα 21B**) και αφορά ειδικούς ιούς που παρασιτούν μόνο σε βακτήρια. Η μεταφορά του γενετικού υλικού γίνεται ως παρενέργεια του πολλαπλασιασμού του φάγου κατά την διάρκεια του λυτικού κύκλου-*γενικευμένη μεταγωγή (generalized transduction)*-όπου λόγω του πολλαπλασιασμού του φάγου έχουμε την λύση του μικροβιακού κυττάρου και την ενσωμάτωση γενετικού υλικού σε θυγατρικά σωματίδια φάγου, που στην συνέχεια μολύνουν άλλα βακτηριακά κύτταρα. Επίσης μεταφορά γενετικού υλικού επιτυγχάνεται και κατά τον λυσιγόνο κύκλο του φάγου-*εξειδικευμένη μεταγωγή (specificied transduction)* -όπου ο πολλαπλασιασμός του φάγου περιλαμβάνει μία φάση ενσωμάτωσης του DNA του φάγου στο DNA του βακτηρίου. Σε μία μεταγενέστερη φάση αποκόλλησης του DNA φάγου, ενδεχόμενα να συμπαρασύρει και γειτονικό DNA βακτηρίου που στην συνέχεια μεταφέρεται σε νέο βακτήριο.

• Η **σύζευξη (conjugation)** (Εικόνα 21Γ): είναι μια διαδικασία γενετικής μεταφοράς που βασίζεται στην άμεση επαφή κυττάρων. Ο μηχανισμός σύζευξης κωδικοποιείται από τα πλασμίδια. Τα **πλασμίδια** είναι κυκλικά μόρια δίκλωνου DNA, τα οποία βρίσκονται εκτός του χρωμοσωμικού DNA, ως βοηθητικό διαθέσιμο γενετικό υλικό και αναπαράγονται ανεξάρτητα από το DNA του βακτηρίου. Οι γενετικές πληροφορίες για την αναπαραγωγή τους παρέχονται αποκλειστικά από τα βακτήρια που τα φιλοξενούν. Στο γενετικό υλικό των πλασμιδίων δεν περιλαμβάνονται γονίδια βασικού μεταβολισμού και ανάπτυξης. Φέρουν γονίδια τα οποία επιτρέπουν στο κύτταρο να τα εκμεταλλευτεί περιοδικά σε ιδιαίτερες περιβαλλοντικές συνθήκες. Στα γονίδια των πλασμιδίων περιλαμβάνονται γονίδια παθογονικότητας και αντοχής στα αντιβιοτικά, γονίδια αντοχής σε τοξική επίδραση βαρέων μετάλλων (υδράργυρο, κάδμιο, άργυρο κ.α.), γονίδια λοιμογόνων παραγόντων, γενετικές πληροφορίες για την μετακίνηση τους μεταξύ των μικροοργανισμών καθώς επίσης και γονίδια για την επιδιόρθωση του DNA. Τα πλασμίδια αντοχής στα αντιβιοτικά συνήθως κωδικοποιούν πληροφορίες έναντι πολλών αντιβιοτικών και μάλιστα εκείνων που βρίσκονται στην πρώτη γραμμή της αντιμικροβιακής θεραπείας. Τα περισσότερα πλασμίδια που φέρουν γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά είναι και συζευκτικά, διαθέτουν δηλαδή πληροφορίες για την μετακίνηση τους μέσω της μικροβιακής σύζευξης αλλά και για την μετακίνηση μη συζευκτικών πλασμιδίων.



Εικόνα 21. Η μεταμόρφωση, η μεταγωγή και η σύζευξη ως φαινόμενα οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού διαφέρουν ως προς τον τρόπο με τον οποίο εισάγουν το τμήμα του DNA-δότη. (βλέπε κείμενο) (Medical Microbiology, 4th edition, Baron S, editor)

Το μέγεθος των πλασμιδίων κυμαίνεται από μόλις 2-3 γονίδια (2-3kb) και μπορεί να φθάσει μέχρι και το 10% του χρωμοσώματος που τα φιλοξενεί (ισοδύναμο με 400 γονίδια ανά πλασμίδιο ή και περισσότερο). Τα πλασμίδια που φέρουν γονίδια αντοχής σε αντιβιοτικά και λοιμογόνους παράγοντες συνήθως κωδικοποιούν και πληροφορίες για την διαδικασία της σύζευξης και μεταφοράς του DNA πλασμιδίου από κύτταρο σε κύτταρο. ⁽²¹⁹⁾

Μετάθεση (transposition): Η ακριβής διευθέτηση των γονιδίων κατά μήκος του χρωμοσώματος σ' ένα βακτηριακό χρωμόσωμα, δεν είναι αναγκαστικά μονίμως σταθερή. Μερικά γονίδια μπορούν υπό ορισμένες συνθήκες να αλλάζουν θέση. Η διαδικασία με την οποία ένα γονίδιο μετακινείται από μία θέση σε μια άλλη στο γονιδίωμα λέγεται μετάθεση και είναι μια σημαντική διαδικασία τόσο για την εξέλιξη όσο και για την γενετική ανάλυση. Υπάρχουν τέσσερις τύποι μεταθετών στοιχείων στα Βακτήρια:

- τα μεταθετόνια ή τρανσποζόνια (trasponsons, tns),
- οι αλληλουχίες ένθεσης (insertion sequences, IS),
- ορισμένοι ειδικοί ιοί (όπως ο Mu)
- οι νησίδες παθογονικότητας.

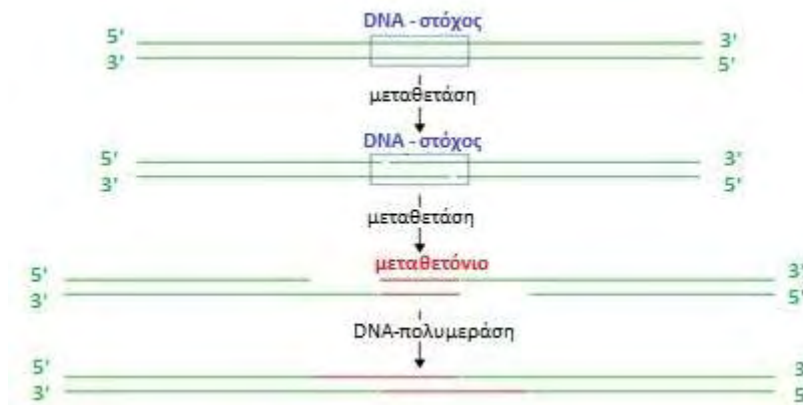
Τα μεταθετά στοιχεία αποτελούν γενετικές δομές που βρίσκονται τόσο στο χρωμόσωμα, όσο και στα πλασμίδια και χαρακτηρίζονται από την αξιοσημείωτη ιδιότητα τους να μετακινούνται από μόριο σε μόριο DNA αλλά και κατά μήκος του ίδιου μορίου DNA. Αρχικά ανακαλύφθηκαν από την Αμερικανίδα γενετίστρια **Barbara McClintock** (1902-1992), την δεκαετία του 1940, που είχε ως αντικείμενο έρευνας, την μοριακή βάση της χρωματικής απόκλισης των σπόρων του αραβοσίτου. Ερμήνευσε τις παρατηρήσεις της στο επίπεδο της γονιδιακής ρύθμισης, από κάποιου είδους ρυθμιστικά στοιχεία ικανά να μετακινούνται από θέση σε θέση στα χρωμοσώματα. Η σπουδαιότητα της πρωτοπόρας αυτής ανακάλυψης εκτιμήθηκε αρκετά χρόνια αργότερα και βραβεύτηκε με το **βραβείο Νόμπελ Φυσιολογίας-Ιατρικής το 1983**. Χρειάστηκε μισός αιώνας από τις παρατηρήσεις της, για την κατανόηση του τρόπου δράσης των μεταθετών στοιχείων και τον σημαντικό τους ρόλο στην εξέλιξη των γενωμάτων και την γονιδιακή ρύθμιση. ⁽²²⁰⁾

Οι αλληλουχίες ένθεσης (insertion sequences, IS) και τα μεταθετόνια ή τρανσποζόνια (trasponsons, tns), έχουν δύο κοινές χαρακτηριστικές ιδιότητες: Αφ' ενός διαθέτουν γονίδια που κωδικοποιούν μια μεταθετάση, το απαραίτητο ένζυμο για την μετάθεση, και αφ' ετέρου διαθέτουν μικρές ανάστροφες ακραίες επαναλήψεις (inverted repeats) στο DNA τους, που αποτελούνται από 20-100 βάσεις και περιέχουν πληροφορίες για την μετακίνηση τους.

Δύο μηχανισμοί μετάθεσης είναι γνωστοί ο αντιγραφικός και ο συντηρητικός:

- **Αντιγραφικός μηχανισμός μετάθεσης**, τύπου «αντιγραφής και ενσωμάτωσης» («copy and paste mechanism»): Στο μηχανισμό αυτό περιλαμβάνεται η μεταγραφή του DNA του μεταθετού στοιχείου αρχικά σε RNA και εν συνεχεία μέσω της δράσης μιας αντίστροφης μεταγραφάσης ξανά σε DNA, το οποίο ενσωματώνεται στην νέα του θέση στο γένωμα. Μετά την ολοκλήρωση της μετάθεσης, *ένα* αντίγραφο του μεταθετού στοιχείου παραμένει στην αρχική του θέση και *ένα άλλο αντίγραφο* βρίσκεται στη νέα του θέση, οπότε τα αντιγραφικά μεταθετά στοιχεία *διπλασιάζονται*. Με την διαδικασία αυτή μεταγράφονται τα ρετρομεταθετόνια ή κατηγορίας I και ο βακτηριοφάγος Mu.

- **Συντηρητικός μηχανισμός μετάθεσης**, τύπου «αποκοπής και ενσωμάτωσης» («cut and paste mechanism»): Σ αυτό το είδος της μετάθεσης, το μεταθετό στοιχείο αποκόπεται από μία περιοχή του χρωματοσώματος και εντίθεται σε μία άλλη περιοχή του.



Εικόνα 22. Μετάθεση DNA μεταθετονίων-τρανσποζονίων της κατηγορίας II με τον μηχανισμό αποκόπτης και ενσωμάτωσης (συντηρητικός μηχανισμός).

Η μετάθεση καταλύεται από το ένζυμο μεταθετάση, η δράση του οποίου είναι κλιμακωτή. Αρχικά κόβει την αλληλουχία του DNA σε ένα σημείο-στόχο, παράγοντας κολλώδη άκρα και εν συνεχεία αποκόπτει το μεταθετόνιο και μέσω μιας λιγάσης το τοποθετεί στο σημείο-στόχο. Μια DNA πολυμεράση συμπληρώνει τα κενά που δημιουργούνται από τα κολλώδη άκρα και η DNA λιγάση κλείνει τα κενά με φωσφοδιεστερικό δεσμό. Η όλη διεργασία έχει ως αποτέλεσμα, ο αριθμός των αντιγράφων του μεταθετού στοιχείου να παραμένει σταθερός. Μ' αυτόν τον μηχανισμό μεταγράφονται τα μεταθετόνια κατηγορίας II.

Για τον μηχανισμό της μετακίνησης των μεταθετονίων δεν απαιτείται DNA ομολογία, μεταξύ της αλληλουχίας των μεταθετών στοιχείων και της θέσης ενσωμάτωσης αυτών, παρότι υπάρχουν παραδείγματα όπου συγκεκριμένα μεταθετόνια εμφανίζονται να έχουν ισχυρή προτίμηση σε συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του σημείου ενσωμάτωσης. Τα περισσότερα εξ αυτών εμφανίζουν μια μη προφανή προτίμηση και ενσωματώνονται κατά ένα μάλλον τυχαίο τρόπο. ^(221, 222) Τα σύνθετα μεταθετόνια αποτελούνται από δύο αλληλουχίες ένθεσης (IS) που περιλαμβάνουν σειρά γονιδίων παθογονικότητας και αντοχής στα αντιβιοτικά.

Ειδική κατηγορία μεταθετονίων-τρανσποζονίων είναι αυτά που φέρουν επιπλέον γονίδια αντίστασης στα αντιβιοτικά και ανήκουν στην **Tn οικογένεια**. Επειδή τα μεταθετόνια των βακτηρίων προσδίδουν τόσο αντοχή στα αντιβιοτικά όσο και ικανότητα μετάθεσης σε συζευκτικά πλασμίδια, η παραδοσιακή θεραπεία των βακτηριακών λοιμώξεων μπορεί να αποδειχτεί προβληματική.

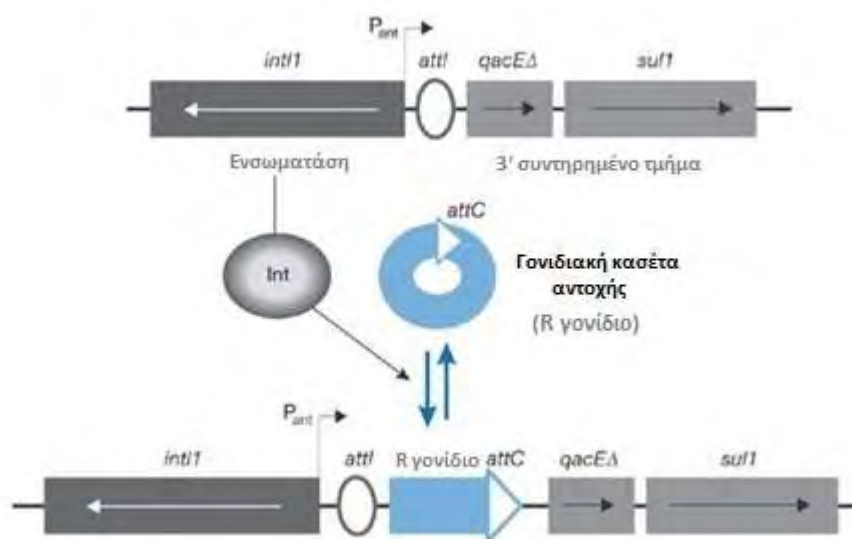
Τα μεταθετόνια, μέλη της οικογένειας Tn, περιέχουν χαρακτηριστικά γενετικά στοιχεία που τους προσδίδουν ακόμα πιο αξιοθαύμαστες ιδιότητες, τα **ενσωματώνια** ή **ιντεγκρόνια** (**integrons**), τα οποία έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν και να ενσωματώνουν εξωγενή κινητά γονίδια όπως γονίδια αντοχής σε αντιβιοτικά. Τα γονίδια τα οποία αναγνωρίζονται και ενσωματώνονται από τα ενσωματώνια έχουν μια ιδιαίτερη δομή που ονομάζεται **γονιδιακή κασέτα** (**gene cassette**). ⁽²²³⁾ Τα ενσωματώνια στην απλούστερη μορφή τους αποτελούνται από τρία απαραίτητα στοιχεία για την ενσωμάτωση και την έκφραση των εξωγενών γονιδίων: το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο **ενσωμάτωση ή ιντεργκράση** (integrase intI), μία αλληλουχία ανασυνδυασμού ειδικής θέσης (aatI) και έναν υποκινητή

για την έκφραση των ενσωματωμένων γονιδιακών κασετών. (224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236)

Οι γονιδιακές κασέτες υπάρχουν ελεύθερες, ως κλειστά κυκλικά μόρια που προέκυψαν από εκτομή μέσω της ενσωμάτωσης από παλαιότερες γονιδιακές κασέτες, στο ίδιο ή σε άλλο ενσωματώνιο. (237) Οι γονιδιακές κασέτες έχουν ιδιαίτερα δομικά χαρακτηριστικά και αποτελούνται από ένα μόνο γονίδιο και μία ατελή αναστραμμένη επανάληψη (inverted repeat IR), γνωστή ως αλληλουχία ανασυνδυασμού ειδικής θέσης attC. Η κινητικότητα των γονιδιακών κασετών εξαρτάται: από την ενσωμάτωση, από την ειδική θέση ανασυνδυασμού attI του ενσωματωνίου και από την ειδική θέση ανασυνδυασμού attC της κασέτας.

Η ενσωμάτωση συνδέεται με την περιοχή attI του ενσωματωνίου και με την περιοχή attC της γονιδιακής κασέτας, επιτρέποντας την ενσωμάτωση και την εκτομή γονιδίων. Έχει ενδιαφέρον το γεγονός ότι τα γονίδια που ενσωματώνονται στην attI περιοχή έχουν μορφή κασέτας, η οποία ακολουθείται από συντηρημένη περιοχή 59 βάσεων (59 base element) και η ενσωμάτωση των νέων γονιδίων γίνεται στην 5' περιοχή, μεταξύ των ήδη υπαρχόντων γονιδίων και των προαγωγών.

Οι γονιδιακές κασέτες δεν διαθέτουν υποκινητές και εκφράζονται μέσω του υποκινητή των ενσωματωνίων. Επίσης παρατηρήθηκε μεγαλύτερο επίπεδο έκφρασης και αντοχής των γονιδιακών κασετών που συνορεύουν άμεσα με την 5' συντηρημένη περιοχή των ενσωματωνίων. Έχουν περιγραφεί όμως και γονιδιακές κασέτες που διαθέτουν δικό τους υποκινητή με παράδειγμα την κασέτα αντοχής στην χλωραμφενικόλη (cmlA). (238)



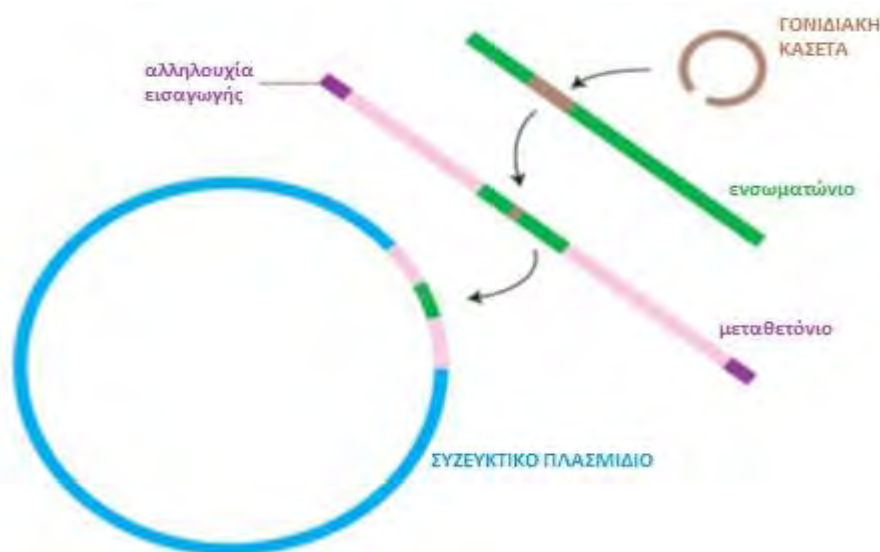
Εικόνα 23. Μηχανισμός ενσωμάτωσης γονιδιακής κασέτας με αντοχή στα αντιβιοτικά. Η ενσωμάτωση είναι υπεύθυνη για την ενσωμάτωση μιας κυκλικής γονιδιακής κασέτας, μέσω κατάλυσης της ειδικής θέσης ανασυνδυασμού attC θέσης της κασέτας και της ειδικής θέσης ανασυνδυασμού attI του ενσωματωνίου.

Έχουν αναγνωριστεί πάνω από 80 γονιδιακές κασέτες αντοχής στα ενσωματώνια της τάξης 1 που κωδικοποιούν γονίδια αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά, σε όλες τις αμινογλυκοσίδες, την χλωραμφενικόλη, τριμεθοπρίμη, ριφαμπικίνη, ερυθρομυκίνη, φωσφομυκίνη και λινομυκίνη. Μόνον 6 γονιδιακές κασέτες αντοχής σχετίζονται με ενσωματώνια της

τάξης 2. Οι γονιδιακές κασέτες των χρωμοσωμικών ενσωματωμάτων συνήθως είναι μοναδικές για το είδος του ξενιστή και πέραν των γονιδίων αντοχής, κωδικοποιούν και πρωτεΐνες για διάφορες μεταβολικές λειτουργίες που σχετίζονται με την προσαρμογή τους σε δυσμενές περιβάλλον, όπως γονίδια τοξινών, λιποπρωτεϊνών, περιοριστικών ενδονουκλεασών και γονίδια λοιμογόνων παραγόντων. ⁽²³⁶⁾

Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι στο ίδιο ενσωματώσιο αρκετές γονιδιακές κασέτες αντοχής παρουσιάζουν ομολογία στην αλληλουχία των γονιδίων αντοχής με αποτέλεσμα να εμφανίζουν φαινότυπο αντοχής όταν βρίσκονται υπό συνθήκες πίεσης επιλογής αντιβιοτικών. Συνεπώς τα ενσωματώσια λειτουργούν ως ένα γενικευμένο σύστημα ενσωμάτωσης και ανταλλαγής γενετικού υλικού που επιτρέπει στα βακτήρια γρήγορη προσαρμογή σε περιβαλλοντικές αλλαγές και όχι κατ' ανάγκη μόνον σε περιπτώσεις πίεσης επιλογής λόγω χρήσης αντιβιοτικών.

Η κλινική σημασία των ενσωματωμάτων και των γονιδιακών κασετών που αυτά προσλαμβάνουν, μοιάζει προφανής. Αυτό όμως που δεν είναι τόσο προφανές είναι η προέλευση των ίδιων των γονιδιακών κασετών. Δεν αποτελούν απλώς τυχαία γονίδια που μπορούν να μεταφερθούν, αλλά γονίδια μέσα σε ειδικές αλληλουχίες DNA, που αναγνωρίζονται από την ενσωμάτωση, και γονίδια που δεν εκφράζονται έως ότου ενσωματωθούν δίπλα σε έναν υποκινητή του ενσωματωμένου. ⁽²¹⁴⁾



Εικόνα 24. Η αρθρωτή και ιεραρχική σύνθεση των κινητών γενετικών στοιχείων. Οι γενετικές κασέτες ενσωματώνονται μέσω της ειδικής θέσης ανασυνδυασμού της κασέτας attC και της ειδικής θέσης ανασυνδυασμού attI του ενσωματωμένου από την ενσωμάτωση. Τα ενσωματώσια μπορούν να ενσωματωθούν στα σύνθετα μεταθετόνια, τα οποία με την σειρά τους έχουν την ικανότητα ενσωμάτωσης σε πλασμίδια και καθίστανται τελικώς μέρος μίας κοινής δεξαμενής για την μεταγωγή γενετικών πληροφοριών. ⁽²³⁹⁾

Ο βακτηριοφάγος Mu είναι ένας ήπιος ιός αλλά έχει την ασυνήθιστη ιδιότητα να αντιγράφεται ως μεταθετό στοιχείο. Ο φάγος αυτός παίρνει το όνομα του από την αγγλική λέξη mutator, επειδή προκαλεί μεταλλάξεις στο γονιδίωμα του ξενιστή στον οποίο ενσωματώνεται. Η μεταλλαξιγόνα ιδιότητα του Mu οφείλεται στο ότι το γονιδίωμα του ιού μπορεί να εισαχθεί στο χρωμόσωμα, ανάμεσα σε γονίδια του ξενιστή, απενεργοποιώντας τα (επομέ-

ως, ο ξενιστής που προσβλήθηκε από τον *Mu* συμπεριφέρεται ως μεταλλαγμένος). Πρόκειται για έναν ιό που πολλαπλασιάζει το DNA του με τον μηχανισμό της μετάθεσης. ⁽²¹⁴⁾

Άλλα κινητά τμήματα του DNA είναι οι **νησίδες παθογονικότητας (*pathogenicity islands*)**. Πρόκειται για μεγάλα τμήματα του DNA, που φέρουν γονίδια παθογονικότητας και αντοχής. Οι νησίδες αυτές μετακινούνται δύσκολα μεταξύ των μικροοργανισμών, πιθανώς λόγω του μεγέθους τους. Περιβάλλονται από ανάστροφες αλληλουχίες, ενδεικτικό του γεγονότος ότι προέρχονται από άλλο μικροβιακό είδος, από το οποίο μεταφέρθηκαν σε κάποια στιγμή της εξελικτικής διαδικασίας. ⁽²⁴⁰⁾

Συμπερασματικά η εξέλιξη των μικροβιακών κλώνων, η παραγόμενη ποικιλομορφία και η διαμόρφωση των επάλληλων γενεών των μικροοργανισμών, εξαρτάται από τον ρυθμό των μεταλλάξεων και την ικανότητα οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού σε συγκεκριμένες συνθήκες που αυτά διασπείρονται. Κάθε μικροβιακό είδος αποτελείται από ένα άθροισμα μικροβιακών κλώνων, που εξελίσσονται αφ' ενός μέσω μεταλλάξεων και ανασυνδυασμού του γενετικού τους υλικού και αφετέρου μέσω συνεχούς ανταλλαγής γενετικού υλικού είτε μεταξύ τους είτε με άλλα μικροβιακά είδη.

Η μελέτη της δομής των πληθυσμών που απαρτίζουν τα μικροβιακά είδη, αποτελεί το αντικείμενο μιας νέας σχετικά επιστήμης της **Πληθυσμιακής Γενετικής**. ^(241, 242) Στην Πληθυσμιακή Γενετική η μέθοδος της MLST έχει συμβάλλει μέσω των μελετών των αλληλουχιών των διατηρημένων γονιδίων και των μηχανισμών μέσω των οποίων τα γονίδια αυτά διαφοροποιούνται. Τα συμπεράσματα της Πληθυσμιακής Γενετικής είναι εξαιρετικά χρήσιμα στην κατανόηση της φυλογένεσης, της επιδημιολογίας και της εξέλιξης της παθογένειας των μικροοργανισμών. Μέσω αυτής της προσέγγισης έχει βρεθεί ότι ο *S.aureus*, ο ανθεκτικός στην μεθικιλίνη (MRSA), είναι αποτέλεσμα της εισαγωγής του γονιδίου *mec* σε περιορισμένο αρχικά αριθμό κλώνων και εν συνεχεία στην παγκόσμια διασπορά αυτών. ⁽²⁴³⁾ Αντίστοιχα, ανάλογη προσέγγιση βοήθησε στην κατανόηση της γενετικής πολυμορφίας της *E.coli*, του μηνιγγιτιδόκοκκου και του τρόπου διασποράς των ανθεκτικών κλώνων του πνευμονιόκοκκου. ^(244, 245, 246) Επίσης αυτές οι μελέτες βοηθούν στην κατανόηση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των διαφόρων μικροοργανισμών. Με βάση τον βαθμό ποικιλομορφίας τους, οι μικροοργανισμοί μπορούν να ταξινομηθούν σε ένα ευρύ φάσμα το οποίο ξεκινά από τα είδη που εμφανίζουν μικρή ποικιλομορφία (μικρή συχνότητα ανασυνδυασμού και ικανότητα ανταλλαγής γενετικού υλικού) και συνεπώς η κλωνικότητα τους είναι εμφανής. Ένα τέτοιο είδος είναι οι σαλμονέλες που μετά από μελέτες διαπιστώθηκε ότι η *Salmonella typhi* απαρτίζεται από μόλις τέσσερες κλώνους και οι πληθυσμοί του βακτηρίου αυτού διατηρούν με την πάροδο του χρόνου την γενετική τους ομοιογένεια, με αποτέλεσμα την μεγάλη δυσκολία διαχωρισμού μεταξύ των διαφόρων κλώνων και των επιδημιολογικά σχετιζόμενων μεταξύ τους, στελεχών. ⁽²⁴⁷⁾ Στο άλλο άκρο του φάσματος υπάρχουν είδη μικροοργανισμών με έντονο το φαινόμενο της οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού. Εδώ το αντιπροσωπευτικό παράδειγμα είναι ο πνευμονιόκοκκος, ο οποίος με το φαινόμενο της μεταμόρφωσης, εμφανίζει επάλληλες γενεές που έχουν χάσει την γενετική τους ομοιότητα και συχνά παρατηρείται το φαινόμενο επιδημιολογικά σχετιζόμενα στελέχη, που μάλλον ανήκουν στον ίδιο κλώνο, να εμφανίζονται γενετικά ανάμοια, δυσκολεύοντας την παρακολούθηση της διασποράς των κλώνων του μικροοργανισμού.

1.10. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ

Αν και γνωρίζουμε ότι οι προκαρυώτες είναι πανάρχαιοι οργανισμοί, όπως μαρτυρούν και τα μικροαπολιθώματα κυττάρων που βρέθηκαν σε πετρώματα ηλικίας περίπου 3,5 δισεκατομμυρίων ετών, μέχρι και πριν από 20 περίπου χρόνια οι ερευνητές δεν διέθεταν αποτελεσματικά εργαλεία για να διασαφηνίσουν τις εξελικτικές σχέσεις και να τυποποιήσουν ορθά τους μικροοργανισμούς.⁽²¹⁴⁾ Αυτό είναι κάτι που μπορεί να γίνει σήμερα, σχεδόν σε επίπεδο ρουτίνας, με την βοήθεια των μοριακών μεθόδων, που περιλαμβάνουν την συγκριτική ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεϊκών οξέων, καθώς και με την ραγδαία εξέλιξη προγραμμάτων τρίτης γενιάς των ηλεκτρονικών υπολογιστών. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών δίνουν μια ασφαλή εικόνα της μικροβιακής φυλογένεσης και μας προμηθεύουν με νέα ερευνητικά εργαλεία για την μικροβιακή οικολογία και την Κλινική Διαγνωστική.

1.10.1. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Ορισμένα γονίδια των κυττάρων αποτελούν χρονόμετρα-μετρητές των εξελικτικών αλλαγών. Η εξελικτική απόσταση μεταξύ των μικροοργανισμών μπορεί να υπολογιστεί από τις διαφορές στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων σε ομόλογα μακρομόρια που απομονώνουμε από αυτούς. Αυτό συμβαίνει διότι ο αριθμός των διαφορών στην αλληλουχία ενός μακρομορίου είναι ανάλογος με τον αριθμό των σταθερών μεταλλάξεων οι οποίες παγιώνονται στο DNA που κωδικοποιεί για το μόριο αυτό. Προκειμένου να διευκρινιστούν οι πραγματικοί εξελικτικοί συσχετισμοί, είναι απαραίτητο να επιλεγούν τα κατάλληλα γονίδια για τις μελέτες των αλληλουχιών. Αυτό είναι σημαντικό για αρκετούς λόγους: ⁽²¹⁴⁾

- τα γονίδια πρέπει να έχουν μια οικουμενική διασπορά στην ομάδα που έχουμε αποφασίσει να μελετήσουμε.
- πρέπει να είναι λειτουργικώς ομόλογα διότι οι φυλογενετικές συγκρίσεις πρέπει να έχουν ως αφετηρία μόρια με πανομοιότυπη λειτουργία.
- είναι σημαντικό το να μπορούμε να αντιστοιχίσουμε επακριβώς δύο γονίδια, έτσι ώστε να αναγνωρίσουμε περιοχές των αλληλουχιών που είναι όμοιες και άλλες που διαφέρουν.
- η αλληλουχία του επιλεγμένου γονιδίου πρέπει να μεταβάλλεται με ρυθμό κατάλληλο για την μετρούμενη εξελικτική απόσταση. Και μάλιστα, όσο μεγαλύτερη είναι η απόσταση που μετριέται τόσο βραδύτερος πρέπει να είναι ο ρυθμός μεταβολής της αλληλουχίας. Οι πολλές αλλαγές καθιστούν δυσανάγνωστο το εξελικτικό αρχείο.

1.10.2. ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΑ ΔΕΝΔΡΑ

Trees and Dedrograms

Όταν ολοκληρώνεται η Ανάλυση Αλληλουχίας, τα δεδομένα είναι έτοιμα για επεξεργασία με κατάλληλα προγράμματα βιοπληροφορικής. Υπάρχουν αρκετά προγράμματα με διαφορετικούς αλγόριθμους ανάλυσης αλληλουχιών και δημιουργίας φυλογενετικών δέντρων και δενδρογραμμάτων που είναι διαθέσιμοι για συγκριτική μελέτη. Ανεξάρτητα από

ποιό πρόγραμμα χρησιμοποιείται, οι αλληλουχίες πρέπει να αντιστοιχιστούν με τη χρήση επιμελητή αλληλουχιών. Οι στοιχημένες αλληλουχίες εισάγονται κατόπιν στο καθαυτό πρόγραμμα προσδιορισμού διακλαδώσεων και γίνονται οι συγκριτικές αναλύσεις.

Δύο είναι οι αλγόριθμοι ευρείας εφαρμογής, η **απόσταση (distance)** και η **φειδώ (parsimony)**.⁽²¹⁴⁾

• Με την εφαρμογή μεθόδων «απόστασης», οι αλληλουχίες αντιστοιχίζονται και ο υπολογιστής μετρά κάθε δυνατή θέση στα δεδομένα στην οποία υπάρχει *διαφορά*, για να υπολογίσει κάθε **εξελικτική απόσταση (E_D)**. Από τα δεδομένα αυτά μπορεί να κατασκευαστεί ένας πίνακας που να δείχνει την **E_D** μεταξύ οποιουδήποτε ζεύγους αλληλουχιών στο σύνολο των δεδομένων. Μετά από αυτό εισάγεται ένας *διορθωτικός παράγοντας*, ο οποίος συνυπολογίζει την πιθανότητα να έχουν συμβεί πολλαπλές αλλαγές σε ένα συγκεκριμένο σημείο. Για παράδειγμα υπάρχει μια χαμηλή, αλλά στατιστικά σημαντική, πιθανότητα ότι η βάση που υφίσταται σε ένα οποιοδήποτε σημείο δύο αλληλουχιών είναι αποτέλεσμα δύο μεταλλάξεων, μιας που τελικά μετέβαλλε την αλληλουχία και μιας δεύτερης που επανέφερε την βάση στην προηγούμενη κατάσταση. Αυτές οι πιθανότητες μπορούν να υπολογιστούν, ώστε να προκύψει ο διορθωτικός παράγοντας. Τέλος κατασκευάζεται ένα φυλογενετικό δέντρο στο οποίο οι αποστάσεις των γραμμών είναι ανάλογες των εξελικτικών αποστάσεων. Ένα παράδειγμα κατασκευής δενδρογράμματος «απόστασης» που για τις ανάγκες της αναπαράστασης, απεικονίζονται μόνο μικρές αλληλουχίες:

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΓΟΝΙΔΙΟΥ	ΑΝΑΛΥΣΗ
A	CGT AGA CCT GAC	A→B, 3 διαφορές στα 12 νουκλεοτίδια. Άρα η εξελικτική απόσταση είναι: $3/12=0,25$
B	CCT AGA GCT GGC	
C	CCA AGA CGT GGC	
D	GCT AGA TGT GCC	

Πίνακας 2. Αντιστοίχιση και Αλληλούχιση εικονικού γονιδίου.

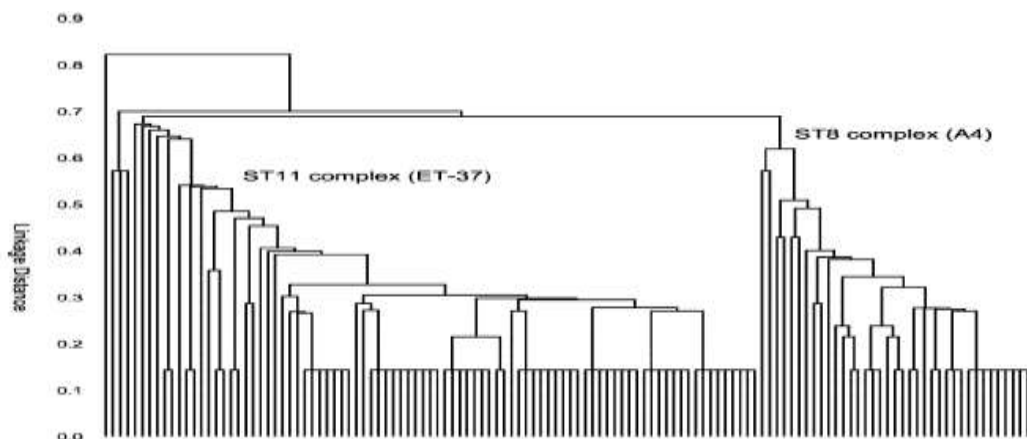
ΣΤΕΛΕΧΗ	ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗ ΑΠΟΣΤΑΣΗ E _D	ΔΙΟΡΘΩΜΕΝΗ E _D
A→B	0,25	0,30
A→C	0,33	0,44
A→D	0,42	0,61
B→C	0,25	0,30
B→D	0,33	0,44
C→D	0,33	0,44

Πίνακας 3. Υπολογισμός της εξελικτικής απόστασης.

Το δενδρόγραμμα που δημιουργείται τελικά (**Εικόνα 25**) μέσω ανάλυσης των δεδομένων σε συγκεκριμένα προγράμματα σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, είναι τέτοιο ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη συμφωνία. Το ολικό μήκος των κλάδων που χωρίζουν δύο οιοσδήποτε οργανισμούς είναι ανάλογο προς την υπολογισθείσα μεταξύ τους εξελικτική απόσταση. Στις πραγματικές αναλύσεις χρησιμοποιείται κατά κανόνα μια στατιστική διεργασία που ονομάζεται **boot-strapping**, με την οποία δημιουργούνται θεωρητικά εκατοντάδες εκδοχές του δένδρου, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι το τελικό αποτέλεσμα παρουσιάζει πράγματι την βέλτιστη συμφωνία για το σύνολο των δεδομένων και εκφράζεται επί τοις %.

Ο αλγόριθμος «φειδώ» (parsimony) μια άλλη δημοφιλής μέθοδος φυλογενετικής ανάλυσης, δημιουργεί φυλογενετικά δένδρα βασιζόμενος στην παραδοχή ότι για την από-

κλιση δύο απογόνων, προερχόμενων από έναν κοινό πρόγονο, έχει συμβεί μόνον ο ελάχιστος αριθμός μεταβολών στις αλληλουχίες.



Εικόνα 25. Ένα παράδειγμα δένδρογράμματος απόστασης (distance) των κλωνικών συμπλεγμάτων ST8 και ST11, τα οποία μοιράζονται κοινά γονίδια από ≥ 3 γονίδια από τα 7 της MLST. Τα δεδομένα προέρχονται από την ιστοσελίδα της MLST που αφορά τα στελέχη *Neisseria*.

Όπως και στα προγράμματα «απόστασης», στη μέθοδο απαιτείται να γίνει σύνοψη του αριθμού των διαφορών που υπάρχουν στις αλληλουχίες σε ένα συγκεκριμένο σύνολο δεδομένων, όμως ο αλγόριθμος εφαρμόζει μια κάπως διαφορετική ανάλυση. Παρ' όλα αυτά τα φυλογενετικά δένδρα που στηρίζονται στον αλγόριθμο «φειδώ» εμφανίζονται όμοια με τα δένδρα «απόστασης», αν και η διάταξη των κλάδων ενδέχεται να διαφέρει, και πράγματι αυτό συμβαίνει σε δένδρα προερχόμενα και από τους δύο αλγορίθμους οι οποίοι έχουν εφαρμοστεί σε πανομοιότυπα σύνολα δεδομένων.

Επομένως, κανένα συγκεκριμένο φυλογενετικό δένδρο δεν μπορεί να δώσει την «οριστική απάντηση» στις εξελικτικές σχέσεις των οργανισμών που εξετάζονται. Αυτό όμως που επιτυγχάνεται είναι μια κατά δυνατόν προσέγγιση της πραγματικότητας των σχέσεων.

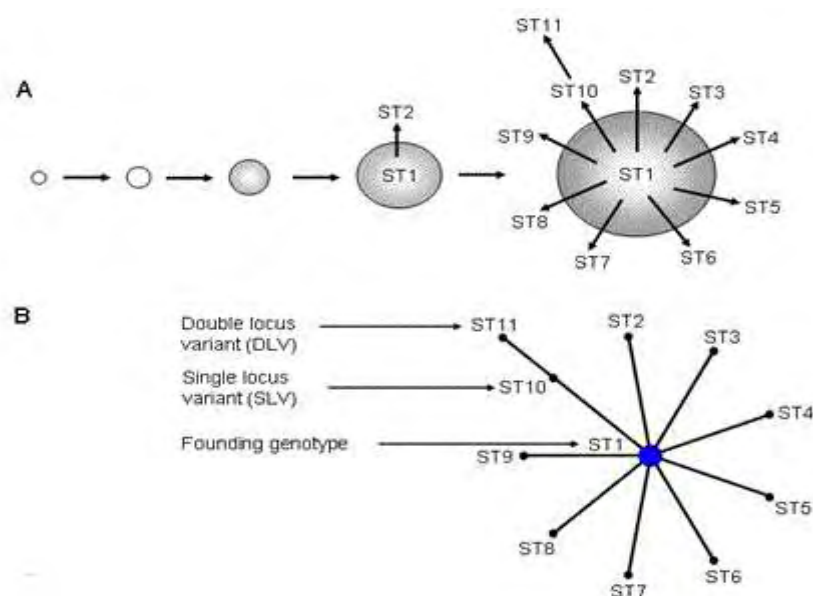
1.10.3. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΚΛΩΝΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΩΝ eBURST BURST (Based Upon Related Sequence Types)

Σε πολλούς βακτηριακούς πληθυσμούς οι σχέσεις μεταξύ μακρινά συνδεδεμένων γονότυπων είναι δύσκολο να διακριθούν καθώς η έκταση του ανασυνδυασμού των γονιδίων τους είναι αρκετά υψηλή. Η εισαγωγή της MLST για τον ακριβή χαρακτηρισμό των στελεχών των βακτηριακών παθογόνων είχε ένα σημαντικό αντίκτυπο τόσο στην καθημερινή επιδημιολογική επιτήρηση όσο και στην βιολογία του μικροβιακού πληθυσμού. Και στους δύο αυτούς τομείς, το κλειδί για την εκμετάλλευση αυτής της γνώσης, είναι η ικανότητα να διακρίνουμε την συγγένεια των στελεχών και να δημιουργούμε πρότυπα εξελικτικής καταγωγής ανάμεσα σε στελέχη με παρόμοιο γονότυπο. Παραδοσιακές μέθοδοι ομαδοποίησης, όπως τα διαγράμματα διασποράς (cluster diagrams), δένδρα ή δένδρογράμματα, παρέχουν μια πολύ φτωχή αναπαράσταση πρόσφατων εξελικτικών γεγονότων, αφού προσπαθούν να ανακατασκευάσουν συγγένειες, με απουσία όμως ενός ρεαλιστικού μοντέλου στον τρόπο με τον οποίο οι βακτηριακοί κλώνοι εμφανίζονται, διαιρούνται και σχηματίζουν κλωνικά συμπλέγματα. Μια δημοφιλής προσέγγιση, μέσω του αλγορίθμου BURST, προσπάθησε να καλύψει

αυτό το κενό αλλά αρχικά δεν μπορούσε να διαχειριστεί μεγάλο όγκο δεδομένων και προσέφερε φτωχά γραφικά απεικόνισης. Η αρχική εκδοχή του BURST επινοήθηκε από τον **Ed Feil** σαν εφαρμογή της **Java™ applet**, το 2004, και βελτιώθηκε από τον ίδιο και τους συνεργάτες του Man-Suen Chan και David Aanensen στο Imperial College London ως eBURSTv3 το 2006. (248)

Η νέα μέθοδος προσφέρει πολύ περισσότερα πλεονεκτήματα όπως: χωρίζει οποιουδήποτε μεγέθους δεδομένα της MLST σε ομάδες συγγενικών στελεχών και κλωνικών συμπλεγμάτων (clonal complex), προβλέποντας τον προγονικό ιδρυτή κάθε κλωνικού συμπλέγματος.

Το eBURST (<http://eburst.mlst.net/>) χρησιμοποιεί ένα απλό αλλά κατάλληλο μοντέλο της εμφάνισης των κλωνικών συμπλεγμάτων κατά το οποίο ένας προγονικός ή ιδρυτικός γονότυπος αυξάνεται σε συχνότητα στον βακτηριακό πληθυσμό, σαν αποτέλεσμα είτε ενός κατάλληλου πλεονεκτήματος που απέκτησε είτε από μια τυχαία γενετική τάση και σταδιακά γίνεται ο κυρίαρχος κλώνος. Λόγω της αυξημένης παρουσίας του, στη συνέχεια αρχίζει να διαφοροποιείται, παράγοντας μια ομάδα στενά συνδεδεμένων γονότυπων, που όλα κατάγονται από τον ίδιο ιδρυτικό γονότυπο.



Εικόνα 26. Διαφοροποίηση των κλώνων ενός ιδρυτικού γονότυπου σύμφωνα με το μοντέλο του αλγορίθμου eBURST (βλέπε κείμενο). Η απεικόνιση προέρχεται από τις ιστοσελίδες της MLST.

Αυτή η ομάδα των στενά συνδεδεμένων γονότυπων, αναφέρεται συχνά σαν κλωνικό σύμπλεγμα (clonal complex CC). Στα πλαίσια της MLST, οι απόγονοι του ιδρυτικού γονότυπου αρχικά θα παραμείνουν αμετάβλητοι αλλά με την πάροδο του χρόνου θα προκύψουν νέοι απόγονοι στους οποίους ένα από τα επτά αλληλόμορφα γονίδια θα έχει διαφοροποιηθεί (με σημειακή μετάλλαξη ή με ανασυνδυασμό) (**Εικόνα 26A**). Αυτοί οι απόγονοι, που έχουν αλληλόμορφα προφίλ με διαφορά ενός αλληλόμορφου γονιδίου από τον ιδρυτικό γονότυπο, ονομάζονται single locus variants (SLVs). Τελικά οι SLVs θα διαφοροποιηθούν ακόμα περισσότερο παράγοντας απογόνους με διαφορές δύο αλληλόμορφων από τον ιδρυτικό γονότυπο (double locus variants-DLVs-), τριών αλληλόμορφων γονιδίων (TLVs) και ούτω καθεξής. (**Εικόνα 26B**)

Αρχικά ο αλγόριθμος προσδιορίζει τις ομάδες εξειδικευμένης μετάλλαξης (mutually exclusive groups) συναφών γονότυπων στον πληθυσμό-τυπικά τα δεδομένα μιας MLST-και επιχειρεί να προσδιορίσει τον ιδρυτικό γονότυπο της κάθε ομάδας. Ο αλγόριθμος κατόπιν προβλέπει την καταγωγή από τον προβλεπόμενο ιδρυτικό γονότυπο, των άλλων γονότυπων της ομάδας, εμφανίζοντας το αποτέλεσμα σαν ένα ακτινικό διάγραμμα, επικεντρωμένο πάνω στον προβλεπόμενο ιδρυτικό γονότυπο. (Εικόνα 26) Η διαδικασία eBURST έχει την δυνατότητα ανάλυσης και σύγκρισης ακόμα και στελεχών που τα αλληλόμορφα και τα STs τους (alleles and STs numbers) δεν βρίσκονται ακόμη στις βάσεις δεδομένων της MLST, δίνοντας προσωρινούς αριθμούς. Αναπτύχθηκε κύρια για την χρήση των δεδομένων της MLST αλλά έχει την δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί και να δώσει αποτελέσματα και σε άλλους τύπους μοριακών μεθόδων χρησιμοποιώντας κατάλληλα κριτήρια.

Το διάγραμμα eBURST είναι κυρίως ένα επιδημιολογικό εργαλείο που σχεδιάστηκε για την εξέταση μικρών εξελικτικών χρονοδιαγραμμάτων. Συνεπώς τα στελέχη που παρουσιάζουν αντοχή σε αντιβιοτικά αποτελούν απλά περιπτώσεις ελέγχου του μοντέλου. Τα ανθεκτικά στελέχη είναι απίθανο να είναι προγενέστερα της εισαγωγής στην Ιατρική των αντιβιοτικών στα οποία φέρουν αντοχή και συνεπώς οι γονότυποι τους θα πρέπει να έχουν διαφοροποιηθεί πολύ λίγο από τον αρχικό ιδρυτή τους σ' αυτό το πολύ σύντομο χρονικό διάστημα.

Το eBURST δεν φέρει την απόλυτη αλήθεια στις σχέσεις μεταξύ των βακτηριακών πληθυσμών, απλώς παράγει μία υπόθεση γύρω από τον τρόπο που το κάθε κλωνικό σύμπλεγμα εμφανίστηκε και διαφοροποιήθηκε. Κάθε άλλο επιπρόσθετο δεδομένο που είναι τα αποτελέσματα των ερευνών του συγκεκριμένου μικροβιακού πληθυσμού, όπως φαινοτυπικά, βιοχημικά, γονοτυπικά και επιδημιολογικά χαρακτηριστικά, πρέπει οπωσδήποτε να μελετηθούν παράλληλα και να χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα για να διερευνηθεί και η αξιοπιστία του προτεινόμενου μοντέλου.

1.11. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μοριακή τυποποίηση αντιπροσωπευτικών στελεχών Gram-θετικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα ασθενών από διαφορετικές περιοχές της χώρας μας, με στόχο να χαρτογραφηθούν οι επικρατέστεροι κλώνοι ανά μικροοργανισμό και να συγκριθούν με παγκόσμιους επιδημικούς κλώνους.

Στο Κλινικό Εργαστήριο η τυποποίηση των βακτηρίων χρησιμοποιείται κυρίως για την διερεύνηση μιας επιδημικής έξαρσης μικρής ή και μεγαλύτερης έκτασης. Είναι σημαντικό να καθορίζονται οι κλώνοι των βακτηρίων που ενέχονται στις ενδοσοκομειακές λοιμώξεις ώστε να αναζητώνται οι πηγές των λοιμώξεων και οι τρόποι διασποράς τους, με στόχο την εξάλειψη του κινδύνου εμφάνισης μιας επιδημίας. Οι στόχοι μας για την επιλογή μιας κατάλληλης μοριακής επιδημιολογικής μεθόδου ήταν αφενός μεν ο ακριβής μοριακός χαρακτηρισμός των κλώνων των παθογόνων στελεχών και αφετέρου η μελέτη της γενετικής τους συγγένειας, προσφέροντας έτσι μια επιδημιολογική ανάλυση του μελετώμενου βακτηριακού πληθυσμού, σημαντική για την εξεύρεση επιδημιολογικών εργαλείων ελέγχου των ενδοσοκομειακών λοιμώξεων και των επιδημιών.

Αρχικά λοιπόν, υπήρξε μια θεωρητική διερεύνηση των πλέον σύγχρονων μοριακών επιδημιολογικών μεθόδων για την εξεύρεση μιας ή και δύο τεχνικών (για πιθανή συγκριτική μελέτη) που θα κάλυπτε τους στόχους που είχαμε θέσει για την επιλογή τους. Η μελέτη αυτή κατέληξε στην επιλογή της μεθόδου της MLST (Πολυτοπικός Προσδιορισμός Αλληλουχίας) λόγω των αδιαμφισβήτητων πλεονεκτημάτων που παρέχει για πλήθος παθογόνων επιδημικών μικροοργανισμών, πλεονεκτήματα που αναφέρθηκαν αναλυτικά στο Γενικό Μέρος της παρούσας Διατριβής και που θα αναφερθούν πιο συγκεκριμένα στο Ειδικό Μέρος της Διατριβής.

Η επιλογή των παθογόνων μικροοργανισμών ξεκίνησε από τον *Enterococcus faecium* λόγω των αυξημένων λοιμώξεων που παρουσίασε στο ΠΓΝ Λάρισας, κατά την έναρξη της παρούσας μελέτης. Η ίδια πρακτική συνεχίστηκε και για την επιλογή των υπόλοιπων μικροοργανισμών που μελετήθηκαν και προσδιορίστηκαν μέσω της MLST. Η πραγματική νοσοκομειακή και επιδημιολογική πραγματικότητα καθόρισε λοιπόν και επέβαλε την διερεύνηση των συγκεκριμένων βακτηρίων.

Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν συλλογές επιδημικών παθογόνων νοσοκομειακών στελεχών Gram-θετικών βακτηρίων, από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας αλλά και από νοσοκομεία που βρίσκονται σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας, σε μια προσπάθεια καθορισμού, διερεύνησης και ελέγχου της διασποράς των παθογόνων στελεχών, σε διάφορες χρονικές περιόδους από το 2008 έως το 2011.

Αρχικά τα κλινικά στελέχη υποβλήθηκαν, στις καθιερωμένες τεχνικές χειρισμού των βακτηρίων που περιλαμβάνουν την καλλιέργεια, βιοχημικές δοκιμασίες για την ταυτοποίηση των στελεχών των βακτηρίων σε επίπεδο γένους και είδους και τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά (VITEK-2, E-test). Η απομόνωση του γενετικού υλικού - DNA - των υπό μελέτη βακτηρίων, πραγματοποιήθηκε μέσω της εκχύλισης τους με το αυτόματο σύστημα Magtration προκειμένου να γίνει η τυποποίηση τους.

Ο γονοτυπικός χαρακτηρισμός και η κλωνική συγγένεια όλων των στελεχών πραγματοποιήθηκε με την μοριακή μέθοδο της MLST η οποία βασίζεται στην ενίσχυση επτά θραυσμάτων διατηρημένων γονιδίων (*housekeeping genes*), διαφορετικών για κάθε είδος βακτηρίου. Πρόκειται για σταθερά εσωτερικά γονίδια του χρωμοσώματος που σχετίζονται με βασικές μεταβολικές λειτουργίες του βακτηριακού κυττάρου και είναι απαραίτητες για την επιβίωση του. Η ενίσχυση όλων των γονιδίων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Για κάθε είδος βακτηρίου επιλέχθηκε ένα τυποποιημένο σχήμα γονιδίων, από τις ηλεκτρονικές βάσεις της MLST, για τον καθορισμό του αλληλόμορφου προφίλ του και του τύπου αλληλουχίας του (ST). Το κάθε σχήμα της MLST πρωταρχικά διερευνήθηκε εργαστηριακά, για την βέλτιστη ανίχνευση και ενίσχυση των γονιδίων του, μέσω αλλαγών εργαστηριακών παραμέτρων όπως λχ ποσοτικών και θερμοκρασιακών αλλαγών.

Σε επόμενο στάδιο ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των ενισχυμένων γονιδίων σε πήκτωμα αγαρόζης, καθαρισμός του DNA και αλληλούχιση (*sequencing*) του κάθε γονιδίου. Ο αριθμός των αλληλόμορφων γονιδίων κάθε βακτηριακού στελέχους προσδιορίστηκε με την χρήση εξειδικευμένων προγραμμάτων βιοπληροφορικής, που σε συνδυασμό με τις βάσεις δεδομένων της MLST, τα στελέχη των βακτηρίων ταξινομήθηκαν σε STs τύπους. Ακολούθησε η μελέτη της γενετικής συγγένειας των κλώνων των στελεχών, μέσω της εφαρμογής προγράμματος του αλγορίθμου eBURST, που έδωσε την δυνατότητα της ταξινόμησης των στελεχών σε κλωνικά συμπλέγματα με εν δυνάμει κοινά χαρακτηριστικά. Η ομαδοποίηση αυτή προσφέρει την δυνατότητα αναγνώρισης της πηγής της λοίμωξης αλλά και της σύγκρισης των στελεχών με παγκόσμιους επιδημικούς κλώνους συγκεκριμένων χαρακτηριστικών.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Συλλογή και Προέλευση των στελεχών των Gram θετικών βακτηρίων

Ένας συνολικός αριθμός 575 στελεχών Gram-θετικών βακτηρίων απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα ασθενών όπως αίμα, πύον, ούρα, κόπρανα, κολπικά επιχρίσματα κ.ά. για τις ανάγκες της παρούσας διατριβής. Το κλινικό υλικό της μελέτης προέρχεται από επτά μεγάλα νοσοκομεία της χώρας μας. Τα είδη των βακτηρίων και ο αριθμός των στελεχών που επιλέχθηκαν και μας απεστάλησαν από κάθε νοσοκομείο καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

	ΠΓΝ Λάρισας	ΠΓΝ Πατρών	ΠΓΝ Αλεξ/πολης	ΠΓΝ Αττικό	Ασκληπιείο ΓΠΝ Βούλας	Σισμα- νόγλειο ΓΝΑ	ΝΠ Αγλαΐα Κυριακού	ΣΥΝΟΛΟ ΣΤΕΛΕΧΩΝ
vancomycin resistant Enterococcus faecium	82	64	7	8	18	7		186
linezolid resistant Enterococcus faecalis:	18	12						30
Staphylococcus aureus	39	61	26					126
MRSA:	27	35	26					88
MSSA:	12	26	(-)					38
linezolid resistant Staphylococcus epidermidis	10	18				7		35
Streptococcus pyogenes	80							80
Streptococcus agalactiae	63		19	19			17	118
ΣΥΝΟΛΟ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	292	155	52	27	18	14	17	575

Πίνακας 4: Η προέλευση, τα είδη και ο αριθμός των στελεχών των μελετηθέντων βακτηρίων.

Η δειγματοληψία των κλινικών δειγμάτων ήταν:

- Αντιπροσωπευτική: συλλέχθηκε το 2% των κλινικών δειγμάτων κάθε εργαστηρίου.
- Ομοιόμορφα κατανεμημένα ανά μήνα.
- Κλινικά δείγματα ασθενών: αίμα, πύον, ούρα, κόπρανα, κολπικά επιχρίσματα κ.α.
- Συνολική Διάρκεια έρευνας: Ιανουάριος 2008 - Σεπτέμβριος 2011.
- Τα στελέχη τυποποιήθηκαν σε είδη σύμφωνα με τα πρωτόκολλα του κάθε νοσοκομείου και στην συνέχεια εστάλησαν με ειδικούς στείλους μεταφοράς στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας. Στο εργαστήριο του Μικροβιολογικού τμήματος υποβλήθηκαν στις κατεργασίες που αναφέρονται αναλυτικά παρακάτω.

2.2. Φαινοτυπικές Δοκιμασίες για την ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους

2.2.1. Δοκιμασία Χρώσης κατά Gram

Η χρώση κατά Gram πραγματοποιήθηκε για όλα τα στελέχη των μελετώμενων βακτηρίων και αποτελεί την πιο σημαντική χρώση στη βακτηριολογία. Χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση των βακτηρίων με βάση τις φυσιολογικές ιδιότητες του κυτταρικού τους τοιχώματος. Έχοντας υπόψη την διαφορά της δομής των θετικών και αρνητικών κατά Gram κυττάρων, είναι δυνατόν να κατανοήσουμε εύκολα τον μηχανισμό της εν λόγω χρώσης. Η διαφορά ανάμεσα στους δύο τύπους κυττάρων οφείλεται στον αποχρωματισμό που προκαλεί η αιθανόλη. Τα κύτταρα βάφονται με κρυσταλλικό ιώδες ή ιώδες της γεντιανής και διάλυμα Lugol (ιώδιο) με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός συμπλόκου κρυσταλλικού ιώδους-ιωδίου. Όταν ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο ξεπλυθεί με αιθανόλη, τα λιπίδια της εξωτερικής μεμβράνης διαλύονται και απομακρύνονται. Αυτό αποσταθεροποιεί την εξωτερική μεμβράνη και αυξάνει τη διαπερατότητά της. Έτσι, το σύμπλοκο της χρωστικής ξεπλένεται αποχρωματίζοντας το αρνητικό κατά Gram βακτήριο, το οποίο στη συνέχεια χρωματίζεται ερυθρόχρωμο από τη σαφρανίνη. Στα θετικά κατά Gram βακτήρια, η αιθανόλη προκαλεί τον σχηματισμό πόρων στο στρώμα της πεπτιδογλυκάνης, που συρρικνώνεται και εγκλωβίζει το σύμπλοκο του κρυσταλλικού ιώδους-ιωδίου της χρωστικής εντός του κυττάρου. Για τη χρώση κατά Gram των υπό μελέτη στελεχών χρησιμοποιήθηκε το Gram Color Kit με την μεθοδολογία που αναφέρεται αναλυτικότερα παρακάτω:

Υλικά:

WFI (**W**ater **F**or **I**njection-στείρο απυρετογόνο H₂O)

Διάλυμα crystal violet (Iiofilchem)

Διάλυμα Lugol PVP (Iiofilchem)

Διάλυμα decolorizing (αιθανόλη και ακετόνη)

Διάλυμα safranin (Iiofilchem)

Αντικειμενοφόρες πλάκες (Mediware)

Οπτικό μικροσκόπιο (ZEISS)

Πειραματική Διαδικασία:

Αρχικά μονιμοποιούνται τα παρασκευάσματα πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Καλύπτεται κάθε παρασκεύασμα με διάλυμα crystal violet για 1min και έπειτα ξεπλένεται με νερό της βρύσης. Στη συνέχεια, καλύπτεται έκαστο παρασκεύασμα με διάλυμα Lugol PVP για 1min κι έπειτα ξεπλένεται με νερό της βρύσης. Αποχρωματίζεται έκαστο παρασκεύασμα ξεπλένοντας την αντικειμενοφόρο πλάκα με διάλυμα decolorizing (αιθανόλη και ακετόνη). Ακολούθως, μεταχρωματίζεται έκαστο παρασκεύασμα καλύπτοντάς το με διάλυμα σαφρανίνης για 10 sec. Τέλος, ξεπλένεται με νερό της βρύσης, ξηραίνεται μεταξύ φύλλων διηθητικού χαρτιού και μικροσκοπείται. Με την μέθοδο αυτή τα Gram θετικά βακτήρια χρωματίζονται σκούρα ιώδη σχεδόν μαύρα, ενώ τα Gram αρνητικά αχνά κόκκινα.

2.2.2. Δοκιμασία παραγωγής καταλάσης

Η δοκιμασία παραγωγής καταλάσης πραγματοποιήθηκε σε όλα τα στελέχη των υπό μελέτη βακτηρίων για την διάκριση των σταφυλόκοκκων (κατά καταλάση θετικοί) από τους εντερόκοκκους και στρεπτόκοκκους (κατά καταλάση αρνητικοί). Η δοκιμασία παραγωγής καταλάσης αποτελεί την πρώτη κατατοπιστική διαχωριστική δοκιμή όσον αφορά τους Gram θετικούς κόκκους.

Η καταλάση είναι ένα ένζυμο που διασπά το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο, παράγοντας μικρές φυσαλίδες. Για τη δοκιμασία παραγωγής καταλάσης, των υπό μελέτη στελεχών χρησιμοποιήθηκε η ID Color Catalase (BioMerieux) με την μεθοδολογία που αναφέρεται αναλυτικότερα παρακάτω.

Υλικά:

Διάλυμα ID Color Catalase–ASE (BioMerieux)

Κρικοφόροι στείλειοι

Αντικειμενοφόρες πλάκες (Mediware)

Πειραματική Διαδικασία:

Αρχικά τοποθετείται πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα μια σταγόνα ID έγχρωμη καταλάση. Έπειτα λαμβάνεται και τοποθετείται μια αποικία του υπό μελέτη στελέχους ή μέρος αυτής, εντός της σταγόνας. Τέλος, παρατηρείται η ύπαρξη ή μη, άφθονων μικρών φυσαλίδων εντός της σταγόνας.

2.2.3. Δοκιμασία υδρόλυσης αισκουλίνης

Το άγαρ της αισκουλίνης Bile Esculin Agar (BEA) είναι ένα επιλεκτικό υλικό που χρησιμοποιείται για την απομόνωση και των προσδιορισμό των μελών του γένους των εντερόκοκκων. Οι εντερόκοκκοι *E. faecium* και *E. faecalis* δίνουν θετική την αντίδραση, υδρολύοντας την αισκουλίνη προς γλυκόζη και αισκουλετίνη που αντιδρά με σίδηρο και σχηματίζει μαύρου χρώματος ένωση. Η κατάταξη των εντερόκοκκων σε είδη πραγματοποιήθηκε με μοριακή μέθοδο μέσω του γονιδίου *sodA*.

2.2.4. Δοκιμασία παραγωγής πηκτάσης (coagulase)

Η δοκιμασία παραγωγής πηκτάσης πραγματοποιήθηκε σε όλα τα στελέχη των σταφυλόκοκκων για την διάκριση των στελεχών του *S. aureus* Cg⁽⁺⁾ (coagulase-θετικοί) από τους *S. epidermidis* Cg⁽⁻⁾ (coagulase-αρνητικοί). Χαρακτηριστική και μοναδική ιδιότητα του *S. aureus* είναι η παραγωγή του ενζύμου πηκτάση. Ο *S. aureus* φέρει δύο είδη πηκτάσης, την συνδεδεμένη και την ελεύθερη. Η συνδεδεμένη βρίσκεται καθηλωμένη στο κυτταρικό τοίχωμα και μετατρέπει άμεσα το ινωδογόνο σε αδιάλυτη ινική, προκαλώντας τη συγκόλληση και τη συσσώρευση των βακτηριακών κυττάρων. Ομοίως, η ελεύθερη πηκτάση έχει την ίδια δράση, καταλήγει όμως έμμεσα στο σχηματισμό ινικής μέσω μιας σφαιρίνης του πλάσματος (coagulase reacting factor).

Η δοκιμασία παραγωγής πηκτάσης γίνεται συνήθως με δύο μεθόδους. Μια ταχεία, πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα και μια βραδεία μέσα σε σωληνάριο. Με την πρώτη ανιχνεύουμε την συνδεδεμένη πηκτάση ενώ με τη δεύτερη την ελεύθερη πηκτάση. Ωστόσο, για τη δοκιμασία παραγωγής πηκτάσης των υπό μελέτη στελεχών χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό SLIDEX Staph Plus Kit της BioMerieux σύμφωνα με το οποίο μία θετική εξέταση για *S. aureus* παρατηρείται από μια ορατή αντίδραση συγκόλλησης. Το αντιδραστήριο του συγκεκριμένου kit περιλαμβάνει κυανά σωματίδια latex ευαισθητοποιημένα με ανθρώπινο ινωδογόνο και μονοκλωνικά αντισώματα, με ταυτόχρονη ανίχνευση της πηκτάσης και της πρωτεΐνης A χρησιμοποιώντας το Fc κλάσμα της IgM ποντικού και μιας ειδικής αντιγονικής ομάδας, συνδεδεμένες με ειδικές περιφερειακές δομές του *S. aureus*. Η δοκιμασία παραγωγής πηκτάσης πραγματοποιήθηκε με την μεθοδολογία που αναφέρεται αναλυτικότερα παρακάτω.

Υλικά:

Διάλυμα **R₁** *S. aureus* (L)

Διάλυμα **R₂** *S. aureus* (LCD)

Αναλώσιμες κάρτες πεδίων αντίδρασης

Κρικοφόροι στειλεοί

Πειραματική διαδικασία:

- Αρχικά αφήνονται τα αντιδραστήρια να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου (18⁰-25⁰C) και επαναιωρούνται πριν από τη χρήση.
- Στον ένα κύκλο μιας αναλώσιμης κάρτας προστίθεται μια σταγόνα διαλύματος **R₁** ενώ στο δεύτερο μια σταγόνα διαλύματος **R₂**.
- Ακολούθως χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικούς κρικοφόρους στειλεούς προστίθενται αποικίες σε έκαστο κύκλο.
- Αναδεύονται καλά για 10 sec και απλώνεται η σταγόνα σε ολόκληρη την περιοχή του κύκλου.
- Τέλος, παρατηρείται η αντίδραση κάτω από κανονικές συνθήκες φωτισμού και χωρίς τη βοήθεια μεγεθυντικού φακού.

2.2.5. Δοκιμασίες ταυτοποίησης στρεπτόκοκκων

Τα είδη των στρεπτόκοκκων ταξινομούνται με βάση τις αιμολυτικές τους ιδιότητες. Οι υπό μελέτη στρεπτόκοκκοι *S. pyogenes* και *S. agalactiae* κατατάσσονται στους β-αιμολυτικούς στρεπτόκοκκους. Οι β-αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι προκαλούν αιμόλυση κατά την καλλιέργεια τους σε αιματούχο άγαρ όπου προκαλούν πλήρη διαύγαση, με την εμφάνιση ευρέων καθαρών περιοχών, γύρω από τις βακτηριακές αποικίες. Οι β-αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι διαχωρίζονται μεταξύ τους μέσω των οροτύπων κατά Lancefield, που περιγράφουν συγκεκριμένους υδατάνθρακες του κυτταρικού τους τοιχώματος. Κατ' αυτήν την δοκιμασία, ο *S. pyogenes* κατατάσσεται στην ομάδα A (αντιγόνο A) κατά Lancefield ήτοι **Group A Streptococcus (GAS)** ενώ ο *S. agalactiae* κατατάσσεται στην ομάδα B (αντιγόνο B) κατά Lancefield ήτοι **Group B Streptococcus (GBS)**.

2.3. Έλεγχος Ευαισθησίας στα Αντιβιοτικά

Ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά πραγματοποιήθηκε σε όλα τα υπό μελέτη στελέχη. Στα στελέχη των εντερόκοκκων και σταφυλόκοκκων δόθηκε έμφαση στην αντοχή τους σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά ενώ στους στρεπτόκοκκους δεν δόθηκε κάποια ιδιαίτερη έμφαση στην αντοχή τους, όπως καταγράφεται αναλυτικά παρακάτω:

- *Enterococcus faecium*: vancomycin / teicoplanin
- *Enterococcus faecalis*: linezolid / vancomycin
- *Staphylococcus aureus* : oxacillin / cefoxitin
- *Staphylococcus epidermidis* : linezolid
- *Streptococcus pyogenes*
- *Streptococcus agalactiae*

Ο έλεγχος της ευαισθησίας όλων των υπό μελέτη στελεχών πραγματοποιήθηκε με τις δοκιμασίες που περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

2.3.1. Δοκιμασία των Δίσκων

Πρόκειται για την πιο διαδεδομένη και απλή μέθοδο που χρησιμοποιείται στα διαγνωστικά εργαστήρια των νοσοκομείων. Στη συγκεκριμένη μέθοδο το αντιβιοτικό εμποτίζεται σε δίσκους από διηθητικό χαρτί, το οποίο δεν έχει επίδραση επί του μικροοργανισμού, και η πυκνότητα του αντιβιοτικού στο δίσκο επιλέγεται έτσι ώστε να αντιστοιχεί με την *in vivo* πυκνότητα του. Μια ομογενοποιημένη καλλιέργεια του προς εξέταση μικροοργανισμού επιστρώνεται σε ειδικό άγαρ, πάνω στο οποίο εναποτίθενται οι εμποτισμένοι αυτοί δίσκοι. Το αντιβιοτικό διαχέεται στα χρησιμοποιούμενα υλικά και προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού, οπότε μετά από 18-24 ώρες επώασης μετρώνται οι διάμετροι των ζωνών αναστολής του αντιβιοτικού και συγκρίνονται με τα κριτήρια της CLSI. Ο έλεγχος με την δοκιμασία των δίσκων πραγματοποιήθηκε με την μεθοδολογία που αναφέρεται αναλυτικότερα παρακάτω.

Υλικά:

Τρυβλία με άγαρ Mueller-Hinton

Εμποτισμένοι δίσκοι αντιβιοτικών

WFI (**W**ater **F**or **I**njection-στείρο απυρετογόνο H₂O)

Κλίβανος επώασης

Λύχνος Bunsen

Πουάρ μιας χρήσεως

Βαμβακοφόροι στείλεοι

Λαβίδα

Χάρακας

Πειραματική διαδικασία:

- Αρχικά διαλύονται μερικές μεμονωμένες αποικίες μετά από ολονύχτια καλλιέργεια έκαστου στελέχους σε υλικό εναιώρησης έως ότου γαλακτωματοποιηθούν.

- Έπειτα ενοφθαλμίζεται ομοιόμορφα με το εναιώρημα, η επιφάνεια του τρυβλίου Mueller - Hinton και απομακρύνεται η περίσσεια του εναιωρήματος από το τρυβλίο.

- Αφού απορροφηθεί πλήρως η πλεονάζουσα υγρασία, τοποθετούνται τα δισκία αντιβιοτικών στην επιφάνεια του άγαρ και τα τρυβλία επωάζονται ανεστραμμένα σε κλίβανο για 24 ώρες.

- Τέλος, αξιολογούνται τα αποτελέσματα με βάση τα κριτήρια της CLSI.

2.3.2. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά με το σύστημα Vitek-2

Το αυτόματο σύστημα Vitek-2 χρησιμοποιείται εκτεταμένα πλέον στα νοσοκομεία αφενός μεν για γρήγορη και ακριβή ταυτοποίηση των βακτηρίων, αφετέρου δε για την δοκιμή της ευαισθησίας τους στα αντιβιοτικά. Το καινοτόμο Vitek 2 σύστημα ταυτοποίησης των βακτηρίων, περιλαμβάνει μια εκτεταμένη βάση δεδομένων αναγνώρισης, με διαθέσιμη την πιο αυτοματοποιημένη πλατφόρμα για γρήγορα αποτελέσματα και βελτίωση της εμπιστοσύνης των αποτελεσμάτων. Ο ταχύς χρόνος απόκρισης σημαίνει ότι τα αποτελέσματα μπορεί να παρασχεθούν πιο γρήγορα απ' ό,τι με οποιοδήποτε χειροκίνητη τεχνική ταυτοποίησης των βακτηρίων.

2.3.3. Δοκιμασία E (E- test)

Ο προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοστατικής συγκέντρωσης του αντιβιοτικού (MIC) γίνεται με τη χρήση μιας πλαστικής ταινίας, η οποία είναι εμποτισμένη με μια ορισμένη και σταθερή διαβάθμιση της συγκέντρωσης του εξεταζόμενου αντιβιοτικού. Αυτή τοποθετείται πάνω στην πλάκα του άγαρ που έχει ομογενώς εμβολιασθεί με το ερευνούμενο βακτήριο. Η ανάγνωση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης γίνεται στο σημείο τομής της ελλειπτικής καμπύλης αναστολής με την κλίμακα. Ο προσδιορισμός αυτός πραγματοποιήθηκε με την μεθοδολογία που αναφέρεται αναλυτικότερα παρακάτω.

Υλικά:

Τρυβλία με άγαρ Mueller- Hinton

Ταινίες αντιβιοτικών

WFI (στείρο απυρετογόνο H₂O)

Κλίβανος επώασης

Λύχνος Bunsen

Πουάρ μιας χρήσεως

Βαμβakoφόροι στειλεοί

Χάρακας

Λαβίδα

Πειραματική διαδικασία:

- Αρχικά διαλύονται μερικές μεμονωμένες βακτηριακές αποικίες, μετά από ολονύχτια καλλιέργεια, σε υλικό εναιώρησης έως ότου γαλακτοποιηθούν.

- Έπειτα ενοφθαλμίζεται ομοιόμορφα με το παραπάνω υλικό η επιφάνεια του τρυβλίου με άγαρ Mueller- Hinton και απομακρύνεται η περίσσεια του εναιωρήματος από το τρυβλίο.

- Αφού απορροφηθεί πλήρως η πλεονάζουσα υγρασία, τοποθετούνται οι ταινίες στην επιφάνεια του άγαρ και τα τρυβλία επωάζονται ανεστραμμένα σε κλίβανο για 24 ώρες.
- Τέλος, αξιολογούνται τα αποτελέσματα με βάση τα κριτήρια της CLSI.

2.4. Απομόνωση του Γενετικού Υλικού των βακτηρίων

Η απομόνωση του γενετικού υλικού (DNA), όλων των υπό μελέτη στελεχών, πραγματοποιήθηκε με την εκχύλιση τους μέσω του αυτομάτου συστήματος Magtration.

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

Για την εκχύλιση του DNA των υπό μελέτη στελεχών χρησιμοποιήθηκε το αυτόματο σύστημα Magtration 12GC σε συνδυασμό με το Magtration-MagaZorb DNA Common Kit-200N, με την μεθοδολογία που αναφέρεται αναλυτικότερα παρακάτω.

Υλικά:

Magtration 12GC (PSS Bio Instruments)

MagaZorb DNA Common Kit-200N

Πειραματική διαδικασία:

Η αρχή της μεθόδου εκχύλισης του DNA βασίζεται στην παγίδευση του σε μαγνητικά σφαιρίδια και στην εν συνεχεία απελευθέρωση του με χρήση μαγνήτη. Η μέθοδος περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Προσθήκη λυτικού διαλύματος στο δείγμα DNA (200 µl) και καλή ανάμιξη με αναρρόφηση.
- Προσθήκη buffer εξουδετέρωσης στο «λυμένο» δείγμα και καλή ανάμιξη με αναρρόφηση.
- Προσθήκη διαλύματος μαγνητικών σφαιριδίων στο δείγμα για την δέσμευση του DNA. Τα μαγνητικά σφαιρίδια φέρουν επιφανειακά ειδική επικάλυψη διοξειδίου του πυριτίου (silica), που έχει μια φυσική συγγένεια με τα νουκλεϊκά οξέα και με τον τρόπο αυτό δεσμεύεται το DNA του βακτηριακού στελέχους πάνω στα μαγνητικά σφαιρίδια.
- Το σύμπλεγμα μαγνητικού σφαιριδίου/DNA αποχωρίζεται από τα άχρηστα κυτταρικά υπολείμματα με χρήση μαγνήτη. Στη συνέχεια το σύμπλεγμα μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάριο όπου με την χρήση διαλύματος χαμηλού ιονισμού και θερμότητας, εκπλένεται και απελευθερώνεται το DNA από τα μαγνητικά σφαιρίδια.
- Τα μαγνητικά σφαιρίδια συλλέγονται με χρήση μαγνήτη και έτσι στο σωληνάριο απομένει το καθαρό εκχυλισμένο DNA.

Η αυτόματη μέθοδος πλεονεκτεί έναντι της κλασσικής (χειροκίνητης) από άποψη χρόνου, ποσότητας και ποιότητας εκχυλισμένου DNA διότι δεν περιλαμβάνει τις διαδικασίες της διήθησης, της φυγοκέντρωσης και του καθαρισμού με ισχυρά απορρυπαντικά που περιλαμβάνονται στην χειροκίνητη μέθοδο.

Το εκχυλισμένο DNA χρησιμοποιείται περαιτέρω για τις διεργασίες της Αλυσιδωτής Α-ντιδράσης Πολυμεράσης (PCR).

2.5. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η ενίσχυση ή η πολλαπλή αντιγραφή (amplification) γονιδιακών θραυσμάτων του βακτηριακού DNA πραγματοποιήθηκε μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και εφαρμόστηκε σε όλα τα γονιδιακά θραύσματα των τυποποιημένων σχημάτων των στελεχών των υπό μελέτη Gram (+) θετικών βακτηρίων της μεθόδου του Πολυτοπικού Προσδιορισμού Αλληλουχίας MLST. Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) αναπτύχθηκε διεξοδικά στο Γενικό Μέρος της παρούσας Διατριβής. Για την εκτέλεση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης παρασκευάζεται ένα Master Mix, τα υλικά του οποίου και οι αναλογίες τους παρατίθενται αναλυτικότερα παρακάτω.

Υλικά:

DNA βακτηρίου

WFI (water for injection-στείρο απυρετογόνο H₂O)

Taq DNA πολυμεράση 5u/μl (Fermentas)

10X Taq Buffer με KCl (Fermentas)

MgCl₂: 25 mM (Fermentas)

Primer 1: 100 pmol/ μl (Ανάδραση)

Primer 2: 100 pmol/ μl (Ανάδραση)

dNTPs Set: 100mM (Fermentas)

DNA Engine Peltier Thermal Cycler (BIO – RAD)

Συσκευή καθέτου νηματικής ροής κλάσης II

Αυτόματος αναδευτήρας Vortex (BICASA)

Σωληνάρια eppendorf για PCR

αυτόματα σιφώνια (πιπέτες) 1000 μl, 200 μl, 20μl

αποστειρωμένα ρύγχη

Πειραματική διαδικασία:

Αρχικά παρασκευάζεται το Master Mix έκαστης αντίδρασης αναμιγνύοντας σε eppendorf ποσότητες πολλαπλάσιες του αριθμού των δειγμάτων (συμπεριλαμβανομένου του θετικού και του αρνητικού μάρτυρα) από τις αντίστοιχες βασικές ποσότητες (**Πίνακας 5**) των κάτωθι αντιδραστηρίων: DNA βακτηρίου, Taq DNA πολυμεράση, 10X Taq Buffer με KCl, MgCl₂, primer 1, primer 2, μίγματος dNTPs και WFI:

Περιεκτικότητα του Master Mix για την αντίδραση της PCR	
DNA βακτηρίου	5 μl
10X Taq Buffer με KCl	5 μl
MgCl ₂ : 25 mM	3 μl
dNTPs : 20mM	1 μl
Primer 1: 25 pmol/μl	0,5 μl
Primer 2: 25 pmol/μl	0,5 μl
Taq DNA πολυμεράση 5u/μl	0,4 μl
WFI	34,6 μl
Τελικός Όγκος	50 μl

Πίνακας 5. Βασικές ποσότητες αντιδραστηρίων για την παρασκευή του Master Mix της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης.

Αναμιγνύεται ήπια το **Master Mix** με τη χρήση Vortex και μοιράζεται σε ένα εppendorf 45 μl αυτού. Τέλος, προστίθεται σε ένα εppendorf 5 μl από κάθε δείγμα DNA και όλα τα εppendorf τοποθετούνται στον θερμικό κυκλοποιητή σε πρόγραμμα της επιλογής μας ανάλογα του είδους των βακτηρίων. Συγκεκριμένα σε κάθε βακτηριακό στέλεχος ενισχύθηκαν επτά γονιδιακά θραύσματα σε ξεχωριστές αντιδράσεις PCR, όπως περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

2.6. Πολυτοπικός Προσδιορισμός Αλληλουχίας (MLST)

Ο Πολυτοπικός Προσδιορισμός Αλληλουχίας DNA (MLST) είναι η μέθοδος της επιλογής μας για τον μοριακό χαρακτηρισμό των στελεχών και τυποποίησης των κλώνων των, υπό μελέτη, βακτηρίων. Πληροφορίες σχετικές με τα είδη των βακτηρίων που καταχωρούνται στην μέθοδο της MLST και τα τυποποιημένα σχήματα κατάταξης τους, βρίσκονται καταχωρημένα στους δύο επίσημους ιστότοπους της MLST που τα ερευνητικά τους κέντρα εδράζονται στο Imperial College, London (<http://www.mlst.net/>) και στο Oxford University (<http://pubmlst.org/>) αντίστοιχα. Οι ιστότοποι παρέχουν ελεύθερη πρόσβαση σε κάθε ερευνητή και διατηρούν τα αποκλειστικά δικαιώματα των βάσεων δεδομένων αλληλουχιών των τυποποιημένων σχημάτων για 28 και 22 μικροοργανισμούς αντίστοιχα. Επίσης προσφέρουν ελεύθερα προγράμματα βιοπληροφορικής για αναλύσεις και μελέτες μετά την ενίσχυση των γονιδίων των στελεχών όπως πρόγραμμα ανάλυσης αλληλουχίας Mega, προγράμματα μελέτης κλωνικής συγγένειας όπως eBURST, UPGMA κ.α. Οι αρχές, στις οποίες βασίζεται η MLST, παρουσιάστηκαν αναλυτικά στο Γενικό Μέρος της παρούσας Διατριβής. Συνοπτικά, κάθε τυποποιημένο σχήμα MLST ενός είδους βακτηρίων βασίζεται στην ανάλυση επτά γονιδίων διατηρημένων γονιδίων (housekeeping genes) του βακτηριακού χρωμοσώματος. Ο όρος «διατηρημένα γονίδια» περιλαμβάνει γονίδια του βασικού μεταβολισμού, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες υπό οποιοσδήποτε συνθήκες αύξησης των βακτηρίων. Το κάθε γονίδιο του σχήματος δεν ενισχύεται εξ ολοκλήρου, με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), αλλά ένα εσωτερικό θραύσμα του (internal fragment), μήκους συνήθως 400-600 bp. Τα ενισχυμένα γονιδιακά θραύσματα στη συνέχεια αλληλουχούνται και τα στελέχη ορίζονται από τα επτά αλληλόμορφα γονίδια (alleles) που αντιστοιχούν σε επτά αριθμούς. Οι επτά αριθμοί προκύπτουν από την σύγκριση των υπό μελέτη αλληλουχιών με τις βάσεις δεδομένων της MLST και αποτελούν το αλληλόμορφο προφίλ (allelic profile) του στελέχους. Κάθε μοναδικό αλληλόμορφο προφίλ αντιστοιχεί σε ένα μοναδικό τύπο αλληλουχίας που καταχωρείται ως ST (Sequence Type) του στελέχους. Ο ST αποτελεί έναν κατάλληλο και ξεκάθαρο τρόπο χαρακτηρισμού ενός στελέχους ή ενός κλώνου βακτηρίου. Τα στελέχη με το ίδιο ST αποτελούν μέλη του ίδιου κλώνου. ^(249, 250)

Τα Gram θετικά βακτήρια τα οποία επιλέχθηκαν για τυποποίηση με την μέθοδο της MLST είναι:

- Εντερόκοκκοι:** Vancomycin Resistant *Enterococcus faecium*
Linezolid Resistant *Enterococcus faecalis*
- Σταφυλόκοκκοι:** MRSA & MSSA *Staphylococcus aureus*
Linezolid Resistant *Staphylococcus epidermidis*

ΣΤΡΕΠΤΟΚΟΚΚΟΙ: *Streptococcus pyogenes*
Streptococcus agalactiae

Τα αναλυτικά σχήματα της MLST περιλαμβάνουν για κάθε υπό μελέτη είδος βακτηρίου την επιλογή των γονιδίων που ενισχύονται, τα χαρακτηριστικά τους, τις πρωτεΐνες που κωδικοποιούν και τις λειτουργίες τους. Επίσης περιλαμβάνουν τους επιλεγέντες εκκινητές κάθε γονιδιακού θραύσματος της αντίδρασης PCR (²⁵¹, ²⁵²). Όλα τα ένζυμα που κωδικοποιούνται σημειώνονται με τον κωδικό του ενζύμου (EC: Enzyme Class) και οι αντιδράσεις που καταλύουν και καταγράφονται στην παρούσα μελέτη, προέρχονται από την ψηφιακή εγκυκλοπαίδεια του Πανεπιστημίου του Κιότο για γονίδια και γονιδιώματα (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes-**KEGG**) (<http://www.genome.ad.jp/kegg/>).

2.6.1. *Enterococcus faecium*

Εφαρμόσαμε το **σχήμα MLST** για *E. faecium* που καθιερώθηκε τον Ιούνιο του **2002** όπως περιγράφεται από τους: **Rob Willems** (National Institute of Public Health and the Environment-RIVM), Netherlands σε συνεργασία με τους **Homan WL** και **David Tribe** (The University of Melbourne, Australia). (²⁵³, ²⁵⁴)

ΓΟΝΙΔΙΟ	ENZYMΟ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ (bp)	ΜΕΓΕΘΟΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ (bp)	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (aa)
<i>atpA</i>	ATP synthase, alpha subunit	556	1757	518
<i>ddl</i>	D-alanine: D-alanine ligase	465	1047	348
<i>gdh</i>	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	530	1524	507
<i>purK</i>	carboxylase ATPase subunit	492	582	193
<i>gyd</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	395	1002	333
<i>pstS</i>	Phosphate ATP binding cassette transporter	583	801	269
<i>adk</i>	Adenylate kinase	437	651	216

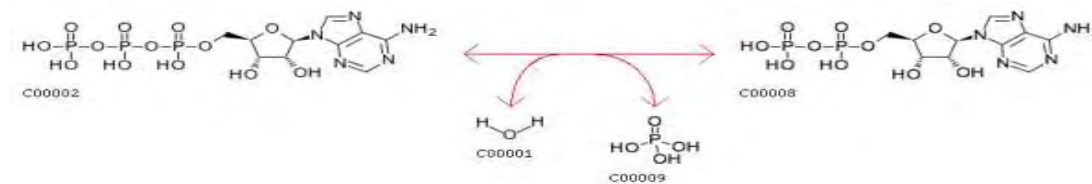
ΓΟΝΙΔΙΟ	ΔΡΑΣΗ ENZYMOY	ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΟΔΟΣ
<i>atpA</i>	Υδρολάση για μεταφορά ιόντων H ⁺	Μεταβολισμός υδρογονανθράκων, Γλυκόλυση, νεογλυκογένεση
<i>ddl</i>	Λιγάση D-αλανίνης	Μεταβολισμός D-αλανίνης, βιοσύνθεση πεπτιδογλυκανών.
<i>gdh</i>	Αφυδρογονάση	Μεταβολισμός υδατανθράκων και φωσφορικών πεντοζών
<i>purK</i>	Λιγάση (σχηματισμός δεσμών μεταξύ άνθρακα και αζώτου)	Μεταβολισμός πουρινών.
<i>gyd</i>	Αφυδρογονάση	Μεταβολισμός υδρογονανθράκων, γλυκόλυση, νεογλυκογένεση.
<i>pstS</i>	Πρωτεΐνη μεταφοράς φωσφόρου	Μεταφορέας ουσιών.
<i>adk</i>	Φωσφοτρανσφεράση	Μεταβολισμός πουρινών

Πίνακας 6: Χαρακτηριστικά μεγέθη και ιδιότητες των γονιδίων του σχήματος MLST του *E. faecium*

❖ Ο πλήρης γενετικός χάρτης του γονιδιώματος για τον *E. faecium* δεν έχει ακόμα ολοκληρωθεί γι' αυτό και δεν παρατίθενται οι σχετικές θέσεις των υπό μελέτη γονιδίων στον φυσικό χάρτη του γονιδιώματος του βακτηρίου.

6.1.1 *atpA* (ATP synthase subunit alpha EC 3.6.3.14): το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για την α-υπομονάδα της ATP υδρολάσης, ενζύμου που καταλύει την διακίνηση πρωτονίων (H⁺)

μεταξύ του ενδοκυττάριου και του εξωκυττάριου χώρου και πραγματοποιείται με αποικοδόμηση του ATP μέσω υδρόλυσης:



Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου *atpA_n*

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

atpA_n 1: 5'- TTC AAA TGG CTC ATA CGG - 3'

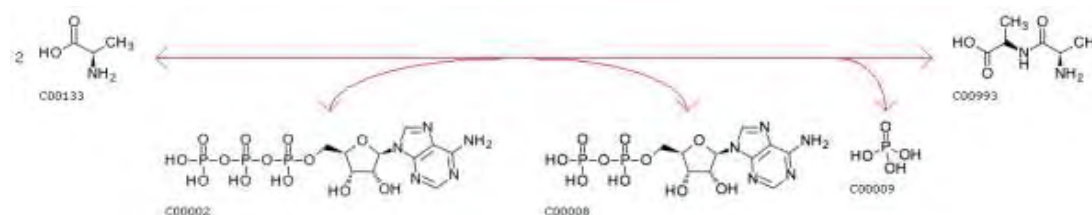
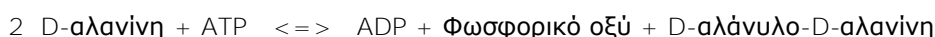
atpA_n 2: 5'- AGT TCA CGA TAA GCA ACA GC - 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 7**.

Στάδιο	Θερμοκρασία(°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική Αποδιάταξη	95	5min	1
Μετουσίωση	94	30sec	
Υβριδισμός	55	30sec	35
Επιμήκυνση	72	10min	
Τελική Επιμήκυνση	72	5min	1

Πίνακας 7. Συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή κατάλληλες για την ενίσχυση θραυσμάτων των γονιδίων *atpA_n, ddl, gdh, purk_n* του *E.faecium*.

6.1.2 *ddl* (D-alanyl-D-alanine ligase EC 6.3.2.4), γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο λιγάση της D-αλανίνης. Πρόκειται για ένζυμο μεταβολισμού της D-αλανίνης αλλά και άλλων αμινοξέων τα οποία συμμετέχουν στον σχηματισμό του κυτταρικού τοιχώματος, με σύγχρονη προσφορά ενέργειας από το ATP :



Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου *ddl*

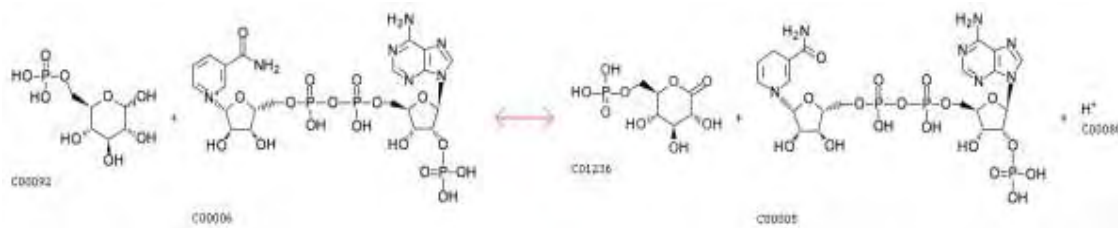
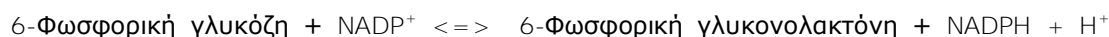
Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

ddl 1: 5'- GAG ACA TTG AAT ATG CCT TAT G - 3'

ddl 2: 5' - AAA AAG AAA TCG CAC CG - 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 7**.

6.1.3 *gdh* (Glucose-6-phosphate dehydrogenase EC 1.1.1.49) γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο αφυδρογονάση (ή οξειδοαναγωγή) της φωσφορικής γλυκόζης. Πρωτονιοδέκτης (H^+) της αντίδρασης είναι το $NADP^+$. Η αντίδραση είναι αμφίδρομη:



Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου *gdh*

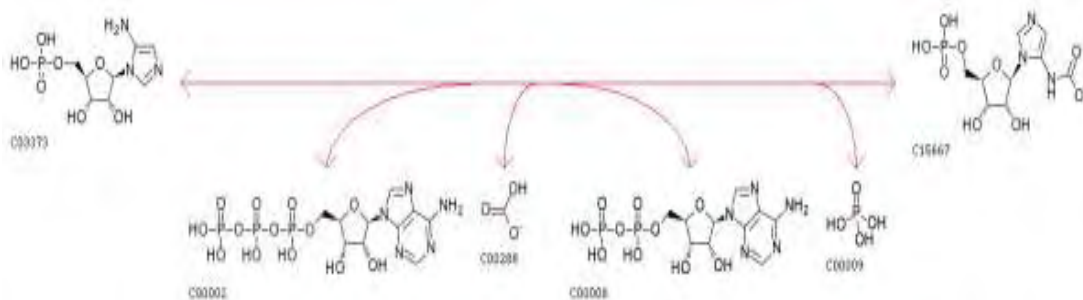
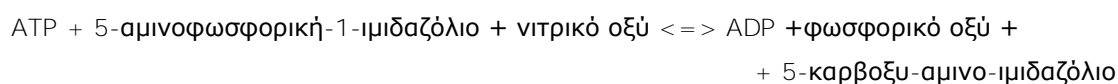
Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

***gdh* 1:** 5'- GGC GCA CTA AAA GAT ATG GT – 3'

***gdh* 2:** 5'- CCA AGA TTG GGC AAC TTC GTC CCA – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 7**.

6.1.4 *purK* (phosphoribosylaminoimidazol carboxylase ATPase subunit EC 4.1.1.21): γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο λιγάση μιας υπομονάδας του ATP. Ανήκει σε μια υπεροικογένεια λιγασών και η συγκεκριμένη λιγάση καταλύει τον σχηματισμό δεσμού μεταξύ ατόμων άνθρακα και αζώτου:



Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου *purK_n*

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

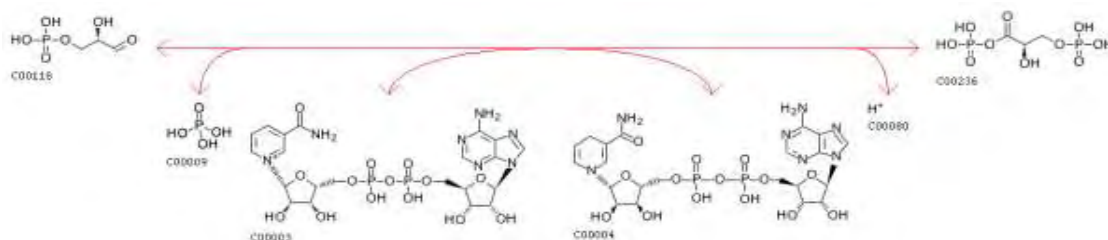
***purK_n* 1:** 5'- CAG ATT GGC ACA TTG AAA G- 3'

***purK_n* 2:** 5' – TTC ATT CAC ATA TAG CCC G– 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 7**.

6.1.5 *gyd* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase EC 1.2.1.12): γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο αφυδρογονάση (ή οξειδοαναγωγή) της φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης. Δέκτης των πρωτονίων (H^+) της αμφίδρομης αντίδρασης είναι το NAD^+ .

3-φωσφο-γλυκεραλδεΐδη + φωσφορικό οξύ + NAD⁺ <=> 1,3 διφωσφο-γλυκερικό οξύ + NADH + H⁺



Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου *gpd*

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

gpd 1: 5'- CAA ACT GCT TAG CTC CAA TGG C - 3'

gpd 2: 5' - CAT TTC GTT GTC ATA CCA AGC - 3'

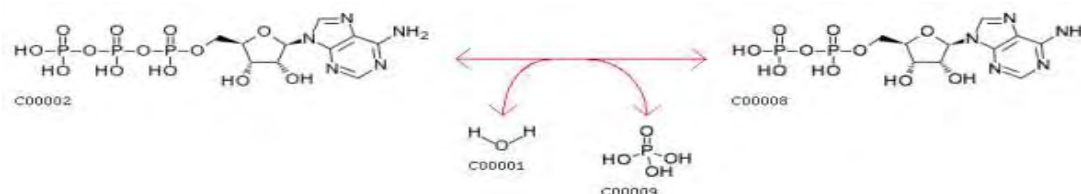
Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 8**.

Στάδιο	Θερμοκρασία(°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική Αποδιάταξη	94	3min	1
Μετουσίωση	94	30sec	
Υβριδισμός	48	30sec	35
Επιμήκυνση	72	30sec	
Τελική Επιμήκυνση	72	5min	1

Πίνακας 8. Συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή κατάλληλες για την ενίσχυση θραύσματος του γονιδίου *gpd* του *E.faecium*.

6.1.6 *pstS* (phosphate ATP binding cassette transporter EC 3.6.3.27): Πρόκειται για γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί για μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία χρησιμοποιεί ως πηγή ενέργειας την υδρόλυση του ATP, για την μεταφορά διαφόρων ουσιών (ιόντων, σακχάρων, λιπιδίων, στερολών, πεπτιδίων, πρωτεϊνών και φαρμάκων), στην προκειμένη περίπτωση φωσφόρου, μέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Η υδρόλυση του ATP είναι αμφίδρομη σύμφωνα με την αντίδραση:

ATP + H₂O + φωσφορικές ομάδες (out) <=> ADP + φωσφορικό οξύ + φωσφορικές ομάδες (in)



Η λειτουργία των πρωτεϊνών που ανήκουν στο σύστημα διαμεμβρανικής μεταφοράς **ABC-transporter** (ATP-Binding Cassette transporter) περιγράφονται αναλυτικά στο Παράρτημα (Π3).

Ενίσχυση με PCR, θραύσματος του γονιδίου *pstS*

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

pstS 1: 5' - TTG AGC CAA GTC GAA GCT GGA G - 3'

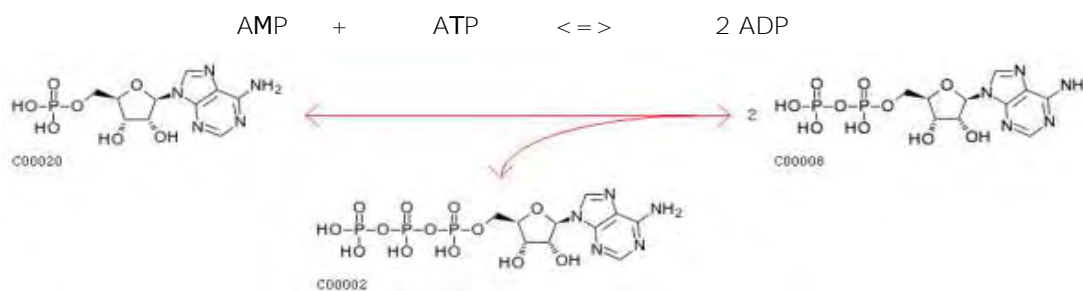
pstS 2: 5' – CGT GAT CAC GTT CTA CTT CC – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 9**.

Στάδιο	Θερμοκρασία(°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική Αποδιάταξη	94	3min	1
Μετουσίωση	94	30sec	
Υβριδισμός	50	30sec	35
Επιμήκυνση	72	30sec	
Τελική Επιμήκυνση	72	5min	1

Πίνακας 9. Συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή κατάλληλες για την ενίσχυση θραυσμάτων των γονιδίων **pstS** και **adk** του *E.faecium*.

6.1.7 adk (adenylate kinase EC 2.7.4.3): γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο αδενυλική κινάση ή κυκλάση. Το ένζυμο, καταλύοντας στην δημιουργία του AMP, ενεργοποιεί σημαντικότερες μεταβολικές πορείες εντός του κυττάρου. Το AMP λειτουργεί ως εναρκτήριο σήμα οδηγώντας στην έκφραση γονιδίων του κυττάρου πχ παροχή σακχάρων σε απουσία γλυκόζης στο κυτταρικό περιβάλλον. Επίσης συμμετέχει στον μεταβολισμό των πουρινών



Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου *adk*

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

adk 1: 5' – TAT GAA CCT CAT TTT AAT GGG-3'

adk 2: 5' – GTT GAC TGC CAA ACG ATT TT- 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 9**.

2.6.2. Enterococcus faecalis

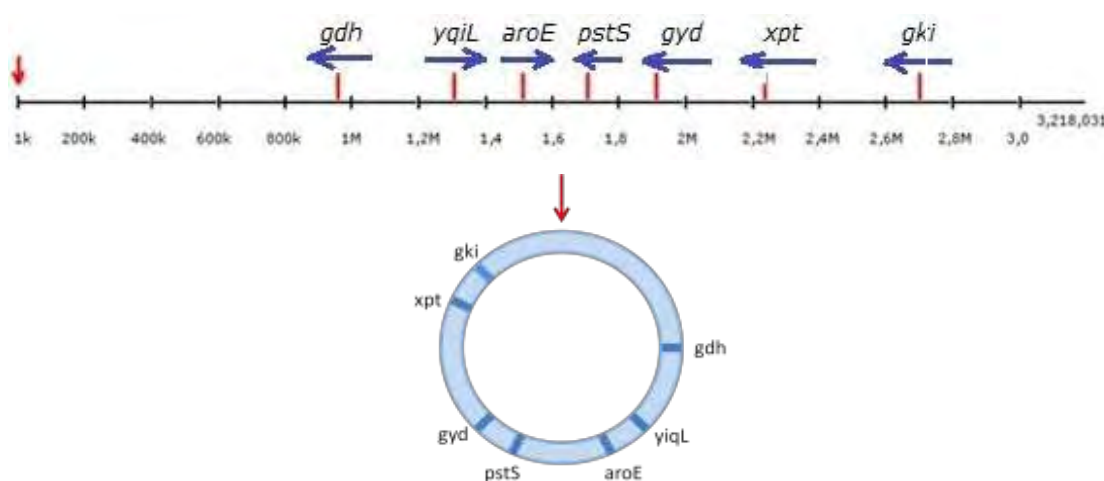
Εφαρμόσαμε το **σχήμα MLST** για *Enterococcus faecalis* που καθιερώθηκε το **2006** από τους: **Patricia Ruiz Garbajosa** και **Rob Willems** στο εργαστήριο του **Marc Bonten**-University Medical Center Utrecht, Utrecht, the Netherlands. Ένα μέρος των αρχικών αλληλουχιών προσφέρθηκε ευγενώς από την Barbara Murray. (²⁵⁵, ²⁵⁶)

ΓΟΝΙΔΙΟ	ENZYMO	ΜΕΓΕΘΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ (bp)	ΜΕΓΕΘΟΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ (bp)	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (aa)
<i>gdh</i>	<i>Glucose-6-phosphate dehydrogenase</i>	530	1524	507
<i>gyd</i>	<i>Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase</i>	395	1002	333

<i>pstS</i>	Phosphate ATP binding cassette transporter	583	801	269
<i>gki</i>	Glucokinase	438	972	323
<i>aroE</i>	Shikimate-5-dehydrogenase	459	867	288
<i>xpt</i>	Xanthine phosphoribosyltransferase	456	582	193
<i>yqiL</i>	Acetyl-CoA acetyltransferase	436	2412	803

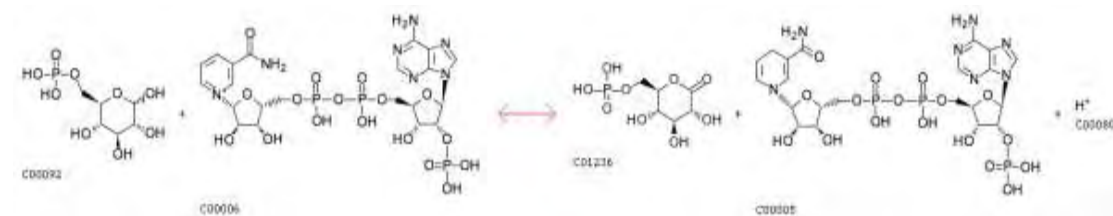
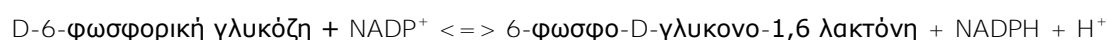
ΓΟΝΙΔΙΟ	ΔΡΑΣΗ ΕΝΖΥΜΟΥ	ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΟΔΟΣ
<i>gdh</i>	Οξειδοαναγωγή	Μεταβολισμός υδρογονανθράκων και φωσφορικών πεντοζών
<i>gyd</i>	Οξειδοαναγωγή	Μεταβολισμός υδρογονανθράκων, γλυκόλυση-νεογλυκογένεση
<i>pstS</i>	Πρωτεΐνη μεταφοράς φωσφόρου	Μεταφοράς ουσιών
<i>gki</i>	Φωσφοτρανσφεράση	Μεταβολισμός υδρογονανθράκων, γλυκόλυση-νεογλυκογένεση
<i>aroE</i>	Οξειδοαναγωγή	Μεταβολισμός αμινοξέων (φαινυλαλανίνης, τυροσίνης και τρυπτοφάνης)
<i>xpt</i>	Τρανσφεράση	Μεταβολισμός πουρινών
<i>yqiL</i>	Οξειδοαναγωγή	Μεταβολισμός λιπαρών οξέων

Πίνακας 10: Χαρακτηριστικά μεγέθη και ιδιότητες των γονιδίων του σχήματος MLST για τον *E. faecalis*



Εικόνα 27. Χρωμοσωμικές θέσεις των χρησιμοποιηθέντων γονιδίων του *E. faecalis*. Οι τοποθεσίες σχεδιάστηκαν στο φυσικό γενετικό χάρτη του στελέχους **V583** του *E. faecalis*. (257)

6.2.1 *gdh* (glucose-6-phosphate dehydrogenase EC 1.1.1.49): το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για το ένζυμο αναγωγή της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Η αντίδραση είναι αμφίδρομη με παρουσία του NADP^+ ως πρωτονιοδέκτη.



Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου *gdh*

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

***gdh* 1:** 5' – GGC GCA CTA AAA GAT ATG GT – 3'

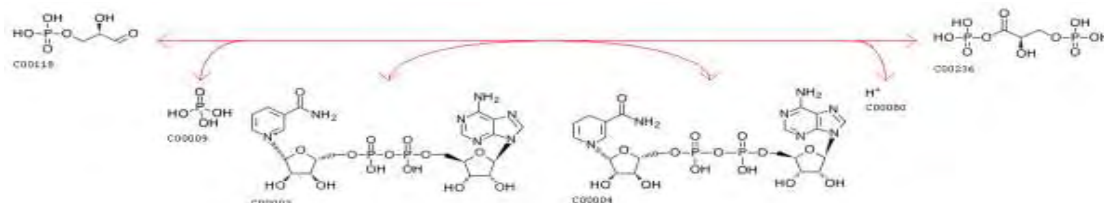
gdh 2: 5' – CCA AGA TTG GGC AAC TTC GTC CCA – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 11**.

Στάδιο	Θερμοκρασία(°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική Αποδιάταξη	95	5min	1
Μετουσίωση	94	30sec	
Υβριδισμός	55	30sec	35
Επιμήκυνση	72	1min	
Τελική Επιμήκυνση	72	10min	1

Πίνακας 11. Συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή, κατάλληλες για την ενίσχυση θραύσματος του γονιδίου *gdh* του *E. faecalis*.

6.2.2 *gyd* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase EC 1.2.1.59): γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο αφυδρογονάση (ή οξειδοαναγωγή) της φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης. Δέκτης των πρωτονίων (H^+) της αμφίδρομης αντίδρασης είναι το NAD^+ :
 $3\text{-φώσφο-γλυκεραλδεΐδη} + \text{φωσφορικό οξύ} + NAD^+ \rightleftharpoons 1,3\text{ διφώσφορο-γλυκερικό οξύ} + NADH + H^+$



Ενίσχυση με PCR, θραύσματα του γονιδίου *gyd*

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

gyd 1: 5' – CAA ACT GCT TAG CTC CAA TGG C – 3'

gyd 2: 5' – CAT TTC GTT GTC ATA CCA AGC – 3'

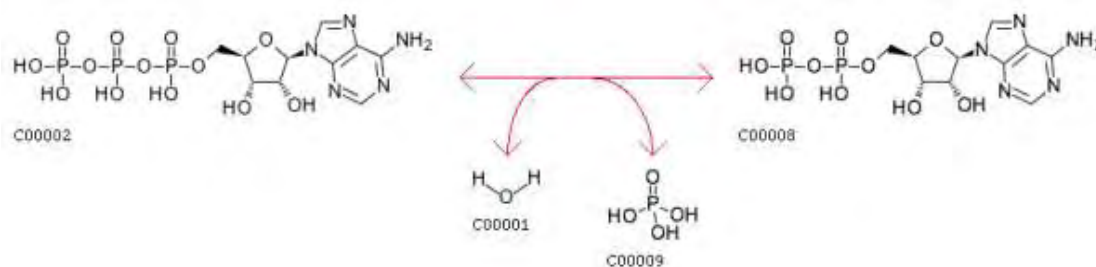
Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 12**.

Στάδιο	Θερμοκρασία(°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική Αποδιάταξη	95	3min	1
Μετουσίωση	94	30sec	
Υβριδισμός	48	30sec	35
Επιμήκυνση	72	30sec	
Τελική Επιμήκυνση	72	5min	1

Πίνακας 12. Συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή κατάλληλες για την ενίσχυση των θραυσμάτων των γονιδίων *aroE*, *gyd*, *pstS*, *gki*, *xpt*, *yiqL* του *E. faecalis*.

6.2.3 *pstS* (phosphate ATP-binding cassette transporter EC 3.6.3.27): Πρόκειται για γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί για μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία χρησιμοποιεί ως πηγή ενέργειας την υδρόλυση του ATP για την μεταφορά διαφόρων ουσιών (ιόντων, σακχάρων, λιπιδίων, στερολών, πεπτιδίων, πρωτεϊνών και φαρμάκων) εν προκειμένω του φωσφόρου, μέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Η μεταφορά των φωσφορικών ομάδων απαιτεί την υδρό-

λυση του ATP για τις ενεργειακές ανάγκες της διαμεμβρανικής μεταφοράς. (258, 259) Η υδρόλυση του ATP είναι αμφίδρομη σύμφωνα με την αντίδραση:



Οι πρωτεΐνες που ανήκουν στο σύστημα **ABC-transporter** (ATP-Binding Cassette transporter) περιγράφονται εκτενώς στο Παράρτημα (Π3).

Ενίσχυση με PCR, θραύσματος του γονιδίου *pstS*

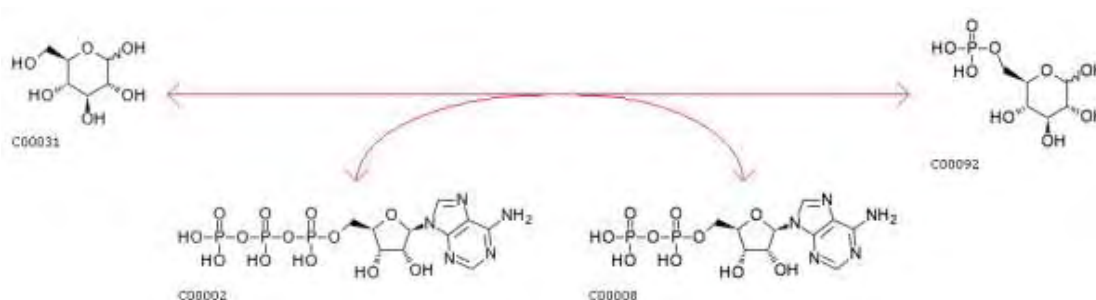
Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

***pstS* 1:** 5' – CGG AAC AGG ACT TTC GC – 3'

***pstS* 2:** 5' – ATT TAC ATC ACG TTC TAC TTG C – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 12**.

6.2.4 *gki* (glucokinase EC 2.7.1.2): γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί για το ένζυμο εξοκινάση της γλυκόζης, με προσφορά ενέργειας από το ATP, που συμμετέχει στην αμφίδρομη αντίδραση:



Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου *gki*

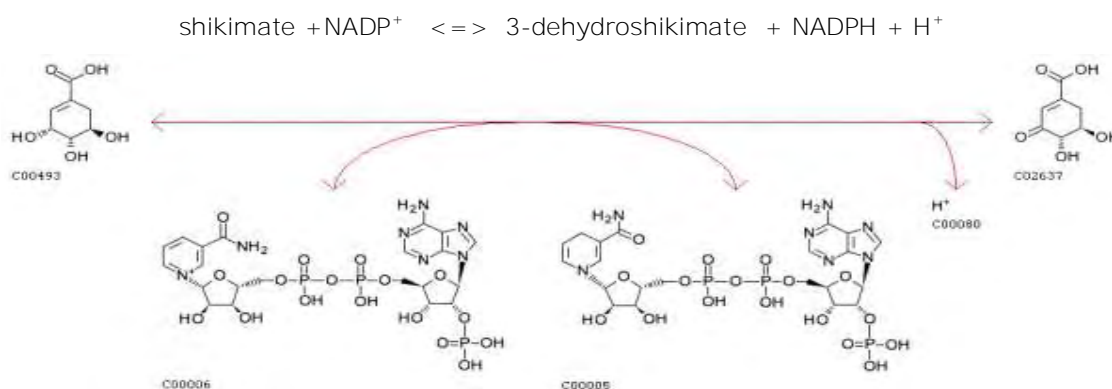
Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

***gki* 1:** 5' – GAT TTT GTG GGA ATT GGT ATG G – 3'

***gki* 2:** 5' – ACC ATT AAA GCA AAA TGA TCG C – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 12**.

6.2.5 *aroE* (shikimate 5-dehydrogenase EC 1.1.1.25): γονίδιο που κωδικοποιεί για μια αφυδρογονάση που λαμβάνει μέρος στον μεταβολισμό της φαινυλαλανίνης, τυροσίνης και τρυπτοφάνης με συμμετοχή του NADP⁺ ως δέκτη πρωτονίων (H⁺):



Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου *aroE*

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινήτες με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

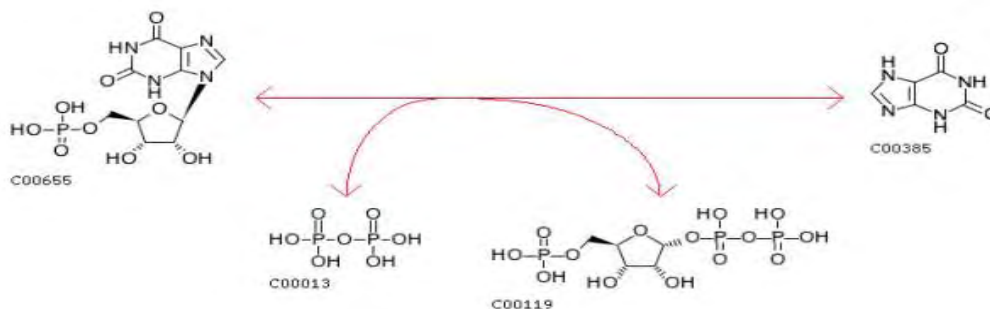
***aroE* 1:** 5' – TGG AAA ACT TTA CGG AGA CAG C – 3'

***aroE* 2:** 5' – GTC CTG TCC ATT GTT CAA AAG C – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 12**.

6.2.6 *xpt* (xanthine phosphoribosyl transferase EC 2.4.2.22): γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί για το ένζυμο φωσφο-ριβοσυλο-τρανσφεράση της μεταβολικής οδού των πουρινών. Η αντίδραση είναι αμφίδρομη:

Ξανθυλικό οξύ + πυροφωσφορικό οξύ \rightleftharpoons Ξανθίνη + διφωσφορική-D-ριβόζη



Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου *xpt*

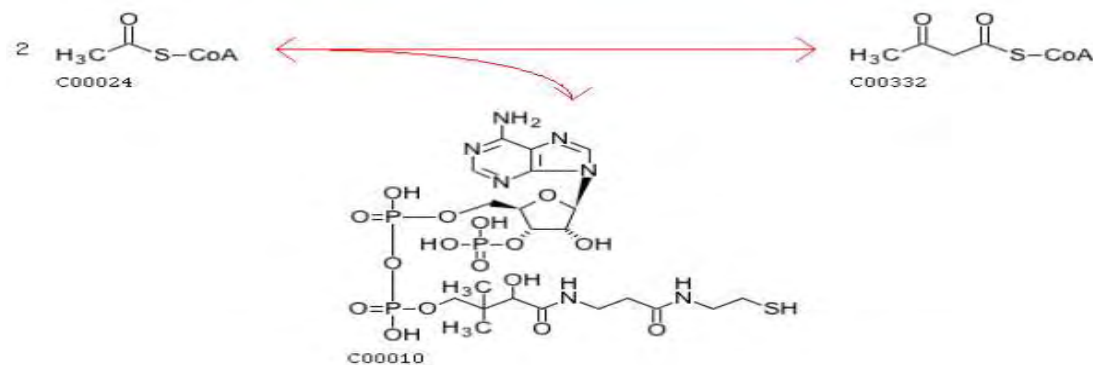
Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινήτες με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

***xpt* 1:** 5' – AAA ATG ATG GCC GTG TAT TAG G – 3'

***xpt* 2:** 5' – AAC GTC ACC GTT CCT TCA CTT A – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 12**.

6.2.7 *yigL* (acetyl coenzyme A acetyltransferase EC 2.3.1.9): το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για ένζυμο μεταφοράς ακετυλομάδων από το υπόστρωμα ακέτυλο-συνένζυμο A. Η μεταβολική οδός στην οποία το συγκεκριμένο ένζυμο δραστηριοποιείται είναι κατά τον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, στην σύνθεση και αποικοδόμηση κετονικών σωμάτων και αμινοξέων (βαλίνης, λευκίνης, τρυπτοφάνης κ.α).



Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου *yqiL*

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

***yqiL* 1:** 5' – CAG CTT AAG TCA AGT AAG TGC CG – 3'

***yqiL* 2:** 5' – GAA TAT CCC TTC TGC TTG TGC T – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον Πίνακα 12.

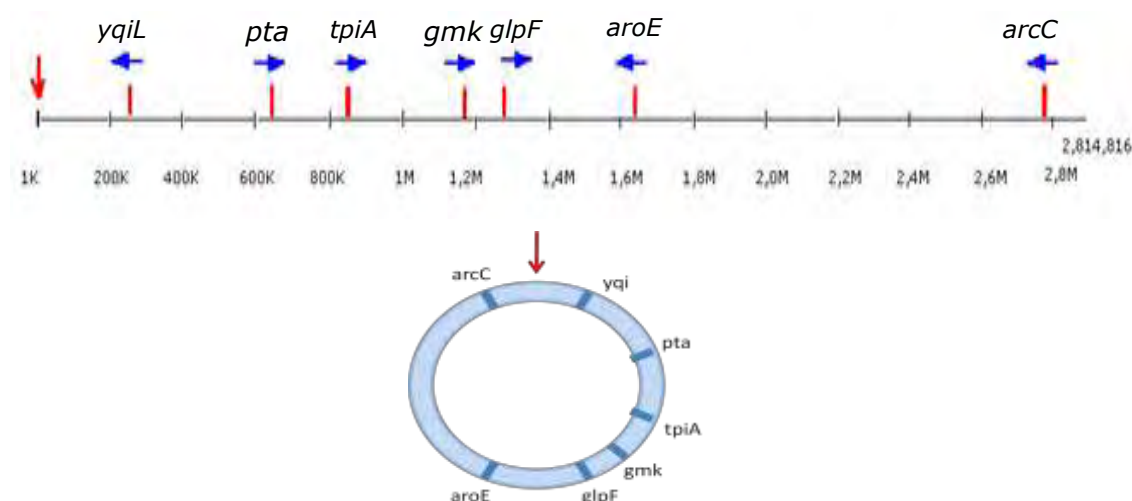
2.6.3. *Staphylococcus aureus*

Εφαρμόσαμε το το σχήμα MLST για *Staphylococcus aureus* που καθιερώθηκε το 2000 από τον Mark Enright (University of Bath) στο εργαστήριο του Professor Brian Spratt, Imperial College, London, σε συνεργασία με τα εργαστήρια των Drs Nick Day και Sharon Peacock του John Radcliffe Hospital, Oxford. (²⁶⁰, ²⁶¹)

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΕΝΖΥΜΟ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ (bp)	ΜΕΓΕΘΟΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ (bp)	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (aa)
<i>arcC</i>	<i>carbamate kinase</i>	456	942	313
<i>aroE</i>	<i>Shikimate-5-dehydrogenase</i>	456	807	268
<i>glp</i>	<i>Glycerol kinase</i>	465	1497	498
<i>gmk</i>	<i>Guanylate kinase</i>	429	624	207
<i>pta</i>	<i>Phosphate acetyltransferase</i>	474	987	328
<i>tpi</i>	<i>Triosephosphate isomerase</i>	402	762	252
<i>yqiL</i>	<i>Acetyl-CoA acetyltransferase</i>	516	1185	394

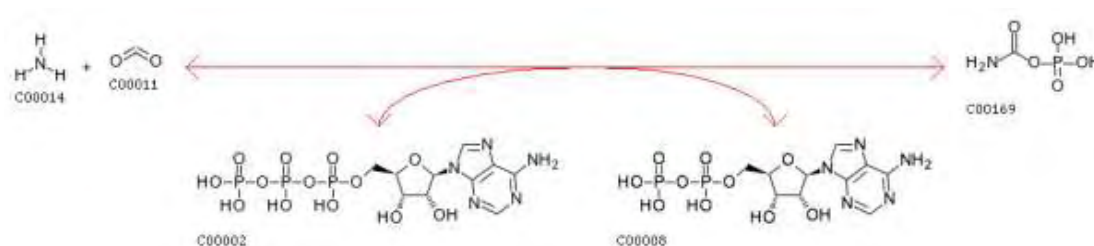
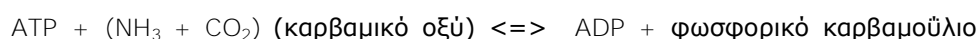
ΓΟΝΙΔΙΟ	ΔΡΑΣΗ ΕΝΖΥΜΟΥ	ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΟΔΟΣ
<i>arcC</i>	Φωσφοτρανσφεράση	Μεταβολισμός πουρινών, αμινοξέων (αργινίνης, προλίνης) και αζώτου
<i>aroE</i>	Αφυδρογονάση-οξειδοαναγωγή	Μεταβολισμός αμινοξέων κυρίως φαινυλαλανίνης, τυροσίνης και τρυπτοφάνης
<i>glp</i>	Φωσφοτρανσφεράση	Μεταβολισμός λιπιδίων
<i>gmk</i>	Φωσφοτρανσφεράση	Μεταβολισμός πουρινών
<i>pta</i>	Τρανσφεράση ακετυλομάδων	Μεταβολισμός υδατανθράκων και πυροσταφυλικού οξέος
<i>tpi</i>	Ισομεράση	Γλυκόλυση και γλυκονογένεση (μεταβολισμός φρουκτόζης και μαννόζης)
<i>yqiL</i>	Τρανσφεράση ακετυλομάδων	Μεταβολισμός λιπιδίων, αμινοξέων (βαλίνης, λευκίνης, τρυπτοφάνης)

Πίνακας 13: Χαρακτηριστικά μεγέθη και ιδιότητες των γονιδίων του σχήματος MLST για *S. aureus*



Εικόνα 28. Χρωμοσωμικές θέσεις των γονιδίων του *S. aureus*. Οι τοποθεσίες σχεδιάστηκαν στο φυσικό χάρτη του στελέχους **N315 *S. aureus*** ⁽²⁶²⁾

6.3.1 *arcC* (carbamate kinase EC 2.7.2.2): το οποίο κωδικοποιεί για το ένζυμο της καρβαμικής κινάσης. Πρόκειται για μία ATP καρβαμική φωσφοτρανσφεράση η οποία καταλύει την αμφίδρομη αντίδραση μεταφοράς φωσφορικής ομάδος, με χρήση ενέργειας από την μετατροπή του ATP σε ADP, σύμφωνα με την αντίδραση:



Το συγκεκριμένο ένζυμο χρησιμοποιείται στον μεταβολισμό των πουρινών, της αργινίνης, της προλίνης καθώς και στο μεταβολισμό του αζώτου.

Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου *arcC*

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

***arcC* up:** 5' – TTG ATT CAC CAG CGC GTA TTG TC – 3'

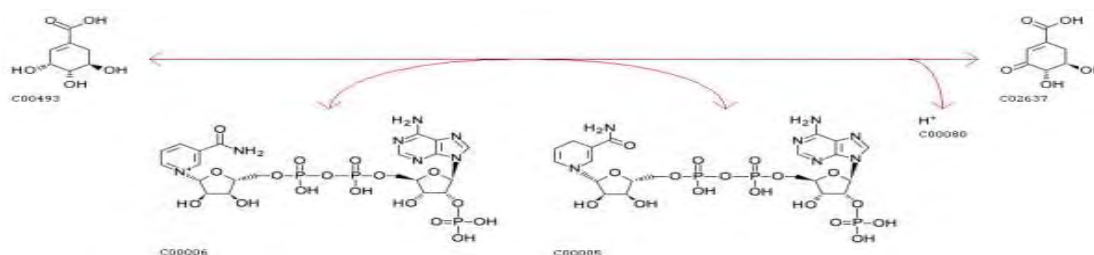
***arcC* dn:** 5' – AGG TAT CTG CTT CAA TCA GCG – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 14**:

Στάδιο	Θερμοκρασία(°C)	Χρόνος (min)	Κύκλοι
Αρχική Αποδιάταξη	95	5	1
Μετουσίωση	94	1	
Υβριδισμός	55	1	30
Επιμήκυνση	72	1	
Τελική Επιμήκυνση	72	10	1

Πίνακας 14. Συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή κατάλληλες για την ενίσχυση των θραυσμάτων όλων των γονιδίων *Staphylococcus aureus*

6.3.2 *aroE* (shikimate 5-dehydrogenase EC 1.1.1.25): γονίδιο που κωδικοποιεί για μία αφυδρογονάση που λαμβάνει μέρος στον μεταβολισμό της φαινυλαλανίνης, τυροσίνης και τρυπτοφάνης, με συμμετοχή του NADP⁺ ως δέκτη πρωτονίων (H⁺):



Ενίσχυση με PCR, θραύσματος του γονιδίου *aroE*

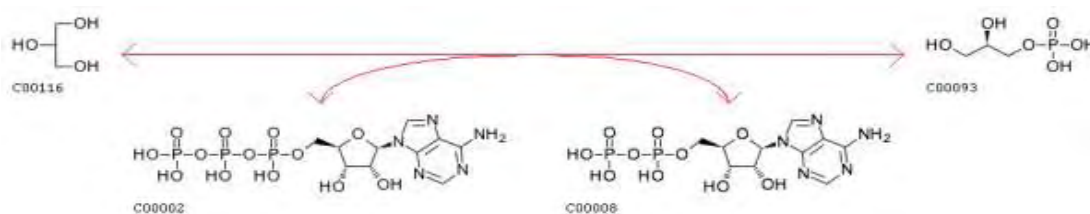
Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

***aroE* up:** 5' – ATC GGA AAT CCT ATT TCA CAT TC – 3'

***aroE* dn:** 5' – GGT GTT GTA TTA ATA ACG ATA TC – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 14**.

6.3.3 *glp* (glycerol kinase EC 2.7.1.30): γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο φωσφοτρανσφεράση ή κινάση της γλυκερόλης. Πρόκειται για ένζυμο μεταβολισμού των λιπιδίων και η αντίδραση που καταλύει πραγματοποιείται με προσφορά ενέργειας από την διάσπαση του ATP:



Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου *glp*

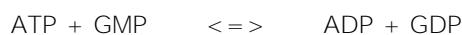
Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

***glp* up:** 5' – CTA GGA ACT GCA ATC TTA ATC C – 3'

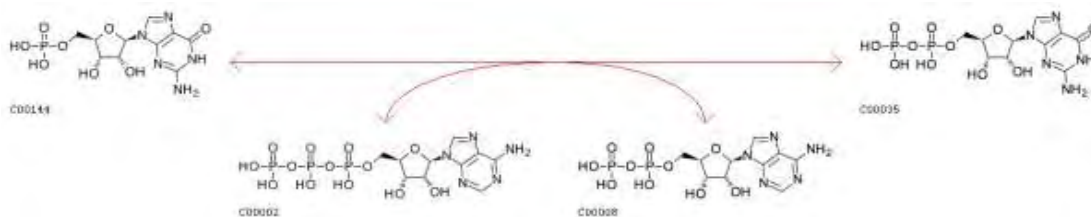
***glp* dn:** 5' – TGG TAA AAT CGC ATG TCC AAT TC – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 14**.

6.3.4 *gmk* (guanulate kinase EC 2.7.4.8) ή *ATP-φωσφοτρανσφεράση*, γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο κινάση της μονοφωσφορικής γουανωσίνης και καταλύει την μεταφορά φωσφορικών ομάδων της μεταβολικής οδού των πουρινών και ειδικά των νουκλεοτιδίων, με προσφορά ενέργειας από το ATP:



Όπου: GMP (μονοφωσφορική γουανοσίνη) και GDP (5-διφωσφορική γουανοσίνη)



Ενίσχυση με PCR, θραύσματος του γονιδίου *gmk*

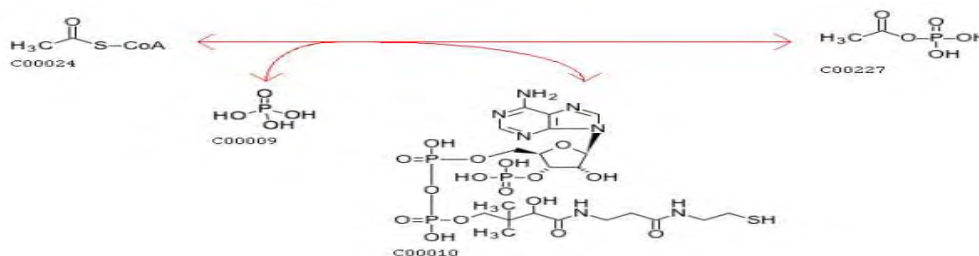
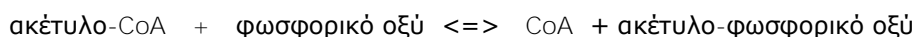
Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

gmk up: 5' – ATC GTT TTA TCG GGA CCA TC – 3'

gmk dn: 5' – TCA TTA ACT ACA ACG TAA TCG TA – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον Πίνακα 14.

6.3.5 *pta* (phosphotransacetylase EC 2.3.1.8): το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για το ένζυμο φωσφο-τρανσακετυλάση που καταλύει την μεταφορά φωσφορικών ομάδων και ακετυλομάδων κατά τον μεταβολισμό των υδατανθράκων και του πυροσταφυλικού οξέος. Η αμφίδρομη αντίδραση καταλύεται πάνω σε υπόστρωμα ακέτυλο-CoA:



Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου *pta*

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

pta up: 5' – GTT AAA ATC GTA TTA CCT GAA GG – 3'

pta dn: 5' – GAC CCT TTT GTT GAA AAG CTT AA – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον Πίνακα 14.

6.3.6 *tpiA* (triosephosphate isomerase EC 5.3.1.1): πρόκειται για γονίδιο που κωδικοποιεί για ένζυμο με δράση αναγωγής του υποστρώματος της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης και προϊόν την φωσφογλυκερόνη. Οι μεταβολικές οδοί στις οποίες συμμετέχει το ένζυμο είναι οι οδοί της γλυκόλυσης και νεογλυκογένεσης. Η αντίδραση είναι αμφίδρομη:



Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου *tpiA*

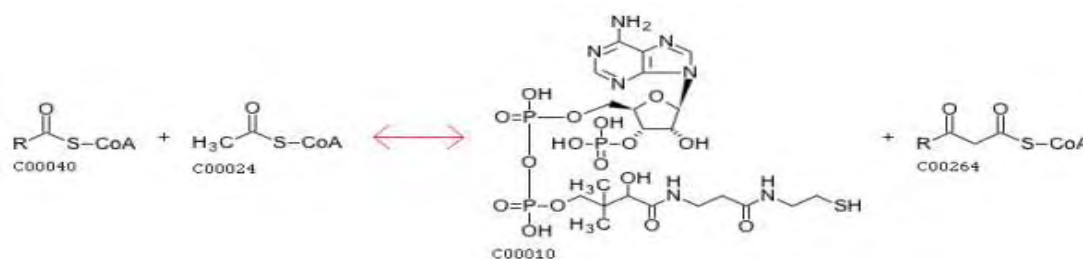
Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

tpi up: 5' – TCG TTC ATT CTG AAC GTC GTG AA – 3'

tpi dn: 5' – TTT GCA CCT TCT AAC AAT TGT AC – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 14**.

6.3.7 *yqiL* (acetyl-CoA acetyltransferase EC 2.3.1.9): το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί ένζυμο μεταφοράς ακετυλομάδων από το υπόστρωμα ακέτυλο-συνένζυμο Α. Οι μεταβολικές οδοί στις οποίες δρα το συγκεκριμένο ένζυμο είναι κατά τον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, κατά την σύνθεση και αποδόμηση των κετονικών σωμάτων καθώς και αμινοξέων όπως βαλίνης, λευκίνης, τρυπτοφάνης κ.α.

Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου *yqiL*

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

yqiL up: 5' – CAG CAT ACA GGA CAC CTA TTG GC – 3'

yqiL dn: 5' – CGT TGA GGA ATC GAT ACT GGA AC – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 14**.

2.6.4. *Staphylococcus epidermidis*

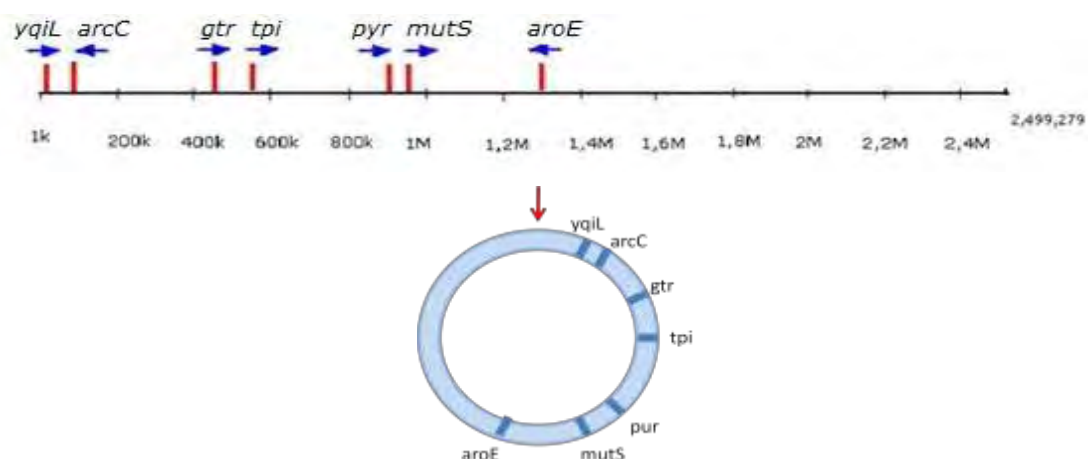
Τρία σχήματα MLST για ***Staphylococcus epidermidis*** έγιναν αρχικά διαθέσιμα. Τα δύο από αυτά δημοσιεύτηκαν τον ίδιο μήνα, των **Wang et al** και **Wisplinghoff et al**, ενώ το τρίτο σχήμα των **Peacock et al** ήταν ακόμη αδημοσίευτο. Ωστόσο και τα τρία σχήματα αποδείχθηκαν στην πράξη κατώτερα των προσδοκιών. Σε μια σύγκριση και των τριών σχημάτων, χρησιμοποιώντας το ίδιο υλικό, από τους **Thomas et al**, το **2007** κανένα σχήμα δεν υπερίσχυσε έναντι του άλλου. Αυτό οδήγησε στην χρήση ενός ενιαίου και βελτιωμένου σχήματος που χρησιμοποιεί τους πιο διακριτούς γονιδιακούς τόπους και από τα τρία σχήματα. (²⁶³, ²⁶⁴)

ΓΟΝΙΔΙΟ	ΕΝΖΥΜΟ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ (bp)	ΜΕΓΕΘΟΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ (bp)	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (aa)
<i>arcC</i>	Carbamate kinase	465	930	309
<i>aroE</i>	Shikimate 5-dehydrogenase	420	819	272
<i>gtr</i>	ABC transporter	438	1695	564

<i>mutS</i>	DNA mismatch repair protein	412	2622	873
<i>pur</i>	Pyrimidine operon regulatory protein	428	528	175
<i>tpi</i>	Triosephosphate isomerase	424	762	253
<i>yqiL</i>	Acetyl coenzyme A acetyltransferase	416	1185	394

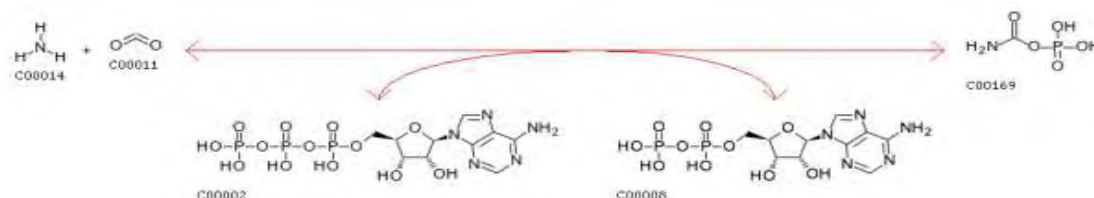
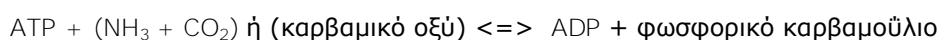
ΓΟΝΙΔΙΟ	ΔΡΑΣΗ ΕΝΖΥΜΟΥ	ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΟΔΟΣ
<i>arcC</i>	Φωσφοτρανσφεράση	Μεταβολισμός πουρινών, αμινοξέων (αργινίνης, προλίνης) και αζώτου
<i>aroE</i>	Αφυδρογονάση	Μεταβολισμός αμινοξέων κυρίως φαινυλαλάνης, τυροσίνης και τρυπτοφάνης
<i>gtr</i>	ABC-transporter πρωτεΐνη	Διαμεμβρανική μεταφορά ουσιών
<i>mutS</i>	Πρωτεΐνη επιδιόρθωσης αναντιστοιχίας (mismatch) των βάσεων του DNA	Διαδικασία αντιγραφής και επιδιόρθωσης του DNA
<i>pur</i>	Φωσφοτρανσφεράση	Μεταβολισμό των πυριμιδινών
<i>tpi</i>	Αναγωγή (της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης)	Γλυκόλυση και νεογλυκογένεση (μεταβολισμός φρουκτόζης και μαννόζης)
<i>yqiL</i>	Μεταφορά ακετυλομάδων	Μεταβολισμός λιπαρών οξέων

Πίνακας 15: Χαρακτηριστικά μεγέθη και ιδιότητες των γονιδίων του σχήματος MLST για *S. epidermidis*



Εικόνα 29. Χρωμοσωμικές θέσεις των γονιδίων *S. epidermidis*. Οι τοποθεσίες σχεδιάστηκαν στο φυσικό χάρτη του στελέχους **ATCC 12228 *S. epidermidis*** ⁽²⁶⁵⁾

6.4.1. *arcC* (carbamate kinase EC 2.7.2.2): γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο της καρβαμικής κινάσης. Πρόκειται για μία ATP καρβαμική φωσφοτρανσφεράση η οποία καταλύει την αμφίδρομη αντίδραση μεταφοράς φωσφορικής ομάδος, με χρήση ενέργειας από την μετατροπή του ATP σε ADP, σύμφωνα με την αντίδραση:



Το συγκεκριμένο ένζυμο δραστηριοποιείται επίσης και κατά τον μεταβολισμό των πουρινών, της αργινίνης, της προλίνης και κατά τον μεταβολισμό του αζώτου.

Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου *arcC*

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

arcC F: 5' – TGT GAT GAG CAC GCT ACC GTT AG – 3'

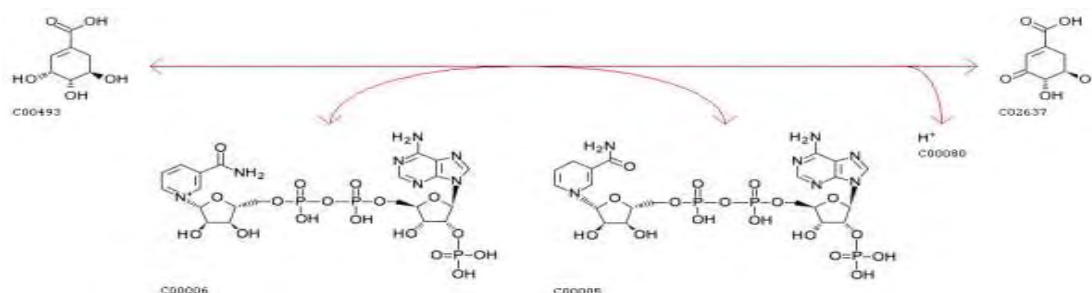
arcC R: 5' – TCC AAG TAA ACC CAT CGG TCT G – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 16**.

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (min)	Κύκλοι
Αρχική Αποδιάταξη	95	5	1
Μετουσίωση	94	1	
Υβριδισμός	55	1	30
Επιμήκυνση	72	1	
Τελική Επιμήκυνση	72	10	1

Πίνακας 16. Συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή κατάλληλες για την ενίσχυση των θραυσμάτων όλων των γονιδίων *Staphylococcus epidermidis*.

6.4.2. aroE (shikimate 5-dehydrogenase EC 1.1.1.25): γονίδιο που κωδικοποιεί για μία αφυδρογονάση που λαμβάνει μέρος στον μεταβολισμό της φαινυλαλανίνης, τυροσίνης και τρυπτοφάνης, με συμμετοχή του NADP⁺ ως δέκτη πρωτονίων (H⁺):



Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου aroE

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

aroE F: 5' – CAT TGG ATT ACC TCT TTG TTC AGC – 3'

aroE R: 5' – CAA GCG AAA TCT GTT GGG G – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 16**.

6.4.3. gtr (*ABC transporters* or **ATP-Binding Cassette Transporters**): κωδικοποιεί για πρωτεΐνη που ανήκει στην κατηγορία των **ATP-Binding Cassette Transporters** ή ABC μεταφορών. Είναι πρωτεΐνες-μεταφορείς (διακινητές) που ανήκουν σε μία από τις μεγαλύτερες υπέρ-οικογένειες πρωτεϊνών, από τις πλέον αρχαίες, με αντιπροσώπευση σε όλους τους ζώντες οργανισμούς, από τους προκαρυωτικούς έως και τους ανθρώπους. Αναλυτικά για την δράση και την λειτουργία της κατηγορίας αυτών των πρωτεϊνών αναφέρονται στο **Παράρτημα (Π3)**

Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου gtr

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

gtr F: 5' – CAG CCA ATT CTT TTA TGA CTT TT – 3'

gtr R: 5' – GTG ATT AAA GGT ATT GAT TTG AAT – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 16**.

6.4.4. mutS (DNA mismatch repair protein): Το **σύστημα DNA mismatch repair** αναγνωρίζει και διορθώνει λάθη που μπορεί να παρατηρηθούν κατά την διαδικασία του διπλασιασμού και ανασυνδυασμού του DNA και αφορά την εισαγωγή, την διαγραφή ή την αναντιστοιχία των βάσεων του DNA. Η επιδιόρθωση της αναντιστοιχίας (mismatch) των βάσεων είναι ειδική της νεοσχηματισθείσας έλικας του DNA και προϋποθέτει αρχικά την αναγνώριση της νέας-θυγατρικής έλικας του DNA και τον διαχωρισμό της από την πρότυπη έλικα. Αναλυτικά η λειτουργία του συστήματος αυτού αναφέρεται στο **Παράρτημα (Π3)**

Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου mutS

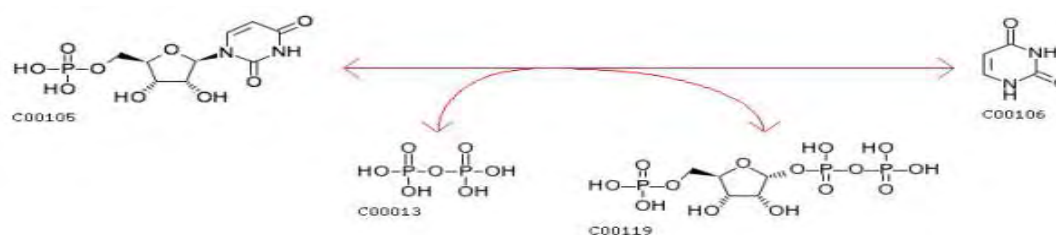
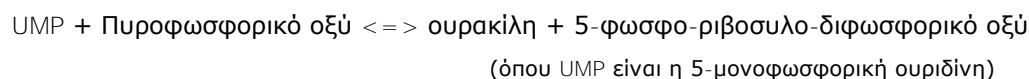
Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

mutS F₃: 5' – GAT ATA AGA ATA AGG GTT GTG AA – 3'

mutS R₃: 5' – GTA ATC GTC TCA GTT ATC ATG TT – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 16**.

6.4.5. pyrR (pyrimidine operon regulatory protein EC 2.4.2.9): γονίδιο που κωδικοποιεί για πρωτεΐνη του οπερονίου της πυριμιδίνης που ρυθμίζει την ενεργοποίηση της παραγωγής του ενζύμου πυροφωσφορυλάση της ουρακίλης. Πρόκειται για μία φωσφοτρανσφεράση που καταλύει την αμφίδρομη αντίδραση μεταφοράς φωσφορικών ριζών:



Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου pyr

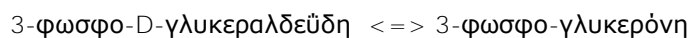
Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

pyr F₂: 5' – GTT ACT AAT ACT TTT GCT GTG TTT – 3'

pyr R₂: 5' – GTA GAA TGT AAA GAG ACT AAA ATG AA – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 16**.

6.4.6. *tpiA* (triosephosphate isomerase EC 5.3.1.1): γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο ισομεράση των φωσφορικών τριοζών. Έχει δράση αναγωγάσης και καταλύει την αναγωγή υποστρώματος αλδεΐδης σε κετόνη. Οι μεταβολικές οδοί στις οποίες δρα είναι αυτές της γλυκόλυσης και της νεογλυκογένεσης:



Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου *tpi*

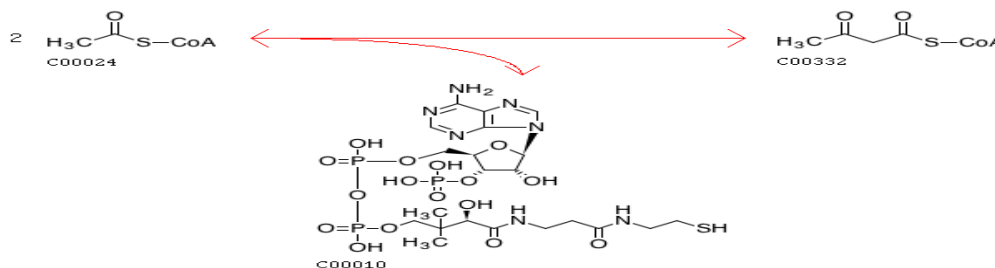
Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

tpi F2: 5' – ATC CAA TTA GAC GCT TTA GTA AC – 3'

tpi R2: 5' – TTA ATG ATG CGC CAC CTA CA – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 16**.

6.4.7. *yqiL* (acetyl-CoA acetyltransferase EC 2.3.1.9): γονίδιο που κωδικοποιεί για μια τρανσφεράση που δραστηριοποιείται σε αντίδραση μεταφοράς ακετυλομάδων από το υπόστρωμα ακέτυλο-συνένζυμοΑ. Οι μεταβολικές οδοί στις οποίες δραστηριοποιείται είναι: κατά τον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, κατά την σύνθεση και αποικοδόμηση κετονικών σωμάτων και αμινοξέων όπως της βαλίνης, λευκίνης, τρυπτοφάνης κ.α.



Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου *yqiL*

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

yqiL F2: 5' – CAC GCA TAG TAT TAG CTG AAG – 3'

yqiL R2: 5' – CTA ATG CCT TCA TCT TGA GAA ATA A – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 16**.

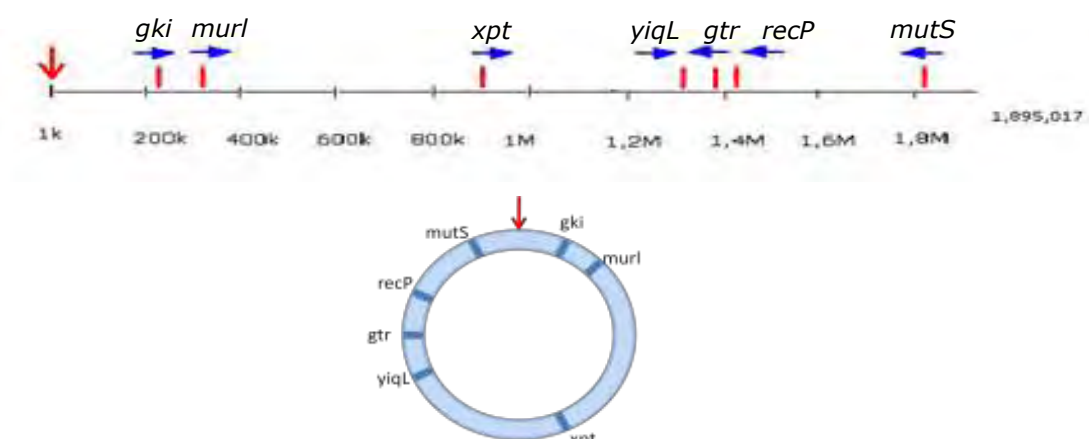
2.6.5. *Streptococcus pyogenes*

Εφαρμόσαμε το **σχήμα MLST** για ***Streptococcus pyogenes*** (group A streptococcus, GAS) που καθιερώθηκε το **2001** από τον **Mark Enright** στο εργαστήριο του Καθηγητή **Brian Spratt** σε συνεργασία με το εργαστήριο της **Debra Bessen**. ^(266, 267)

ΓΟΝΙΔΙΟ	ENZYMΟ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΘΡΑΥΣΜΑΤΟΣ (bp)	ΜΕΓΕΘΟΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ (bp)	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (aa)
<i>gki</i>	Glucose kinase	498	939	312
<i>gtr</i>	Glutamine transporter protein	450	744	247
<i>murl</i>	Glutamate racemase	438	795	264
<i>mutS</i>	DNA mismatch repair protein	405	2556	851
<i>recP</i>	Transketolase	459	1986	661
<i>xpt</i>	Xanthine phosphoribosil transferase	450	582	193
<i>yiqL</i>	Acetyl coenzyme A acetyltransferase	434	1188	395

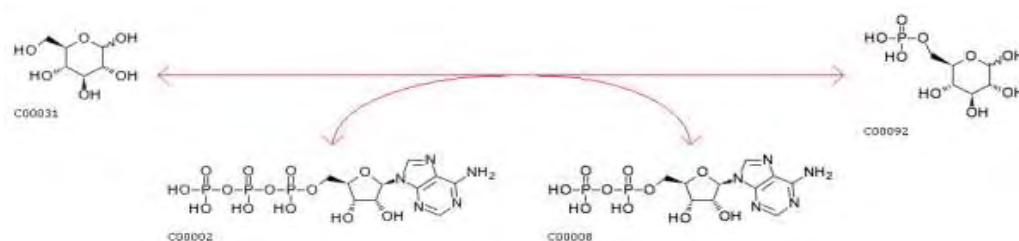
ΓΟΝΙΔΙΟ	ΔΡΑΣΗ ENZYMOY	ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΟΔΟΣ
<i>gki</i>	Φωσφοτρανσφεράση	Μεταβολισμός υδατανθράκων, Γλυκόλυση - Νεογλυκογένεση
<i>gtr</i>	Πρωτεΐνη μεταφοράς	Διαμεμβρανική μεταφορά ουσιών
<i>murl</i>	Ισομεράση γλουταμινικού οξέος	Μεταβολισμός αμινοξέων
<i>mutS</i>	Μηχανισμός επιδιόρθωσης αναντιστοιχίας βάσεων DNA	Αντιγραφή - επιδιόρθωση DNA
<i>recP</i>	Τρανσφεράση κετονικών ομάδων	Μεταβολισμός πεντοζών
<i>xpt</i>	Φωσφοτρανσφεράση	Μεταβολισμός πουρινών
<i>yiqL</i>	Τρανσφεράση ακετυλομάδων	Μεταβολισμός λιπαρών οξέων. Καταβολισμός κετονικών σωμάτων και αμινοξέων

ΠΙΝΑΚΑΣ 17: Χαρακτηριστικά μεγέθη και ιδιότητες των γονιδίων του σχήματος MLST για *S. pyogenes*.



Εικόνα 30. Χρωμοσωμικές θέσεις των γονιδίων του *S. pyogenes*. Οι τοποθεσίες σχεδιάστηκαν στο φυσικό χάρτη του στελέχους **MGAS8232-ορότυπου M18 S. pyogenes**.⁽²⁶⁸⁾

6.5.1. *gki* (glucose kinase EC 2.7.1.2): γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί για το ένζυμο κινάση της γλυκόζης. Πρόκειται για μία φωσφοτρανσφεράση που καταλύει την μεταφορά φωσφόρου μεταξύ διαφόρων ενώσεων με χρήση ATP ως πηγή ενέργειας. Η αντίδραση είναι αμφίδρομη:



Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου *gki*

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

gki up: 5' – GGC ATT GGA ATG GGA TCA CC – 3'

gki dn: 5' – TCT CCT GCT GCT GAC AC – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 18**.

Στάδιο	Θερμοκρασία(°C)	Χρόνος (min)	Κύκλοι
Αρχική Αποδιάταξη	95	5	1
Μετουσίωση	94	1	
Υβριδισμός	55	1	30
Επιμήκυνση	72	1	
Τελική Επιμήκυνση	72	10	1

Πίνακας 18. Συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή κατάλληλες για την ενίσχυση των θραυσμάτων όλων των γονιδίων ***Streptococcus pyogenes***.

6.5.2. gtr (*glutamine ABC-transporter protein*): το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία χρησιμοποιεί ως πηγή ενέργειας την υδρόλυση του ATP με στόχο την μεταφορά διαφόρων ουσιών (ιόντων, σακχάρων, λιπιδίων, στερολών, πεπτιδίων, πρωτεϊνών και φαρμάκων) εν προκειμένω την μεταφορά του γλουταμινικού και γλουταραμικού οξέος, μέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Ο λειτουργικός ρόλος των πρωτεϊνών που ανήκουν στο σύστημα **ABC-transporter** (ATP-Binding Cassette transporter) περιγράφονται αναλυτικά στο Παράρτημα. **(Π3)**

Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου gtr

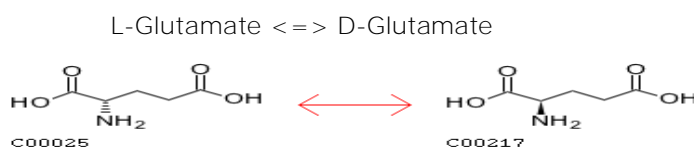
Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

gtr up: 5' – GAG GTT GTG GTG ATT ATT GG – 3'

gtr dn: 5' – GCA AAG CCC ATT TCA TGA GTC – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 18**.

6.5.3. murl (*glutamate racemase EC 5.1.1.3*): γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί για το ένζυμο ισομεράση του γλουταμινικού οξέος. Η αντίδραση, που καταλύεται από το συγκεκριμένο ένζυμο, είναι αμφίδρομη:



Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου murl

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

murl up: 5' – TGC TGA CTC AAA ATG TTA AAA TGA TTG – 3'

murl dn: 5' – GAT GAT AAT TCA CCG TTA ATG TCA AAA TAG – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 18**.

6.5.4. *mutS* (*DNA mismatch repair protein*): Η πρωτεΐνη *mutS* παρουσιάζει ήπια δράση ATPάσης και ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών του συστήματος DNA mismatch repair, το οποίο αναγνωρίζει και διορθώνει λάθη τα οποία μπορεί να παρατηρηθούν κατά την διαδικασία του διπλασιασμού και ανασυνδυασμού του DNA. Η επιδιόρθωση αφορά την εισαγωγή, την διαγραφή ή την αναντιστοιχία των βάσεων του DNA. Αναλυτικά για την δράση των πρωτεϊνών της οικογένειας αυτής αναφέρονται στο **Παράρτημα (Π3)**.

Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου *mutS*

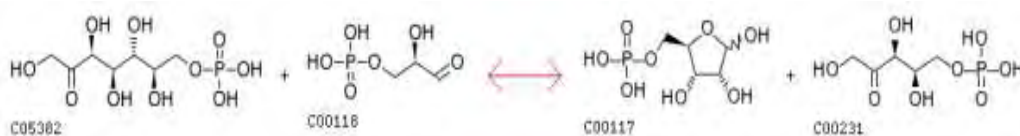
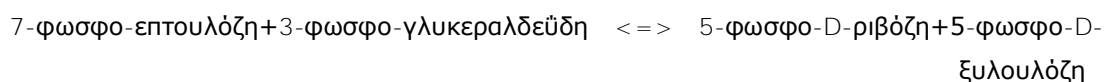
Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

***mutS* up:** 5' – GAA GAG TCA TCT AGT TTA GAA TAC GAT – 3'

***mutS* dn:** 5' – AGA GAG TTG TCA CTT GCG CGT TTG ATT GCT – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 18**.

6.5.5. *recP* (transketolase EC 2.2.1.1): γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο τρανσκετολάση που πρόκειται για μία τρανσφεράση που μεταφέρει κετονικές ομάδες κατά τον μεταβολισμό των φωσφορικών πεντοζών. Η αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο είναι αμφίδρομη:



Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου *recP*

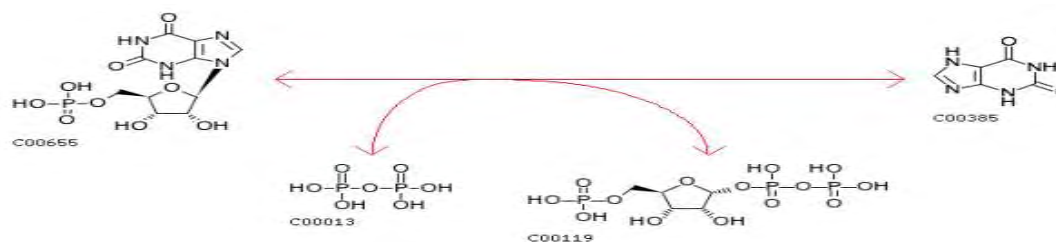
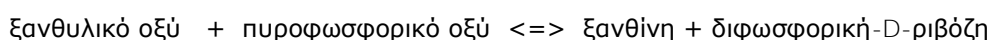
Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

***recP* up:** 5' – GCA AAT TCT GGA CAC CCA GG – 3'

***recP* dn:** 5' – CTT TCA CAA GGA TAT GTT GCC – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 18**.

6.5.6. *xpt* (xanthine phosphoribosil transferase EC 2.4.2.22): γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο φωσφο-ριβοσυλο-τρανσφεράση και δρα κατά την μεταβολική οδό των πουρινών:



Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου *xpt*

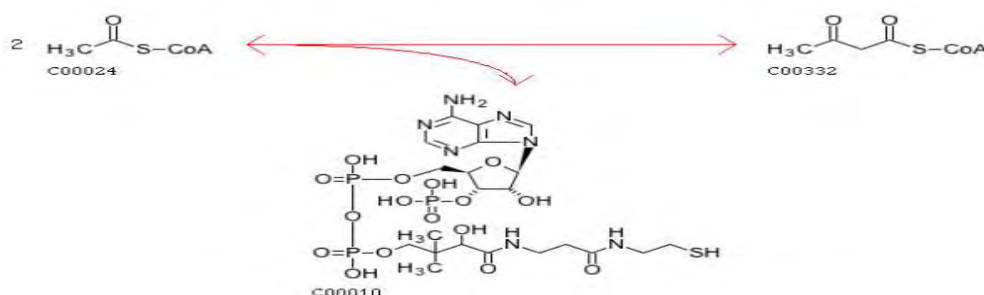
Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

xpt up: 5' – TTA CTT GAA GAA CGC ATC TTA – 3'

xpt dn: 5' – ATG AGG TCA CTT CAA TGC CC – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 18**.

6.5.7. yqil (acetyl coenzyme A acetyltransferase EC 2.3.1.9): γονίδιο που κωδικοποιεί για μια τρανσφεράση που δραστηροποιείται σε αντίδραση μεταφοράς ακετυλομάδων από το υπόστρωμα ακέτυλο-συνένζυμοΑ. Οι μεταβολικές οδοί στις οποίες δραστηριοποιείται είναι: κατά τον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, κατά την σύνθεση και αποικοδόμηση κετονικών σωμάτων και αμινοξέων όπως βαλίνης, λευκίνης, τρυπτοφάνης κ.α.



Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου yqil

Για την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου επιλέχθηκαν εκκινητές με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

yqil up: 5' – TGC AAC AGT ATG GAC TGA CCA GAG AAC AAG ATG C – 3'

yqil dn: 5' – CAA GGT CTC GTG AAA CCG CTA AAG CCT GAG – 3'

Η ενίσχυση του παρόντος τμήματος τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 18**.

2.7. Διπλή ή Εμφωλεάζουσα PCR (Nested PCR)

Ανάμεσα στις παραλλαγές της βασικής αντίδρασης της PCR, από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες στη Μοριακή Διαγνωστική Μικροβιολογία είναι η Διπλή ή Εμφωλεάζουσα PCR (Nested PCR) όπως αναλυτικότερα παρουσιάστηκε στο Γενικό Μέρος της παρούσας διατριβής. Η συγκεκριμένη παραλλαγή αφορά δύο συνεχόμενες αντιδράσεις PCR. Στην πρώτη χρησιμοποιείται ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (amplified primers) που περικλείει την ευρύτερη περιοχή της ακολουθίας που πρόκειται να ενισχυθεί. Στη συνέχεια, το προϊόν του πρώτου πολλαπλασιασμού μεταφέρεται σε δεύτερο δοκιμαστικό σωλήνα και επιτελείται η δεύτερη αντίδραση PCR με ένα ή περισσότερα ζεύγη εκκινητών (sequencing primers), ειδικών ως προς την εσωτερική αλληλουχία που ενισχύθηκε με το πρώτο ζεύγος εκκινητών. Έτσι, αυξάνεται η ειδικότητα και η ευαισθησία της μεθόδου.

Μετά την δεύτερη ενίσχυση, όπως και στην κλασική PCR, τα προϊόντα PCR ανιχνεύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.

Κάθε στέλεχος λοιπόν υποβάλλεται σε επτά διπλές αντιδράσεις PCR, των οποίων οι συνθήκες και η μεθοδολογία παρατίθενται αναλυτικότερα παρακάτω.

Υλικά:

WFI (**w**ater **f**or **i**njection-στειρό απυρετογόνο H₂O)

Taq DNA πολυμεράση 5u/μl (Fermentas)

10X Taq Buffer με KCl (Fermentas)

MgCl₂: 25 mM (Fermentas)

Primer 1: 100 pmol/ μl (Ανάδραση)

Primer 2: 100 pmol/ μl (Ανάδραση)

dNTPs Set 100mM (Fermentas)

DNA Engine Peltier Thermal Cycler (BIO – RAD)

Συσκευή καθέτου νηματικής ροής κλάσης II

Αυτόματος αναδευτήρας Vortex (BICASA)

Eppendorf για PCR, αυτόματες πιπέτες και αποστειρωμένα ρύγχη πιπετών

Πειραματική διαδικασία:

Όσον αφορά την πρώτη αντίδραση:

Αρχικά παρασκευάζεται το Master Mix της αντίδρασης αναμιγνύοντας σε eppendorf ποσότητες πολλαπλάσιες του αριθμού των στελεχών (συμπεριλαμβανομένου του θετικού και του αρνητικού μάρτυρα) από τις αντίστοιχες βασικές ποσότητες (**Πίνακας 19**) των κάτωθι αντιδραστηρίων:

Master Mix for Amplification Reaction	
DNA βακτηρίου	5 μl
10X Taq Buffer με KCl	5 μl
MgCl ₂ : 25 mM	3 μl
dNTPs: 20mM	1 μl
Primer 1: 25 pmol/μl	0,5 μl
Primer 2: 25 pmol/μl	0,5 μl
Taq DNA πολυμεράση 5u/μl	0,4 μl
WFI	34,6 μl
Τελικός Όγκος	50 μl

Πίνακας 19. Βασικές ποσότητες αντιδραστηρίων για την πρώτη αντίδραση της Διπλής ή Εμφωλεάζουσας PCR (nested PCR) για *S. agalactiae*

Αναμιγνύεται ήπια το Master Mix με τη χρήση vortex και μοιράζεται σε έναστο eppendorf 45 μl αυτού. Τέλος, προστίθεται σε έναστο eppendorf 5 μl από κάθε δείγμα και τα eppendorf τοποθετούνται στον θερμικό κυκλοποιητή στο πρόγραμμα της επιλογής μας.

Όσον αφορά τη δεύτερη αντίδραση:

Ομοίως με την πρώτη αντίδραση, παρασκευάζεται το Master Mix αναμιγνύοντας σε eppendorf τα κάτωθι αντιδραστήρια:

Master Mix for Sequencing Reaction	
DNA βακτηρίου	0,5 μl
10X Taq Buffer με KCl	5 μl
MgCl ₂ : 25 mM	3 μl
dNTPs: 20mM	1 μl
Primer 1: 25 pmol/μl	0,5 μl
Primer 2: 25 pmol/μl	0,5 μl

Taq DNA πολυμεράση 5u/μl	0,4 μl
WFI	39,1 μl
Τελικός Όγκος	50 μl

Πίνακας 20. Βασικές ποσότητες αντιδραστηρίων για την δεύτερη αντίδραση της Διπλής ή Εμφωλεύουσας PCR (nested PCR) για *S. agalactiae*.

Αναμιγνύεται ήπια το master mix με τη χρήση vortex και μοιράζεται σε έναστο eppendorf 49,5 μl αυτού. Τέλος, προστίθεται σε έναστο eppendorf 0,5 μl από το προϊόν ενίσχυσης DNA του κάθε δείγματος και τα eppendorf τοποθετούνται στον θερμικό κυκλοποιητή στο πρόγραμμα της επιλογής μας.

Η Διπλή ή Εμφωλεύουσα PCR, εφαρμόστηκε ως μέθοδος ενίσχυσης θραυσμάτων των γονιδίων του βακτηρίου *Streptococcus agalactiae*.

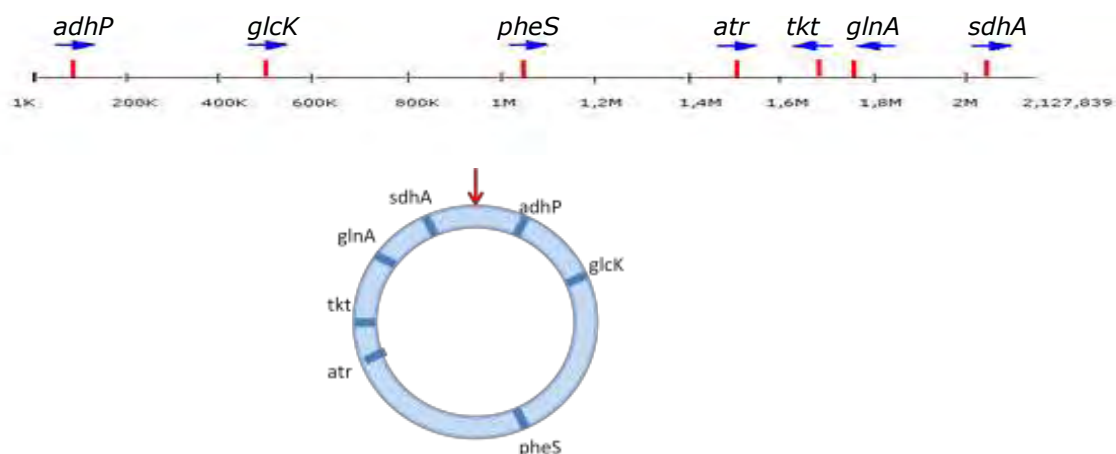
2.7.1. *Streptococcus agalactiae*

Εφαρμόσαμε το **σχήμα MLST** για *Streptococcus agalactiae* που καθιερώθηκε το **2004** από τον **Nicola Jones** (Nuffield Department of Clinical Laboratory Services, John Radcliffe Hospital, Oxford, UK) στο εργαστήριο του **Brian Spratt** (Department of Infectious Disease Epidemiology, Faculty of Medicine, Imperial College, London, UK) **μαζί με τον Derrick Crook** (Nuffield Department of Clinical Laboratory Sciences, John Radcliffe Hospital, Oxford, UK) και τον **Man-Suen Chan**. (²⁶⁹, ²⁷⁰)

ΓΟΝΙΔΙΟ	ENZYMΟ	A Προϊόν PCR (bp)	B Προϊόν PCR (bp)	ΜΕΓΕΘΟΣ ΓΟΝΙΔΙΟΥ (bp)	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (aa)
<i>adhP</i>	Alcohol dehydrogenase	672	498	1017	338
<i>pheS</i>	Phenylalanyl-tRNAsynthetase	723	501	1041	346
<i>atr</i>	Glutaminetransporter protein	627	501	741	448
<i>glnA</i>	Glutamine synthetase	589	498	1347	448
<i>sdhA</i>	Serine dehydratase	646	519	873	290
<i>glcK</i>	Glucose kinase	607	459	969	322
<i>tkl</i>	Transketolase	859	480	1986	661

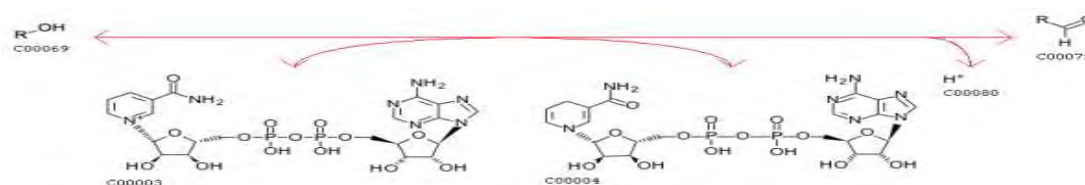
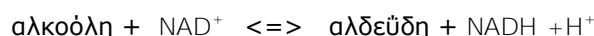
ΓΟΝΙΔΙΟ	ΔΡΑΣΗ ENZYMΟΥ	ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΟΔΟΣ
<i>adhP</i>	Αλκοολική αφυδρογονάση	Μεταβολισμός υδατανθράκων. Γλυκόλυση - Γλυκονοεογένεση
<i>pheS</i>	Λιγάση	Αντιγραφή - Μετάφραση του DNA Σύνθεση των άμινο-άκυλο-tRNA
<i>atr</i>	ABC- Transporter	Μεταφορά και μεταβολισμός αμινοξέων
<i>glnA</i>	Λιγάση	Μεταβολισμός αζώτου και αμινοξέων (αλανίνης, ασπαργικού και γλουταμινικού οξέος)
<i>sdhA</i>	Αφυδρογονάση - Απαμινάση	Μεταβολισμός αμινοξέων (γλυκίνης, σερίνης θρεονίνης)
<i>glcK</i>	Τρανσφεράση	Μεταβολισμός υδατανθράκων. Γλυκόλυση - Γλυκονοεογένεση
<i>tkl</i>	Τρανσφεράση κετονικών ομάδων	Μεταβολισμός των φωσφορικών πεντοζών

Πίνακας 21: Χαρακτηριστικά μεγέθη και ιδιότητες των γονιδίων του σχήματος MLST για *S. agalactiae*.



Εικόνα 31. Χρωμοσωμικές θέσεις των γονιδίων του *S. agalactiae*. Οι τοποθεσίες σχεδιάστηκαν στο φυσικό χάρτη του στελέχους **A909 *S. agalactiae*** (271)

7.1.1. *adhP* (alcohol dehydrogenase EC 1.1.1.1): γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο της αλκοολικής αφυδρογονάσης. Το συγκεκριμένο ένζυμο καταλύει την αμφίδρομη αντίδραση αφυδρογόνωσης με δέκτη πρωτονίων (H^+) το NAD^+ :



Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου *adhP*

Για την πρώτη αντίδραση:

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές (amplified primers) με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

***adhP* 1:** 5' – GTT GGT CAT GGT GAA GCA CT – 3'

***adhP* 2:** 5' – ACT GTA CCT CCA GCA CGA AC – 3'

Για την δεύτερη αντίδραση:

Για την ενίσχυση εσωτερικού τμήματος του ενισχυμένου γονιδίου επιλέχθηκαν εκκινητές (sequencing primers) με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

***adhP* 3:** 5' – GGT GTG TGC CAT ACT GAT TT – 3'

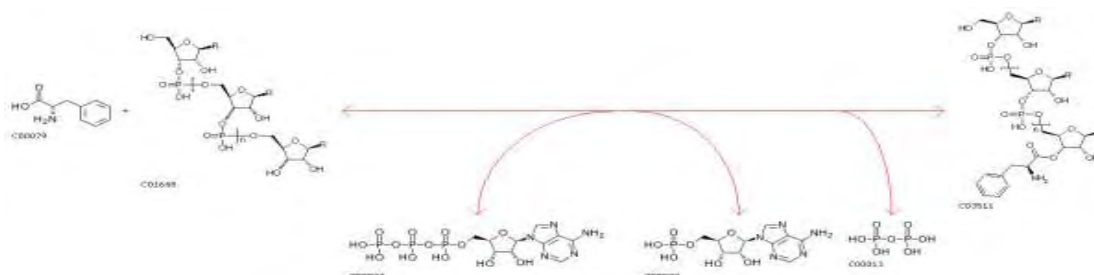
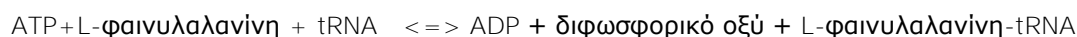
***adhP* 4:** 5' – ACA GCA GTC ACA ACC ACT CC – 3'

Η ενίσχυση των δύο γονιδιακών θραυσμάτων (εξωτερικού και εσωτερικού) τελέστηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 22**.

Στάδιο	Θερμοκρασία(°C)	Χρόνος (min)	Κύκλοι
Αρχική Αποδιάταξη	94	5	1
Μετουσίωση	94	1	
Υβριδισμός	55	1	33
Επιμήκυνση	72	1	
Τελική Επιμήκυνση	72	10	1

Πίνακας 22. Συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή κατάλληλες για την ενίσχυση των θραυσμάτων όλων των γονιδίων του *Streptococcus agalactiae*.

7.1.2. *pheS* (phenylalanyl-tRNA synthetase EC 6.1.1.20): γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο συνθετάση του tRNA της φαινυλαλανίνης. Πρόκειται για μία λιγάση, ένζυμο που καταλύει την δημιουργία δεσμών μεταξύ άνθρακα και οξυγόνου:



Ενίσχυση με PCR, θραύσματος του γονιδίου *pheS*

Για την πρώτη αντίδραση:

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές (amplified primers) με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

***pheS* 1:** 5' – GAT TAA GGA GTA GTG GCA CG – 3'

***pheS* 2:** 5' – TTG AGA TCG CCC ATT GAA AT – 3'

Για την δεύτερη αντίδραση:

Για την ενίσχυση εσωτερικού τμήματος του ενισχυμένου γονιδίου επιλέχθηκαν εκκινητές (sequencing primers) με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

***pheS* 3:** 5' – ATA TCA ACT CAA GAA AAG CT – 3'

***pheS* 4:** 5' – TGA TGG AAT TGA TGG CTA TG – 3'

Η ενίσχυση των δύο γονιδιακών θραυσμάτων (εξωτερικού και εσωτερικού) τελέστηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 22**.

7.1.3. *atr* (glutamine ABC transporter protein): το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία χρησιμοποιεί ως πηγή ενέργειας την υδρόλυση του ATP για την μεταφορά διαφόρων ουσιών (ιόντων, σακχάρων, λιπιδίων, στερολών, πεπτιδίων, πρωτεϊνών και φαρμάκων) εν προκειμένω των γλουταμινικού και γλουταραμικού οξέος, μέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Οι πρωτεΐνες που ανήκουν στο σύστημα **ABC-transporter** (ATP-Binding Cassette transporter) αναφέρονται αναλυτικά στο Παράρτημα (**Π3**).

Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου *art*

Για την πρώτη αντίδραση:

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές (amplified primers) με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

***art* 1:** 5' – CGA TTC TCT CAG CTT TGT TA – 3'

***art* 2:** 5' – AAG AAA TCT CTT GTG CGG AT – 3'

Για την δεύτερη αντίδραση:

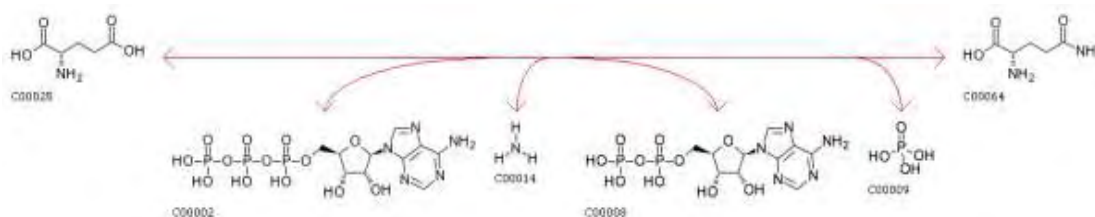
Για την ενίσχυση εσωτερικού τμήματος του ενισχυμένου γονιδίου επιλέχθηκαν εκκινητές (sequencing primers) με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

***art* 3:** 5' – ATG GTT GAG CCA ATT ATT TC – 3'

***art* 4:** 5' – CCT TGC TCA ACA ATA ATG CC – 3'

Η ενίσχυση των δύο γονιδιακών θραυσμάτων (εξωτερικού και εσωτερικού) τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 22**.

7.1.4. *glnA* (glutamine synthetase EC 6.3.1.2): το γονίδιο κωδικοποιεί για μία λιγάση, ένζυμο που καταλύει την δημιουργία δεσμών μεταξύ ατόμων άνθρακα και αζώτου κατά τον μεταβολισμό του γλουταμινικού οξέος σε γλουταραμικό οξύ. Η αντίδραση απαιτεί ενέργεια που προσφέρεται από το ATP, σύμφωνα με την αμφίδρομη αντίδραση:



Ενίσχυση με PCR, θραύσματος του γονιδίου *glnA*

Για την πρώτη αντίδραση:

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές (amplified primers) με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

glnA 1: 5' – CCG GCT ACA GAT GAA CAA TT – 3'

glnA 2: 5' – CTG ATA ATT GCC ATT CCA CG – 3'

Για την δεύτερη αντίδραση:

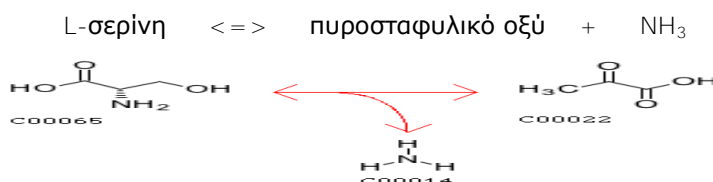
Για την ενίσχυση εσωτερικού τμήματος του ενισχυμένου γονιδίου επιλέχθηκαν εκκινητές (sequencing primers) με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

glnA 3: 5' – AAT AAA GCA ATG TTT GAT GG – 3'

glnA 4: 5' – GCA TTG TTC CCT TCA TTA TC – 3'

Η ενίσχυση των δύο γονιδιακών θραυσμάτων (εξωτερικού και εσωτερικού) τελέστηκε σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 22**.

7.1.5. *sdhA* (serine dehydratase EC 4.3.1.17): γονίδιο που κωδικοποιεί για ένα ένζυμο που καταλύει την αντίδραση απαμίνωσης της σερίνης, δρα όμως και ως αφυδρογονάση της σερίνης. Οι αντιδράσεις είναι αμφίδρομες:



Ενίσχυση με PCR θραύσματος του γονιδίου *sdhA*

Για την πρώτη αντίδραση:

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές (amplified primers) με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

sdhA 1: 5' – AGA GCA AGC TAA TAG CCA AC – 3'

sdhA 2: 5' – ATA TCA GCA GCA ACA AGT GC – 3'

Για την δεύτερη αντίδραση:

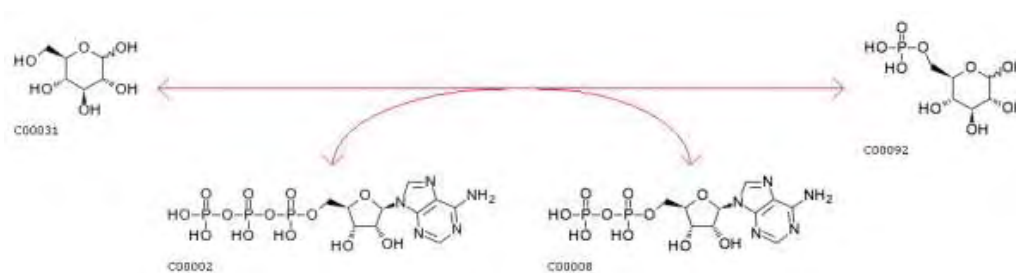
Για την ενίσχυση εσωτερικού τμήματος του ενισχυμένου γονιδίου επιλέχθηκαν εκκινητές (sequencing primers) με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

ssdhA 3: 5' – AAC ATA GCA GAG CTC ATG AT – 3'

ssdhA 4: 5' – GGG ACT TCA ACT AAA CCT GC – 3'

Η ενίσχυση των δύο γονιδιακών θραυσμάτων (εξωτερικού και εσωτερικού) τελέστηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 22**.

7.1.6. *glcK* (glucose kinase EC 2.7.1.2): γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο κινάση της γλυκόζης. Πρόκειται για μία φωσφοτρανσφεράση που καταλύει την μεταφορά φωσφόρου μεταξύ διαφόρων ενώσεων με χρήση του ATP ως πηγή ενέργειας. Η αντίδραση είναι αμφίδρομη:



Ενίσχυση με PCR, θραύσματος του γονιδίου *glcK*

Για την πρώτη αντίδραση:

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές (amplified primers) με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

glcK 1: 5' – CTC GGA GGA ACG ACC ATT AA – 3'

glcK 2: 5' – CTT GTA ACA GTA TCA CCG TT – 3'

Για την δεύτερη αντίδραση:

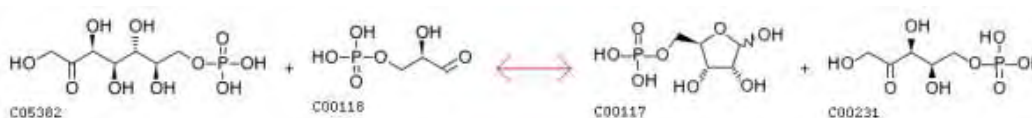
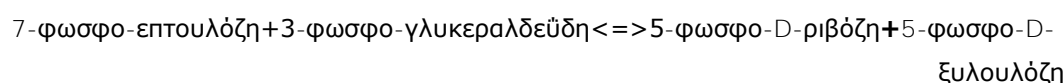
Για την ενίσχυση εσωτερικού τμήματος του ενισχυμένου γονιδίου επιλέχθηκαν εκκινητές (sequencing primers) με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

glcK 3: 5' – GGT ATC TTG ACG CTT GAG GG – 3'

glcK 4: 5' – ATC GCT GCT TTA ATG GCA GA – 3'

Η ενίσχυση των δύο γονιδιακών θραυσμάτων (εξωτερικού και εσωτερικού) τελέστηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 22**.

7.1.7. *tkt* (transketolase EC 2.2.1.1): γονίδιο που κωδικοποιεί για το ένζυμο τρανσκετολάση και πρόκειται για μία τρανσφεράση που καταλύει την μεταφορά κετονικών ομάδων κατά τον μεταβολισμό των φωσφορικών πεντοζών:



Ενίσχυση με PCR, θραύσματος του γονιδίου *tkt*

Για την πρώτη αντίδραση:

Για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου αυτού επιλέχθηκαν εκκινητές (amplified primers) με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

tkt 1: 5' – CCA GGC TTT GAT TTA GTT GA – 3'

tkt 2: 5' – AAT AGC TTG TTG GCT TGA AA – 3'

Για την δεύτερη αντίδραση:

Για την ενίσχυση εσωτερικού τμήματος του ενισχυμένου γονιδίου επιλέχθηκαν εκκινητές (sequencing primers) με τις παρακάτω παρατιθέμενες αλληλουχίες:

tkt 3: 5' – ACA CTT CAT GGT GAT GGT TG – 3'

tkt 4: 5' – TGA CCT AGG TCA TGA GCT TT – 3'

Η ενίσχυση των δύο γονιδιακών θραυσμάτων (εξωτερικού και εσωτερικού) τελέστηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή στις συνθήκες που περιγράφονται στον **Πίνακα 22**.

2.8. Ηλεκτροφόρηση Προϊόντων της PCR

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

Σύμφωνα με αυτή την τεχνική, τα θραύσματα DNA αναγκάζονται να κινηθούν μέσω των πόρων που σχηματίζονται σε πήκτωμα αγαρόζης, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται κυρίως από τέσσερις παραμέτρους: το μέγεθος του DNA, τη συγκέντρωση της αγαρόζης, τη στερεοδιάταξη του DNA και την ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος. Η θέση του DNA στο πήκτωμα προσδιορίζεται με υπεριώδες φως και τη χρήση μικρής ποσότητας βρωμιούχου αιθιδίου, μιας φθορίζουσας χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των αζωτούχων βάσεων του DNA. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2% για την ηλεκτροφόρηση όλων των προϊόντων PCR. Για κάθε προϊόν PCR πραγματοποιήθηκαν δύο ηλεκτροφορήσεις, μία μετά την ενίσχυση του DNA του με PCR και μία μετά τον καθαρισμό του DNA. Χαρακτηριστικές εικόνες ηλεκτροφόρησης παρατίθενται στο Παράρτημα της παρούσας Διατριβής. (**Π1**)

Η μεθοδολογία παρατίθεται αναλυτικά παρακάτω:

Υλικά:

WFI (**W**ater **F**or **I**njection-στείρο απυρετογόνο H₂O για τις αραιώσεις)

TBE Buffer (Tris-Boric Acid-EDTA), 10X (Ambion)

Agarose SeaKem LE (Cambrex)

Ethidium bromide soln, (EtBr₂) 10mg/ml (Research Organics)

6X DNA Loading Dye Solution-κυανό της βρωμοφαινόλης (Fermentas)

Gene Ruler 100bp DNA Ladder (Fermentas)

Mass Ruler DNA Ladder, High Range (Fermentas)

Λάμπα UV (MiniBisPro, Bio-Imaging Systems)

Συσκευή ηλεκτροφόρησης (EC105-LVD Submarine Gel System Classic, Thermo ElectronCo)

Τροφοδοτικό Τάσης (EC105-LVD, Thermo Electron Co)

Φούρνος μικροκυμάτων

Κωνική φιάλη 250 ml

Εκμαγείο και «χτενάκια» στερεοποίησης πηκτώματος

Αυτόματα σιφώνια (πιπέτες), αποστειρωμένα ρύγχη και parafilm.

Πειραματική διαδικασία:

- Αραίωση του TBE Buffer 10X σε συγκέντρωση 1X, με ανάμιξη 10 ml TBE 10X και 90 ml νερό (WFI).

- Σε κωνική φιάλη των 250 ml αναμιγνύονται 50 ml TBE Buffer 1X και 1g αγαρόζης έτσι ώστε να προκύψει διάλυμα αγαρόζης 2% w/v. Το διάλυμα αναμιγνύεται ζωηρά με κυκλική ανακίνηση της κωνικής φιάλης.

- Το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου διαλυθεί η αγαρόζη και με βρασμό να διαυγάσει το διάλυμα. Στη συνέχεια αφήνεται να κατέβει η θερμοκρασία περίπου στους 55°C (κωνική ανεκτή στην παρεία) ώστε το διάλυμα να μην επηρεάσει το πλαστικό εκμαγείο.

- Προστίθεται 2μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr₂) έτσι ώστε να έχει τελική συγκέντρωση 0,5μg/ml στο διάλυμα. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων του δίκλωνου DNA, φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290 nm.

- Τοποθετούνται τα «χτενάκια» στο εκμαγείο, για την δημιουργία βυθισμάτων υποδοχής του DNA, και αποχύνεται προσεκτικά το διάλυμα της αγαρόζης.

- Αφού στερεοποιηθεί εντελώς η αγαρόζη, αφαιρούνται προσεκτικά τα «χτενάκια» και το πήκτωμα είναι πλέον έτοιμο για ηλεκτροφόρηση του DNA, με εμβάπτιση του σε διάλυμα TBE Buffer 1X της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

- Αναμειγνύονται 6μl από ένα δείγμα DNA με 2μl χρωστικής (κυανό της βρωμοφαινόλης) Loading Dye Soln και ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων DNA στα βυθίσματα του πηκτώματος. Για τον προσδιορισμό του μήκους των προϊόντων της PCR είναι απαραίτητη η προσθήκη στο πήκτωμα ενός μάρτυρα μοριακού βάρους. Χρησιμοποιήθηκε ο 1000bp/100 DNA Ladder (Fermentas)

- Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή τάση 160 Volts και ένταση 50 mA για 20 λεπτά. Το ηλεκτροφορηθέν πήκτωμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός, UV Photo MiniBisPro, Bio-Imaging Systems και φωτογραφήθηκε με Olympus Digital Camera που είναι ενσωματωμένη στη συσκευή.

2.9. Καθαρισμός των Προϊόντων της PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR, για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων των εκκινητών, των dNTPs, του ενζύμου και των αλάτων, είναι απαραίτητος ώστε να επακολουθήσει η διαδικασία της αλληλούχισής τους. Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε σε όλα τα μελετώμενα δείγματα DNA των στελεχών σύμφωνα με το πρωτόκολλο της PureLink PCR Purification Kit της Invitrogen.

Υλικά:

Binding Buffer (**B**₁)

Wash Buffer (W₁)

Elution Buffer: 10mM Tris-HCl, pH 8.5 (E₁)

Στήλες φυγοκέντρησης PureLink PCR με σωληνάρια συλλογής

Σωλήνες έκλουσης PureLink (1.7 ml)

Ισοπροπανόλη 100%

Αιθανόλη 96-100%

Φυγόκεντρος Mini Spin (για σωληνάρια τύπου eppendorf)

Αυτόματα σιφώνια (πιπέτες), αποστειρωμένα ρύγχη σιφωνίων

Πειραματική διαδικασία:Αραιώσεις των αρχικών διαλυμάτων:

- Προστίθενται 48ml ισοπροπανόλης 100% σε 72 ml **B**inding Buffer (B₁) και το διάλυμα αναδεύεται ελαφρώς ώστε να καταστεί ομοιογενές.

- Προστίθενται 160 ml αιθανόλης 96-100% στα 40ml **W**ash Buffer (W₁) και το διάλυμα αναδεύεται ελαφρώς ώστε να καταστεί ομοιογενές.

Τα διαλύματα αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου.

Ο καθαρισμός του DNA επιτελείται σε τρία στάδια:**1. Δέσμευση του DNA**

- Προστίθεται τετραπλάσιος όγκος (168 μl), αραιωμένου **B**inding Buffer(B₁), από τον όγκο του προϊόντος της PCR (42 μl περίπου), σε καθένα από τα eppendorf που περιέχονται στο kit και το μίγμα αναμειγνύεται καλά με αναρρόφηση.

- Στη συνέχεια το μίγμα μεταφέρεται σε στήλη φυγοκέντρησης PureLink PCR όπου και δεσμεύεται το DNA στη στήλη.

- Φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά στις 7300 rpm και απορρίπτεται το διήθημα.

2. Καθαρισμός του DNA

- Προστίθενται σε κάθε στήλη, 650 μl του αραιωμένου με αιθανόλη **W**ash Buffer(W₁).

- Φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά στις 7300 rpm και απορρίπτεται εκ νέου το διήθημα.

- Επαναφυγοκεντρείται κάθε στήλη σε θερμοκρασία δωματίου για 4 λεπτά στις 13.400 rpm και απορρίπτεται το διήθημα ώστε να απομακρυνθούν τα τυχόν υπολείμματα του Wash Buffer.

- Απορρίπτονται οι σωλήνες συλλογής και έκαστη στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωλήνα έκλουσης PureLink (1,7ml).

3. Έκλουση του DNA

- Προστίθενται 50μl Elution Buffer (E₁) στο κέντρο κάθε στήλης προσεκτικά, έτσι ώστε να διαβραχεί και να αποδεσμευτεί όλη η ποσότητα του DNA από την στήλη. Επώζονται οι στήλες για ένα min σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν φυγοκεντρούνται για 4 min στις 13400 rpm.

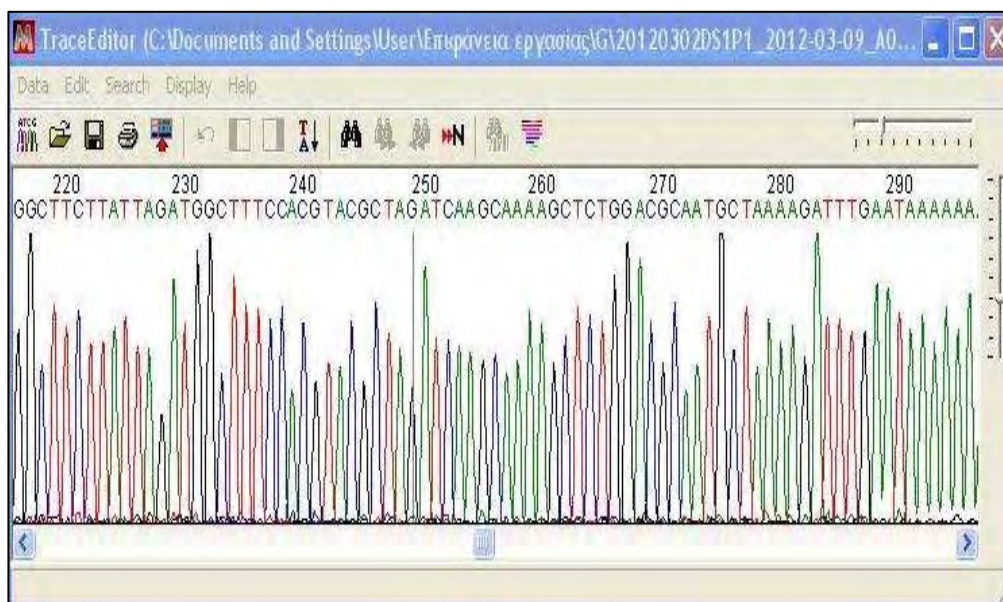
- Έκαστη στήλη απορρίπτεται και το διήθημα που περιέχει το καθαρισμένο προϊόν της PCR, ηλεκτροφορείται ξανά, με τον ίδια τεχνική όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 10, για επαναβεβαίωση της ύπαρξης του και μετά τον καθαρισμό. Τέλος, φυλάσσεται σε βαθεία κατάψυξη (-20°C) έως ότου αποσταλεί για την αλληλούχιση του DNA (Sequencing).

2.10. Ανάλυση Αλληλουχίας του DNA (Sequencing)

Η αλληλούχιση του DNA των γονιδιακών θραυσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη τροποποιημένη κατά Sanger μέθοδο, γνωστή και ως διδοξυ-μέθοδο, η οποία βασίζεται στο ειδικό τερματισμό μιας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης-επέκτασης του εκκινητή, όπως αναλυτικά παρουσιάστηκε στο Γενικό Μέρος της παρούσας Διατριβής.

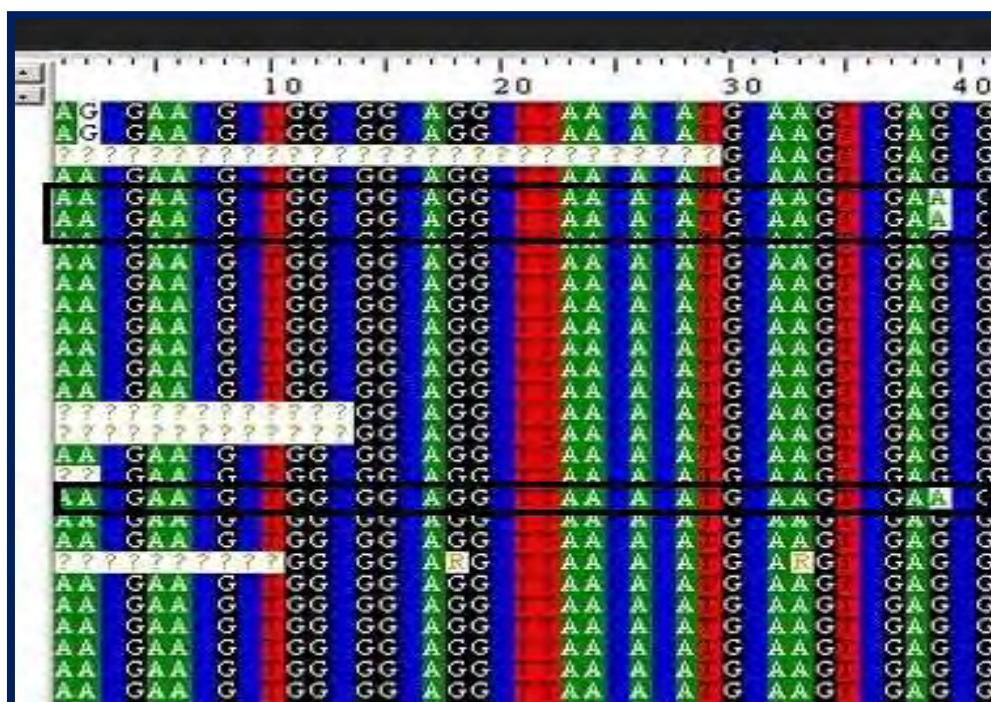
Η Αλληλούχιση εφαρμόστηκε και στις δύο έλικες των γονιδιακών θραυσμάτων, σε όλα τα στελέχη των βακτηρίων της έρευνας μας και πραγματοποιήθηκε απ' την **Εταιρεία COGENICS**, η οποία εδρεύει στο **Hope End, Takeley Essex_CM22 6TA_United Kingdom** από τον Ιανουάριο του 2008 έως τον Ιούνιο του 2010. Συγκεκριμένα για κάθε αντίδραση αλληλούχισης, αποστέλλονταν 50μl από το προϊόν ενίσχυσης του DNA και 20μl από ένα εκκινητή με αραιώση 1:4 που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 25 pmol/μl. Από τον Ιούνιο του 2010 έως τον Σεπτέμβριο του 2011 η ανάλυση αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε στην **Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας σε ειδικό τμήμα του Εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας**. Για κάθε αντίδραση αλληλούχισης αποστέλλονταν στο Εργαστήριο, 50μl από το προϊόν ενίσχυσης του DNA και 20μl από ένα εκκινητή με αραιώση 1:20 που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 5 pmol/μl.

Τα αποτελέσματα της Ανάλυσης Αλληλουχίας των μελετώμενων γονιδίων παρουσιάζονται με ένα ηλεκτροφερόγραμμα (electropherogram), που αποτελείται από μια σειρά κορυφών που αντιστοιχούν σε κάποια από τις τέσσερις βάσεις (Αδενίνη **A**, Θυμίνη **T**, Γουανίνη **G**, Κυτοσίνη **C**) ανάλογα με το χρώμα φθορισμού. Συγκεκριμένα αναπαριστάται η ένταση των φθοριζόντων σημάτων ως συνάρτηση του χρόνου ηλεκτροφόρησης. (**Εικόνα 32**)



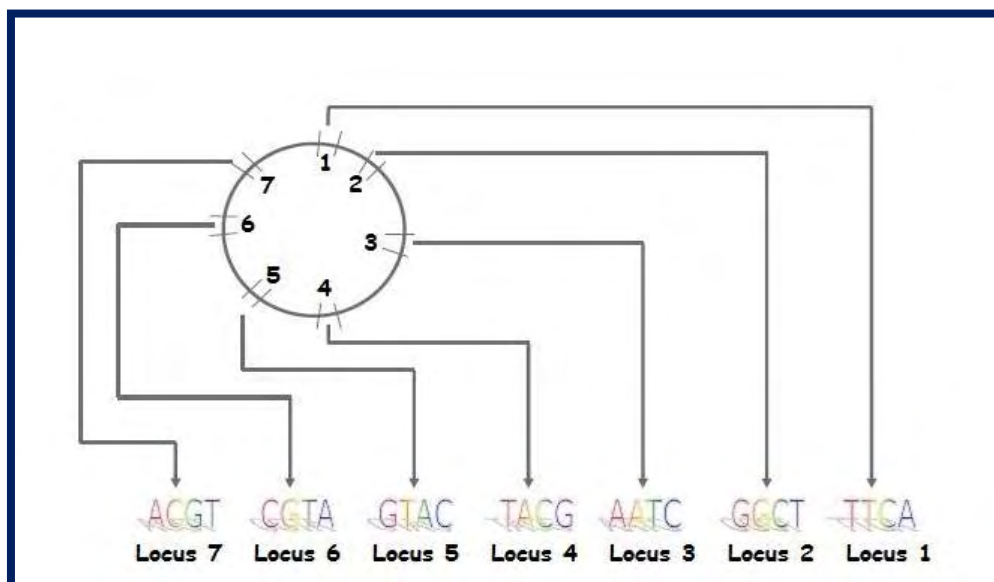
Εικόνα 32. Ενδεικτικό ηλεκτροφερόγραμμα τμήματος του γονιδίου *purK* του βακτηρίου *E. faecium* με χρήση του προγράμματος Ανάλυσης Αλληλουχίας **Mega 5.0**.

Η επεξεργασία των αλληλουχιών των γονιδιακών θραυσμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Mega 5.0 και η ευθυγράμμιση των νουκλεοτιδίων με το πρόγραμμα ClustalW. (**Εικόνα 33**) Η επεξεργασία αυτή καθιστά την αλληλουχία αναγνώσιμη και συγκρίσιμη.



Εικόνα 33: Ενδεικτική επεξεργασία των αλληλουχιών του γονιδίου *purK* του *E. faecium* των πρώτων 40 από τα 492 νουκλεοτίδια του θραύσματος. Κάθε δύο συνεχόμενες σειρές αντιστοιχούν σε ένα βακτηριακό στέλεχος (διπλή αλληλούχιση και των δύο ελίκων του DNA). Στο τρίτο κατά σειρά στέλεχος εντοπίζεται μια σημειακή μετάλλαξη.

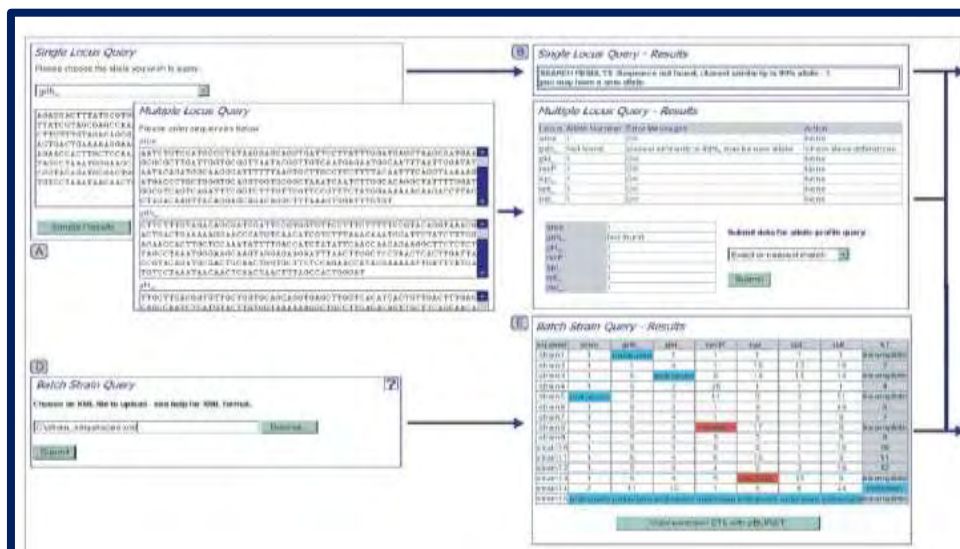
Στο τέλος της μελέτης της αλληλούχισης γνωρίζουμε επακριβώς την αλληλουχία κάθε θραύματος γονιδίου του τυποποιημένου σχήματος της MLST για κάθε υπό μελέτη είδος βακτηρίου όπως σχηματικά περιγράφεται στην Εικόνα 34.



Εικόνα 34: Σχηματική αναπαράσταση ενός βακτηριακού χρωμοσώματος από το οποίο απομονώνονται και ενισχύονται με PCR, επτά θραύσματα διατηρημένων γονιδίων ενός τυποποιημένου σχήματος της MLST. Οι επτά αλληλουχίες υποβάλλονται σε ανάλυση αλληλουχίας -sequencing- και στο τέλος του σταδίου αυτού, μας είναι γνωστές οι επτά αλληλουχίες για κάθε στέλεχος βακτηρίου.

2.11. Εκχώρηση του Αλληλόμορφου Προφίλ και του Sequence Type (ST)

Μετά την επεξεργασία της αλληλουχίας, κάθε γονιδιακού θραύσματος του σχήματος της MLST, ακολουθεί η σύγκριση της με τις αλληλουχίες αναφοράς των ηλεκτρονικών βάσεων δεδομένων της MLST, όπως αναλυτικά περιγράφεται στην δημοσίευση των David M. Aanensen και Brian G. Spratt (2005). (272)



Εικόνα 35: Σχηματική αναπαράσταση σύγκρισης των υπό μελέτη αλληλουχιών με τις βάσεις δεδομένων της MLST για την εκχώρηση των αριθμών των αλληλόμορφων γονιδίων και του Sequence Type (ST) του βακτηριακού στελέχους.

Η σύγκριση καταλήγει στην εκχώρηση ενός αριθμού για κάθε αλληλόμορφο γονίδιο του σχήματος. Οι επτά αριθμοί και για τα επτά γονιδιακά θραύσματα του σχήματος αποτελούν το αλληλόμορφο προφίλ (**allelic profile**) του βακτηριακού στελέχους. Τέλος συγκρίνεται το συνολικό αλληλόμορφο προφίλ και για κάθε μοναδικό συνδυασμό του εκχωρείται, από τις βάσεις δεδομένων της MLST, ένας αριθμός που αποτελεί το Sequence Type (ST) του βακτηριακού στελέχους. Ο ST αποτελεί τον πλέον κατάλληλο και ξεκάθαρο τρόπο χαρακτηρισμού ενός στελέχους (ή ενός κλώνου βακτηρίου).

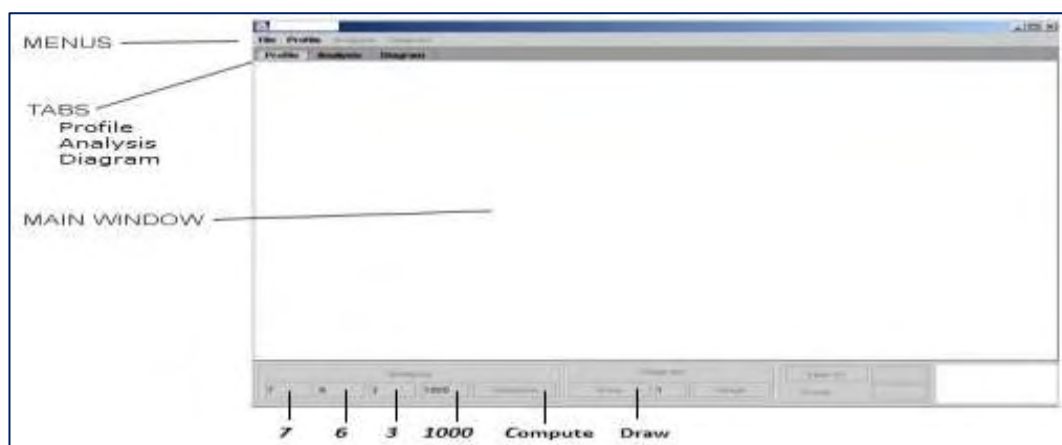
atpA	ddl	gdh	purK	gvd	pstS	adk	ST
ACGT 1	GCCT 1	TACG 1	AATC 1	CGTA 1	TTCA 1	CAEG 1	17
ACGT 15	GCCA 1	TACG 1	AATC 1	GTAC 1	TTCA 20	GACG 1	203
ACGT 15	GCCA 1	TACG 1	AATC 44	AATA 1	TTCA 20	GACG 1	412

Εικόνα 36: Σχηματική αναπαράσταση εκχώρησης αλληλόμορφου προφίλ και ST στο κλώνο ST17 του *E. faecium*, στον ST203 (ο οποίος διαφέρει από τον ST17 κατά 2 γενετικά συμβάντα) και στον ST412, που είναι ο κλώνος που επικρατεί στην Ελλάδα και διαφέρει κατά 3 γενετικά συμβάντα από τον ST17 και κατά ένα από τον ST203.

2.12. Εφαρμογή της κλωνικής μελέτης μέσω του αλγορίθμου eBURST

Μετά το τέλος του μοριακού χαρακτηρισμού ενός είδους βακτηριακού πληθυσμού – πρακτικά τα αλληλόμορφα γονίδια και οι STs- προχωρούμε στη μελέτη της κλωνικής τους συγγένειας για την ομαδοποίηση και την ταξινόμηση των κλώνων σε κλωνικά συμπλέγματα που επειδή έχουν παρόμοιο γενετικό υπόβαθρο-συγγενείς γονότυποι- έχουν και παρόμοια γενετικά χαρακτηριστικά. Το μοντέλο εμφάνισης των κλώνων και της διαφοροποίησης τους βασίζεται στην διαφοροποίηση των αλληλόμορφων γονιδίων τους. Η εφαρμογή του αλγορίθμου **eBURST** περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

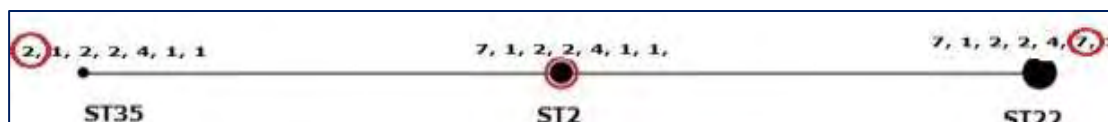
- Εγκατάσταση στον υπολογιστή του προγράμματος *Java™ applet*
- Επιλέγεται και αντιγράφεται (copy) από τα αρχεία μας όλος ο πληθυσμός ενός είδους βακτηρίων δηλ. οι STs και τα αλληλόμορφα γονίδια, προσέχοντας τα γονίδια να είναι με την σειρά που αναγράφονται στις βάσεις δεδομένων της MLST.
- Επικολλάται η επιλογή μας στις βάσεις δεδομένων της MLST κάνοντας διαδοχικά τις ενέργειες: πχ Databases->*Enterococcus faecalis*->eBURST->enter your own profile data->paste-> analyse your allelic profiles separately->submit->Run
- Η διασύνδεση της εφαρμογής eBURST χωρίζεται σε τρία τμήματα:
Το παράθυρο Προφίλ- εμφάνιση των δεδομένων μας
Το παράθυρο Ανάλυσης ->Compute-Γραπτή Αναφορά eBURST
Το παράθυρο Διαγράμματος-> Draw- Διάγραμμα eBURST του πληθυσμού μας



Εικόνα 37. Το παράθυρο της εφαρμογής eBURST. Στο κάτω μέρος αναγράφονται τα κριτήρια επιλογής για την παρουσίαση της Γραπτής Αναφοράς και των Διαγραμμάτων. Το διάγραμμα ενός ολοκληρωμένου πληθυσμού (τύπου «population snapshots») εμφανίζεται με την αλλαγή του 6->0 (Analysis) (βλέπε κείμενο). Το παράθυρο της εφαρμογής eBURST φαίνεται στα αποτελέσματα *E. faecium*.

➤ Η μέθοδος χρησιμοποιεί το πιο αυστηρό κριτήριο ορισμού μιας ομάδας ή ενός κλωνικού συμπλέγματος (group or clonal complex) σύμφωνα με το οποίο οι STs που αποτελούν ένα σύμπλεγμα, έχουν μεταξύ τους όμοια τα έξι από τα επτά αλληλόμορφα γονίδια με τα γειτονικά τους STs του συμπλέγματος (6/7 κοινά αλληλόμορφα ή 1/7 ένα διαφορετικό αλληλόμορφο από τα επτά - ένα γενετικό συμβάν). Επίσης για να είναι ένας ST ιδρυτής (predicted founder) ή υποϊδρυτής ομάδας πρέπει να έχει παράγει τουλάχιστον τρεις κλώ-

νους-SLVs (single locus variants). Η στατιστική εμπιστοσύνη (confidence) στον αποδιδόμενο ως κύριο ιδρυτή προσδιορίζεται με μια στατιστική διαδικασία δειγματοληψίας γνωστή ως Bootstrap που χρησιμοποιεί 1000 δοκιμές ανά ST. Το Bootstrap αποδίδεται στην γραπτή αναφορά eBURST σαν ποσοστό επί τοις % στον κύριο ιδρυτή ή υποϊδρυτή ομάδας αλλά και σε κάθε ST και εκφράζει την δυνατότητα επί τοις % ενός ST να είναι ιδρυτής ομάδας ή πιο απλά ο πιο παλιός κλώνος. Οι singletons κλώνοι δεν ανήκουν σε κανένα κλωνικό σύμπλεγμα γιατί διαφέρουν, από κάθε άλλον ST μιας συλλογής, από τρία έως και επτά αλληλόμορφα γονίδια. Όλα τα κριτήρια αναγράφονται στο κάτω μέρος του μενού. (Εικόνα 37)



Εικόνα 38: Υπόδειγμα κλωνικής μελέτης μέσω του αλγορίθμου eBURST. Ο ST35 έχει με τον ST2 όμοια τα 6 από τα επτά διατηρημένα γονίδια (6/7 κοινά αλληλόμορφα γονίδια ή 1/7 ένα διαφορετικό αλληλόμορφο από τα επτά - ένα γενετικό συμβάν). Το ίδιο συμβαίνει και με τον ST22 σε σχέση με τον γειτονικό του ST2 ενώ με τον ST35 διαφέρει κατά δύο γενετικά συμβάντα- έχουν διαφορά δύο αλληλόμορφων γονιδίων από τα επτά. Ο ST2 δεν μπορεί να θεωρηθεί ιδρυτής ομάδας (μπλέ χρώμα) γιατί έχει παράγει δύο κλώνους (χρειάζονται τουλάχιστον τρεις σύμφωνα με τα κριτήρια), ωστόσο θεωρείται ο παλαιότερος (ιδρυτής) των δύο άλλων κλώνων γιατί έχει παράγει δύο κλώνους παρότι ο ST22 είναι ο πολυπληθέστερος. Το παράδειγμα προέρχεται από την μελέτη των ευρεθέντων κλώνων του πληθυσμού μας *S. epidermidis*.

➤ **Διάγραμμα eBURST τύπου «population snapshots»:** τα διαγράμματα eBURST δίνονται ανά κλωνικό σύμπλεγμα. Ολόκληρος όμως ο πληθυσμός μιας συλλογής μπορεί να εμφανιστεί σ' ένα διάγραμμα, συνδεδεμένων και ασύνδετων STs, τύπου «population snapshots», θέτοντας τον πιο χαλαρό ορισμό για τον σχηματισμό ομάδας (6->0) στο στάδιο της Ανάλυσης, επιτρέποντας έτσι τις σωστές γενετικές αποστάσεις μεταξύ των κλώνων των διαφορετικών ομάδων. Οι συστάδες των συνδεδεμένων κλώνων ανταποκρίνονται σε κλωνικά συμπλέγματα CCs. Οι προβλεπόμενοι ιδρυτές μιας ομάδας ή ενός κλωνικού συμπλέγματος σημειώνονται με μπλε κουκίδες και τοποθετούνται στο κέντρο των συμπλεγμάτων ενώ οι ιδρυτές υποομάδων σημειώνονται με κίτρινες κουκίδες. Οι ανεξάρτητοι singletons-κλώνοι εμφανίζονται ως μαύρες κουκίδες. Το μέγεθος των κουκίδων είναι ανάλογο με τον όγκο του πληθυσμού τους (αριθμός των στελεχών που αντιπροσωπεύουν). Οι SLV (single locus variants) όταν συνδέονται με γραμμές αποτελούν τα κλωνικά συμπλέγματα ή με άλλα λόγια οι ομάδες και οι υποομάδες κατά eBURST αντιστοιχούν σε ομάδες συνδεδεμένων μεταξύ τους STs. Τα κλωνικά συμπλέγματα παριστάνονται με την συντόμευση CC και τον αριθμό του ιδρυτή του κλωνικού συμπλέγματος. Για παράδειγμα: το CC17 είναι το κλωνικό σύμπλεγμα, του οποίου ο κλώνος ST17 είναι ο ιδρυτής του.



Όλες οι πληροφορίες σχετικά με την εφαρμογή eBURST δίδονται από τις βάσεις δεδομένων της MLST σε κάθε είδος βακτηρίων, όταν «πατήσουμε» πάνω στο επίσημο σήμα του. Εκεί βρίσκουμε τρόπους σύγκρισης μεταξύ δύο πληθυσμών, πως βρίσκουμε τα DLVs ενός ST κ.α

2.13. Προγράμματα Βιοπληροφορικής και Γενετικές Βάσεις Δεδομένων

Μετά τα αποτελέσματα της Αλληλούχισης, χρησιμοποιήθηκαν μια σειρά από προγράμματα Βιοπληροφορικής και Γενετικές Βάσεις Δεδομένων για την επεξεργασία και την μελέτη των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων των μελετώμενων βακτηρίων.

NCBI: (National Center for Biotechnology Information) Εθνικό Κέντρο Βιοτεχνολογικών Πληροφοριών (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Το NCBI ιδρύθηκε το 1988 στις ΗΠΑ ως μια εθνική πηγή πληροφοριών σχετικών με την μοριακή βιολογία. Ο ρόλος του είναι «να δημιουργεί Δημόσιες Βάσεις Δεδομένων, να διεξάγει έρευνα στο πεδίο της υπολογιστικής βιολογίας, να αναπτύσσει εργαλεία λογισμικού για την ανάλυση γονιδιωματικών δεδομένων και να προσφέρει ελεύθερα στην επιστημονική κοινότητα βιοϊατρικές πληροφορίες, όλα αυτά με σκοπό να συμβάλλει στη βαθύτερη κατανόηση των μοριακών διαδικασιών που επηρεάζουν την ανθρώπινη υγεία και ασθένεια». Τα εργαλεία αναζήτησης που χρησιμοποιήθηκαν μέσω του δικτυακού τόπου του NCBI είναι:

PubMed: προσφέρει πρόσβαση σε βιβλιογραφικές παραπομπές, περιλήψεις καθώς και συνδέσεις με δικτυακούς τόπους που περιέχουν σε ηλεκτρονική μορφή άρθρα από ερευνητικά περιοδικά.

BLAST: (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool), είναι ένα εργαλείο που χρησιμοποιείται για την σύγκριση μιας νουκλεοτιδικής ή πρωτεϊνικής αλληλουχίας με όλες τις αλληλουχίες που υπάρχουν στη βάση δεδομένων για την ανεύρεση πιθανών ομοιοτήτων. Επίσης παρατίθενται και γονίδια με τις σχετικές λειτουργίες τους γεγονός που επιτρέπει μεγαλύτερη επικέντρωση στην λειτουργία του μελετώμενου γονιδίου. ⁽²⁷³⁾

GenBank: Είναι βάση δεδομένων γενετικών αλληλουχιών των Εθνικών Ιδρυμάτων Υγείας των ΗΠΑ (NIH, National Institutes of Health). Στην GenBank βρίσκονται όλες οι αλληλουχίες DNA που είναι δημόσια διαθέσιμες (200 δισεκατομμύρια βάσεις τον Ιούνιο του 2008). Ο αλγόριθμος BLAST αναζητά στην GenBank κατατεθειμένες αλληλουχίες ή τμήματα αυτών, οι οποίες παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με την υπό μελέτη αλληλουχία. Η ποιότητα κάθε στοίχισης ποσοτικοποιείται σε μία κλίμακα και οι τοπικές στοιχίσεις με την υψηλότερη βαθμολογία συσχέτισης (HSPs-high scoring segment pairs) καταγράφονται με μορφή πίνακα. Ο πίνακας αυτός παρουσιάζει τελικά τις πιο «συγγενικές» αλληλουχίες, κατά σειρά μειούμενης βαθμολογίας συσχέτισης, και επομένως ομολογίας. ⁽²⁷⁴⁾

Mega: Το πρόγραμμα Ανάλυσης Αλληλουχίας Mega (έκδοση 5.0; <http://www.mega-software.net>) ⁽²⁷⁵⁾ χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του αριθμού των μεταβλητών νουκλεοτιδικών τόπων των υπό μελέτη γονιδίων, σε συνδυασμό με το πρόγραμμα **ClustalW** ⁽²⁷⁶⁾ που παρέχει την επιμέλεια της ευθυγράμμισης των εκχωρημένων νουκλεοτιδικών ακολουθιών. Το πρόγραμμα περιλαμβάνεται δωρεάν μέσα από τις ιστοσελίδες της MLST.

MLST: Οι Βάσεις Δεδομένων της MLST, διατίθενται ελεύθερα στο Διαδίκτυο σε δύο ιστοσελίδες που εδρεύουν, στο Imperial College, London (<http://www.mlst.net/>) και στο Oxford University, London (<http://pubmlst.org/>). Οι Βάσεις Δεδομένων που φιλοξενούνται στους παραπάνω δύο ιστότοπους περιλαμβάνουν 50 διαφορετικά (28 και 22 αντίστοιχα) είδη μικροοργανισμών, διατηρούν τα αποκλειστικά δικαιώματα των αλληλουχιών αναφοράς των αλληλόμορφων γονιδίων τους καθώς και τις λίστες των STs για τους συγκεκριμένους

μικροοργανισμούς. Επίσης περιλαμβάνουν δωρεάν προγράμματα επεξεργασίας αλληλούχησης όπως το Mega καθώς και προγράμματα αλγορίθμων που είναι κατάλληλα για επεξεργασίες φυλογενετικών και κλωνικών μελετών συγγένειας όπως λχ eBURST, UPGMA κ.α.

eBURST: η εφαρμογή του αλγορίθμου eBURST περιέχεται ελεύθερα στις ιστοσελίδες της MLST (<http://eburst.mlst.net>) και τα διαγράμματα της παρέχουν μια ολοκληρωμένη εικόνα της κλωνικής συγγένειας των υπό μελέτη στελεχών των βακτηρίων, αποσκοπώντας στην ομαδοποίηση τους με συγκεκριμένα γενετικά χαρακτηριστικά. Χρησιμοποιείται για την ολοκληρωμένη έρευνα ενός πληθυσμού, κατά την μελέτη διερεύνησης και ελέγχου των λοιμώξεων και των επιδημικών εξάρσεων που προκαλούν. Αποδίδεται με Γραπτή Αναφορά και Γραφικά μέσω του προγράμματος της *Java™ applet*.

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes): είναι μια συλλογή από ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων του Πανεπιστημίου του Κιότο (<http://www.genome.ad.jp/kegg/>) που ασχολείται με γονιδιώματα, ενζυμικές οδούς και οργανικές χημικές ουσίες. Είναι το μοναδικό αυτού του είδους των προγραμμάτων βιοπληροφορικής που παρέχεται δωρεάν στο Διαδίκτυο. Αποτελεί τμήμα του γιαπωνέζικου προγράμματος για το ανθρώπινο γονιδίωμα και δημιουργήθηκε το 1995. (277, 278).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για τις ανάγκες της καλύτερης και συνοπτικότερης παρουσίασης των αποτελεσμάτων αλλά και την γεωγραφική κατανομή και διασπορά των κλώνων των μελετηθέντων Gram-θετικών βακτηρίων στην ελληνική επικράτεια, τα στελέχη χωρίστηκαν σε:

- **Περιοχή Α:** περιλαμβάνει τα στελέχη από την Πάτρα και την Νότια Ελλάδα
- **Περιοχή Β:** περιλαμβάνει τα στελέχη από τα νοσοκομεία της Αττικής
- **Περιοχή Γ:** περιλαμβάνει τα στελέχη της Λάρισας και της Θεσσαλίας
- **Περιοχή Δ:** περιλαμβάνει τα στελέχη της Αλεξανδρούπολης και της Θράκης



Εικόνα 39: Κατανομή των στελεχών όλων των βακτηρίων της έρευνας μας στην ελληνική επικράτεια.

Συνολικός έλεγχος μοριακών εργαστηριακών παραμέτρων					
	No. στελεχών	Διατηρημένα γονίδια	Αντιδράσεις PCR	Παθογονικά γονίδια	Αντιδράσεις PCR
<i>E. faecium</i>	186	7	1302	<i>esp</i>	186
<i>E. faecalis</i>	30	7	210	-	-
<i>S. aureus</i>	126	7	882	<i>PVL</i> <i>SCCmec</i> I,II,III,IV,V	126
<i>S. epidermidis</i>	35	7	245	-	-
<i>S. pyogenes</i>	80	7	560	-	-
<i>S. agalactiae</i>	118	7(7)	1652	-	-
ΣΥΝΟΛΟ	575	42	4851	7	462

Πίνακας 23. Συνολικός αριθμός εξετασθέντων γενετικών τύπων και αντιδράσεων PCR

Ο συνολικός μοριακός έλεγχος που πραγματοποιήθηκε για τις ανάγκες της παρούσας Διατριβής και για τα έξι υπό μελέτη βακτήρια περιελάμβανε 575 κλινικά στελέχη τα οποία ελέγχθηκαν συνολικά για **49 διαφορετικούς γενετικούς τύπους**, των οποίων τα γονίδια ενισχύθηκαν με ένα συνολικό αριθμό 5313 αντιδράσεων PCR.

Ηλεκτροφόρηση των γονιδίων των μελετηθέντων βακτηρίων: Χαρακτηριστικές εικόνες ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων PCR των ερευνηθέντων θραυσμάτων γονιδίων των βακτηρίων παρατίθενται στο Παράρτημα της παρούσας Διατριβής. **(Π1)**

3.1. *Enterococcus faecium*

Υλικό συλλογής: Το υλικό της μελέτης μας αποτέλεσαν 186 στελέχη *Enterococcus faecium* ανθεκτικών στην βανκομυκίνη (VRE). Από αυτά, εξήντα τέσσερα (64) στελέχη προ-

έρχονται από το ΠΓΝ Πατρών, δεκαοκτώ (18) από το Ασκληπιείο ΠΓΝ Βούλας, επτά (7) από το Σισμανόγλειο ΓΝΑ, οκτώ (8) από το Αττικό ΠΓΝ, ογδόντα δύο (82) από το ΠΓΝ Λάρισας και επτά (7) από το ΠΓΝ Αλεξ/πολης. Το κλινικό υλικό περιελάμβανε δύο κατηγορίες: η πρώτη κατηγορία με 121 στελέχη, που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα ασθενών όπως αίμα, πύον κτλ ενώ η δεύτερη κατηγορία με 65 στελέχη που απομονώθηκαν σποραδικά από κόπρανα ασθενών στα αντίστοιχα νοσοκομεία.

Χρονική διάρκεια έρευνας: 7.01-17.09.2008 //31.03-9.04.2009 //16.6-12.9.2011

➤ **Παραλλαγές της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ανά γενετικό τόπο:** Στα 186 στελέχη *Enterococcus faecium* εφαρμόστηκε το σχήμα της MLST όπως αναπτύχθηκε από τους **Homan et al** το 2002 (²⁵⁴) που βασίζεται στην ανάλυση της αλληλουχίας και των δύο κλώνων DNA των εσωτερικών θραυσμάτων επτά διατηρημένων γονιδίων (housekeeping genes), των: *atpA*, *ddl*, *gdh*, *purk*, *gyd*, *pstS* και *adk*. Το μήκος των θραυσμάτων αυτών των γονιδίων κυμαίνεται από 395 έως 583 bp. Ο αριθμός των παραλλαγών των αλληλόμορφων ανά γονίδιο κυμάνθηκε από 3 (*ddl*, *gdh*, *purk*) έως 4 παραλλαγές (*atpA*, *gyd*, *pstS*, *adk*) με μέσο όρο Md=3.71 αλληλόμορφα γονίδια ανά γενετικό τόπο.

MLST locus	Sequence length(bp)	No. of alleles
<i>atpA</i>	556	4
<i>ddl</i>	465	4
<i>gdh</i>	530	4
<i>purk</i>	492	3
<i>gyd</i>	395	4
<i>pstS</i>	583	4
<i>adk</i>	437	3

Πίνακας 24. Παραλλαγές της αλληλουχίας των επτά γενετικών τόπων του σχήματος MLST

➤ **Μοριακός χαρακτηρισμός των στελεχών *E. faecium*:** Ο μοριακός χαρακτηρισμός των 186 στελεχών *E. faecium* μέσω της MLST προσδιόρισε 29 διαφορετικούς STs. Δεκαέξι (16) από αυτούς, αντιπροσωπεύονται από ένα στέλεχος, ενώ επτά (7) STs αντιπροσωπεύονται από 2 έως 4 στελέχη. Οι STs με την μεγαλύτερη αντιπροσώπηση είναι: ο **ST412** με 72 στελέχη (38.7%), ο **ST17** με 28 στελέχη (15%), ο **ST203** με 28 στελέχη (15%), ο **ST16** με 13 στελέχη (7%) και ο **ST1003*** με 6 στελέχη (3.2%). Επίσης σημειώνεται για κάθε ST η ύπαρξη (+) ή μη (-) του παθογονικού γονιδίου **esp** (Enterococcal surface protein).

No	Περιοχή	No στελεχών	ST	Allelic Profile							esp
				<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purk</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>adk</i>	
1	A,B,Γ,Δ	72	412	15	1	1	44	1	20	1	(+)
2	A,B,Γ,Δ	28	17	1	1	1	1	1	1	1	(+)
3	A,B,Γ,Δ	28	203	15	1	1	1	1	20	1	(+)
4	A,B,Γ	13	16	1	2	1	1	1	1	1	(+)
5	Γ	6	1003*	1	2	1	1	1	2	1	(+)
6	Γ	5	192	15	1	1	1	1	7	1	(+)
7	Γ	4	1002*	1	2	1	1	1	2	9	(+)
8	B	4	65	1	2	1	20	1	1	9	(+)
9	Γ	2	1004*	1	1	1	1	1	2	1	(+)
10	A,B	2	584	1	1	1	44	1	1	1	(+)
11	B, Γ	2	552	1	3	1	1	1	7	1	(-)
12	A, Γ	2	117	9	1	1	1	1	1	1	(+)
13	Γ	2	721	9	1	1	1	1	20	1	(+)
14	B	1	78	15	1	1	1	1	1	1	(+)

15	B	1	494	1	15	3	1	1	20	1	(-)
16	Δ	1	1012*	1	1	1	44	1	7	1	(-)
17	B	1	18	7	1	1	1	5	1	1	(-)
18	A	1	750	1	1	1	44	1	20	1	(-)
19	B	1	656	15	3	1	44	1	20	1	(-)
20	Γ	1	1007*	9	2	1	1	1	20	1	(+)
21	A	1	80	9	1	1	1	12	1	1	(+)
22	Γ	1	1008*	15	1	1	1	1	20	18	(+)
23	Γ	1	1006*	1	2	1	20	1	2	1	(+)
24	Γ	1	1011*	1	2	1	1	1	1	9	(+)
25	Γ	1	125	7	3	1	1	5	1	1	(-)
26	Γ	1	64	7	1	1	1	1	1	1	(+)
27	Γ	1	1001*	1	3	1	1	1	7	18	(+)
28	Γ	1	1005*	1	2	22	1	19	2	18	(+)
29	Γ	1	1009*	1	3	12	1	19	7	18	(+)

Πίνακας 25: Σύνοψη των αποτελεσμάτων της MLST των 29 STs του πληθυσμού μας *E. faecium* καθώς και του γονιδίου *esp*. Καταγράφεται επίσης η συχνότητα εμφάνισης του κάθε ST στη συλλογή, η διασπορά ανά περιοχή καθώς και τα αλληλόμορφα γονίδια τους.

➤ **Νέοι κλώνοι:** ο κλώνος που επικράτησε σ' όλα τα δείγματα ήταν ένας νέος αχαρκτηρήσιτος κλώνος που παρουσίασε νέο αλληλόμορφο γονίδιο *purk* στις βάσεις δεδομένων της MLST και χαρακτηρίστηκε από την συγκεκριμένη έρευνα ως ST412, ενώ 11 νέοι κλώνοι με STs* 1001,1002,1003,1004,1005,1006,1007,1008,1009,1011,1012 παρουσίασαν αλληλόμορφα γονίδια που προέκυψαν από τον ανασυνδυασμό ήδη υπάρχοντων γονιδίων.

*οι τελικοί STs των νέων κλώνων είναι σε αναμονή

➤ **Κλωνική συγγένεια που προσδιορίστηκε με τον στον αλγόριθμο eBURST:**

ΓΡΑΠΤΗ ΑΝΑΦΟΡΑ eBURST

eBURST Report									
<i>E. faecium</i>									
Fri Mar 30 19:50:05 EEST 2012									
No. isolates = 186 No. STs = 29 No. re-samplings for bootstrapping = 1000									
No. loci per isolate = 7 No. identical loci for group def = 6 No. groups = 2									
Group 1: No. Isolates = 181 No. STs = 25 Predicted Founder =17									
ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp	
17	28	6	9	8	1	2.16	58%	73%	
203	28	6	7	6	5	2.45	50%	74%	
78	1	5	9	7	3	2.33	11%	37%	
117	2	5	7	8	4	2.45	13%	37%	
64	1	4	8	8	4	2.5	1%	9%	
1003*	6	4	3	11	6	2.79	7%	33%	
721	2	3	10	6	5	2.58	0%	11%	
16	13	3	9	9	3	2.5	1%	13%	
412	72	3	7	5	9	3.0	1%	19%	
584	2	3	6	10	5	2.70	0%	13%	
750	1	3	5	10	6	2.83	3%	8%	
1011*	1	3	2	7	12	3.25	1%	13%	
1004*	2	2	12	7	3	2.45	0%	0%	
192	5	2	9	8	5	2.70	0%	0%	
494	1	2	6	8	8	2.95	0%	0%	

1012*	1	2	4	9	9	3.08	0%	0%
18	1	2	4	6	12	3.33	0%	0%
1002*	4	2	4	2	16	3.54	0%	0%
656	1	2	2	7	13	3.5	0%	0%
1007*	1	1	5	13	5	2.91	0%	0%
80	1	1	5	7	11	3.33	0%	0%
1008*	1	1	5	7	11	3.29	0%	0%
1006*	1	1	4	6	13	3.45	0%	0%
65	4	1	3	3	17	3.91	0%	0%
125	1	1	1	6	16	3.83	0%	0%

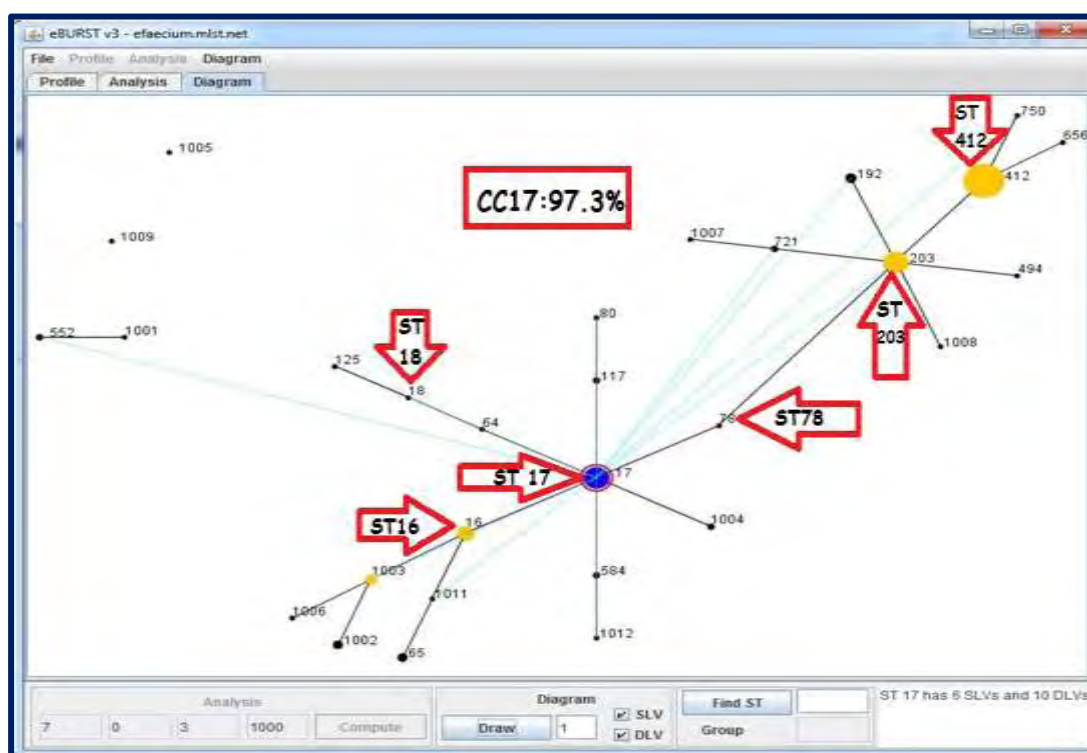
Group 2: No. Isolates = 3 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
552	2	1	0	0	0	1.0
1001*	1	1	0	0	0	1.0

Singletons: size 2

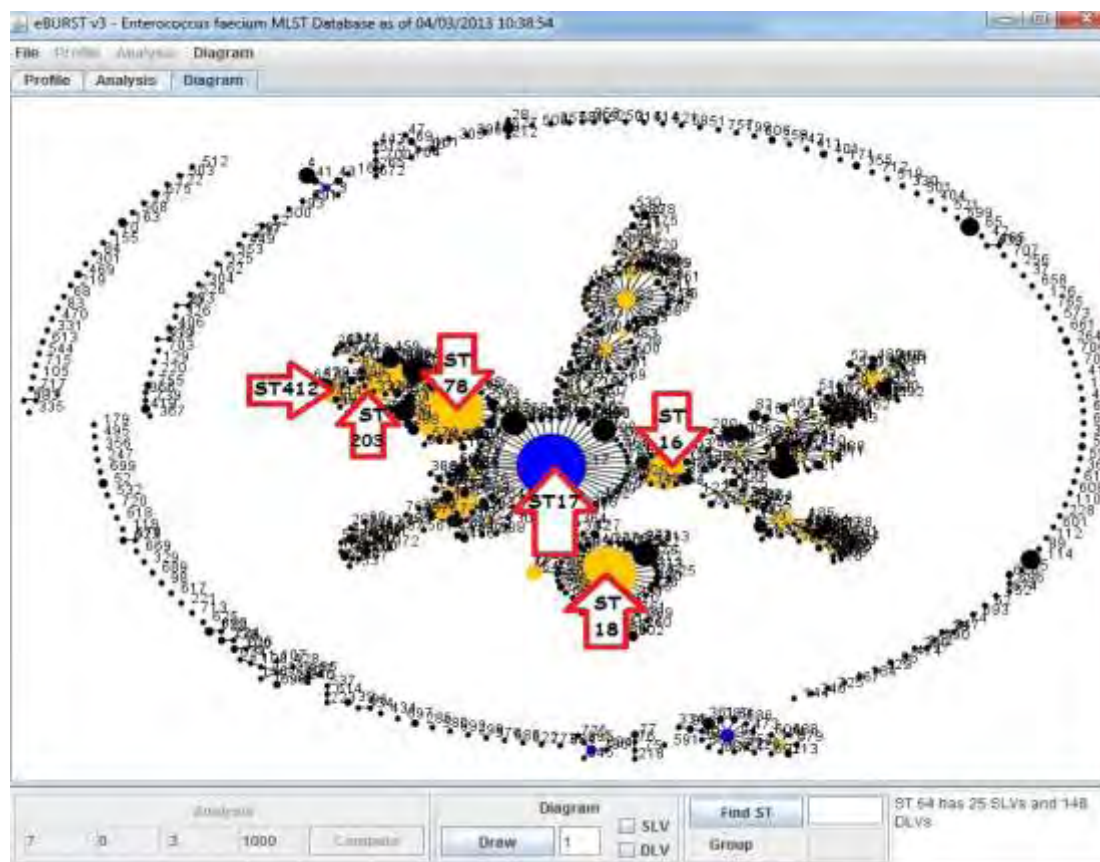
ST	FREQ
1005*	1
1009*	1

Πίνακας 26: Συνοδευτική αναφορά της εφαρμογής eBURST για την ταξινόμηση του υπό μελέτη πληθυσμού *E. faecium* σε κλωνικά συμπλέγματα. Στον πίνακα περιέχονται η συχνότητα εμφάνισης των κλώνων (FREQ), οι SLVs, οι DLVs και οι TLVs του κάθε κλώνου καθώς και τα αποτελέσματα της στατιστικής διαδικασίας Bootstrap.



Διάγραμμα 1: Διάγραμμα eBURST για *E. faecium*. Η πλειονότητα των στελεχών μας ανήκουν στο παθογονικό κλωνικό σύμπλεγμα CC17 (97.3%). Έμφαση δίνεται σε παγκόσμιους διακεκριμένους κλώνους του συμπλέγματος που σημειώνονται με κόκκινα βέλη ενώ ο ST412 είναι ο παθογονικός κλώνος που χαρακτηρίστηκε από την έρευνα μας και επικρατεί στην Ελλάδα. Οι γαλάζιες γραμμές ενώνουν τον ST17 με τους κλώνους από τους οποίους διαφέρει κατά δύο γενετικά συμβάντα (DLVs).

➤ **Σύγκριση των κλώνων μας με το παγκόσμιο διάγραμμα eBURST για *E. faecium*:** Σύγκριση των κλώνων της έρευνας μας (29 STs) με το σύνολο των κλώνων του *E. faecium* που περιλαμβάνει μέχρι στιγμής 670 STs. Το κλωνικό σύμπλεγμα CC17 κυριαρχεί παγκοσμίως στο νοσομειακό περιβάλλον με 427 STs ως ενιαίο κλωνικό σύμπλεγμα.



Διάγραμμα 2: Παγκόσμιο διάγραμμα eBURST για *E. faecium*. Με κόκκινα βέλη σημειώνονται οι παγκόσμιοι επιδημικοί κλώνοι του CC17 που εντοπίστηκαν στην συλλογή μας.

3.2. *Enterococcus faecalis*

Υλικό συλλογής: Το υλικό της συλλογής αποτέλεσαν 30 κλινικά στελέχη *E. faecalis* εκ των οποίων τα 21 ήταν ανθεκτικά στην λινεζολίδη και ευαίσθητα στην βανκομυκίνη και τα υπόλοιπα 9 ανθεκτικά στην βανκομυκίνη. Δεκαοκτώ (18) στελέχη προέρχονται από το Πανεπιστημιακό ΓΝ Λάρισας και τα υπόλοιπα δώδεκα (12) από το Πανεπιστημιακό ΓΝ Πατρών. Χρονική διάρκεια έρευνας: 13.5-10.7.2008 // 24.2.2009 // 16.6-28.6.2011

➤ **Παραλλαγές της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ανά γενετικό τόπο:** Στα 30 στελέχη της συλλογής μας *E. faecalis* εφαρμόστηκε το σχήμα της MLST όπως αναπτύχθηκε από τους **Patricia Ruiz Garbajosa et al** το 2006 (²⁵⁶). Το σχήμα βασίζεται στην ανάλυση αλληλουχίας και των δύο κλώνων DNA, των εσωτερικών θραυσμάτων επτά διατηρημένων γονιδίων (housekeeping genes) των: *gdh*, *gyd*, *pstS*, *gki*, *aroE*, *xpt*, *yqjL*. Το μήκος των θραυσμάτων των γονιδίων κυμαίνεται από 395 έως 530 bp. Ο αριθμός των παραλλαγών των αλληλόμορφων ανά γονίδιο κυμάνθηκε από 2 (*gdh*, *xpt*) έως 5 παραλλαγές (*pstS*) με μέσο όρο Md=3.57 αλληλόμορφα γονίδια ανά γενετικό τόπο.

MLST locus	Sequence length(bp)	No. of alleles
<i>gdh</i>	530	2
<i>gyd</i>	395	4
<i>pstS</i>	583	5
<i>gki</i>	438	4
<i>aroE</i>	459	4
<i>xpt</i>	456	2
<i>ygjL</i>	436	4

Πίνακας 27. Παραλλαγές της αλληλουχίας των επτά γενετικών τύπων του σχήματος MLST για τα στελέχη *E. faecalis*.

➤ **Μοριακός χαρακτηρισμός των στελεχών *E. faecalis*:** Ο μοριακός χαρακτηρισμός των 30 στελεχών *E. faecalis* μέσω της MLST προσδιόρισε 8 διαφορετικούς STs. Έξη από αυτούς τους STs, αντιπροσωπεύονται από ένα στέλεχος (1000*, 9, 181, 73, 1001*, 421) ενώ οι STs με την μεγαλύτερη αντιπροσώπηση είναι ο **ST28** με 18 στελέχη (60%) και ο **ST6** με 6 στελέχη (20%).

Περιοχή	No στελεχών	ST	<i>Allelic Profile</i>							
			<i>gdh</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>gki</i>	<i>aroE</i>	<i>xpt</i>	<i>ygjL</i>	
1	A,Γ	18	28	4	4	8	3	8	1	3
2	Γ	6	6	12	7	3	7	6	1	5
3	Γ	1	1000*	4	4	3	3	6	1	5
4	Γ	1	9	4	6	16	4	1	1	4
5	Γ	1	181	12	5	30	7	6	1	5
6	Γ	1	73	4	7	11	1	23	12	2
7	Γ	1	1001*	4	4	8	7	8	1	3
8	Γ	1	421	4	7	8	3	8	1	3

Πίνακας 28: Ιδιότητες των 8 STs της συλλογής μας και σύνοψη των αποτελεσμάτων της MLST. Καταγράφεται η συχνότητα εμφάνισης του κάθε ST στη συλλογή καθώς και τα αλληλόμορφα γονίδια τους.

➤ **Νέοι κλώνοι:** Βρέθηκαν δύο νέοι κλώνοι οι ST1000* και ST1001*. Και οι δύο κλώνοι εντοπίστηκαν στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας.

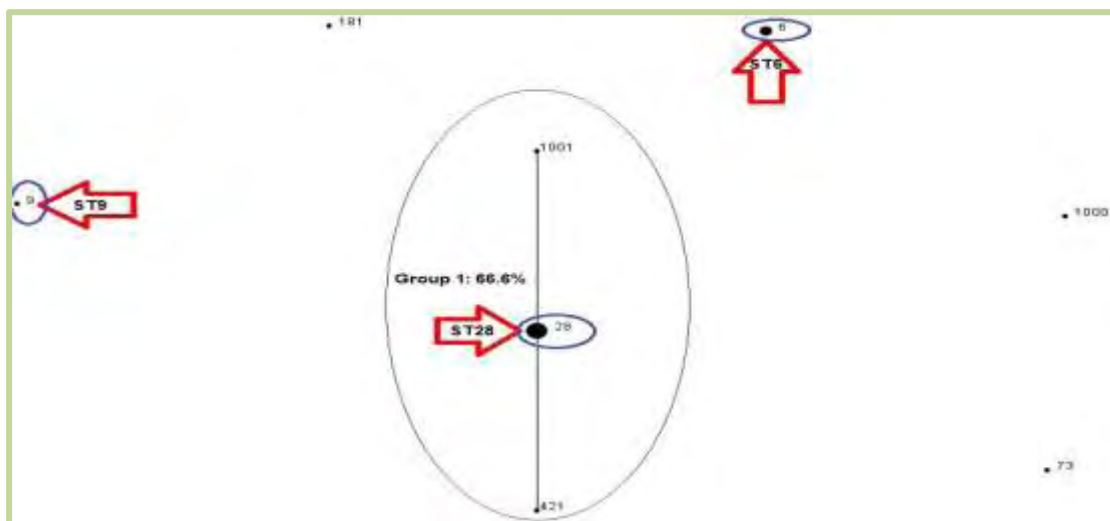
➤ Κλωνική συγγένεια που προσδιορίστηκε με τον αλγόριθμο eBURST:

Γραπτή αναφορά eBURST

eBURST Report									
<i>E. faecalis</i>									
Tue Mar 20 20:25:18 EET 2012									
No. isolates = 30 No. STs = 8 No. re-samplings for bootstrapping = 1000									
No. loci per isolate = 7 No. identical loci for group def = 6 No. groups = 1									
Group 1: No. Isolates = 20 No. STs = 3 Predicted Founder = 28									
ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Group	Bootstrap	Subgrp
28	18	2	0	0	0	1.0	31%	0%	
1001*	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	
421	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	
Singletons: size 5									
6	6								
73	1								
1000*	1								
9	1								
181	1								

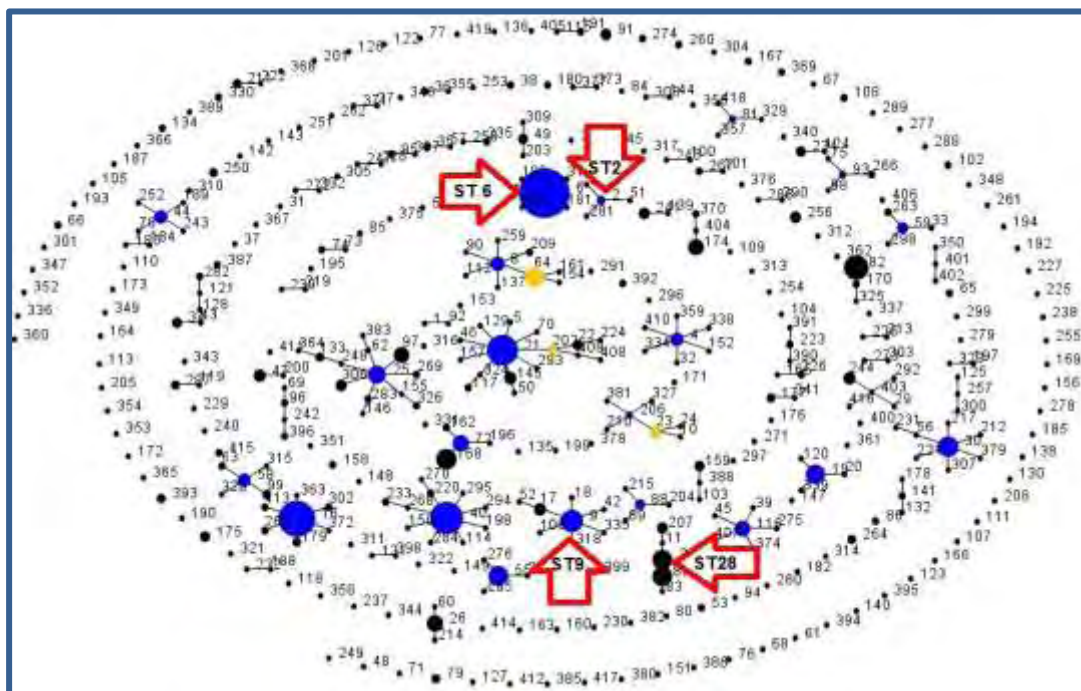
Πίνακας 29. Συνοδευτική αναφορά της εφαρμογής eBURST για την κατάταξη του μελετώμενου πληθυσμού *E. faecalis* σε κλωνικά συμπλέγματα.

➤ **Προσδιορισμός της κλωνικής συγγένειας:** Οι οκτώ STs του πληθυσμού μας ταξινομήθηκαν από τον αλγόριθμο eBURST σε δύο κατηγορίες: μία ομάδα στελεχών με 20 STs και προβλεπόμενο ιδρυτή το ST28 και μια ομάδα Singletons που περιλαμβάνει πέντε STs και δέκα συνολικά στελέχη.



Διάγραμμα 3: Διάγραμμα eBURST για *E. faecalis* του υπό μελέτη πληθυσμού μας. Με κόκκινα βέλη δίνεται έμφαση στους παγκόσμιους επιδημικούς κλώνους της συλλογής μας που ανήκουν στα κλωνικά συμπλέγματα CC28, CC6 και CC9 και χαρακτηρίζονται από τους ερευνητές ως κλωνικά συμπλέγματα υψηλού κινδύνου -HIRECCs (High-Risk Enterococcal clonal complexes). (279)

➤ **Σύγκριση των κλώνων του πληθυσμού μας με το παγκόσμιο διάγραμμα eBURST για *E. faecalis*:** το παγκόσμιο διάγραμμα eBURST για *E. faecalis* περιλαμβάνει, μέχρι στιγμής, 413 STs και 65 κλωνικά συμπλέγματα.



Διάγραμμα 4: Παγκόσμιο διάγραμμα eBURST για *E. faecalis*. Χαρακτηριστικό του διαγράμματος είναι η ύπαρξη διάσπαρτων STs χωρίς τάσεις δημιουργίας μεγάλων ενιαίων κλωνικών συμπλεγμάτων. Με κόκκινα βέλη εντοπίζονται οι παγκόσμιοι επιδημικοί κλώνοι του πληθυσμού μας.

3.3. *Staphylococcus aureus*

Υλικό συλλογής: το υλικό της έρευνας μας αποτέλεσαν 126 κλινικά στελέχη *S. aureus* εκ των οποίων τα εξήντα ένα (61) προέρχονται από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών, τριάντα εννέα (39) από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας και είκοσι έξι (26) από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αλεξανδρούπολης.

Χρονική διάρκεια έρευνας:

5.5-22.12.2008 // 28.4.-11.5.2009 // 19.2-23.9.2010 // 18.1-20.2.2011

➤ Κατανομή των κλινικών στελεχών ανά νοσοκομείο-περιοχή:

Περιοχή	No. isolates	MRSA	MSSA
Α	61	35	26
Γ	39	27	12
Δ	26	26	(-)
ΣΥΝΟΛΟ	126	88	38

Πίνακας 30. Κατανομή των κλινικών στελεχών *S.aureus*

➤ **Παραλλαγές της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ανά γενετικό τόπο:** Στα 126 στελέχη *S.aureus* εφαρμόστηκε το σχήμα της MLST όπως περιγράφεται από τους **Mark Enright et al** το **2000** (²⁶¹) που βασίζεται στην ανάλυση αλληλουχίας και των δύο κλώνων DNA επτά εσωτερικών θραυσμάτων διατηρημένων γονιδίων (housekeeping genes) των: *arcC*, *aroE*, *glp*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yciL*. Το μήκος των θραυσμάτων των γονιδίων κυμαίνεται από 402 έως 516 bp. Ο αριθμός των αλληλόμορφων ανά γονίδιο κυμάνθηκε από 6 αλληλόμορφα (*glp*) έως 13 αλληλόμορφα (*tpi*) γονίδια και μέσο όρο Md=10.14 αλληλόμορφα ανά γενετικό τόπο που δείχνει πολύ υψηλό βαθμό διαφοροποίησης των αλληλόμορφων.

MLST locus	Sequence length (bp)	No. of alleles
<i>arcC</i>	456	10
<i>aroE</i>	456	11
<i>glp</i>	465	6
<i>gmk</i>	429	9
<i>pta</i>	474	10
<i>tpi</i>	402	14
<i>yciL</i>	516	11

Πίνακας 31. Παραλλαγές της αλληλουχίας των επτά γενετικών τόπων του γονιδιώματος των στελεχών *S. aureus* της συλλογής μας.

➤ **Νέοι κλώνοι:** η έρευνα απέδωσε επτά (7) νέους κλώνους εκ των οποίων οι δύο (ST1002*, ST1003*) προέρχονται από την Αλεξανδρούπολη, τρεις κλώνοι (ST1004*, ST1005*, ST1006*) προέρχονται από την Λάρισα και τέλος δύο νέοι κλώνοι (ST1007*, ST1008*) προέρχονται από την Πάτρα.

➤ Μοριακός χαρακτηρισμός των MRSA στελεχών *S. aureus*:

Ο μοριακός χαρακτηρισμός των 88 στελεχών του MRSA *Staphylococcus aureus* προσδιόρισε 23 STs. Έντεκα STs (11) αντιπροσωπεύονται από ένα στέλεχος με ποσοστό 0.8% για τον κάθε ST, ενώ πέντε STs (5) αντιπροσωπεύονται από 2 στελέχη (1.6%) για τον κάθε

ST. Οι STs με την μεγαλύτερη αντιπροσώπευση είναι ο **ST80** με 32 στελέχη (25.4%), ο **ST239** με 12 στελέχη (9.5%), ο **ST225** με 7 στελέχη (5.5%), ο **ST377** με 5 στελέχη (4%) ο **ST152** με 5 στελέχη (4%), ο **ST30** με 3 στελέχη (2.4%) και ο **ST1** με 3 στελέχη (2.4%). Τα ποσοστά υπολογίστηκαν επί του συνολικού αριθμού στελεχών ήτοι 126. Επίσης σημειώνεται για κάθε ST η ύπαρξη (+) ή μη (-) των παθογονικών γονιδίων **lukS/lukF PV** (*Pantom Valentine Leukocidin*) και του τύπου της σταφυλοκοκκικής κασέτας **SCCmec** (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*).

a/a	Περιοχή	No στελεχών	ST	Allelic profile							PVL	SCCmec
1	A,Γ,Δ	32	80	1	3	1	14	11	51	10	(+)	type IV
2	A,Γ,Δ	12	239	2	3	1	1	4	4	3	(-)	type III
3	A,Γ	7	225	1	4	1	4	12	25	10	(-)	type II
4	Γ	5	377	46	75	49	50	13	68	60	(+)	type III
5	A,Γ	5	152	46	75	49	44	13	68	60	(+)	type III
6	A,Γ	3	30	2	2	2	2	6	3	2	(+)	type IV
7	A	3	1	1	1	1	1	1	1	1	(-)	type IV
8	Γ	2	1004*	1	4	1	4	1	25	10	(-)	type II
9	A	2	121	6	5	6	2	7	14	5	(-)	NT
10	Δ	2	1003*	1	4	1	1	12	25	10	(-)	type II
11	Γ	2	15	13	13	1	1	12	11	13	(+)	NT
12	Δ	2	149	1	4	1	4	12	41	10	(-)	type II
13	Γ	1	1006*	1	176	1	14	11	3	10	(+)	NT
14	A	1	1007*	2	3	2	2	6	51	2	(+)	type IV
15	Δ	1	1002*	3	1	1	4	1	5	3	(+)	type IV
16	Δ	1	109	3	27	1	1	1	1	10	(+)	type V
17	A	1	585	2	1	1	1	4	4	3	(-)	type III
18	A	1	45	10	14	8	6	10	3	2	(-)	NT
19	A	1	72	1	4	1	8	4	4	3	(+)	NT
20	A	1	8	3	3	1	1	4	4	3	(-)	type III
21	Δ	1	5	1	4	1	4	12	1	10	(-)	type II
22	A	1	22	7	6	1	5	8	8	6	(-)	NT
23	A	1	1008*	1	3	1	14	11	51	40	(+)	type IV

Πίνακας 32: Σύνοψη των αποτελεσμάτων της MLST των 23 STs της συλλογής μας, των γονιδίων *lukS/lukF PV* (*Pantom Valentine Leukocidin*) και της κασέτας *SCCmec* για MRSA *S. aureus*. Καταγράφεται η συχνότητα εμφάνισης του κάθε ST στη συλλογή, η διασπορά των κλώνων στην Ελλάδα καθώς και τα αλληλόμορφα γονίδια τους. (συντόμηση NT:Not Tested)

➤ Κλωνική συγγένεια που προσδιορίστηκε με τον αλγόριθμο eBURST:

ΓΡΑΠΤΗ ΑΝΑΦΟΡΑ eBURST

eBURST Report									
Thu Mar 14 20:20:54 EET 2013 MRSA <i>S.aureus</i>									
No. isolates = 88 No. STs = 23 No. re-samplings for bootstrapping = 1000									
No. loci per isolate = 7 No. identical loci for group def = 6 No. groups = 4									
Group 1: No. Isolates = 14 No. STs = 5 Predicted Founder = 225									
ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp	
225	7	4	0	0	0	1.0	90%	49%	
149	2	2	2	0	0	1.5	1%	0%	
5	1	2	2	0	0	1.5	2%	0%	
1004*	2	1	3	0	0	1.75	0%	0%	

1003*	2	1	3	0	0	1.75	0%	0%
-------	---	---	---	---	---	------	----	----

Group 2: No. Isolates = 14 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 239

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average	ST Bootstrap	
						Distance	Group	Subgrp
239	12	2	0	0	0	1.0	30%	0%
585	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
8	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 3: No. Isolates = 33 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
80	32	1	0	0	0	1.0
1008*	1	1	0	0	0	1.0

Group 4: No. Isolates = 10 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
152	5	1	0	0	0	1.0
377	5	1	0	0	0	1.0

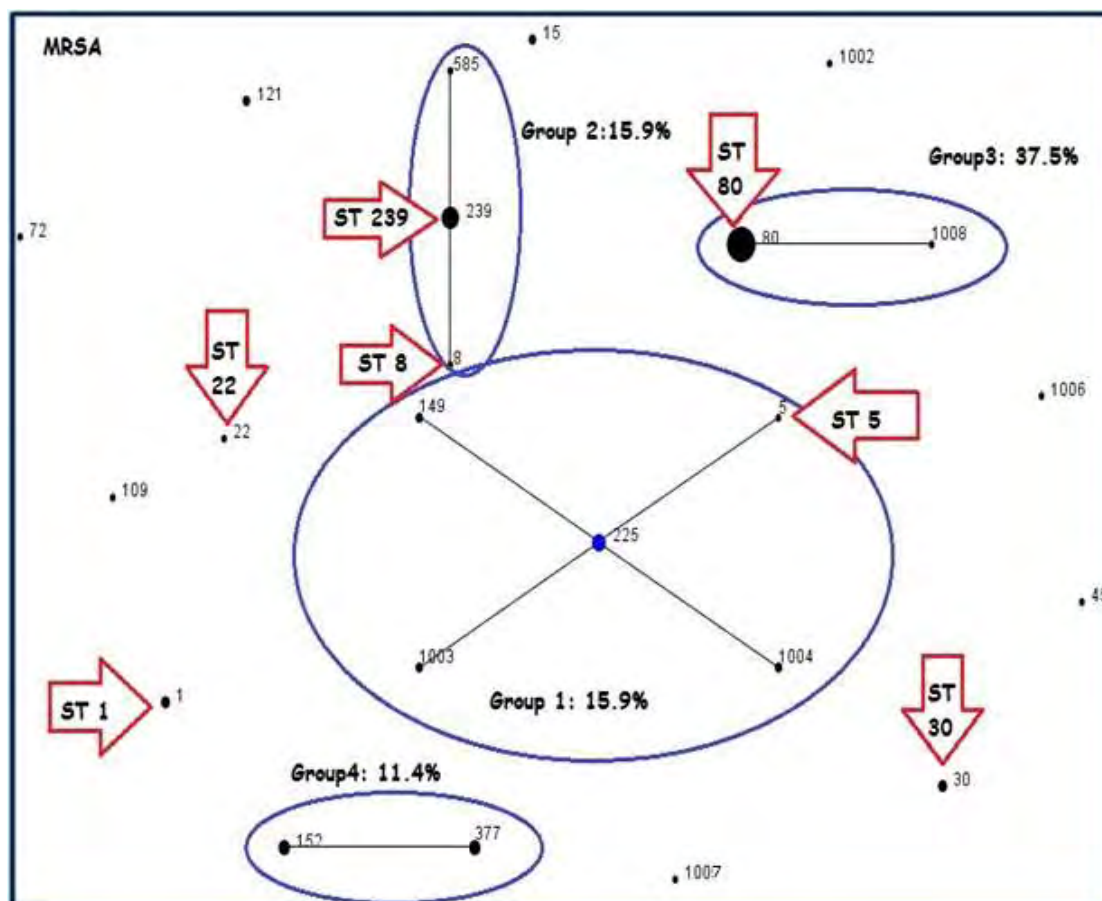
Singletons: size 11

1006*
1007*
121
1002*
109
30
15
45
72
1
22

Πίνακας 33. Συνοδευτική αναφορά της εφαρμογής eBURST για την κατάταξη του υπό μελέτη πληθυσμού MRSA *S. aureus* σε κλωνικά συμπλέγματα. Στον πίνακα περιέχονται η συχνότητα εμφάνισης των κλώνων (FREQ), οι SLVs, οι DLVs και οι TLVs του κάθε κλώνου καθώς και τα αποτελέσματα της στατιστικής διαδικασίας Bootstrap για την στατιστική εμπιστοσύνη των προβλεπόμενων ιδρυτών και υποϊδρυτών ομάδων.

➤ Προσδιορισμός της κλωνικής συγγένειας των στελεχών MRSA *S.aureus*:

Οι 23 STs της συλλογής μας ταξινομήθηκαν από τον αλγόριθμο eBURST σε πέντε κατηγορίες: α) την 1^η ομάδα με 14 στελέχη, 5 STs και προβλεπόμενο ιδρυτή το ST225, β) την 2^η ομάδα με 14 στελέχη, 3 STs και προβλεπόμενο ιδρυτή το ST239, γ) την 3^η ομάδα με 33 στελέχη, 2 STs και χωρίς προβλεπόμενο ιδρυτή, δ) την 4^η ομάδα με 10 στελέχη, 2 STs και χωρίς προβλεπόμενο ιδρυτή, ε) τέλος, εντοπίστηκαν 11 singletons μ' ένα συνολικό αριθμό 17 στελεχών.



Διάγραμμα 5: Διάγραμμα eBURST για τα στελέχη MRSA *S. aureus* του πληθυσμού μας. Στους μπλέ κύκλους ομαδοποιούνται οι STs κάθε ομάδας με το ποσοστό συμμετοχής τους, ενώ με κόκκινα βέλη εντοπίζονται οι παγκόσμιοι επιδημικοί κλώνοι του πληθυσμού μας MRSA *S. aureus*.

➤ **Μοριακός χαρακτηρισμός των στελεχών MSSA *S. aureus*:**

Ο μοριακός χαρακτηρισμός των 38 στελεχών MSSA *Staphylococcus aureus* προσδιόρισε 14 STs. Επτά STs (7) αντιπροσωπεύονται από ένα στέλεχος (0.8%) για τον κάθε ST, ενώ ο ST22 αντιπροσωπεύεται από 2 στελέχη (1.6%). Οι STs με την μεγαλύτερη αντιπροσώπηση είναι ο **ST80** με 8 στελέχη (6.3%), ο **ST225** με 6 στελέχη (4.8%), ο **ST1** με 5 στελέχη (4%) ο **ST30** με 4 στελέχη (3.2%) ο **ST7** με 3 στελέχη (2.4%) και ο **ST1005*** με 3 στελέχη (2.4%). Επίσης σημειώνεται για κάθε ST η ύπαρξη (+) ή μη (-) των παθογόνων γονιδίων *lukS/lukF PV* (**Pantom Valentine Leukocidin**).

Περιοχή	Νο στελεχών	ST	Allelic Profile							PVL
1	A,Γ	80	1	3	1	14	11	51	10	(+)
2	A	225	1	4	1	4	12	25	10	(-)
3	A	1	1	1	1	1	1	1	1	(-)
4	A,Γ	30	2	2	2	2	6	3	2	(+)
5	A,Γ	7	5	4	1	4	4	6	3	(-)
6	Γ	1005*	2	3	2	2	6	51	2	(-)
7	A	22	7	6	1	5	8	8	6	(-)
8	A	25	4	1	4	1	5	5	4	(+)

9	A	1	935	1	4	2	4	12	1	10	(-)
10	A	1	535	2	2	1	2	6	3	2	(+)
11	A	1	8	3	3	1	1	4	4	3	(-)
12	A	1	241	2	3	1	1	4	4	30	(-)
13	A	1	5	1	4	1	4	12	1	10	(-)
14	A	1	770	1	3	1	1	4	4	3	(-)

Πίνακας 34: Σύνοψη των αποτελεσμάτων της MLST και οι ιδιότητες των 14 STs της συλλογής μας για τα στελέχη MSSA *S. aureus*. Καταγράφεται η συχνότητα εμφάνισης του κάθε ST στη συλλογή, η διασπορά των κλώνων στην Ελλάδα, τα αλληλόμορφα γονίδια καθώς και η ύπαρξη ή μη των παθογόνων γονιδίων *lukS/lukF PV* (*Pantom Valentine Leukocidin*).

➤ **Κλωνική συγγένεια που προσδιορίστηκε με τον αλγόριθμο eBURST:**

ΓΡΑΠΤΗ ΑΝΑΦΟΡΑ eBURST

eBURST Report

Thu Mar 14 20:37:38 EET 2013 MSSA ***S.aureus***

No. isolates = 38 | No. STs = 14 | No. re-samplings for bootstrapping = 1000

No. loci per isolate = 7 | No. identical loci for group def = 6 | No. groups = 3

Group 1: No. Isolates = 8 | No. STs = 3 | **Predicted Founder = 5**

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average	ST Bootstrap	
						Distance	Group	Subgrp
5	1	2	0	0	0	1.0	34%	0%
225	6	1	1	0	0	1.5	0%	0%
935	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 2: No. Isolates = 5 | No. STs = 2 | **Predicted Founder = None**

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
30	4	1	0	0	0	1.0
535	1	1	0	0	0	1.0

Group 3: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | **Predicted Founder = None**

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
8	1	1	0	0	0	1.0
770	1	1	0	0	0	1.0

Singletons: size 7

25

80

22

7

1005*

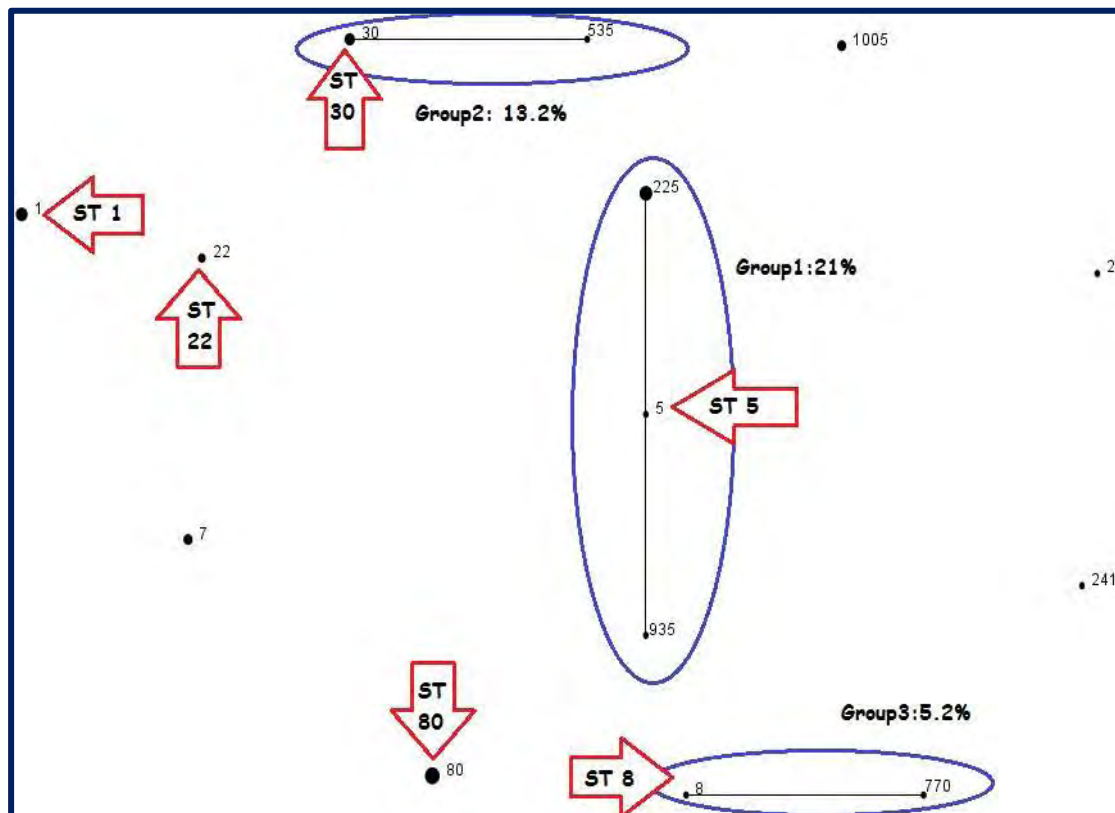
241

1

Πίνακας 35. Συνοδευτική αναφορά της εφαρμογής eBURST για την κατάταξη του μελετώμενου πληθυσμού MSSA *S. aureus* σε κλωνικά συμπλέγματα.

➤ **Προσδιορισμός της κλωνικής συγγένειας MSSA *S.aureus*:**

Οι STs της συλλογής μας ταξινομήθηκαν από τον αλγόριθμο eBURST σε 4 κατηγορίες: α) την 1^η ομάδα με 8 στελέχη, 3 STs και προβλεπόμενο ιδρυτή το ST5, β) την 2^η ομάδα με 5 στελέχη, 2 STs και χωρίς προβλεπόμενο ιδρυτή γ) την 3^η ομάδα με 2 στελέχη, 2 STs και χωρίς προβλεπόμενο ιδρυτή δ) τέλος, εντοπίστηκαν 7 singletons μ' ένα συνολικό αριθμό 23 στελεχών.



Διάγραμμα 6: Διάγραμμα eBURST για τα στελέχη MSSA *S.aureus* του πληθυσμού μας.

➤ **Σύγκριση του πληθυσμού μας με το παγκόσμιο διάγραμμα eBURST για τον *S.aureus*:** το παγκόσμιο διάγραμμα eBURST περιλαμβάνει 2.121 STs και 68 ομάδες κλωνικών συμπλεγμάτων. Η σύγκριση του πληθυσμού μας με τους παγκόσμιους κλώνους επέφερε μια πιο ουσιαστική κατάταξη των κλώνων μας διότι ακόμα και ορισμένοι singletons αποδείχτηκαν ότι είναι είτε ιδρυτές είτε υποϊδρυτές μεγάλων κλωνικών συμπλεγμάτων.

a/a	Group	Primary founder	SLVs	Subgrps	Subgrp founders
1	1(407 STs)	CC5 με ST5	*	3 κύριες	ST239,ST8, ST72
2	2(225 STs)	CC1 με ST1	(-)	5 κύριες	ST25, ST109
3	3(183 STs)	CC30 με ST30	ST535	3 μικρές	(-)
4	4(113 STs)	CC45 με ST45	(-)	(-)	(-)
5	5(85 STs)	CC15 με ST15	(-)	(-)	(-)
6	6(73 STs)	CC121 με ST121	(-)	(-)	(-)
7	7(56 STs)	CC22 με ST22	(-)	(-)	(-)
8	14(20 STs)	CC80 με ST80	(-)	(-)	(-)
9	17(16 STs)	CC7 με ST7	(-)	(-)	(-)
10	20(9 STs)	CC152 με ST152	ST377	(-)	(-)

Πίνακας 36 : Κατάταξη των STs του πληθυσμού μας μετά την σύγκριση με τα παγκόσμια δεδομένα των διαγραμμάτων eBURST. * ST770, ST935, ST241, ST225, ST149, ST585

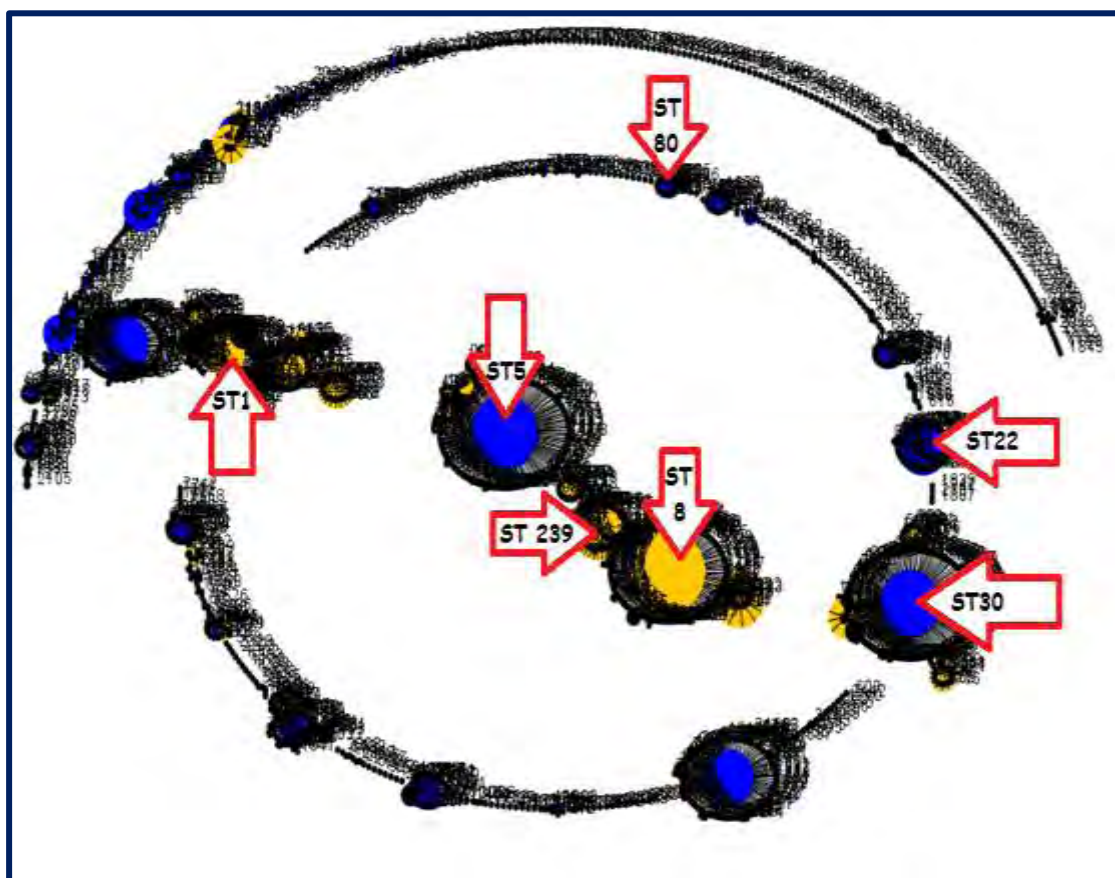
➤ **Κοινά STs και στις δύο κατηγορίες στελεχών (MRSA & MSSA)**

Επτά μεγάλοι παγκόσμιοι επιδημικοί κλώνοι ήταν κοινοί και στα ανθεκτικά και στα ευαίσθητα στελέχη του πληθυσμού μας *S.aureus*.

α/α	MRSA	Περιοχή	ΣΤΕΛΕΧΗ - %	MSSA	Area	ΣΤΕΛΕΧΗ - %
1	80	A, Γ, Δ	32 στ. 25.4	80	A, Γ	8 στ. 6.3
2	225	A, Γ	7 στ. 5.5	225	A	6 στ. 4.8
3	30	A	3 στ. 2.4	30	A, Γ	4 στ. 3.2
4	1-USA400	A	3 στ. 2.4	1-USA400	A	5 στ. 4
5	8-USA300	A	1 στ. 0.8	8-USA300	A	1 στ. 0.8
6	5	Δ	1 στ. 0.8	5	A	1 στ. 0.8
7	22	A	1 στ. 0.8	22	A	2 στ. 1.6

Πίνακας 37: Κλώνοι με ίδιο ST αλλά διαφορετικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. ⁽³⁸¹⁾

➤ **Παγκόσμιο διάγραμμα eBURST για *S.aureus*:**



Διάγραμμα 7: Παγκόσμιο διάγραμμα eBURST για *S.aureus*. Με τα κόκκινα βέλη σημειώνονται οι παγκόσμιοι επιδημικοί κλώνοι που εντοπίστηκαν και στον υπό μελέτη πληθυσμό μας. Οι κυριότεροι παγκόσμιοι επιδημικοί κλώνοι που βρέθηκαν στον πληθυσμό της έρευνας μας είναι: ST1, ST80, ST5, ST8, ST239, ST22 και ST30.

3.4. *Staphylococcus epidermidis*

➤ **Υλικό συλλογής:** Το υλικό της συλλογής μας αποτέλεσαν 35 κλινικά στελέχη *S. epidermidis* με αντοχή στην λινεζολιδη. Από αυτά, τα επτά (7) στελέχη προέρχονται από το Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Σισμανόγλειου Γενικού Νοσοκομείου Αττικής, δέκα (10) στελέχη προέρχονται από το Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού

Νοσοκομείου Λάρισας και τα υπόλοιπα δεκαοκτώ (18) προέρχονται από το Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Πατρών.

Χρονική διάρκεια έρευνας: 1.6-16.9.2009 // 25.2-1.3.2010

➤ **Παραλλαγές της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ανά γενετικό τόπο:** Στα 35 στελέχη της συλλογής *S. epidermidis* εφαρμόστηκε το σχήμα της MLST όπως περιγράφεται από τους **Thomas et al.** το **2007** ⁽²⁶⁴⁾ Το σχήμα βασίζεται στην αλληλούχιση των εσωτερικών θραυσμάτων επτά διατηρημένων γονιδίων (housekeeping genes) των: *arcC*, *aroE*, *gtr*, *mutS*, *pyr*, *tpi* και *gqiL*. Το μήκος των θραυσμάτων των γονιδίων κυμαίνεται από 412 έως 465 bp. Παρατηρήθηκαν μόνο δύο παραλλαγές: μία παραλλαγή στο γονίδιο ***tpi*** μεταξύ των STs 22 και των 2 και 35 και ακόμα μια παραλλαγή στο γονίδιο ***arcC*** μεταξύ των STs 35 και των 22 και 2.

➤ **Μοριακός χαρακτηρισμός των στελεχών *Staphylococcus epidermidis*:** Ο μοριακός χαρακτηρισμός των 35 στελεχών *Staphylococcus epidermidis* προσδιόρισε τρία (3) διαφορετικά STs. Ο **ST22** με 23 στελέχη (65.7%) και αντιπροσώπευση και στα τρία νοσοκομεία με αξιοσημείωτη την επικράτηση του στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών (100%) ενώ στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας με ένα μόνο στέλεχος. Ο **ST2** με δέκα στελέχη και ποσοστό 28.6% επικράτησε στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας με 8/10 στελέχη. Ο **ST35** με 2 στελέχη (5.7%) βρέθηκε μόνο στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας.

Περιοχή	No στελεχών	ST	Allelic Profile							
			<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>gtr</i>	<i>mutS</i>	<i>pyr</i>	<i>tpi</i>	<i>gqiL</i>	
1	A,B,Γ	23	22	7	1	2	2	4	7	1
2	B,Γ	10	2	7	1	2	2	4	1	1
3	Γ	2	35	2	1	2	2	4	1	1

Πίνακας 38: Ιδιότητες των 3 STs της συλλογής μας και σύνοψη των αποτελεσμάτων της MLST. Καταγράφεται η συχνότητα εμφάνισης του κάθε ST στη συλλογή καθώς και τα αλληλόμορφα γονίδια τους.

➤ **Κλωνική συγγένεια που προσδιορίστηκε με τον αλγόριθμο eBURST:**

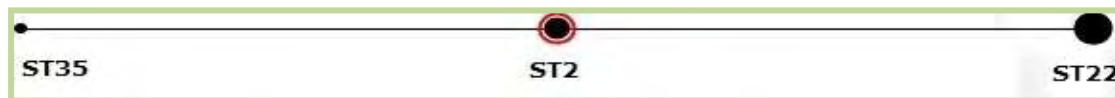
ΓΡΑΠΤΗ ΑΝΑΦΟΡΑ eBURST

eBURST Report									
<i>S. epidermidis</i>									
Mon Feb 11 20:51:56 EET 2013									
No. isolates = 35 No. STs = 3 No. re-samplings for bootstrapping = 1000									
No. loci per isolate = 7 No. identical loci for group def = 6 No. groups = 1									
Group 1: No. Isolates = 35 No. STs = 3 Predicted Founder = 2									
ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp	
2	10	2	0	0	0	1.0	32%	0%	
22	23	1	1	0	0	1.5	0%	0%	
35	2	1	1	0	0	1.5	0%	0%	

Πίνακας 39. Συνοδευτική αναφορά της εφαρμογής eBURST για *S. epidermidis* για την ταξινόμηση του υπό μελέτη πληθυσμού σε κλωνικά συμπλέγματα. Στον πίνακα περιέχονται η συχνότητα εμφάνισης των κλώνων (FREQ), οι SLVs, οι DLVs και οι TLVs του κάθε κλώνου καθώς και τα αποτελέσματα της στατιστικής διαδικασίας Bootstrap.

➤ **Προσδιορισμός της κλωνικής συγγένειας:**

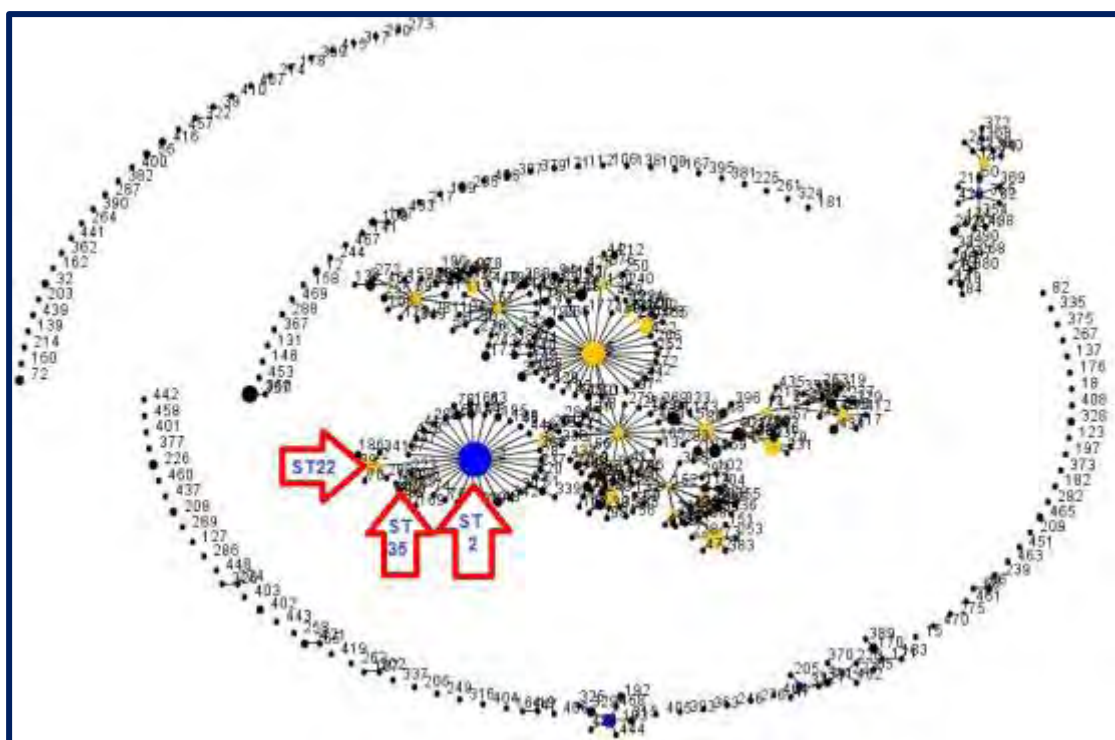
Όλα τα στελέχη του πληθυσμού μας – τριάντα πέντε – είναι μέλη του ίδιου κλωνικού συμπλέγματος (**CC2**) με προβλεπόμενο ιδρυτή το **ST2**.



Διάγραμμα 8: Διάγραμμα eBURST για *S. epidermidis* του υπό μελέτη πληθυσμού μας.

➤ **Σύγκριση του πληθυσμού μας με το παγκόσμιο διάγραμμα eBURST:**

Σύγκριση των κλώνων της μελέτης (3 STs) με το σύνολο των κλώνων του *S. epidermidis* που περιλαμβάνει μέχρι στιγμής 448 STs και 13 ομάδες. Το κλωνικό σύμπλεγμα **CC2** κυριαρχεί παγκοσμίως στο νοσοκομειακό περιβάλλον.



Διάγραμμα 9: Παγκόσμιο διάγραμμα eBURST για *S. epidermidis*. Με κόκκινα βέλη εντοπίζονται οι παγκόσμιοι επιδημικοί κλώνοι του πληθυσμού μας.

3.5. *Streptococcus pyogenes*

➤ **Υλικό συλλογής:** περιλαμβάνει 80 κλινικά στελέχη *Streptococcus pyogenes*, τα οποία συλλέχθηκαν κατά το χρονικό διάστημα 2007-2010 από κλινικά δείγματα όπως αμυγδαλές, πύον κλπ από την περιοχή της Θεσσαλίας.

Χρονική διάρκεια έρευνας: 7.10-17.12.2009 // 1.2-13.5.2010

➤ **Παραλλαγές της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ανά γενετικό τόπο:** στα 80 στελέχη της συλλογής *Streptococcus pyogenes* της παρούσας διατριβής εφαρμόστηκε το σχήμα της MLST όπως περιγράφηκε από τους **Mark Enright et al** το **2001** (²⁶⁷) που βασι-

ζεται στην ανάλυση αλληλουχίας και των δύο κλώνων επτά εσωτερικών θραυσμάτων διατηρημένων γονιδίων (housekeeping genes) των: *gki*, *gtr*, *murl*, *mutS*, *recP*, *xpt*, *ygil*. Το μήκος των θραυσμάτων των γονιδίων κυμαίνεται από 405 έως 498 bp. Ο αριθμός των αλληλόμορφων ανά γονίδιο κυμάνθηκε από 7 αλληλόμορφα (*murl*, *mutS*, *xpt*, *ygil*) έως 11 αλληλόμορφα (*gki*) με μέσο όρο Md=8.28 αλληλόμορφα γονίδια ανά γενετικό τόπο που δείχνει υψηλό βαθμό διαφοροποίησης των αλληλόμορφων γονιδίων.

MLST locus	Sequence length (bp)	No. of alleles
<i>gki</i>	498	11
<i>gtr</i>	450	10
<i>murl</i>	438	7
<i>mutS</i>	405	7
<i>recP</i>	459	9
<i>xpt</i>	450	7
<i>ygil</i>	434	7

Πίνακας 40. Παραλλαγές της αλληλουχίας των επτά γενετικών τόπων

➤ **Μοριακός χαρακτηρισμός των στελεχών *Streptococcus pyogenes*:** Ο μοριακός χαρακτηρισμός των 80 στελεχών *S. pyogenes* προσδιόρισε 19 STs. Δέκα STs (10) αντιπροσωπεύονται από ένα στέλεχος ενώ τέσσερα (4) αντιπροσωπεύονται από 2 έως 3 στελέχη. Οι STs με την μεγαλύτερη αντιπροσώπηση είναι ο **ST36** με 21 στελέχη (26.2%), ο **ST28** με 18 στελέχη (23.7%), ο **ST101** με 8 στελέχη (10%), ο **ST39** με 7 στελέχη (8.7%) και ο **ST38** με 5 στελέχη (6.2%).

α/α	No. στελεχών	ST	Allelic Profile							Αντοχή ερυθρομυκίνη
			<i>gki</i>	<i>gtr</i>	<i>murl</i>	<i>mutS</i>	<i>recP</i>	<i>xpt</i>	<i>ygil</i>	
1	21	36	5	2	2	6	6	2	2	R
2	18	28	4	3	4	4	4	2	4	R
3	8	101	16	2	8	3	1	13	3	S
4	7	39	5	11	8	5	15	2	1	R
5	5	38	5	7	8	5	15	2	1	S
6	3	15	2	6	8	5	2	3	2	S
7	2	382	5	52	5	5	5	4	3	S
8	1	20	3	4	6	5	1	5	1	R
9	1	46	9	8	1	1	1	3	4	R
10	1	49	11	2	1	3	12	3	7	R
11	1	55	11	9	1	9	2	3	4	S
12	1	89	24	2	3	5	1	3	1	R
13	1	99	33	30	7	5	5	26	3	S
14	1	150	11	2	1	3	50	8	7	S
15	1	167	29	32	2	5	48	5	21	S
16	1	253	16	2	11	3	1	13	1	S
17	1	550	13	6	2	3	1	3	11	R
18	1	551	5	3	2	6	6	2	2	S
19	1	1001*	13	6	2	3	6	3	11	R
20	1	1002*	4	3	4	4	1	2	4	R
21	1	1003*	13	6	2	3	15	2	11	R
22	1	1004*	29	32	2	5	4	5	21	S
23	1	1005*	13	6	2	3	23	3	3	R

Πίνακας 41. Σύνοψη των αποτελεσμάτων της MLST και οι ιδιότητες των 23 STs της συλλογής μας. Καταγράφεται η συχνότητα εμφάνισης του κάθε ST στη συλλογή, τα αλληλόμορφα γονίδια τους και η αντοχή που παρουσίασαν στο αντιβιοτικό ερυθρομυκίνη.

➤ **Νέοι κλώνοι:** η έρευνα απέδωσε πέντε (5) νέους κλώνους τους ST1001*, ST1002*, ST1003*, ST1004*, ST1005*.

➤ **Κλωνική συγγένεια που προσδιορίστηκε με τον αλγόριθμο eBURST:**

ΓΡΑΠΤΗ ΑΝΑΦΟΡΑ eBURST

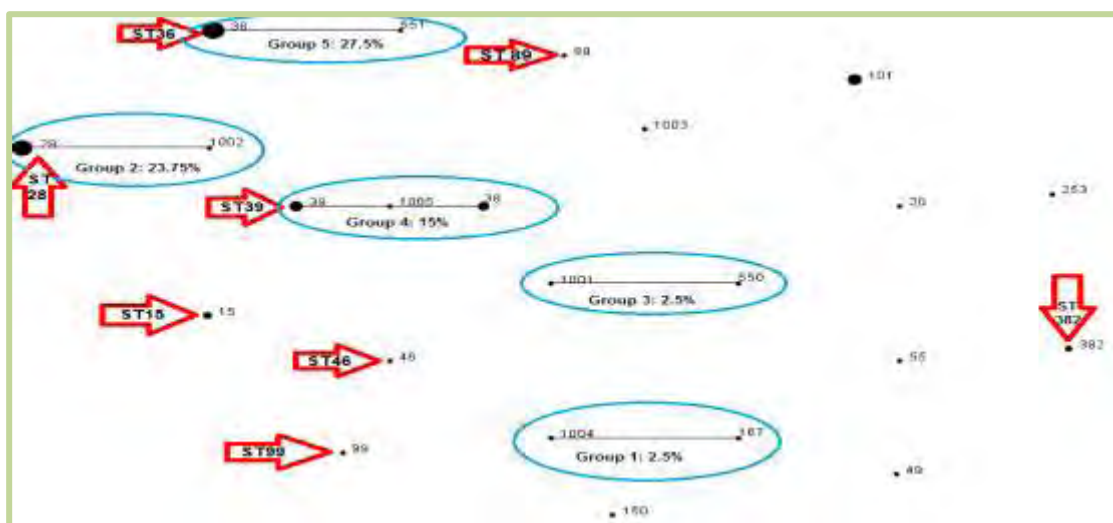
Wed Feb 13 19:03:05 EEST 2013		eBURST Report					<i>S. pyogenes</i>
No. isolates = 80 No. STs = 23 No. re-samplings for bootstrapping = 1000							
No. loci per isolate = 7 No. identical loci for group def = 6 No. groups = 3							
Group 1: No. Isolates = 2 No. STs = 2 Predicted Founder = None							
ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance	
1004*	1	1	0	0	0	1.0	
167	1	1	0	0	0	1.0	
Group 2: No. Isolates = 19 No. STs = 2 Predicted Founder = None							
ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance	
28	18	1	0	0	0	1.0	
1002*	1	1	0	0	0	1.0	
Group 3: No. Isolates = 2 No. STs = 2 Predicted Founder = None							
ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance	
1001*	1	1	0	0	0	1.0	
550	1	1	0	0	0	1.0	
Group 4: No. Isolates = 12 No. STs = 2 Predicted Founder = None							
ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance	
39	7	1	0	0	0	1.0	
38	5	1	0	0	0	1.0	
Group 5: No. Isolates = 22 No. STs = 2 Predicted Founder = None							
ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance	
36	21	1	0	0	0	1.0	
551	1	1	0	0	0	1.0	
Singletons: size 13							
1005*	1						
1003*	1						
150	1						
99	1						
382	2						
101	8						
49	1						
15	3						
46	1						
253	1						
89	1						
55	1						
20	1						

Πίνακας 42. Συνοδευτική αναφορά της εφαρμογής eBURST για *S. pyogenes*.

➤ **Προσδιορισμός κλωνικής συγγένειας:**

Οι 80 STs της συλλογής μας ταξινομήθηκαν από τον αλγόριθμο eBURST σε έξη κατηγορίες: α) την 1^η ομάδα με 2 στελέχη, 2 STs και χωρίς προβλεπόμενο ιδρυτή, β) την 2^η ομάδα με 19 στελέχη, 2 STs και χωρίς προβλεπόμενο ιδρυτή, γ) την 3^η ομάδα με 2 στελέχη, 2

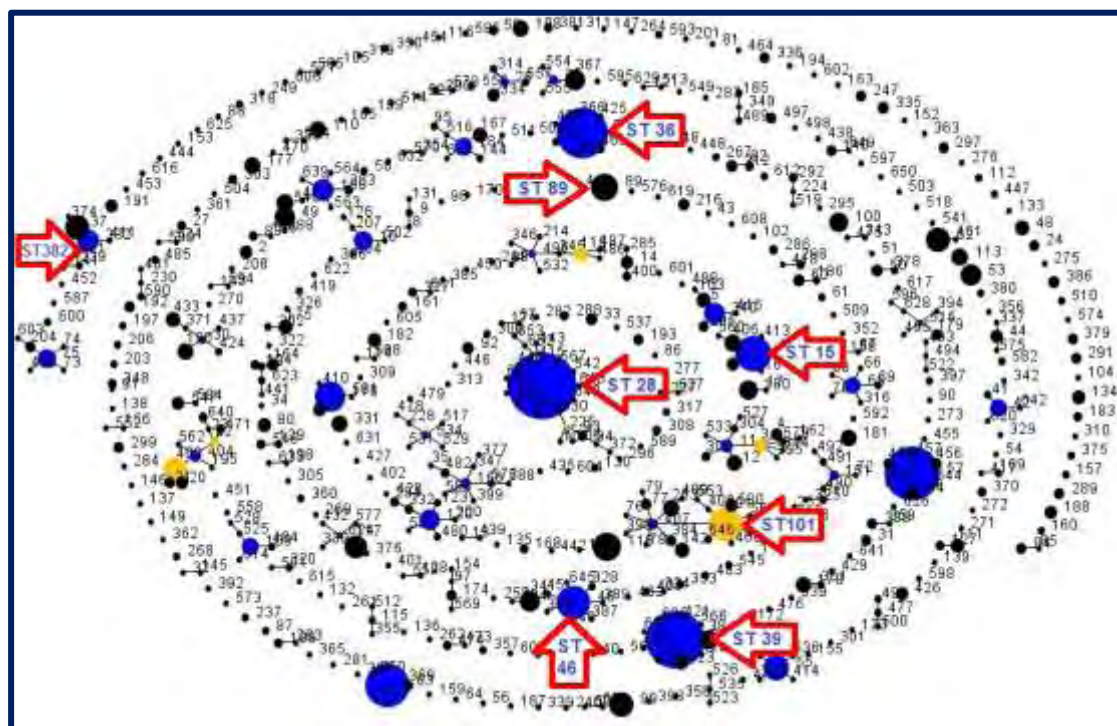
STs και χωρίς προβλεπόμενο ιδρυτή, δ) την 4^η ομάδα με 12 στελέχη, 2 STs και χωρίς προβλεπόμενο ιδρυτή, ε) την 5^η ομάδα με 22 στελέχη, 2 STs και χωρίς προβλεπόμενο ιδρυτή, στ) τέλος, εντοπίστηκαν 13 singletons μ' ένα συνολικό αριθμό 23 στελεχών.



Διάγραμμα 10: Διάγραμμα eBURST για *S. pyogenes*. Με γαλάζιους κύκλους εντοπίζονται οι ομάδες των κλωνικών συμπλεγμάτων του πληθυσμού μας ενώ με κόκκινα βέλη σημειώνονται οι παγκόσμιοι επιδημικοί κλώνοι *S. pyogenes* που εντοπίστηκαν στον πληθυσμό μας.

➤ **Σύγκριση του πληθυσμού μας με το παγκόσμιο διάγραμμα eBURST:**

Η σύγκριση των κλώνων της έρευνας μας απέδωσε 23 STs στο παγκόσμιο σύνολο των κλώνων *S. pyogenes* που περιλαμβάνει 587 STs και 88 κλωνικά συμπλέγματα.



Διάγραμμα 11: Παγκόσμιο διάγραμμα eBURST για *S. pyogenes*. Με κόκκινα βέλη εντοπίζονται οι παγκόσμιοι επιδημικοί κλώνοι του πληθυσμού μας.

3.6. *Streptococcus agalactiae*

➤ **Υλικό συλλογής:** Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 118 κλινικά στελέχη *S. agalactiae*, εκ των οποίων τα 101 απομονώθηκαν από κολπικά επιχρίσματα υγιών εγκύων γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας οι οποίες προσήλθαν στα μικροβιολογικά εργαστήρια των νοσοκομείων μετά από παραπομπή του γυναικολόγου τους. Στην έρευνα μας εξετάστηκαν εξήντα τρία (63) στελέχη από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, δεκαεννέα (19) στελέχη από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αλεξανδρούπολης και δεκαεννέα (19) στελέχη από το Αττικό Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο. Επίσης εξετάστηκαν δεκαεπτά (17) κλινικά στελέχη νεογνών από το Νοσοκομείο Παίδων «Αγλαΐα Κυριακού». Η έρευνα πραγματοποιήθηκε στο χρονικό διάστημα: 14.5-24.9.2010

➤ **Παραλλαγές της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ανά γενετικό τόπο:** Στα 118 στελέχη της συλλογής *S. agalactiae* εφαρμόστηκε το σχήμα της MLST όπως περιγράφεται από τους **Nicola Jones et al.** το **2003** ⁽²⁷⁰⁾ και βασίζεται στην ανάλυση αλληλουχίας των δύο κλώνων DNA, επτά εσωτερικών θραυσμάτων διατηρημένων γονιδίων (housekeeping genes), των *adhP*, *pheS*, *atr*, *gln*, *sdh*, *glc*, *tkt*. Για την ενίσχυση των γονιδίων χρησιμοποιήθηκε μια παραλλαγή της PCR, η Διπλή ή Εμφωλεάζουσα PCR (Nested PCR) όπως αναλυτικά περιγράφηκε στο Ειδικό Μέρος της παρούσας Διατριβής. Το μήκος των θραυσμάτων των εσωτερικών γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση αλληλουχίας του β' προϊόντος PCR, κυμαίνεται από 459 έως 519 bp. Ο αριθμός των αλληλόμορφων ανά γονίδιο κυμάνθηκε από 7 αλληλόμορφα (*adhP*) έως 3 αλληλόμορφα (*tkt*) με μέσο όρο Md=4.3 αλληλόμορφα γονίδια ανά γενετικό τόπο.

MLST locus	Sequence length (bp) β' προϊόντος PCR	No. of alleles
<i>adhP</i>	498	7
<i>pheS</i>	501	4
<i>atr</i>	501	6
<i>glnA</i>	498	5
<i>sdhA</i>	519	4
<i>glcK</i>	459	5
<i>tkt</i>	480	3

Πίνακας 43. Παραλλαγές της αλληλουχίας των επτά γενετικών τόπων του *S. pyogenes*.

➤ **Μοριακός χαρακτηρισμός των στελεχών *S. agalactiae*:** Ο μοριακός χαρακτηρισμός των 118 στελεχών *S. agalactiae* προσδιόρισε 22 STs. Από αυτά, δώδεκα STs (12) αντιπροσωπεύονται από ένα στέλεχος, ενώ τρία STs (3) αντιπροσωπεύονται από 2 στελέχη. Οι STs με την μεγαλύτερη αντιπροσώπευση στο σύνολο των δεδομένων είναι ο **ST1** με 25 στελέχη (21.2%), ο **ST23** με 22 στελέχη (18.6%), ο **ST17** και ο **ST19** από 14 στελέχη (11.8%) αντίστοιχα, οι **ST8** και **ST12** με 10 στελέχη (8.5%) αντίστοιχα και ο **ST28** με 4 στελέχη και ποσοστό (3.4%).

α/α	Περιοχή	No isolates	ST	Allelic Profile						
				<i>adhP</i>	<i>pheS</i>	<i>atr</i>	<i>gln</i>	<i>sdh</i>	<i>glc</i>	<i>tkt</i>
1	B,Γ,Δ	25	1	1	1	2	1	1	2	2
2	B,Γ,Δ,N	22	23	5	4	6	3	2	1	3

3	Β,Γ,Ν	14	17	2	1	1	2	1	1	1
4	Β,Γ,Δ,Ν	14	19	1	1	3	2	2	2	2
5	Β,Γ,Δ,Ν	10	8	4	1	4	1	3	3	2
6	Β,Γ,Δ,Ν	10	12	10	1	4	1	3	3	2
7	Γ,Δ	4	28	1	1	3	5	2	2	2
8	Δ	2	197	1	1	3	1	2	2	2
9	Γ	2	24	5	4	4	3	2	3	3
10	Β	2	498	5	35	4	3	2	3	3
11	Δ	1	464	5	4	4	3	2	3	1
12	Δ	1	2	1	1	3	1	1	2	2
13	Β	1	335	1	1	43	2	2	2	2
14	Γ	1	10	9	1	4	1	3	3	2
15	Δ	1	219	42	1	3	2	2	2	2
16	Ν	1	146	2	1	1	1	1	1	1
17	Γ	1	196	1	1	3	1	1	12	2
18	Γ	1	220	1	4	6	3	2	1	3
19	Δ	1	106	1	1	3	4	2	5	2
20	Γ	1	314	16	1	2	2	9	2	2
21	Γ	1	7	10	1	2	1	3	2	2
22	Β	1	22	13	3	1	3	1	1	1

Πίνακας 44. Σύνοψη των αποτελεσμάτων της MLST και οι ιδιότητες των 22 STs της συλλογής *S. agalactiae*. Καταγράφεται η συχνότητα εμφάνισης του κάθε ST στη συλλογή καθώς και τα αλληλόμορφα γονίδια τους.

➤ **Κλωνική συγγένεια που προσδιορίστηκε με τον αλγόριθμο eBURST:**

ΓΡΑΠΤΗ ΑΝΑΦΟΡΑ eBURST

eBURST Report

S. agalactiae

Sat Mar 31 20:26:12 EEST 2012

ΕΓΚΥΕΣ ΓΥΝΑΙΚΕΣ

No. isolates = 101 | No. STs = 21 | No. re-samplings for bootstrapping = 1000

No. loci per isolate = 7 | No. identical loci for group def = 6 | No. groups = 4

Group 1: No. Isolates = 46 | No. STs = 8 | **Predicted Founder = 19**

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average	ST Bootstrap	
						Distance	Group	Subgrp
19	11	4	1	2	0	1.71	57%	48%
197	2	3	4	0	0	1.57	34%	18%
2	1	3	2	2	0	1.85	34%	17%
28	4	2	3	2	0	2.0	0%	0%
335	1	1	3	2	1	2.42	0%	0%
219	1	1	3	1	2	2.57	0%	0%
1	25	1	2	3	1	2.57	0%	0%
196	1	1	2	2	2	2.71	0%	0%

Group 2: No. Isolates = 5 | No. STs = 3 | **Predicted Founder = 24**

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average	ST Bootstrap	
						Distance	Group	Subgrp
24	2	2	0	0	0	1.0	30%	0%
498	2	1	1	0	0	1.5	0%	0%
464	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 3: No. Isolates = 19 | No. STs = 3 | **Predicted Founder = Multiple Candidates**

						Average	ST Bootstrap	

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance	Group	Subgrp
12	9	2	0	0	0	1.0	8%	0%
8	9	2	0	0	0	1.0	7%	0%
10	1	2	0	0	0	1.0	15%	0%

Group 4: No. Isolates = 22 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
23	21	1	0	0	0	1.0
220	1	1	0	0	0	1.0

Singletons: size 5

ST FREQ ST106(1), ST17(4), ST314(1), ST7(1), ST22(1)

ΠΙΝΑΚΑΣ 45. Συνοδευτική αναφορά της εφαρμογής eBURST για *S. agalactiae* που αφορά τα κλινικά στελέχη των εγκύων γυναικών.

➤ **Κλωνική συγγένεια που προσδιορίστηκε με τον αλγόριθμο eBURST:**

ΓΡΑΠΤΗ ΑΝΑΦΟΡΑ eBURST

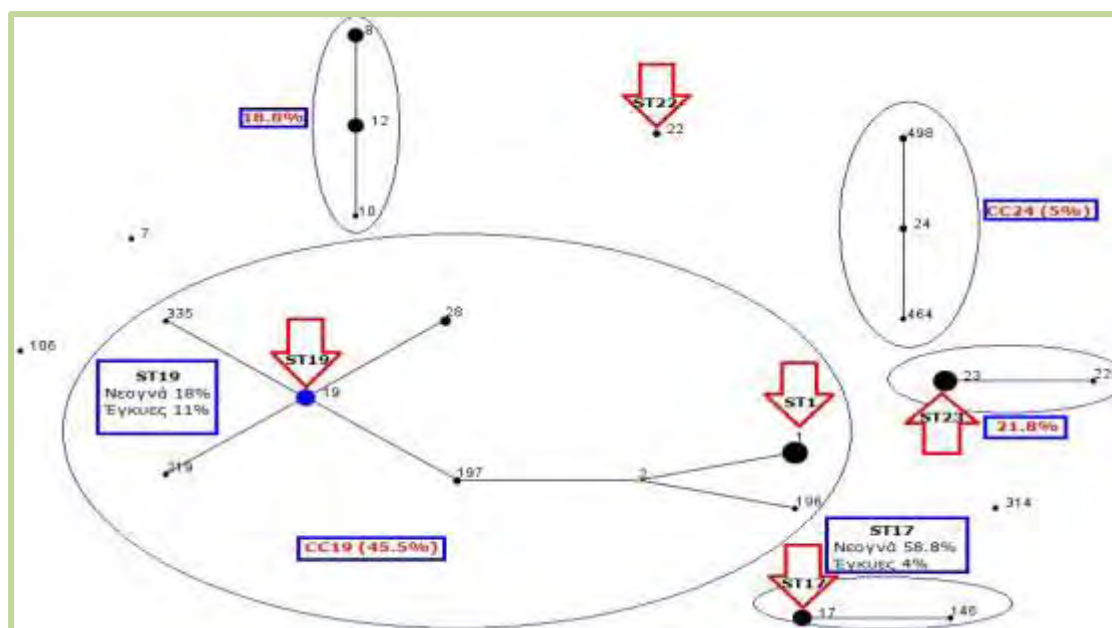
eBURST Report							
<i>S. agalactiae</i>							
NEOΓΝΑ							
Sun Apr 01 11:12:56 EEST 2012							
No. isolates = 17 No. STs = 6 No. re-samplings for bootstrapping = 1000							
No. loci per isolate = 7 No. identical loci for group def = 6 No. groups = 2							
Group 1: No. Isolates = 2 No. STs = 2 Predicted Founder = None							
ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance	
12	1	1	0	0	0	1.0	
8	1	1	0	0	0	1.0	
Group 2: No. Isolates = 11 No. STs = 2 Predicted Founder = None							
ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance	
17	10	1	0	0	0	1.0	
146	1	1	0	0	0	1.0	
Singletons: size 2							
23	1						
19	3						

Πίνακας 46. Συνοδευτική αναφορά της εφαρμογής eBURST για *S. agalactiae* που αφορά τα κλινικά στελέχη των νεογνών.

➤ **Προσδιορισμός κλωνικής συγγένειας:**

Έγκυες γυναίκες: οι είκοσι δύο (22) STs της συλλογής μας ταξινομήθηκαν από τον αλγόριθμο eBURST σε πέντε κατηγορίες: α) την 1^η ομάδα με 46 στελέχη, 8 STs και με προβλεπόμενο ιδρυτή το ST19, β) την 2^η ομάδα με 5 στελέχη, 3 STs και με προβλεπόμενο ιδρυτή το ST24, γ) την 3^η ομάδα με 19 στελέχη, 3 STs και με πολλαπλούς πιθανούς ιδρυτές, δ) την 4^η ομάδα με 22 στελέχη, 2 STs και χωρίς προβλεπόμενο ιδρυτή, ε) τέλος, εντοπίστηκαν 5 singletons μ' ένα συνολικό αριθμό 8 στελεχών.

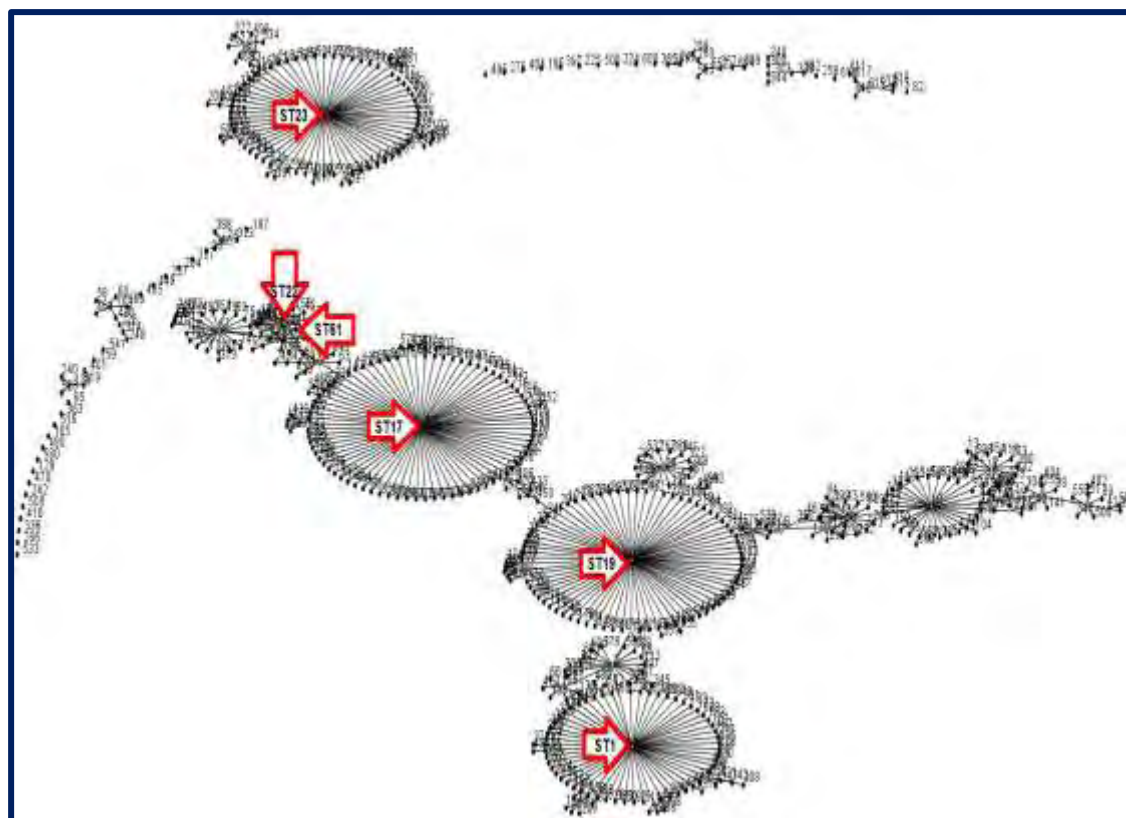
Νεογνά: τα στελέχη ταξινομήθηκαν σε 2 ομάδες χωρίς προβλεπόμενους ιδρυτές και 2 singletons.



Διάγραμμα 12: Διάγραμμα eBURST για *S. agalactiae*. Οι ευρεθείσες από την έρευνα μας ομάδες περικλείονται σε μπλέ κύκλους και οι προβλεπόμενοι ιδρυτές των ομάδων αναφέρονται με τα ποσοστά τους τόσο στα στελέχη των εγκύων γυναικών όσο και στα στελέχη των νεογνών. Με κόκκινα βέλη σημειώνονται οι παγκόσμιοι επιδημικοί κλώνοι του πληθυσμού μας: ST1, ST17, ST19, ST22, ST23.

➤ **Σύγκριση του πληθυσμού μας με το παγκόσμιο διάγραμμα eBURST:**

Η σύγκριση των κλώνων της έρευνας μας απέδωσε 22 STs στο σύνολο των κλώνων *S. agalactiae* που περιλαμβάνει 622 STs και 11 κλωνικά συμπλέγματα.



Διάγραμμα 13: Παγκόσμιο διάγραμμα eBURST για *S. agalactiae*. Με κόκκινα βέλη εντοπίζονται οι παγκόσμιοι επιδημικοί κλώνοι του πληθυσμού μας που είναι οι: ST23, ST17, ST19, ST1 και ST22.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο χαρακτηρισμός των παθογόνων στελεχών των βακτηρίων διαδραματίζει έναν κεντρικό ρόλο στην επιδημιολογία των μολυσματικών ασθενειών, δημιουργώντας τις απαραίτητες πληροφορίες για τον εντοπισμό, την παρακολούθηση και την επέμβαση κατά την διάρκεια των επιδημικών εξάρσεων. Η μέθοδος του Πολυτοπικού Προσδιορισμού Αλληλουχίας - MLST- σαν μία αδιαμφισβήτητη τυποποιητική προσέγγιση που βασίζεται σε μοριακή βάση μέσω της ανάλυσης αλληλουχίας νουκλεοτιδίων, εφαρμόζεται σε πολλά βακτηριακά παθογόνα. Η μέθοδος, συνδυάζοντας τις εξελίξεις στις τεχνολογίες αλληλούχισης και βιοπληροφορικής με τις καθιερωμένες τεχνικές της μελέτης των παθογόνων βακτηριακών πληθυσμών, μας παρέχει ένα συγκρίσιμο, αναπαραγώγιμο και επεκτάσιμο σύστημα τυποποίησης που αντανακλά τον βακτηριακό πληθυσμό και την εξελικτική βιολογία των παθογόνων στελεχών. Τα σχήματα της MLST που έχουν αναπτυχθεί για μια μεγάλη ποικιλία προκαρυωτικών αλλά και ευκαρυωτικών παθογόνων και τα δεδομένα που παράγονται από αυτά, συμβάλλουν τόσο στην επιδημιολογική νοσοκομειακή επιτήρηση όσο και στις θεμελιώδεις μελέτες της βιολογίας των παθογόνων μικροοργανισμών.

Οι πληθυσμοί των βακτηρίων συνήθως αποτελούνται από μια μεγάλη και ετερογενή ομάδα βακτηριακών στελεχών τα οποία σπανίως προκαλούν ασθένειες και μόνο ένας μικρός αριθμός ομάδων στενά συνδεδεμένων, συγγενών στελεχών (κλώνων ή γενετικά συγγενών στελεχών) συνδέονται ιδιαίτερα με την εμφάνιση μιας νόσου. Οι ομάδες αυτές χαρακτηρίζονται με τον όρο «υπέρ-λοιμογόνοι» κλώνοι και μ' αυτόν τον όρο περιγράφονται τα στελέχη που παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα στην πρόκληση νόσου. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εξεταζόμενων διατηρημένων γονιδίων (housekeeping), διαθέτοντας τα κατάλληλα επίπεδα νουκλεοτιδικής διαφοροποίησης, δίνουν τη δυνατότητα στην MLST να προσδιορίζει με ακρίβεια τα στελέχη που ανήκουν στους «υπέρ-λοιμογόνους» κλώνους ή σε μια «υπέρ-λοιμογόνο γενεά», να τους ξεχωρίζει από τους υπόλοιπους μη λοιμογόνους κλώνους καθώς και από τον γενικό πληθυσμό. Κατά συνέπεια όλα τα βακτηριακά στελέχη που εμπλέκονται σε μια λοιμογόνο γενεά μιας χρονικής περιόδου έχουν πανομοιότυπα αλληλόμορφα γονίδια. Οι εξαιρέσεις δημιουργούνται μετέπειτα όταν έστω και ένα διατηρημένο γονίδιο -από ανασυνδυασμό ή από σημειακή μετάλλαξη- μεταβάλλει την αλληλουχία του. Τότε, έχουμε την εμφάνιση ενός νέου υπέρ-λοιμογόνου κλώνου με διαφορετικό αλληλόμορφο προφίλ και τύπο αλληλουχίας (ST) .

Μια οποιαδήποτε μέθοδος τυποποίησης, που είναι η διεργασία ταξινόμησης στελεχών βακτηρίων σε «τύπους», θα πρέπει να μιμείται κατά το δυνατόν, το φυσικό διαχωρισμό των μικροοργανισμών και επίσης θα πρέπει να παρέχει με σαφήνεια αρκετές πληροφορίες έτσι ώστε να διακρίνεται ο ένας τύπος από τον άλλο, χωρίς ωστόσο η μέθοδος να είναι τόσο διακριτική ώστε κάθε στέλεχος βακτηρίου να θεωρείται μοναδικό. Ένα κατάλληλο πλαίσιο διάκρισης θα πρέπει να μπορεί έτσι να διαχωρίσει με σαφήνεια καθορισμένες και διακριτές ομάδες στενά συνδεδεμένων στελεχών -κλωνικών συμπλεγμάτων- στον πληθυσμό των βακτηρίων. Τι αντιπροσωπεύουν όμως τα κλωνικά συμπλέγματα; Από την άποψη της πληθυσμιακής γενετικής, το ερώτημα αφορά κυρίως τις δυνάμεις που καθοδηγούν την εμφάνιση των κλωνικών συμπλεγμάτων και τη συντήρησή τους μέσα στον βακτηριακό πληθυσμό. Ειδικότερα να διευκρινίζονται οι ρόλοι της επιλογής και της οριζόντιας μεταφοράς των γονιδίων στην διαμόρφωση των κλωνικών συμπλεγμάτων. Μήπως τα συμπλέγματα αναπαρι-

στούν προσαρμογή σε μια συγκεκριμένη οικοθέση; Πως ο γενετικός ανασυνδυασμός συμβάλει στην εσωτερική συνοχή του συμπλέγματος και τη διαφοροποίηση του μεταξύ των άλλων συμπλεγμάτων; Για έναν επιδημιολόγο ή για έναν μικροβιολόγο, το ερώτημα είναι περισσότερο ρεαλιστικό, δηλαδή κατά πόσον τα κλωνικά συμπλέγματα ανταποκρίνονται σε χαρακτηριστικές ιδιότητες που έχουν σχέση με:

- ✓ Την επιτήρηση της νόσου (αυξανόμενη παθογένεια),
- ✓ Την εξωτερική παρέμβαση (αντιμικροβιακή αντοχή),
- ✓ Την εμφάνιση τους (από αποικισμό ή από γεωγραφική πηγή)

Στην πραγματικότητα, όλες αυτές οι απόψεις είναι συνδεδεμένες και μία θεώρηση των εξελικτικών δυνάμεων δίνει υπόσταση στα MLST-κλωνικά συμπλέγματα και μπορεί να βοηθήσει στην πρόβλεψη ή στην ερμηνεία της έκτασής τους με συγκεκριμένα κλινικά και επιδημιολογικά χαρακτηριστικά.

Η μέθοδος της MLST έχει λοιπόν τη δυνατότητα να εντοπίζει τους υφιστάμενους αλλά και τους νεοεμφανιζόμενους υπέρ-λοιμογόνους κλώνους, να τους ομαδοποιεί σε κλωνικά συμπλέγματα με εν δυνάμει κοινά χαρακτηριστικά και να παρακολουθεί την τοπική (νοσοκομείο, περιοχή, χώρα) αλλά και την παγκόσμια εξάπλωση τους.

4.1. *Enterococcus faecium*

Οι εντερόκοκκοι είναι κοινοί συμβιωτικοί μικροοργανισμοί του γαστρεντερικού συστήματος ανθρώπων και ζώων. Τις τελευταίες όμως δύο δεκαετίες έχουν αναδειχθεί σε σπουδαία νοσοκομειακά παθογόνα. Αν και είχαν αναγνωριστεί από παλαιότερα σαν παθογόνα ικανά να προκαλέσουν ενδοκαρδίτιδα, γενικά θεωρούνταν δεύτερης τάξης παθογόνα. Πρόσφατες όμως εκτιμήσεις αποδεικνύουν ότι οι εντερόκοκκοι διαδραματίζουν ηγετικό ρόλο στις νοσοκομειακές λοιμώξεις. ⁽²⁸⁰⁾ Ο αριθμός των εντεροκοκκικών νοσοκομειακών λοιμώξεων που προκαλούνται από τον *E. faecium* αυξάνεται συνεχώς από την δεκαετία του 1990, σύμφωνα με αναφορές από όλο τον κόσμο. ^(281, 282)

Χρησιμοποιώντας στην μελέτη μας την μέθοδο MLST για τον μοριακό χαρακτηρισμό των στελεχών και τον αλγόριθμο eBURST για την μελέτη της κλωνικής τους συγγένειας, προσδιορίσαμε ότι η συντριπτική πλειοψηφία (97.3%) των κλώνων του μελετώμενου βακτηριακού πληθυσμού του *E. faecium* ανήκει στο κλωνικό σύμπλεγμα CC17. ⁽²⁸³⁾ Αυτό το αποτέλεσμα συμφωνεί απόλυτα με τα παγκόσμια επιδημιολογικά δεδομένα για τον *E. faecium*, που ορίζουν ότι η πλειοψηφία των σύγχρονων στελεχών που ανακτώνται από το νοσοκομειακό περιβάλλον και είναι υπεύθυνα για νοσοκομειακές επιδημικές εξάρσεις, ομαδοποιούνται σε μια λοιμογόνο βακτηριακή γενεά του *E. faecium* που ορίζεται ως κλωνικό σύμπλεγμα CC17, περιλαμβάνει διαφορετικούς τύπους STs που συνδέονται άμεσα γενετικά μεταξύ τους και αποτελούν εξέλιξη του αρχικού ιδρυτή του κλωνικού συμπλέγματος, του ST17. ^(284, 285) Τα στελέχη του συμπλέγματος CC17 είναι γενετικά διαφορετικά από τα αυτόχθονα στελέχη *E. faecium* που ανήκουν στην φυσιολογική χλωρίδα του εντέρου. ^(286, 287) Οι μηχανισμοί με τους οποίους το προαναφερθέν κλωνικό σύμπλεγμα κυριάρχησε οικολογικά στο νοσοκομειακό περιβάλλον δεν είναι πλήρως κατανοητοί και ερευνώνται διεξοδικά κατά την τελευταία δεκαετία. Μελέτες υποδεικνύουν ότι η αρχική απόκτηση μηχανι-

σμών αντοχής σε αντιβιοτικά όπως η πενικιλίνη και οι κινολόνες καθώς και επιφανειακές πρωτεΐνες, μπορεί να έχουν συμβάλει στην οικολογική επιτυχία του κλωνικού συμπλέγματος CC17 στο νοσοκομειακό περιβάλλον. Οι έρευνες έχουν δείξει ότι το κλωνικό σύμπλεγμα CC17 φέρει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά τα οποία συμβάλουν στην αύξηση των ικανοτήτων του στην διάδοση ή την λοίμωξη των νοσηλευόμενων ασθενών. ⁽²⁸⁸⁾

Τα παθογόνα χαρακτηριστικά τα οποία συνδέονται με το κλωνικό σύμπλεγμα CC17 είναι:

➤ Χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την δημιουργία βιομεμβράνης: Η επιφανειακή πρωτεΐνη **esp** (*enterococcal surface protein*) την οποία φέρουν η πλειονότητα (176/186 ή 94.6%) των στελεχών του εξεταζόμενου πληθυσμού μας, είναι ο πρώτος τεκμηριωμένος παράγοντας του κλωνικού συμπλέγματος CC17 που εμπλέκεται στον σχηματισμό βιομεμβράνης. Η βιομεμβράνη είναι ένας κυτταρικός πληθυσμός, άρρηκτα συνδεδεμένος με βιοτικές και αβιοτικές επιφάνειες, που περιβάλλεται από μια ενυδατωμένη μήτρα εξωπολυμερικών ουσιών, πρωτεϊνών, πολυσακχαριτών και νουκλεϊκών οξέων. ⁽²⁸⁹⁾ Ο σχηματισμός της βιομεμβράνης είναι μια σύνθετη αναπτυξιακή διαδικασία που περιλαμβάνει την προσάρτηση και ακινητοποίηση του μικροοργανισμού πάνω σε μια επιφάνεια, με αλληλεπίδραση κυττάρου προς κύτταρο, σχηματισμό μικροαποικιών με αλληπάλληλες στιβάδες που τελικά αναπτύσσονται σε μια τρισδιάστατη δομή. ⁽²⁹⁰⁾ Τα βακτήρια που αποτελούν την βιομεμβράνη συμπεριφέρονται διαφορετικά από τα ελεύθερα ομόλογα τους. Η ρύθμιση της γονιδιακής τους έκφρασης, μεταβάλλεται σ' ένα σύστημα διέγερσης και απόκρισης (*quorum sensing*) που σχετίζεται με την πυκνότητα του βακτηριακού πληθυσμού στην βιομεμβράνη και επιτυγχάνεται με την παραγωγή εξωκυττάρων μορίων που ονομάζονται αυτοεπαγωγείς (*autoinducers*). ⁽²⁹¹⁾ Οι βιομεμβράνες είναι εξαιρετικά δύσκολο να εξαλειφθούν και αποτελούν πηγή πολλών χρόνιων λοιμώξεων λόγω της δημιουργίας τους σε ποικίλα ιατρικά υλικά όπως καθετήρες, βηματοδότες, προσθετικές καρδιακές βαλβίδες και ορθοπεδικά προσθετικά υλικά, προκαλώντας επίμονες λοιμώξεις όπως ενδοκαρδίτιδα, λοιμώξεις τραυμάτων και εγκαυμάτων, χρόνιες ωτίτιδες (με δημιουργία υγρού στο μέσο ους) και λοιμώξεις ασθενών με κυστική ίνωση. ⁽²⁹²⁾ Οι ώριμες βιομεμβράνες μπορούν να ανεχθούν συγκεντρώσεις αντιβιοτικών από 10-1000 φορές μεγαλύτερες από τα ομόλογα τους ελεύθερα βακτήρια. ⁽²⁹³⁾

Ο σχηματισμός βιομεμβράνης κατά τις εντεροκοκκικές λοιμώξεις έχει αποδειχθεί από μια πληθώρα μελετών ^(294, 295, 296, 297) Η εξέταση ανθρώπινων αλλά και ζωικών στελεχών *E. faecium* αποκάλυψε ότι το γονίδιο *esp* προέρχεται αποκλειστικά από νοσοκομειακά στελέχη που ανήκουν στο κλωνικό σύμπλεγμα CC17. ^(298, 299, 300, 301, 302, 303) Παγκόσμια ευρήματα συνηγορούν ότι η πρωτεΐνη *Esp* έχει διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην εξελικτική ανάπτυξη του CC17 του *E. faecium* μετατρέποντας το από ένα συμβιωτικό μη παθογόνο μικροοργανισμό σε ένα σπουδαίο, παγκόσμιας εξάπλωσης, νοσοκομειακό παθογόνο. ⁽³⁰⁴⁾ Στην ίδια έρευνα επιβεβαιώνεται ο ρόλος της *Esp* στην δημιουργία της βιομεμβράνης, με την κατασκευή ενός μεταλλαγμένου στελέχους ως προς το γονίδιο *esp*. Η ύπαρξη του γονιδίου *esp* είναι πολύ σημαντική στην αρχική πρόσφυση και τον επακόλουθο σχηματισμό βιομεμβράνης σε αβιοτικές επιφάνειες όπως το πολυστυρένιο, όπως αναφέρθηκε αναλυτικά παραπάνω, αλλά έχει αποδειχθεί ότι δεν είναι ο μόνος παράγοντας που συνηγορεί στις πα-

ραπάνω διαδικασίες. ⁽³⁰⁵⁾ Η υπόθεση ότι η *Esp* συμμετέχει στην αρχική πρόσφυση και σε έμβιες επιφάνειες όπως είναι τα επιθηλιακά κύτταρα και εξωκυττάρια μόρια, που είναι απαραίτητα για τον αποικισμό του εντέρου, ακόμη ερευνώνται. Σε μια μελέτη πάντως ⁽³⁰⁶⁾ στελέχη του *E. faecium* που απομονώθηκαν από αίμα ασθενών, εμπλουτισμένο με γονίδια *esp*, έδειξαν αυξημένη πρόσφυση σε κύτταρα Caco-2 καρκινοπαθών του παχέος εντέρου υποδηλώνοντας έτσι τον ρόλο της *Esp* στον αποικισμό του εντέρου. Το γονίδιο *esp* έχει μελετηθεί περισσότερο στον *E. faecalis*, στον οποίο έχει συνδεθεί η παρουσία του με μια αυξανόμενη λοιμογόνο δύναμη και με τον σχηματισμό βιομεμβράνης. Έχει αποδειχθεί ότι το γονίδιο *esp* του *E. faecalis* εντοπίζεται σε μια νησίδα παθογονικότητας. ⁽³⁰⁷⁾ Ανάλυση των πριν και μετά περιοχών του γονιδίου *esp* στον *E. faecium* αποκάλυψαν ότι, όπως και στον *E. faecalis*, το γονίδιο *esp* εντοπίζεται σε μια νησίδα παθογονικότητας η οποία είναι όμως διαφορετική της νησίδας του *E. faecalis*. ⁽³⁰⁸⁾ Στην ίδια έρευνα εντοπίστηκαν έξι παθογόνα γονίδια, συνδεδεμένα με το γονίδιο *esp*, που έχουν σχέση με την ρύθμιση, την παθογένεια και την αντοχή του στα αντιβιοτικά. Αυτό το σύμπλεγμα των έξι γονιδίων εμφανίζει συγκεκριμένα γνωρίσματα, τέτοια που μπορούν να του προσδώσουν τον χαρακτηρισμό της νησίδας παθογονικότητας (σελ.68) (**pathogenicity island-PAI**). Άλλη έρευνα αποκάλυψε ότι η νησίδα παθογονικότητας βρίσκεται μόνο στα στελέχη που περιλαμβάνονται στο CC17 και πέραν των υπολοίπων παθογονικών γονιδίων, κωδικοποιεί μια νέα μεταβολική οδό που σχετίζεται με την μεταφορά και τον μεταβολισμό των υδατανθράκων. ⁽²⁸⁶⁾ Οι έρευνες έδειξαν ότι η νησίδα αυτή του *E. faecium* είναι αποτέλεσμα όχι μόνο ενός γενετικού συμβάντος, αλλά μια σύνθετη εξέλιξη πολλών σταδίων με διαφορετικούς βακτηριακούς προγόνους και που τελικά υιοθετήθηκε από τον *E. faecium* με οριζόντια μεταφορά γενετικού υλικού. Η ανάλυση και η αλληλούχιση ενός κλωνοποιημένου στελέχους του *E. faecium* αποκάλυψε ότι το γονίδιο *esp* στους εντερόκοκκους ^(309, 310) ανήκει σε μια οικογένεια Gram θετικών επιφανειακών πρωτεϊνών με ανάλογες επαναλαμβανόμενες δομές όπως οι πρωτεΐνες Rib ⁽³¹¹⁾ και Alpha C του *S. agalactiae*, ^(312, 313) η πρωτεΐνη R28 του *S. pyogenes* καθώς και η πρωτεΐνη Bar ⁽³¹⁴⁾ του *S. aureus* που συνδέονται με το σχηματισμό βιομεμβράνης. Όλες αυτές οι πρωτεΐνες αποτελούν γνωστούς λοιμογόνους παράγοντες.

➤ Παθογονικότητα που οφείλεται στο γονίδιο *hyl Efm*: το γονίδιο *hyl Efm* δεν βρίσκεται ανάμεσα στα γονίδια που ερευνηθήκαν στην παρούσα μελέτη, αλλά μπορούμε με ασφάλεια να το συμπεριλάβουμε στην συζήτηση μας και αυτό κατατάσσεται στα πλεονεκτήματα της μεθόδου μας, της MLST, για δυο λόγους α) πλήθος ερευνών συνδέουν την παρουσία του με το κλωνικό σύμπλεγμα CC17, που όπως προανέφερα αποτελεί το 97.3% του μελετηθέντος πληθυσμού μας ^(315, 316, 317, 318, 319) και β) σε μια μεγάλη παγκόσμια έρευνα που έγινε στην Ισπανία και δημοσιεύτηκε το 2010 ⁽³²⁰⁾ για το γονίδιο αυτό, εκτός του ότι περιλαμβάνονται στην έρευνα συγκεκριμένοι κλώνοι του CC17 που ανευρίσκονται και στα δικά μας αποτελέσματα, συμπεριλαμβάνεται από την Ελλάδα και ο κλώνος ST412, που επικρατεί στα ελληνικά νοσοκομεία σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής (38.7%). ⁽²⁸³⁾ Το γονίδιο *hyl Efm* κωδικοποιεί ένα ένζυμο, μια γλυκοσυδο-υδρολάση η οποία φαίνεται ότι διευκολύνει τον αποικισμό του εντέρου καθώς και την περιτοναϊκή διείσδυση (intestinal colonization and peritoneal invasion). ^(321, 322) Η πρωτεΐνη *Hyl Efm* έχει ομολογία με πρωτεΐνες όπως οι γλυκοσαμινιδάσες ή υαλουρονιδάσες οι οποίες θεωρούνται λοιμογόνες και σε

άλλα Gram-θετικά βακτήρια όπως ο *S. pyogenes*, η *Listeria monocytogenes* και το *Clostridium perfringens*. Η *Hyl Efm* αρχικά περιγράφηκε ως υαλουρονιδάση αλλά πρόσφατα σχολιάστηκε ως γλυκοσυδο-υδρολάση μετά από ανάλυση και σύγκριση της με το γονίδιο *spy1600* του *Streptococcus pyogenes*.⁽³²³⁾ Τα αποτελέσματα της ισπανικής έρευνας έδειξαν ότι το γονίδιο *hyl Efm* περιέχεται σχεδόν σε όλα τα στελέχη που ανήκουν στο CC17 (27/28) με διάφορα STs όπως οι ST16, ST17, ST18, ST80, ST192, ST412, κλώνοι που προσδιορίστηκαν και στη δική μας μελέτη. Ιδιαίτερη αναφορά γίνεται και για το ST65 που περιέχει το γονίδιο *hyl* (μοναδικό εύρημα εκτός συμπλέγματος στην έρευνα) αν και δεν ανήκει στο CC17. Σύμφωνα με το δικό μας διάγραμμα eBURST το ST65 ανήκει στο CC17, μέσω της σύνδεσης του με ένα νεοανακαλυφθέντα από εμάς κλώνο με τύπο αλληλουχίας ST1011*. Το ST65 είναι ένα στέλεχος που έχει προκαλέσει μια επιδημική έξαρση σε νοσοκομείο της Αθήνας το 1999 σύμφωνα με δημοσίευση της Ρούτση *et al.*⁽³²⁴⁾ Το γονίδιο *hyl Efm* περιλαμβάνεται σταθερά σε πλασμίδια του *E. faecium*, τα οποία πλασμίδια βρέθηκαν να είναι τόσο μεγάλα (150-450 kb) που τους δόθηκε ο χαρακτηρισμός μέγα-πλασμίδια (megaplasmids). Ειδικά για το πλασμίδιο του στελέχους ST412 που επικρατεί στην Ελλάδα, το μέγεθος του είναι 200 kb ενώ σε άλλους STs του συμπλέγματος βρέθηκε το γονίδιο *hyl* σε μέγα-πλασμίδια με κυμαινόμενο μέγεθος. Κάτω από την πίεση των αντιβιοτικών, φαίνεται ότι το γονίδιο *hyl* μεταφέρθηκε συγχρόνως με άλλα γενετικά στοιχεία όπως γονίδια αντοχής στα γλυκοπεπίδια συμπεριλαμβανομένης βέβαια και της αντοχής στην βανκομυκίνη.

➤ Άλλα παθολογικά ευρήματα για το CC17 του *E. faecium* θεωρούνται: η αντοχή του στην φαγοκυττάρωση από ουδετερόφιλα⁽³²⁵⁾ το αντιγόνο SagA⁽³²⁶⁾ καθώς και το επιφανειακό αντιγόνο Acm⁽³²⁷⁾.

➤ Επιπλέον η ανάλυση του συνόλου του γονιδιώματος αποκάλυψε πάνω από 100 συγκεκριμένα γονίδια νοσοκομειακής προέλευσης που περιλαμβάνουν κινητά στοιχεία όπως αλληλουχίες ένθεσης, γονίδια φάγων, αλληλουχίες πλασμιδίων, πρωτεΐνες μεμβρανών καθώς και ρυθμιστικά γονίδια και γονίδια αντοχής.⁽³²⁸⁾ Η τυποποίηση αυτών των γενετικών στοιχείων θα είναι ένα επόμενο βήμα για την αποσαφήνιση της παγκόσμια εξάπλωσης και της προσαρμογής του *E. faecium* στο νοσοκομειακό περιβάλλον.

Όλα αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι ο *E. faecium* ST17, ο προβλεπόμενος ιδρυτής του κλωνικού συμπλέγματος CC17, απέκτησε την δυνατότητα της προσαρμογής στο νοσοκομειακό περιβάλλον μέσα από μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων. Σ' ένα αρχικό στάδιο τα στελέχη του ST17 απέκτησαν αντοχή στην αμπικιλίνη και ακολούθησε μια σωρευτική απόκτηση προσαρμοστικών στοιχείων όπως γονίδια αντοχής και θεωρούμενα λοιμογόνα γονίδια τα οποία πρόσφεραν επιλεκτικό πλεονέκτημα στον ST17. Αυτό ακολουθήθηκε από μια αύξηση στην συχνότητα της παρουσίας του, διευκολύνοντας ακόμα περισσότερες προσαρμοστικές δυνατότητες και γενετική διαφοροποίηση, με αποτέλεσμα την συγκρότηση ενός στενά συνδεδεμένων γονότυπων με συγκεκριμένα γνωρίσματα, του CC17.⁽²⁸⁸⁾

Μια τέτοια διαδικασία προσαρμογής και επιβολής ενός βακτηρίου στο νοσοκομειακό περιβάλλον έχει χαρακτηριστεί από ερευνητές ως γενετικός καπιταλισμός.⁽³²⁹⁾

4.2. *Enterococcus faecalis*

Για πολλά χρόνια ο *E. faecalis* εθεωρείτο ως ένας συμβιωτικός μικροοργανισμός με το ανθρώπινο γαστρεντερικό σύστημα που προκαλούσε μόνο ευκαιριακές λοιμώξεις σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Τα τελευταία τριάντα χρόνια, ωστόσο, φημίζεται ότι αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων συμπεριλαμβανομένων λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος, ενδοκοιλιακών λοιμώξεων, ενδοκαρδίτιδας και βακτηριαιμίας. ^(330, 331) Η ικανότητα του *E. faecalis* να προκαλεί λοίμωξη συνδέεται κατ'αρχήν με εγγενή εντεροκοκκικά χαρακτηριστικά που επιτρέπουν στο βακτήριο να ανέχεται δύσκολες συνθήκες ανάπτυξης. Επιπλέον έχουν χαρακτηριστεί αρκετοί λοιμογόνοι παράγοντες για τον *E. faecalis* ⁽³³²⁾ και ο ρόλος τους στην παθογόνο ικανότητα του βακτηρίου έχει αποδειχθεί ακόμα και με πειραματικά μοντέλα λοίμωξης ζώων. ⁽³³³⁾ Μερικοί από τους προσδιοριστικούς παράγοντες παθογένειας του *E. faecalis* είναι παρόμοιοι με τους παράγοντες παθογένειας του *E. faecium* που είναι: το γονίδιο *esp* ^(334, 335, 336, 337) που συμβάλλει, όπως και στον *E. faecium*, στην δημιουργία βιομεμβράνης, το γονίδιο *hyl* ⁽³³⁸⁾, η ύπαρξη νησίδας παθογονικότητας ⁽³³⁹⁾, γονίδια που κωδικοποιούν κολλαγόνο, που συνδέεται με την ικανότητα προσκόλλησης του βακτηρίου καθώς και γονίδια MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules). ⁽³⁴⁰⁾

Η αρχική αποτυχία των ερευνητών να συνδέσουν όλα τα στελέχη του *E. faecalis* με παθογόνα γονίδια οδήγησε στην υπόθεση ότι υπάρχουν συγκεκριμένα στελέχη του βακτηρίου που τα φέρουν. Αυτό προέκυψε από την σύγκριση των γονιδιωμάτων, του νέου αλληλουχημένου στελέχους OG1RF με το παλαιότερο στέλεχος V583, που έδειξαν ότι το καθένα από αυτά περιλαμβάνει μοναδικά γονίδια. ⁽³⁴¹⁾ Παγκόσμιες μελέτες της πληθυσμιακής δομής του *E. faecalis* με την μέθοδο της MLST έχουν ορίσει διακριτά κλωνικά συμπλέγματα του βακτηρίου που είναι εμπλουτισμένα και προέρχονται από νοσηλευόμενους ασθενείς. Αυτά τα κλωνικά συμπλέγματα είναι τα: **CC2**, **CC9**, **CC28** και το **CC40** που χαρακτηρίζονται και ως κλωνικά συμπλέγματα υψηλού κινδύνου-**HiRECCs** (High-Risk Enterococcal clonal complexes). ^(279, 342)

Ο μοριακός χαρακτηρισμός στελεχών του *E. faecalis* στα πλαίσια της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε σε δύο χρονικές περιόδους. Η πρώτη έρευνα διεξήχθη κατά το 2008-2009, για πρώτη φορά στον ελλαδικό χώρο με την μέθοδο της MLST, με συλλογή 21 κλινικών δειγμάτων από τα Πανεπιστημιακά Νοσοκομεία Λάρισας και Πάτρας. Κύρια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της παραπάνω συλλογής ήταν η αντοχή των στελεχών του *E. faecalis* στην λινεζολιδη και η ευαισθησία στην βανκομυκίνη. Ο χαρακτηρισμός των στελεχών με την μέθοδο της MLST έδειξε ότι το 81% (17/21) των στελεχών ανήκει στον τύπο **ST28** και ένα στέλεχος στο τύπο **ST9**. Τα ST28 και ST9 ανήκουν σε κλωνικά συμπλέγματα υψηλού κινδύνου. Αυτός ο μοριακός χαρακτηρισμός περιλαμβάνεται στην δημοσίευση μας ⁽³⁴³⁾. Το κλωνικό σύμπλεγμα **CC28**, υποθέτουμε, ότι πρέπει να ήταν το επικρατούν κλωνικό σύμπλεγμα στην Ελλάδα τουλάχιστον από δεκαετίας και λόγω του ποσοστού που βρήκαμε (90%) αλλά και επειδή ανευρέθη ο ST28 σε κλωνικό στέλεχος επιτήρησης του 1997 (E1188) σε νοσοκομείο της Αθήνας, σύμφωνα με δημοσίευση. ⁽³⁴⁴⁾ Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι στην ίδια δημοσίευση ο τύπος ST28 προερχόταν αποκλειστικά από την Ελλάδα. Η δεύτερη

έρευνα πραγματοποιήθηκε το 2011 με 9 νέα στελέχη από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Αφορμή της δεύτερης έρευνας υπήρξε η παρατήρηση της διαφοροποίησης του φαινοτυπικού προφίλ και της αύξησης της συχνότητας των λοιμώξεων από *E.faecalis*, σε κλινικά δείγματα που αποστέλλονταν στο μικροβιολογικό εργαστήριο του νοσοκομείου. Το φαινοτυπικό προφίλ αυτών των στελεχών έδειξε αντοχή στην βανκομυκίνη και ο μοριακός προσδιορισμός με την μέθοδο της MLST έδειξε εντυπωσιακή αλλαγή του γονότυπου, με επικράτηση του κλώνου **ST6** σε ποσοστό 67% (6/9) και του κλώνου ST28, που επικρατούσε κατά την πρώτη έρευνα, μόλις στο 11% (1/9). Σύμφωνα με τα διαγράμματα eBURST το ST6 ανήκει στο κλωνικό σύμπλεγμα **CC2** που θεωρείται το πλέον παθογόνο κλωνικό σύμπλεγμα σύμφωνα με παγκόσμια επιδημιολογικά δεδομένα.

Ο **ST6** του CC2 είναι ένας επιδημικός κλώνος που τον ανευρίσκουμε από το 1985 σε αμερικάνικα νοσοκομεία ενώ κατά την προηγούμενη δεκαετία πέρασε στον ευρωπαϊκό χώρο (Νορβηγία, Πολωνία, Ισπανία) και τώρα πλέον θεωρείται το πλέον παθογόνο σύμπλεγμα που αναπαριστά μια λοιμογόνο γενεά νοσοκομειακής προέλευσης με παγκόσμια εξάπλωση και εμβέλεια. Το CC2, που παλαιότερα οριζόταν ως BVE κλωνικό σύμπλεγμα, αποτελείται από σημαντικά κλινικά στελέχη του *E.faecalis* συμπεριλαμβανομένων: του πρώτου γνωστού στελέχους HH22 που παρουσίασε αντοχή στις β-λακταμάσες, του πρώτου αμερικάνικου στελέχους V583 με αντοχή στην βανκομυκίνη, στελέχη με νησίδες παθογονικότητας (PAI) που συνδέονται με βακτηριαίμιες κ.α. (³⁴⁵, ³⁴⁶), υπερέχει δε των άλλων συμπλεγμάτων εξαιτίας της λοιμογόνου δύναμης που διαθέτει σύμφωνα με τις απόψεις των ερευνητών. Έρευνα του 2011 που εστιάζεται αποκλειστικά στο CC2, (²⁷⁹) λόγω της σπουδαιότητας του, αποκάλυψε την ύπαρξη 252 σημαντικών παθογόνων γονιδίων. Η πλειονότητα αυτών των γονιδίων εδράζεται σε γνωστά, από προηγούμενες έρευνες, κινητά γενετικά στοιχεία όπως: phage03, efaB5 και μια νησίδα παθογονικότητας που συνδέεται με το γονίδιο *VanB* (υπεύθυνο για την αντοχή στην βανκομυκίνη). Επιπλέον εντοπίστηκε, στο γονιδίωμα του στελέχους V583, ένα μικρό νησίδιο (EF3217 έως -27), που κωδικοποιεί κινητό στοιχείο που συνδέεται με βακτηριοφάγο. Επίσης εντοπίστηκαν ενδιαφέρουσες επιφανειακές δομές που βρίσκονται σε αφθονία στο γονιδίωμα και κωδικοποιούν παθογόνες πρωτεΐνες, συμβάλλοντας έτσι στην λοιμογόνο δύναμη του CC2, όπως οι MSCRAMMs (Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules), internalins και WxL γονίδια.

Συμπερασματικά ανιχνεύτηκαν στο CC2, σειρές παθογόνων γονιδίων με πιθανούς ρόλους στην προσαρμογή ή και την επιμονή της επιβίωσης των στελεχών του σε νοσοκομειακό περιβάλλον που έχουν συμβάλει στην ικανότητα των στελεχών του CC2 να διασπείρονται στο νοσοκομειακό περιβάλλον και να προκαλούν λοιμώξεις.

4.3. *Staphylococcus aureus*

Ο *S. aureus*, και ιδιαίτερα ο ανθεκτικός στην μεθικιλίνη, MRSA, είναι αιτία πρόκλησης σοβαρότατων νοσοκομειακών λοιμώξεων, οι οποίες γίνονται όλο και πιο δύσκολο να καταπολεμηθούν εξαιτίας της εμφανιζόμενης αντοχής τους σε όλες σχεδόν τις τρέχουσες τάξεις αντιβιοτικών. Πολλές μελέτες έχουν εντοπίσει στελέχη του MRSA και έχουν χαρακτηρίσει εκείνα, τα οποία φαίνονται να είναι καλά προσαρμοσμένα σε νοσοκομειακό περιβάλλον, να

έχουν εγκατασταθεί σε διάφορα νοσοκομεία μιας χώρας ή και να έχουν εξαπλωθεί διεθνώς χαρακτηριζόμενα ως επιδημικοί MRSA κλώνοι (**Epidemic-MRSA, E-MRSA**). Οι επιδημικοί κλώνοι E-MRSA έγιναν αρχικά διακριτοί, με την εφαρμογή μοριακών μεθόδων κυρίως της PFGE, η οποία αποδείχθηκε πολύ επιτυχής στην διερεύνηση επιδημικών εξάρσεων του MRSA. (^{347, 348, 349}) Το μεγαλύτερο όμως μειονέκτημα της PFGE, αλλά και άλλων μοριακών τεχνικών που βασίζονται στην σύγκριση προτύπων ζώνωσης σε πηκτώματα, αποτελεί η δυσκολία της σύγκρισης των αποτελεσμάτων τους μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων. Για τον λόγο αυτό υπήρξε αρχικά μια μεγάλη σύγχυση σχετικά με την γενετική συγγένεια των επιδημικών κλώνων του *S. aureus*, που περιγράφονταν στα ξεχωριστά εργαστήρια ανά τον κόσμο. Για την ανάγκη της διάκρισης των επιδημικών κλώνων MRSA, τους είχαν δοθεί διάφορα, εμπειρικά κυρίως, ονόματα όπως κλώνος USA 400, USA 300, βραζιλιάνικος κλώνος, παιδιατρικός κλώνος κ.α. Υπήρχε λοιπόν μια επιτακτική ανάγκη εξεύρεσης μιας μεθόδου που με αδιαφιλονίκητο τρόπο θα χαρακτήριζε όλους αυτούς τους κλώνους χωρίς την ανάγκη ανταλλαγής στελεχών αναφοράς. Αυτόν τον χώρο ήρθε να καλύψει η MLST που με την υψηλή διακριτική της ικανότητα, βασιζόμενη στην αμερόληπτη και αδιαμφισβήτητη ανάλυση αλληλουχίας νουκλεοτιδίων διατηρημένων γονιδίων, κατάφερε να κατατάξει, να ομαδοποιήσει και να συγκρίνει ξεκάθαρα αυτούς τους κλώνους. Το σχήμα της MLST για τον *S. aureus* που προτάθηκε από τους **Mark Enright et al**, το **2000** (²⁶¹) ήταν από τα πρώτα μελετηθέντα βακτήρια, λόγω της σπουδαιότητάς του, με την μέθοδο της MLST. Η πρώτη μεγάλη επιτυχία της MLST για τους επιδημικούς κλώνους του *S. aureus* ήταν ότι κατάφερε να ομαδοποιήσει πλήθος παθογόνων στελεχών σε μοριακή βάση. Σαν παραδείγματα αξίζει να αναφερθούν ότι οι επιδημικοί κλώνοι EMRSA-1,-4,-11, πορτογαλικός, βραζιλιάνικος κλώνος, ουγγαρέζικος και ο κλώνος της Βιέννης, μετά την εφαρμογή της MLST βρέθηκε ότι όλοι ανήκουν σ' έναν ST και συγκεκριμένα στον κλώνο **ST239**. Παρόμοιο παράδειγμα αποτελούν και οι κλώνοι EMRSA-2,-6,-7,-12,-13,-14, και ο ιρλανδικός¹, που όλοι ανήκουν στον κλώνο **ST8**, ο EMRSA -15 και ο κλώνος Barnim ανήκουν και οι δύο στον **ST22** και τέλος ο EMRSA-3, ο κλώνος New York/Japan και ο παιδιατρικός κλώνος που όλοι αποτελούν τον κλώνο **ST5**. (³⁵⁰) Επισημαίνεται ότι όλοι αυτοί οι προαναφερθέντες παγκόσμιοι επιδημικοί κλώνοι (ST239, ST8, ST22, ST5) εμφανίζονται και στον υπό μελέτη πληθυσμό μας (**Πίνακες 32,34**) και καταδεικνύουν την σημασία των ευρημάτων μας.

Ωστόσο παρά την εφαρμογή της MLST, η παγκόσμια επιδημιολογία του *S. aureus* δεν απλοποιήθηκε αλλά παρέμεινε εξαιρετικά πολύπλοκη κυρίως λόγω της πληθώρας των κλώνων και των κλωνικών συμπλεγμάτων (STs και CCs) που προσδιορίστηκαν και που μέχρι στιγμής αριθμούν 2.121 STs και 68 ομάδες κλωνικών συμπλεγμάτων (CCs) στην βάση δεδομένων της. Αυτή η διασπορά κλώνων και κλωνικών συμπλεγμάτων που συνοδεύονται από διαφορετικά χαρακτηριστικά, αντικατοπτρίζεται και στην δική μας συλλογή που από τα 126 μελετηθέντα στελέχη, προέκυψε ότι ανήκουν σε δέκα μεγάλα κλωνικά συμπλέγματα (CC1,5,7,15,22,30,45,80,121,152) και σε πέντε μικρότερα (CC239,8,72,25,109) (**Πίνακας 34**), γεγονός που καθιστά την μελέτη της επιδημιολογίας τους εξαιρετικά σύνθετη.

Οι προσδιοριστικοί παράγοντες της εμφάνισης μιας πολύ σύνθετης επιδημιολογικής συμπεριφοράς στον *S. aureus* οφείλεται κυρίως:

• Στην εισαγωγή του γονιδίου *mecA*: Το γονίδιο *mecA* βρίσκεται σε ένα κινητό γενετικό στοιχείο που ορίζεται ως **S**taphylococcal **C**assette **C**hromosome *mec* (*SCCmec*). ⁽³⁵¹⁾ Υπάρχουν πέντε κύριοι τύποι *SCCmec* (types I-V) αν και κάποιοι ερευνητές ανεβάζουν τον αριθμό τους πλέον σε οκτώ ή και έντεκα. Στην δική μας συλλογή έγινε έλεγχος κάποιων κλώνων για τους τύπους *SCCmec* I, II, III, IV, V. Η παρουσία του *SCCmec* είναι σχεδόν καθολική σ' όλα τα στελέχη MRSA και οι τύποι *SCCmec* I, IV, V κωδικοποιούν αποκλειστικά αντοχή σε β-λακταμικά αντιβιοτικά. Προτάθηκαν δύο αντίθετες θεωρίες για να εξηγήσουν την εισαγωγή του γονιδίου *mecA* που είχε σαν αποτέλεσμα αυτήν την διαφοροποίηση και την εμφάνιση νέων επιδημικών κλώνων του MRSA. Η θεωρία του μοναδικού-κλώνου (single-clone theory) που προτείνει ότι όλοι οι κλώνοι MRSA έχουν έναν κοινό πρόγονο και ότι το γονίδιο *SCCmec* εισήχθη μόνο μια φορά σε στελέχη του *S.aureus*. ⁽³⁵²⁾ Επικρατέστερη όμως, από την πλειοψηφία των ερευνητών, είναι η θεωρία των πολλαπλών κλώνων (multi-clone theory), η οποία υποθέτει ότι το γονίδιο *SCCmec* εισήχθη αρκετές φορές σε στελέχη του *S.aureus* διαφορετικών γενετικών καταγωγών. ^(350, 353, 354, 355)

➤ Η παραγωγή της εξωτοξίνης PVL (Panton-Valentine leukocidin): η οποία συνδέεται με λοιμώξεις του δέρματος, των μαλακών μορίων και την νεκρωτική πνευμονία. Στη δική μας μελέτη η παρουσία της εξωτοξίνης PVL είναι πολύ μεγάλη (67/126 ή ποσοστό 53.7%) γεγονός που προκαλεί μεγάλη ανησυχία.

• Εμφάνιση και χαρακτηρισμός νέων κλώνων MRSA: Μεγάλη ανησυχία προκαλεί κατά την τελευταία δεκαετία η εμφάνιση νέων κλώνων MRSA που προκαλούν λοιμώξεις στην κοινότητα και γι' αυτό και ονομάζονται **CA-MRSA** (**C**ommunity-**A**ssociated MRSA) Η παγκόσμια εμφάνιση των CA-MRSA αποτελεί απειλή τόσο για τα άτομα της κοινότητας όσο και για το νοσοκομειακό περιβάλλον, δεδομένου ότι αυτά τα στελέχη είναι περισσότερο λοιμογόνα από τα νοσοκομειακά **HA-MRSA** (**H**ospital- **A**ssociated MRSA) ^(356, 49) Η ύπαρξη οκτώ διαφορετικών ορισμών, για τον καθορισμό των CA-MRSA, προκάλεσε αρχικά μεγάλη σύγχυση στην αναγνώριση και τον εντοπισμό τους, γι αυτό πλέον επίσημα ισχύει διεθνώς μόνο ο ορισμός της **CDC** (**C**enters for **D**isease **C**ontrol and **P**revention) ^(357, 358): «στελέχη CA-MRSA θεωρούνται τα στελέχη *S.aureus* που απομονώθηκαν από τα εξωτερικά ιατρεία ή από νοσηλευόμενους ασθενείς, μέσα σε χρονικό διάστημα 48 ωρών από την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο. Οι ασθενείς αυτοί δεν πρέπει να έχουν προηγούμενο ιστορικό λοίμωξης ή αποικισμού από MRSA, εισαγωγής σε νοσοκομείο κατά το προηγούμενο έτος, ιστορικό αιμοκάθαρσης ή χειρουργικής επέμβασης. Επιπλέον ο ασθενής δεν πρέπει να φέρει μόνιμο καθετήρα ή άλλες ιατρικές συσκευές που να διαπερνούν το δέρμα.»

Κάθε κατηγορία CA- ή HA-MRSA στελεχών παρουσιάζει διακριτά χαρακτηριστικά:

✓ **HA-MRSA**: φέρουν μεγάλα γονίδια *SCCmec* τύπου I, II, III, σπάνια έχουν γονίδια PVL, συχνά παρουσιάζουν αντοχή και σε πολλά είδη μη β-λακταμικών αντιβιοτικών, προσβάλλουν μεγαλύτερες ηλικίες ασθενών που έχουν ήδη εκτεθεί σε νοσοκομειακό περιβάλλον και φέρουν μία ή και περισσότερες συνοδευτικές νόσους, τείνοντας να προκαλούν πνευμονία, βακτηραιμία και διεισδυτικές λοιμώξεις.

✓ **CA-MRSA**: φέρουν μικρότερα και περισσότερο ευκίνητα γονίδια *SCCmec* τύπου IV, V, συχνά φέρουν γονίδια PVL, έχουν αντοχή σε λιγότερα αντιβιοτικά με ευαισθησία όμως στην κλινδαμυκίνη, προσβάλλουν κυρίως υγιή και νεότερα άτομα που συνδέονται με λοιμώ-

ξεις SSTIs (**S**kin and **S**oft-**T**issue **I**nfections), προκαλούν σοβαρά κλινικά σύνδρομα όπως νεκρωτική πνευμονία και σοβαρή σήψη. (³⁵⁹, ³⁶⁰) Επιπλέον τα στελέχη CA-MRSA έχουν αρχίσει να αντικαθιστούν τα HA-MRSA στο νοσοκομειακό περιβάλλον. (³⁶¹, ³⁶²) Μεγάλη έρευνα στο San Francisco, που διεξήχθη κατά το 2004-2005, και δημοσιεύτηκε το 2008, έδειξε συντριπτική αύξηση των CA-MRSA σε σχέση με των HA-MRSA (316 με 31 περιπτώσεις αντίστοιχα/100.000 κατοίκους) (³⁶³).

Τα σημαντικότερα παγκόσμια επιδημικά κλωνικά συμπλέγματα, σύμφωνα με τους ερευνητές, είναι τα **CC5**, **CC8**, **CC22**, **CC45**, **CC30**. (³⁵⁰) Στην δική μας συλλογή εμφανίζονται και τα πέντε αυτά κλωνικά συμπλέγματα με συνολικό ποσοστό 40% (50/126)

Σημαντικότεροι HA-MRSA παθογόνοι κλώνοι της συλλογής μας με παγκόσμια εξάπλωση

❖ **ST239** κατέχει το ποσοστό 9.5% (12/126) της συλλογής μας. Επικρατεί στους HA-MRSA παγκοσμίως, θεωρείται καθαρά νοσοκομειακός κλώνος επιδεικνύοντας πολυανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά. Είναι ένας SLV του ST8 και μέσα από το eBURST θεωρείται ιδρυτής υποομάδας. Όλα τα στελέχη του είναι MRSA III που δείχνει ότι πιθανότατα προήλθε αποκλειστικά από ένα πρόγονο ST8-MRSA III. Αποτελεί το 90% των HA-MRSA κλώνων που κυκλοφορούν σε ολόκληρη την Κίνα, την Ταϊλάνδη, την Τουρκία και κατά πάσα πιθανότητα σ' ένα μεγάλο μέρος της ηπειρωτικής Ασίας. Το ST239 έχει ανιχνευθεί στη Ν. Αμερική ενώ επί του παρόντος κυκλοφορεί στην Α. Ευρώπη. (³⁶⁴) Παραλλαγές του ST239 ανταποκρίνονται στους επιδημικούς κλώνους MRSA 1,4,11, βραζιλιάνικος, ουγγαρέζικος και βιεννέζικος, οι οποίοι διακρίνονται από τις διακυμάνσεις που παρουσιάζουν στο μέγεθος του γονιδίου *SCCmec* III, στους τύπους spa και λεπτές διαφορές στην τυποποίηση με την μέθοδο PFGE.

❖ Το κλωνικό σύμπλεγμα **CC5** με προβλεπόμενο ιδρυτή τον ST5 συνδέεται με τους ST8 και ST239 που είναι στελέχη που πρωτοεμφανίστηκαν από την δεκαετία του 1960. Ο ST5 εμφανίζεται και με τους τέσσερις πρώτους τύπους *SCCmec*.

Σημαντικότεροι CA-MRSA παθογόνοι κλώνοι της συλλογής μας με παγκόσμια εξάπλωση

❖ **ST80** (ευρωπαϊκός κλώνος) Κατέχει το υψηλότερο ποσοστό 32% (40/126) μεταξύ των κλώνων της συλλογής μας. Είναι ένας κλώνος singleton της συλλογής μας σύμφωνα με το διάγραμμα eBURST. Είναι ο πιο κοινός CA-MRSA (PVL⁺ *SCCmec* IV) κλώνος που κυκλοφορεί στην Δ. Ευρώπη με αναφορές, ως αυξανόμενη κοινή αιτία για λοιμώξεις από Αυστρία, Νορβηγία, Δανία, Σουηδία, Μ. Βρετανία, Ελβετία και Ελλάδα. (³⁶⁵, ³⁶⁶) Στην Γαλλία προκάλεσε σποραδικές επιδημίες με διεισδυτικές λοιμώξεις το 2006-07 ενώ αποτελεί σπάνιο εύρημα για άλλες χώρες όπως Αυστραλία, Κουβέιτ, Τυνησία και Αίγυπτο.

❖ **ST30** Με ποσοστό 5.5% (7/126) στην έρευνα μας, που αντιστοιχεί σε απόγονο παθογόνου νοσοκομειακού στελέχους που κυκλοφόρησε στις ΗΠΑ στις δεκαετίες '50 και '60 (phage type 80/81). Ήταν MSSA στελέχη που συχνά έφεραν γονίδια PVL. Ένας ST30 MRSA κλώνος γνωστός και σαν Southwest Pacific (SWP), είναι πιθανόν άμεσος απόγονος των παλαιότερων 80/81 κλώνων και ήταν επί μακρόν ένα κοινό ανθρώπινο παθογόνο στην Αυστραλία. Από τα μέσα της δεκαετίας του '90, οι κλώνοι αυτοί με διαφορετικούς τύπους PFGE (πχ USA1100 στις ΗΠΑ) και γενετικά χαρακτηριστικά, έχουν αναφερθεί από πολλά μέρη του κόσμου, σαν κλώνοι που βρίσκονται σε συνεχή εξέλιξη. (³⁶⁷, ³⁶⁸) Το κλωνικό σύμπλεγμα

CC30 αντιπροσωπεύει κύρια τους κλώνους που είναι υπεύθυνοι για το σύνδρομο τοξικού σοκ (toxic shock syndrome). ⁽³⁶⁹⁾

❖ **ST1 (USA 400)** Με ποσοστό 6.4% (8/126) στην έρευνα μας, είναι ένας κλώνος singleton της συλλογής μας σύμφωνα με το διάγραμμα eBURST. Κλώνος ST1 της συλλογής μας προκάλεσε νεκρωτική πνευμονία με θανατηφόρα κατάληξη όπως αναφέρεται σε δημοσίευση του εργαστηρίου μας. ⁽³⁷⁰⁾ Επικράτησε στις ΗΠΑ στα τέλη της δεκαετίας του '90. Το γονιδίωμα του πρωτότυπου στελέχους MW2 έχει αλληλουχηθεί και περιέργως δεν παρουσίασε τρανσποζόνια ή αλληλουχίες ένθεσης αλλά προσδιορίστηκαν πολλές τοξίνες που απουσιάζουν από άλλα παθογόνα στελέχη. Το γονιδίωμα του προσομοιάζει με του MSSA476 που προκάλεσε σοβαρή διεισδυτική λοίμωξη σε ανοσοκατεσταλμένο παιδί και το στέλεχος MW2 θανατηφόρα λοίμωξη επίσης σε παιδί. Πέραν της ικανότητας του να προκαλεί σοβαρότατες διεισδυτικές νόσους, μετά το 2001 αντικαταστάθηκε σε ΗΠΑ και Καναδά, ως επικρατούν κλώνος, από τον ST8 (USA 300). ⁽³⁵⁹⁾ Ένας ST1 κλώνος, παρόμοιος και με κλώνο της συλλογής μας (PVL⁺), ευαίσθητος στα περισσότερα μη β-λακταμικά αντιβιοτικά που προκαλεί επιδημικές κρίσεις, αναφέρθηκε στην Αυστραλία (WA-MRSA-1 κλώνος) και Μ. Βρετανία. ^(371, 372)

❖ **ST8 (USA 300)** Με ποσοστό 1.6% (2/126) στην έρευνα μας, ο επικρατέστερος κλώνος στις ΗΠΑ και Καναδά με παρουσία σ' όλες τις ηπείρους. Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες ο ST8 υπήρξε ένας επιτυχημένος MSSA κλώνος που με μικρή διαφοροποίηση παρήγαγε τον ST250-MSSA, που με την μετέπειτα απόκτηση *SCCmec* type I προέκυψε ο πρώτος κλώνος EMRSA που ανιχνεύτηκε το 1961. Ο ST8 εμφανίζεται και με τους τέσσερις τύπους *SCCmec* (όπως και ο ST5) και πιθανότατα ο MRSA κλώνος του εμφανίστηκε με πολλαπλές ξεχωριστές εισαγωγές του γονιδίου *mec*. Σ αυτήν την υπόθεση συνηγορεί το γεγονός ότι δεν υπάρχουν πρώιμοι ST8-MRSA κλώνοι. Στα χαρακτηριστικά του περιλαμβάνονται το γονίδιο *SCCmec* IV κύρια (αλλά εμφανίζεται και με όλους τους τύπους του γονιδίου), PVL⁺ και στα περισσότερα στελέχη του περιλαμβάνεται ένα μοναδικό στοιχείο, το **ACME** (arginine catabolic mobile element), που θεωρείται γενετικός δείκτης για τον συγκεκριμένο κλώνο και δίνει την ικανότητα στο βακτήριο να αποικίζει το δέρμα υγιών ατόμων. Η επικράτηση του στις ΗΠΑ και στον Καναδά από το 2005 και 2006 αντίστοιχα, συντελέστηκε στο πολύ σύντομο χρονικό διάστημα των 3-4 χρόνων, γεγονός που προβληματίζει τους ερευνητές εάν θα ακολουθήσει το ίδιο ταχύ μοτίβο εξάπλωσης και επικράτησης και σε άλλες χώρες. ⁽³⁷³⁾ Οι πρώτες αναφορές στην Ευρώπη για τον κλώνο αυτό είναι από το 2008. ^(374, 375)

➤ Η αυξανόμενη παρουσία θετικών PVL⁺ στελεχών (χαρακτηριστικό των CA-MRSA στελεχών) υποδεικνύει ισχυρή διείσδυση του CA-MRSA στο νοσοκομειακό περιβάλλον, γεγονός που καθιστά την εξαγωγή ορθών συμπερασμάτων περισσότερο πολύπλοκη. ⁽³⁷⁶⁾ Το πρόβλημα αυτό δεν είναι τοπικό, ούτε της έρευνάς μας διότι πλήθος πρόσφατων ερευνών αναφέρονται στην εξάπλωση του CA-MRSA στο νοσοκομειακό περιβάλλον και την αντικατάσταση παραδοσιακών στελεχών του HA-MRSA στα νοσοκομεία. ^(377, 378, 379, 380) Επίσης η ανεύρεση κλώνων με το ίδιο ST αλλά διαφορές ως προς την φορεία των γονιδίων PVL προσδίδουν στον κλώνο διαφορετικά κλινικά χαρακτηριστικά.

➤ Συνοψίζοντας μια δεκαετή πλέον εμπειρία στον μοριακό χαρακτηρισμό του *S. aureus* μέσω της MLST, ερευνητές (^{381, 129}) εκφράζοντας σκεπτικισμό για φαινόμενα όπως:

- Μεγάλο πλήθος κλώνων και κλωνικών συμπλεγμάτων.
- Κλώνοι με ίδιο ST αλλά με διαφορετικά φαινοτυπικά και κλινικά χαρακτηριστικά.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η συγκριτική ανάλυση αλληλουχίας δύο στελεχών των MW2 και MSSA476 που και τα δύο απομονώθηκαν από περιστατικά λοιμώξεων που προέρχονταν από την κοινότητα και αντιστοιχούν στον κλώνο ST1. Ο MW2 ήταν ένας MRSA κλώνος, PVL⁺ που ανακτήθηκε από θανατηφόρα παιδιατρική βακτηριαμία ενώ ο MSSA476, ένας κλώνος ευαίσθητος στην μεθικιλίνη που ανακτήθηκε από περιστατικό οστεομυελίτιδας με πλήρη ανάρρωση του ασθενούς, σύμφωνα με παράδειγμα της παράπάνω δημοσίευσης. Το φαινόμενο αυτό, το αντιμετωπίσαμε και στα ευρήματά μας όπου επτά σημαντικοί παγκόσμιοι STs είναι κοινοί και στα στελέχη MRSA και στα MSSA. (Πίνακας 37)

- Τα κλωνικά συμπλέγματα του *S. aureus* παρατηρούνται με την ίδια συχνότητα, ανεξάρτητα αν τα δεδομένα προέρχονται από περιστατικά διεισδυτικών νόσων ή ασυμπτωτικής φορείας, φαινόμενο που δεν παρατηρείται συνήθως σε άλλα βακτήρια.

- Το σχήμα της MLST για τον *S. aureus*, των επτά διατηρημένων γονιδίων, δεν είναι αρκετό για τον μοριακό χαρακτηρισμό των στελεχών αλλά είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός και άλλων γενετικών τόπων (PVL, SCCmec I,II,III,IV,V) για ορθό μοριακό χαρακτηρισμό, γεγονός που καθιστά το σχήμα επίπονο και χρονοβόρο.

Οι παραπάνω επισημάνσεις οδήγησαν σε συμπεράσματα όπως:

- Ο *S. aureus* έχει την ικανότητα της μαζικής και ταχείας απόκτησης κινητών στοιχείων, νησιδίων και άλλων γονιδίων παθογονικότητας σε διαφορετικά οικολογικά περιβάλλοντα και αυτό αποτελεί σημείο εκκίνησης ενός νέου παθογονικού τρόπου ζωής για το βακτήριο, υποδεικνύοντας είδος ταχέως εξελισσόμενο.

- Υιοθέτηση μιας, παλαιότερα αμφισβητούμενης, θεωρίας για την εξήγηση της συμπεριφοράς του, είναι ότι η εξέλιξη μπορεί να πραγματοποιηθεί με άλματα (saltation) και όχι μόνο μέσω αργής συσσώρευσης πολύ μικρών αλλαγών.

- Πολλά από τα στελέχη του με ίδιο ST διαφέρουν στην παθογονικότητα, η γενετική βάση όμως αυτών των διαφορών δεν αντανακλάται στα αποτελέσματα της MLST.

- Ποσοτική ανάλυση των δεδομένων στα πλαίσια της MLST έδειξε ότι οι αλλαγές στο γονιδίωμα του είναι αποτέλεσμα κυρίως σημειακών μεταλλάξεων παρά ανασυνδυασμού, που σημαίνει ότι το σταθερό γενετικό υλικό αλλάζει πάρα πολύ αργά και το γονιδίωμα του «πυρήνα» σ' αυτό το είδος να είναι σχεδόν σταθερό. Κάθε ST περιλαμβάνει έτσι στελέχη που αντανακλούν ένα ευρύ φάσμα δυνητικής παθογένειας.

- Τα κλωνικά συμπλέγματα που προσδιορίζονται μέσω της MLST είναι πιθανόν ότι αναπαριστούν αρχαίες και όχι πρόσφατες γενεαλογίες, που είναι ο στόχος της μεθόδου, και να είχαν κοινό πρόγονο εκατοντάδες χιλιάδες χρόνια πριν.

- Αντίθετα η διερεύνηση των γενετικών αλλαγών μεταξύ των κλώνων των CCs έδειξε ότι υπερισχύει ο ανασυνδυασμός έναντι των μεταλλάξεων οπότε υφίσταται ένας διαφορετικός μηχανισμός ροής γονιδίων.

- Η διαφορά της ροής των γονιδίων (γονίδια που διαφοροποιούνται μέσω μεταλλάξεων ή μέσω ανασυνδυασμού) ανάμεσα στα CCs και εσωτερικά σ' ένα κλωνικό σύμπλεγμα

(CC) δημιουργούν όρια μεταξύ των CCs. Η ύπαρξη ορίων μεταξύ των CCs, σύμφωνα με θεωρία που υφίσταται ευρύτατα στα ευκαρυωτικά, είναι η βάση της ύπαρξης των ξεχωριστών ειδών και αυτό ενισχύει την ελκυστική πιθανότητα ότι κάποια από τα CCs του *S. aureus* ανταποκρίνονται στον όρο «βιολογικό είδος».

➤ Η οικολογική επιτυχία του *S. aureus*: η επιδημιολογία του βακτηρίου καταδεικνύει με σαφήνεια ότι οι κυρίαρχοι επιδημικοί κλώνοι αλλάζουν με την πάροδο του χρόνου, τόσο στο νοσοκομειακό περιβάλλον όσο και στην κοινότητα, όπως αποδεικνύεται από τις πρόσφατες επιδημίες CA-MRSA στις ΗΠΑ (από κυρίαρχο κλώνο ST1 σε ST8 σε διάστημα τεσσάρων χρόνων). Διαπιστώθηκε ότι κάποια κλωνικά συμπλέγματα είναι περισσότερο επιτυχημένα από άλλα διότι επικρατούν πληθυσμιακά. Η βάση όμως αυτής της πληθυσμιακής επιτυχίας δεν είναι εντελώς σαφής. Σύμφωνα με τους ερευνητές η επιτυχία ενός βακτηριακού γονότυπου φαίνεται από τον τρόπο της εξάπλωσης του είτε μέσω επιτυχούς μετατόπισης σε άλλους γονότυπους είτε μέσω αποικισμού σε άτομα που προηγουμένως δεν ήταν αποικισμένα. Περισσότερο στοχευμένες έρευνες είναι αναγκαίες για την ενίσχυση της μιας ή της άλλης άποψης. Γνωστό μέχρι τώρα είναι ότι ο *S. aureus* δημιουργεί διακριτά κλωνικά συμπλέγματα υποδεικνύοντας έτσι την καλή και εύκολη προσαρμογή του σε διαφορετικά οικολογικά περιβάλλοντα. Προτείνεται λοιπόν ότι αυτή είναι η επιλεκτική κινητήρια δύναμη που είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση και την συντήρηση των κλωνικών συμπλεγμάτων του. ⁽³⁸²⁾ Αυτό κάνει τα κλωνικά συμπλέγματα του *S. aureus* να είναι ξεχωριστές σημαντικές βιολογικές οντότητες και ήδη έχει προταθεί από τους Feil E. *et al* ⁽³⁸¹⁾ ότι κλωνικά συμπλέγματα *S. aureus* έχουν τα στοιχεία που απαιτούνται για την αναγωγή τους σε νέα βακτηριακά είδη.

4.4. *Staphylococcus epidermidis*

Ο *S. epidermidis* είναι ένα συμβιωτικό βακτήριο που αποικίζει το δέρμα και τους βλενογόνους των θηλαστικών. Θεωρείται το πιο διαδεδομένο είδος σταφυλόκοκκου στον άνθρωπο. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι υγιείς άνθρωποι φέρουν από 10 έως 24 διαφορετικά στελέχη του ανά πάσα στιγμή. ⁽³⁸³⁾ Παράλληλα με την πρόοδο της ιατρικής πρακτικής στην κατασκευή πχ καθετήρων και τεχνητών μελών, ο *S. epidermidis* έχει γίνει δυστυχώς η πιο κοινή αιτία πρωτογενούς βακτηριαμίας λόγω του αποικισμού του σε μόνιμα ιατρικά εμφυτεύματα. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι επειδή ο *S. epidermidis* είναι ένας μόνιμος και πανταχού παρών αποικιστής του ανθρώπινου δέρματος, έχει σαν αποτέλεσμα υψηλή πιθανότητα μόλυνσης κατά την εισαγωγή μιας συσκευής. ⁽³⁸⁴⁾

Το γονιδίωμα του *S. epidermidis* είναι πολύ παρόμοιο με του *S. aureus*, κωδικοποιεί όμως λιγότερους παθογόνους παράγοντες και νησίδια παθογονικότητας σε σχέση με τον *S. aureus*. Ο *S. epidermidis* δεν περιλαμβάνει στο γονιδίωμα του σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες, λευκοκτονίνη, α-τοξίνη, πρωτεΐνη Α και πλήθος άλλων παραγόντων συγκόλλησης. Αυτή η σπανιότητα μολυσματικών παραγόντων είναι πιθανότατα υπεύθυνη για την μειωμένη ικανότητας πρόκλησης λοιμώξεων σε σχέση με τον *S. aureus*. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο *S. epidermidis* εξελίσσεται ταχέως μέσω της συχνής μεταφοράς κινητών γενετικών στοιχείων και ανασυνδυασμού πιθανώς δε και μέσω αλληλουχιών ένθεσης (IS) ⁽³⁸⁵⁾. Είναι ευρέως

πλέον αποδεκτό ότι αποτελεί δεξαμενή γονιδίων αντοχής και νησιδίων παθογονικότητας για τον *S. aureus* που τα αποκτά στη συνέχεια μέσω οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού. ^(386, 387) Η συμπεριφορά των δύο βακτηρίων εξηγείται από την οικοθέση τους που για μεν τον *S. epidermidis* είναι το δέρμα ενώ για τον *S. aureus* είναι κυρίως η μύτη. Ο *S. epidermidis* μπορεί εύκολα να έρθει μέσω της άμεσης επαφής με άλλες οντότητες αλλά και να απομακρυνθεί εξίσου εύκολα μέσω αποφλοίωσης του δέρματος. Μάλιστα έχει προταθεί μαθηματικό μοντέλο που προβλέπει τον αριθμό των στελεχών αυξημένης παθογόνου ικανότητας, που θα απομακρυνθούν από τον πληθυσμό του. ⁽³⁸⁸⁾ Έχει αναπτύξει λοιπόν περισσότερο μηχανισμούς που αφορούν την επιβίωση του στο δέρμα παρά μηχανισμούς ικανότητας εμπλοκής σε λοιμώξεις. Τέτοια στοιχεία είναι οι phenol soluble modulins (PSMs) καθώς και ένα προσφάτως περιγραφόμενο αισθητήριο σύστημα τριών συστατικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων (three-component antimicrobial peptide-sensing system) ^(389, 390, 391) Η αλληλούχιση του γονιδιώματος του έχει αποκαλύψει συστήματα μεταφοράς ιόντων/πρωτονίων σχετιζόμενα με την ωσμωπροστασία, αντανακλώντας την οικοθέση του βακτηρίου. Τα συστήματα αυτά βοηθούν το βακτήριο στην επιβίωση του, εξουδετερώνοντας την ωσμωτική πίεση και τις υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων του δέρματος.

Ωστόσο κωδικοποιεί έναν μοναδικό παράγοντα παθογένειας, το έλυτρο **poly-γ-DL-glutamic acid** (PGA) που επισημαίνεται ότι είναι ένας σημαντικός παράγοντας παθογένειας στον βάκιλο του άνθρακα (*Bacillus anthracis*). ⁽³⁹²⁾

Ο μοριακός προσδιορισμός των υπό μελέτη κλινικών στελεχών μας *S. epidermidis*, που πραγματοποιήθηκε από τον Ιούνιο του 2009 έως τον Μάρτιο του 2010, μέσω της MLST, έδειξε ότι ο πληθυσμός μας απαρτίζεται σχεδόν αποκλειστικά από δύο κλώνους, τον **ST22** και τον **ST2** που διαφέρουν μόνο ως προς ένα αλληλόμορφο γονίδιο το *tpi* (7 και 1 αντίστοιχα) ενώ ο **ST35** με 2 στελέχη προερχόταν αποκλειστικά από το ΠΓΝ Λάρισας (**Πίνακας 38**) Αυτός ο μοριακός χαρακτηρισμός περιλαμβάνεται σε δημοσίευσή μας. ⁽³⁹³⁾ Αξιοσημείωτο είναι ότι το ST2 κυριαρχεί σχεδόν αποκλειστικά στα στελέχη που προέρχονται από ΠΓΝ Λάρισας (7/10-70%), ενώ το ST22 κυριαρχεί αποκλειστικά στα κλινικά στελέχη που μας εστάλησαν από ΠΓΝ Πάτρας (18/18-100%) ενώ τα δείγματα από το Σισμανόγλειο ΓΝΑ έδειξαν μια ενδιάμεση κατάσταση [ST22 (4/7-57%) και ST2 (3/7-43%)]. Και οι τρεις κλώνοι έδειξαν αντοχή στο αντιβιοτικό λινεζολιδη (R:LZD) και ανήκουν, σύμφωνα με το διάγραμμα eBURST (**Διαγράμματα 8, 9**), στο ίδιο κλωνικό σύμπλεγμα CC2 με κύριο ιδρυτή τον κλώνο ST2 και SLVs τους κλώνους ST22 και ST35. Η τάση της επικράτησης του **CC2** ως του κυρίαρχου παθογονικού κλωνικού συμπλέγματος σε νοσοκομειακό περιβάλλον φάνηκε, ευθύς εξαρχής και σε παγκόσμιο επίπεδο, από την αρχική δημοσίευση του σχήματος της MLST για τον *S. epidermidis* το 2007, όπου ανιχνεύτηκε με ποσοστό 74%, ενώ στη δική μας μελέτη ανέρχεται στο 100%. Ειδικά ο κλώνος ST2 αποτελεί το 31% των στελεχών του βακτηρίου που κυκλοφορούν παγκοσμίως. ⁽²⁶⁴⁾

Οι κύριοι παράγοντες παθογένειας, όπως ειπώθηκε και παραπάνω, σχετίζονται με την ικανότητα του βακτηρίου αυτού να αποικίζει και να διαμορφώνει βιομεμβράνες σε βιοϋλικά όπως καθετήρες και καρδιακές βαλβίδες. ⁽³⁹⁴⁾ Η θεραπεία των λοιμώξεων εξ αιτίας της βιομεμβράνης του *S. epidermidis*, συνήθως περιλαμβάνει αφαίρεση της επίμαχης συσκευής και

την επακόλουθη αντικατάσταση της προκαλώντας αύξηση της νοσηρότητας, του κόστους και της διάρκειας της νοσηλείας.

Οι πρόοδοι των μοριακών μεθόδων κατά την τελευταία δεκαετία επέτρεψαν στους επιστήμονες να διερευνήσουν τους μηχανισμούς παθογένειας του βακτηρίου και ιδιαίτερα τους παράγοντες που μεσολαβούν για τον σχηματισμό της σταφυλοκοκκικής βιομεμβράνης.

Τα χαρακτηριστικά του *S. epidermidis* που συνδέονται με τη σύνθεση της βιομεμβράνης και αποτελούν την κύρια αιτία παθογονικότητας του βακτηρίου, έχουν ως κύρια σημεία:

- Ο σχηματισμός σταφυλοκοκκικής βιομεμβράνης τυπικά θεωρείται ως ένας μηχανισμός τεσσάρων βημάτων: προσκόλληση (**adherence**), συσσώρευση (**accumulation**), ωρίμανση (**maturation**) και αποκόλληση (**detachment**).

- Οι παράγοντες οι οποίοι αποδεδειγμένα συμμετέχουν στον σχηματισμό της βιομεμβράνης είναι οι: *icaADBC*, *aap*, *embp*, *bhp*. (395, 396, 397, 398)

- Η προσκόλληση στα βιοϋλικά διαμεσολαβείται τόσο από ειδικές όσο και από μη ειδικές αλληλεπιδράσεις. Ειδικές ουσίες προσκόλλησης περιλαμβάνουν τις διπλής λειτουργίας αυτολυσίνες AtIE/Aae και πρωτεΐνες όπως οι MSCRAMMs, SdrG, SdrF και Embp. (399, 400, 401)

- Το πιο μελετημένο στάδιο σχηματισμού της βιομεμβράνης αποτελεί το στάδιο της συσσώρευσης με προσδιοριστικό παράγοντα τον πολυσακχαρίτη μεσοκυττάριας προσκόλλησης (**polysaccharide intercellular adhesin-PIA**), ο οποίος συντίθεται από τα γονιδιακά προϊόντα του οπερονίου *icaADBC*. Μεταγραφικά το οπερόνιο ρυθμίζεται από πολλούς παράγοντες αποδεικνύοντας ότι η σύνθεση του PIA συνδέεται με τη μεταβολική κατάσταση του βακτηρίου. (402, 403)

- Στελέχη του *S. epidermidis* έχουν επίσης απομονωθεί από κλινικά σχετιζόμενες λοιμώξεις που δε συνθέτουν PIA, γεγονός που υποδηλώνει ότι και άλλοι παράγοντες μπορούν να αντικαταστήσουν τον PIA κατά τη φάση της συσσώρευσης. Οι πρωτεΐνες Aap και Bhp είναι δύο πρωτεΐνες που μπορούν να λειτουργήσουν σ' αυτό το ρόλο. (404)

- Ελάχιστα είναι γνωστά για τη φάση της ωρίμανσης της σταφυλοκοκκικής βιομεμβράνης αλλά κάποια δεδομένα συνηγορούν ότι ο καταβολισμός της αργινίνης διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο. Ένα ειδικό οπερόνιο, που σταθερά αυτορυθμίζεται σε πληθυσμούς εντός της βιομεμβράνης και εμφανίζεται τόσο στον *S. epidermidis* όσο και στον *S. aureus*, είναι η *arginine deiminase operon (ADI)* (405, 406) περιέχεται δε στα νησίδια παθογονικότητας ACME II και I (arginine catabolic mobile element) αντίστοιχα. Θεωρείται γενετικός δείκτης για τον **ST8** (USA 300) κλώνο του *S. aureus*. (407) Φαινοτυπικές διακυμάνσεις μπορεί να είναι ένα παράπλευρο προϊόν της ωρίμανσης και του σχηματισμού του μορφώματος της βιομεμβράνης. (408, 409)

- Η διασπορά των βιομεμβρανών του *S. aureus* και του *S. epidermidis* εξαρτάται από το γονίδιο *agr*, ωστόσο στον *S. epidermidis* η διασπορά σχετίζεται επίσης με τη σύνθεση phenol soluble modulins και δ-τοξινών ενώ στον *S. aureus* σχετίζεται κυρίως με την παραγωγή πρωτεάσης.

4.5. *Streptococcus pyogenes*

Η δράση του *S. pyogenes* μέσω των αντιγόνων που διαθέτει και των τοξινών που παράγει είναι γνωστή εδώ και δεκαετίες. Πολλά από τα αντιγόνα του, έχουν ανάλογη δομή με ουσίες ανθρώπινων ιστών όπως καρδιακές βαλβίδες (M-πρωτεΐνη), μυοκάρδιο (T- & M-πρωτεΐνη), αρθρικό υγρό (υαλουρονικό οξύ του ελύτρου), δέρμα (μουκοπεπτιδίο) κ.α. Η ανοσολογική απόκριση του ξενιστή περιλαμβάνει την σύνθεση αντισωμάτων που έχουν σαν στόχο τα συγκεκριμένα αντιγόνα του βακτηρίου αλλά επακόλουθα και τους ανθρώπινους ιστούς που προσομοιάζουν με αυτά.

Ο *S. pyogenes* ξεχωρίζει από τους περισσότερους Gram⁺ παθογόνους κόκκους στο γεγονός ότι δεν έχει αποκτήσει φυσική αντοχή στις β-λακτάμες. Η τυχόν αποτυχία της θεραπείας με πενικιλίνη πολλές φορές οφείλεται στον συναποικισμό του *S. pyogenes* με άλλο είδος πχ με *S. aureus*, που παράγει την β-λακταμάση και αδρανοποιεί το αντιβιοτικό. Το ερώτημα «γιατί ο *S. pyogenes* απέτυχε να αποκτήσει αντοχή (ευτυχώς για μας) στην πενικιλίνη;» παραμένει ένα μυστήριο. Σύμφωνα με τους ερευνητές, η πιθανή εξήγηση για την συμπεριφορά του δεν έχει μόνο γενετική βάση διότι γνωρίζουμε ότι ο *S. pyogenes* μαζί με τους σταφυλόκοκκους μοιράζονται πολλά ομόλογα γονίδια που φέρονται μέσω γενετικών στοιχείων. Η αποτυχία του αυτή εξηγείται μάλλον από μια μειωμένη φυσική ικανότητα πχ μειωμένη βιοσύνθεση πεπτιδογλυκάνης, που απαιτεί από το βακτήριο ένα μεγάλο βιολογικό κόστος. Ως εκ τούτου τα αντιβιοτικά επιλογής για την θεραπεία των περισσότερων λοιμώξεων του *S. pyogenes* παραμένουν οι β-λακτάμες. Οι μακρολίδες είναι τα αντιβιοτικά επιλογής για ασθενείς που παρουσίασαν είτε αλλεργία στις β-λακτάμες είτε έχουν μια προηγούμενη αποτυχημένη θεραπεία. Η κλινδαμυκίνη (μια λινκοσαμίδα) προτιμάται για ασθενείς με λοιμώξεις των μαλακών μορίων, απειλητικές για την ζωή όπως είναι το σύνδρομο τοξικής καταπληξίας και η νεκρωτική ινοσίτιδα (necrotizing fasciitis), διότι διεισδύει καλύτερα στους ιστούς και αναστέλλει άμεσα την παραγωγή της εξωτοξίνης, που ευθύνεται κύρια για την παθογένεια της νόσου. Η κλινικά σημαντική αντοχή στις μακρολίδες, προέκυψε από τα μέσα της δεκαετίας του '70 και σταδιακά έγινε ευρέως διαδεδομένη. ^(410, 411, 412) Σε τοπικές έρευνες, τα ποσοστά αντοχής μερικές φορές υπερβαίνουν το 30% και μπορεί να φτάσουν και υψηλότερα, ενώ σημαντικό είναι το γεγονός ότι υπάρχει ένας ισχυρός συσχετισμός μεταξύ κατανάλωσης μακρολιδών και επιπέδου αντοχής στον *S. pyogenes*. ^(413, 414) Η αντοχή στις μακρολίδες οφείλεται κυρίως στα γονίδια *erm(A)*, *erm(B)* και *mef(A)* και σε μικρότερο βαθμό σε άλλους τύπους των παραπάνω γονιδίων και ριβοσωμικές μεταλλάξεις. Επίσης έχουν ερευνηθεί διεξοδικά και κινητά γενετικά στοιχεία που φιλοξενούν γονίδιο αντοχής στις μακρολίδες, σε συνδυασμό μερικές φορές, με αντοχή στην τετρακυκλίνη.

Ο πληθυσμός του *S. pyogenes* εμφανίζει πολύ υψηλό επίπεδο γενετικής ποικιλότητας. ⁽⁴¹⁵⁾ Το ινίδιο του *S. pyogenes*, είναι γνωστό ότι φέρει τις πρωτεΐνες M, που είναι οι στόχοι της προστατευτικής ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή. Η διαφυγή του βακτηρίου από την ανοσολογική απόκριση του ανθρώπινου οργανισμού, επιτυγχάνεται μέσω της διαφοροποιητικής επιλογής των γονιδίων *emm* του βακτηρίου. Οι πρωτεΐνες M παρέχουν την βάση της κλασσικής μεθόδου προσδιορισμού του οροτύπου του *S. pyogenes*. Πρόσφατα η μέθοδος αυτή αντικαταστάθηκε με την τυποποίηση *emm* που βασιζόμενη στην αλληλούχιση του

γονιδίου, χρησιμοποιείται σχεδόν παγκόσμια για την μοριακή τυποποίηση των στελεχών του *S. pyogenes* που προκύπτουν από την πληθυσμιακή επιδημιολογική επιτήρηση. Για πολλά στελέχη όμως η τυποποίηση *emm* δεν συσχετίζεται με κλώνους. Οι κλώνοι του *S. pyogenes* ορίζονται με μεγαλύτερη ακρίβεια μέσω του συνδυασμού της τυποποίησης *emm* και του ST, που βασίζεται στα αλληλόμορφα των πολλαπλών γενετικών τόπων των διατηρημένων γονιδίων της MLST. Για τα ανθεκτικά στις μακρολίδες, στελέχη του *S. pyogenes*, ο συνδυασμός της τυποποίησης *emm*, της MLST τυποποίησης και της τυποποίησης γονιδίων αντοχής, μας παρέχει ένα πολύ καλό ορισμό του κλώνου.

Η βάση δεδομένων της MLST, που είναι δημοσίως διαθέσιμη, ⁽²⁶⁶⁾ παρέχει δεδομένα για > 400 ανθεκτικά στελέχη στις μακρολίδες που κατατίθενται από πολυάριθμους ερευνητές. Σύμφωνα μ' αυτή υπάρχουν περίπου 100 μοναδικοί συνδυασμοί ST, τύποι *emm* και γονιδίων αντοχής [*erm(A)*, *erm(B)* και *mef*], που μπορούν να ταυτοποιηθούν.

Μέσα σ' αυτά τα πλαίσια, μια μελέτη δηλαδή με συνδυασμό τυποποίησης *emm*, MLST τυποποίησης και τυποποίησης των γονιδίων αντοχής, πραγματοποιήθηκε μια μεγάλη έρευνα του εργαστηρίου μας, που περιελάμβανε 495 στελέχη του *S. pyogenes* τα οποία συλλέχθηκαν από την περιοχή της Θεσσαλίας κατά την διάρκεια των δύο ετών 2007-2009. Έναυσμα της παραπάνω έρευνας υπήρξε η παρατήρηση της αύξησης των ανθεκτικών στελεχών του βακτηρίου στις μακρολίδες φαινοτυπικά, σε σύγκριση και με παλαιότερη έρευνα του εργαστηρίου μας. ^(416, 417) Η παρούσα έρευνα έδειξε πράγματι αύξηση του ποσοστού αντοχής στις μακρολίδες από 19.3% το 2001, σε 24% το 2009 στην περιοχή της Θεσσαλίας. ⁽⁴¹⁸⁾ Αντίστοιχες έρευνες στην Ευρώπη επιδεικνύουν μεγάλες διακυμάνσεις στην παρουσία στελεχών με αντοχή στις μακρολίδες. Στην Πορτογαλία το 27% των στελεχών αναφέρονται ως ανθεκτικά στις μακρολίδες, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στη Σκωτία είναι μόλις 1.9% ⁽⁴¹⁹⁾

Από το σύνολο των παραπάνω στελεχών προς έρευνα, επιλέχτηκε μια αντιπροσωπευτική συλλογή 80 στελεχών, ανθεκτικών και μη, για μοριακό χαρακτηρισμό μέσω της MLST, που πραγματοποιήθηκε στα τέλη του 2009. Χαρακτηρίστηκαν 23 STs (Πίνακας 41) μεταξύ των οποίων και οι πιο διαδεδομένοι, με αντοχή στις μακρολίδες, παγκόσμιοι κλώνοι του *S. pyogenes*. Οι πιο διαδεδομένοι παγκόσμιοι κλώνοι σύμφωνα με τους ερευνητές είναι: **ST36**, **ST39**, **ST89** και μικρότερης γεωγραφικής εμβέλειας **ST28**, **ST176**, **ST46**, **ST43**, **ST382**. ⁽⁴²⁰⁾ Από τους τρεις κύριους κλώνους εντοπίστηκαν στη συλλογή μας και οι τρεις ST36, ST39, ST89 και επιπλέον οι ST28, ST46 και ST382.

➤ Ο **ST36** με ποσοστό 26.2% (21/80) έχει την μεγαλύτερη αντιπροσώπευση στην συλλογή μας. Θεωρείται ο παλαιότερος παγκόσμιος ανθεκτικός κλώνος στις μακρολίδες και ανακτήθηκε για πρώτη φορά από στέλεχος του 1976 στον Καναδά. Κυκλοφορεί σε 16 χώρες.

➤ Ο **ST39** με ποσοστό 8.7% (7/80) στην συλλογή μας. Θεωρείται από τους παλαιότερους και πλέον επιτυχημένους ανθεκτικούς κλώνους, έχοντας υποστεί διαφοροποίηση σε περισσότερα από ένα διατηρημένα γονίδια. Είναι ιδρυτής του κλωνικού συμπλέγματος CC39 που παγκοσμίως περιλαμβάνει 5 SLVs ενώ στο δικό μας eBURST (Διάγραμμα 9), είχαμε 1 SLV τον ST38 που είναι ένας ευαίσθητος στις μακρολίδες κλώνος. Κυκλοφορεί σε 17 χώρες.

➤ Ο **ST89** με μικρό ποσοστό 1.25% (1/80) στην συλλογή μας. Ο μοναδικός ανθεκτικός κλώνος που κυκλοφορεί και στις 6 ηπείρους.

Στις παγκόσμιες μελέτες, και οι τρεις κύριοι τύποι γονιδίων αντοχής ανερεύθησαν συνδεδεμένοι μ' αυτούς τους ευρέως διαδεδομένους κλώνους του *S. pyogenes* ενώ ο ST36 και ο ST46, βρέθηκαν συνδεδεμένοι με παραπάνω από ένα γονίδιο αντοχής συγχρόνως.

➤ Ο **ST382** με ποσοστό 2.5% (2/80) στην συλλογή μας. Αναφέρθηκε σε δημοσίευση για τοπικής εμβέλειας επιδημική έξαρση σε σχολείο στο Πίτσμπουργκ των ΗΠΑ. ⁽⁴²¹⁾

➤ Αξιοσημείωτο εύρημα στον μελετώμενο πληθυσμό μας αποτελούν τα στελέχη: **ST15** (3/80), **ST28** (18/80) και **ST99** (1/80). Τα στελέχη αυτά συνδέονται με επιδημίες ρευματικού πυρετού και εξάρσεις διεισδυτικών νόσων σε πολλές χώρες ^(422, 423, 424). Η παθογονικότητα αυτών των στελεχών φαίνεται να συνδέεται άμεσα με τον βαθμό έκκρισης της κάψας υαλουρονικού οξέος του *S. pyogenes*. Η άφθονη παραγωγή υαλουρονικού οξέος αυτών των στελεχών αποδίδεται με μια εικόνα βλενωδους (mucoid) μορφολογίας κατά την καλλιέργεια τους σε τρυβλία με αιματούχο άγαρ. Η άφθονη έκκριση της κάψας συσχετίστηκε με την λοιμογόνο δύναμη του στελέχους και ενώ ήταν γνωστή από παλαιότερες μελέτες, για πρώτη φορά επαναπροσδιορίστηκε ο ρόλος της στις ΗΠΑ το 2004 ^(423, 425), όπου παρατηρήθηκε μια χρονική συσχέτιση υψηλών συχνοτήτων περιπτώσεων ρευματικού πυρετού και αυξημένης παρουσίας βλενωδών στελεχών *S. pyogenes* που οδήγησε στην έρευνα και την τυποποίηση αυτών των στελεχών. Αν και έχει περάσει σχεδόν ένας αιώνας από την αναγνώριση της κάψας, η γρήγορη απώλεια της έκφρασης της όταν έρχεται σε επαφή με τεχνητά μέσα, με μικροβιοφόρες ουσίες κ.α. και κατά την διάρκεια ανάρρωσης από φορείς με φαρυγγίτιδα, δημιούργησε ερευνητικά προβλήματα για την αξιολόγηση του ρόλου της. Αν και πολλές σύγχρονες επιδημιολογικές μελέτες επικεντρώνονται στον παθογονικό χαρακτήρα της επιφανειακής αντιγονικής πρωτεΐνης M, ένα μεγάλο πλήθος κλινικών, επιδημιολογικών και πειραματικών στοιχείων συνηγορούν στο γεγονός ότι η έκφραση της κάψας μαζί με την πρωτεΐνη M μοιράζονται την συνεισφορά στην πρόκληση σοβαρών λοιμώξεων. ⁽⁴²⁶⁾ Δυστυχώς πολύ λίγα κλινικά εργαστήρια αναφέρουν την μορφολογία των καλλιέργειών του *S. pyogenes* και αυτή η παράλειψη οφείλεται κυρίως σε δύο λόγους: α) έλλειψη εξοικείωσης με την μορφολογία βλενωδών καλλιέργειών β) οι ταχείες δοκιμασίες ανίχνευσης του αντιγόνου της ομάδας A έχουν αντικαταστήσει την καλλιέργεια, κατά την εργαστηριακή διάγνωση των φαρυγγιτιδών. ⁽⁴²⁷⁾ Η ταχεία ανίχνευση του αντιγόνου της ομάδας A είναι πολύ χρήσιμη σαν αρνητικός προγνωστικός δείκτης GAS φαρυγγίτιδας, ωστόσο δεν προσφέρει καμία ένδειξη ως προς την πραγματική παθογένεια των λοιμογόνων στελεχών. Με τους τρόπους αυτούς διαφεύγουν σημαντικότερες ενδείξεις παθογόνων στελεχών υπεύθυνων για επιδημικές εξάρσεις.

Συμπερασματικά μπορεί να ειπωθεί ότι η μεγάλη κατανάλωση των μακρολιδών στην κοινότητα αποτελεί έναν ισχυρό προγνωστικό παράγοντα της εμφάνισης και της επικράτησης των ανθεκτικών GAS στελεχών. Οι ανθεκτικοί κλώνοι που έχουν έρθει για να κυριαρχήσουν μπορεί να εμφανίστηκαν απλώς και μόνο επειδή έτυχε να βρεθούν την κατάλληλη στιγμή στο κατάλληλο μέρος. Στο συμπέρασμα αυτό, συνηγορεί το γεγονός ότι οι επικρατούντες πληθυσμιακά κλώνοι όπως οι ST28, ST36, ST39, είναι επίσης συνδεδεμένοι με κάποιο γονίδιο αντοχής στις μακρολίδες. Ωστόσο το αντίθετο δεν ισχύει πάντα. Το πιο ενδεικτικό παράδειγμα αποτελεί ο κλώνος ST89 που ενώ είναι ο περισσότερο διαδεδομένος κλώνος σ' όλο τον κόσμο, είναι σχετικά σπάνιος, στο σύνολο όλων των κυκλοφορούντων στε-

λεχών του GAS, ανθεκτικών και μη. Έτσι το εύρημα των ST89 κλώνων είναι συνεπές με την άποψη ότι, τουλάχιστον σ' αυτήν την περίπτωση, η αντοχή στις μακρολίδες συμπίπτει μ' ένα μεγάλο άλμα επιτυχημένης μετάδοσης από άνθρωπο σε άνθρωπο. ⁽⁴²⁰⁾

4.6. *Streptococcus agalactiae*

Ο *Streptococcus agalactiae* ή στρεπτόκοκκος ομάδας Β (GBS), είναι ένα σημαντικό παθογόνο που συναντάται στους ανθρώπους και σε αγελάδες με μαστίπια ενώ σε άλλα είδη συναντάται μόνο περιστασιακά. Είναι η κύρια αιτία νεογνικής σηψαιμίας και μηνιγγίτιδας αλλά και μια συχνή αιτία της επιλόχειας σηψαιμίας στο Ηνωμένο Βασίλειο και στις ΗΠΑ. ^(428, 429) Θεωρείται ακόμη, ως ένα αναδυόμενο παθογόνο σε ηλικιωμένα άτομα και ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, με αυξανόμενη συχνότητα κατά την τελευταία δεκαετία. ⁽⁴³⁰⁾ Ωστόσο, ο GBS είναι συνήθως ένας συμβιωτικός μικροοργανισμός που μπορεί να απομονωθεί από το γεννητικό, ουροποιητικό και γαστρεντερικό σύστημα, σε ποσοστό πάνω από 35%, υγιών ενηλίκων ανδρών και γυναικών. ⁽⁴³¹⁾

Στην μελέτη μας που πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της MLST προσδιορίσαμε ότι η εξετασθείσα πληθυσμιακή δομή του GBS αποτελείται κυρίως από τέσσερις STs: **ST1**, **ST17**, **ST19**, **ST23** που αναπαριστούν πάνω από τα 2/3 των εξετασθέντων κλινικών στελεχών μας (85/118) με ποσοστό 72%. (Πίνακας 44) Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί απόλυτα με την αρχική μελέτη εφαρμογής της MLST που χρησιμοποίησε παγκόσμια κλινικά στελέχη και επιδημιολογικά δεδομένα. ⁽⁴³²⁾ Σύμφωνα μ' αυτή την μελέτη οι ST1 και ST19 συνδέονται συνήθως με καταστάσεις φορείας -υγιούς σε μεγαλύτερο ποσοστό- και σε μικρότερο ποσοστό με διεισδυτικές νόσους ενώ ο ST17 συνδέεται κυρίως με διεισδυτικές νεογνικές νόσους. Ενώ παλαιότερες μελέτες εμφανίζουν τους ST1 και ST19 ως ιδρυτές ξεχωριστών κλωνικών συμπλεγμάτων, στην δική μας μελέτη η εφαρμογή του αλγορίθμου eBURST απέδωσε ένα ενιαίο κλωνικό σύμπλεγμα (μέσω του ST197) το **CC19**, που μαζί με το κλωνικό σύμπλεγμα **CC23**, αποτελούν τα κύρια κλωνικά συμπλέγματα που αφορούν διεισδυτικές λοιμώξεις και περιστατικά αποικισμού σε ανθρώπους από GBS. ^(433, 434, 435)

➤ Στα κλινικά στελέχη των εγκύων γυναικών επικρατούν τα: **CC19** (45.5%), **CC23** (20.7%) και ο **ST17** (4%). Σύμφωνα με καναδική μελέτη ⁽⁴³⁶⁾ σ' αυτά τα κλωνικά συμπλέγματα ο ST19 είναι περισσότερο διαδεδομένος σε στελέχη που προκαλούν πρώιμη εμφάνιση της νόσου (λοιμώξη οξείας εισβολής-early onset disease EOD) ενώ ο ST17 προκαλεί όψιμη εκδήλωση της νόσου (λοιμώξη χρόνιας εισβολής-late onset disease LOD) αντίστοιχα. Επίσης στην ίδια μελέτη αναφέρεται ότι οι ST1, ST12 και ST23 απαντώνται συχνότερα σε έγκυες γυναίκες, γεγονός που συμφωνεί και με τα δικά μας αποτελέσματα. Μεταξύ των στελεχών διείσδυσης και αποίκησης των εγκύων, υπάρχει μια βασική ομάδα γονοτύπων που κυριαρχούν τόσο στην μελέτη μας όσο και σε άλλες μελέτες.

➤ Στα κλινικά στελέχη των νεογνών επικρατεί ο **ST17** (58.8%), γεγονός που συμφωνεί με τις παγκόσμιες επιδημιολογικές μελέτες και σε μικρότερο βαθμό ο **ST19** (18%). Τα στελέχη του CC17 είναι περισσότερο πιθανά να προκαλέσουν μηνιγγίτιδα από άλλους απαντώμενους γονότυπους. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνουν την συσχέτιση του ST17 και της νεογνικής νόσου σε δημοσιευμένες μελέτες από το Ηνωμένο Βασίλειο, την Σουηδία, την

Πορτογαλία, τις ΗΠΑ, και το Ισραήλ (⁴³⁷, ⁴³⁸, ⁴³⁹, ⁴⁴⁰) υποστηρίζοντας έτσι την ιδέα ότι τα στελέχη του CC17 έχουν μια αυξημένη ικανότητα διείσδυσης και πρόκλησης λοιμώξεων. Ειδικά ο κλώνος ST17 συνδέεται με την νεογνική στρεπτοκοκκική σηψαιμία και μηνιγγίτιδα. (⁴⁴¹) Επίσης οι κλώνοι ST17 και ST19 είναι περισσότερο διαδεδομένοι στα νεογνά παρά στις έγκυες γυναίκες.

Γενετικές μελέτες έχουν δείξει ότι το CC17 εμφανίζει μοναδικά λοιμογόνα αλληλόμορφα γονίδια, είναι σχετικά ομοιογενές, και έχει αποκλίσει ανεξάρτητα από άλλους γονότυπους, μ' ένα αποκλειστικό σύνολο χαρακτηριστικών παθογένειας. (⁴⁴²) Το ίδιο ισχύει και για το κλωνικό σύμπλεγμα CC61 (δεν περιλαμβάνεται στον υπό μελέτη πληθυσμό μας), που απαρτίζεται από στελέχη που προέρχονται αποκλειστικά από βοοειδή (αγελάδες με μαστίτιδα) και είναι πολύ συγγενές γενετικά με το CC17. Η σύγκριση των κλωνικών συμπλεγμάτων CC17 και CC61 είναι δυνατή χάρη στο πλεονεκτήματα που παρέχει η μέθοδος της MLST και της μελέτης της γενετικής συγγένειας των στελεχών του αλγορίθμου eBURST. Τα χαρακτηριστικά παθογένειας αυτών των συμπλεγμάτων είναι πιθανόν να αποκτήθηκαν αρχικά είτε μέσω σημειακής μετάλλαξης είτε γενετικού ανασυνδυασμού όπως αποδεικνύεται από το υψηλό επίπεδο διαφοροποίησης των διατηρημένων γονιδίων της MLST και για τα δύο συμπλέγματα (CC17 και CC61). Σε γενικές γραμμές, είναι πιθανό ότι η οικολογική επιτυχία και των δύο συμπλεγμάτων σε χωριστούς ξενιστές μπορεί να αποδοθεί σε μεταγενέστερη ανεξάρτητη απόκλιση. (⁴⁴³) Αυτή η υπόθεση επιβεβαιώνεται από στοιχεία, που αποδεικνύουν ότι τα GBS στελέχη στους ανθρώπους και στα βοοειδή αποτελούν διακριτούς πληθυσμούς. Σε μια μελέτη πάντως αναφέρεται ότι ο ST17 είναι πιθανόν να εξελίχτηκε από έναν γενετικό πρόγονο των βοοειδών, γεγονός που υποδεικνύει ίσως ότι αυτός ο σοβαρότατος επιδημικός κλώνος στον άνθρωπο μπορεί να προέρχεται από τα βοοειδή μέσω του γάλακτος ή του κρέατος. (⁴⁴⁴)

Ορισμένοι γονότυποι αποικισμού στις γυναίκες όπως οι ST1 και ST23, φαίνεται να είναι καλά προσαρμοσμένοι στο γυναικείο γεννητικό και ουροποιητικό σύστημα, να μπορούν να αποκτώνται πιο εύκολα μέσω της άμεσης επαφής και εν συνεχεία να μεταδίδονται σε ευπαθή νεογνά κατά την διάρκεια του τοκετού. Στην μελέτη μας ο ST17 ενώ φαίνεται ότι επικρατεί στα νεογνά (58.8%) αντίθετα στις έγκυες γυναίκες κατέχει ένα μικρό ποσοστό (4%), γεγονός που υποδεικνύει ότι τα νεογνά δεν επιμολύνονται από τον συγκεκριμένο κλώνο ST17 μόνο από τις μητέρες κατά την διάρκεια του τοκετού, αλλά πιθανόν και από άλλες πηγές. Το συγκεκριμένο συμπέρασμα θα ήταν περισσότερο ασφαλές εάν ο αριθμός των υπό μελέτη στελεχών των νεογνών ήταν μεγαλύτερος και ο έλεγχος δεν περιοριζόταν μόνο στα νεογνά αλλά επεκτεινόταν στις μητέρες των νεογνών καθώς και στο ιατρικονοσηλευτικό προσωπικό των κλινικών που ήταν υπεύθυνα για την φροντίδα των νεογνών, για πιθανή μετάδοση.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ζήτημα κεντρικής σημασίας για την επιδημιολογική επιτήρηση και για καίριες αποφάσεις στην Δημόσια Υγεία είναι η ικανότητα για τον ακριβή προσδιορισμό των στελεχών των μικροοργανισμών που φέρουν παθογόνους παράγοντες και προκαλούν ασθένειες. Πριν από την MLST δεν υπήρχαν εξ ολοκλήρου ικανοποιητικές μέθοδοι για την επίτευξη αυτού του στόχου. Πολλές από τις χρησιμοποιούμενες μεθόδους τυποποίησης έπασχαν από σημαντικά μειονεκτήματα όπως ανεπαρκή διακριτική ικανότητα, περιορισμένη διαθεσιμότητα αντιδραστηρίων, κακή αναπαραγωγιμότητα εντός και μεταξύ των εργαστηρίων καθώς και αδυναμία ποσοτικοποίησης των γενετικών σχέσεων μεταξύ των στελεχών. Η αξιολόγηση της MLST ως εργαστηριακής μοριακής τεχνικής αποδεικνύεται άριστη ως προς τις παραμέτρους της τυποποιητικής ικανότητας, αναπαραγωγιμότητας, διακριτικής ικανότητας, ευαισθησίας, ευκολίας στην εφαρμογή και μεθόδου με συνεχώς μειούμενο κόστος.

Στην πραγματικότητα οι μοριακές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για να αντιμετωπίσουν επιδημιολογικά δύο διαφορετικά ερωτήματα ενός προβλήματος. Πρώτον: τα στελέχη που ανακτώνται από μια τοπική έξαρση μιας νόσου (outbreak) είναι ίδια, συγγενή ή διαφορετικά; (βραχυπρόθεσμη ή τοπική επιδημιολογία). Δεύτερον: τα στελέχη που προκαλούν νόσο σε μια συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή, πώς συνδέονται με ανάλογα στελέχη από άλλη γεωγραφική περιοχή ή με εκείνα τα παθογόνα στελέχη που απομονώθηκαν σε παγκόσμιο επίπεδο; (μακροπρόθεσμη ή παγκόσμια επιδημιολογία). Άλλες μέθοδοι είναι κατάλληλες για διερεύνηση τοπικής επιδημιολογίας και άλλες για μακροπρόθεσμη επιδημιολογία αλλά και στις δύο περιπτώσεις θα πρέπει να έχουν υψηλή διακριτική ικανότητα έτσι ώστε τα στελέχη που καταχωρούνται σ' έναν τύπο να είναι πιθανοί απόγονοι ενός πρόσφατου κοινού προγόνου και στελέχη που μοιράζονται έναν πιο μακρινό πρόγονο να μην καταχωρούνται στον ίδιο τύπο. Αυτό το υψηλό επίπεδο διάκρισης των στελεχών, όπως είδαμε, μπορεί να επιτευχθεί με δύο αρκετά διαφορετικούς τρόπους. Στη μια προσέγγιση, εντοπίζονται μεμονωμένες ή αχαρακτήριστες περιοχές του γονιδιώματος που είναι εξαιρετικά μεταβλητές μέσα στον βακτηριακό πληθυσμό. Δημοφιλείς μέθοδοι αυτής της προσέγγισης είναι η PFGE, η ριβοτυπία, σύστημα PCR με επαναλαμβανόμενα στοιχεία DNA κ.α. Σ' αυτές τις μεθόδους επιλέγονται κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα ή εκκινητές PCR που να εντοπίζουν μια μέγιστη διακύμανση σ' έναν πληθυσμό. Στη συνέχεια η διακύμανση που καταχωρείται, εξελίσσεται πάρα πολύ γρήγορα αλλά συνήθως για άγνωστους λόγους. Τέτοιες τεχνικές είναι συνήθως κατάλληλες για τοπικές επιδημιολογικές μελέτες διότι αναγνωρίζουν και τις μικροδιακυμάνσεις που απαιτούνται για την διάκριση των στελεχών σε μια γεωγραφική περιοχή, σε συνδυασμό όμως με τα μη ή δυσκόλως συγκρίσιμα αποτελέσματα, μπορεί να είναι παραπλανητικές για την παγκόσμια επιδημιολογία, ταιριάζοντας στην έκφραση ότι «βλέπουν το δέντρο αλλά μπορεί να χάνουν το δάσος». Σε αντίθετη προσέγγιση είναι η MLST που χρησιμοποιεί διακυμάνσεις που συσσωρεύονται πολύ αργά και τα υψηλά επίπεδα διάκρισης επιτυγχάνονται με την χρήση πολλών γενετικών τόπων, ενώ βασιζόμενη στην αμερόληπτη και αδιαμφισβήτητη ανάλυση αλληλουχίας νουκλεοτιδίων των διατηρημένων γονιδίων, επιτυγχάνει υψηλά επίπεδα διάκρισης τόσο στην τοπική όσο και στην παγκόσμια επιδημιολογία.

Ο πιο σημαντικός περιορισμός των άλλων μεθόδων τυποποίησης είναι η δυσκολία της σύγκρισης των αποτελεσμάτων τους που επιτυγχάνονται από τα διαφορετικά εργαστήρια. Σ' αυτό το επίπεδο η MLST υπερέρχει έναντι όλων των άλλων μεθόδων, διαθέτοντας έναν πλή-

πως ενημερωμένο Διαδικτυακό τόπο, χαρακτηριζόμενη ως μέθοδος με εύκολη διακίνηση ηλεκτρονικών δεδομένων (portable) και επεκτάσιμη διότι μπορεί να εφαρμοστεί σχεδόν σε όλα τα βακτηριακά είδη και σε απλοειδείς οργανισμούς. Κάθε ερευνητής της MLST χρησιμοποιεί το ίδιο σχήμα γονιδίων για ένα είδος βακτηρίου, τους ίδιους εκκινητές στις PCR, καθιστώντας τα αποτελέσματα απολύτως συγκρίσιμα και η εκχώρηση των STs πραγματοποιείται μόνο μέσω της σύγκρισης, των κατά τόπους αποτελεσμάτων, με τις βάσεις δεδομένων της. Αυτό επιβάλλει μια κοινή ονοματολογία των στελεχών των βακτηρίων, χρησιμοποιούμενη πλέον σε πολυάριθμες δημοσιεύσεις, χαρακτηριζόμενη ως «κοινό λεξικό» ή «κοινή γλώσσα». Με τα διαγράμματα eBURST, μορφοποιεί και ποσοτικοποιεί τις γενετικές σχέσεις μεταξύ των στελεχών ενός είδους, δημιουργώντας με τα κλωνικά συμπλέγματα, πρότυπα συγγένειας και συγχρόνως μια ισχυρή πηγή πληροφοριών για την τοπική και την παγκόσμια επιδημιολογία.

Με την εφαρμογή της MLST για την μοριακή τυποποίηση στελεχών Gram-θετικών κόκκων καταλήξαμε ότι οι κυριότεροι πληθυσμιακά κλώνοι που προσδιορίστηκαν και κυκλοφορούν στην Ελλάδα είναι: στον *E. faecium* οι ST412, ST17, ST203, στον *E. faecalis* οι ST28, ST6, ST9, στον *S. aureus* οι ST80, ST225, ST239, στον *S. epidermidis* οι ST22, ST2, ST35, στον *S. pyogenes* οι ST36, ST28, ST101 και στον *S. agalactiae* οι ST1, ST22 και ST17. Η σύγκριση τους με παγκόσμιους επιδημικούς κλώνους έδειξε ότι στα ελληνικά νοσοκομεία κυκλοφορούν παθογόνοι κλώνοι παγκόσμιας εμβέλειας και είναι αναγκαίο να παρθούν αυστηρότερα μέτρα πρόληψης και αναχαίτισης της διασποράς τους. Ο σημερινός παγκοσμιοποιημένος τρόπος ζωής με τα ταξίδια και τις συχνές μετακινήσεις πληθυσμών (σπουδές, εργασία) επηρεάζουν άμεσα την επιδημιολογία των λοιμώξεων και τα αποτελέσματα μας θα αποτελέσουν μια βάση σύγκρισης για μελλοντικές επιδημιολογικές μελέτες, παρακολούθησης της διασποράς των συγκεκριμένων κλώνων στην Ελλάδα και της μελλοντικής διαφοροποίησης τους με τον χρόνο.

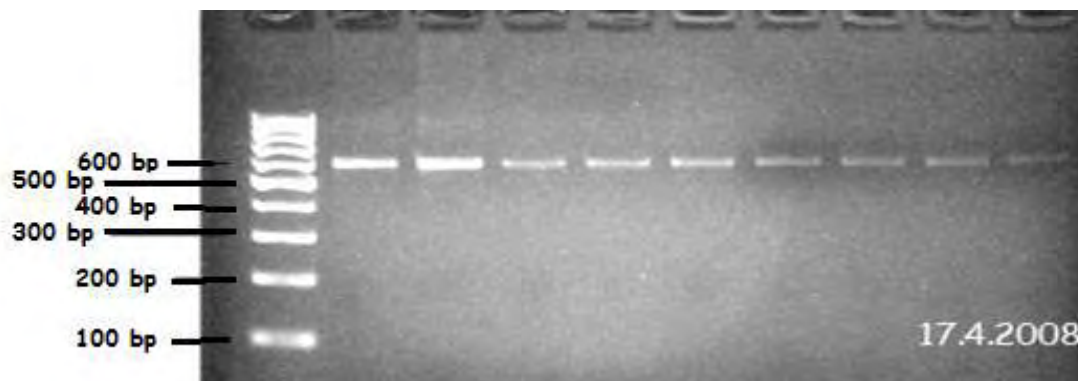
Η σημασία της κατανόησης της πληθυσμιακής γενετικής και της εξέλιξης των μικροβιακών παθογόνων αυξάνεται τα τελευταία χρόνια ως αποτέλεσμα της εξάπλωσης και της εκ νέου εμφάνισης πολλών μολυσματικών ασθενειών και τις επιπτώσεις τους για τη δημόσια υγεία. Η αποδοχή της MLST ως μεθόδου «gold standard» στην βακτηριακή τυποποίηση, παρέχει στην μέθοδο την αξιοπιστία και τα ισχυρά εργαλεία τόσο για επιδημιολογικές έρευνες όσο και για εξελικτικές μελέτες. Τα σχήματα της MLST που εφαρμόστηκαν σε διαφοροποιημένες συλλογές βακτηρίων από διάφορες οικολογικές πηγές και γεωγραφικές περιοχές, έχουν βελτιώσει όχι μόνο την παρακολούθηση των κλινικά σχετιζόμενων (ιδιαίτερα των παθογόνων ή ανθεκτικών) κυκλοφορούντων κλώνων σε παγκόσμιο επίπεδο, αλλά παρέχουν επίσης μια πιο λεπτομερή εικόνα της δομής του πληθυσμού των εν λόγω παθογόνων. Η MLST αποκάλυψε μια εκτεταμένη γενετική διαφοροποίηση στα μελετώμενα παθογόνα με βαθιές διαφορές στους μηχανισμούς που καθοδηγούν τις γενετικές παραλλαγές. Σε αδρές γραμμές οι διαφοροποιήσεις αυτές παρουσιάστηκαν μέσα από την συζήτηση για κάθε βακτήριο και σταχυολογώντας μπορούμε να αναφέρουμε κάποια παραδείγματα. Η συγκριτική σπουδή των αλληλόμορφων των διατηρημένων γονιδίων με την ανάλυση της αλληλουχίας τους αποκαλύπτει την επικράτηση της μετάλλαξης ή του ανασυνδυασμού ως κινητήριας δύναμης διαφοροποίησης των κλώνων και την αποκάλυψη ως εκ τούτου αρχαίων ή πρό-

σφατων γενεαλογιών των κλωνικών συμπλεγμάτων αντίστοιχα. Σαν αποτέλεσμα της διαφοράς της ροής των γονιδίων στον *S.aureus* (μετάλλαξη ή ανασυνδυασμός) προτάθηκε η αναγωγή των κλωνικών συμπλεγμάτων του σε νέα βιολογικά είδη. Αντίθετα στον *S. pyogenes* η καθοδηγούσα διαφοροποιητική δύναμη των κλώνων του, αποδείχτηκε ο ανασυνδυασμός, που πραγματοποιείται μέσω μεταγωγής (transduction) και σύζευξης (conjugation), παράγοντας κλωνικά συμπλέγματα πολύ πρόσφατων γενεών. Οι εντερόκοκκοι *E.faecium* και *E.faecalis* επιδεικνύουν όπως και ο *S. aureus* ένα ευρύ φάσμα ξενιστών αλλά όπως και στον *S. pyogenes* η διαφοροποίηση καθοδηγείται κυρίως με ανασυνδυασμό παρά με μετάλλαξη. Η γενετική τους διαφοροποίηση περιλαμβάνει υιοθέτηση κινητών γενετικών στοιχείων και σύζευξης περισσότερο στα πλασμίδια αλλά και στα MLST γονίδια.

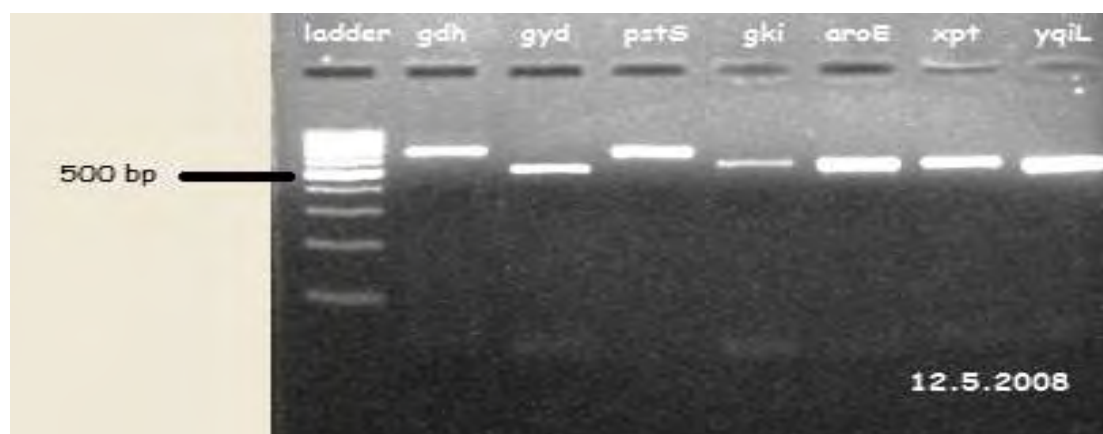
Μια μελλοντική προσέγγιση της MLST με ενσωμάτωση βιολογικής συστημικής που θα περιλαμβάνει αντιγραφικές, πρωτεϊνοσυνθετικές και μεταβολικές αναλύσεις καθώς λειτουργικές μελέτες μοντέλων ζωικών λοιμώξεων θα αποκαλύψουν νέες λεπτομέρειες στην εσωτερική δομή των βακτηριακών πληθυσμών. Επιπλέον η βελτίωση της Ανάλυσης Αλληλουχίας μέσω της ταχείας εξάπλωσης και της μείωσης του κόστους των νέων τεχνικών αλληλούχισης δεύτερης, τρίτης ή και επόμενης γενιάς (που αναφέρονται στο Παράρτημα) θα δώσει έναν αυξανόμενο αριθμό εντεροκοκκικών, σταφυλοκοκκικών και στρεπτοκοκκικών γονιδιωμάτων, πλήρως αλληλουχημένων, προσφέροντας την δυνατότητα της μοριακής συσχέτισης των γονιδίων με την ειδικότητα μιας νόσου. Αυτό μπορεί να ανοίξει οδούς για νέες προσεγγιστικές παρεμβάσεις στα βακτηριακά γονιδιώματα και τέτοιες ερευνητικές προκλήσεις που ενδεχόμενα θα καταρρίψουν όλα τα όρια μεταξύ βιοχημείας, οικολογίας, βιοπληροφορικής, επιδημιολογίας και μικροβιολογίας και θα είναι ίσως η πιο βαθιά κληρονομιά της γονιδιωματικής επανάστασης.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

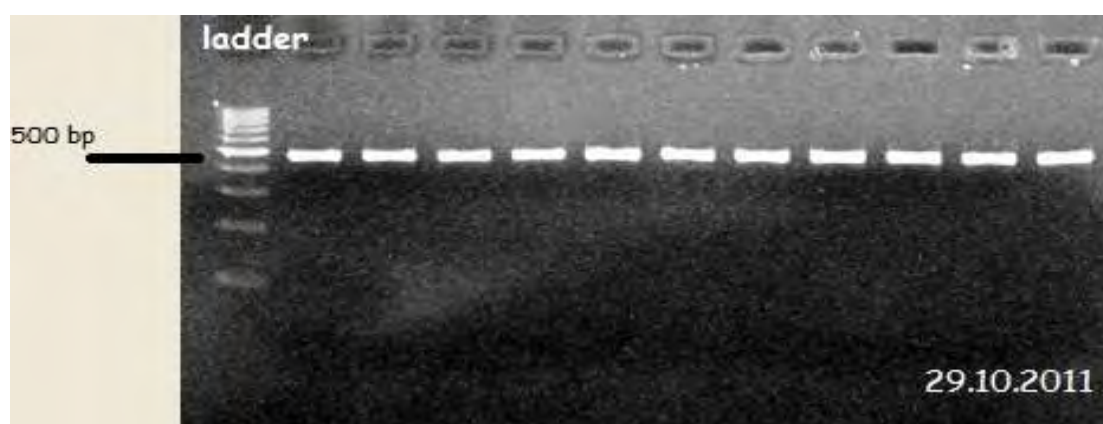
Π1. Χαρακτηριστικές εικόνες ηλεκτροφόρησης γονιδίων σε πήκτωμα αγαρόζης των υπό μελέτη μικροοργανισμών.



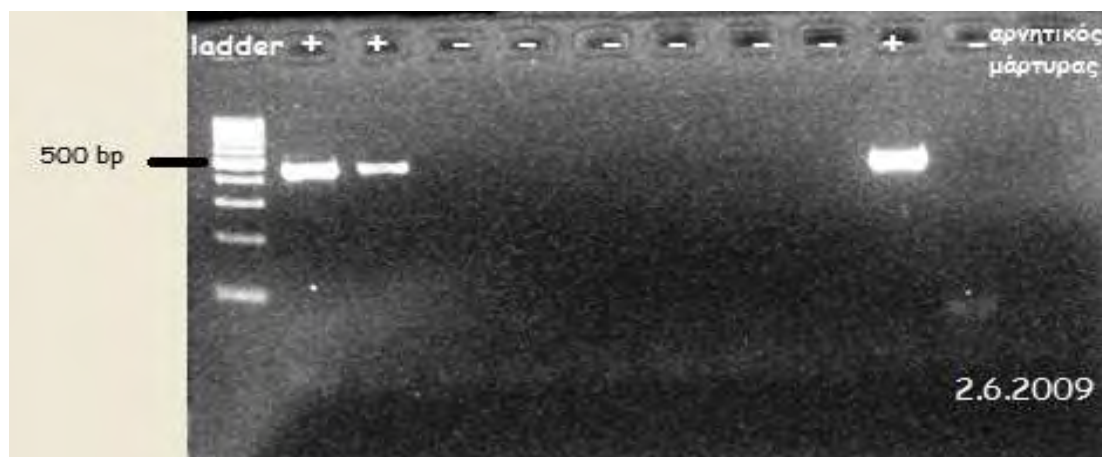
Εικόνα 40. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης του γονιδίου *pstS* μεγέθους 583 bp σε εννέα στελέχη *Enterococcus faecium*.



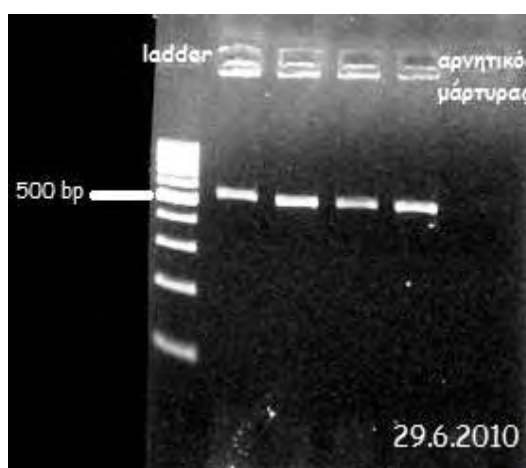
Εικόνα 41. Ηλεκτροφόρηση και των επτά διατηρημένων γονιδίων ενός στελέχους *Enterococcus faecalis* σε πήκτωμα αγαρόζης.



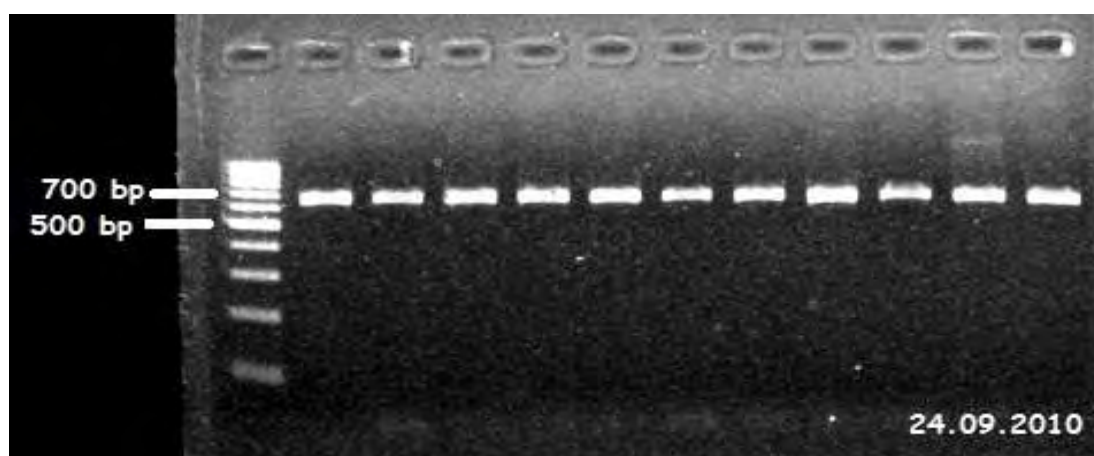
Εικόνα 42. Ηλεκτροφόρηση του γονιδίου *pta* μεγέθους 474 bp σε πήκτωμα αγαρόζης σε έντεκα στελέχη *Staphylococcus aureus* μετά από την ενίσχυση τους με PCR.



Εικόνα 43. Ηλεκτροφόρηση του παθογονικού γονιδίου *PVL* (Panton Valentine Leukocidin) του *Staphylococcus aureus*, μιας εξωτοξίνης που ενοχοποιείται για λοιμώξεις του δέρματος, των μαλακών μορίων και της νεκρωτικής πνευμονίας. Από τα δέκα εξετασθέντα σπυρίδια της εικόνας τα τρία είναι θετικά και τα επτά αρνητικά.



Εικόνα 44. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης του γονιδίου *pheS* του *Streptococcus agalactiae* μεγέθους 501 bp.



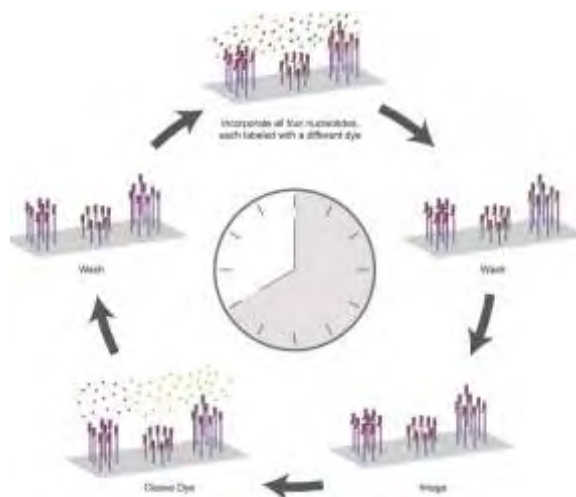
Εικόνα 39. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης του α' προϊόντος PCR του γονιδίου *sdhA* του *Streptococcus agalactiae* μεγέθους 646 bp.

Π2. Νεώτερες Μέθοδοι στην Τεχνολογία της Αλληλούχισης του DNA

➤ Sequencing by synthesis

Ο προσανατολισμός σε τεχνολογίες ανάλυσης αλληλουχίας με μικρότερο κόστος, μεγαλύτερη παραγωγικότητα και μεγαλύτερο όγκο δειγμάτων για ανάλυση, αποτέλεσε το κίνητρο πολλών βελτιώσεων μετά το 2005, με την εμφάνιση των **τεχνολογιών αλληλούχισης δευτέρας γενιάς**. Η τεχνολογική αυτή προσέγγιση χαρακτηρίζεται από ανάλυση αλληλουχίας μέσω σύνθεσης με κοινό γνώρισμα όλων των τεχνολογιών δευτέρας γενιάς, την αγκύρωση δεκάδων χιλιάδων τμημάτων DNA προς ανάλυση, σε συγκεκριμένες θέσεις και σειρά επιτυχημένων κύκλων «πλουσίματος-ανάγνωσης». ⁽¹⁹⁸⁾

Οι κύκλοι συμπληρώνονται με την απομάκρυνση της φθορίζουσας χρωστικής των νουκλεοτιδίων που έχουν ενσωματωθεί και η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι του σημείου που οι αντιδράσεις να μην είναι πλέον εφαρμόσιμες. Η αγκύρωση των τμημάτων DNA χαρακτηρίζεται από πολύ μεγάλη πυκνότητα, με αποτέλεσμα δραματική αύξηση της παραγωγικότητας και μείωση του κόστους, όταν μάλιστα οι αναλυτές αλληλουχίας λειτουργούν στο maximum των δυνατοτήτων τους. Για παράδειγμα η παραγωγικότητα του αναλυτή HiSeq της εταιρείας Illumina είναι περίπου 300 gigabases κατά την διάρκεια ενός κύκλου. ⁽⁴⁴⁵⁾



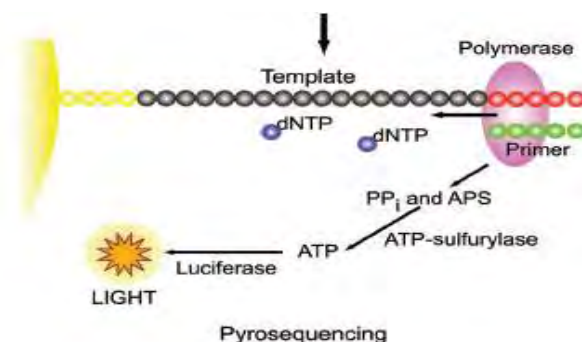
Εικόνα 45. Ο κύκλος «πλουσίματος-ανάγνωσης», που χαρακτηρίζει τις τεχνολογίες ανάλυσης αλληλουχίας Δεύτερης Γενιάς.

➤ Pyrosequencing

Η τεχνική αυτή βασίζεται στον προσδιορισμό της πυροφωσφορικής ομάδος (pyrophosphate), η οποία απελευθερώνεται μετά την ενσωμάτωση ενός νουκλεοτιδίου.

Η συγκεκριμένη ομάδα είναι απαραίτητη κατά την διαδικασία αντιγραφής του DNA. Ειδικότερα δε, περιλαμβάνει μια αλυσίδα τριών φωσφορικών ομάδων, η μία εκ των οποίων χρησιμεύει για την δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού κατά την επιμήκυνση του DNA, ενώ οι άλλες δύο απελευθερώνονται ως πυροφωσφορική ομάδα (PPi). Μέσω μιας σειράς αντιδράσεων η απελευθέρωση της πυροφωσφορικής ομάδος μετατρέπεται σε φωτεινό σήμα, η ένταση του οποίου εξαρτάται από τον αριθμό των νουκλεοτιδίων που ενσωματώνονται. Το

σήμα που παράγεται, καταγράφεται μέσω ανιχνευτή σε ένα διάγραμμα, το πυρόγραμμα (Pyrogram), όπου το ύψος του σήματος αντιστοιχεί στο αριθμό των νουκλεοτιδίων που έχουν ενσωματωθεί.

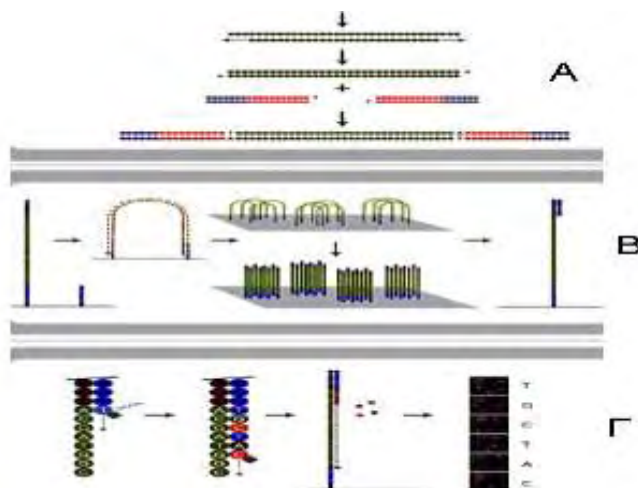


Εικόνα 46. Καταρράκτης αντιδράσεων για την παραγωγή σήματος με την απελευθέρωση της πυροφωσφορικής ομάδος (PP_i) μετά την ενσωμάτωση ενός νουκλεοτιδίου (APS-adenosine 5'-phosphosulfate).

Τα νουκλεοτίδια που δεν χρησιμοποιήθηκαν καταβόλιζονται από το ένζυμο *apyrase*, και με το πέρας αρχίζει νέος κύκλος αντίδρασης με την προσφορά του επομένου νουκλεοτιδίου. Το είδος των νουκλεοτιδίων που ενσωματώνονται είναι γνωστά εκ των προτέρων, μέσω της σειράς που αυτά προσφέρονται στην αντίδραση. (^{446, 447, 448})

➤ **Sequencing by reversible dye terminators**-Μέθοδος Solexa/Illumina

Στηρίζεται σε αναστρέψιμη διαδικασία τερματισμού που επιτυγχάνεται με την αποκοπή της μονάδας τερματισμού, η οποία φέρει και την σήμανση με φθορίζουσα χρωστική για την αναγνώριση της βάσης, αμέσως μετά την αναγνώριση του συγκεκριμένου νουκλεοτιδίου.



Εικόνα 47.

- A.** Τροποποίηση των τμημάτων DNA με προσθήκη ολιγονουκλεοτιδίου-προσαρμογέα
- B.** Ενίσχυση των τμημάτων μετά από ακινητοποίηση αυτών με ολιγονουκλεοτίδια συμπληρωματικά ως προς τον προσαρμογέα και την δημιουργία της χαρακτηριστικής γεφύρωσης με τα παρακείμενα. Μετά από αρκετούς γύρους ενίσχυσης, επιτυγχάνεται η δημιουργία ομάδων τμημάτων DNA με ίδια αλληλουχία.
- Γ.** Αποδιάταξη και ανάλυση αλληλουχίας με διακοπή του τερματισμού (απομάκρυνση του ddNTPs).

Η διαφορετική προσέγγιση αφορά την ανάλυση αλληλουχίας με την μέθοδο απομάκρυνσης της χρωστικής μαζί με την μονάδα τερματισμού. Ο νεωτερισμός της μεθόδου χαρακτηρίζει κυρίως τον τρόπο ενίσχυσης των τμημάτων προς αλληλούχιση.

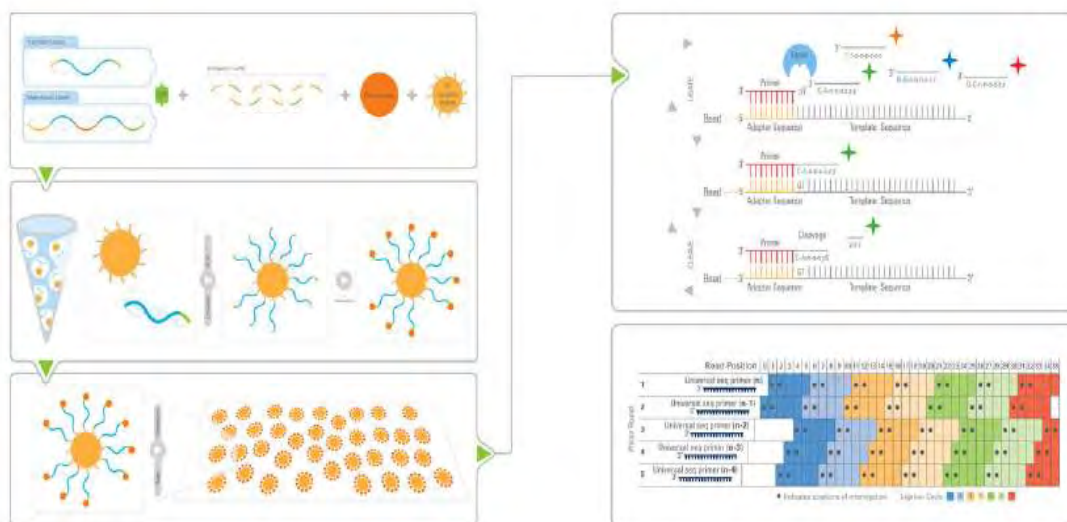
Εν συντομία το DNA, το οποίο πρόκειται να αναλυθεί, χωρίζεται σε μικρότερα τμήματα και το καθένα από αυτά υπόκειται σε τροποποίηση με έναν προσαρμογέα (adaptor), συμπληρωματικό με ακινητοποιημένο ολιγονουκλεοτίδιο. Με τον τρόπο αυτό έχοντας την ακινητοποίηση σε συγκεκριμένη θέση τμήματος του DNA και με την δημιουργία γέφυρας, στο ελεύθερο άκρο του, με το παρακείμενο, επίσης συμπληρωματικό ολιγονουκλεοτίδιο, επιτυγχάνεται η ενίσχυση. Μετά την ενίσχυση ακολουθεί αποκοπή των τμημάτων, με τρόπο ώστε να δημιουργηθούν μονόκλινα ακινητοποιημένα τμήματα DNA και η ανάλυση αλληλουχίας πραγματοποιείται μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων αντιγραφής-ανάγνωσης. Τελικά οι μονάδες τερματισμού αποκόπτονται και απομακρύνονται με πλύση μαζί με την χρωστική δηλαδή το σημασμένο διδεοξινουκλεοτίδιο ddNTP.

➤ Sequencing by ligation

Σε διαφορετική τεχνολογική προσέγγιση βασίζεται η μέθοδος ανάλυσης αλληλουχίας με χρήση του ενζύμου λιγάσης. Στην μέθοδο αρχικά έχουμε τον κατακερματισμό της αρχικής αλληλουχίας σε μικρότερα τμήματα, στα οποία προστίθεται ένα ολιγονουκλεοτίδιο-προσαρμογέα, μέσω του ενζύμου λιγάσης. Αυτά τα τροποποιημένα τμήματα του DNA υβριδοποιούνται με συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια που βρίσκονται στην επιφάνεια μαγνητικών σωματιδίων. Τα σωματίδια περιέχουν γαλάκτωμα, μέσα στο οποίο λαμβάνουν χώρα οι αντιδράσεις ενίσχυσης των τμημάτων. Με το τέλος της ενίσχυσης και καταστροφής του γαλακτώματος, τα μαγνητικά σωματίδια σταθεροποιούνται σε γυάλινη επιφάνεια, όπου και λαμβάνει χώρα η ανάλυση αλληλουχίας. Στην ανάλυση αλληλουχίας χρησιμοποιείται ένας «παγκόσμιος εκκινητής», συμπληρωματικός της αλληλουχίας του ολιγονουκλεοτιδίου-προσαρμογέα, και επαναλαμβανόμενοι κύκλοι συρραφής μέσω λιγάσης (ligation cycles) και οκταμερών συνθετικών νουκλεοτιδίων, έχοντας τα δύο πρώτα νουκλεοτίδια με όλους τους πιθανούς συνδυασμούς των τεσσάρων βάσεων του DNA και φέρουν σήμανση διαφορετική για κάθε είδος οκταμερούς. Σε κάθε κύκλο, τα δύο πρώτα νουκλεοτίδια αντιδρούν συμπληρωματικά, με αντίστοιχα της αρχικής αλληλουχίας, ανίχνευση της χρωστικής και τελικώς την αποκοπή τμήματος του οκταμερούς με την χρωστική μεταξύ της πέμπτης και έκτης βάσης του οκταμερούς. Μετά από αρκετούς κύκλους ο αρχικός εκκινητής απομακρύνεται και χρησιμοποιείται νέος εκκινητής, μικρότερος κατά μία βάση ($n-1$). (449, 450)

Γενικά όμως η σχέση χρόνου και αποτελέσματος, όλων των τεχνολογιών ανάλυσης αλληλουχίας δεύτερης γενιάς, είναι μεγάλη με διάρκεια συνήθως αρκετές μέρες, διότι απαιτείται μεγάλος αριθμός κύκλων «πλυσίματος-ανάγνωσης». Επί πλέον με την πρόοδο της ενσωμάτωσης των νουκλεοτιδίων, η αντίδραση βαίνει ασύγχρονα.

Αυτή η απώλεια του συγχρονισμού (καλείται και διαφορά φάσης-dephasing) είναι η αιτία του αυξημένου «θορύβου» και των λαθών στην αποτελεσματική ανάλυση αλληλουχίας, έτσι ώστε να υπολείπεται, ως προς την ακρίβεια, έναντι των τεχνολογιών πρώτης γενιάς, όσο αυξάνει το μέγεθος των τμημάτων του DNA προς ανάλυση. (198, 451)



Εικόνα 48. Ανάλυση αλληλουχίας με την μέθοδο SOLiD (Applied Biosystems).

Sequencing method	Pyro sequencing	Reversible Dye Terminators	Sequencing by ligation	Sanger Dye Terminators
Read lengths	400 bases	36 bases	35 bases	800 bp
Run Time	10 h	2.5 days	6 days	3h
Total bases per Run	500 Mb	1,5 Gb	4 Gb	800 bp

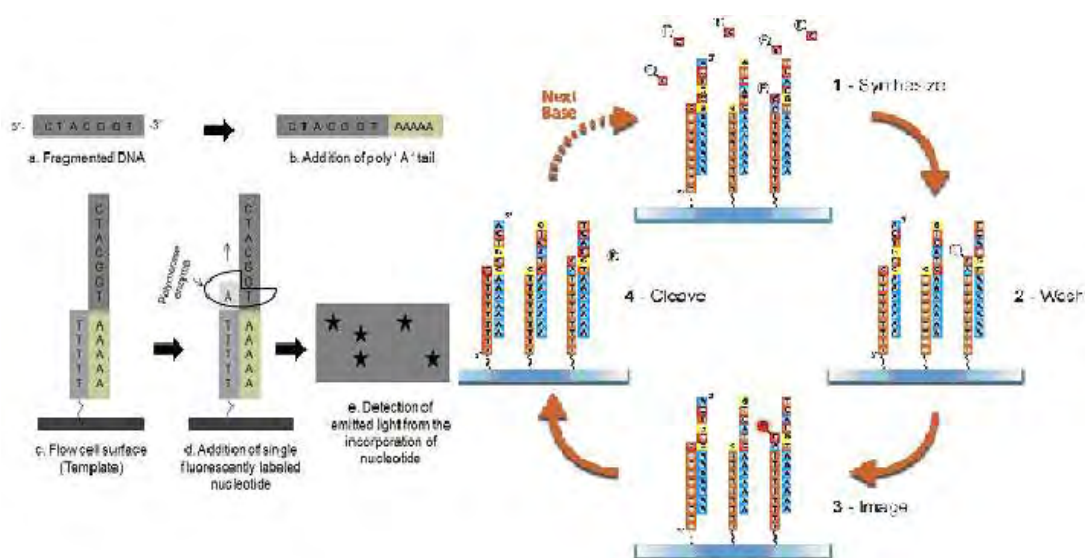
Πίνακας 47. Σύγκριση των μεθόδων αλληλούχισης δεύτερης γενιάς σε σχέση με την μέθοδο Sanger.

Με τις μεθοδολογίες αυτές, η ανάγκη χρήσης μεγάλου αριθμού τμημάτων DNA προς ανάλυση, καθιστά απαραίτητη την προηγούμενη ενίσχυση των τμημάτων αυτών σε πολύ μεγάλο αριθμό. Κατά την διαδικασία της ενίσχυσης δημιουργούνται κάποιες αποκλίσεις από την πρότυπη αλληλουχία και η όλη διαδικασία επισωρεύει λάθη στην τελική ανάλυση αλληλουχίας. Επίσης στο τελικό στάδιο επεξεργασίας το σύνολο των δεδομένων είναι τεράστιο και αποτελεί από μόνο του πρόκληση τόσο στην επεξεργασία του όσο και στην αποθήκευση του.

➤ **Single-Molecule Sequencing (SMS)**

Όπως είναι φανερό με όλους τους περιορισμούς των μεθόδων ανάλυσης αλληλουχίας δεύτερης γενιάς, τον χρόνο προετοιμασίας δειγμάτων (κατακερματισμό και ενίσχυση μέσω PCR), την μικρότερη ακρίβεια ανάλυσης, τον μεγαλύτερο χρόνο ανάλυσης, τον τεράστιο όγκο δεδομένων που παράγονται, οι έρευνες προσανατολίσθηκαν στην κατεύθυνση της ανάλυσης αλληλουχίας άμεσα σε μοριακό επίπεδο, με την προσπάθεια ανίχνευσης του κάθε νουκλεοτιδίου στην αλληλουχία του DNA. Η τεχνολογία φέρει το όνομα **Single-Molecule Sequencing (SMS)** και η προσέγγιση αυτή θεωρείται από άποψη εξέλιξης, **Τρίτης Γενιάς Ανάλυση Αλληλουχίας ή και Επόμενης Γενιάς** (third generation sequencing or next next generation sequencing).

Μία μέθοδος αυτής της προσέγγισης, είναι της εταιρείας Helicos Bioscience με το όνομα **True Single-Molecule Sequencing (tSMS)**. Για την εφαρμογή αυτής της μεθόδου δεν απαιτείται η προηγούμενη ενίσχυση των τμημάτων του DNA, περιλαμβάνει όμως τους επαναλαμβανόμενους κύκλους „πλυσίματος-ανάγνωσης“ των τεχνολογιών Δεύτερης Γενιάς. Εν συντομία, αρχικά το DNA τέμνεται σε μικρότερα τμήματα και προστίθεται σε κάθε τμήμα ένας poly-A ολιγονουκλεοτίδιο-προσαρμογέας. Εν συνεχεία τα τμήματα του DNA ακινητοποιούνται με υβριδισμό μεταξύ του προσαρμογέα και ενός συμπληρωματικού poly-T ολιγονουκλεοτιδίου. (Εικόνα 43). Εν συνεχεία, ακολουθεί η φάση Ανάλυσης Αλληλουχίας με σύνθεση, κατά την οποία τα τμήματα εκτίθενται σε δράση DNA πολυμεράσης και ενός σημασμένου νουκλεοτιδίου διαφορετικού σε κάθε κύκλο. Μετά την ενσωμάτωση του σημασμένου νουκλεοτιδίου, γίνεται ανίχνευση του σήματος και απομάκρυνση της φθορίζουσας ομάδας. Ακολουθεί νέος κύκλος με διαφορετικό σημασμένο νουκλεοτίδιο.



Εικόνα 49. Μέθοδος ανάλυσης αλληλουχίας **tSMS** (next next generation Sequencing)

Οι μέθοδοι SMS μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τρεις κατηγορίες:

- σε τεχνολογίες που βασίζονται στην ανάλυση του DNA, σε επίπεδο του ενός μορίου καθώς η DNA πολυμεράση ενσωματώνει ένα συγκεκριμένο νουκλεοτίδιο.
- σε τεχνολογίες στις οποίες γίνεται χρήση μικροπόρων (nanopore-sequencing) και η αναγνώριση του νουκλεοτιδίου λαμβάνει χώρα κατά την διάρκεια της διέλευσης αυτού μέσω των μικροπόρων.
- και σε τεχνολογίες όπου η ανάλυση της αλληλουχίας στηρίζεται στην αναγνώριση ενός συγκεκριμένου νουκλεοτιδίου με τεχνικές μικροσκοπίας. Οι τεχνολογίες Ανάλυσης Αλληλουχίας DNA Τρίτης Γενιάς βρίσκονται στο στάδιο της ανάπτυξης, με πολλά πλεονεκτήματα αλλά και μειονεκτήματα. Επί πλέον δεν υπάρχει επαρκής βιβλιογραφική τεκμηρίωση αυτών των τεχνολογιών για τους προφανείς λόγους ανταγωνιστικότητας μεταξύ των εταιριών, κάτι το οποίο μελλοντικά αναμένεται από τους ανά τον κόσμο ερευνητές. Το βέβαιο είναι ότι η πλήρης ανάπτυξη αυτών των τεχνολογικών προσεγγίσεων θα επιφέρει μεγάλη μείωση του κόστους ανά νουκλεοτίδιο, θα μειώσει τον χρόνο ανάλυσης και βέβαια θα αυξήσει την ακρίβεια του αποτελέσματος. (197, 445)

Π3.**➤ ATP-Binding Cassette Transporters ή ABC μεταφορείς**

Πρόκειται για διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας την υδρόλυση του ATP για την μεταφορά διαφόρων ουσιών (ιόντων, σακχάρων, λιπιδίων, στερολών, πεπτιδίων, πρωτεϊνών και φαρμάκων) μέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Εκτός της διακίνησης ουσιών, μέλη της οικογένειας λαμβάνουν μέρος στην μετάφραση του RNA και στην επιδιόρθωση του DNA. (^{452, 453})

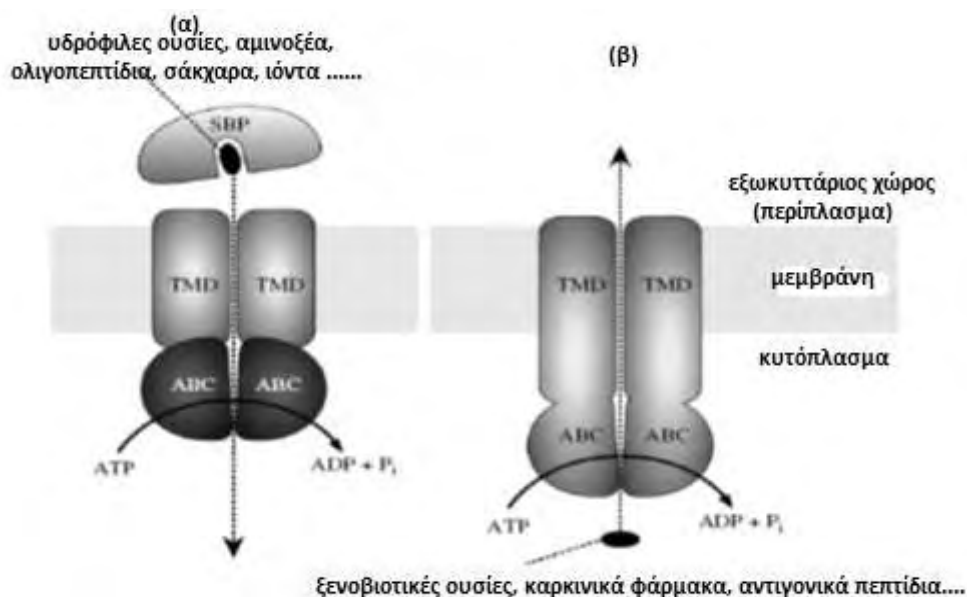
Τα μέλη της οικογένειας χωρίζονται, αναλόγως της λειτουργίας τους, σε τρεις μεγάλες κατηγορίες:

A) Πρωτεΐνες-εισαγωγείς (importers) διαφόρων ουσιών, απαραίτητων στον μεταβολισμό και στην θρέψη των κυττάρων. Η κατηγορία αυτή απαντάται αποκλειστικά στους προκαρυωτικούς οργανισμούς και οι ουσίες που μεταφέρονται μέσω των πρωτεϊνών αυτών (ιόντα, σάκχαρα, λιπίδια, στερόλες, πεπτιδία, πρωτεΐνες και φάρμακα) είναι οι περισσότερες υδρόφοβες ουσίες και πρέπει να προστατευθούν κατά την μεταφορά τους από το υδρόφιλο περιβάλλον των κυτταρικών μεμβρανών. Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, οι ABC-εισαγωγείς είναι κρίσιμοι παράγοντες για την επιβίωση των κυττάρων και δεν απαντώνται στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.

B) Πρωτεΐνες-εκροής ή εξαγωγείς (exporters or effluxes) απαντώνται στους προκαρυωτικούς και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, λειτουργούν ως αντλίες εκροής για ουσίες τοξικές και φάρμακα. Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς οι ABC-εκροής είναι εξαιρετικά σημαντικές στην έκφραση της παθογόνου δράσης αυτών μέσω εκροής ουσιών που αυξάνουν την λοιμογόνο δράση των βακτηρίων. Επίσης στα Gram(-) βακτήρια, εμπλέκονται στην διακίνηση λιπιδίων και πολυσακχαριτών από το κυτταρόπλασμα προς τον εξωκυττάριο χώρο, μέσω έκκρισης από το βακτηριακό κύτταρο, ουσιών όπως καψικοί πολυσακχαρίτες, λιποπολυσακχαρίτες, τοξίνες, αντιβιοτικά, βακτηριοσίνες, φάρμακα κ.α.

Γ) Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην μετάφραση του RNA και επιδιόρθωση του DNA και οι οποίες δεν επιτελούν μεταφορά ουσιών.

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ: Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς οι ABC-μεταφορείς είναι κρίσιμοι για την επιβίωση (ABC εισαγωγείς), την παθογόνο και λοιμογόνο δράση τους (ABC εκροής). Από άποψη κατασκευής το κοινό χαρακτηριστικό των ABC-μεταφορέων είναι η ύπαρξη δύο διακριτών περιοχών, της διαμεμβρανικής περιοχής **TMD** (**T**rans **M**embrane **D**omain) και της συνδεδεμένης με ATP περιοχής (**A**TP **b**inding **c**assette domain-**A**BC **d**omain ή nucleotide binding domain **N**BD). Η αλληλουχία και η αρχιτεκτονική της διαμεμβρανικής περιοχής (TMD) ποικίλει, αντανakλώντας την χημική δομή που μπορεί να μεταφέρει. Η ABC περιοχή βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, διαθέτει αλληλουχία εξαιρετικά συντηρημένη και στους περισσότερους εξαγωγείς το αμινοτελικό άκρο της διαμεμβρανικής περιοχής (TMD) και το καρβοξυτελικό άκρο της ABC περιοχής βρίσκονται σε μία πολυπεπτιδική αλυσίδα.



Εικόνα 50. Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας των ABC μεταφορέων

α. ABC-εισαγωγέας, **β.** ABC-εξαγωγέας (συγχώνευση των δύο περιοχών του μεταφορέα) όπου: **TMD** η διαμεμβρανική περιοχή, **ABC** η περιοχή η συνδεδεμένη με ATP και **SBP** οι πρωτεΐνες που συνδέονται με το υποστρώμα.

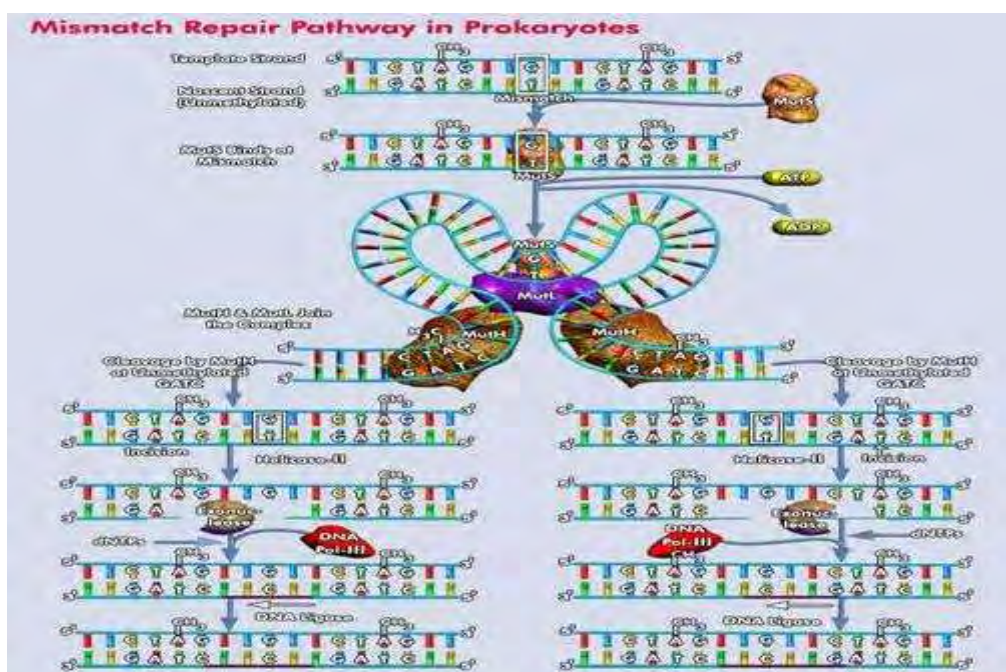
Η ενέργεια που απαιτείται για την ενεργοποίηση της μεταφοράς από τους ABC μεταφορείς προέρχεται όπως ήδη ελέχθη, από την υδρόλυση του ATP. Η σύνδεση του ATP με την ABC περιοχή του μεταφορέα και η επακόλουθη υδρόλυση του ATP, έχει ως αποτέλεσμα διαμορφωτικές αλλαγές της TMD περιοχής και μεταφορά του υποστρώματος (μεταφερόμενης ουσίας). Ο μηχανισμός, ο οποίος περιγράφει τις διαμορφωτικές αλλαγές της περιοχής σύνδεσης του υποστρώματος, σχετίζεται με το μοντέλο της εναλλασσόμενης προσέγγισης (alternating-access model). Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, η περιοχή σύνδεσης του υποστρώματος εναλλάσσεται μεταξύ της διαμόρφωσης προς τα μέσα και προς τα έξω (outward-facing και inward-facing conformations). (454, 455)

➤ Σύστημα DNA mismatch repair – ρόλος της πρωτεΐνης mutS

Το σύστημα DNA mismatch repair είναι το σύστημα το οποίο αναγνωρίζει και διορθώνει τα λάθη τα οποία μπορεί να παρατηρηθούν κατά την διαδικασία του διπλασιασμού και ανασυνδυασμού του DNA και αφορά την εισαγωγή, την διαγραφή ή την αναντιστοιχία των βάσεων του DNA. Ο μηχανισμός επιδιόρθωσης της αναντιστοιχίας των βάσεων είναι εξαιρετικά συντηρημένος μηχανισμός από τους προκαρυωτικούς έως τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, διότι κάθε γενετικό συμβάν το οποίο διαταράσσει την υπερελικομένη κατασκευή του DNA έχει σοβαρή επίπτωση στην γενετική σταθερότητα του κυττάρου. Η επιδιόρθωση της αναντιστοιχίας (mismatch) των βάσεων είναι ειδική της νεο-σχηματισθείσας έλικας του DNA και προϋποθέτει την αρχική αναγνώριση της νέας-θυγατρικής έλικας του DNA και τον διαχωρισμό της από την πρότυπη έλικα. Στα Gram αρνητικά βακτήρια, ο διαχωρισμός της πρότυπης έλικας από την θυγατρική επιτυγχάνεται με την παροδική ημιμεθυλίωση. Στους υπόλοιπους προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς ο ακριβής μηχανισμός του διαχω-

ρισμού δεν είναι ακριβής. Στην *E.coli* η ημιμεθυλίωση επιτυγχάνεται από μία ειδική μεθυλάση, την Dam-methylase (deoxyadenosine methylase), η οποία μεθυλιώνει όλες τις αδενίνες που εμφανίζονται στην **5' - GATC αλληλουχία**. Αμέσως μετά τον διπλασιασμό του DNA, η πρότυπη έλικα μεθυλιώνεται, ενώ η νέα έλικα όχι και μπορούν να διαχωριστούν με σαφήνεια μεταξύ τους. Τα πρώτα στοιχεία του μηχανισμού επιδιόρθωσης προέρχονται από *S. pneumoniae* και αφορούσαν τα γονίδια hexA και hexB. Εν συνεχεία, μετά από έρευνες στην *E.coli*, αναγνωρίστηκαν γονίδια, τα οποία όταν απενεργοποιούνται μέσω μεταλλάξεων, έχουν ως συνέπεια την δημιουργία υπέρ-μεταλλαγμένων στελεχών *E.coli*. Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών καλούνται Mut πρωτεΐνες, τρεις από τις οποίες είναι σημαντικές για την αναγνώριση και προώθηση της διαδικασίας επιδιόρθωσης της αναντιστοιχίας των βάσεων, η MutS, MutL, MutH. Η mutS πρωτεΐνη σχηματίζει ένα διμερές ($mutS_2$) το οποίο αναγνωρίζει την αναντιστοιχία των βάσεων στην νεοσχηματισθείσα έλικα του DNA και συνδέεται στο συγκεκριμένο σημείο (**Εικόνα 45**). Η MutH πρωτεΐνη συνδέεται στις ημιμεθυλιωμένες θέσεις του DNA εκατέρωθεν της αναντιστοιχίας, αλλά η δράση της ξεκινά μόνον όταν το διμερές της MutL₂ πρωτεΐνης συνδεθεί στο σύμπλεγμα MutS-DNA, δρώντας ως μεσολαβητής μεταξύ των MutS₂ και MutH πρωτεϊνών.

Το DNA κάμπτεται κατά την διάρκεια της αναζήτησης της κοντινότερης **αλληλουχίας-GATC-** που έχει ημιμεθυλωθεί και μπορεί να βρίσκεται σε απόσταση έως 1kb.



Εικόνα 51. Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας του συστήματος DNA mismatch repair

Η ενεργοποίηση της MutH πρωτεΐνης δημιουργεί μία εγκοπή στην νεοσχηματισθείσα έλικα του DNA πολύ κοντά στην ημιμεθυλιωμένη θέση και η DNA ελικάση II αναλαμβάνει να διαχωρίσει τις δύο έλικες του DNA, ακολουθούμενη από ειδική εξωνουκλεάση η οποία απομακρύνει τα νουκλεοτίδια της θυγατρικής έλικας. Το είδος της εξωνουκλεάσης που θα δράσει, εξαρτάται από ποιά πλευρά της αναντιστοιχίας έγινε η τομή του DNA από την MutH πρωτεΐνη (5' ή 3'). Στο 5' άκρο δρα η εξωνουκλεάση RecJ ή ExoII, ενώ στο 3' άκρο δρα η

εξωνουκλεάση ExoI. Το κενό που έχει δημιουργηθεί αποκαθίσταται από DNA polymerase III, χρησιμοποιώντας ως πρότυπο την μεθυλιωμένη έλικα του DNA και η DNA λιγάση αποκαθιστά την συνέχεια του DNA. Αμέσως μετά την επιδιόρθωση της αναντιστοιχίας η Dam-methylase μεθυλιώνει την θυγατρική έλικα. (456, 457)

Η πρωτεΐνη MutS παρουσιάζει ήπια δράση ATPάσης και η σύνδεση με το ATP οδηγεί στην διαμόρφωση τριτοταγών δομών στην επιφάνεια της πρωτεΐνης. Κρυσταλλογραφικές μελέτες έχουν δείξει ότι η διαμόρφωση της πρωτεΐνης είναι εξαιρετικά ασύμμετρη και όταν δρα υπό μορφή διμερούς μόνον το ένα τμήμα του διμερούς αλληλεπιδρά με το σημείο της αναντιστοιχίας των βάσεων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ¹ **Stephen Baker, William P Hanage, and Kathryn E Holt** 2010. "Navigating the future of bacterial molecular epidemiology" *Curr Opin Microbiol.* 13(5): 640-645.
- ² **Centers for Disease Control and Prevention.** 1994 "Addressing emerging infectious disease threats: a prevention strategy for the United States" *Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga*
- ³ **Jarvis W.R.** 1994 "Selected aspects of the socioeconomic impact of nosocomial infections: morbidity, mortality, cost and prevention", *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, **17**:552-557
- ⁴ **McDonald LC.** 2006. "Trends in antimicrobial resistance in health care-associated pathogens and effect on treatment", *Clin Infect Dis.*, **42**(Suppl 2):S65-7
- ⁵ **Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M et al.** 2006. "Management of multidrug-resistant organisms in health care settings", *Am J Infect Control.*, 35(2):165-193
- ⁶ **Dellit TH, Owens RC. McGowan JE Jr, et al.** 2007. "Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America guidelines for developing an institutional program to enhance antimicrobial stewardship.", *Clin Infect Dis.*, **44**:159-177
- ⁷ **Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE, et al.** 2003. "SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*", *Infect Control Hosp Epidemiol.*, **24**: 362-386
- ⁸ **Rosdahl VT, Knudsen AM.** 1991. "The decline of methicillin resistance among Danish *Staphylococcus aureus* strains." *Infect Control Hosp Epidemiol* **12**: 83-88.
- ⁹ **Ελένη Α. Αποστολοπούλου** 2000. "Επιδημιολογία Νοσοκομειακών λοιμώξεων" Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης. (2^η Έκδοση): Αθήνα
- ¹⁰ **Sghir A, Gramet G, Suau A, Rochet et al** 2000. "Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotides probe hybridization.", *Appl Environ Microbiol.* **66**: 2263-2266
- ¹¹ **Facklam RR, Collins MD** 1989. "Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme.", *J Clin Microbiol.*, **27**: 731-734
- ¹² **Bradley CR, Fraise AP** 1996. "Heat and chemical resistance of *Enterococci*" , *J Hosp Infect.*, **34**:191-196
- ¹³ **Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS.** 1999. "Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein." *Infect Immun* **67**:193-200.
- ¹⁴ **Garbutt JM, Littenberg B, Evanoff BA, Sahn D, Mundy LM.** 1999. "Enteric carriage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in patients tested for *Clostridium difficile*." *Infect Control Hosp Epidemiol* **20**:664-70.
- ¹⁵ **Mundy LM, Sahn DF, Gilmore M.** 2000. "Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance." *Clin Microbiol Rev* **13**:513-22.
- ¹⁶ **Top J, Willems R, Blok H, De Regt M et al.** 2007. "Ecological replacement of *Enterococcus faecalis* by multiresistant clonal complex 17 *Enterococcus faecium*", *Clin Microbiol Infect.*, **13**:316-319.
- ¹⁷ **P E Coudron, C G Mayhall, R R Facklam, A C Spadora et al.** 1984. "Streptococcus faecium outbreak in a neonatal intensive care unit." *J Clin Microbiol.*, **20**(6): 1044-1048
- ¹⁸ **Murray BE** 1990. "The life and times of the *Enterococcus*", *Clin Microbiol.*, Rev **3**: 46-65.
- ¹⁹ **Grayson ML, Eliopoulos GM, Wennersten CB, Ruoff KL et al.** 1990. "Increasing resistance to beta-lactam antibiotics among clinical isolates of *Enterococcus faecium*: a 22-year review at one institution", *Antimicrob Agents Chemother.*, **35**:2180-2184.
- ²⁰ **Jones RN, Sader HS, Erwin ME & Anderson SC** 1995. "Emerging multiply resistant enterococci among clinical isolates. I. Prevalence data from 97 medical center surveillance study in the United States. *Enterococcus* Study Group", *Diagn Microbiol Infect Dis.*, **21**:85-93.
- ²¹ **Lavery A, Rossney AS, Morrison D, Power A et al.** 1997. "Incidence and detection of multi-drug-resistant enterococci in Dublin hospitals", *J Med Microbiol.*, **46**:50-156.
- ²² **Dornbusch K, King A & Legakis N** 1998. "Incidence of antibiotic resistance in blood and urine isolates from hospitalized patients. Report from a European collaborative study European Study Group on Antibiotic Resistance (ESGAR)", *Scand J Infect Dis.*, **30**: 281-288.
- ²³ **Fontana R, Ligozzi M, Mazzariol A, Veneri Cornaglia G.** 1998. "Resistance of enterococci to ampicillin and glycopeptide antibiotics in Italy. The Italian Surveillance Group for Antimicrobial Resistance" *Clin Infect Dis.*, **27**: 84-S86
- ²⁴ **Suppola JP, Kolho E, Salmenlinna S, Tarkka E et al.** 1999. "*vanA* and *vanB* incorporate into an endemic ampicillin-resistant vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* strain: effect on interpretation of clonality", *J Clin Microbiol.*, **37**:3934-3939.
- ²⁵ **Torell E, Cars O, Olsson-Liljequist B, Hoffman BM et al.** 1999. "Near absence of vancomycin-resistant enterococci but high carriage rates of quinolone-resistant ampicillin-resistant enterococci among hospitalized patients and nonhospitalized individuals in Sweden" *J Clin Microbiol.*, **37**:3509-3513.
- ²⁶ **Harthug S, Jureen R, Mohn SC, Digranes A. et al.** 2002. "The prevalence of faecal carriage of ampicillin-resistant and high-level gentamicin-resistant enterococci among inpatients at 10 major Norwegian hospitals" *J Hosp Infect.*, **50**:145-154.
- ²⁷ **Χ. Ρούση, Ε. Πλατσούκα, Α. Αρμαγανίδης, Γ. Σαρόγλου et al.** 2000. "Λοιμώξεις από *Enterococcus faecium* ανθεκτικό στα γλυκοπεπτιδικά σε ασθενείς μονάδας εντατικής θεραπείας. Πρώτη εμφάνιση", *Archives of Hellenic Medicine*, **17**(6): 609-612.
- ²⁸ **Coque TM, Tomayko JF, Ricke SC, Okhuysen PC et al.** 1996. "Vancomycin-resistant enterococci from nosocomial, community, and animal sources in the United States", *Antimicrob Agents Chemother.*, **40**:2605-9.

- ²⁹ Fridkin SK, Edwards JR, Courval JM, Hill H, Tenover FC, *et al.* 2001. "The effect of vancomycin and third-generation cephalosporins on prevalence of vancomycin-resistant enterococci in 126 U.S. adult intensive care units", *Ann Intern Med.*, **35**:175-183.
- ³⁰ Schouten MA, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF & Voss A. 2000. "Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe", *Eur J Clin Microbiol. Infect. Dis.* **19**:816-822.
- ³¹ EARSS "European Antimicrobial Resistance Surveillance System Annual report 2004" (<http://www.earss.rivm.nl>).
- ³² Van Belkum A, Van Den BN, Thomassen R, Verbrugh H. *et al.* 1996. "Vancomycin-resistant enterococci in cats and dogs", *Lancet*, **348**:1038-1039.
- ³³ Van der Auwera P, Pensart N, Kortzen V, Murray BE *et al.* 1996. "Influence of oral glycopeptides on the fecal flora of human volunteers: selection of highly glycopeptide-resistant Enterococci", *J Infect Dis.*, **173**:1129-1136.
- ³⁴ Van Den Bogaard AE, Mertens P, London NH & Stobberingh EE. 1997. "High prevalence of colonization with vancomycin- and pristinamycin-resistant enterococci in healthy humans and pigs in the Netherlands: is the addition of antibiotics to animal feeds to blame?", *J Antimicrob Chemother.*, **40**: 454-456.
- ³⁵ Van Den Bogaard AE, Willems R, London N, Top J *et al.* 2002. "Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers", *J Antimicrob Chemother.*, **49**:497-505
- ³⁶ Van Den Braak N, Van Belkum A, Van Keulen M, Vliegthart J. *et al.* 1998. "Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci from hospitalized patients and poultry products in the Netherlands", *J Clin Microbiol.*, **36**: 1927-1932.
- ³⁷ Stobberingh E, Van Den BA, London N, Driessen C. *et al.* 1999. "Enterococci with glycopeptide resistance in turkeys, turkey farmers, turkey slaughterers, and (sub) urban residents in the south of the Netherlands: evidence for transmission of vancomycin resistance from animals to humans?", *Antimicrob Agents Chemother.*, **43**: 2215-2221.
- ³⁸ Van Den Bogaard AE, Bruinsma N & Stobberingh EE 2000. "The effect of banning avoparcin on VRE carriage in the Netherlands", *J Antimicrob Chemother*, **46**:146-148.
- ³⁹ Top, J., Willems, R. and Bonten, M. 2008. "Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen.", *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, **52**: 297-308
- ⁴⁰ Α. Εμμανουηλίδου-Αρσένη «Ιατρική Μικροβιολογία-Θεωρία και Πράξη» Αθήνα 1998
- ⁴¹ Deurenberg RH, Stobberingh EE. 2008. "The evolution of *Staphylococcus aureus*.", *Infect Genet Evol*, **8**(6):747-63
- ⁴² Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H 1997. "Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underline mechanisms, and associated risks", *Clin Microbiol Rev.*, **10**(3):505-20
- ⁴³ Chambers HF 2001. "The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*?", *Emerg Infect Dis.*, **7**(2): 178-182
- ⁴⁴ Lowy FD. 1998. "Staphylococcus aureus infections.", *N Engl J Med.*, 339:520-532.
- ⁴⁵ Lowy FD. 2003. "Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*.", *J Clin Invest*, **111**: 1265-1273.
- ⁴⁶ Jevons MP 1961. "Celbenin-resistant staphylococci", *BMJ*, **1**(5219):124-5
- ⁴⁷ Johnson AP, Aucken HM, Cavendish S, Ganner M. *et al.* 2001. "Dominance of EMRSA-15 and -16 among MRSA causing nosocomial bacteraemia in UK: analysis of isolates from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS)" *J Antimicrob Chemother.*, **48**(1):143-4
- ⁴⁸ Centers for Disease Control and Prevention. 1999. "Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*—Minnesota and North Dakota, 1997-1999." *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **48**:707-710.
- ⁴⁹ Centers for Disease Control and Prevention. 2003. "Public health dispatch: outbreaks of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections—Los Angeles County, California, 2002-2003.", *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, **52**:88.
- ⁵⁰ Dufour, P., Y. Gillet, M. Bes, G. Lina, J. Etienne, and H. Richet. 2002. "Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin." *Clin. Infect. Dis.* **35**:819-824.
- ⁵¹ Dietrich, D. W., D. B. Auld, and L. A. Mermel. 2004. "Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in southern New England children.", *Pediatrics*, **133**:347-352.
- ⁵² Vandenesch F, Naimi T, Enright MC *et al.* 2003. "Community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence", *Emerg Infect Dis.*, **9**:978-984.
- ⁵³ Prevost G, Couppie P, Prevost P *et al.* 1995. "Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins", *J Med Microbiol.*, **42**:237-245.
- ⁵⁴ Dominguez, T. J. 2004. "It's not a spider bite, it's community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *J. Am. Board Fam. Pract.* **17**:220-226.
- ⁵⁵ Montgomery, C. P., S. Boyle-Vavra, P. V. Adem, J. C. Lee *et al.* 2008. "Comparison of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pulsotypes USA300 and USA400 in a rat model of pneumonia." *J. Infect. Dis.* **198**:561-570.
- ⁵⁶ Liu, C., C. J. Graber, M. Karr, F. Chambers *et al.* 2008. "A population-based study of the incidence and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in San Francisco, 2004-2005.", *Clin. Infect. Dis.*, **46**:1637-1646.

- ⁵⁷ **Klevens, R. M., M. A. Morrison, and J. Nadle.** 2007. "Invasive methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States.", *JAMA*, **298**:1763-1771.
- ⁵⁸ **Hersh, A. L., H. F. Chambers, J. H. Maselli, and R. Gonzales.** 2008. "National trends in ambulatory visits and antibiotic prescribing for skin and soft tissue infections.", *Arch. Intern. Med.*, **168**:1585-1591.
- ⁵⁹ **Bygott, J., D. A. Enoch, R. P. M. Carson, and J. A. Karas.** 2008. "Presumed community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates reflect spillover of healthcare-associated MRSA.", *J. Hosp. Infect.*, **69**:197-198.
- ⁶⁰ **Calfee, D. P., L. J. Durbin, T. P. Germanson, D. M. Toney, et al.** 2003. "Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among household contacts of individuals with nosocomially acquired MRSA.", *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, **24**:422-426.
- ⁶¹ **Dowzicky, M., G. Talbot, C. Feger, P. Prokocimer, J. Etienne, and R. Leclercq.** 2000. "Characterization of isolates associated with emerging resistance to quinupristin/dalfopristin (Synercid) during a worldwide clinical program." *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **37**:57-62.
- ⁶² **Marty, F. M., W. Yeh, C. L. Venkataraman, E. Albano, E. P. Alyea, et al.** 2006. "Emergence of a clinical daptomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate during treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia and osteomyelitis." *J. Clin. Microbiol.* **44**:595-597.
- ⁶³ **Meka, V. G., S. K. Pillai, G. Sakoulas, C. Wennersten, L. Venkataraman, G. M. Eliopoulos,** 2004. "Linezolid resistance in sequential *Staphylococcus aureus* isolates associated with a T2500A mutation in the 23S rRNA gene and loss of a single copy of rRNA." *J. Infect. Dis.* **190**:311-317.
- ⁶⁴ **Tiemersma EW, Bronzwaer SL, Lyytikainen O et al** 2004. "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002." *Emerg Infect Dis* **10**: 1627-1634.
- ⁶⁵ **Pittet D, Hugonnet S, Harbarth S et al.** 2000. "Effectiveness of a hospital-wide programme to improve compliance with hand hygiene infection control programme." *Lancet*, **356**: 1307-1312.
- ⁶⁶ **Otto M.** 2009. "Staphylococcus Epidermidis-the accidental Pathogen" *Nature Reviews Microbiology*, **7** (8): 555-567
- ⁶⁷ **Abigail A Salyers, Dixie D Whitt** 2001. "Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach.", *ASM Press* (second edition) Washington DC
- ⁶⁸ **Wilma Ziebuhr, Susanne Hennig, Martin Eckart, Hennes Kranzler et al.** 2006. "Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen", *Inter. J. of Antimicrobial Agents*, S14-S20
- ⁶⁹ **Carapetis J. R., A. C. Steer, E. K. Mulholland, and M. Weber.** 2005. "The global burden of group A streptococcal diseases." *Lancet Infect. Dis.* **5**:685-694
- ⁷⁰ **Carapetis JR.** 2007. "Rheumatic heart disease in developing countries." *N Engl J Med* **357**(5):439-441.
- ⁷¹ **World Health Organization** 2005. Department of Child and Adolescent Health and Development Department of Immunization, Vaccines and Biologicals. "Group A streptococcal vaccine: development, current status and issues of relevance to less developed countries"
- ⁷² **Bisno AL, Rubin FA, Cleary PP, Dale JB.** 2005. "Prospects for a group a streptococcal vaccine: rationale, feasibility, and obstacles - report of a National Institute of Allergy and Infectious Diseases workshop." *Clinical Infectious Diseases* **41**(8): 1150-1156.
- ⁷³ **Debra E. Bessen , Karen F McGregor, Adrian M Whatmore.** 2008. "Relationships between emm and multilocus sequence types within a global collection of *Streptococcus pyogenes*" *BMC Microbiology*, **8**:59
- ⁷⁴ **Αντωνιάδης Α, Αντωνιάδης Γρ., Λεγάκης Ν, Τσελέντης Ι.** 1999. "Ιατρική Μικροβιολογία" Τόμος ΙΙ, Εκδόσεις Πασχαλίδη. Αθήνα
- ⁷⁵ **Peterson LR, Noskin GA.** 2001. "New technology for detecting multidrug resistant pathogens in the clinical microbiology laboratory." *Emerg. Infect. Dis.* **7**:1-12
- ⁷⁶ **Peterson LR, Petzel RA, Clabots CR, Fasching CE, et al.** 1993. "Medical technologists using molecular epidemiology as part of the infection control team", *Diagn. Microbiol. Infect Dis.*, **16**: 303-311
- ⁷⁷ **Peterson LR, Brossette SE.** 2002. "Hunting health care-associated infections from the clinical microbiology laboratory." *J. Clin. Microbiol.* **40**:1-4
- ⁷⁸ **Harbarth S, Masuet-Aumatell C, Schrenzel J, Francois P, et al.** 2006. "Evaluation of rapid screening and pre-emptive contact isolation for detecting and controlling methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in critical care: an interventional cohort study.", *Crit. Care*, **10**:R25
- ⁷⁹ **Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JL and Turck M.** 1966. "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.", *Am J Clin Pathol*, **45**: 483-459
- ⁸⁰ **C.L.S.I.** 2009. "Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically." *10th Edition Approved standard*, M02-A10 CLSI
- ⁸¹ **C.L.S.I.** 2009. "Performance standard for antimicrobial susceptibility testing." *19th Edition Informational supplement*, M100-S19
- ⁸² **Barenfanger J, Drake C, Kacich G.** 1999. "Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing." *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1415-1418
- ⁸³ **Rudolph KM, Parkinson AJ, Roberts MC.** 1998. "Molecular analysis by Pulsed-field electrophoresis and antibiogram of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B isolates from selected areas within the United States." *J. Clin. Microbiol.* **36**: 13-18

- ⁸⁴ **Babl FE, Pelton SI, Theodore S, Klein JO.** 2001. "Constancy of distribution of serogroups of invasive pneumococcal isolates among children: experience during 4 decades.", *Clin Infect. Dis.*, **32**:1155-1161.
- ⁸⁵ **Holmberg SD, Wachsmuth IK, Hickman-Brenner FW, Cohen ML.** 1984. "Comparison of plasmid profile analysis, phage typing, and antimicrobial susceptibility testing in characterizing *Salmonella typhimurium* isolates from outbreaks.", *J. Clin. Microbiol.*, **19**:100-104
- ⁸⁶ **Hopkins KL, Desai M, Frost JA, Stanly J, Logan.** 2004. "Fluorescent amplified fragment length polymorphism genotyping of *Campylobacter jejune* and *Campylobacter coli* strains and its relationship with host specificity, serotyping and phage typing.", *J. Clin Microbiol.*, **42**:229-235
- ⁸⁷ **Lina B, Bes M, Vandenesch F, Greenland T, Etienne J, Fleurette J.** 1993. "Role of bacteriophages in genomic variability of related coagulase-negative staphylococci.", *FEMS Microbiol. Lett.*, **109**:273-278
- ⁸⁸ **Pitt TL, Saunders NA.** 2000. "Molecular bacteriology: a diagnostic tool for the millennium." *J. Clin. Pathol.* **53**:71-75
- ⁸⁹ **Naber SP.** 1994. "Molecular pathology-diagnosis of infectious disease.", *N Engl J Med*, **331**:1212-15
- ⁹⁰ **Alber W, Linn S.** 1969. "DNA modification and restriction.", *Annu. Rev. Biochem*, **38**:467-500
- ⁹¹ **Kruger DH, Bickle TA.** 1983. "Bacteriophage survival: multiple mechanisms for avoiding the deoxyribonucleic acid restriction systems of their hosts." *Microbiol. Rev* **47**(3):345-360
- ⁹² **Cheng X.** 1995. "Structure and function of DNA methyltransferases." *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**:293-318
- ⁹³ **Kobayashi I.** 2001. "Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution.", *Nucleic Acids Res.* **29**(18):3742-3756
- ⁹⁴ **Roberts RJ, Belfort M, Beston T, Bhagwat AS, Bickle T, Bitinaite J, et al.** 2003. "A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes." *Nucleic Acids Research*, **31**(7):1805-1818
- ⁹⁵ **Murray NE.** 2000. "Type I restriction systems: sophisticated molecular mashines." *Microbiol. Mol. Rev* **64**:412-434
- ⁹⁶ **Schwartz DC et al.** 1983. "New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging." *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol* **47**(1):189-195
- ⁹⁷ **Schwartz DC and Canton CR.** 1984. "Separation of yeast chromosome-size DNA by pulse-field gel electrophoresis." *Cell* **37**:67-75
- ⁹⁸ **Carle GF, Frank M, Olson MV.** 1986. "Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field." *Science* **232**(4746):65-68
- ⁹⁹ **Chang N, Chui L.** 1998. "A standardized protocol for rapid preparation of bacterial DNA for pulse-field gel electrophoresis." *Diagn. Microbiol. Infect.* **31**:275-279.
- ¹⁰⁰ **Borer A, Gilad J, Yagupsky P, et al.** 2002. "Community-acquired MRSA in institutionalized adults with developmental disabilities." *Emerging Infectious Diseases* **8**(9):966-970
- ¹⁰¹ **Herscheled J, Ananiev G and Schwartz D** 2007. "Pulse-field gel electrophoresis" *Nature Protocols* **2**(3):677-84
- ¹⁰² **Chu G, Volrath D, Davis RW** 1986. "Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogenous electric fields." *Science* **234**:1582
- ¹⁰³ **Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Meckelsen PA, et al.** 1995. "Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulse-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing." *J. Clin. Microbiol.* **33**:2233-39.
- ¹⁰⁴ **Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, et al.** 1994. "Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *S. aureus*." *J. Clin Microbiol.* **32**:407-415.
- ¹⁰⁵ **Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV.** 1997. "Molecular typing working group of the society for healthcare epidemiology of America. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: review for healthcare epidemiologists." *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **18**:426-439
- ¹⁰⁶ **Arbeit RD, Arthur M, Dunn R, Kim C, Selander RK, and Golstein R.** 1990. "Resolution of recent evolutionary divergence among *Escherichia coli* from related lineages: the application of pulse-field electrophoresis to molecular epidemiology." *J. Infect. Dis.* **161**:230-235
- ¹⁰⁷ **Sader HS, Pignatari AC, Leme L, Burattini MN, et al.** 1993. "Epidemiological typing of multiple drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from an outbreak in an intensive care unit." *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **17**:13-18
- ¹⁰⁸ **Rementeria A, Gallego G, Quindos G and Garaizar J.** 2001. "Comparative evaluation of three commercial software packages for analysis of DNA polymorphism patterns." *Clin. Microbiol. Infect.* **7**:331-336
- ¹⁰⁹ **Hunter BS, Vauterin P, Lambert-Fair MA, VanDuynne MS, et al.** 2005. "Establishment of a universal size standard strain for use with the pulse net standardized pulse-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard." *J. Clin Microbiol.* **43**:1045-1050
- ¹¹⁰ **Southern EM.** 1975. "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." *J. Mol. Biol.* **98**:503-517
- ¹¹¹ **Doty P, Marmur J, Eigner J, Schildkraut C.** 1960. "Stand separation and specific recombination in deoxyribonucleic acids: physical chemical studies." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**(4):461-76
- ¹¹² **Schildkraut CL, Marmur J, Doty P.** 1961. "The formation of hybrid molecules and their use in studies of DNA homologies." *J. Mol. Biol.* **3**:595-617

- 113 **Kohne DE.** 1968. "Isolation and characterization of bacteria ribosomal RNA cistrons." *Biophys. J.* **8**(10): 1104-1118
- 114 **Bruse Alberts, Dennis Bray, Karen Hopkin, Alexander Johnson** 2006. "Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας." (Μτφ) Επιμέλεια: Νικ. Ανάγνου, Παν. Παπαζαφειρή. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης. Β' Έκδοση. Αθήνα
- 115 **McNicol AM, Farquharson MA.** 1997. "In situ hybridization and its diagnostic applications in pathology." *J. Pathol.* **182**: 250-261
- 116 **Hogart M, et al.** 2000. "Specific and rapid detection by fluorescent in situ hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients". *J. Clin. Microbiol.* **38**: 818-825
- 117 **Jansen GJ, et al.** 2000. "Rapid identification of bacteria in blood cultures by using fluorescently labeled oligonucleotide probes." *J. Clin. Microbiol.* **38**: 814-817
- 118 **Oliveira K, et al.** 2003. "Direct identification of *Staphylococcus aureus* from positive blood culture bottles." *J. Clin. Microbiol.* **41**: 889-891
- 119 **Bryan RN, Ruth JL, Smith RD, Le Bon JM.** 1986. "Diagnosis of clinical samples with synthetic oligonucleotide hybridization probes." In: Leive L. (ed). *American Society for Microbiology*, Washington 113-116
- 120 **Wolcott MJ.** 1992. "Advances in nucleic acid-based detection methods." *Clin. Microbiol. Reviews* **5**: 370-86
- 121 **Mattew JA and Kricka LJ.** 1988. "Analytical strategies for the use of DNA probes." *Analyt. Bioch.* **169**: 1-25
- 122 **Conville PS, Keiser JF, Witebcky FG.** 1989. "Mycobacterium caused by simultaneous infection with Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare detected by analysis BACTEC 13A Bottle with the Gen-Probe kit." *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **12**: 217-19
- 123 **Lim SD, Todd J, Loez J, Ford E, Janda JM** 1991. "Genotypic identification of pathogenic Mycobacterium species by using a nonradioactive oligonucleotide probe." *J. Clin. Microbiol.* **29**: 1276-78
- 124 **Archer GL, Karchmer AW, Vishniavsky N, and Johnston JL.** 1984. "Plasmid -pattern analysis for the differentiation of infecting from no infecting *Staphylococcus epidermidis*." *J. Infect. Dis.* **149**: 913-920
- 125 **Eisgruber H, Wiedmann M, Stolle A.** 1995. "Use of plasmid profiling as typing method for epidemiologically related *Clostridium perfringens* isolates from food poisoning cases and outbreaks." *Letts. Appl. Microbiol.* **20**: 290-294
- 126 **Liu PYF, Shi ZY, Lan YJ, Hu BS, et al.** 1996. "Use of restriction endonuclease analysis of plasmids and pulse-field gel electrophoresis to investigate outbreaks of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection." *Clin. Infect. Dis.* **22**: 86
- 127 **Tortora J. G, Funke R. B, Case L. C,** 2009. "Εισαγωγή στη Μικροβιολογία" Επιμέλεια Α. Τσακρής Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη (9^η) Αθήνα
- 128 **Donabedian SM, Thal LA, Hershberger E, Perri MB, et al.** 2003. "Molecular characterization of gentamicin-resistant enterococci in the U.S.: evidence of spread from animals to human through food." *J Clin Microbiol* **41**: 1109-1113
- 129 **Feil EJ, Cooper JE, Grundmann H, Robinson DA, et al.** 2003. "How clonal is *Staphylococcus aureus*?" *J Bacteriol* **185**: 3307-3316
- 130 **Thai LA, Donabedian SM, Robinson-Dunn B, Chow JW et al.** 1998. "Molecular analysis of glycopeptides-resistant *Enterococcus faecium* isolates collected from Michigan hospitals over 6-year period." *J Clin Microbiol* **36**: 3303-3308
- 131 **Mullis KB.** 1990. "The unusual origin of polymerase chain reaction." *Sci. Am.* **262**: 56-65
- 132 **Guyer RL, and Koshland DE** 1989. "The molecule of the year." *Science* **246**: 1543-1546
- 133 **Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA.** 1989. "Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes." *Proc Natl Acad Sci USA.* **86**(16): 6230-4
- 134 **Murakaw GJ, Zaia JA, Spallone PA, et al.** 1988. "Direct detection of HIV-1 in RNA from ARC patient samples." *DNA* **7**: 287-95
- 135 **Ou CY, Kwok S, Mitchell SW, et al.** 1988. "DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells." *Science* **239**: 295-97
- 136 **Schowalter DB, Sommer SS.** 1989. "The generation of radio labelled DNA and RNA probes with polymerase chain reaction." *Anal. Biochem.* **177**: 90-94
- 137 **An SF, Franklin D, Fleming KA** 1992. "Generation of digoxigenin labelled double-stranded and single-stranded probes using the polymerase chain reaction." *Mol. And Cellular Probes* **6**: 193-200
- 138 **Green CE, Peterson SL, Kiviat NB, Manos MM.** 1991. "PCR amplification from paraffin-embedded tissues: effects of fixative and fixation time." *Am. J. Clin. Pathol.* **95**: 117-124
- 139 **Persing DH, Telford III SR, Rys PN, Dodge DE et al.** 1990. "Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in museum specimens of Ixodes dammini ticks." *Science* **249**: 1420-23
- 140 **Chiu KP, Cohen, Morris D, Jordan G.** 1992. "Intracellular amplification of proviral DNA in tissue section using the polymerase chain reaction." *J. Histochem. Cytochem.* **40**: 333-41
- 141 **Nuovo GJ, Gallery F, MacConnel P, Becker J et al.** 1992. "An improved technique for the in situ detection of DNA after polymerase chain reaction." *Pathology* **139**: 1239-44
- 142 **Vazquez JA, Dembry LM, Sanchez V, Vazquez MA et al.** 1998. "Nosocomial *Candida glabrata* colonization: an epidemiologic study." *J Clin Microbiol* **36**: 421-426
- 143 **Vazquez JA, Sanchez V, Dmuchowski C, Dembry LM et al.** 1993. "Nosocomial acquisition of *Candida albicans*: an epidemiologic study." *J Infect Dis* **168**: 195-201

- 144 **Zervos MJ and Vazquez JA** 1996. "DNA analysis in the study of fungal infections in the immunocompromised host." *Clin Lab Med* **16**: 73-88
- 145 **Lubert Strayer** 1998. "Βιοχημεία" (Μτφ) Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης (2^η Έκδοση) Ηράκλειο
- 146 **Mullis KB**. 1990. "The unusual origin of the polymerase chain reaction." *Sci. Am.* **262**: 56-65
- 147 **Eisenstein BI**. 1990. "The polymerase chain reaction: new method of using molecular genetics for medical diagnosis." *N. Engl. J. Med.* **332**: 178-183
- 148 **Saiki RK, Gelfand S, Stoffel SJ, Scharf R et al.** 1988. "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239**: 487-91
- 149 **Baynes J, Dominiczak M** 1999. "Ιατρική Βιοχημεία" (Μτφ). Επιμέλεια: Α. Καλοφούτης. Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε. Αθήνα
- 150 **Wu DY, Wallace RB**. 1989. "The ligation amplification reaction (LAR) - amplification of specific DNA sequences using sequential rounds of template-dependent ligation." *Genomics* **4**: 560-69
- 151 **Winn-Deen ES, Jovannisi DM**. 1991. "Sensitive fluorescence method for detecting DNA ligation amplification products." *Clin. Chem.* **37**: 1522-23
- 152 **Backman K**. 1992. "Ligase chain reaction: diagnostic technology for the 1990s and beyond." *Clin. Chem.* **38**: 457-58
- 153 **Barany F**. 1991. "Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase." *Proc. Natl Acad. Sci* **88**: 189-93
- 154 **Haruna I, Spiegelman S**. 1965. "Specific template requirements of RNA replicases." *Proc. Natl Acad. Sci.* **54**: 579-87
- 155 **Persing D**. 1991. "Polymerase chain reaction: trenches to benches." *J. Clin. Microbiol.* **29**: 1281-1285
- 156 **Focucault C, LaScola B, Lindroos H, Andersson SGE**. 2005. "Multispacer typing technique for sequence-based typing of *Bartonella Quintana*." *J. Clin. Microbiol.* **43**: 41-48
- 157 **Francois P, Renzi G, Pittet D, Bento M et al.** 2004. "A novel Multiplex Real-time PCR assay for rapid typing of major Staphylococcal cassette chromosome mec elements." *Clin. Microbiol.* **42**: 3309-3312
- 158 **Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M et al.** 1995. "AFLP: a new technique for DNA fingerprinting." *Nucleic Acids Res.* **23**: 4407-4414
- 159 **Neeleman C, Klaassen CHW, De Valk HA, Ruiter MT et al.** 2004. "Amplified fragment length polymorphism fingerprinting is an effective technique to distinguish *Streptococcus pneumoniae* from other streptococci and alternative to pulse-field gel electrophoresis for molecular typing of pneumococci." *J. Clin. Microbiol.* **42**: 369-371
- 160 **Whatmore AM, Murphy TJ, Shankster S, Young E et al.** 2005. "Use of amplified fragment length polymorphism to identify and type Brucella isolates of medical and veterinary interest." *J. Clin. Microbiol.* **43**: 761-769
- 161 **Haqqi TM, Sarkar G, David CS, Sommer SS**. 1989. "Specific amplification of refractory segment of genomic DNA." *Nucleic Acids Res.* **16**: 11844
- 162 **Zeaiter Z, et al.** 2003. "Dignosis of Bartonella endocarditis by real-time nested PCR assay using serum." *J. Clin. Microbiol.* **41**(3): 919-925
- 163 **Lubert Strayer** 1998. "Βιοχημεία" (Μτφ) (2^η Έκδοση) Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης- Ηράκλειο
- 164 **Coyle MB, Carlson LC, Wallis CK, Leonard RB et al.** 1992. "Laboratory aspects of *Mycobacterium genavense*, a proposed species isolated from AIDS patients." *J. Clin. Microbiol.* **30**: 3206-12
- 165 **Relman DA, Loutit JS, Schmidt TM, Falkow S. et al.** 1990. "The agent of bacillary aniomatosis: an approach to the identification of uncultured pathogens." *N. Engl. L. Med.* **323**: 1573-80.
- 166 **Relman DA, Schmidt TM, Gajadhar A, Sogin M et al.** 1996. "Molecular phylogenetic analysis of the human intestinal pathogen, Cyclospora, suggests that it is closely related to Elmentia." *J. Infect. Dis.* **173**: 440-45
- 167 **Tag YW, Hopkins MK, Kolbert CP, Hartley PA, et al.** 1997. "*Bartonella holmesii*-like organisms associated with septicemia, endocarditis and respiratory failure (Abstract)." *Conference on Molecular diagnostics and therapeutics*. Washington DC: American Society of Microbiology.
- 168 **Schuurman T, et al.** 2004. "Prospective study of use of PCR amplification and sequencing of 16S ribosomal DNA from cerebrospinal fluid for diagnosis of bacteria meningitis in clinical setting." *J. Clin. Microbiol.* **42**: 734-740
- 169 **Gauduchon V, et al.** 2003. "Molecular diagnosis of infective endocarditis by PCR amplification and direct sequencing of DNA from valve tissue." *J. Clin. Microbiol.* **41**: 763-766
- 170 **Rantakokko-Jalava K, Jalava J** 2001. "Optimal DNA isolation method for detection of bacteria in clinical specimens by broad-range PCR." *J. Clin. Microbiol.* **39**: 3587-3582
- 171 **Qian Q, et al.** 2001. "Direct identification of bacteria from positive blood cultures by amplification and sequencing of the 16S rRNA gene: evaluation of BACTEC 9240 instrument true-positive and false-positive results." *J. Clin. Microbiol.* **39**(10): 3578-3582
- 172 **Rothman RE, et al.** 2002. "Detection of bacteremia in emergency department patients at risk for infective endocarditis using universal 16S rRNA primers in a decontaminated polymerase chain reaction assay." *J. Infect. Dis.* **186**: 1677-1681
- 173 **Clood JL, et al.** 2002. "Identification of Mycobacterium ssp. By using a commercial 16S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencing libraries." *J. Clin. Microbiol.* **40**: 400-406
- 174 **Hall L, et al.** 2003. "Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory." *J. Clin. Microbiol.* **41**: 1447-1453

- 175 **Millar BC, Xu J, Moore JE** 2007. "Molecular diagnostics of medically important bacterial infections." *Curr. Issues Mol. Biol* **9**: 21-40.
- 176 **Anthony RM, Brown TJ and French GL**. 2000. "Rapid diagnosis of bacteremia by universal amplification of 23S ribosomal DNA followed by hybridization to an oligonucleotide array." *J.Clin. Microbiol.* **38**: 781-788
- 177 **Gon SH, Potter S, Wood JO, Hemmingsen SM**, 1996. "HSP60 gene sequences as universal targets for microbial species identification: studies with coagulase-negative staphylococci." *J.Clin. Microbiol.* **34**: 818-823.
- 178 **Woo PC, Fung AM, Lau SK, Chan BY**. 2002. "Single gene target bacteria identification *groEL* gene sequencing for discriminating clinical isolates of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia trailandesis*." *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **44**: 143-149
- 179 **Bastien P, Chabbert E, Lachaud L** 2003. "Contamination management of broad-range or specific PCR: is there any difference?" *J Clin Microbiol* **41**: 2272
- 180 **Grahn N, et al.** 2003. "Identification of mixed bacterial DNA contamination in broad-range PCR amplification of 16S r DNA V1 and V2 variable regions by pyrosequencing of cloned amplicons." *FEMS Microbiol. Lett.* **219**: 87-91
- 181 **Hulton CS, Higgins CF and Sharp PM**. 1991. "ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria." *Mol. Microbiol.* **5**: 825-834
- 182 **Ross TL, Merz WG, Farkosh Mand Carroll KC**. 2005. "Comparison of an automated repetitive sequence-based PCR microbial typing system to pulse-field gel electrophoresis for analysis of outbreaks of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *J.Clin. Microbiol.* **43**: 5642-5647
- 183 **Shutt KC, Pounder JI, Page SR, Schaechter BJ** 2005. "Clinical evaluation of the DiversiLab microbial typing system using repetitive-sequence-based PCR for characterization of *Staphylococcus aureus* strains." *J.Clin. Microbiol.* **43**: 1187-1192
- 184 **Pounder JI, Shutt KC, Schaechter BJ and Woods GL** 2006. "Clinical evaluation of repetitive-sequence-based PCR using the DiversiLab System for strain typing of vancomycin-resistant enterococci." *Diagn. Microbiol. Infect. Dis* **54**: 183-187
- 185 **Lindstedt BA, Vardund T, Aas L and Kapperud G**. 2005. "Multiple-locus variable-number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria." *Electrophoresis* **26**: 2567-2582
- 186 **Noller AC, McEllistrem MC, Pacheco AG, Boxrud DJ** 2003. "Multilocus variable-number tandem repeats analysis distinguishes outbreak and sporadic *Escherichia coli* O157:H7 isolates." *J.Clin. Microbiol.* **41**: 5389-5397
- 187 **Heyderman RS, Goyal M, Roberts P, Ushewokunze S et al.** 1998. "Pulmonary tuberculosis in Harare, Zibabwe: analysis by spoligotyping." *Thorax* **53**: 346-350
- 188 **Kamerbeek J, Schools L, Kolk A, Van Agterveld M, et al.** 1997. "Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology." *J.Clin. Microbiol.* **35**: 907-914
- 189 **Bankowski MJ and Anderson SM**. 2004. "Real-time PCR nucleic acid amplification in clinical microbiology." *Clin. Microbiol. Newsl.* **26**: 9-15
- 190 **Cockerill FR**. 2003. "Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for diagnostic testing in the clinical microbiology laboratory." *Arch. Pathol. Lab. Med.* **127**: 1112-1120
- 191 **Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, et al.** 2006. "Real-time PCR in Clinical Microbiology: applications for routine laboratory testing." *Clinical Microbiology Reviews* **19**(1): 165-256
- 192 **Mitterer G, Huber M, Liedinger E, Kiritsis C**. 2004. "Microarray-based identification of bacteria in clinical samples by solid-phase PCR amplification of 23S ribosomal DNA sequences." *J.Clin. Microbiol.* **42**: 1048-1057.
- 193 **Monecke S, Berger-Bachi B, Coombs G, Holmes A, et al.** 2007. "Comparative genomics and DNA array-based genotyping of pandemic *Staphylococcus aureus* strains encoding Pandon-Valentine leukosidin." *Clin. Microbiol. Infect.* **13**: 236-249
- 194 **Miller MB and Tang YW**. 2009. "Basic concepts of microarrays and potential applications in Clinical Microbiology." *J Clin Microbiol Rev* **22**(4): 611-633
- 195 **Min JW, Haegeman G, Ysebaert M, Fiers W**. 1972. "Nucleotide sequencing of the gene coding for the bacteriophage MS2 coat protein." *Nature* **237**(5350): 82-88
- 196 **Fiers W, Contreras R, Duerick F, et al.** 1976. "Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of replicase gene." *Nature* **260**(5551): 500-507
- 197 **Hert DG, Fredlake CP, Barron AE**. 2008. "Advantages and limitations of next-generation sequencing technologies: a comparison of electrophoresis and non-electrophoresis methods." *Electrophoresis* **29**: 4618-4626.
- 198 **Metzker ML**. 2010. "Sequencing technologies- the next-generation." *Nat. Rev. Genet.* **11**: 31-46
- 199 **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.
- 200 **Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Moreli G et al.** 1998. "Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms." *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 3140-3145.
- 201 **Frenay HM, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leeuwen WJ et al.** 1996. "Molecular typing of methicillin-resistant *S aureus* on the basis of protein A gene polymorphism." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **15**: 60-64

- 202 Grundmann H, Aanensen DM, van den Wijngaard CC, Spatt BG, et al. 2010. "Geographic distribution of *S aureus* causing invasive infections in Europe: Molecular-Epidemiological analysis." *PLoS Medicine* **7**(1):1-15
- 203 Shopsis B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH et al. 1999. "Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *S. aureus* strains." *J Clin Microbiol* **37**:3556-3563
- 204 Harmsen D, Heike C, Witte W, Rothganger J, et al. 2003. "Typing of methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital by using novel software for spa repeat determination and database management." *J Clin Microbiol* **41**(12):5442-5448
- 205 Cunningham MW. 2000. "Pathogenesis of Group A Streptococcal infections." *Clinical Microbiology Reviews* **13**(3):470-511
- 206 Fischetti VA 1989. "Streptococcal M Protein: Molecular design and biological behavior." *Clin Microbiol Reviews* **2**(3): 285-314
- 207 Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, et al. 1998. "Multi-locus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms." *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:3140-3145
- 208 Urwin R, Maiden MCJ 2003. "Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology." *Trends in Microbiology* **11**: 479-487
- 209 Turner KM, Feil EJ. 2007. "The secret life of the multi-locus sequence type." *Int J Antimicrob Agents* **29**(2): 129-135
- 210 Chen Y, Zhang W and Knabel SJ. 2005. "Multi-Virulence-Locus sequence typing clarifies epidemiology of recent Listeriosis outbreaks in United States." *J Clin Microbiol* **43**(10): 5291-5294
- 211 Chen Y, Zhang W and Knabel SJ 2007. "Multi-Virulence-Locus sequence typing identifies single nucleotide polymorphisms which differentiate epidemic clones and outbreak strains of *Listeria monocytogenes*." *J Clin Microbiol* **45**(3):835-846
- 212 Teh CS, Chua KH and Thong KL 2011. "Genetic variation of *Vibrio cholerae* using multilocus sequencing typing and multi-virulence locus sequencing typing." *Infect Genet Evol* 2011 Apr 12 (Epub a heat of print)
- 213 Mohamad Y, Roche SM, Myers G, Bavoil PM, et al. 2008: "Preliminary phylogenetic identification of virulent *Chlamydomydia pecorum* strains." *Infect Genet Evol* **8**(6):764-771
- 214 Michael T, Madigan, John M, Martinko, Jack Parker 2010. "Brock: Βιολογία των μικροοργανισμών." Επιμέλεια: Τάσος Οικονόμου. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. (Τόμος Ι) σελ. 310-368
- 215 Feil, E. J., and B. G. Spratt. 2001. "Recombination and the population structures of bacterial pathogens." *Annu. Rev. Microbiol.* **55**:561-590.
- 216 Ochiai K, Yamanaka T, Kimura K, Sawada O. 1959. "Inheritance of drug resistance (and its transfer) between *Shigella* strains and between *Shigella* and *E. coli* strains (in Japan)." *Hihon Iji Shimpou* **1861**: 34
- 217 Akida T, Koyama K, Ishiki Y, Kimura S, Fukushima T. April 1960. "On the mechanism of the development of multiple-drag-resistant clones of *Shigella*." *Jpn. J. Microbiol*, **4**: 219-227.
- 218 Syvanen M Cross. 1985. "Species gene transfer, implications for new theory of evolution." *J. Theor. Biol.* **112**(2):333-43.
- 219 Bennett PM, Livesey CT, Nathawani D, Reeves DS et al. 2004. "An assessment of the risks associated with the use of antibiotic resistance genes in genetically modified plants." *J. Antimicrob. Chemother.* **53**: 418-431
- 220 Biemont C, Vieira C. 2006. "Genetics: junk DNA as an evolutionary force." *Nature*: **443**(7111):521-524
- 221 Craig NL 1997. "Target site selection in transposition." *Ann Rev Biochem* **66**: 437-474
- 222 Bennett PM. 2008. "Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria." *British J. of Pharmacology* **153**: S347-S357
- 223 Recchia GD, Hall RM 1995. "Gene cassettes: A new class of mobile elements." *Microbiology* **141**:3015-3027
- 224 Mazel D, Dychinco B, Webb V, Davies J 1998. "A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome." *Science* **280**: 605-608
- 225 Partridge SR, Recchia GD, Scaramuzzi C, Collis CM et al. 2000. "Definition of the attI1 site of class 1 integrons." *Microbiology* **146**: 2855-2864
- 226 Hochhut B, Lotfi Y, Mazzel D, Farugue SM et al. 2001. "Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and SXT constins." *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 2991-3000
- 227 Nield BS, Holmes AJ, Gillings MR, Recchia GD et al. 2001. "Recovery of new integron classes from environment DNA." *FEMS Microbiol Lett* **195**:59-65
- 228 Clark CA, Purins L, Kaewrakon P, Manning P. 1997. "VCR sequence elements in *Vibrio cholerae* chromosome constitute a mega-integron." *Mol Microbiol* **26**:1137-1138
- 229 Bennett PM. 2008. "Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria." *British J. of Pharmacology* **153**: S347-S357
- 230 Bennett PM. 2008. "Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria." *British J. of Pharmacology* **153**: S347-S357
- 231 Sundstrom L, Roy PH, Skold O. 1991. "Site specific insertion of three structural gene cassette in transposon Tn7." *J Bacteriol* **173**:3025-3028

- 232 **Radstrom P, Skold O, Swedberg G, Flensburg J et al.** 1994. "Transposon Tn5090 of plasmid R751, which carries an integron, is related to Tn7, Mu and the retroelements." *J Bacteriol* **176**:3257-3268
- 233 **Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H et al.** 1995. "A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP." *Antimicrob Agents Chemother* **39**:1612-1615
- 234 **Correia M, Boavida F, Grosso F, Salgado MJ et al.** 2003. "Molecular characterization of new class 3 integronin *Klebsiella pneumoniae*." *Antimicrob Agents Chemother* **47**:2838-2843
- 235 **Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K. et al.** 1996. "PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (blaIMP) in Gram-negative robs resistant to broad-spectrum beta-lactams." *J Clin Microbiol* **34**:2909-2913
- 236 **Mazel D.** 2006. "Integrans: agents of bacterial evolution." *Nat Rev Microbiol* **4**:608-620
- 237 **Hall RM, Collis CM** 1995. "Mobile gene cassettes and integrons: Capture and spread of genes by site-specific recombination." *Mol Microbiol* **15**:593-600
- 238 **Stokes HW, Hall RM.** 1991. "Sequence analysis of the inducible chloramphenicol resistance determinant in the Tn1696 integron suggests regulation by translational attenuation." *Plasmid* **26**:10-19
- 239 **Norman A,Hansen LH and Sorensen S.** 2009. "Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool." *Review Phil Trans R Sol B* **364**:2275-2289
- 240 **Meccas J, Strauss EJ.** 1996. "Molecular mechanisms of bacterial virulence: Type III secretion and pathogenicity islands." *Emerging Infectious diseases* **2**: 271-288
- 241 **Spratt BG, Maiden MCJ.** 1999. "Bacterial population genetics, evolution and epidemiology." *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **354** : 701-710
- 242 **Musser JM.** 1996. "Molecular population genetic analysis of emerged bacterial pathogens. Selected Insights." *Emerging Infectious Diseases* **2**:1-17.
- 243 **Oliveira DC, Tomasz A, De Lancaster H.** 2002. "Secrets of success of a human pathogen: Molecular evolution of pandemic clones of methicillin resistant *St. aureus*." *The Lancet Infectious Diseases* **2** :180-189
- 244 **Souza V, Rocha M, Valera A, Eguiarte LE.** 1999. "Genetic structure of Natural Populations of *E.coli* in Wild Hosts on Different Continents." *Applied and Environmental Microbiology* **65**:3374-3385
- 245 **Jolley KA, Kalmusova J, Feil EJ, Gupta S et al.** 2000. "Carried meningococci in the Czech Republic: a diverse recombining population." *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 4492-4498
- 246 **Mcgee L, Mcdougal L, Zdou J, Spatt BG. et al.** 2001. "Nomenclature of major antimicrobial - resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by Pneumococcal molecular epidemiological Network." *J. Clin. Microbiol.* **39**:2565-2571
- 247 **Urwin R, Martin CJ and Maiden MCJ** 2003. "Multi-locus sequence typing : a tool for global epidemiology." *Trends Microbiol* **11**(10):479-87
- 248 **Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP and Spratt BG** 2004. "Eburst: Inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from Multi-locus sequence typing data." *JB* **186**(5):1518-1530
- 249 **Aanensen DM, Spratt BG.** 2005 Jul "The multilocus sequence typing network: mlst.net." *Nucleic Acids Res.* **1**;3
- 250 **Edward J. Feil, Jessica E., Cooper, Hajo Grundmann D. et al.** 2003. "How clonal is *Staphylococcus Aureus*?" *J. Bacteriol.* **185** (11): 3307-3316
- 251 <http://www.mlst.net>
- 252 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- 253 <http://efaecium.mlst.net/>
- 254 **Homan WL, Tribe D, Poznanski S, Li M et al.** 2002. "Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*." *J Clin Microbiol* **40**(6):1963-71
- 255 (<http://efaecalis.mlst.net/>)
- 256 **Ruiz-Garbajosa P, Bonten MJ, Robinson DA, Top J. et al.** 2006. "Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination" *J Clin Microbiol.* **44**(6):2220-8
- 257 **Shankar N et al.,** 2002. "Modulation of virulence within a pathogenesis island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*." *Nature* **417**(6890):746-50
- 258 **Davidson AL, Dassa E, Orelle C, Chen J** 2008. "Structure, function and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **72**(2):317-364
- 259 **Locher KP** 2009 "Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters." *Phil Trans R Soc B* **364**: 239-245
- 260 ([http:// saureus.mlst.net/](http://saureus.mlst.net/))
- 261 **Mark C. Enright, Nicholas P. J. Day et al.** 2000. "Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus*" *J. Clin. Microbiol.* **38**(3): 1008-1015
- 262 **Kuroda M et al.,** 2001. "Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Lancet* **357** (9264):1225-40
- 263 <http://sepidermidis.mlst.net>
- 264 **Thomas CJ, Vargas R M, Miragaia M, Peacock JS et al.** 2007. "Improved Multilocus Sequence Typing Scheme for *Staphylococcus epidermidis*" *J. Clin. Microbiol.* **45** (2) 616-619
- 265 **Zhang YQ et al.,** 2003. "Genome-based analysis of virulence genes in non-biofilm forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228)." *Mol Microbiol* **49**(6):1577-93

- 266 <http://spyogenes.mlst.net>
- 267 **Enright, M. C., B. G. Spratt, A. Kalia, J. H. Cross, and D. E. Bessen.** 2001. "Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* and the relationships between *emm* type and clone." *Infect. Immun.* **69**:2416-2427.
- 268 **Smoot JC et al.** 2002. "Genome sequence and comparative microarray analysis of serotype M18 group A *Streptococcus* strains associated with acute rheumatic fever outbreaks." *Proc Natl Acad Sci USA* **99**(7): 4668-73.
- 269 <http://pubmlst.org/sagalactiae/>
- 270 **Nicola Jones, John F. Bohnsack, Shinji Takahashi, Karen A. Oliver et al.** 2003. "Multilocus Sequence Typing System for Group B *Streptococcus*." *J. Clin. Microbiol.*, 2530-2536
- 271 **Tettelin H et al.** 2005. "Genome analysis of multiple pathogenic of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial pan-genome." *Proc Natl Acad Sci USA* **102**(39):13950-5
- 272 **David M. Aanensen* and Brian G. Spratt** 2005 «The multilocus sequence typing network: mlst.net» *Nucleic Acids Research*, Vol. **33**: 728-733
- 273 **Altschul X, Steven F, Thomas L, Madden X, et al.** 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Rew* **25**: 3389-3402 (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/)
- 274 **Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei.** 1994. "MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers." *Comput. Appl. Biosci.* **10**:189-191.
- 276 **Higgins D., Thompson J.** 1994. "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-4680.
- 277 **Kanehisa M** 1997. "A database for post-genome analysis". *Trends Genet* **13** (9): 375-6
- 278 **Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Okuno Y, Hattori M** 2004. "The KEGG resource for deciphering the genome". *Nucleic Acids Res* **32** (Database issue): D277-80.
- 279 **Margrete Solheim, Mari C Brekke, Lars G Snipen, Rob JL Willems et al.** 2011. "Comparative genomic analysis reveals significant enrichment of mobile genetic elements and genes encoding surface structure-proteins in hospital-associated clonal complex 2 *Enterococcus faecalis*" *BMC Microbiology* **11**:3
- 280 **Tannock, G. W., and G. Cook.** 2002. "Enterococci as members of the intestinal microflora of humans, p. 101-132." In **M. S. Gilmore, D. B. Clewell, P. Courvalin, G. M. Dunny, B. E. Murray, and L. B. Rice** (ed.) "The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance." *American Society for Microbiology*, Washington, D.C.
- 281 **Galloway-Peña, J. R., S. R. Nallapareddy, C. A. Arias, G. M. Eliopoulos, and B. E. Murray.** 2009. "Analysis of clonality and antibiotic resistance among early clinical isolates of *Enterococcus faecium* in the United States." *J. Infect. Dis.* **200**:1566-1573
- 282 **Ana R Freitas, Ana P. Tedim, Carla Novais, Patricia Ruiz-Garbajosa et al.** 2010. "Global Spread of the *hyl_{Em}* Colonization-Virulence Gene in Megaplasmids of the *Enterococcus faecium* CC17 Polyclonal Subcluster." *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**(6):2660-2665
- 283 **Damani A, Klapsa D, Panopoulou M, Spiliopoulou I, Petinaki E. et al.** 2010 Mar. "A newly described vancomycin-resistant ST412 *Enterococcus faecium* predominant in Greek hospitals." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **29**(3):329-31
- 284 **Leavis, H. L., M. J. Bonten, and R. J. Willems.** 2006. "Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance." *Curr. Opin. Microbiol.* **9**:454-460.
- 285 **Willems, R. J. L., and W. van Schaik.** 2009. "Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen." *Future Microbiol.* **4**:1125-1135.
- 286 **E. Heikens, W. van Schaik, H.L. Leavis, M. J. M. Bonten, and R. J. L. Willems** 2008. "Identification of a Novel Genomic Island Specific to Hospital-Acquired Clonal Complex 17 *Enterococcus faecium* Isolates." *Applied and Environmental Microbiology* **74**(22): 7094-97
- 287 **Willems, R. J., J. Top, M. van Santen, D. A. Robinson et al.** 2005. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex." *Emerg. Infect. Dis.* **11**:821-828.
- 288 **Top, J., Willems, R. and Bonten, M.** 2008. "Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen." *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **52**:297-308.
- 289 **Costerton, J. W.** 2001. "Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection." *Trends Microbiol* **9**:50-52.
- 290 **O'Toole, G., Kaplan, H. B. & Kolter, R.** 2000. "Biofilm formation as microbial development." *Annu Rev Microbiol* **54**:49-79.
- 291 **Miller, M. B. & Bassler, B. L.** 2001. "Quorum sensing in bacteria." *Annu Rev Microbiol* **55**:165-199.
- 292 **Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P.** 1999. "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections." *Science* **284**:1318-1322.
- 293 **Lewis, K.** 2001. "Riddle of biofilm resistance." *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 999-1007.
- 294 **Dautle, M. P., R. L. Ulrich, and T. A. Hughes.** 2002. "Typing and subtyping of 83 clinical isolates purified from surgically implanted silicone feeding tubes by random amplified polymorphic DNA amplification." *J. Clin. Microbiol.* **40**:414-421.
- 295 **Distel, J. W., J. F. Hatton, and M. J. Gillespie.** 2002. "Biofilm formation in medicated root canals." *J. Endod.* **28**:689-693
- 296 **Donlan, R. M., and J. W. Costerton.** 2002. "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms." *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:167-193

- ²⁹⁷ Zegans, M. E., H. I. Becker, J. Budzik, and G. O'Toole. 2002. "The role of bacterial biofilms in ocular infections." *DNA Cell Biol.* **21**:415-420.
- ²⁹⁸ Baldassarri L, Bertuccini L, Ammendolia MG, Gherardi G & Creti R 2001. "Variant *esp* gene in vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium*." *Lancet* **357**: 1802.
- ²⁹⁹ Bonten MJ, Willems R & Weinstein RA 2001. "Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from?" *Lancet Infect Dis* **1**: 314-325
- ³⁰⁰ Willems RJ, Homan W, Top J et al. 2001. "Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals." *Lancet* **357**: 853-855.
- ³⁰¹ Eaton TJ & Gasson MJ 2002. "A variant enterococcal surface protein *Esp(fm)* in *Enterococcus faecium*; distribution among food, commensal, medical, and environmental isolates." *FEMS Microbiol Lett* **216**: 269-275
- ³⁰² Coque TM, Willems R, Canton R, Del Campo R & Baquero F 2002. "High occurrence of *esp* among ampicillin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* clones from hospitalized patients." *J Antimicrob Chemother* **50**: 1035-1038.
- ³⁰³ Hammerum AM & Jensen LB 2002. "Prevalence of *esp*, encoding the enterococcal surface protein, in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from hospital patients, poultry, and pigs in Denmark." *J Clin Microbiol* **40**: 4396.
- ³⁰⁴ Esther Heikens, * Marc J. M. Bonten, and Rob J. L. Willems 2007. "Enterococcal Surface Protein *Esp* Is Important for Biofilm Formation of *Enterococcus faecium* E1162" **189**(22):8233-8240
- ³⁰⁵ Van Wamel WJ, Hendrickx AP, Bonten MJ, Top J et al. 2007. "Growth condition-dependent *Esp* expression by *Enterococcus faecium* affects initial adherence and biofilm formation." *Infect Immun* **75**: 924-931.
- ³⁰⁶ Lund, B., and C. Edlund. 2003. "Bloodstream isolates of *Enterococcus faecium* enriched with the enterococcal surface protein gene, *esp*, show increased adhesion to eukaryotic cells." *J. Clin. Microbiol.* **41**:5183-5185.
- ³⁰⁷ Shankar N, Baghdayan AS & Gilmore MS 2002. "Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*." *Nature* **417**: 746-750.
- ³⁰⁸ Leavis H, Top J, Shankar N, Borgen K, Bonten M, Van Embden J & Willems RJ 2004. "A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity." *J Bacteriol* **186**: 672-682
- ³⁰⁹ Eaton, T. J., and M. J. Gasson. 2002. "A variant enterococcal surface protein *Esp_{fm}* in *Enterococcus faecium*; distribution among food, commensal, medical, and environmental isolates." *FEMS Microbiol. Lett.* **216**:269-275.
- ³¹⁰ Shankar, V., A. S. Baghdayan, M. M. Huycke, G. Lindahl et al. 1999. "Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein." *Infect. Immun.* **67**:193-200.
- ³¹¹ Stalhammar-Carlemalm, M., L. Stenberg, and G. Lindahl. 1993. "Protein Rib: a novel group B streptococcal cell surface protein that confers protective immunity and is expressed by most strains causing invasive infections." *J. Exp. Med.* **177**:1593-1603.
- ³¹² Madoff, L. C., J. L. Michel, E. W. Gong, D. E. Kling, and D. L. Kasper. 1996. "Group B streptococci escape host immunity by deletion of tandem repeat elements of the alpha C protein." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 4131-4136.
- ³¹³ Michel, J. L., L. C. Madoff, D. E. Kling, D. L. Kasper, and F. M. Ausubel. 1991. "Cloned alpha and beta C-protein antigens of group B streptococci elicit protective immunity." *Infect. Immun.* **59**:2023-2028.
- ³¹⁴ Cucarella C., C. Solano, J. Valle, B. Amorena et al. 2001. "*Bap*, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation." *J. Bacteriol.* **183**:2888-2896.
- ³¹⁵ Coque, T. M., R. J. Willems, J. Fortu'n, J. Top 2005. "Population structure of *Enterococcus faecium* causing bacteremia in a Spanish university hospital: setting the scene for a future increase in vancomycin resistance?" *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 2693-2700.
- ³¹⁶ Galloway-Pena, J. R., S. R. Nallapareddy, C. A. Arias, G. M. Eliopoulos 2009. "Analysis of clonality and antibiotic resistance among early clinical isolates of *Enterococcus faecium* in the United States." *J. Infect.Dis.* **200**:1566-1573.
- ³¹⁷ Rice L. B., L. Carias, S. Rudin, C. Vael and B. E. Murray. 2003. "A potential virulence gene, *hylEfm*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin." *J. Infect. Dis.* **187**: 508-512.
- ³¹⁸ Werner, G., T. M. Coque, A. M. Hammerum, R. Hope et al. 2008. "Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe." *Euro Surveill.* **13**:19046.
- ³¹⁹ Willems, R. J. L., and W. van Schaik. 2009. Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen." *Future Microbiol.* **4**: 1125-1135.
- ³²⁰ Ana R. Freitas, Ana P. Tedim, Carla Novais, Patricia Ruiz-Garbajosa et al. 2010. "Global Spread of the *hylEfm* Colonization-Virulence Gene in Megaplasmids of the *Enterococcus faecium* CC17 Polyclonal Subcluster." *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**(6):2660-2665
- ³²¹ Arias, C. A., D. Panesso, K. V. Singh, L. B. Rice, and B. E. Murray. 2009. "Cotransfer of antibiotic resistance genes and a *hylEfm*-containing virulence plasmid in *Enterococcus faecium*." *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 4240-4246
- ³²² Rice, L. B., V. Lakticova, L. L. Carias, S. Rudin et al. 2009. "Transferable capacity for gastrointestinal colonization in *Enterococcus faecium* in a mouse model." *J. Infect. Dis.* **199**: 342-349.

- 323 Sheldon, W. L., M. S. Macauley, E. J. Taylor, C. E. Robinson, S. J. et al. 2006. "Functional analysis of a group A streptococcal *glycoside hydrolase* Spy1600 from family 84 reveals it is a *N-acetyl glucosaminidase* and not a *hyaluronidase*." *Biochem. J.* **399**:241–247.
- 324 Routsis, C., E. Platsouka, R. J. Willems, M. J. Bonten, O. Paniara, G. Saroglou, and C. Roussos. 2003. "Detection of enterococcal surface protein gene (*esp*) and amplified fragment length polymorphism typing of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* during its emergence in a Greek intensive care unit." *J. Clin. Microbiol.* **41**:5742–5746.
- 325 Arduino RC, Jacques-Palaz K, Murray BE & Rakita RM 1994. "Resistance of *Enterococcus faecium* to neutrophil-mediated phagocytosis." *Infect Immun* **62**:5587–5594.
- 326 Teng F, Kawalec M, Weinstock GM, Hryniewicz W & Murray BE 2003. "An *Enterococcus faecium* secreted antigen, *SagA*, exhibits broad-spectrum binding to extracellular matrix proteins and appears essential for *E.faecium* growth." *Infect Immun* **71**:5033–5041.
- 327 Nallapareddy SR, Weinstock GM & Murray BE 2003. "Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by *Acm*, a new member of the MSCRAMM family." *Mol Microbiol* **47**:1733–1747.
- 328 Leavis HL, Willems RJ, Van Wamel WJ, Schuren FH et al. 2007. "Insertion sequence-driven diversification creates a globally dispersed emerging multiresistant subspecies of *E. faecium*." *PLoS Pathog* **3**(1):e7
- 329 Baquero F, Coque TM & Canton R 2003. "Antibiotics, complexity, and evolution." *ASM News* **69**:547–552.
- 330 Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. 2000. "Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States." *Infect Control Hosp Epidemiol* **21**(8):510–515.
- 331 Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, et al. 2004. "Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study." *Clin Infect Dis* **39**(3):309–317.
- 332 Hancock LE, Gilmore MS. 2006. "Pathogenicity of enterococci. In Gram-positive pathogens." Edited by: Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI. Washington DC: ASM Press 299–311.
- 333 Shankar N, Lockatell CV, Baghdayan AS, Drachenberg C, Gilmore MS & Johnson DE 2001. "Role of *Enterococcus faecalis* surface protein *Esp* in the pathogenesis of ascending urinary tract infection." *Infect Immun* **69**:4366–4372.
- 334 Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G & Gilmore MS 1999. "Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein." *Infect Immun* **67**:193–200.
- 335 Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, et al. 2001. "The enterococcal surface protein, *Esp*, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation." *Appl Environ Microbiol* **67**:4538–4545.
- 336 Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS & Shankar N 2004. "Enterococcal surface protein, *Esp*, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*." *Infect Immun* **72**:6032–6039
- 337 Tendolkar PM, Baghdayan AS & Shankar N 2005. "The N-terminal domain of enterococcal surface protein, *Esp*, is sufficient for *Esp*-mediated biofilm enhancement in *Enterococcus faecalis*." *J Bacteriol* **187**: 6213–6222.
- 338 Rice LB, Carias L, Rudin S, Vael C, et al. 2003. "A potential virulence gene, *hylEfm*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin." *J Infect Dis* **187**(3):508–512.
- 339 Shankar N, Baghdayan AS & Gilmore MS 2002. "Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*." *Nature* **417**:746–750.
- 340 Nallapareddy SR, Sillanpaa J, Ganesh VK, Hook M. 2007. "Inhibition of *Enterococcus faecium* adherence to collagen by antibodies against highaffinity binding subdomains of *Acm*." *Infect Immun* **75**(6):3192–3196.
- 341 Bourgogne A, Garsin DA, Qin X, Singh KV, Sillanpaa J et al. 2008. "Large scale variation in *Enterococcus faecalis* illustrated by the genome analysis of strain OG1RF." *Genome Biol* **9**(7):R110.
- 342 Kawalec M, Pietras Z, Danilowicz E, Jakubczak A et al. 2007. "Clonal structure of *Enterococcus faecalis* isolated from Polish hospitals: characterization of epidemic clones." *J Clin Microbiol*, **45**(1): 147
- 343 Spiliopoulou I, Damani A, Chini V, Zerva L, Kolonitsiou F, Petinaki E. 2011. "Linezolid-resistant enterococci in Greece: epidemiological characteristics." *Chemotherapy*. **57**(3):181–5.
- 344 Ruiz-Garbajosa P, Bonten MJ, Robinson DA, Top J. et al. 2006. "Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination." *J Clin Microbiol* **44**(6):2220–2228.
- 345 Nallapareddy SR, Wenxiang H, Weinstock GM, Murray BE. 2005. "Molecular characterization of a widespread, pathogenic, and antibiotic resistance receptive *Enterococcus faecalis* lineage and dissemination of its putative pathogenicity island." *J Bacteriol* **187**(16):5709–5718.
- 346 Murray BE, Mederski-Samaroj B. 1983. "Transferable beta-lactamase. A new mechanism for in vitro penicillin resistance in *Streptococcus faecalis*." *J Clin Invest* **72**(3):1168–1171.
- 347 Cox, R. A., C. Conquest, C. Mallaghan, and R. R. Marples. 1995. "A major outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* caused by a newphage type (EMRSA-16)." *J. Hosp. Infect.* **29**:87–106.

- 348 **Dominguez, M. A., H. de Lencastre, J. Lin~ares, and A. Tomasz.** 1994. "Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish hospital." *J. Clin. Microbiol.* **32**:2081-2087.
- 349 **Richardson, J. F., and S. Reith.** 1993. "Characterization of a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA-15) by conventional and molecular methods." *J. Hosp. Infect.* **25**:45-52.
- 350 **Mark C. Enright, D. Ashley Robinson, Gaynor Randle, Edward J. Feil et al.** 2002. "The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99(11):7687-7692
- 351 **Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K.** 2003. "Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC", *Drug Resist Update*, **6**:41-52.
- 352 **Kreiswirth B, Kornblum J, Arbeit RD et al.** 1993. "Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*" *Science* **259**:227-230.
- 353 **Qi W, Ender M, O'Brien F et al.** 2005. "Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Zurich, Switzerland (2003): prevalence of type IV SCCmec and a new SCCmec element associated with isolates from intravenous drug users.", *J Clin Microbiol.*, **43**:5164-5170.
- 354 **Musser JM, Kapur V.** 1992. "Clonal analysis of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: association of the *mec* gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination", *J Clin Microbiol* **30**:2058-2063.
- 355 **Fitzgerald JR, Sturdevant DE, Mackie SM, Gill SR, Musser JM.** 2001. "Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic", *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**:8821-8826.
- 356 **Etienne J.** 2005. "Panton-Valentine leukocidin: a marker of severity for *Staphylococcus aureus* infection?", *Clin Infect Dis.*, **41**:591-593.
- 357 **Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K et al.** 2003. "Comparison of community- and health care-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection" *JAMA*, **290**:2976-2984.
- 358 **Salgado CD, Farr BM, Calfee DP.** 2003. "Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors", *Clin Infect Dis.*, **36**:131-139.
- 359 **Michael Z. David and Robert S. Daum.** 2010. "Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic", *J Clin Microbiol Rev.*, **23**(3):616-687
- 360 **David, M. Z., D. Glikman, S. E. Crawford, J. Peng, et al.** 2008. "What is community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*?", *J. Infect. Dis.*, **197**:1235-1243.
- 361 **Seybold U, Kourbatova EV, Johnson JG et al.** 2006. "Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genotype as a major cause of health care-associated blood stream infections", *Clin Infect Dis.*, **42**:647-656.
- 362 **Kourbatova EV, Halvosa JS, King MD et al.** 2005. "Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 clone as a cause of health care-associated infections among patients with prosthetic joint infections", *Am J Infect Control*, **33**:385-391.
- 363 **Liu, C., C. J. Graber, M. Karr, B. A. Diep, L. Basuino, M. et al.** 2008. "A population-based study of the incidence and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in San Francisco, 2004-2005." *Clin. Infect. Dis.* **46**:1637-1646.
- 364 **Simon R. Harris, Edward J. Feil, Matthew T. G. Holden, Michael A. Quail et al.** 2010. "Evolution of MRSA During Hospital Transmission and Intercontinental Spread", *Science*, 327
- 365 **Niniou, I., S. Vourli, E. Lebessi, M. Fonustoukou, A. Vatopoulos, D. G.Pasparakis, M. N. Tsolia.** 2008. "Clinical and molecular epidemiology of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children in central Greece." *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **27**:831-837.
- 366 **Sdougkos, G., V. Chini, D. A. Papanastasiou, G. Christodoulou, E. Stamatakis, A. Vris, I. Christodoulidi, G. Protopapadakis, and I. Spiliopoulou.** 2008. "Community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections and nasal carriage among children: molecular microbial data and clinical characteristics." *Clin. Microbiol. Infect.* **14**:995-1001.
- 367 **Durand, G., M. Bes, H. Meugnier, M. C. Enright, J. Etienne.** 2006. "Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones containing toxic-shock syndrome toxin 1 gene responsible for hospital- and community-acquired infections in France." *J. Clin. Microbiol.* **44**:847-853.
- 368 **Brady, J. M., M. E. Stemper, A. Weigel, P. H. and S. K. Shukla.** 2007. "Sporadic "transitional" community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from health care facilities in the United States." *J. Clin. Microbiol.* **45**:2654-2661.
- 369 **Fitzgerald JR, Sturdevant DE, Mackie SM, Gill SR, Musser JM.** 2001. "Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic." *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:8821-6.
- 370 **Neocleous Ch, Damani A, Gerogianni I, Gourgoulisanis K, Petinaki E.** 2010. "Necrotizing pneumonia in Greece caused by a USA400 (ST1) *Staphylococcus aureus* harboring SSCmec type V." *Infection* **38**(1):76-7
- 371 **Coombs, G. W., G. R. Nimmo, J. C. Pearson, and the Australian Group for Antimicrobial Resistance.** 2009. "Prevalence of MRSA strains among *Staphylococcus aureus* isolated from outpatients, 2006." *Commun. Dis. Intell.* **33**:10-20.

- 372 **Otter, J. A., and G. L. French.** 2008. "The emergence of community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a London teaching hospital, 2000-2006." *Clin. Microbiol. Infect.* **14**:670-676.
- 373 **Liu, C., C. J. Graber, M. Karr, B. A. Diep, L. Basuino, B. S. Schwartz, M. C. Enright, J. O'Hanlon, J. C. Thomas and H. F. Chambers.** 2008. "A population-based study of the incidence and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in San Francisco, 2004-2005." *Clin. Infect. Dis.* **46**:1637-1646.
- 374 **Fenner, L., A. F. Widmer, M. Dangel, and R. Frei.** 2008. "Distribution of *spa* types among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates during a 6 year period at a low-prevalence university hospital." *J. Med. Microbiol.* **57**:612-616.
- 375 **Francois, P., S. Harbarth, A. Huyghe, G. Renzi, et al.** 2008. "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Geneva, Switzerland, 1993-2005." *Emerg. Infect. Dis.* **14**:304-307.
- 376 **Michael Z. David* and Robert S. Daum.** 2010. "Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic", *J Clin Microbiol Rev.*, **23**(3):616-687
- 377 **Giorgia Valsesia, Marco Rossi, Sonja Bertschy, Gaby E. Pfyffer** 2010. "Emergence of SCCmec Type IV and SCCmec Type V Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the *Panton-Valentine Leukocidin* Genes in a Large Academic Teaching Hospital in Central Switzerland: External Invaders or Persisting Circulators?", *J Clin Microbiol*, **48**(3): 720-727.
- 378 **Qi, W., M. Ender, F. O'Brien, A. Imhof, et al.** 2005. "Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Zurich, Switzerland (2003): prevalence of type IV SCCmec and a new SCCmec element associated with isolates from intravenous drug users.", *J. Clin. Microbiol.*, **43**:5164-5170.
- 379 **Saiman, L., M. O'Keefe, P. L. Graham III, F. Wu, B. Said-Salim, et al.** 2003. "Hospital transmission of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among postpartum women.", *Clin. Infect. Dis.* **37**:1313-1319.
- 380 **Stranden, A., R. Frei, H. Adler, U. Fluckiger, and A. Widmer.** 2009. "Emergence of SCCmec type IV as the most common type of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital." *Infection* **37**:44-48.
- 381 **Turner, K. M. E., and E. J. Feil.** 2007. "The secret life of the multilocus sequence type." *Int. J. Antimicrob. Agents*, **29**:129-135.
- 382 **Cohan, F. M.** 2002. "What are bacterial species?" *Annu. Rev. Microbiol.* **56**:457-487
- 383 **Kloos WE, Musselwhite MS.** 1975. "Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin." *Appl Microbiol* **30**(3): 381-385.
- 384 **Uckay I, et al.** 2009. "Foreign body infections due to *Staphylococcus epidermidis*." *Ann Med* **41**: 109-119.
- 385 **Miragaia M, Thomas JC, Couto I, Enright MC, de Lencastre H.** 2007. "Inferring a population structure for *Staphylococcus epidermidis* from multilocus sequence typing data." *J Bacteriol* **189**(6):2540-2552.
- 386 **Miragaia M, de Lencastre H, Perdreau-Remington F, et al.** 2009. "Genetic diversity of arginine catabolic mobile element in *Staphylococcus epidermidis*." *PLoS ONE* **4**(11):e7722.
- 387 **Mongkolrattanothai K, Boyle S, Murphy TV, Daum RS.** 2004. "Novel non-mecA-containing staphylococcal chromosomal cassette composite island containing *pbp4* and *tagF* genes in a commensal staphylococcal species: a possible reservoir for antibiotic resistance islands in *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(5): 1823-1836.
- 388 **Massey RC, Horsburgh MJ, Lina G, Hook M.** 2006. "The evolution and maintenance of virulence in *Staphylococcus aureus*: a role for host-to-host transmission?" *Nat Rev Microbiol* **4**(12): 953-958.
- 389 **Otto M.** 2009. *Staphylococcus epidermidis* - the 'accidental' pathogen." *Nat Rev Microbiol* **7**(8):555-567.
- 390 **Otto M.** 2009. "Bacterial sensing of antimicrobial peptides." *Contrib Microbiol* **16**: 136-149.
- 391 **Li M, Lai Y, Villaruz AE, Cha DJ, Sturdevant DE, Otto M.** 2007. "Gram-positive three-component antimicrobial peptide-sensing system." *Proc Natl Acad Sci USA* **104**(22): 9469-9474.
- 392 **Kocianova S, Vuong C, Yao Y, et al.** 2005. "Key role of poly-γ-DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*." *J Clin Invest* **115**(3):688-694.
- 393 **A. Liakopoulos, I. Spiliopoulou, A. Damani,, E. Petinaki et al.** 2010. "Dissemination of two international linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones in Greek hospitals" *J Antimicrob Chemother* **65**: 1070-1077
- 394 **Rogers KL, Fey PD, Rupp ME.** 2009. "Coagulase-negative staphylococcal infections. Review discussing clinical aspects of *Staphylococcus epidermidis*." *Infect Dis Clin North Am* **23**(1): 73-98.
- 395 **Kozitskaya S, Olson ME, Fey PD, Witte W et al.** 2005. "Clonal analysis of *Staphylococcus epidermidis* isolates carrying or lacking biofilm-mediating genes by multilocus sequence typing." *J Clin Microbiol* **43**(9):4751-4757.
- 396 **Cho SH, Naber K, Hacker J, Ziebuhr W.** 2002. "Detection of the *icaADBC* gene cluster and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from catheter-related urinary tract infections." *Int J Antimicrob Agents* **19**(6):570-575.

- ³⁹⁷ Rohde H, Burandt EC, Siemssen N, et al. 2007. "Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections." *Biomaterials* **28**(9):1711-1720.
- ³⁹⁸ Rogers KL, Rupp ME, Fey PD. 2008. "The presence of *icaADBC* is detrimental to the colonization of human skin by *Staphylococcus epidermidis*." *Appl Environ Microbiol* **74**(19):6155-6157.
- ³⁹⁹ Heilmann C, Hussain M, Peters G, Gotz F. 1997. "Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface." *Mol Microbiol* **24**(5):1013-1024.
- ⁴⁰⁰ Heilmann C, Thumm G, Chhatwal GS, Hartleib J, et al. 2003. "Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*." *Microbiology* **149**(10):2769-2778.
- ⁴⁰¹ Sellman BR, Timofeyeva Y, Nanra J, et al. 2008. "Expression of *Staphylococcus epidermidis* SdrG increases following exposure to an *in vivo* environment." *Infect Immun* **76**(7):2950-2957.
- ⁴⁰² Rohde H, Frankenberger S, Zahringer U, Mack D. 2010. "Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections." *Eur J Cell Biol* **89**(1):103-111.
- ⁴⁰³ Olson ME, Garvin KL, Fey PD, Rupp ME. 2006. "Adherence of *Staphylococcus epidermidis* to biomaterials is augmented by PIA." *Clin Orthop Relat Res* **451**:21-24.
- ⁴⁰⁴ Banner MA, Cunniffe JG, Macintosh RL, et al. 2007. "Localized tufts of fibrils on *Staphylococcus epidermidis* NCTC 11047 are comprised of the accumulation-associated protein." *J Bacteriol* **189**(7):2793-2804.
- ⁴⁰⁵ Beenken KE, Dunman PM, McAleese F, et al. 2004. "Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms." *J Bacteriol* **186**(14):4665-4684.
- ⁴⁰⁶ Yao Y, Sturdevant DE, Otto M. 2005. "Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms." *J Infect Dis* **191**(2):289-298.
- ⁴⁰⁷ Diep BA, Gill SR, Chang RF, et al. 2006. "Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Lancet* **367**(9512):731-739.
- ⁴⁰⁸ Nagarajan V, Smeltzer MS, Elasm MO. 2009. "Genome-scale transcriptional profiling in *Staphylococcus aureus*: bringing order out of chaos." *FEMS Microbiol Lett* **295**(2):204-210.
- ⁴⁰⁹ Diep BA, Gill SR, Chang RF, et al. 2006. "Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Lancet* **367**(9512):731-739.
- ⁴¹⁰ Seppala H, Klaukka T, Vuopio-Varkila J, Muotiala A, 1997. "The effect of changes in the consumption of macrolide antibiotics on erythromycin resistance in group A streptococci in Finland. Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance." *N Engl J Med*. **337**:441-6.
- ⁴¹¹ Perez-Trallero E, Garcia C, Orden B, Marimon JM, Montes M. 2004. "Dissemination of *emm28* erythromycin-, clindamycin- and bacitracin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Spain." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **23**:123-6.
- ⁴¹² Syrogiannopoulos GA, Grivea IN, Fitoussi F, Doit C, Katopodis GD, Bingen E, Beratis NG. 2001. "High prevalence of erythromycin resistance of *Streptococcus pyogenes* in Greek children." *Pediatr Infect Dis J*. **20**:863-8.
- ⁴¹³ Fujita K, Muroso K, Yoshikawa M, Murai T. 1994. "Decline of erythromycin resistance of group A streptococci in Japan." *Pediatr Infect Dis J*. **13**:1075-8.
- ⁴¹⁴ Gagliotti C, Nobilio L, Milandri M, Moro ML. 2006. "Macrolide prescriptions and erythromycin resistance of *Streptococcus pyogenes*." *Clin Infect Dis*. **42**:1153-6.
- ⁴¹⁵ Bessen DE. 2009. "Population biology of the human restricted pathogen, *Streptococcus pyogenes*." *Infect Genet Evol*. **9**:581-93.
- ⁴¹⁶ Petinaki E, Kontos F, Pratti A, Skulakis C, Maniatis A. 2003. "Clinical isolates of macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* in Central Greece." *Int J Antimicrob Agents* **21**(1):67-70.
- ⁴¹⁷ Skoulakis Ch, Tigiroglou E, Gkarelis K, Klapsa D, Damani A, Papadakis Ch, Petinaki E. 2008. "Level of *Streptococcus pyogenes* in patients with recurrent tonsillitis and tonsillar hypertrophy." *Scand J Infect Dis*. **40**(11-12):899-903.
- ⁴¹⁸ Malli E, Tatsidou E, Damani A, Pantelidi K, Petinaki E, Skoulakis C, Drougka E, Spiliopoulou I. 2010 Jun. "Macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* in Central Greece: prevalence, mechanism and molecular identification." *Int J Antimicrob Agents*. **35**(6):614-5.
- ⁴¹⁹ Silva-Costa C, Pinto FR, Ramirez M, Melo-Cristino J. 2008. Portuguese Surveillance Group for the Study of Respiratory Pathogens. "Decrease in macrolide resistance and clonal instability among *Streptococcus pyogenes* in Portugal." *Clin Microbiol Infect*. **14**(12):1152-9.
- ⁴²⁰ Willems RJ, Hanage WP, Bessen DE, Feil EJ. 2011 Sep. "Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance." *FEMS Microbiol Rev*. **35**(5):872-900
- ⁴²¹ Martin JM, Green M, Barbadora KA, Wald ER. 2002. "Erythromycin-resistant group A streptococci in schoolchildren in Pittsburgh." *N Engl J Med*. **346**:1200-6.
- ⁴²² Tamayo E, Montes M, Garcia-Medina G, Garcia-Arenzana JM, Pérez-Trallero E. 2010. "Spread of a highly mucoid *Streptococcus pyogenes* emm3/ST15 clone." *BMC Infect Dis*. **5**(10):233
- ⁴²³ Stollerman GH, Dale JB. 2008. "The importance of the group A streptococcus capsule in the pathogenesis of human infections: a historical perspective." *Clin Infect Dis* **46**:1038-1045.
- ⁴²⁴ Meisal R, Andreasson IK, Høiby EA, Aaberge IS, Michaelsen TE, Caugant DA. 2010. "*Streptococcus pyogenes* isolates causing severe infections in Norway in 2006 to 2007: emm types, multilocus sequence types, and superantigen profiles." *J Clin Microbiol*. **48**(3):842-51.

- 425 **Veasy LG, Tani LY, Daly JA, et al.** 2004. "Temporal association of the appearance of mucoid strains of *Streptococcus pyogenes* with a continuing high incidence of rheumatic fever in Utah." *Pediatrics* **113**: 168-72.
- 426 **Stollerman G.** 2004. "*Streptococcus pyogenes* (Group A *Streptococcus*)." In: Gorbach S, Bartlett J, Blacklow N, eds. *Infectious diseases*. 3rd ed. Philadelphia: Lippencott/Williams & Wilkins: 1591-604.
- 427 **Bisno AL, Brito MO, Collins CM.** 2003. "Molecular basis of group A streptococcal virulence." *Lancet Infect Dis* **3**: 191-200.
- 428 **Public Health Laboratory Services.** 2002. "Incidence of group B streptococcal disease in infants aged less than 90 days." *CDR Wkly.* **12**: 3
- 429 **Schuchat, A.** 1999. "Group B streptococcus." *Lancet* **353**: 51-56.
- 430 **Henning, K. J., E. L. Hall, D. M. Dwyer, L. Billmann, et al.** 2001. "Invasive group B streptococcal disease in Maryland nursing home residents." *J. Infect. Dis.* **183**: 1138-1142
- 431 **Bliss, S. J., S. D. Manning, P. Tallman, C. J. Baker, et al.** 2002. "Group B streptococcus colonization in male and nonpregnant female university students: a cross-sectional prevalence study." *Clin. Infect. Dis.* **34**: 184-190.
- 432 **Nicola Jones, John F. Bohnsack, Shinji Takahashi, Karen A. Oliver et al.** 2003 "Multilocus Sequence Typing System for Group B Streptococcus" *J Clin Microbiol.* **6**: 41(2530-2536)
- 433 **Michelle J. Diedrick,1 Aurea E. Flores,1 Sharon L. Hillier et al.** 2010 "Clonal Analysis of Colonizing Group B *Streptococcus*, Serotype IV, an Emerging Pathogen in the United States" *J Clin Microbiol.* **48**: (3100-3104)
- 434 **Jones, N., K. A. Oliver, J. Barry, R. M. Harding et al.** 2006. "Enhanced invasiveness of bovine-derived neonatal sequence type 17 group B *Streptococcus* is independent of capsular serotype." *Clin. Infect. Dis.* **42**:915-924.
- 435 **Luan, S.L., M. Granlund, M. Sellin, T. Lagergård, B. G. Spratt, and M.Norgren.** 2005. "Multilocus sequence typing of Swedish invasive group B streptococcus isolates indicates a neonatally associated genetic lineage and capsule switching." *J. Clin. Microbiol.* **43**:3727-3733.
- 436 **Shannon D. Manning, Cody Springman, Erica Lehotzky, Maggi A. Lewis et al.** 2009. "Multilocus Sequence Types Associated with Neonatal Group B Streptococcal Sepsis and Meningitis in Canada" *J. Clin. Microbiol.* **47**: 4 (1143-1148)
- 437 **Jones, N., K. A. Oliver, J. Barry, R. M. Harding, N. Bisharat, B. G. Spratt et al.** 2006. "Enhanced invasiveness of bovine-derived neonatal sequence type 17 group B *Streptococcus* is independent of capsular serotype." *Clin. Infect. Dis.* **42**:915-924.
- 438 **Martins, E. R., M. A. Pessanha, M. Ramirez, J. Melo-Cristino, and the Portuguese Group for the Study of Streptococcal Infections.** 2007. "Analysis of group B streptococcal isolates from infants and pregnant women in Portugal revealing two lineages with enhanced invasiveness." *J. Clin. Microbiol.* **45**: 3224-3229.
- 439 **Lin, F.-Y., C. A. Whiting, E. Adderson, S. Takahashi et al.** 2006. "Phylogenetic lineages of invasive and colonizing strains of serotype III group B streptococci from neonates: a multicenter prospective study." *J. Clin. Microbiol.* **44**:1257-1261.
- 440 **Bisharat, N., N. Jones, D. Marchaim, C. Block, et al.** 2005. "Population structure of group B *Streptococcus* from a low-incidence region for invasive neonatal disease." *Microbiology* **151**:1875-1881.
- 441 **Manning, S. D., A. C. Springman, E. Lehotzky, M. A. Lewis, T. S. Whittam, and H. D. Davies.** 2009. "Multilocus sequence types associated with neonatal group B streptococcal sepsis and meningitis in Canada." *J. Clin. Microbiol.* **47**:1143-1148.
- 442 **Brochet, M., E. Couve, M. Zouine, T. Vallaey et al.** 2006. "Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae*." *Microbes Infect.* **8**:1227-1243.
- 443 **A. Cody Springman, David W. Lacher, Guangxi Wu, Nicole Milton et al.** 2009. "Selection, Recombination, and Virulence Gene Diversity among Group B Streptococcal Genotypes." *J. of Bacteriology* **191**: 17(5419-5427)
- 444 **Bisharat, N., D. W. Crook, J. Leigh, R. M. Harding et al.** 2004. "Hyper invasive neonatal group *Streptococcus* has arisen from a bovine ancestor." *J. Clin. Microbiol.* **42**:2161-2167.
- 445 **Schadt EE, Turner S and Kasakskis A.** 2010. "A window into third-generation sequencing." *Human Molecular Genetics* **19**:R227-R240.
- 446 **Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P.** 1996. "Real-time PCR sequencing using detection of pyrophosphate release." *Anal Biochem* **242**:84-89.
- 447 **Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P.** 1998. "A sequencing method based on real-time pyrophosphate." *Science* **281**: 363-365
- 448 **Huse SM, Huber JA, Morrison HG, Sogin ML, Welch DM.** 2007. "Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing." *Genome Biol.* **8**:R143
- 449 **Schuster SC** 2008. "Next-generation sequencing transforms today's biology." *Nat. Methods* **5**(1): 16-18
- 450 **Tucker T, Marra M and Friedman JA.** 2009. "Massively parallel sequencing: Next big thing in genetic medicine." *American Journal of Human Genetics* **85**: 142-159.
- 451 **Schatz MC, Delcher AL and Salzberg SL.** 2010. "Assembly of large genomes using second-generation sequencing." *Genome Res.* **20**: 1165-1173.
- 452 **Davidson AL, Dassa E, Orelle C, Chen J** 2008. "Structure, function and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **72**(2):317-364

-
- ⁴⁵³ **Locher KP** 2009. "Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters." *Phil Trans R Soc B* **364**: 239-245
- ⁴⁵⁴ **Douglas C Rees, Johnson Eric, Lewinson Oded.** 2009. "ABC transporters: The power to change." *Nat Rev Mol Biol* **10**(3): 218-227
- ⁴⁵⁵ **Oldham ML, Davidson AL, Chen J** 2008. "Structural insights ABC transporter mechanism." *Curr Opin Struct Biol* **18**(6): 726-733
- ⁴⁵⁶ **Larrea AA, Lujan SA, Kunkel TA** 2010. "SnapShot: DNA mismatch repair." *Cell* **141**(4): 730
- ⁴⁵⁷ **Iyer R, Pluciennik A, Burdett V, Modrich P** 2006. "DNA mismatch repair: functions and mechanisms." *Chem Rev* **106**(2): 302-23