



**DEMOCRITUS UNIVERSITY OF THRACE**  
**SCHOOL OF HEALTH SCIENCES**



**DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY & GENETICS**

Master's Programme

“Translational Research in Biomedicine”

Molecular diagnostics, biomarkers and targeted therapies

**Molecular analysis of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates implementing sequence-based typing techniques**

**Kefala Anastasia Maria**

MASTER THESIS

July 2018

**Επιβλέπων:**

Γαλάνης Αλέξης, Αν. Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης.

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

Γαλάνης Αλέξης, Αν. Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης.

Μαυρομαρά Πηνελόπη, Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης.

Πανοπούλου Μαρία, Επίκ. Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θερμές ευχαριστίες σε όλους όσους βοήθησαν στην εκπόνηση της εργασίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Γαλάνη Αλέξη για την αμέριστη εμπιστοσύνη και επίβλεψη καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής εργασίας. Ευχαριστώ θερμά τον Μπελούκα Αποστόλη, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής και Ερευνητή στο Department of Clinical Infection, Microbiology and Immunology, Institute of Infection and Global Health, University of Liverpool, για την επιστημονική καθοδήγηση καθώς και τη πολύτιμη βοήθεια στην διεξαγωγή των τελικών αποτελεσμάτων. Θα ήθελα επίσης, να ευχαριστήσω ολόθερμα την Δρ Παππά Όλγα, Επιστημονική Συνεργάτη, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής για την εμπιστοσύνη, ηθική στήριξη και την αφιέρωση πολύτιμου χρόνου καθ' όλη τη διάρκεια της έρευνας, των πειραμάτων και της συγγραφής της εργασίας. Ιδιαίτερες ευχαριστίες στους Δρ Μωραϊτου Ελένη, Δρ Πανοπούλου Μαρία, Δρ Κωστούλα Κώστα και Δρ Βογιατζάκη Ευάγγελο για την πολύτιμη συμβολή τους στη παρούσα εργασία. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την αγάπη, τη στήριξη που μου παρείχαν κι τις πολύτιμες συμβουλές τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, όπως και σε κάθε βήμα μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Double Locus Sequence typing (DLST) είναι μια καινούρια και πολλά υποσχόμενη μοριακή τυποποιητική τεχνική, η οποία έχει ήδη εφαρμοστεί σε επιδημιολογικές μελέτες δύο κύριων νοσοκομειακών παθογόνων, των *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa*, με αξιόπιστα αποτελέσματα. Στην παρούσα μελέτη, συλλέχθηκαν 77 στελέχη *P. aeruginosa*, απομονωμένα από ποικίλα κλινικά δείγματα και μονάδες δυο νοσοκομείων του Ελλαδικού χώρου: το Νοσοκομείο της Βόρειας Ελλάδας, (N1, 27 στελέχη) και το Νοσοκομείο της Κεντρικής Ελλάδας (N2, 50 στελέχη). Σε 72/77 στελέχη, τα οποία αρχικά ταυτοποιήθηκαν ως *P. aeruginosa* με μοριακή ανίχνευση περιοχών του *16s rRNA* γονιδίου, εφαρμόστηκε το τυποποιητικό σχήμα DLST, εκ των οποίων 71/72 στελέχη τυποποιήθηκαν επιτυχώς (τυποποιητικότητα 98.6%) με 1 ατυποποίητο στέλεχος για τον γενετικό τόπο *ms172*. Κατά τον έλεγχο της μικροβιακής ευαισθησίας του υπό εξέταση πληθυσμού, η πλειοψηφία των στελεχών εμφάνισε πολυαντοχή (MDR: 50/72, 69.5%) στα ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιψευδομονικά [κυρίως απομονωμένα από το Νοσοκομείο της Κεντρικής Ελλάδας (41/50, 82%)], ενώ ένα αρκετά χαμηλότερο ποσοστό χαρακτηρίστηκε ως ανθεκτικό (R: 13/72, 18%) και ευαίσθητο (S: 9/72, 12.5%). Η αντοχή στις καρβαπενέμες (CARB<sub>R</sub>), ένας φαινότυπος διαδεδομένος στα νοσοκομειακά περιβάλλοντα του Ελλαδικού χώρου, εμφανίστηκε σε ποσοστό 82% των MDR στελεχών, εκ των οποίων το 46.35% εκτιμάται ότι φέρει το γονίδιο που κωδικοποιεί την VIM-2 MBL. Τέλος, η πλειοψηφία των στελεχών παρουσίασε αντοχή στις αμινογλυκοσίδες, ένας φαινότυπος ιδιαίτερα διαδεδομένος σε κλινικά στελέχη *P. aeruginosa*, σε αντίθεση με τον νέο φαινότυπο FEP<sub>R</sub>- CAZ<sub>S</sub> που εντοπίστηκε σε συνολικά 13 κλινικά στελέχη (18%) της συλλογής. Ένα υποσύνολο του πληθυσμού, (19/71 στελέχη) και από τα 2 νοσοκομεία, επιλέχτηκε για φυλογενετική ανάλυση και μελέτη της διασποράς των φαινοτύπων αντοχής στους διάφορους DLST-τύπους που προέκυψαν από αυτή. Η μέθοδος DLST αποδείχτηκε ικανή να προσδώσει στα στελέχη ένα ήδη γνωστό γονοτυπικό προφίλ (allele profile) και κατάφερε να προσδιορίσει τους 3 επικρατέστερους DLST-τύπους, 8-37 (6/19 στελέχη), 18-156 και 78-17 (2/19 στελέχη έκαστος), οι οποίοι εντοπίστηκαν αποκλειστικά στο Νοσοκομείο της Κεντρικής Ελλάδας. Από την ανάλυση προέκυψε ότι ο κυρίαρχος γονότυπος 8-37 και ο 2<sup>ος</sup> επικρατέστερος 18-156, σχετίζονται άμεσα με την κυκλοφορία

του φαινότυπου CARB<sub>R</sub> στα υπό εξέταση στελέχη. Επιπλέον, παρατηρήθηκε πως το αλληλόμορφο 8 του γενετικού τόπου *ms172* πιθανόν καθοδηγεί το νέο φαινότυπο FER<sub>R</sub>-CAZ<sub>S</sub>, ενώ περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για να υποστηρίξουν την υπόθεση της κλωνικής σχέσης του φαινότυπου VIM-2 με τον κυρίαρχο DLST-τύπο. Καταλήγοντας, φαίνεται ότι ο συνδυασμός των προφίλ αντοχής των υπό μελέτη πολυανθεκτικών κλινικών στελεχών του βακτηρίου *P. aeruginosa* με τα γενετικά προφίλ που προέκυψαν από την εφαρμογή του νέου τυποποιητικού σχήματος DLST, αποδεικνύεται πολύτιμος, όταν πραγματοποιούνται επιδημιολογικές μελέτες σε σύντομο χρονικό διάστημα και σε τοπικό επίπεδο όπως και στη παρούσα μελέτη.

## ABSTRACT

DLST is a new and promising molecular typing method that has been successfully applied in epidemiological studies of two major hospital pathogens, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, producing reliable results. In this study, 77 *P. aeruginosa* isolates derived from a variety of clinical specimens and nosocomial units of two hospitals of Greece: the Hospital of Northern Greece (N1, 27 isolates) and the Hospital of Central Greece (N2, 50 isolates) were used for the implementation of the DLST method. 72 out of the 77 isolates, initially identified as *P. aeruginosa* by molecular detection of *16s rRNA* gene regions, were subjected to DLST, of which 71 isolates were successfully typed (98.6% typability) and one was untyped for locus *msI72*. Antimicrobial susceptibility testing revealed that most of the isolates expressed Multi Drug Resistance (MDR: 50/72, 69.5%) in widely used antipseudomonal antibiotics [mostly isolated from Hospital of Central Greece (41/50, 82%)]; a much lower percentage was characterized as Resistant (R: 13/72, 18%) and Sensitive (S: 9/72, 12.5%). The resistance in carbapenems (CARB<sub>R</sub>), a phenotype prevalent in hospital settings of Greece, was present in 82% of the MDR strains, of which 46.35% is estimated to carry the VIM-2 encoding gene. The majority of the strains showed resistance to aminoglycosides, a phenotype prevalent in *P. aeruginosa* clinical isolates, in contrast to the new FEP<sub>R</sub>-CAZ<sub>S</sub> phenotype, which was found in 13 clinical isolates (18%) of the collection. A subset of the tested population (19/71 strains) from both hospitals, was selected for phylogenetic analysis and to study the distribution of the resistance phenotypes among the various DLST-types. DLST scheme was able to assign an already known allelic profile to all the isolates and to elucidate the three most dominant DLST-types 8-37 (6/19 isolates), 18-156 and 78-17 (2/19 isolates each) that were detected exclusively in the Hospital of Central Greece. The phylogenetic analysis revealed the probable correlation of the predominant genotype 8-37 and the second most dominant 18-156, to the circulation of the CARB<sub>R</sub> phenotype in the tested sub-population. In addition, it was observed that allele 8 of the locus *msI72* is likely to act as a driving force for the spread of the new phenotype FEP<sub>R</sub>-CAZ<sub>S</sub>, while further studies are required to unveil the cloning relationship of the VIM-2 phenotype with the predominant DLST-type. In conclusion, the combination of the resistant profiles of the studied multidrug-resistant *P.*

*aeruginosa* clinical isolates with the genetic profiles from the implementation of the new DLST typing scheme proves to be valuable when epidemiological studies are conducted in short time and at a local level.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	1
1.1 Γενικά Χαρακτηριστικά του βακτηρίου <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.1.1 Κλινικές λοιμώξεις από το βακτήριο <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
1.2 Γενετικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
1.3 Τυποποίηση στελεχών <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
1.3.1 Φαινοτυπικές μέθοδοι	14
1.3.1.1 Έλεγχος Μικροβιακής Ευαισθησίας στα Αντιβιοτικά	16
1.3.2 Μοριακές μέθοδοι τυποποίησης	18
1.3.2.1 Η μέθοδος Double Locus Sequence Typing (DLST)	21
1.3.2.2 <i>16s rDNA</i> typing	25
1.4 Ανάπτυξη αντιμικροβιακής αντοχής στις εγκαταστάσεις υγειονομικής περίθαλψης	30
1.5 Μηχανισμοί αντοχής στο βακτήριο <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
1.5.1 Εγγενείς μηχανισμοί αντοχής	37
1.5.2 Επίκτητοι μηχανισμοί αντοχής	39
1.6 Σκοπός	42
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	43
2.1 Θρεπτικά υποστρώματα	43
2.1.1 Γενικό θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient agar για ανακαλλιέργειες	43
2.1.2 Θρεπτικό υπόστρωμα MacConkey agar No.3	43
2.1.3 Θρεπτικό υπόστρωμα Mueller Hinton agar για έλεγχο της μικροβιακής ευαισθησίας	43
2.1.4 Θρεπτικό υπόστρωμα φύλαξης στελεχών στους -80°C, Brain Heart + 20% glycerol	43
2.2 Χημικά και Ρυθμιστικά Διαλύματα	44
2.2.1 10x Tris – Borate EDTA Buffer (TBE)	44
2.2.2 EDTA 0.5M	44



2.2.3 Βρωμιούχο Αιθίδιο	44
2.3 Στελέχη αναφοράς	44
2.4 Υλικά και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	45
2.5 Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων	45
2.5.1 Ανακαλλιέργεια και φύλαξη των στελεχών	47
2.6 Απομόνωση Γενωμικού DNA	47
2.7 Μοριακή ανίχνευση του <i>I6s rDNA</i>	47
2.8 Double Locus Sequence Typing (DLST)	48
2.9 Ανάλυση των δεδομένων που ελήφθησαν από την αλληλούχιση	50
2.10 Φυλογενετική ανάλυση eBURST και κατασκευή των minimum spanning trees	50
2.11 Φαινοτυπική Μέθοδος Ελέγχου Μικροβιακής Ευαισθησίας των στελεχών/ Ανίχνευση Μηχανισμών Αντοχής	51
2.11.1 Έλεγχος μικροβιακής ευαισθησίας	51
2.11.2 Έλεγχος παραγωγής μεταλλο-β-λακταμασών (MBL) με τη δοκιμασία συνέργειας με EDTA	52
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	53
3.1 Μοριακή ανίχνευση του <i>I6s rDNA</i>	53
3.2 Φαινοτυπικές Δοκιμασίες Ελέγχου Μικροβιακής Ευαισθησίας των στελεχών / Ανίχνευση Μηχανισμών Αντοχής	54
3.3 Double Locus Sequence Typing (DLST)	63
3.4 Ανάλυση των δεδομένων που ελήφθησαν από την αλληλούχιση	64
3.5 eBURST φυλογενετική ανάλυση και κατασκευή των minimum spanning trees	65
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	71
4.1 Μοριακή Ταυτοποίηση με αλληλούχιση του <i>I6s rDNA</i>	71
4.2 Έλεγχος Μικροβιακής Ευαισθησίας	73
4.3 Τυποποίηση με την εφαρμογή της DLST μεθόδου	77
4.4 Συσχέτιση φαινοτυπικών και γονοτυπικών δεδομένων	82
4.5 Φυλογενετική ανάλυση	86

4.6 Συμπεράσματα	88
4.7 Προοπτικές και μελλοντικοί στόχοι	89
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	90
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</b>	101

## Abbreviations

AMK	Αμικασίνη
ATM	Αζτρεονάμη
BAL	Bronchial washing
BL	Blood
BS	Bronchial secretions
BSIs	Blood stream infections
CA	Catheter
CAIs	Community-acquired infections
CARB	Carbapenem
CAZ	Κεφταζιδίμη
C.B.D.	Center of Breath Deficiency
CIP	Σιπροφλοξασίνη
DLST	Double Locus Sequence Typing
E.I.	Εξωτερικά Ιατρεία
ESBL	Extended-spectrum beta lactamases
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FEP	Κεφεπίμη
GEN	Γενταμικίνη
HAIs	Hospital-acquired infections
HAP	Hospital-acquired pneumonia
HCAIs	Healthcare-associated infections
HCAP	Healthcare-associated pneumonia
H1	Hospital of Northern Greece
H2	Hospital of Central Greece
Θ/X	Θωρακοχειρουργική
ICU	Intensive Care Unit
IMP	Ιμιπενέμη
K.A.A.	Κέντρο Αναπνευστικής Ανεπάρκειας
M.A.Φ.	Μονάδα Αυξημένης Φροντίδας
MBLs	Metallo-β-lactamases
MDR	Multi Drug Resistant
M.E.Θ.	Μονάδα Εντατικής Θεραπείας
MEM	Μεροπενέμη
MLST	Multi Locus Sequence Typing
N1	Νοσοκομείο της Βόρειας Ελλάδας
N2	Νοσοκομείο της Κεντρικής Ελλάδας
ORFs	Open Reading Frames
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed-field Gel Electrophoresis
R	Resistant
RP	Resistant Phenotype
S	Sensitive
Σ.Μ.	Στεφανιαία Μονάδα
SP	Sputum
T.E.Π.	Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών
TIC	Τικαρκιλίνη
VNTRs	Variable number of tandem repeats

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Γενικά Χαρακτηριστικά του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa*

Το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa*, ή αλλιώς *Pseudomonas* η πυοκυανική, είναι ένα Gram αρνητικό στρογγυλό βακτήριο μεγέθους 0.5-0.8 μm x 1.5-3.0 μm. Σχεδόν όλα τα στελέχη του είδους είναι κινούμενα διαθέτοντας ένα ενιαίο πολικό μαστίγιο (Todar K. 2014). Το μαστίγιο του είναι μια μακριά προεξοχή στο κυρίως σώμα του βακτηρίου, είναι δομικά παρόμοιο με αυτά των άλλων Gram-αρνητικών βακτηρίων και εύκολα ορατό στο οπτικό μικροσκόπιο. Επιπλέον, αποτελείται από μικροσωληνίσκους και ένα σχετικά περίπλοκο βασικό κυτταρικό σώμα ενώ η δομή άγκιστρου, προσφέρει στο βακτήριο μια χαρακτηριστική ελικοειδή κίνηση (Agora S.K. και συνεργάτες 2004). Η γρήγορη κινητικότητα του στο χώμα και στο νερό καθιστά το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* το ταχύτερο και πιο ευρέως διαδεδομένο βακτήριο στη φύση. Το *P. aeruginosa* συναντάται στη φύση είτε ως ένα μονοκύτταρο ελεύθερο βακτήριο, το οποίο κινείται στα διάφορα περιβάλλοντα με τη βοήθεια του μοναδικού του μαστίγιου, είτε με μορφή βιολογικού υμενίου (βιοφίλμ) το οποίο εντοπίζεται σε επιφάνειες και διάφορα υποστρώματα που έρχονται σε επαφή με το νερό (Todar K. 2014). Διαθέτει εξειδικευμένους μηχανισμούς για την αρχική επαφή και προσκόλληση σε επιφάνειες, για την ανάπτυξη του μέσα στο βιοφίλμ, αλλά και για την επαναφορά στην ελεύθερη μορφή του με μία διαδικασία που ονομάζεται αποκόλληση ή διασπορά. Έχει παρατηρηθεί πως αφαιρώντας το μαστίγιο από το βακτήριο, μειώνεται η ικανότητα προσκόλλησης και ανάπτυξης του, σε οποιαδήποτε επιφάνεια, κατά 90%. Τα συστήματα χημειοταξίας που διαθέτει το βακτήριο ελέγχουν την κολυμβητική κινητικότητα του και συμβάλλουν αναμφίβολα στην οικολογική διασπορά του ως ένα ευκαιριακό παθογόνο (Croft L. και συνεργάτες 2000, Agora S.K. και συνεργάτες 2004).

Όπως όλα τα είδη του γένους *Pseudomonas*, το *P. aeruginosa* έχει πολύ απλές διατροφικές απαιτήσεις. Παρατηρείται πολύ συχνά η ανάπτυξή του σε απιονισμένο νερό, κάτι που αποτελεί απόδειξη των χαμηλών του διατροφικών απαιτήσεων. Οι μεταβολικές του διαδικασίες χαρακτηρίζονται από μεγάλη προσαρμοστικότητα, καθώς δεν απαιτούνται

ιδιαίτεροι παράγοντες ανάπτυξης και μπορεί να χρησιμοποιήσει περισσότερες από εβδομήντα πέντε οργανικές ενώσεις. Το είδος *P. aeruginosa* αναπτύσσεται υπό αερόβιες συνθήκες σε όλα τα κοινά θρεπτικά υλικά (όπως στο Nutrient agar) με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37°C και διαφοροποιείται από τα υπόλοιπα είδη του γένους *Pseudomonas* λόγω της ικανότητας ανάπτυξης στους 42°C. Δεν συμμετέχει σε διαδικασίες ζύμωσης, αλλά μπορεί να αναπτυχθεί απουσία οξυγόνου εάν νιτρικά είναι διαθέσιμα στο περιβάλλον, τα οποία χρησιμεύουν ως τελικοί δέκτες των ηλεκτρονίων (Μενεγάτου Δ. και συνεργάτες 2001, Bitton G. 2002, Todar K. 2014). Εμφανίζει ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων και χρωστικών, ασθενή αντισηπτικά, αλλά και πολλά ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά (Sazakli E. και συνεργάτες 2005).

Όπως και άλλα είδη του γένους *Pseudomonas*, το βακτήριο *P. aeruginosa* εκκρίνει 2 τύπους διαλυτών χρωστικών ουσιών, την πυοκυανίνη, η οποία δίνει το χαρακτηριστικό μπλε-πράσινο χρώμα στις αποικίες του, και τη πυοβερδίνη (pyoverdine), η οποία δίνει ένα χρώμα κίτρινο-πράσινο στις αποικίες και έντονο φθορισμό. Ο φθορισμός στο υπεριώδες φως είναι χρήσιμος για τον έγκυρο εντοπισμό των αποικιών *P. aeruginosa*, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιπλέον για να υποδηλώσει την παρουσία βακτηρίων του είδους σε πληγές. Η πυοκυανίνη παράγεται άφθονα σε υποστρώματα με χαμηλές συγκεντρώσεις σιδήρου, αλλά και κατά τον μεταβολισμό των ιόντων από το βακτήριο (Μενεγάτου Δ. και συνεργάτες 2001, Todar K. 2014). Η ιδιαίτερη οσμή (γιασεμί) και η παραγωγή της μπλε-πράσινης χρωστικής είναι βασικά χαρακτηριστικά για την ταυτοποίηση του είδους. Οι συνήθεις αποικίες είναι επίπεδες με ανώμαλα άκρα και με την πάροδο του χρόνου έχουν την τάση να απλώνονται στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού. Η μορφολογία των αποικιών δεν είναι πάντοτε η τυπική καθώς έχουν διαγνωστεί 6 τύποι αποικιών: οι λείες (smooth), οι ξηρές (rough), οι βλενώδεις (mucoid), οι ζελατινώδεις, οι μικρές και εκείνες που έχουν μορφή κολοβακτηριδίου. Οι βλενώδεις που λαμβάνονται συχνά από εκκρίσεις του αναπνευστικού και του ουροποιητικού συστήματος, οφείλουν την μορφή τους σε ένα βλενώδες εξωκυττάριο πολυσακχαρίδιο (mucoid exopolysaccharide, MEP). Οι διαφορές στη μορφολογία των αποικιών συνοδεύονται και από βιολογικές, βιοχημικές, αντιγονικές και άλλες, όπως διαφορές στην ευαισθησία των αντιβιοτικών (Σαζακλή Ε. 2005, Todar K. 2014).

Πρόκειται για ένα βακτήριο το οποίο μπορεί να εντοπιστεί σε ποικίλα περιβαλλοντικά ενδιαιτήματα όπως νερό, χώμα, τη φυλόσφαιρα και τη ριζόσφαιρα φυτών, απόβλητα βιολογικού καθαρισμού αλλά και σε νοσοκομειακά περιβάλλοντα όπως καθετήρες, τρόφιμα, νεροχύτες, συσκευές αερισμού κ.α. Αν και το βακτήριο γενικά δεν θεωρείται συστατικό της κανονικής περιφερειακής χλωρίδας των ανθρώπων, η εμφάνισή του σε κόπρανα και σε μικρότερο βαθμό στον οροφάρυγγα και στο δέρμα δεν είναι ασυνήθιστη. Το βακτήριο είναι διάσημο για τη μεγάλη ανθεκτικότητά του στα ευρέως χρησιμοποιούμενα κλινικά αντιβιοτικά και για αυτό θεωρείται επικίνδυνο και θανατηφόρο ευκαιριακά παθογόνο βακτήριο. Μάλιστα εξαιτίας της αντοχής του σε ποικίλες αντιβακτηριακές ουσίες, η παρουσία του στο περιβάλλον αλλά και σε εγκαταστάσεις υγειονομικής περίθαλψης χρήζει περαιτέρω μελέτης, καθώς υπάρχει αυξημένος κίνδυνος μεταφοράς της μικροβιακής αντοχής από στέλεχος σε στέλεχος και στο τέλος στον ίδιο τον άνθρωπο. Τη μεγάλη ανθεκτικότητά του την οφείλει στην εξωτερική λιποπολυσακχαριδικής φύσεως μεμβράνη του, στους εγγενείς μηχανισμούς αντοχής που διαθέτει, αλλά και στους νέους μηχανισμούς που προσλαμβάνει μέσω των κινητών γενετικών μονάδων. Επιπλέον, η ικανότητά του να αναπτύσσεται με τη δημιουργία βιολογικού υμενίου, καθιστά πρόκληση την εύρεση αποτελεσματικής θεραπείας (Sazakli E. και συνεργάτες 2005, Driscoll J.A. και συνεργάτες 2007, Kerr K.G. και συνεργάτες 2009).

### **1.1.1 Κλινικές λοιμώξεις από το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa***

Το *P. aeruginosa* είναι ένα ευπροσάρμοστο παθογόνο που συνδέεται με ένα ευρύ φάσμα λοιμώξεων στους ανθρώπους. Κατά τη δεκαετία του 1960 και 1970 το βακτήριο είχε χαρακτηριστεί ως το πιο κοινό μολυσματικό παθογόνο σε ασθενείς με αιματολογικές και ογκολογικές διαταραχές, ενώ οι λοιμώξεις που προκαλούσε εμφάνιζαν υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας σε σύγκριση με άλλες βακτηριακές λοιμώξεις. Η ικανότητα του *P. aeruginosa* να επιβιώνει με ελάχιστες διατροφικές απαιτήσεις και να αντέχει σε μεγάλο εύρος φυσικών συνθηκών του επιτρέπει να ευδοκιμεί τόσο στη κοινότητα όσο και στο νοσοκομειακό περιβάλλον. Το βακτήριο μπορεί να μολύνει οποιαδήποτε εξωτερική θέση ή επιφάνεια του σώματος. Η πλειοψηφία των λοιμώξεων της κοινότητας είναι ήπιες και επιφανειακές, αλλά οι νοσοκομειακές λοιμώξεις είναι συχνότερες, σοβαρότερες και ποιο

ποικίλες. Το *P. aeruginosa* είναι σπάνια μέλος της κανονικής μικροβιακής χλωρίδας στους ανθρώπους. Ωστόσο, τα ποσοστά μόλυνσης από το βακτήριο, μπορεί να ξεπεράσουν το 50% κατά τη διάρκεια της νοσηλείας, ειδικά σε ασθενείς που έχουν τραυματιστεί ή έχουν υποστεί βλάβη στους δερματικούς ή βλεννογόνους φραγμούς με ενδοτραχειακούς σωλήνες, καθετήρες, μηχανικό αερισμό, χειρουργική επέμβαση ή σοβαρά εγκαύματα. Επίσης, οι ασθενείς με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα ή εκείνοι με διαταραγμένη τη μικροβιακή χλωρίδα, έπειτα από αντιμικροβιακή θεραπεία, εμφανίζουν υψηλότερο κίνδυνο μόλυνσης από το βακτήριο (Greenwood D. και συνεργάτες 2007, Lister P.D. και συνεργάτες 2009, Kim H.S. και συνεργάτες 2017).

Το *P. aeruginosa* είναι μια από τις κύριες αιτίες λοιμώξεων στα νοσοκομεία (hospital-acquired infections, HAIs) και στη κοινότητα (community-acquired infections, CAIs). Σύμφωνα με τους Greenwood D. και συνεργάτες (2007), ως λοιμώξεις της κοινότητας χαρακτηρίζονται οι επίκτητες λοιμώξεις που μεταδίδονται και αναπτύσσονται εκτός νοσοκομείου, αλλά απαιτούν την μεταφορά του ασθενούς στο νοσοκομείο (π.χ. πνευμονιοκοκκική πνευμονία) ή που εμφανίζονται κλινικά εντός 48 ωρών από την είσοδο του ασθενούς στο νοσοκομείο για οποιοδήποτε λόγο (π.χ. ανεμοβλογιά) (Greenwood D. και συνεργάτες 2007). Στην κοινότητα, τα ενδιαιτήματα στα οποία εμφανίζεται το βακτήριο είναι πισίνες, υδρομασάζ, διαλύματα φακών επαφής, οικιακοί υγραντήρες, χώμα, ριζόσφαιρα και λαχανικά (Lister P.D. και συνεργάτες 2009). Οι ασθενείς που νοσηλεύονται είναι πιθανό να μολυνθούν με το βακτήριο κατά την εισαγωγή τους ή κατά τη διάρκεια παραμονής τους στο νοσοκομείο. Το *P. aeruginosa* μπορεί να απομονωθεί από σχεδόν οποιαδήποτε πηγή μέσα στα νοσοκομεία όπως εξοπλισμό αναπνευστικής θεραπείας, αντισηπτικά, σαπούνι, νεροχύτες, σφουγγαρίστρες, φάρμακα, μολυσμένο ιατρικό εξοπλισμό και πισίνες φυσιοθεραπείας και υδροθεραπείας. Σημαντικές μελέτες υποδεικνύουν ότι οι περιβαλλοντικές πηγές, ειδικά το νερό, μπορεί να παίζουν καθοριστικό ρόλο στην επιδημιολογία των λοιμώξεων που προκαλεί το βακτήριο στις νοσοκομειακές εγκαταστάσεις, συμπεριλαμβανομένων και των μονάδων εντατικής θεραπείας (Kerr K.G. και συνεργάτες 2009, Lister P.D. και συνεργάτες 2009).

Τα τελευταία χρόνια, οι αλλαγές στο σύστημα υγειονομικής περίθαλψης έχουν μετατοπίσει ένα σημαντικό μέρος της φροντίδας των ασθενών από τα νοσοκομεία στην κοινότητα. Ως αποτέλεσμα, η παραδοσιακή διάκριση μεταξύ των HAIs και των CAIs έχει

γίνει λιγότερο ξεκάθαρη. Οι λοιμώξεις που εμφανίζονται μεταξύ εξωτερικών ασθενών, δηλαδή σε ασθενείς που δε νοσηλεύονται στο νοσοκομείο αλλά έχουν επαφή με το σύστημα υγειονομικής περίθαλψης, ονομάζονται "λοιμώξεις που συνδέονται με την υγειονομική περίθαλψη" (healthcare-associated infections, HCAs). Σε αυτή την νέα κατηγορία περιλαμβάνονται οι ασθενείς που είχαν πρόσφατα επαφή με το σύστημα υγειονομικής περίθαλψης μέσω νοσηλευτικών ιδρυμάτων, κλινικών αιμοκάθαρσης, μονάδων μακροχρόνιας περίθαλψης ή νοσηλείας σε νοσοκομείο. Οι λοιμώξεις της κοινότητας (CAIs), οι λοιμώξεις που σχετίζεται με την υγειονομική περίθαλψη (HCAs) και εκείνες που αποκτούνται στο νοσοκομείο (HAIs) είναι 3 διακριτές επιδημιολογικές και κλινικές οντότητες, με τάση αύξησης της θνησιμότητας και σοβαρότητας της προκαλούμενης νόσου (π.χ. βακτηριαμία, πνευμονία κ.α.) από την πρώτη προς την τελευταία κατηγορία (Venditti M. και συνεργάτες 2009, Hattemer A. και συνεργάτες 2013, McCarthy K.L. και συνεργάτες 2016).

Δεν υπάρχει αμφιβολία για την ευελιξία του *P. aeruginosa* ως παθογόνος παράγοντας. Ο κατάλογος των λοιμώξεων που σχετίζονται με αυτό το βακτήριο είναι μεγάλος και συνεχώς αυξάνεται. Οι λοιμώξεις της κοινότητας (CAIs) περιλαμβάνουν την ελκώδη κερατίτιδα (συνήθως σχετίζεται με τη χρήση φακών επαφής), εξωτερική ωτίτιδα, μόλυνση του δέρματος ή μαλακού ιστού (όπως θυλακίτιδα, μολύνσεις των ποδιών και το σύνδρομο του πράσινου νυχιού μετά από έκθεση σε πηγές νερού όπως υδρομασάζ, τζακούζι και πισίνες) και σηπτική αρθρίτιδα σε χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών. Όμως, οι πιο σοβαρές λοιμώξεις από το βακτήριο παρατηρούνται στις εγκαταστάσεις της υγειονομικής περίθαλψης και περιλαμβάνουν την πνευμονία, μολύνσεις του ουροποιητικού συστήματος και του κυκλοφορικού συστήματος, χειρουργική μόλυνση και δερματική μόλυνση στα σημεία εγκαυμάτων και τραυματισμών. Ορισμένες ομάδες ασθενών διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να μολυνθούν από άλλες: ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς, ειδικά εκείνοι που πάσχουν από ουδετεροπενία, καρκίνο στο αίμα, σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS) και σακχαρώδη διαβήτη, καθώς και ευάλωτοι ασθενείς με κυστική ίνωση ή που βρίσκονται σε μονάδες εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ), εμφανίζουν αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα (Driscoll J.A. και συνεργάτες 2007, Kerr K.G. και συνεργάτες 2009).



Η βακτηριαμία (51.7%), η λοίμωξη του αναπνευστικού (19.0%) και η λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος (17.2%) είναι οι συχνότερες νοσοκομειακές λοιμώξεις (HAIs) που προκαλεί το *P. aeruginosa*:

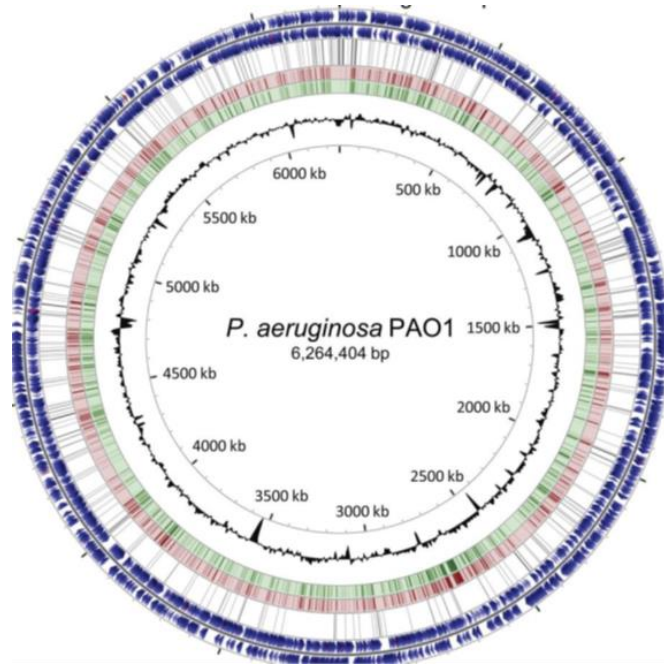
- Το βακτήριο είναι υπεύθυνο για νοσοκομειακές λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος κυρίως σε ασθενείς με εγκατεστημένους καθετήρες ούρων σε σχέση με εκείνους που δεν χρησιμοποιούν αυτές τις συσκευές. Οι λοιμώξεις της ουροποιητικού οδού (urinary tract infections, UTIs) που έχουν αποκτηθεί από την κοινότητα συγκαταλέγονται στις πιο συχνές λοιμώξεις στις γυναίκες, και αποτελούν αιτία για περισσότερες από 8 εκατομμύρια ιατρικές επισκέψεις ετησίως στις Ηνωμένες Πολιτείες, καθώς και σημαντικά έξοδα νοσηρότητας και υγειονομικής περίθαλψης. Παρόλα αυτά το *P. aeruginosa* σπάνια προκαλεί λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος που σχετίζονται με την κοινότητα. Η τρέχουσα αντιμετώπιση αυτών των λοιμώξεων είναι συνήθως εμπειρική, χωρίς τη χρήση καλλιέργειας ούρων ή δοκιμών ευαισθησίας σε αντιβιοτικά για την καθοδήγηση της θεραπείας. Τα θεραπευτικά σχήματα εξαρτώνται από την παρουσία δομικών ανωμαλιών, καθετήρα, σήψης, καθώς και από την προηγούμενη χρήση αντιβιοτικών (Gupta K. και συνεργάτες 2001, Driscoll J.A. και συνεργάτες 2007, Fujitani S.: <http://www.antimicrobe.org/b112.asp>).
- Το βακτήριο έχει αναγνωριστεί ως η 2<sup>η</sup> πιο συχνή αιτία πνευμονίας στο νοσοκομείο (hospital-acquired pneumonia, HAP) ή πνευμονίας που σχετίζεται με το σύστημα υγειονομικής περίθαλψης (healthcare-associated pneumonia, HCAP) (Driscoll J.A. και συνεργάτες 2007). Η πνευμονία της κοινότητας (community-acquired pneumonia, CAP) από το βακτήριο *P. aeruginosa* είναι εξαιρετικά σπάνια και εμφανίζεται σε ασθενείς με σοβαρή υποκείμενη νόσο (κυρίως σε ασθενείς που έχουν μολυνθεί με HIV, σε δέκτες μοσχεύματος οργάνων ή μυελού των οστών ή σε ασθενείς με ουδετεροπενία), ενώ λιγότερο συχνά έχουν αναφερθεί περιστατικά σε αρχικά υγιή άτομα (Hatchette T.F. και συνεργάτες 2000, Driscoll J.A. και συνεργάτες 2007, Tsuji S. και συνεργάτες 2014). Η HCAP είναι παρόμοια με την πνευμονία του νοσοκομείου (HAP) και ευθύνεται για πιο σοβαρές μορφές της νόσου, αυξημένη θνησιμότητα και παρατεταμένη νοσηλεία. Η HCAP συνήθως δεν αναγνωρίζεται ή διαχειρίζεται σωστά από τους κλινικούς ιατρούς, γεγονός που ενδέχεται να οδηγήσει σε ακατάλληλη

θεραπεία με αντιβιοτικά και αυξημένη θνησιμότητα (Venditti M. και συνεργάτες 2009).

- Το *P. aeruginosa* αντιπροσωπεύει το 3-7% όλων των λοιμώξεων του αίματος (blood stream infections, BSIs) και το 23-26% των βακτηριαμιών που προκαλούνται από Gram-αρνητικά βακτήρια. Η πνευμονία, η λοίμωξη του παγκρέατος και των χοληφόρων, οι καθετήρες και η μόλυνση του ουροποιητικού συστήματος, αποτελούν τις πιο πιθανές πηγές μόλυνσης για την ανάπτυξη της νόσου (Hattemer A. και συνεργάτες 2013, Kim H.S. και συνεργάτες 2017). Το βακτήριο προκαλεί συχνά βακτηριαμίες σε ασθενείς με ανοσοανεπάρκεια, οξεία λευχαιμία ή σε ασθενείς έπειτα από μεταμόσχευση οργάνων και μυελού των οστών, σε σύγκριση με τον γενικό νοσοκομειακό πληθυσμό (Driscoll J.A. και συνεργάτες 2007). Οι λοιμώξεις του αίματος (BSIs) από το *P. aeruginosa* αποκτούνται κυρίως στο νοσοκομειακό περιβάλλον, ενώ οι βακτηριαμίες που ξεκινούν από την κοινότητα είναι λιγότερο συχνές και όχι καλά καθορισμένες στη βιβλιογραφία. Ένα βακτηριαμικό επεισόδιο ορίζεται ως η χρονική περίοδος 14 ημερών από την ημερομηνία της πρώτης θετικής καλλιέργειας αίματος για το βακτήριο. Οι θετικές καλλιέργειες αίματος εκτός αυτού του χρονικού διαστήματος αποτελούν ένα διαφορετικό επεισόδιο (McCarthy K.L. και συνεργάτες 2016). Η θνησιμότητα σε ασθενείς με βακτηριαμία κυμαίνεται σε υψηλά ποσοστά (27-48%), και σχετίζεται άμεσα με την ύπαρξη πολυανθεκτικών στελεχών (multi drug resistant isolates) *P. aeruginosa*, που καθιστούν δύσκολη την εύρεση κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής. Στα πολυανθεκτικά στελέχη του βακτηρίου έχει παρατηρηθεί μια αύξηση από 32% έως 71% την τελευταία δεκαετία και ως εκ τούτου, είναι απαραίτητη η συνεχής παρακολούθηση και ο περιορισμός τους. Οι BSIs που έχουν αποκτηθεί από το σύστημα υγειονομικής περίθαλψης (healthcare-associated blood stream infections, HCABSIs) εμφανίζουν πιο μεγάλη αντιμικροβιακή αντοχή σε σύγκριση με τις BSIs της κοινότητας (community-acquired blood stream infections, CABSIs) (Hattemer A. και συνεργάτες 2013, Kim H.S. και συνεργάτες 2017).

## 1.2 Γενετικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa*

Το βακτήριο *P. aeruginosa* διαθέτει ένα μεγάλο και πολύπλοκο γονιδίωμα, η ανάλυση του οποίου οδήγησε τους ερευνητές σε ανακαλύψεις νέων γονιδίων και στην κατανόηση των περισσοτέρων βιολογικών διεργασιών που το αφορούν (Stover C.K. και συνεργάτες 2000). Η πρώτη προσπάθεια της αλληλούχισης του γονιδιώματος του βακτηρίου έγινε στο στέλεχος PAO1 (*P. aeruginosa* serotype O1), ένα στέλεχος ευρέως χρησιμοποιούμενο σε ερευνητικές μελέτες που αρχικά είχε απομονωθεί από τραύμα ασθενούς στην Αυστραλία. Μελέτες αλληλούχισης που πραγματοποιήθηκαν το 2000 έδειξαν πως το στέλεχος αυτό έχει γονιδίωμα μεγέθους 6.3 Mbp με υψηλή περιεκτικότητα σε G+C (66.6%) και περιέχει 5570 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames, ORFs), καθιστώντας το - το μεγαλύτερο βακτηριακό γονιδίωμα που είχε πλήρως αλληλουχηθεί ως τότε (**Εικόνα 1.2.1**) (Stover C.K. και συνεργάτες 2000, Kung V.L. και συνεργάτες 2010). Όπως και σε άλλα βακτηριακά γονιδιώματα, ένα μεγάλο ποσοστό του γονιδιώματος (45.8% των ORFs) αποτελείται από γονίδια για τα οποία δεν θα μπορούσε να καθοριστεί ή να προταθεί κάποια λειτουργία. Τα 372 ORFs που είναι γνωστά γονίδια του *P. aeruginosa* με αποδεδειγμένες λειτουργίες, συμβάλλουν στην προσαρμοστικότητα του, στους μηχανισμούς παθογένειάς του στην κινητικότητα και την προσκόλληση και σε πολλές ακόμη βιολογικές διαδικασίες (Tümmler B. και συνεργάτες 2014). Διαθέτει επίσης, το μεγαλύτερο σχετικό ποσοστό των ρυθμιστικών γονιδίων (8.4%) σε σύγκριση με άλλα βακτήρια, αλλά και ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων που εμπλέκονται στον καταβολισμό, στη μεταφορά και την εκροή των οργανικών συστατικών, αλλά και γονίδια που συμμετέχουν σε τέσσερα χημειοτακτικά συστήματα, από τα οποία τουλάχιστον το ένα συμμετέχει στη δημιουργία βιολογικού υμενίου (Stover C.K. και συνεργάτες 2000).



**Εικόνα 1.2.1:** Κυκλική αναπαράσταση του γονιδιώματος του *P. aeruginosa* με τα 5570 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames). Στην εικόνα ο εσωτερικός μαύρος κύκλος δηλώνει το ποσοστό σε περιεκτικότητα γουανίνης – κυτοσίνης (G+C content) (Εικόνα τροποποιημένη από Stover C.K. και συνεργάτες 2000).

Συγκριτική ανάλυση γονιδιωμάτων περιβαλλοντικών και κλινικών στελεχών *P. aeruginosa*, αποκάλυψε ότι το γονιδιώμα τους είναι ένα μωσαϊκό, το οποίο σχηματίζεται από συντηρημένες αλληλουχίες που αποτελούν τον πυρήνα του γονιδιώματος (Core Genome), αλλά και από διάσπαρτα μεταβλητά γενετικά στοιχεία, βοηθητικά του γονιδιώματος (Accessory Genome) (Wiehlmann L. και συνεργάτες 2007, Khan N.H. και συνεργάτες 2008, Kung V.L. και συνεργάτες 2010). Ο πυρήνας του γονιδιώματος αποτελείται από περισσότερα από 4000 γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν μεταβολικούς και παθογόνους παράγοντες, οι οποίοι απαντώνται σε όλα τα στελέχη του βακτηρίου, ανεξάρτητα από την πηγή προέλευσης (περιβαλλοντικά, κλινικά ή εργαστηριακά). Επίσης, ο πυρήνας του γονιδιώματος αποτελεί περίπου το 90% του συνολικού γονιδιώματος και είναι συντηρημένος σε μεγάλο βαθμό από στέλεχος σε στέλεχος (Kung V.L. και συνεργάτες 2010, Tümmler B. και συνεργάτες 2014). Το μέγεθός του όμως, μειώνεται συνεχώς όσο προσδιορίζονται νέες αλληλουχίες του γονιδιώματος, με αποτέλεσμα να δυσκολεύεται όλο και περισσότερο η εύρεση της καταλληλότερης μεθόδου αλληλούχισης,

η οποία θα αποδώσει με βεβαιότητα το πραγματικό σύνολο των στοιχείων που αποτελούν τον πυρήνα του (Silby M.W. και συνεργάτες 2011).

Σε αντίθεση, τα βοηθητικά στοιχεία του γονιδιώματος (Accessory Genome) περιλαμβάνουν γονίδια που είναι δυνατόν να βρίσκονται σε ορισμένα στελέχη, αλλά να απουσιάζουν από άλλα συγγενικά. Τα γενετικά στοιχεία αυτά τείνουν να συγκεντρώνονται σε ορισμένες θέσεις του πυρήνα, που λειτουργούν ως «hot spots». Οι Mathee και συνεργάτες (2008), χρησιμοποίησαν τον όρο «περιοχές γενωμικής πλαστικότητας» («Regions of Genomic Plasticity», RGPs) για να περιγράψουν αυτές τις θέσεις (Kung V.L. και συνεργάτες 2010, Silby M.W. και συνεργάτες 2011). Οι γενετικές αλληλουχίες που καταλαμβάνουν πολλές RGPs αναφέρονται συχνά ως γονιδιωματικά νησιά (μεγέθους > 10 kb) ή νησίδες (μεγέθους < 10 kb). Τα γονιδιωματικά νησιά ή νησίδες είναι διακριτά τμήματα DNA που συνήθως αποκτώνται μέσω οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς, ενσωματώνονται συχνά δίπλα ή μέσα σε tRNA γονίδια και χαρακτηρίζονται από διαφορετική περιεκτικότητα σε G+C από το πυρηνικό χρωμόσωμα (Wiehlmann L. και συνεργάτες 2007, Mathee K. και συνεργάτες 2008, Battle E.S. και συνεργάτες 2009). Ένας μεγάλος αριθμός γενωμικών νησιών είναι ικανός για ενσωμάτωση στο χρωμόσωμα του ξενιστή, αποκοπή και μεταφορά σε έναν νέο ξενιστή με μετασχηματισμό, σύζευξη ή μεταγωγή (Juhás M. και συνεργάτες 2009). Τα γενωμικά νησιά ευθύνονται για το 10% του συνολικού γενετικού υλικού των στελεχών του βακτηρίου και θεωρείται ότι συμβάλλουν στην ικανότητα κάποιων στελεχών *P. aeruginosa* να αποικίζουν και να επιβιώνουν σε ακραία περιβάλλοντα (Battle E. S. και συνεργάτες 2009).

Τα βοηθητικά γενετικά στοιχεία (Accessory Genome) είναι κεντρικής σημασίας για τη βιολογία του βακτηρίου. Μαζί με ελλείματα, αναδιατάξεις και μεταλλάξεις που πραγματοποιούνται στον πυρήνα του γονιδιώματος, η οριζόντια μεταφορά των βοηθητικών γενετικών στοιχείων συμβάλλει κυρίως στην εξέλιξη του γονιδιώματος του είδους (Tümmler B. και συνεργάτες 2014). Τα βοηθητικά γενετικά στοιχεία προσδίδουν στο βακτήριο ειδικούς φαινοτύπους, οι οποίοι είναι επωφελείς υπό ορισμένες επιλεκτικές συνθήκες και του επιτρέπουν να επιβιώσει και να ανταγωνιστεί άλλους μικροοργανισμούς (Stover C.K. και συνεργάτες 2000, De Reuse H. & Bereswill S. 2009, Kung V.L. και συνεργάτες 2010). Αποτελούν μια πηγή όχι μόνο γονιδίων που κωδικοποιούν λοιμογόνους παράγοντες (πχ. ελαστάση, εξωτοξίνη A, φωσφολιπάση, και αλκαλική πρωτεάση), αλλά

και γονιδίων που προσφέρουν αντοχή σε πολλαπλές κατηγορίες αντιβιοτικών (Juhas M. και συνεργάτες 2009, Maatallah M. και συνεργάτες 2011, Al- Daraghi W.A. & Abdullah Z.H. 2013). Δεδομένης της υψηλής εγγενούς αντοχής του είδους, η εξάπλωση στελεχών με ανθεκτικότητα σε πολλά ευρέως κλινικά χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά, είναι ιδιαίτερα ανησυχητική. Μεταθετά βοηθητικά γενετικά στοιχεία (Accessory Genome) συμβάλλουν στη μετάδοση ανθεκτικών γονιδίων μεταξύ των στελεχών. Η διατήρηση των γονιδίων αντοχής παρατηρείται όχι μόνο σε κλινικά αλλά και σε περιβαλλοντικά στελέχη, επιτρέποντάς τα να αποικίζουν σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών ενδιαιτημάτων (νοσοκομειακά περιβάλλοντα και λύματα, υπόγεια και επιφανειακά υδάτινα οικοσυστήματα κ.α.) (Stover C.K. και συνεργάτες 2000, Wolfgang M.C. και συνεργάτες 2003). Στα βοηθητικά γενετικά στοιχεία (Accessory genome) του *P. aeruginosa* εντοπίζονται τα εξής: (i) στοιχεία ενσωμάτωσης και σύζευξης (ICEs), (ii) νησιά αντικατάστασης, (iii) προφάγοι και στοιχεία όμοια των φάγων, (iv) τρανσποζόνια, αλληλουχίες ένθεσης (Iss) και ιντεγκρόνια (Cornelis P. 2008, Kung V. L. και συνεργάτες 2010). Πρέπει να σημειωθεί πως πολλά από τα γενετικά στοιχεία δεν μπορούν να ταξινομηθούν με σαφήνεια σε μία συγκεκριμένη κατηγορία, ενώ κάποια άλλα μπορεί να στερούνται χαρακτηριστικά κατάταξης σε οποιαδήποτε από αυτές τις κατηγορίες. Παρόλα αυτά, η χρήση του συγκεκριμένου συστήματος ταξινόμησης παρέχει ένα χρήσιμο πλαίσιο κατάταξης και αναγνώρισης των στοιχείων που αποτελούν το «Accessory Genome» του βακτηρίου (Silby M.W. και συνεργάτες 2011).

Τόσο το «Core» όσο και το «Accessory» γονιδίωμα του *P. aeruginosa* δεν είναι τυχαία συναρμολογημένα. Το μεγαλύτερο μέρος του γονιδιώματος είναι σχετικά συντηρημένο με ένα ποσοστό παραλλαγών 0.3%, που οφείλονται κυρίως σε πολυμορφισμούς (single nucleotide polymorphisms, SNPs) (Spencer D.H. και συνεργάτες 2003, Cornelis P. 2008). Αν και οι περισσότεροι γενετικοί τόποι (loci) που έχουν μελετηθεί στο γονιδίωμα του βακτηρίου ανασυνδυάζονται με τυχαίο τρόπο μεταξύ τους, η ελεύθερη ροή γονιδίων μέσα στο είδος δεν πραγματοποιείται μεταξύ όλων των loci του γονιδιώματος (Wiehlmann L. και συνεργάτες 2007). Μεγάλες ανακατατάξεις, απόκτηση και απώλεια μεγάλων τμημάτων του DNA, σημειακές μεταλλάξεις καθώς και ο ενδογονιδιακός ανασυνδυασμός, είναι υπεύθυνα για το μεγαλύτερο μέρος της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ διαφορετικών στελεχών. Συγκεκριμένα, ο ανασυνδυασμός, αν είναι συχνός, μπορεί

να καταστρέψει οποιαδήποτε φυλογενετική πληροφορία (Cornelis P. 2008, Kidd T.J. και συνεργάτες 2012).

**Πίνακας 1.2.1:** Γενετικά χαρακτηριστικά του γονιδιώματος του βακτηρίου *P. aeruginosa* PAO1 (Πίνακας τροποποιημένος από Stover C.K. και συνεργάτες 2000).

<b>ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ</b>			
Μέγεθος γονιδιώματος	6,264,403		
G+C περιεκτικότητα	66.6%		
Κωδικές περιοχές	89.4%		
Σταθερό RNA	0.4 %		
<b>RNA</b>			
rRNA	16s	23s	5s
Μεταφορικό RNA	63 είδη		
Μη τυπικό RNA	4 είδη		
<b>Κωδικές αλληλουχίες (επίπεδα)</b>	<b>Ανοιχτά πλαίσια ανάγωσης</b>	<b>Χαρακτηρισμός</b>	
1	3,752 (6.7%)	Γονίδια του <i>P. aeruginosa</i> με καθορισμένες λειτουργίες	
2	1,059 (19%)	Ομόλογα γονίδια από άλλους οργανισμούς με καθορισμένες λειτουργίες	
3	1,590 (28.5%)	Γονίδια με μη καθορισμένες λειτουργίες	
4	769 (13.6%)	Ομόλογα γονίδια άγνωστης λειτουργίας	
5	1,780 (32%)	Καμία ομολογία	
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>5,570 (100%)</b>		

### 1.3 Τυποποίηση στελεχών *Pseudomonas aeruginosa*

Ως τυποποίηση ορίζεται η διαδικασία κατά την οποία πραγματοποιείται φαινοτυπική ή/ και γονοτυπική ανάλυση βακτηριακών στελεχών σε επίπεδο είδους-υποείδους, με στόχο την ταξινόμηση των στελεχών σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά τους (van Belkum A. και συνεργάτες 2007, Sabat A.J. και συνεργάτες 2013). Η τυποποίηση παρέχει βασικές πληροφορίες σχετικά με την εξελικτική βιολογία, την πληθυσμιακή βιολογία, την ταξινόμηση, την οικολογία και τη γενετική των βακτηρίων (Wiehlmann L. και συνεργάτες 2007). Οι μέθοδοι τυποποίησης χρησιμοποιούνται σε επίπεδο ρουτίνας τόσο από τα κλινικά όσο και από τα περιβαλλοντικά εργαστήρια, με σκοπό τη μελέτη της διασποράς και μετάδοσης κάποιων μικροοργανισμών και τη μελέτη της δυναμικής των βακτηριακών πληθυσμών σε κλινικά και περιβαλλοντικά ενδιαιτήματα, σε επίπεδο που εκτείνεται από έναν ξενιστή έως και το παγκόσμιο οικοσύστημα (van Belkum A. και συνεργάτες 2007). Οι τυποποιητικές μέθοδοι αποτελούν βασικά επιδημιολογικά εργαλεία για την πρόληψη και τον έλεγχο των λοιμώξεων, καθώς συμβάλλουν στην παροχή χρήσιμων πληροφοριών για τη μελέτη μιας επιδημίας, της παθογένειας και της πορείας μιας μόλυνσης και βοηθούν στη θεραπεία των ασθενών. Με την ανάλυση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων, είναι δυνατή η λήψη δραστικών μέτρων έναντι της ασθένειας και ο σχεδιασμός τρόπων αντιμετώπισης και περιορισμού της (Adzitey F. και συνεργάτες 2013, Sabat A.J. και συνεργάτες 2013). Επίσης, η τυποποίηση των βακτηρίων έχει συμβάλει αδιαμφισβήτητα στην αύξηση της αποτελεσματικότητας των συστημάτων επιτήρησης και έχει δώσει σημαντικά στοιχεία για τις στρατηγικές ελέγχου της δημόσιας υγείας (Ranjbar R. και συνεργάτες 2014).

Οι τεχνικές τυποποίησης αξιολογούνται με βάση την απόδοσή τους (διακριτική ισχύς, αναπαραγωγιμότητα, ικανότητα τυποποίησης και συμφωνία μεταξύ των τυποποιητικών τεχνικών) και ευκολία χρήσης τους (κόστος και διαθεσιμότητα αντιδραστηρίων και εξοπλισμού, ταχύτητα και ευκολία εκτέλεσης και ερμηνείας των αποτελεσμάτων) (Adzitey F. και συνεργάτες 2013). Μια μέθοδος τυποποίησης θεωρείται αξιόπιστη όταν πληροί κάποιες βασικές προϋποθέσεις. Έτσι, πρέπει: 1) να διαθέτει σταθερότητα όσον αφορά την αρχή της μεθόδου και τα αποτελέσματα που διεξάγονται, 2) να παρέχει ολική ικανότητα τυποποίησης [τυποποιητικότητα: υπολογίζεται διαιρώντας τον αριθμό των στελεχών που τυποποιήθηκαν με το σύνολο των στελεχών που μελετήθηκαν



(van Belkum A. και συνεργάτες 2007)] για όλα τα στελέχη της έρευνας, 3) να έχει υψηλό βαθμό διακριτικής ικανότητας, δηλαδή να επιτρέπει τη διάκριση ανάμεσα στα στελέχη, η οποία πρέπει να είναι σύμφωνη με την επιδημιολογική εικόνα και, τέλος 4) τα αποτελέσματα της μεθόδου πρέπει να μπορούν να αναπαραχθούν ανεξάρτητα από τον χρόνο, τον τόπο και το προσωπικό του εργαστηρίου (επαναληψιμότητα) (van Belkum A. και συνεργάτες 2007). Πρέπει να τονιστεί ότι τα αποτελέσματα μιας μεθόδου τυποποίησης αξιολογούνται και ερμηνεύονται πάντα σε συνδυασμό με τα πρόσφατα επιδημιολογικά, κλινικά και δημογραφικά δεδομένα. Η ανάγκη για διεθνείς βάσεις δεδομένων με τις οποίες μπορεί να εξασφαλιστεί η εύκολη προσβασιμότητα αλλά κυρίως η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων από μεθόδους τυποποίησης, είναι σημαντική. Επι του παρόντος, έχουν αναπτυχθεί διεθνείς βάσεις δεδομένων που παρέχουν καταλόγους πρότυπων στελεχών (π.χ. το DLST.org κ.α.) ή δεδομένα τυποποίησης και πληροφορίες σχετικά με τα κλινικά ή/και επιδημιολογικά χαρακτηριστικά των στελεχών όπως το Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI), το PulseNet International (The International Molecular Subtyping Network) κ.α. Εργαστήρια που εφαρμόζουν μεθόδους τυποποίησης χρησιμοποιούν τυποποιητικά σχήματα προτεινόμενα από τέτοιους φορείς, έτσι ώστε να υπάρχει ένας κοινός κώδικας, βάσει του οποίου τα εργαστήρια μπορούν να επεξεργαστούν και να συγκρίνουν τα αποτελέσματά τους σε κοινές βάσεις δεδομένων (van Belkum A. και συνεργάτες 2007, Sabat A.J. και συνεργάτες 2013).

Οι μέθοδοι τυποποίησης χωρίζονται στις Φαινοτυπικές (σύγκριση μακροσκοπικών και μικροσκοπικών βιολογικών χαρακτηριστικών μεταξύ των βακτηριακών στελεχών) και στις Μοριακές (εκμεταλλεύονται τα χαρακτηριστικά του γενετικού υλικού για σύγκριση στελεχών που ανήκουν στο ίδιο είδος).

### **1.3.1 Φαινοτυπικές μέθοδοι**

Οι φαινοτυπικές μέθοδοι μελετούν τα μακροσκοπικά και μικροσκοπικά βιολογικά χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών με σκοπό τη σύγκριση στελεχών του ίδιου είδους και την τελική τους τυποποίηση. Η μελέτη του φαινοτύπου μπορεί να περιλαμβάνει την μορφολογία των αποικιών, το χρώμα, την οσμή και άλλα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά, όμως οι περισσότερες μέθοδοι τυποποίησης βασίζονται σε χαρακτηριστικά που απαιτούν

εξειδικευμένες τεχνικές για να μελετηθούν. Συγκεκριμένα, μπορούν να αξιολογήσουν, ποιοτικά και ποσοτικά, την ικανότητα βακτηριακών στελεχών να αναπτύσσονται υπό την παρουσία συγκεκριμένων ουσιών (όπως αντιβιοτικά, βακτηριακές τοξίνες κ.α.), την ποικιλία που εμφανίζουν στις μεταβολικές λειτουργίες ή στα αντιγόνα που μπορεί να διαθέτουν στην κυτταρική τους μεμβράνη και στο μαστίγιο, το διαχωρισμό πρωτεϊνών και ενζύμων και άλλα (van Belkum A. και συνεργάτες 2007).

Τα παραδοσιακά συστήματα τυποποίησης με βάση τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, χρησιμοποιούνται ευρέως σε κλινικά εργαστήρια ή νοσοκομεία λόγω του χαμηλού κόστους τους και της επαρκούς εκπαίδευσης του προσωπικού σε αυτόν τον τομέα υγείας (Castro-Escarpulli G. και συνεργάτες 2015). Παρόλο που βρίσκονται σε εφαρμογή για πολλά χρόνια, εμφανίζουν προβλήματα στα κριτήρια απόδοσης (μεταβλητή διακριτική ικανότητα, χαμηλή ευαισθησία και αναπαραγωγιμότητα) λόγω των χαρακτηριστικών που επιλέγονται για μελέτη. Συνεπώς, όλες οι μέθοδοι απαιτούν αυστηρό έλεγχο των πειραματικών συνθηκών, αφού οι φαινότυποι είναι αρκετά επιρρεπείς στις αλλαγές των περιβαλλοντικών συνθηκών. Επιπλέον, οι περισσότερες φαινοτυπικές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για συγκεκριμένα είδη βακτηρίων και δεν είναι γενικά εφαρμόσιμες. Οποιοσδήποτε δεδομένος φαινότυπος δεν αντικατοπτρίζει πάντοτε με ακρίβεια τον γονότυπο ενός μικροοργανισμού και συνεπώς, δεν μπορεί να παράσχει αξιόπιστο και σταθερό επιδημιολογικό δείκτη. Για τους λόγους αυτούς, τις τελευταίες τρεις δεκαετίες, οι φαινοτυπικές μέθοδοι έχουν αντικατασταθεί σε μεγάλο βαθμό πλέον από τις γονοτυπικές ή μοριακές μεθόδους τυποποίησης (van Belkum A. και συνεργάτες 2007, Ranjbar R. και συνεργάτες 2014, Castro-Escarpulli G. και συνεργάτες 2015).

**Πίνακας 1.3.1.1:** Φαινοτυπικές μέθοδοι τυποποίησης/ πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά τους (Sridhar Rao P.N.: [www.microrao.com](http://www.microrao.com)).

<b>Βιοτυποποίηση</b> [Τυπικές ενζυμικές δοκιμές (κιτρικό, ουρεάση), αιμόλυση, ζύμωση σακχάρων κ.α.]	Πλεονεκτήματα: Επαναληψιμότητα, εύκολη ερμηνεία αποτελεσμάτων
	Μειονεκτήματα: Διακριτική ικανότητα
<b>Τυποποίηση φάγων</b>	Πλεονεκτήματα: Επαναληψιμότητα, διακριτική ικανότητα, εύκολη ερμηνεία αποτελεσμάτων
	Μειονεκτήματα: Δύσκολη τεχνική που εφαρμόζεται από εξειδικευμένο προσωπικό, ατυποποίητα στελέχη
<b>Τυποποίηση βακτηριοκινών</b>	Πλεονεκτήματα: Επαναληψιμότητα, διακριτική ικανότητα, εύκολη ερμηνεία αποτελεσμάτων
	Μειονεκτήματα: Δύσκολη τεχνική που εφαρμόζεται από εξειδικευμένο προσωπικό, ατυποποίητα στελέχη
<b>Οροτυποποίηση</b>	Πλεονεκτήματα: Επαναληψιμότητα, εύκολη ερμηνεία των αποτελεσμάτων
	Μειονεκτήματα: Διακριτική ικανότητα, δύσκολη και απαιτητική τεχνική, ατυποποίητα στελέχη
<b>Τυποποίηση βάσει αντιβιογράμματος</b>	Πλεονεκτήματα: Επαναληψιμότητα, εύκολη τεχνική και ερμηνεία των αποτελεσμάτων
	Μειονεκτήματα: Διακριτική ικανότητα, αλλαγή του προφίλ αντοχής σε βάθος χρόνου
<b>Τυποποίηση πρωτεϊνών</b>	Πλεονεκτήματα: Επαναληψιμότητα και εύκολη ερμηνεία των αποτελεσμάτων
	Μειονεκτήματα: Απαιτητική και ακριβή τεχνική, δύσκολη ερμηνεία των αποτελεσμάτων
<b>Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE)</b>	Πλεονεκτήματα: Επαναληψιμότητα και εύκολη ερμηνεία των αποτελεσμάτων
	Μειονεκτήματα: Μέτρια διακριτική ικανότητα για την επιδημιολογική ανάλυση κλινικών στελεχών, απαιτείται ειδικός εξοπλισμός

### 1.3.1.1 Έλεγχος Μικροβιακής Ευαισθησίας στα Αντιβιοτικά

Αντοχή είναι η περιγραφή της σχετικής ευαισθησίας ενός μικροοργανισμού σε μια συγκεκριμένη θεραπεία υπό ένα συγκεκριμένο σύνολο συνθηκών. Σε σχέση με τους αντιμικροβιακούς παράγοντες, η αντοχή συνήθως ποσοτικοποιείται ως η ελάχιστη συγκέντρωση που απαιτείται για να προκαλέσει μια σημαντική επίδραση (π.χ. αναστολή

της ανάπτυξης) σε έναν πληθυσμό κυττάρων. Όπου υπάρχει μια αλλαγή στην ευαισθησία, όπου ένας αντιμικροβιακός παράγοντας είναι αναποτελεσματικός έναντι συγκεκριμένου οργανισμού, ο μικροοργανισμός αυτός αναφέρεται ως ανθεκτικός στον συγκεκριμένο παράγοντα. Πολλοί μικροοργανισμοί χαρακτηρίζονται ως εγγενώς ανθεκτικοί σε έναν συγκεκριμένο παράγοντα εξαιτίας της φυσιολογίας ή της βιοχημείας τους. Ένας οργανισμός ευαίσθητος στα αντιβιοτικά μπορεί να γίνει ανθεκτικός με διαδικασίες μετάλλαξης ή με ενσωμάτωση της γενετικής πληροφορίας που κωδικοποιεί την αντοχή (Kummerer K. και συνεργάτες 2004).

Η τυποποίηση βάσει αντιβιογράμματος, δηλαδή με δοκιμή της αντιμικροβιακής ευαισθησίας, μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με διάχυση του αντιβιοτικού σε στερεά θρεπτικά μέσα ανάπτυξης είτε με αραίωσή του σε υγρό μέσο, χρησιμοποιώντας μια ποικιλία συστημάτων μέτρησης. Πλέον, τα περισσότερα κλινικά και περιβαλλοντικά εργαστήρια που μελετούν την αντιμικροβιακή αντοχή τόσο σε κλινικά όσο και σε περιβαλλοντικά στελέχη, εφαρμόζουν την προτεινόμενη από το European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) μέθοδο διάχυσης των δίσκων, Kirby-Bauer (Matuschek E. και συνεργάτες 2014). Το προφίλ ευαισθησίας του κάθε στελέχους εκφράζεται με ανάπτυξη διαμέτρου αναστολής σε κάθε αντιβιοτικό, έτσι ώστε στο τέλος να παράγεται ένα πλήρες προφίλ αντιμικροβιακής αντοχής. Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα ερμηνεύονται σύμφωνα με τις οδηγίες του EUCAST που εφαρμόζονται όλο και πιο συχνά σε μικροβιολογικά εργαστήρια των ευρωπαϊκών χωρών (Matuschek E. και συνεργάτες 2014) και παράλληλα μέσω βάσεων δεδομένων που περιλαμβάνουν έναν μεγάλο όγκο επιδημιολογικών δεδομένων των κλινικών και περιβαλλοντικών στελεχών (<http://www.eucast.org/>). Η τυποποίηση μέσω του αντιβιογράμματος μπορεί με κατάλληλη επιλογή των αντιβιοτικών, να εφαρμοστεί σε όλους τους μικροοργανισμούς. Η διακριτική ικανότητα της μεθόδου εξαρτάται από την ποικιλία, τη σταθερότητα και τη σχετική συχνότητα με την οποία εμφανίζονται κάποιοι μηχανισμοί αντοχής στο συγκεκριμένο μικροοργανισμό που μελετάται. Επίσης, εξαρτάται από τον αριθμό των αντιβιοτικών που εξετάζονται, ώστε να αποκαλύψουν συγκεκριμένους μηχανισμούς αντοχής. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από χαμηλό κόστος και σχετική ευκολία στην εφαρμογή της, επιτρέποντας έτσι τη μελέτη υψηλού αριθμού στελεχών. Η αναπαραγωγιμότητα και επαναληψιμότητα της μεθόδου εξαρτώνται τόσο από το

εργαστηριακό προσωπικό όσο και από τη φύση του μικροοργανισμού (van Belkum A. και συνεργάτες 2007). Σύμφωνα με τα παραπάνω, για το βακτήριο *P. aeruginosa* εφαρμόζεται το αντιβιογράμμα χρησιμοποιώντας τα προτεινόμενα αντιβιοτικά και όρια του EUCAST.

Η τυποποίηση βάσει αντιβιογράμματος έχει άμεσο αντίκτυπο στον κλινικό τομέα, καθώς τα περισσότερα κλινικά μικροβιολογικά εργαστήρια την εφαρμόζουν, με στόχο να καθοδηγήσουν τις φαρμακευτικές αγωγές των ασθενών. Με την συνεχώς αυξανόμενη εμφάνιση πολυανθεκτικών στελεχών, η εύρεση πιθανών μηχανισμών αντοχής είναι δύσκολη, καθώς πλέον ένα εργαστήριο καλείται να μελετήσει βακτήρια με πολλαπλούς μηχανισμούς αντοχής, όπου δεν είναι πλήρως κατανοητοί οι παράγοντες που επιδρούν στην ανάπτυξη εγγενών και επίκτητων μηχανισμών αντοχής (Livermore D.M. και συνεργάτες 2002, van Belkum A. και συνεργάτες 2007). Παρά τις δυσκολίες όμως, η τυποποίηση με αντιβιογράμμα ήταν για πολλά χρόνια και παραμένει μέχρι και σήμερα, η πρώτη μέθοδος που θα εφαρμόζεται για την ανίχνευση πιθανών περιστατικών εξάπλωσης βακτηριακών μολύνσεων σε χώρους υγειονομικής περίθαλψης (van Belkum A. και συνεργάτες 2007). Επίσης, η συγκεκριμένη φαινοτυπική μέθοδος παρέχει ιστορικά δεδομένα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε επιδημιολογικές μελέτες, σχετικά με τη διάδοση συγκεκριμένων δεικτών αντοχής σε καθορισμένες γεωγραφικές περιοχές, καθώς και μεταξύ διαφορετικών χωρών (Ranjbar R. και συνεργάτες 2014).

### **1.3.2 Μοριακές μέθοδοι τυποποίησης**

Η εφαρμογή τεχνικών μοριακής βιολογίας έχει βελτιώσει σημαντικά την ικανότητα αναγνώρισης και ταξινόμησης βακτηρίων, ιδιαίτερα με τις γονοτυπικές μεθόδους που εκμεταλλεύονται τα χαρακτηριστικά του γενετικού υλικού για την σύγκριση βακτηριακών στελεχών που ανήκουν στο ίδιο είδος. Οι μοριακές τυποποιητικές μέθοδοι βασίζονται στην ποικιλομορφία του γονιδιώματος των βακτηριακών στελεχών, με σκοπό την απόκτηση δεδομένων όσον αφορά στη σύσταση του γονιδιώματος (π.χ. παρουσία ή απουσία πλασμιδίου), την ολική δομή του (π.χ. τη δομή, τον αριθμό και τη θέση των επαναλαμβανόμενων στοιχείων) ή τέλος, την ολόκληρη νουκλεοτιδική αλληλούχισή του (π.χ. ενός ή περισσότερων γονιδίων ή ενδογονιδιακών περιοχών). Η συνεχώς αυξανόμενη

διαθεσιμότητα ολόκληρων γονιδιωμάτων διαφόρων βακτηρίων βοηθά στην εξέλιξη των μεθόδων αυτών (van Belkum A. και συνεργάτες 2007, Donelli G. και συνεργάτες 2013).

Οι μοριακές τεχνικές χρησιμοποιούνται ευρέως στην μελέτη της επιδημιολογίας μίας ασθένειας, των γενετικών μεταλλάξεων αλλά και σε άλλες γενετικές μελέτες παθογόνων βακτηρίων. Η ικανότητα χαρακτηρισμού των στελεχών σε επίπεδο κλώνου, παράγει πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο μετάδοσης και τις πηγές της μόλυνσης, που θα ήταν εξαιρετικά δύσκολο ή αδύνατο να ανιχνευτούν με τις πιο παραδοσιακές μεθόδους που βασίζονται στο φαινότυπο. Οι μοριακές μέθοδοι εμφανίζουν κάποια πλεονεκτήματα έναντι των φαινοτυπικών, που τις καθιστούν πιο αξιόπιστες και πιο χρηστικές στον καθορισμό γένους, είδους, αλλά ακόμη και υποείδους σε έναν πληθυσμό βακτηρίων. Όλες οι μοριακές μέθοδοι χαρακτηρίζονται από υψηλή αναπαραγωγιμότητα, επαναληψιμότητα διακριτική ικανότητα και ταχύτητα, παρέχοντας δεδομένα εύκολα ερμηνεύσιμα και αξιόπιστα (Adzitey F. και συνεργάτες 2013, Ranjbar R. και συνεργάτες 2014). Αντιθέτως, επειδή θεωρούνται πιο απαιτητικές και συνήθως έχουν υψηλότερο κόστος από τις φαινοτυπικές μεθόδους, δεν είναι διαθέσιμες στα εργαστήρια των δημόσιων νοσοκομείων, αλλά εφαρμόζονται σε ερευνητικά εργαστήρια και εργαστήρια αναφοράς (Castro-Escarpulli G. και συνεργάτες 2015).

Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μοριακών τεχνικών τυποποίησης που βασίζονται στην επεξεργασία του γενετικού υλικού: τεχνικές υβριδισμού (κανονικός και ανάστροφος υβριδισμός, ribotyping, array hybridisation), μέθοδοι βασισμένοι στην ανάλυση θραυσμάτων από τη χρήση περιοριστικών ενζύμων, [Restriction Endonuclease Analysis (REA), Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) κ.ά.], μέθοδοι που ολοκληρώνονται με αλληλούχιση του DNA (αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος/whole genome sequencing, αλληλούχιση νέας γενιάς/next generation sequencing, οπτική χαρτογράφηση/optical mapping κ.ά.) και μέθοδοι που βασίζονται στην ενίσχυση συγκεκριμένων γενετικών στόχων με την χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) (van Belkum A. και συνεργάτες 2007, Donelli G. και συνεργάτες 2013).

Η PCR είναι ευρέως γνωστή μέθοδος ανίχνευσης νουκλεϊκών οξέων και η ικανότητα της να ενισχύει μικρές ποσότητες συγκεκριμένων μικροβιακών DNA αλληλουχιών την έχει καταστήσει ένα ισχυρό μοριακό εργαλείο. Η τυποποίηση με χρήση

της PCR εμφανίζει ευαισθησία σε μικρές μεταβολές των πειραματικών συνθηκών και των αντιδραστηρίων, είναι κατάλληλη για τη σύγκριση μικρού αριθμού δειγμάτων, ενώ τα αποτελέσματα μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των ηλεκτροφορήσεων, ακόμη και στον ίδιο εργαστηριακό χώρο. Η PCR χρησιμοποιείται σε μια ποικιλία μεθόδων με πολλές διαγνωστικές και επιδημιολογικές εφαρμογές, όπως PCR-RFLP, PCR-ribotyping, επαναλαμβανόμενη εξωγενής παλινδρομική (Rep)-PCR, και άλλες τεχνικές. Η Multi-locus VNTR Analysis (MLVA), η RAPD-PCR και η Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) αποτελούν κάποιες από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μοριακές τυποποιητικές μεθόδους βασισμένες στην ανάλυση θραυσμάτων με χρήση PCR, ενώ το 16S and 23S rDNA, η Multi Locus Sequence Typing (MLST) και η Double Locus Sequence typing (DLST), απαιτούν επιπλέον αλληλούχιση των προϊόντων (van Belkum A. και συνεργάτες 2007, Donelli G. και συνεργάτες 2013, Ranjbar R. και συνεργάτες 2014, Castro-Escarpulli G. και συνεργάτες 2015). Όπως παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1.3.2.1**, κάθε μία από αυτές τις μοριακές τεχνικές έχει τα πλεονεκτήματα και τους περιορισμούς της, που τη καθιστούν χρήσιμη μόνο σε συγκεκριμένες μελέτες και όχι σε άλλες. Τα κριτήρια επιλογής μιας μεθόδου μοριακής τυποποίησης διαφέρουν μεταξύ εργαστηρίων και εξαρτώνται από το επίπεδο δεξιοτήτων του προσωπικού και τους πόρους του εργαστηρίου, καθώς και από το στόχο και την εμβέλεια της μελέτης. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν μπορούν να επεξεργαστούν και να αναλυθούν με τη βοήθεια υπολογιστικών προγραμμάτων και ειδικών βάσεων δεδομένων όπως η pubmlst.org (MLST), dlst.org (DLST), mlva.net (MLVA) κ.α. Υπάρχει μία μεγάλη κατηγορία αναλυτικών μεθόδων που αποσκοπούν στην ανάδειξη της συγγένειας μεταξύ των υπό μελέτη μικροοργανισμών και στελεχών, μέσω φυλογενετικής και αριθμητικής ταξινόμησης και δημιουργίας φυλογενετικών δένδρων (Ranjbar R. και συνεργάτες 2014).

**Πίνακας 1.3.2.1:** Τα βασικά χαρακτηριστικά μερικών ευρέως χρησιμοποιούμενων μοριακών τυποποιητικών μεθόδων, που βασίζονται στην τεχνική της PCR (Ranjbar R. και συνεργάτες 2014, Castro-Escarpulli G. και συνεργάτες 2015).

	<b>PCR-RFLP</b>	<b>RAPD-PCR</b>	<b>Rep-PCR</b>	<b>AFLP</b>	<b>VNTR</b>	<b>MLST</b>
<b>Διακριτική Ικανότητα</b>	Χαμηλή	Καλή	Μέτρια-υψηλή	Υψηλή	Υψηλή	Καλή-υψηλή
<b>Αναπαραγωγικότητα</b>	Υψηλή	Μέτρια	Καλή-υψηλή	Καλή-υψηλή	Υψηλή	Υψηλή
<b>Επαναληψιμότητα</b>	Υψηλή	Υψηλή	Καλή-Υψηλή	Υψηλή	Υψηλή	Υψηλή
<b>Ευκολία εφαρμογής</b>	Εύκολη	Εύκολη	Εύκολη	Μέτρια	Εύκολη	Μέτρια
<b>Ευκολία ερμηνείας των αποτελεσμάτων</b>	Εύκολη	Μέτρια	Μέτρια-εύκολη	Μέτρια-εύκολη	Εύκολη	Εύκολη
<b>Κόστος</b>	Χαμηλό	Χαμηλό	Χαμηλό-μέτριο	Μέτριο-υψηλό	Χαμηλό-μέτριο	Μέτριο-υψηλό
<b>Διάρκεια (σε ημέρες)</b>	1-2	1	1	2	≥3	2

### 1.3.2.1 Η μέθοδος Double Locus Sequence Typing (DLST)

Η DLST είναι μια μοριακή τυποποιητική μέθοδος, η οποία εφαρμόστηκε για πρώτη φορά σε κλινικά πολυανθεκτικά στελέχη *S. aureus* (Multi Drug *S. aureus* - MRSA) με στόχο την ανάπτυξη μιας γρήγορης και οικονομικής μεθόδου για την τυποποίηση και επιδημιολογική μελέτη βακτηρίων (Kuhn G. και συνεργάτες 2007). Έκτοτε έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε φυλογενετικές και επιδημιολογικές μελέτες του βακτηρίου *S. aureus* (Basset P. και συνεργάτες 2009, Vogel V. και συνεργάτες 2012), ενώ πλέον αναπτύσσονται πρωτόκολλα για όλο και περισσότερους μικροοργανισμούς όπως το *Campylobacter jejuni* (Ahmed M.U. και συνεργάτες 2014) και το *Clostridium difficile* (Stojanov M. και συνεργάτες 2016).

Παρόλο που η μοριακή τυποποίηση του *P. aeruginosa* είναι σημαντική προκειμένου να γίνει πιο κατανοητή η τοπική επιδημιολογία του βακτηρίου, αντιμετωπίζει ακόμα πολλές δυσκολίες. Πρόσφατα, δημοσιεύτηκε το πρωτόκολλο της DLST για το βακτήριο *P. aeruginosa*, όπου προτείνεται η μερική αλληλούχιση (single-strand sequencing) δυο ιδιαίτερα μεταβλητών γενετικών τόπων, *ms172* και *ms217*, για την τυποποίηση κλινικών και περιβαλλοντικών στελεχών του βακτηρίου. Παρ' όλο που κατά



τη μελέτη των Basset P. και συνεργάτες (2014) μελετήθηκε και το γονίδιο *oprD*, αφαιρέθηκε από το τελικό σχήμα, καθώς ο συνδυασμός μόνο των δύο γενετικών τόπων *ms172* και *ms217* αποδείχτηκε αρκετός και αποτελεσματικός για την επιδημιολογική τυποποίηση του βακτηρίου (Basset P. & Blanc D.S 2014). Η προσθήκη του τρίτου γενετικού τόπου *oprD* αυξάνει σε χαμηλό βαθμό την διακριτική ικανότητα της μεθόδου και ίσως είναι χρήσιμο σε περιπτώσεις όπου ερευνάται πιθανή σύνδεση μεταξύ δύο απομονώσεων. Ωστόσο αυτή η μικρή ενίσχυση στην απόδοση της μεθόδου δεν είναι πιθανώς αρκετά υψηλή για να δικαιολογήσει το πρόσθετο κόστος της αλληλούχισης ενός τρίτου γενετικού τόπου (Basset P. & Blanc D.S. 2014). Παρόλα αυτά, σε μελέτη που διεξήχθη με στόχο να διερευνήσει τη φυλογένεση ενός πληθυσμού σε τοπικό επίπεδο, έχει δείξει ότι σε εφαρμογή της DLST σε περιβαλλοντικά στελέχη, ο συνδυασμός της μεθόδου με το τρίτο γενετικό δείκτη (*oprD*) κατάφερε να διαχωρίσει γενετικά κοντινά στελέχη (Pappa O. και συνεργάτες 2016).

Οι γενετικοί μάρτυρες *ms172* και *ms217* που μελετά η DLST είναι διαγονιδιακοί επαναλαμβανόμενοι γενετικοί τόποι γνωστοί ως εν σειρά επαναλήψεις μεταβλητού αριθμού (variable number of tandem repeats, VNTRs) ή μινιδορυφόροι (minisatellites) ή μικρές εν σειρά επαναλήψεις (short tandem repeats, STR) (Lewin B., 2004, Vu-Thien H. και συνεργάτες 2007). Οι μινιδορυφόροι είναι πολυμορφικές αλληλουχίες που αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες μονάδες μήκους 10-100bp και κατανέμονται σε όλο το μήκος του γονιδιώματος (Lewin B. 2004). Είχαν αρχικά μελετηθεί και χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση κληρονομικών σχέσεων στους ανθρώπους με την τεχνική του αποτυπώματος DNA (DNA fingerprinting). Τα τελευταία χρόνια όμως, η ανάπτυξη μεθόδων αλληλούχισης ολόκληρου του γονιδιώματος αποκάλυψε την ύπαρξη αυτών των αλληλουχιών στα βακτήρια και ανοίχτηκαν νέοι δρόμοι για την μελέτη και αξιολόγησή τους σε τυποποιητικά σχήματα (Onteniente L. και συνεργάτες 2003, Blanc D.S. 2004). Οι πολυμορφικοί γενετικοί τόποι *ms172*, *ms217*, μεταξύ πολλών άλλων, είχαν αρχικά μελετηθεί από τους Onteniente L. και συνεργάτες (2003) και τους Vu-Thien H. και συνεργάτες (2007) σε κλινικά στελέχη *P. aeruginosa* με σκοπό την ανάπτυξη μιας οικονομικής και ιδιαίτερα πληροφοριακής γονοτυπικής μεθόδου [Multiple-Locus Variable-number tandem-repeat (VNTR) Analysis, MLVA] (Onteniente L. και συνεργάτες 2003, Vu-Thien H. και συνεργάτες 2007). Ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων μονάδων

των γενετικών τόπων *ms172*, *ms217* έχει υπολογιστεί μετρώντας το μέγεθος των προϊόντων PCR με τη χρήση ειδικών εκκινητών εκατέρωθεν από το επαναλαμβανόμενο κομμάτι (Onteniente L. και συνεργάτες 2003). Οι μινιδουρόφοροι έχει αποδειχθεί πως είναι πιο σταθεροί στο βακτήριο *P. aeruginosa* σε σύγκριση με άλλα είδη (Onteniente L. και συνεργάτες 2003). Σύμφωνα με την μελέτη των Vu-Thien H. και συνεργάτες (2007), οι γενετικοί μάρτυρες, *ms172* και *ms217*, είναι ειδικοί για το βακτήριο *P. aeruginosa* και σε συνδυασμό με την υψηλή αναπαραγωγιμότητα και ακρίβεια των αποτελεσμάτων που προσφέρουν, θεωρούνται αξιόπιστοι για την φυλογενετική μελέτη του βακτηρίου (Vu-Thien H. και συνεργάτες 2007). Στον **Πίνακα 1.3.2.1.1** που ακολουθεί, αναφέρονται κάποια βασικά χαρακτηριστικά των 2 αυτών μινιδουρόφων.

**Πίνακας 1.3.2.1.1:** Χαρακτηριστικά των γενετικών τόπων *ms172* και *ms217* (Vu-Thien H. και συνεργάτες 2007).

Γενετικός Τόπος	Μέγεθος (bp) ET	PAO1			Δείκτης πολυμορφισμού
		Θέση (kb)	Αριθμός ET	Μέγεθος προϊόντος (bp)	
<i>ms172</i>	54	5084	12	789	0.73
<i>ms217</i>	109	6187	2	606	0.79

ET: επαναλαμβανόμενο τμήμα (repeat unit)

Το νέο τυποποιητικό σχήμα DLST έχει μελετηθεί συγκριτικά με την έως τώρα ευρέως χρησιμοποιούμενη τυποποιητική μέθοδο Multi Locus Sequence Typing (MLST) (Basset P. & Blanc D.S. 2014), η οποία έχει χρησιμοποιηθεί για την κατανόηση της παγκόσμιας πληθυσμιακής δομής των βακτηρίων και βασίζεται στην αλληλούχηση 7 συντηρημένων γονιδίων. Σε έναν μεγάλο αριθμό (281) στελεχών *P. aeruginosa*, αποδείχτηκε ότι τόσο η τυποποιητικότητα όσο και η διακριτική ικανότητα της DLST βρίσκεται στα ίδια επίπεδα με την MLST, εξάγοντας αξιόπιστα αποτελέσματα, ειδικά όταν διεξάγονται επιδημιολογικές και φυλογενετικές μελέτες σε τοπικό επίπεδο (Basset P. & Blanc D.S. 2014, Cholley P. και συνεργάτες 2015). Η DLST είναι εύκολη στην εφαρμογή

της και προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα όπως: υψηλή τυποποιητικότητα, διακριτική ικανότητα αναπαραγωγιμότητα και επαναληψιμότητα, ενώ ταυτόχρονα δεν απαιτείται πολύς χρόνος και ειδικός εξοπλισμός για την διεξαγωγή των πειραμάτων. Η μέθοδος είναι σταθερή και μπορεί να συγκρίνει στελέχη τα οποία έχουν απομονωθεί από έρευνες διάρκειας ολόκληρων μηνών ή και χρόνων. Πιο συγκεκριμένα, επειδή οι δύο γενετικοί δείκτες *ms172*, *ms217* που μελετά είναι σταθεροί σε μια χρονική περίοδο παρόμοια με εκείνη των τοπικών επιδημιολογικών ερευνών, την καθιστά κατάλληλη μέθοδο για την τοπική επιδημιολογική ανάλυση του *P. aeruginosa*. Αυτό δεν αποτελεί περιορισμό της μεθόδου, καθώς έχει αναπτυχθεί μια βάση δεδομένων (<http://www.dlst.org/P.aeruginosa/>), στην οποία οι χρήστες καταθέτουν αλληλουχίες για τους δύο γενετικούς τόπους, ένας αριθμός δίδεται για κάθε 'τόπο' και ο συνδυασμός των δύο αριθμών καθορίζει τον DLST τύπο. Έτσι, με εύκολο τρόπο και χωρίς την χρήση πολλαπλών βάσεων δεδομένων, είναι δυνατή η συσχέτιση των αλληλουχιών που προέρχονται από στελέχη διαφορετικών απομονώσεων αλλά και διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών, δημιουργώντας φυλογενετικά δέντρα και χάρτες. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως η μέθοδος είναι αρκετά καινούρια και έτσι δεν υπάρχει αρκετή πληροφορία στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με την εφαρμογή της, τόσο σε κλινικά όσο και σε περιβαλλοντικά στελέχη *P. aeruginosa*, ενώ η βάση δεδομένων συνεχώς εμπλουτίζεται με νέους γενετικούς τόπους (Basset P. & Blanc D.S. 2014, Cholley P. και συνεργάτες 2015, Stojanov M. και συνεργάτες 2016).

Παρόλο που πλέον η ανάπτυξη καινοτόμων τυποποιητικών μεθόδων που βασίζονται στην αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing) έχει έρθει να λύσει πολλά από τα προβλήματα των κλασικών μοριακών τεχνικών (Shi Z. και συνεργάτες 2015, Thrane S.W. και συνεργάτες 2016), τα περισσότερα εργαστήρια φυλογένεσης και μοριακής τυποποίησης επιμένουν να εφαρμόζουν τις κλασικές μοριακές τεχνικές που βασίζονται στην αλληλούχιση γνωστών γενετικών τόπων (Sequence Based Typing). Η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος έχει πολύ υψηλό κόστος και συνεπώς, σε αντίθεση με τη DLST, είναι ακατάλληλη για επιδημιολογική μελέτη και επιτήρηση σε επίπεδο ρουτίνας (Tissot F. και συνεργάτες 2016). Γίνονται συνεχώς προσπάθειες για την εύρεση μίας μοριακής τυποποιητικής μεθόδου γρήγορης και με χαμηλό κόστος, που να διατηρεί ταυτόχρονα την ευαισθησία και την διακριτική ικανότητα

σε υψηλά επίπεδα. Η DLST φαίνεται να καλύπτει αρκετές από αυτές τις απαιτήσεις σε σχέση με την έως τώρα πρότυπη μέθοδο MLST καθώς: χρησιμοποιούνται δύο γονίδια αντί των 7 της MLST (μείωση χρόνου και κόστους) και απαιτείται αλληλούχιση μόνο στη μία κατεύθυνση του γονιδιώματος (με τη χρήση του Reverse primer/μείωση χρόνου και κόστους) (Cholley P. και συνεργάτες 2015). Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η χρήση γενετικών μαρτύρων ταχέως εξελισσόμενων δεν εμποδίζει τις φυλογενετικές παραμέτρους, τουλάχιστον σε επίπεδο είδους, για τη μελέτη της εξελικτικής πορείας ενός πληθυσμού και ότι η επιλογή των κατάλληλων γενετικών τόπων θα πρέπει να βασίζεται στη νουκλεοτιδική ποικιλομορφία και όχι στη γονιδιακή λειτουργία. Συμπερασματικά, με τη χρήση επαναλαμβανόμενων γενετικών τόπων (variable repeats) όπως στην περίπτωση της DLST, και όχι συντηρημένων, ίσως αντικατοπτρίζεται καλύτερα και πιο αξιόπιστα η γενετική ποικιλομορφία του βακτηριακού πληθυσμού, γεγονός που την καθιστά μια πολύτιμη εναλλακτική λύση για την ταυτοποίηση του βακτηρίου (Pérez-Losada M. και συνεργάτες 2013). Μάλιστα, η εφαρμογή της μεθόδου σε συνδυασμό με την τεχνική του Whole genome sequencing θα μπορούσε να αποτελέσει μια αποτελεσματική στρατηγική τυποποίησης για την διερεύνηση ή/και πρόληψη επιδημιών (Cholley P. και συνεργάτες 2015).

### **1.3.2.2 *16s rDNA* typing**

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, με την ευρεία χρήση της PCR μεθόδου και της αλληλούχισης του DNA, η αλληλούχιση του *16s rRNA* γονιδίου κατέχει κεντρικό ρόλο στην ταυτοποίηση και φυλογενετική ανάλυση βακτηριακών στελεχών στα εργαστήρια κλινικής μικροβιολογίας. Από το 1980 ο Woese C.R. απέδειξε πως οι φυλογενετικές σχέσεις των βακτηρίων αλλά και όλων των μορφών ζωής, θα μπορούσαν να καθοριστούν μέσω σύγκρισης των σταθερών περιοχών του γενετικού υλικού (Clarridge J.E. και συνεργάτες 2004). Για το λόγο αυτό κατάλληλοι γενετικοί τόποι για μελέτη θεωρήθηκαν τα γονίδια που κωδικοποιούν τα RNA των βακτηριακών ριβοσωμάτων. Στα βακτήρια, τα γονίδια που κωδικοποιούν τα ριβοσωμικά RNA (rRNA) μεταγράφονται από το ριβοσωμικό οπερόνιο ως πρόδρομα μόρια *30s rRNA* και στη συνέχεια, με τη βοήθεια της RNase III διαχωρίζονται σε *16s* (γνωστό και ως μικρή υπομονάδα), *23s* και *5s rRNA* μόρια (Rajendhran J. & Gunasekaran P. 2011). Δεδομένου ότι το *16s rRNA* είναι το πιο

συντηρημένο από τα τρία rRNA, ο Woese C.R. αναφέρει πως συμπεριφέρεται ως «εξελικτικό ρολόι», το οποίο οδήγησε στην ανακατασκευή του δέντρου της ζωής (Clarridge J.E. και συνεργάτες 2004, Rajendhran J. & Gunasekaran P. 2011). Το μέγεθος του ριβοσωμικού οπερονίου, οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες και οι δευτερογενείς δομές των τριών rRNA γονιδίων είναι υψηλά συντηρημένα μέσα σε ένα βακτηριακό είδος (Woo P.C.Y. και συνεργάτες 2008, Rajendhran J. & Gunasekaran P. 2011). Ο υψηλός βαθμός σταθερότητας και συντήρησης της αλληλουχίας οφείλεται στο γεγονός ότι το *16s rRNA* κατέχει σημαντικό ρόλο στην λειτουργία των κυττάρων. Η αλληλούχηση του γονιδίου έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την εκτίμηση της βακτηριακής ποικιλότητας σε περιβαλλοντικά δείγματα μέσω μεταγονιδιωματικών προσεγγίσεων και πλέον, αποτελεί την «Gold standard» τεχνική στην ταξινόμηση και φυλογένεση ειδών βακτηρίων (Spilker T. και συνεργάτες 2004, Rajendhran J. & Gunasekaran P. 2011).

Η ανάλυση της αλληλουχίας του *16s rRNA* γονιδίου παρέχει υψηλής ακρίβειας ταυτοποίηση των υπό μελέτη στελεχών σε επίπεδο είδους και μπορεί να αποσαφηνίσει την κλινική τους σημασία. Τα λάθη στην ταυτοποίηση ανεπαρκώς χαρακτηρισμένων στελεχών, σπάνια απομονωμένων στελεχών ή στελεχών που αποκλίνουν φαινοτυπικά/βιοχημικά, είναι πιθανώς αρκετά συνηθισμένα σε ένα κλινικό εργαστήριο. Ακόμη και σε μεγάλα ερευνητικά εργαστήρια και εργαστήρια αναφοράς, τα οποία διαθέτουν περισσότερο χρόνο και φαινοτυπικά τεστ για την ταυτοποίηση των βακτηρίων, τα πιο ασυνήθιστα βακτήρια συχνά δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν. Η ανάλυση της αλληλουχίας του *16s rRNA* γονιδίου παρέχει ταχύτερα και πιο αξιόπιστα αποτελέσματα σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους ταυτοποίησης (Clarridge J.E. 2004, Asghari F.B. και συνεργάτες 2013). Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η μελέτη του γονιδίου με την εφαρμογή της PCR ανέδειξε πολλές περιπτώσεις λανθασμένης ταυτοποίησης του βακτηρίου από εμπορικά τεστ και άλλες φαινοτυπικές μεθόδους (Clarridge J.E. 2004, Spilker T. και συνεργάτες 2004). Παρ' αυτά, επειδή η φαινοτυπική ταυτοποίηση εξακολουθεί να είναι εξαιρετικά σημαντική για τους κλινικούς μικροβιολόγους, οι φαινοτυπικές εξετάσεις πρέπει να συνδέονται με τις μοριακές μεθόδους αλληλούχησης που εξάγουν αναπαραγώγιμα και πιο ακριβή αποτελέσματα (Clarridge J.E. 2004).

Προβλήματα, όπως η ύπαρξη κολοβωμένων γονιδίων *16s rRNA* [ελλατωματικά αντίγραφα ολόκληρης της αλληλουχίας του γονιδίου ή τμημάτων αυτού, στα οποία

απουσιάζουν τα 3' ή 5' άκρα (Strachan T. & Read A.P. 2004)] ή ασυνήθιστης ποικιλομορφίας μεταξύ παράλογων γονιδίων *16s rRNA* [ομόλογα γονίδια ενός και του αυτού είδους τα οποία έχουν παρόμοιες λειτουργίες και προκύπτουν από φαινόμενα γονιδιακού διπλασιασμού (Koonin E.V. 2005)] σε διάφορα είδη βακτηρίων μπορεί να θέσουν περιορισμούς στη χρήση του γονιδίου σε μελέτες (Ntushelo K. 2013). Η ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου *16s rRNA* έχει συνδυαστεί με διάφορες πειραματικές προσεγγίσεις, όπως την παραδοσιακή 16s-cloning-and-sequencing μέθοδο και τις τεχνικές: terminal restriction fragment length polymorphisms (t-RFLP), single-stranded conformation polymorphism (SSCP), amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) και denaturing ή temperature gradient gel electrophoresis (DGGE, TGGE). Αυτές οι τεχνικές χρησιμοποιούνται μέχρι και σήμερα και παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες στην ταξινόμηση των βακτηρίων (Rajendhran J. & Gunasekaran P. 2011, Ntushelo K. 2013). Η αλληλούχιση του *16s rRNA* γονιδίου συνέβαλε όχι μόνο στην απάντηση σε ορισμένα από τα πιο θεμελιώδη ερωτήματα της βιολογίας, αλλά τα τελευταία χρόνια η τεχνολογία αυτή έχει εισέλθει πέρα από το πεδίο της έρευνας και στον χώρο των κλινικών εφαρμογών. Όσον αφορά τη διαχείριση των ασθενών, η ακριβής ταυτοποίηση των κλινικών στελεχών, ιδιαίτερα των «μη ταυτοποιημένων βακτηρίων», των σπάνιων βακτηρίων, των βραδέως αναπτυσσόμενων βακτηρίων και των μη καλλιεργούμενων βακτηρίων, βοήθησε τους κλινικούς ιατρούς στην επιλογή των κατάλληλων αντιβιοτικών και στον καθορισμό της διάρκειας της θεραπείας. Η ακριβής ταυτοποίηση έχει συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση και μελέτη της επιδημιολογίας των κλινικών συνδρόμων και ως εκ τούτου, έχει βελτιώσει τις εμπειρικές θεραπείες (Woo P.C.Y. και συνεργάτες 2008).

Η αλληλούχιση του *16s rRNA* γονιδίου έχει κύρια εφαρμογή σε φυλογενετικές μελέτες και η μεγάλη ποσότητα δεδομένων που έχει συγκεντρωθεί, παρέχει λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ διαφόρων οργανισμών (Gupta R.S. 2016). Το 1985 εφαρμόστηκε η πρώτη φυλογενετική ανάλυση που βασίστηκε στη μελέτη της αλληλουχίας του *16s rRNA* γονιδίου (Yang B. και συνεργάτες 2016) και από τότε έχουν σημειωθεί πολυάριθμες φυλογενετικές μελέτες σε βακτήρια από διάφορες απομονώσεις (Chun J. & Goodfellow M. 1995, Anzai Y. και συνεργάτες 2000, Nakayama A. και συνεργάτες 2005, Gong J. και συνεργάτες 2007, Kalita M. και συνεργάτες 2017). Η σύγκριση των αλληλουχιών των *16s rRNA* γονιδίων επιτρέπει την διαφοροποίηση

μεταξύ οργανισμών σε επίπεδο γένους που ανήκουν σε όλα τα κύρια φύλα των βακτηρίων, καθώς και την ταξινόμηση στελεχών σε πολλαπλά φυλογενετικά επίπεδα, όπως για παράδειγμα σε είδη και υποείδη. Με την αλληλούχιση του γονιδίου, από το 2001 έως το 2007 ανακαλύφθηκαν 215 νέα είδη βακτηρίων, 29 εκ των οποίων ανήκουν σε διαφορετικά γένη. Υπάρχουν πολλές βάσεις δεδομένων αλληλουχιών (π.χ. NCBI, RDP, SILVA, GreenGenes, StrainInfo, CRW κ.α.) οι οποίες περιέχουν επί του παρόντος πάνω από ένα εκατομμύριο πλήρους μήκους αλληλουχίες του γονιδίου *16s rRNA*, που αντιπροσωπεύουν ένα ευρύ φυλογενετικό φάσμα, χρήσιμο για την ταξινόμηση βακτηρίων από διάφορες απομονώσεις (Clarridge J.E. 2004, Woo P.C.Y. και συνεργάτες 2008, Ntushelo K. 2013).

Το *16s rRNA* αποτελεί με διαφορά τον πιο κοινό συντηρημένο γενετικό δείκτη που χρησιμοποιείται σε μελέτες φυλογένεσης και ταξινόμησης βακτηρίων για πολλούς λόγους: i) Η αλληλουχία βρίσκεται σε όλα τα βακτήρια, συχνά σε μορφή οικογένειας γονιδίων (multigene family), ή οπερονίων, ii) Η λειτουργία του γονιδίου έχει παραμείνει σταθερή με το πέρασμα του χρόνου, συνεπώς οι τυχαίες αλλαγές στην αλληλουχία αποτελούν ένα πιο ακριβές μέτρο του χρόνου και της εξέλιξης, iii) Το μέγεθος του γονιδίου (1500 bp) είναι αρκετά μεγάλο για πληροφορικές αναλύσεις (Janda J.M. και συνεργάτες 2007). Ο αριθμός των rRNA οπερονίων ποικίλει μεταξύ των βακτηρίων που ανήκουν στο γένος *Pseudomonas*: Στο βακτήριο *P. putida* (στέλεχος KT2440) υπάρχουν 7 αντίγραφα ενώ το *P. aeruginosa* (στέλεχος PAO1) διαθέτει 4 αντίγραφα του γονιδίου *16s rRNA* (Bodilis J. και συνεργάτες 2012). Οι αλλαγές που σημειώνονται στην αλληλουχία του γονιδίου αναδεικνύουν την εξελικτική απόσταση και τη συγγένεια των οργανισμών. Ο ρυθμός αλλαγής του γονιδίου *16s rRNA* είναι δύσκολο να υπολογιστεί καθώς μπορεί να ποικίλει μεταξύ οργανισμών που ανήκουν σε διαφορετικές ταξινομικές ομάδες, αλλά και να εξαρτάται από την θέση της αλλαγής κατά μήκος της αλληλουχίας του γονιδίου. Υπάρχουν περιοχές "hot spots" που παρουσιάζουν υψηλότερο αριθμό μεταλλάξεων και δεν είναι οι ίδιες για όλα τα είδη. Επιπλέον, το *16s rRNA* αποτελεί στόχο για διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες και ως εκ τούτου, μεταλλάξεις στο γονίδιο μπορούν να επηρεάσουν την ευαισθησία του οργανισμού σε αυτούς τους παράγοντες. Ωστόσο, αυτά τα χαρακτηριστικά δεν αποκλείουν ούτε επηρεάζουν τη χρήση της αλληλουχίας του γονιδίου για την ταξινόμηση και φυλογενετική ανάλυση των βακτηρίων (Clarridge J.E. και συνεργάτες 2004).

Στα βακτήρια, ολόκληρη η αλληλουχία του *16s rRNA* γονιδίου αποτελείται από εννέα "υπερμεταβλητές περιοχές" (V1-V9), οι οποίες πλαισιώνονται από 9 συντηρημένες περιοχές. Λόγω των περιορισμών που θέτει η τεχνολογία αλληλούχισης, οι περισσότερες μελέτες εστιάζουν σε τμήματα της αλληλουχίας του γονιδίου (Yang B. και συνεργάτες 2016). Συνήθως χρησιμοποιούνται γενικοί εκκινητές (Universal primers) συμπληρωματικοί προς τα συντηρημένα τμήματα του γονιδίου και οι μεταβλητές αλληλουχίες μεταξύ των συντηρημένων περιοχών χρησιμοποιούνται για τη συγκριτική ταξινόμηση. Οι υπερμεταβλητές περιοχές παρουσιάζουν σημαντική ποικιλομορφία μεταξύ διαφορετικών ειδών βακτηρίων και συνεπώς, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταξινόμηση σε επίπεδο είδους. Μελέτες έχουν δείξει πως διαφορετικές μεταβλητές περιοχές έχουν διαφορετική ετερογένεια, διακριτική ικανότητα και ευαισθησία σε σχέση με άλλες περιοχές που τις καθιστά πιο αξιόπιστες για την φυλογενετική ανάλυση των βακτηρίων (Clarridge J.E. 2004, Chakravorty S. και συνεργάτες 2007, Yang B. και συνεργάτες 2016). Είναι σημαντικό να εντοπιστούν περιοχές του γονιδίου που παρέχουν τον μεγαλύτερο όγκο πληροφοριών χρήσιμων για την μελέτη και ταξινόμηση των βακτηρίων. Συγκεκριμένα για το βακτήριο *P. aeruginosa*, έχουν αναγνωριστεί ειδικές αλληλουχίες (signature sequences) στο *16s rRNA* γονίδιο, που μαρτυρούν το γένος και το είδος του βακτηρίου και με βάση αυτές τις αλληλουχίες, έχουν σχεδιαστεί απλές, γρήγορες και ακριβείς μέθοδοι PCR, οι οποίες επιτρέπουν τη διαφοροποίηση του *P. aeruginosa* από άλλα είδη *Pseudomonas* (Spilker T. και συνεργάτες 2004). Η χρήση ειδικών εκκινητών για το γένος και το είδος (που στοχεύουν τις V2 και V8 υπερμεταβλητές περιοχές) του βακτηρίου *P. aeruginosa*, έχει σημειώσει 100% ευαισθησία και ακρίβεια αλλά και είναι ικανή να διαφοροποιήσει τα υπό μελέτη στελέχη από άλλα φυλογενετικά στενά σχετιζόμενα είδη *Pseudomonas* (Spilker T. και συνεργάτες 2004, Fothergill J. L. και συνεργάτες 2008).

Αν και η αλληλούχιση του *16s rRNA* γονιδίου χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο στα κλινικά εργαστήρια μικροβιολογίας, δεν υπάρχουν ευρέως αποδεκτές οδηγίες για τη χρήση της τεχνικής ή για την ερμηνεία των δεδομένων αλληλούχισης. Ένα από τα μεγαλύτερα εμπόδια στην χρήση της τεχνολογίας αλληλούχισης του γονιδίου σε επίπεδο ρουτίνας στα κλινικά εργαστήρια μικροβιολογίας είναι η αυτοματοποίηση της τεχνολογίας. Επί του παρόντος, είναι αδύνατη η πλήρης αυτοματοποίηση της



αλληλούχισης του γονιδίου, δηλ. η εισαγωγή του βακτηριακού στελέχους/κλινικού δείγματος/εκχυλισμένου DNA, σε μια μηχανή που θα εξάγει ως αποτέλεσμα την ταυτότητα του στελέχους. Με την εμφάνιση των πρωτοποριακών τεχνολογιών υψηλής απόδοσης [Illumina, Roche (454), Applied Biosystems (SOLiD) και Life Technologies (Ion torrent)], αυτά τα βήματα μπορούν να ενσωματωθούν σε ένα ρομποτικό σύστημα, καθιστώντας δυνατή μελλοντικά την πλήρη αυτοματοποίηση της αλληλούχισης του *16s rRNA* γονιδίου (Woo P.C.Y. και συνεργάτες 2008, Ntushelo K. 2013).

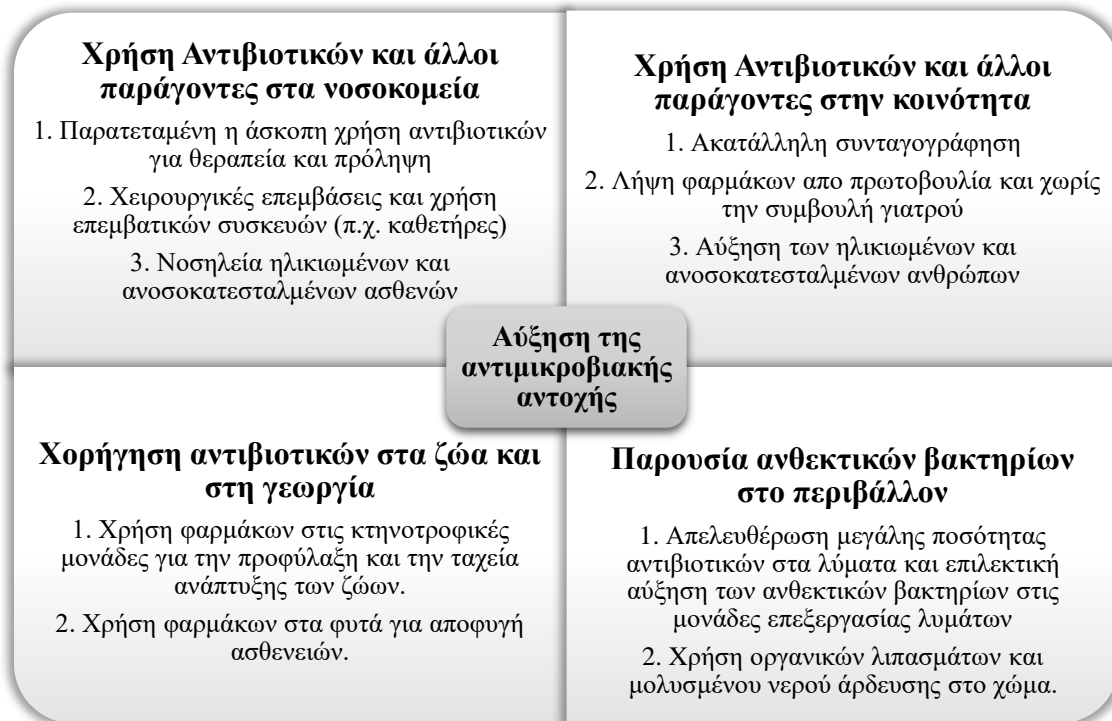
#### **1.4 Ανάπτυξη αντιμικροβιακής αντοχής στις εγκαταστάσεις υγειονομικής περίθαλψης**

Η αντιμικροβιακή αντοχή έχει αναδειχθεί ως ένα από τα κύρια προβλήματα της δημόσιας υγείας του 21<sup>ου</sup> αιώνα και καθιστά δύσκολη την αποτελεσματική πρόληψη και θεραπεία μιας συνεχώς αυξανόμενης σειράς λοιμώξεων που προκαλούνται από βακτήρια, παράσιτα, ιούς και μύκητες, τα οποία δεν είναι πλέον ευαίσθητα στα κοινά φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία τους. Το πρόβλημα της αντιμικροβιακής αντοχής είναι ιδιαίτερα μεγάλο όσον αφορά τα βακτήρια. Επί αρκετές δεκαετίες, τα βακτήρια που προκαλούν κοινές ή σοβαρές λοιμώξεις έχουν αναπτύξει αντοχή σε κάθε νέο αντιβιοτικό που έρχεται στην αγορά. Υπό αυτές τις συνθήκες, είναι επιτακτική η άμεση δράση για την αποτροπή αυτής της αναπτυσσόμενης παγκόσμιας κρίσης που αφορά τον τομέα της υγειονομικής περίθαλψης (Prestinaci F. και συνεργάτες 2015).

Η σύγχρονη εποχή των αντιβιοτικών ξεκίνησε με την ανακάλυψη της πενικιλίνης από τον Alexander Fleming το 1928. Από τότε, τα αντιβιοτικά μεταμόρφωσαν τη σύγχρονη ιατρική και έσωσαν εκατομμύρια ζωές. Όμως λίγο αργότερα, η αντοχή στην πενικιλίνη προκάλεσε σημαντικό κλινικό πρόβλημα. Ακολούθησε η ανακάλυψη και η ανάπτυξη νέων φαρμάκων (π.χ. τα β-λακταμικά), όμως με το πέρασμα του χρόνου, εμφανιζόταν αντοχή για σχεδόν όλα τα αντιβιοτικά. Από τα τέλη της δεκαετίας του 1960 μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 1980, η φαρμακευτική βιομηχανία εισήγαγε πολλά νέα αντιβιοτικά για να λύσει το πρόβλημα της αντιμικροβιακής αντοχής, αλλά στη συνέχεια το νούμερο των νέων φαρμάκων που εισάγονταν στην αγορά άρχισε να μειώνεται σταδιακά. Η πίεση της επιλογής που προκάλεσε η χρήση γιγαντιαίων ποσοτήτων

αντιβιοτικών τα τελευταία 75 χρόνια έχει κάνει σχεδόν όλα τα βακτήρια που προκαλούν ασθένειες, ανθεκτικά στα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία τους (Laxminarayan R. και συνεργάτες 2013, Ventola C.L. 2015). Ως αποτέλεσμα, το έτος 2017 οι βακτηριακές λοιμώξεις να αποτελούν και πάλι παγκόσμια απειλή (Fiore M. και συνεργάτες 2017, Karoor G. και συνεργάτες 2017).

Η αντοχή στα αντιβιοτικά είναι ένα φυσικό φαινόμενο που συμβαίνει όταν οι μικροοργανισμοί εκτίθενται σε αντιβιοτικά φάρμακα. Το φαινόμενο της φυσικής επιλογής αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα για την επιλογή και την εξάπλωση των ανθεκτικών βακτηρίων, όταν τα αντιβιοτικά εντοπίζονται πάνω από μια ορισμένη συγκέντρωση. Κάτω από την επιλεκτική πίεση των αντιβιοτικών, τα ευαίσθητα βακτήρια θανατώνονται ή αναστέλλονται, ενώ τα βακτήρια που είναι ανθεκτικά από την φύση τους (εγγενώς) ή που έχουν αποκτήσει μηχανισμούς αντοχής στα αντιβιοτικά, διαθέτουν μεγαλύτερη πιθανότητα επιβίωσης και πολλαπλασιασμού. Η υπερβολική χρήση αλλά και η ακατάλληλη χρήση αντιβιοτικών (επιλογή λάθος φαρμάκου, ανεπαρκής δοσολογία, έκθεση των βακτηρίων σε υποθεραπευτική αντιμικροβιακή συγκέντρωση κ.α.) συμβάλλουν στην ανάπτυξη αντοχής στις αντιμικροβιακές ουσίες. Η **Εικόνα 1.4.1** δείχνει μια σχηματική αναπαράσταση των παραγόντων που εμπλέκονται στην εμφάνιση και την εξάπλωση της αντοχής στα αντιβιοτικά. Στο περιβάλλον του νοσοκομείου, η συνεχής και παρατεταμένη χρήση φαρμάκων αποτελεί τη κύρια αιτία για την εμφάνιση και την εξάπλωση των εξαιρετικά ανθεκτικών στα αντιβιοτικά, νοσοκομειακών λοιμώξεων. Το πρόβλημα μάλιστα μεγεθύνεται στην περίπτωση ανοσοκατεσταλμένων ασθενών (π.χ. ασθενείς με AIDS, καρκινοπαθείς), ηλικιωμένων ασθενών, χειρουργικών επεμβάσεων, μακρόχρονης διαμονής σε ιδρύματα υγειονομικής περίθαλψης κ.α. Η πνευμονία, η οποία θεραπευόταν εύκολα με την εμφάνιση της πενικιλίνης, πλέον απαιτεί, όλο και πιο συχνά, εναλλακτικά θεραπευτικά σχήματα (second- or third-line antibiotics). Η κυστίτιδα, η οποία θεραπευόταν εύκολα με τη χορήγηση φαρμάκων από το στόμα, χρειάζεται πλέον πάντα πιο σύνθετες αντιβιοτικές θεραπείες, που επιβάλλουν πρόσθετο κόστος στους ασθενείς και στο σύστημα υγείας (Prestinaci F. και συνεργάτες 2015).



**Εικόνα 1.4.1:** Σχηματική αναπαράσταση των παραγόντων που συμβάλλουν στην εμφάνιση και την εξάπλωση της αντιμικροβιακής αντοχής (Εικόνα τροποποιημένη από Prestinaci F. και συνεργάτες 2015).

Υπάρχουν πολλά είδη παθογόνων ανθεκτικών βακτηρίων που ευδοκιμούν σε διαφορετικά περιβάλλοντα, όπως το *S. aureus* που συναντάται συχνά στο νοσοκομείο και στην κοινότητα, το *non-typhoidal Salmonella* (NTS), κύρια αιτία ασθενειών από τρόφιμα και το *Klebsiella pneumoniae*, το οποίο προκαλεί λοιμώξεις που σχετίζονται με την υγειονομική περίθαλψη (healthcare-associated infections, HAI) (Prestinaci F. και συνεργάτες 2015). Στο περιβάλλον του νοσοκομείου, αλλά και γενικά στους χώρους υγειονομικής περίθαλψης, η εξάπλωση ενός ανθεκτικού κλώνου μπορεί να είναι γρήγορη και να έχει σοβαρές κλινικές συνέπειες για τους ευάλωτους ασθενείς. Την τελευταία δεκαετία, έχει σημειωθεί αύξηση της αντοχής στις καρβαπενέμες μεταξύ των κοινών *Enterobacteriaceae*. Η σηψαιμία που προκαλούν τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες εντεροβακτήρια και πανανθεκτικά στελέχη όπως τα *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* κ.α. είναι πλέον αδύνατο να θεραπευτεί. Το 50-60% των παθογόνων αρνητικών κατά Gram βακτηρίων της κοινότητας (όπως το *E. coli*) που σχετίζεται με λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, έχουν αναπτύξει αντοχές στα

κοινά αντιβιοτικά (π.χ. Amoxicillin, cefixime και ciprofloxacin). Αυτά είναι μερικά παραδείγματα που αποδεικνύουν το πόσο δύσκολη έχει γίνει σήμερα η επιλογή της κατάλληλης θεραπείας για σοβαρές ασθένειες, λόγω της συνεχώς αυξανόμενης εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών (Laxminarayan R. και συνεργάτες 2013, Ventola C.L. 2015). Από τα θετικά κατά Gram παθογόνα, την μεγαλύτερη απειλή αποτελεί η παγκόσμια πανδημία των ανθεκτικών ειδών *Enterococcus* και *S. aureus* (με ποιο σημαντικό το *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, *MRSA*). Όμως, τα αρνητικά κατά Gram παθογόνα βακτήρια θεωρούνται πλέον πιο ανησυχητικά, επειδή έχουν αναπτύξει αντοχή σε σχεδόν όλα τα διαθέσιμα αντιβιοτικά, ενώ τα προβλήματα που δημιουργούν στον χώρο της υγείας θυμίζουν κατά πολύ την εποχή πριν από την χρήση των αντιβιοτικών. Τα κύρια αρνητικά κατά Gram βακτήρια που εμφανίζονται σε περιβάλλοντα υγειονομικής περίθαλψης είναι τα πολύ- και παν- ανθεκτικά *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter*, και πιο τελευταία το *Neisseria gonorrhoeae*. Αρνητικά κατά Gram πολυανθεκτικά βακτήρια συναντώνται επίσης και στην κοινότητα όπως τα *Escherichia coli* και *Neisseria gonorrhoeae* (Fair R.J. & Tor Y. 2014, Ventola C.L. 2015).

Το φαινόμενο της αντιμικροβιακής αντοχής έχει μεγάλο οικονομικό αντίκτυπο στο σύστημα υγείας, παγκοσμίως. Η αύξηση της αντοχής στα αντιβιοτικά οδηγεί σε αυξημένη οικονομική δαπάνη: Χρήση περισσότερων και συνήθως ακριβότερων φαρμάκων [όταν οι λοιμώξεις καθίστανται ανθεκτικές στα αντιβιοτικά πρώτης γραμμής (First-line drugs), η θεραπεία πρέπει να μεταπηδήσει σε φάρμακα δεύτερης ή τρίτης γραμμής (second- and third-line drugs), τα οποία είναι σχεδόν πάντοτε ακριβότερα], εξειδικευμένου εξοπλισμού, μακροχρόνια νοσηλεία ασθενών κ.α. Στην Ευρώπη, το συνολικό οικονομικό βάρος που προκαλεί η αντιμικροβιακή αντοχή εκτιμάται ότι είναι τουλάχιστον 1,5 δισεκατομμύρια ευρώ, εκ των οποίων πάνω από 900 εκατομμύρια ευρώ αντιστοιχούν στο κόστος των νοσοκομείων (Prestinaci F. και συνεργάτες 2015).

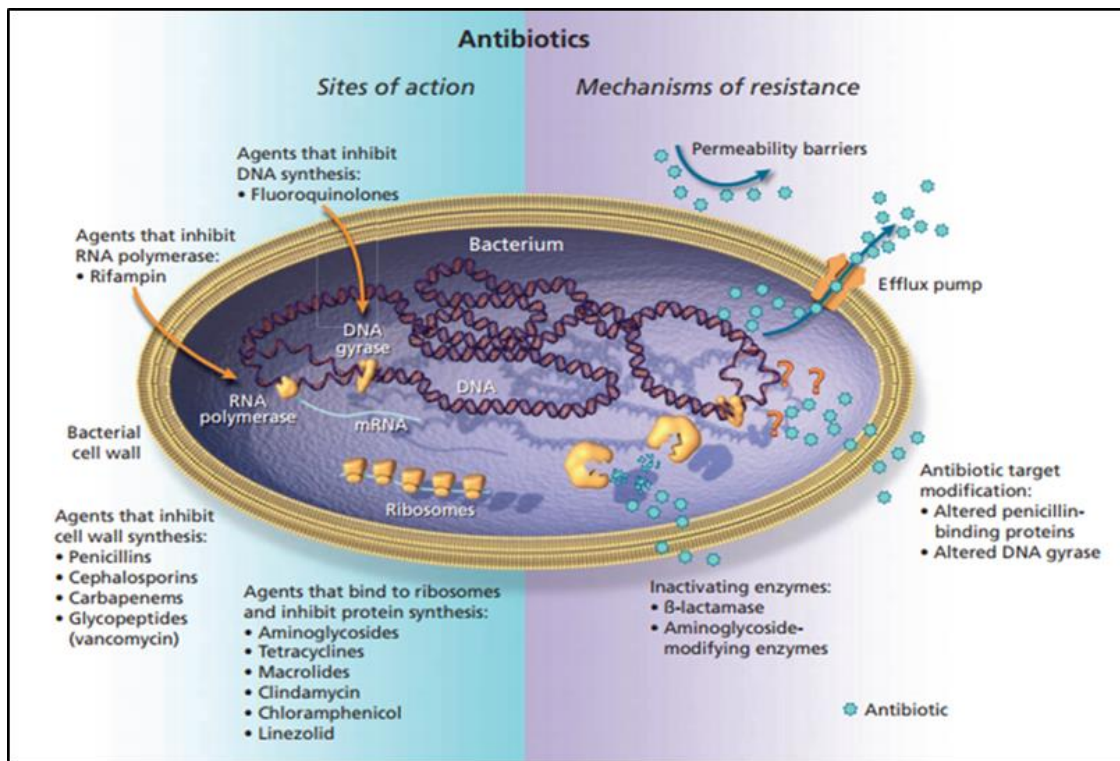
Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization, WHO) έχει αναφέρει την έλλειψη επαρκούς ελέγχου και συστημάτων επιτήρησης της μικροβιακής αντοχής σε πολλά μέρη του κόσμου, καθώς και την ύπαρξη μεγάλων κενών στις γνώσεις που υπάρχουν για τους μικροοργανισμούς μείζονος σημασίας για τη δημόσια υγεία. Συνεπώς, η παγκόσμια ενίσχυση και εναρμόνιση των μέτρων ελέγχου της αντιμικροβιακής

αντοχής είναι υψίστης σημασίας. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τον καλύτερο συντονισμό των συστημάτων επιτήρησης σε όλον το κόσμο, καθώς και με την ανάπτυξη και υιοθέτηση κοινών πειραματικών μεθόδων και ορισμών προκειμένου να γίνει πιο εύκολη η ανταλλαγή και σύγκριση πληροφοριών. Επιπλέον, χρειάζονται καινοτόμες προσεγγίσεις για την ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών και άλλων ουσιών προκειμένου να καταπολεμηθεί το πρόβλημα της αντιμικροβιακής αντοχής. Επί του παρόντος, υπάρχει μεγάλη έλλειψη στην παραγωγή νέων αντιβιοτικών, ενώ η βιομηχανία δεν έχει ισχυρά κίνητρα για να επενδύσει στην έρευνα και την ανάπτυξη αυτού του τομέα. Τα τελευταία 30 χρόνια, μόνο δύο νέες κατηγορίες αντιβιοτικών κυκλοφορούν στο εμπόριο (οι οξαζολιδινόνες και τα κυκλικά λιποπεπίδια), τα οποία στοχεύουν μόνο τα θετικά κατά Gram παθογόνα βακτήρια. Αντίστοιχα, υπάρχουν πολύ λίγα αποτελεσματικά φάρμακα για τη θεραπεία λοιμώξεων από τα αρνητικά κατά Gram πολυανθεκτικά βακτήρια, τα οποία αντιπροσωπεύουν σήμερα τη μεγαλύτερη απειλή για την δημόσια υγεία. Η εισαγωγή νέων εμβολίων αλλά και η χρήση εναλλακτικών τρόπων θεραπείας (π.χ. θεραπεία με βακτηριοφάγους κ.α.) μπορεί να μειώσει σημαντικά τις μολυσματικές ασθένειες και κατ' επέκταση, την ανάγκη για αντιβιοτικά (Prestinaci F. και συνεργάτες 2015).

## 1.5 Μηχανισμοί αντοχής στο βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa*

Το ευκαιριακά παθογόνο βακτήριο *P. aeruginosa*, αποτελεί σημαντική αιτία πολλαπλών μολύνσεων και φέρει το υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας από όλα τα αρνητικά κατά Gram παθογόνα (Igbnosa E.O. και συνεργάτες 2012). Το *P. aeruginosa* διαθέτει τους βασικούς μηχανισμούς αντοχής ενός αρνητικού κατά Gram μικροοργανισμού, που αποδίδονται σχηματικά στην **Εικόνα 1.5.1**, οι κυριότεροι των οποίων είναι η παραγωγή ενζύμων που υδρολύουν ή τροποποιούν το αντιβιοτικό (π.χ. β-λακταμάσες), οι μεταλλαγές στις θέσεις-στόχους του αντιβιοτικού, η ελαττωμένη πρόσληψη του αντιβιοτικού και η ενεργός απέκκριση του αντιβιοτικού από το κύτταρο. Το βακτήριο θεωρείται μέχρι και σήμερα μια σοβαρή πρόκληση για τη θεραπεία των λοιμώξεων τόσο της κοινότητας όσο και των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων και η επιλογή του κατάλληλου αντιβιοτικού είναι πολύ σημαντική για την επιτυχή θεραπεία της ασθένειας. Δυστυχώς, η επιλογή του καταλληλότερου αντιβιοτικού περιπλέκεται από την

ικανότητα του *P. aeruginosa* να αναπτύσσει αντίσταση σε πολλαπλές κατηγορίες αντιβακτηριακών παραγόντων, ακόμη και κατά τη διάρκεια της θεραπείας μίας λοίμωξης. Το βακτήριο εκτός από την εγγενή αντιμικροβιακή αντοχή του λόγω της χαμηλής διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης (Loss of *oprD*), της χρωμοσωμικής κεφαλοσπορινάσης *AmpC*, καθώς και ένα εκτεταμένο σύστημα αντλιών εκροής (efflux pumps), κατέχει εξέχουσα θέση στην ανάπτυξη επίκτητων μηχανισμών αντοχής. Οι ποικίλοι μηχανισμοί του βακτηρίου του δίνουν την ικανότητα να εμφανίζει αντοχή σε μεγάλο αριθμό αντιβιοτικών (**Πίνακας 1.5.1**) (Bonomo R.A. & Szabo D. 2006, Strateva T. & Yordanov D. 2009).



**Εικόνα 1.5.1:** Αντιβιοτικά, οι θέσεις δράσης τους και οι μηχανισμοί αντοχής του βακτηρίου (Mulvey M.R. & Simor A.E. 2009).

**Πίνακας 1.5.1:** Οι σημαντικότεροι μηχανισμοί αντοχής του *P. aeruginosa* στις μεγάλες κατηγορίες αντιβιοτικών (Hancock R.E. & Speert D.P. 2000).

ΤΑΞΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟΥ	ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΤΟΧΗΣ
Πενικιλίνη	Τικαρσιλλίνη, Πιπερακιλλίνη	Καταστολή της χρωμοσωμικής κεφαλοσπορινάσης AmpC/ Υπερπαραγωγή της MexAB-OprM αντλίας/ Πλασμιδιακή β-λακταμάση
Κεφαλοσπορίνη	Κεφαζιδίμη, Κεφεπίμη	Καταστολή της χρωμοσωμικής κεφαλοσπορινάσης AmpC/ Υπερπαραγωγή της MexAB-OprM και MexCD-OprJ αντλίας
Αμινογλυκοσίδη	Γενταμυκίνη, Αμικασίνη, Τομπραμυκίνη	Υπερπαραγωγή της MexXY αντλίας/ Πλασμιδιακή β-λακταμάση
Κινολόνη	Σiproφλοξασίνη	Σημειική μεταλλαγή στην GyrA τοποίσομεράση/ Υπερπαραγωγή πολλών αντλιών λόγω μεταλλαγών στα NalB, NfxB, NfxC
Πολυμυξίνη	Κολιστίνη	Αλλαγές στη εξωτερική λιπο-πολυσακχαριδική μεμβράνη (LPS)
Καρβαπενέμη	Ιμιπενέμη, μεροπενέμη	Απώλεια ή Μείωση της παραγωγής της εξωτερικής πορίνης oprD λόγω μεταλλαγής στο NfxC, το οποίο ενεργοποιεί και την υπερπαραγωγή αντλιών εκροής (MexEF-OprN, MexAB-OprM)

Η εμφάνιση πολυανθεκτικών στελεχών *P. aeruginosa*, δηλαδή στελεχών ανθεκτικών σε πολλά αντιβιοτικά [Multi Drug Resistant (MDR) isolates], αυξάνεται συνεχώς από το 2000 και πλέον αποτελούν ένα από τα κυριότερα προβλήματα της δημόσιας υγείας τόσο στην Ελλάδα, όσο και στον υπόλοιπο κόσμο. Ο πολυανθεκτικός φαινότυπος του βακτηρίου μπορεί να προκύψει από: 1. απόκτηση γονιδίων ανθεκτικότητας που φέρουν κινητά γενετικά στοιχεία (όπως τα πλασμίδια), 2. συνδυασμό επίκτητων και εγγενών μηχανισμών αντοχής, 3. συσσώρευση πολλαπλών χρωμοσωμικών αλλαγών με την πάροδο του χρόνου 4. μία μετάλλαξη που προκαλεί υπερέκφραση ενός μηχανισμού αντοχής σε πολλές αντιμικροβιακές ουσίες π.χ. μιας αντλίας εκροής (Lister P.D. και συνεργάτες 2009). Προηγούμενες μελέτες που ασχολούνται με κλινικά στελέχη *P. aeruginosa* αναφέρουν ότι ο συνδυασμός δύο εγγενών μηχανισμών αντοχής, η μειωμένη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης (Loss of oprD) με την αύξηση του συστήματος αντλίας εκροής (efflux pumps), ένας μηχανισμός που προσδίδει διασταυρούμενη αντοχή

σε πολλές κατηγορίες αντιβιοτικών, μπορεί να οδηγήσει επίσης στη δημιουργία πολυανθεκτικών στελεχών του βακτηρίου (Livermore D.M. 2002, Ikonomidis A. και συνεργάτες 2008, Lee J.Y. και συνεργάτες 2012).

### 1.5.1 Εγγενείς μηχανισμοί αντοχής

Το βακτήριο *P. aeruginosa* έχει φυσική αντοχή σε πολλά αντιβιοτικά συμπεριλαμβανομένων πολλών β-λακταμών (β-lactams), στις μακρολίδες (macrolides), στις τετρακυκλίνες (tetracyclines), στη συν-τριμοξαζόλη (co-trimoxazole: trimethoprim/sulfamethoxazole) και στις περισσότερες φθοριοκινολόνες (fluoroquinolones). Εν αντιθέσει, το βακτήριο δεν είναι εγγενώς ανθεκτικό στις καρβοξυπενικυλλίνες (τικαρκιλίνη), ουρεΐδοπενικιλίνες (πιπερακιλλίνη), συνδυασμούς β-λακτάμες/αναστολείς β-λακταμάσης (πιπερακιλλίνη/ταζοβακτάμη, τικαρκιλίνη/κλαβουλανικό οξύ), τέταρτης γενιάς και ορισμένες τρίτης γενιάς κεφαλοσπορίνες (κεφεπίμη, κεφταζιδίμη και κεφοπεραζόνη), αμινογλυκοσίδες (γενταμικίνη, τομπραμυκίνη και αμικακίνη), μονοβακτάμες (αζτρεονάμη), μερικές φθοριοκινολόνες (λεβοφλοξασίνη, σιπροφλοξασίνη), καρβαπενέμες (ιμιπενέμη, μεροπενέμη και ερταπενέμη) και πολυμυξίνες (κολιστίνη) (Driscoll J.A. και συνεργάτες 2007, Balasoïu M. και συνεργάτες 2014). Η φυσική αντοχή του βακτηρίου στους αντιμικροβιακούς παράγοντες, αντιπροσωπεύει τον φαινότυπο άγριου τύπου (wild-type phenotype) και κωδικοποιείται από γονίδια που εδράζονται στο χρωμόσωμά του (Balasoïu M. και συνεργάτες 2014). Οι μηχανισμοί εγγενούς αντιμικροβιακής αντοχής του βακτηρίου είναι η χαμηλή διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης (Loss of *oprD*), η χρωμοσωμική κεφαλοσπορινάση *AmpC*, και τα συστήματα αντλιών εκροής (efflux pumps):

- **Χρωμοσωμική κεφαλοσπορινάση *AmpC*:** Οι β-λακτάμες θεωρούνται από τα πιο ασφαλή και αποτελεσματικά αντιβιοτικά και χορηγούνται σε όλο τον κόσμο για την θεραπεία ασθενειών από θετικά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Οι λακταμάσες είναι ένζυμα ικανά να αποικοδομούν τις β-λακτάμες με υδρόλυση και είναι ένας εξέχων μηχανισμός αντοχής, που φέρουν τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Το *P. aeruginosa* διαθέτει τη χρωμοσωμική *AmpC* (ή τάξης III) β-λακταμάση, η έκφραση της οποίας μπορεί να προκληθεί με έκθεση σε μία β-λακτάμη. Τα άγριου τύπου



στελέχη παράγουν μόνο μικρές ποσότητες της AmpC, όμως όταν η παραγωγή του ενζύμου αυξηθεί, προσφέρει αντοχή στις επαγόμενες αντιβακτηριακές β-λακτάμες αλλά και σε άλλες. Δεν είναι όλες οι β-λακτάμες εξίσου καλοί επαγωγείς του ενζύμου AmpC. Επίσης, πολλά αποτελέσματα ερευνών διαφωνούν όσον αφορά τον ρόλο της AmpC στην αντοχή έναντι των καρβαπενέμων. Τα δεδομένα που υπάρχουν μέχρι τώρα υποστηρίζουν ότι το ένζυμο δεν μεταβάλλει σημαντικά την ευαισθησία του βακτηρίου στις καρβαπενέμες, όμως σε συνδυασμό με άλλους μηχανισμούς αντοχής (π.χ. υπερπαραγωγή αντλιών εκροής, μείωση της OprD πορίνης κ.α.) θα μπορούσε να συμβάλλει στην ανάπτυξη αντοχής. Τα βακτήρια *P. aeruginosa* που υπερεκφράζουν την χρωμοσωμική AmpC β-λακταμάση έχουν μεγάλο κλινικό ενδιαφέρον, ενώ η γρήγορη ταυτοποίησή τους στο κλινικό εργαστήριο και η πλήρης κατανόηση του μηχανισμού επαγωγής του ενζύμου είναι απαραίτητα για την θεραπεία τους (Driscoll J.A. και συνεργάτες 2007, Lister P.D. και συνεργάτες 2009).

- **Χαμηλή διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης (Loss of oprD):** Όπως σε όλα τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, το *P. aeruginosa* διαθέτει στην εξωτερική μεμβράνη πρωτεϊνικά κανάλια, που ονομάζονται πορίνες. Οι πορίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην διακίνηση σακχάρων, αμινοξέων, φωσφορικών αλάτων, δισθενών κατιόντων και σιδηροφόρων. Ορισμένα υδρόφιλα αντιβιοτικά, όπως οι λακτάμες, οι αμινογλυκοσίδες, οι τετρακυκλίνες και μερικές φθοριοκινολόνες, έχουν επίσης αποδειχθεί ότι διαπερνούν την εξωτερική μεμβράνη μέσω των πορινών και συνεπώς, η απώλεια συγκεκριμένων πορινών μπορεί να μειώσει την ευαισθησία του *P. aeruginosa* σε συγκεκριμένους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Η πορίνη oprD του βακτηρίου διευκολύνει την διάχυση βασικών αμινοξέων, μικρών πεπτιδίων και των καρβαπενέμων μέσα στο κύτταρο (Driscoll J.A. και συνεργάτες 2007, Lister P.D. και συνεργάτες 2009). Η μειωμένη ή μηδενική έκφραση της oprD αποτελεί τον βασικότερο μηχανισμό αντοχής έναντι των καρβαπενέμων και έχει σημειωθεί τόσο σε κλινικά όσο και σε εργαστηριακά στελέχη *P. aeruginosa* (Driscoll J.A. και συνεργάτες 2007). Μειωμένα επίπεδα έκφρασης του oprD γονιδίου μπορεί να προκύψουν από: (i) μεταλλάξεις στον εκκινητή του oprD γονιδίου (προσθήκες ή διαγραφές στο ανοδικό τμήμα του εκκινητή), (ii) πρόωρο τερματισμό της μεταγραφής, (iii) δράση του σαλικυλικού και (iv) μηχανισμούς κοινής ρύθμισης με την αντλία εκροής πολλαπλών

φαρμάκων, που κωδικοποιείται από το mexEF-oprN. Αν και η σχέση μεταξύ της πορίνης OprD και της ανθεκτικότητας στις καρβαπενέμες έχει αναγνωριστεί εδώ και 3 δεκαετίες, οι πληροφορίες που υπάρχουν για την ρύθμιση του oprD και για τον εκκινητή του γονιδίου είναι περιορισμένες, σε σύγκριση με τις γνώσεις που υπάρχουν για τους μηχανισμούς της AmpC β-λακταμάσης και του συστήματος αντλιών εκροής (Lister P.D. και συνεργάτες 2009).

- **Σύστημα αντλίας εκροής (efflux pumps):** Οι αντιβακτηριακές ουσίες μπορούν να εξαχθούν από το βακτήριο *P. aeruginosa* μέσω των αντλιών εκροής. Οι αντλίες εκροής είναι τριμερείς πρωτεϊνικές δομές που συνδέουν την εσωτερική και εξωτερική μεμβράνη του βακτηρίου καθώς και τον περιπλασματικό χώρο αναμεσά τους (Driscoll J.A. και συνεργάτες 2007). Οι αντλίες εκροής κατηγοριοποιούνται σε 5 υπερ-οικογένειες με βάση την σύστασή τους από αμινοξέα, την πηγή ενέργειας που χρησιμοποιούν για την εξαγωγή των ουσιών και τις ιδιαιτερότητες των υποστρωμάτων τους (Lister P.D. και συνεργάτες 2009). Η αλληλούχηση του γονιδιώματος του βακτηρίου έχει αποκαλύψει την ύπαρξη συστημάτων εκροής και από τις 5 υπερ-οικογένειες. Στο *P. aeruginosa* τέσσερις αντλίες εκροής πολλαπλών αντιβιοτικών (multidrug efflux pumps) έχουν χαρακτηριστεί καλά (MexA-MexB-OprM, MexC-MexD-OprJ, MexE-MexF-OprN και MexX-MexY-OprM) και στο γονιδιώμα του εδράζονται τουλάχιστον 10 διαφορετικά οπερόνια συστημάτων αντλιών εκροής. Η υπερέκφραση μιας αντλίας εκροής πολλαπλών φαρμάκων αυξάνει τη μέση ανασταλτική συγκέντρωση (mean inhibitory concentration, MIC) οποιουδήποτε φαρμάκου ευαίσθητου σε αυτή. Επίσης, κάθε αντλία έχει τη δυνατότητα να χειρίζεται πολλά αντιβακτηριακά φάρμακα (Driscoll J.A. και συνεργάτες 2007).

### 1.5.2 Επίκτητοι μηχανισμοί ανοχής

Η επίκτητη ανοχή του βακτηρίου στους αντιμικροβιακούς παράγοντες, είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων ή απόκτησης νέων μηχανισμών ανοχής μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων, η οποία μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια της θεραπείας του ατόμου. Στην περίπτωση των μεταλλάξεων, οι αλλαγές που προκαλούν μπορεί να οδηγήσουν στην υπερέκφραση ενδογενών β-λακταμάσεων ή αντλιών εκροής, στη

μειωμένη έκφραση κάποιων πορινών και σε τροποποιήσεις στις θέσεις στόχου του αντιβιοτικού. Η μεταφορά γονιδίων αντοχής αφορά κυρίως αυτά που κωδικοποιούν τις β-λακταμάσες και τα ένζυμα τροποποίησης των αμινογλυκοσίδων (aminoglycoside modifying enzymes, AMEs). Οι επίκτητοι μηχανισμοί αντοχής χωρίζονται σε 2 κατηγορίες: τους ενζυμικούς μηχανισμούς [πενικιλινάσες, κεφαλοσπορινάσες, ευρέου φάσματος β-λακταμάσες (extended-spectrum beta lactamases, ESBL), μεταλλο-β-λακταμάσες] και τους μη-ενζυμικούς μηχανισμούς [υπερέκφραση αντλιών εκροής, μείωση της διαπερατότητας της μεμβράνης (Loss of oprD), τροποποίηση του στόχου του αντιμικροβιακού παράγοντα] (Meletis G. & Bagkeri M. 2013, Balasoïu M. και συνεργάτες 2014).

- **Ενζυμικοί μηχανισμοί αντοχής:**

Αφορούν την παραγωγή β-λακταμάσης και αντιπροσωπεύουν τον κύριο μηχανισμό αντοχής στις β-λακτάμες. Αυτά τα ένζυμα ομαδοποιούνται σε τέσσερις κατηγορίες (σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά Ambler), ανάλογα με την αλληλουχία των αμινοξέων τους. Οι σημαντικότερες β-λακταμάσες είναι οι καρβαπενεμάσες, οι πενικιλινάσες, οι ευρέου φάσματος β-λακταμάσες (ESBLs) και η ενδογενής κεφαλοσπορινάση AmpC (Balasoïu M. και συνεργάτες 2014).

1. Καρβαπενεμάσες: Η εμφάνιση των καρβαπενεμασών οφείλετε στην υπερβολική χρήση καρβαπενεμών (εξαιτίας της εξάπλωσης των ESBL). Από τις 4 τάξεις καρβαπενεμασών, οι καρβαπενεμάσες κατηγορίας B, που φέρουν  $Zn^{2+}$  στο ενεργό κέντρο τους, είναι παγκόσμια οι πιο συχνά εμφανιζόμενες στο βακτήριο *P. aeruginosa* και ονομάζονται μέταλλο-β-λακταμάσες (Metallo-β-lactamases, MBLs). Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις MBLs εμφανίζονται συνήθως ως γονιδιακές κασέτες σε ιντεγκρόνια και μπορούν να μεταβιβαστούν από στέλεχος σε στέλεχος. Υπάρχει πιθανότητα το ιντεγκρόνιο να φέρει και άλλα γονίδια ανθεκτικότητας για πολλές κατηγορίες αντιβιοτικών, συνεισφέροντας έτσι στην ανάπτυξη πολυανθεκτικών (MDR) φαινοτύπων (Meletis G. & Bagkeri M. 2013, Balasoïu M. και συνεργάτες 2014).

2. Πενικιλινάσες: Προσφέρουν αντοχή στις καρβοξυπενικιλίνες, ουρεϊδοπενικιλίνες κεφοπεραζόνη και ευαισθησία στην κεφταζιδίμη, κεφεπίμη, μιπενέμη και τους αναστολείς των β-λακταμασών (Balasoïu M. και συνεργάτες 2014).

3. Ευρέου φάσματος β-λακταμάσες (ESBLs): Υδρολύουν τις ευρέου φάσματος κεφαλοσπορίνες (κεφοταξίμη, κεφτριαξόνη, κεφταζιδίμη), μονοβακτάμες (αστρεονάμη) και δεν επηρεάζονται από τους αναστολείς των καρβαπενεμασών και β-λακταμασών. Τα βακτήρια που παράγουν ESBLs παρουσιάζουν αντοχή ταυτόχρονα σε πολλές κατηγορίες αντιβιοτικών. Για το λόγο αυτό, το εύρος των θεραπευτικών επιλογών συνεχώς μειώνεται ενώ ταυτόχρονα αυξάνονται οι αναφορές για λοιμώξεις που προκαλούνται από ESBLs (Meletis G. & Bagkeri M. 2013, Balasoïu M. και συνεργάτες 2014).

- **Μη-ενζυμικοί μηχανισμοί αντοχής:**

Αποτελούν ουσιαστικά τους εγγενείς μηχανισμούς αντοχής του βακτηρίου και επιπλέον την περίπτωση τροποποίησης της θέσης στόχου του αντιμικροβιακού παράγοντα: Τα αντιβιοτικά δρουν με το να προσδένονται σε μια συγκεκριμένη περιοχή στόχο στα βακτήρια, η οποία ποικίλλει ανάλογα με την κατηγορία του αντιβιοτικού. Οι αλλαγές στην δομή του φαρμακευτικού στόχου συνήθως καθιστούν αδύνατη την πρόσδεση του φαρμάκου σε αυτόν και προσφέρουν αντοχή. Για παράδειγμα, αλλαγές σε δομές του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων, που ονομάζονται «πρωτεΐνες πρόσδεσης της πενικιλίνης» (penicillin-binding proteins, PBP), προσφέρουν αντοχή στις β-λακτάμες. Ένα άλλο παράδειγμα αντιμικροβιακής αντοχής που προκαλείται από μια αλλοιωμένη θέση στόχο είναι η αντοχή στις φθοροκινολόνες (π.χ. σιπροφλοξασίνη). Οι φθοροκινολόνες δρουν αναστέλλοντας τις DNA γυράσες (κωδικοποιούνται από τα γονίδια *gyrA* και *gyrB*) και τις τοποϊσομεράσες (κωδικοποιούνται από τα γονίδια *parC* και *parE*), οι οποίες είναι απαραίτητες πρωτεΐνες για την αντιγραφή του βακτηριακού DNA. Μεταλλάξεις σε συγκεκριμένες περιοχές των γονιδίων *gyrA* ή *parC* οδηγούν σε αλλοιώσεις της DNA γυράσης ή της τοποϊσομεράσης, με αποτέλεσμα η θέση στόχος του αντιβιοτικού να τροποποιείται (Mulvey M.R. & Simor A.E. 2009). Επιπλέον, όσον αφορά την υπερέκφραση αντλιών εκροής, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι μεταξύ των διαφόρων συστημάτων εκροής του *P. aeruginosa* (βλέπε Παράγραφο 1.5.1), τα MexAB-OprM, MexXY-OprM και MexCD-OprJ διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη αντοχής στις β-λακτάμες. Από αυτές τις τρεις, η αντλία MexAB-OprM είναι συνήθως υπεύθυνη για την ανάπτυξη αντοχής στα κλινικά στελέχη *P. aeruginosa* (Meletis G. & Bagkeri M. 2013, Balasoïu M. και συνεργάτες 2014).

## 1.6 Σκοπός

Οι βασικοί στόχοι της παρούσας εργασίας είναι: 1) η συλλογή, απομόνωση και ταυτοποίηση στελεχών του βακτηρίου *P. aeruginosa* που επικρατούν σε νοσοκομειακά περιβάλλοντα του Ελλαδικού χώρου με αλληλούχιση περιοχών του *16s rRNA* γονιδίου, 2) η περιγραφή και η φυλογενετική ανάλυση του απομονωθέντος πληθυσμού εφαρμόζοντας το πρόσφατα δημοσιευμένο τυποποιητικό σχήμα Double Locus Sequence Typing (DLST). Επιπλέον, αξιολογείται η διακριτική ικανότητα της μεθόδου και η ικανότητά της να καθορίζει τον κυρίαρχο γονότυπο στα συγκεκριμένα περιβάλλοντα και 3) ο προσδιορισμός των φαινοτύπων αντοχής που εμφανίζουν τα κλινικά στελέχη της συλλογής και η μελέτη της διασποράς τους στα γενετικά προφίλ που προέκυψαν κατά τη φυλογενετική μελέτη. Τέλος, ο συνδυασμός των παραπάνω δεδομένων ελπίζουμε ότι θα βοηθήσει στην ανάπτυξη μιας επιδημιολογικής μελέτης σε τοπικό επίπεδο, αλλά και στη ανίχνευση τυχόν επιδημικών στελεχών μέσα στο συγκεκριμένο πληθυσμό.

## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1 Θρεπτικά υποστρώματα**

#### **2.1.1 Γενικό θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient agar για ανακαλλιέργειες (LAB008, LAB M™)**

Περιέχει (g/L): πεπτόνη 5.0, εκχύλισμα κρέατος 3.0, χλωριούχο νάτριο 8.0, άγαρ 12.0. Διάλυση 28.0 gr σε 1 L απιονισμένου νερού, ρύθμιση του pH στο  $7.3 \pm 0.2$  πριν την αποστείρωση και στη συνέχεια αποστείρωση στους 121 °C για 15 min.

#### **2.1.2 Θρεπτικό υπόστρωμα MacConkey agar No.3 (LAB045, LAB M™)**

Περιέχει (g/L): πεπτόνη 20.0, λακτόζη 10.0, χολικά άλατα No.3 1.5, χλωριούχο νάτριο 5.0, ουδέτερο κόκκινο 0.03, κρυσταλλικό ιώδες 0.001, άγαρ No.2 15.0. Διάλυση 51.5 gr σε 1 L απιονισμένου νερού, ρύθμιση του pH στο  $7.1 \pm 0.2$  πριν την αποστείρωση και στη συνέχεια αποστείρωση στους 121 °C για 15 min.

#### **2.1.3 Θρεπτικό υπόστρωμα Mueller Hinton agar για έλεγχο της μικροβιακής ευαισθησίας (LAB039, LAB M™)**

Περιέχει (g/L): beef infusion solids 2.0, όξινη υδρολυμένη καζεΐνη 17.5, άμυλο 1.5, άγαρ No.1 17.0. Διάλυση 38 gr σε 1 L απιονισμένου νερού, ρύθμιση του pH στο  $7.3 \pm 0.1$  πριν την αποστείρωση και στη συνέχεια αποστείρωση στους 121 °C για 15 min.

#### **2.1.4 Θρεπτικό υπόστρωμα φύλαξης στελεχών στους -80°C, Brain Heart + 20% glycerol (CM1135, OXOID)**

Περιέχει σε (g/L): brain heart infusion solids 17.5, γλυκόζη 10.0, χλωριούχο νάτριο 5.0 και όξινο φωσφορικό νάτριο ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 2.5. Διάλυση 37.0 g σε 1 L απιονισμένου νερού και αποστείρωση στους 121 °C για 15 min. Μετά την αποστείρωση προστίθεται 20% γλυκερόλη.

## 2.2 Χημικά και Ρυθμιστικά Διαλύματα

**2.2.1 10x Tris–Borate EDTA Buffer (TBE)** (AppliChem: A1086,0500; A2940,0500; A4892,05000)

Περιέχει (σε 1 L): Tris – HCl 1M 108 g, Βορικό οξύ 55 g και 40 ml EDTA 0.5M. Για παρασκευή TBE 0.5x γίνεται αραιώση ποσότητας του TBE 10x (π. χ. για 100 ml TBE 0.5 x, σε 95 ml νερό προστίθενται 5 ml TBE 10x).

**2.2.2 EDTA 0.5M** (6381-92-6, SIGMA-ALDRICH; 102)

Διάλυση 186.1 g Na<sub>2</sub>EDTA\*2H<sub>2</sub>O σε 800 ml υψηλής καθαρότητας νερό και ρύθμιση του pH στο 8.0 προσθέτοντας περίπου 50 ml 10M NaOH. Συμπλήρωση με νερό μέχρι το 1 L και στη συνέχεια αποστείρωση στους 121 °C για 15 min.

**2.2.3 Βρωμιούχο Αιθίδιο** (Ethidium Bromide, E1510, SIGMA-ALDRICH)

Συσκευασία των 10 ml συγκέντρωσης 10 mg/ml. Για παρασκευή 2 mg/ml Βρωμιούχου Αιθιδίου, διαλύονται 200 mg σκόνης Βρωμιούχου Αιθιδίου σε 100 ml TBE 0.5x.

## 2.3 Στελέχη αναφοράς

Κατά τη διάρκεια όλων των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα εξής στελέχη αναφοράς:

- *P. aeruginosa* PAO1 CIP 104116: συλλογή του Ινστιτούτου Pasteur, Παρίσι, Γαλλία (Collection of Institute Pasteur CIP104116, [www.crbip.pasteur.fr](http://www.crbip.pasteur.fr)).
- *P. aeruginosa* NEQAS: EARS-Net EQA exercise 2013, United Kingdom National External Quality Assessment Schemes (UK-NEQAS; the HPA External Quality Control Scheme), Λονδίνο, Αγγλία.

## 2.4 Υλικά και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

- Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές σε συγκέντρωση 10 Μμ. Οι αλληλουχίες τους δίνονται στον **Πίνακα Π1**.
- Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer 10x) της Taq DNA πολυμεράσης χωρίς μαγνήσιο (Invitrogen-Thermo Scientific, Germany)
- Διάλυμα MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Invitrogen-Thermo Scientific)
- Μίγμα τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (dNTPs): γουανίνης, αδενίνης, θυμίνης και κυτοσίνης, περιεκτικότητας 10 mM από το καθένα (Invitrogen-Thermo Scientific)
- Taq DNA πολυμεράση (recombinant) συγκέντρωσης 5 u/μl (Invitrogen-Thermo Scientific)
- 10x Blue Juice, Gel Loading Buffer (Invitrogen-Thermo Scientific)
- TrackIt 100 bp DNA Ladder (Invitrogen-Thermo Scientific)
- Θερμικοί κυκλοποιητές: advanced PRIMUS 25 (PEQLAB) και 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης 200/2.0 POWER SUPPLY, THERMO Scientific

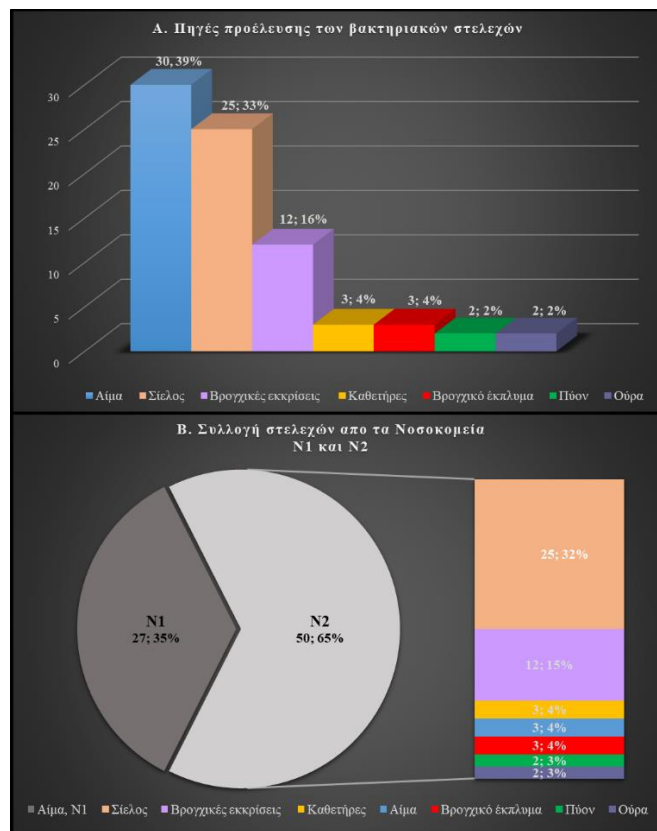
## 2.5 Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων

Εβδομήντα-επτά ταυτοποιημένα κλινικά στελέχη *P. aeruginosa* εστάλησαν στο Ερευνητικό εργαστήριο του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής από: Α) Νοσοκομείο της Βόρειας Ελλάδας (27 στελέχη), το οποίο θα αποκαλείται στο εξής νοσοκομείο N1 και Β) Νοσοκομείο της Κεντρικής Ελλάδας (50 στελέχη), το οποίο θα αποκαλείται στο εξής νοσοκομείο N2 (**Εικόνα 2.5.1B**).

Τα στελέχη έχουν απομονωθεί από διάφορες νοσοκομειακές μονάδες (Μονάδες Εντατικής Θεραπείας, Μονάδες Αυξημένης Φροντίδας, Παθολογικές Μονάδες κ.α.) και από ποικίλες πηγές (αίμα, ούρα, βρογχικές εκκρίσεις, σάλιο, πύον, καθετήρες κ.α.) (**Πίνακας Π2**). Στην **Εικόνα 2.5.1A** που ακολουθεί, παρουσιάζεται η ποσοστιαία κατανομή των στελεχών με βάση τις πηγές απομόνωσής τους και στην **Εικόνα 2.5.1B** απεικονίζεται η ποσοστιαία κατανομή των στελεχών σύμφωνα με το νοσοκομείο προέλευσης και τις πηγές



απομόνωσης τους από το καθένα. Ο υπό εξέταση πληθυσμός παρουσιάζει μια ανισοκατανομή καθώς τα περισσότερα στελέχη προέρχονται από την Κεντρική Ελλάδα. Με στόχο να αντιμετωπισθεί αυτός ο περιορισμός, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ξεχωριστά για κάθε νοσοκομείο και με τον ίδιο τρόπο αναπτύσσεται και η συζήτηση. Η αρχική απομόνωση και των 77 στελεχών πραγματοποιήθηκε στους χώρους των δύο νοσοκομείων κατά το χρονικό διάστημα 2016-2017 και η αποστολή τους έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα MacConkey agar υπό άσηπτες συνθήκες. Τα στελέχη επεξεργάστηκαν στο Ερευνητικό εργαστήριο του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής όπου 5 από αυτά αποκλείστηκαν από τις περαιτέρω διαδικασίες, καθώς δεν επιβεβαιώθηκαν ως *P. aeruginosa*. Τέλος, η ροή όλων των πειραματικών διαδικασιών που αναπτύσσονται στα παρακάτω κεφάλαια παρουσιάζεται συνοπτικά στην **Εικόνα Π1** του παραρτήματος.



**Εικόνα 2.5.1 (A):** Ποσοστιαία κατανομή των στελεχών σύμφωνα με την πηγή προέλευσής τους  
**(B):** Ποσοστιαία κατανομή των στελεχών σύμφωνα με το νοσοκομείο προέλευσης και τις πηγές απομόνωσής τους από το καθένα.

*N1: Νοσοκομείο της Βόρειας Ελλάδας, N2: Νοσοκομείο της Κεντρικής Ελλάδας.*

### 2.5.1 Ανακαλλιέργεια και φύλαξη των στελεχών

Τα στελέχη ανακαλλιεργήθηκαν μετά τη παραλαβή τους σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα MacConkey agar. Οι ανακαλλιέργειες έγιναν με την τεχνική της αραιώσης με σκοπό να ληφθούν μεμονωμένες αποικίες από το κάθε στέλεχος. Ακολούθησε επώαση στους 37 °C σε αερόβιες συνθήκες για 24 h. Τα στελέχη φυλάχθηκαν σε cryovials, σε διάλυμα Brain Heart Infusion + 20% glycerol όπου και διατηρούνται σε μορφή κυττάρων στους -80 °C.

## 2.6 Απομόνωση Γενομικού DNA

Για κάθε στέλεχος *P. aeruginosa* πραγματοποιήθηκε ανακαλλιέργεια από το cryovial σε γενικό θρεπτικό υπόστρωμα (Nutrient agar) και επώαστηκε για 18-24 ώρες στους 37 °C. Το γενομικό DNA απομονώθηκε από στελέχη με τη μέθοδο του βρασμού: Μεταφορά αποικιών σε 200-400 μl water for injection και βρασμός για 20 min στους 100 °C. Ακολουθεί ψύξη των κυττάρων για 7-8 min στους -20 °C και φυγοκέντρωση για 5 min σε 10.000rpm. Το υπερκείμενο περιέχει το βακτηριακό DNA (Fothergill J.L. και συνεργάτες 2008).

## 2.7 Μοριακή ανίχνευση του *16s rDNA*

Στα 79 στελέχη της συλλογής (συμπεριλαμβανομένων και των δύο στελεχών αναφοράς PAO1 και NEQAS) πραγματοποιήθηκε ανίχνευση τμημάτων του γονιδίου *16s rRNA*, χρησιμοποιώντας 3 διαφορετικά ζεύγη εκκινητών, ειδικών για το είδος *P. aeruginosa* (PA-SS-F/R), το γένος *Pseudomonas* (PA-GS-F/R) και το βασίλειο *bacteria* (314F-518R) (Πίνακας III). Εφαρμόστηκε το προτεινόμενο πρωτόκολλο από τους Fothergill J.L. και συνεργάτες (Fothergill J.L. και συνεργάτες 2008). Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση και έλεγχος για την παρουσία του σωστού προϊόντος (Μοριακό Βάρος: 956 bp). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ‘καθαρισμός’ (purification) των προϊόντων της PCR με το kit (PureLink™ Quick Gel Extraction Kit, Invitrogen) και ακολούθησε αλληλούχιση κατά Sanger στην εταιρεία CeMIA SA (<http://cemia.eu/sangersequencing.html>) με τη χρήση των κατάλληλων εκκινητών

(Πίνακας III). Στις περιπτώσεις όπου δεν λήφθηκε προϊόν από την PCR ή όπου η αλληλουχία ήταν χαμηλής ποιότητας κατά την αλληλούχιση, έγινε επανάληψη της όλης διαδικασίας για δεύτερη φορά. Εάν και μετά τη δεύτερη φορά το αποτέλεσμα ήταν αρνητικό για κάποια στελέχη, τότε θεωρήθηκε πως πιθανόν ανήκουν ή σε διαφορετικό είδος *Pseudomonas* ή σε άλλο γένος ή πως δεν είναι βακτήριο (Spilker T. και συνεργάτες 2004).

DNA	2 μl
Buffer 10x	2.5 μl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1.25 μl
dNTPs 10 mM	0.25 μl
Εκκινητές	0.75 μl έκαστος
Taq πολυμεράση (5 u/μl)	0.2 μl
Απεσταγμένο νερό	17.3 μl

Τα δείγματα υποβλήθηκαν αρχικά σε:

- αποδιάταξη DNA σε 95 °C για 2 min και στη συνέχεια σε
  - αποδιάταξη σε 94 °C για 20 sec
  - υβριδισμό σε 53 °C /54 °C/58 °C για 20 sec
  - επιμήκυνση σε 72 °C για 40 sec
- } για 25 κύκλους
- και τελική επιμήκυνση σε 72 °C για 1 min.

Στην PCR συμπεριλήφθηκαν ως θετικοί μάρτυρες τα δύο στελέχη αναφοράς, αλλά και αρνητικοί μάρτυρες.

## 2.8 Double Locus Sequence Typing (DLST)

Σε όλα τα υπό εξέταση στελέχη (συμπεριλαμβανομένων και των δύο στελεχών αναφοράς PAO1 και NEQAS), τα οποία έδωσαν θετικό αποτέλεσμα για το *16s rRNA* με την χρήση και των τριών ζευγών εκκινητών (βλέπε Παράγραφο 2.7), εφαρμόστηκε η

DLST σύμφωνα με το πρωτόκολλο από τους Basset P. και συνεργάτες (2014) (Basset P. και συνεργάτες 2014). Καθαρό γενωμικό DNA χρησιμοποιήθηκε για τον πολλαπλασιασμό των δύο γενετικών τόπων, *ms172* και *ms217* με τη μέθοδο της PCR. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση και έλεγχος για την παρουσία του σωστού προϊόντος. Όπως ήταν αναμενόμενο, το μοριακό βάρος των γονιδίων ήταν διαφορετικό για το κάθε στέλεχος. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ‘καθαρισμός’ (purification) των προϊόντων της PCR με τη χρήση του kit (PureLink™ Quick Gel Extraction Kit, Invitrogen) και αλληλούχιση τους κατά Sanger στην εταιρεία CeMIA SA (<http://cemia.eu/sangersequencing.html>) με τη χρήση μόνο των ανάστροφων (reverse) εκκινητών για τον κάθε γενετικό τόπο (**Πίνακας Π1**). Στις περιπτώσεις, όπου δεν λήφθηκε προϊόν από την PCR ή όπου η αλληλουχία ήταν χαμηλής ποιότητας κατά την αλληλούχιση, έγινε επανάληψη της όλης διαδικασίας για δεύτερη φορά. Εάν και μετά τη δεύτερη φορά η αλληλουχία δεν ήταν καλή για κάποια στελέχη, τότε θεωρήθηκε ότι το αλληλόμορφο ήταν μηδενικό (null allele) και κατηγοριοποιήθηκε ως ατυποποίητο (Basset P. και συνεργάτες 2014).

DNA	2 μl
Buffer 10x	2 μl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	0.8 μl
dNTPs 10 mM	0.2 μl
Εκκινητές	0.6 μl έκαστος
Taq πολυμεράση (5 u/μl)	0.2 μl
Απεσταγμένο νερό	15.6 μl

Τα δείγματα υποβλήθηκαν αρχικά σε:

- αποδιάταξη DNA σε 94 °C για 5 min και στη συνέχεια σε
  - αποδιάταξη σε 94 °C για 30 sec
  - υβριδισμό σε 60 °C/64 °C για 30 sec
  - επιμήκυνση σε 72 °C για 45 sec
- } για 35 κύκλους
- και τελική επιμήκυνση σε 72 °C για 10 min.

Στην PCR συμπεριλήφθηκαν ως θετικοί μάρτυρες τα δύο στελέχη αναφοράς, αλλά και αρνητικοί μάρτυρες.

## **2.9 Ανάλυση των δεδομένων που ελήφθησαν από την αλληλούχιση**

Τα χρωματογραφήματα που παρήχθησαν από την αλληλούχιση των προϊόντων της DLST-PCR, επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα Sequencer 5.3 χρησιμοποιώντας ως αναφορά τις αλληλουχίες έναρξης (start signatures of the trimmed pattern) για τους 2 γενετικούς τόπους *ms172* και *ms217* σύμφωνα με το πρωτόκολλο (Basset P. και συνεργάτες 2014). Οι επεξεργασμένες αλληλουχίες (trimmed sequences) υποβλήθηκαν στη βάση δεδομένων της DLST (<http://www.dlst.org/Paeruginosa/>) για τον καθορισμό του locus. Στην περίπτωση που δεν υπήρξε ταύτιση της επεξεργασμένης αλληλουχίας με κάποιο από τα ήδη καταχωρημένα loci της βάσης, ακολουθήθηκε η διαδικασία που προτείνεται από την ιστοσελίδα της DLST (<http://www.dlst.org/Paeruginosa/>) για την υποβολή νέας αλληλουχίας και καθορίστηκε ένας αριθμός για τον νέο γενετικό τόπο. Τα χρωματογραφήματα που παρήχθησαν από την αλληλούχιση των προϊόντων της PCR για το *16s rRNA* γονίδιο με την χρήση των ειδικών εκκινητών για το είδος *P. aeruginosa* (PA-SS-F/R, Πίνακας Π1), επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα Sequencer 5.3 και ελέγχθηκε η κωδικοποίηση του σωστού προϊόντος μέσω BLAST – alignment.

## **2.10 Φυλογενετική ανάλυση eBURST και κατασκευή των minimum spanning trees**

Οι γενετικοί μάρτυρες της DLST θεωρούνται υψηλά σταθεροί, όταν χρησιμοποιούνται για φυλογενετικές μελέτες σε τοπικό επίπεδο (Basset P. και συνεργάτες 2009, Basset P. & Blanc D.S. 2014). Παρ' όλα αυτά, κατά τη διάρκεια μιας μακρόχρονης μελέτης είναι δυνατόν να υποστούν γενετικές αλλαγές (Basset P. και συνεργάτες 2009). Σε μελέτες, όπως η παρούσα, όπου κλινικά στελέχη *P. aeruginosa* προερχόμενα από μια συγκεκριμένη χώρα και απομονωμένα σε χρονικό διάστημα ενός έτους, χρησιμοποιούνται με στόχο να αξιολογηθούν τα τοπικά φυλογενετικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου, είναι ιδιαίτερα σημαντικό να εφαρμοστεί το κατάλληλο πρόγραμμα μοριακής ανάλυσης των

αλληλουχιών. Το πρόγραμμα Global optimal eBURST analysis [(Francisco A.P. και συνεργάτες 2009), (<http://www.phyloviz.net/goeburst/>) πρόσβαση στις 27.12.2017)], το οποίο έχει προταθεί από τη διεθνή βιβλιογραφία για μοριακή ανάλυση αλληλουχιών που έχουν αποκτηθεί από στελέχη του βακτηρίου *S. aureus* (Basset P. και συνεργάτες 2009, Sakwinska O. και συνεργάτες 2009), επιλέχθηκε και για την ανάλυση των DLST που αποκτήθηκαν από τα στελέχη *P. aeruginosa*, εφαρμόζοντας τους ίδιους κανόνες και ορισμούς.

## **2.11 Φαινοτυπική Μέθοδος Ελέγχου Μικροβιακής Ευαισθησίας των στελεχών/ Ανίχνευση Μηχανισμών Αντοχής**

### **2.11.1 Έλεγχος μικροβιακής ευαισθησίας**

Ο έλεγχος της μικροβιακής ευαισθησίας πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες πρότυπης μεθόδου του ‘The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing’ (EUCAST) (Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, 2017). Τα στελέχη της συλλογής, τα οποία έδωσαν θετικό αποτέλεσμα για το *16s rRNA* με την χρήση και των τριών ζεύγων εκκινήτων, εξετάστηκαν ως προς την ευαισθησία τους σε 12 ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά που ανήκουν σε 5 διαφορετικές τάξεις: β-λακταμικά μη καρβαπενέμες: κεφεπίμη (FEP, 30 μg), πιπερακιλλίνη (PIP, 75 μg), τικαρκιλίνη (TIC, 75 μg), τικαρκιλίνη-κλαβουλανικό (TCC, 75 μg/10 μg), κεφταζιδίμη (CAZ, 30 μg), μονοβακτάμες: αζτρεονάμη (ATM, 30 μg), αμινογλυκοσίδες: γενταμυκίνη (GEN, 30 μg), τομπραμυκίνη (TOB, 30 μg), αμικασίνη (AMK, 30 μg), καρβαπενέμες: μεροπενέμη (MEM, 10 μg), ιμιπενέμη (IPM, 10 μg), φθοριοκινολόνη: σιπροφλοξασίνη (CIP, 5 μg). Τα στελέχη ανακαλλιεργούνται σε γενικό θρεπτικό υπόστρωμα (Nutrient agar) και επωάζονται (37 °C σε αερόβιες συνθήκες για 18-24 h) με στόχο τη λήψη μεμονωμένων αποικιών. Την επόμενη ημέρα παρασκευάζεται το βακτηριακό εναιώρημα επίστρωσης (θολερότητας 0.5 της κλίμακας McFarland) σε 0.9% NaCl. Από το βακτηριακό εναιώρημα λαμβάνεται μια ποσότητα με τη χρήση βαμβακοφόρου στυλεού και πραγματοποιείται επίστρωση σε τρυβλίο Mueller Hinton agar.

Στη συνέχεια, τοποθετούνται τα 12 αντιβιοτικά σε συγκεκριμένη διάταξη ώστε να επιτρέπεται ταυτόχρονα η ανίχνευση μηχανισμού αντοχής με τη δοκιμασία συνέργειας με EDTA (βλέπε Παράγραφο 2.11.2). Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις προτεινόμενες οδηγίες τόσο από το EUCAST όσο και από δημοσιευμένες κατευθύνσεις (Livermore D.M. και συνεργάτες 2002, Magiorakos A.P. και συνεργάτες 2011).

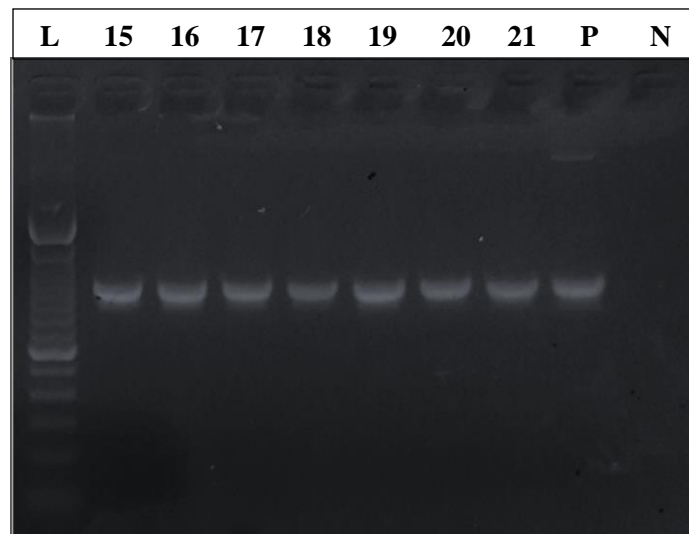
### **2.11.2 Έλεγχος παραγωγής μέταλλο-β-λακταμασών (MBL) με τη δοκιμασία συνέργειας με EDTA**

Στο ίδιο τρυβλίο Mueller Hinton agar, το οποίο είναι επιστρωμένο με βακτηριακό εναιώρημα και έχουν τοποθετηθεί τα 12 υπό εξέταση αντιβιοτικά, τοποθετείται επιπλέον δίσκος αποστειρωμένου διηθητικού χαρτιού εμποτισμένος με 5 μl διαλύματος EDTA 0.1M σε απόσταση 20 mm κέντρο με κέντρο από δίσκους ιμιπενέμης (IMP, 10 μg), κεφταζιδίμης (CAZ, 30 μg), πιπερακιλλίνης (PIP, 75 μg), και μεροπενέμης (MEM, 10 μg). Ακολουθεί επώαση σε αερόβιες συνθήκες στους 37 °C για 18-24 ώρες. Η παραμόρφωση της ζώνης αναστολής μεταξύ των δίσκων υποδεικνύει την ύπαρξη μέταλλο-β-λακταμασών (EDTA θετικό στέλεχος) (Giakkouri P. και συνεργάτες 2008).

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Μοριακή ανίχνευση του *16s rDNA*

Από τα 79 στελέχη της συλλογής (συμπεριλαμβανομένων και των 2 στελεχών αναφοράς PAO1 και NEQAS), τα 74 έδωσαν θετικό αποτέλεσμα για το γονίδιο *16s rRNA* με την χρήση των ειδικών εκκινητών για το είδος *P. aeruginosa*, το γένος *Pseudomonas* και το βασίλειο *bacteria* (PA-SS-F/R, PA-GS-F/R και 314F-518R αντίστοιχα, **Πίνακας Π1**) (**Πίνακας Π2**). Πέντε στελέχη (5/79), ενώ παρήγαγαν ηλεκτροφορητική ζώνη για το γένος *Pseudomonas* και τα βακτήρια, έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα όταν εξετάστηκαν με τους εκκινητές για το είδος *P. aeruginosa*, έτσι θεωρήθηκαν πως δεν ανήκουν στο είδος *P. aeruginosa* και δεν μελετήθηκαν περαιτέρω (**Πίνακας Π2**). Στην **Εικόνα 3.1.1** παρουσιάζεται η ηλεκτροφορητική εικόνα επιλεγμένων στελεχών, με την χρήση των ειδικών εκκινητών για το είδος *P. aeruginosa*, με το αναμενόμενο μοριακό βάρος (956 bp) (Spilker T. και συνεργάτες 2004, Fothergill J.L. και συνεργάτες 2008).

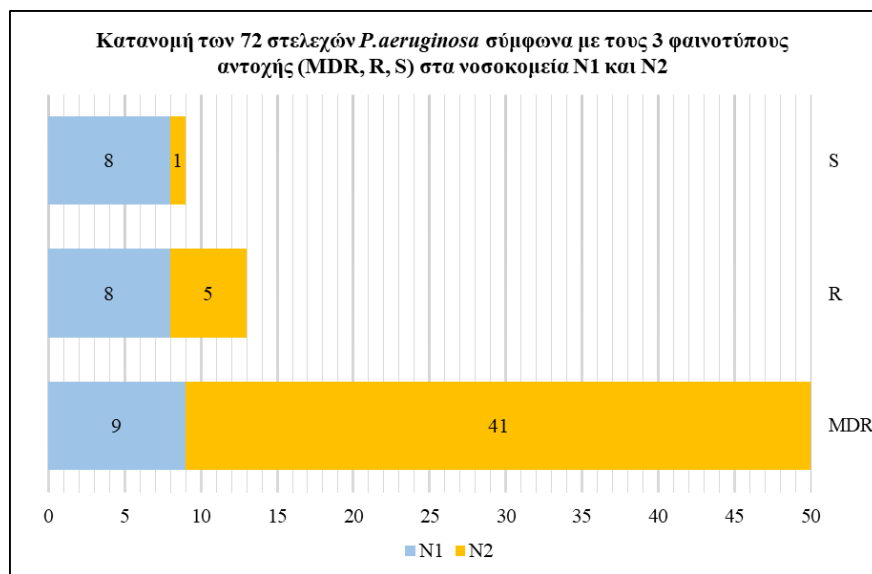


**Εικόνα 3.1.1:** Ηλεκτροφορητική εικόνα των στελεχών 15,16,17,18,19,20,21 με τους ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο *16s rRNA* (*P. aeruginosa*). *P*: PAO1, *N*: αρνητικό control, *L*: Ladder

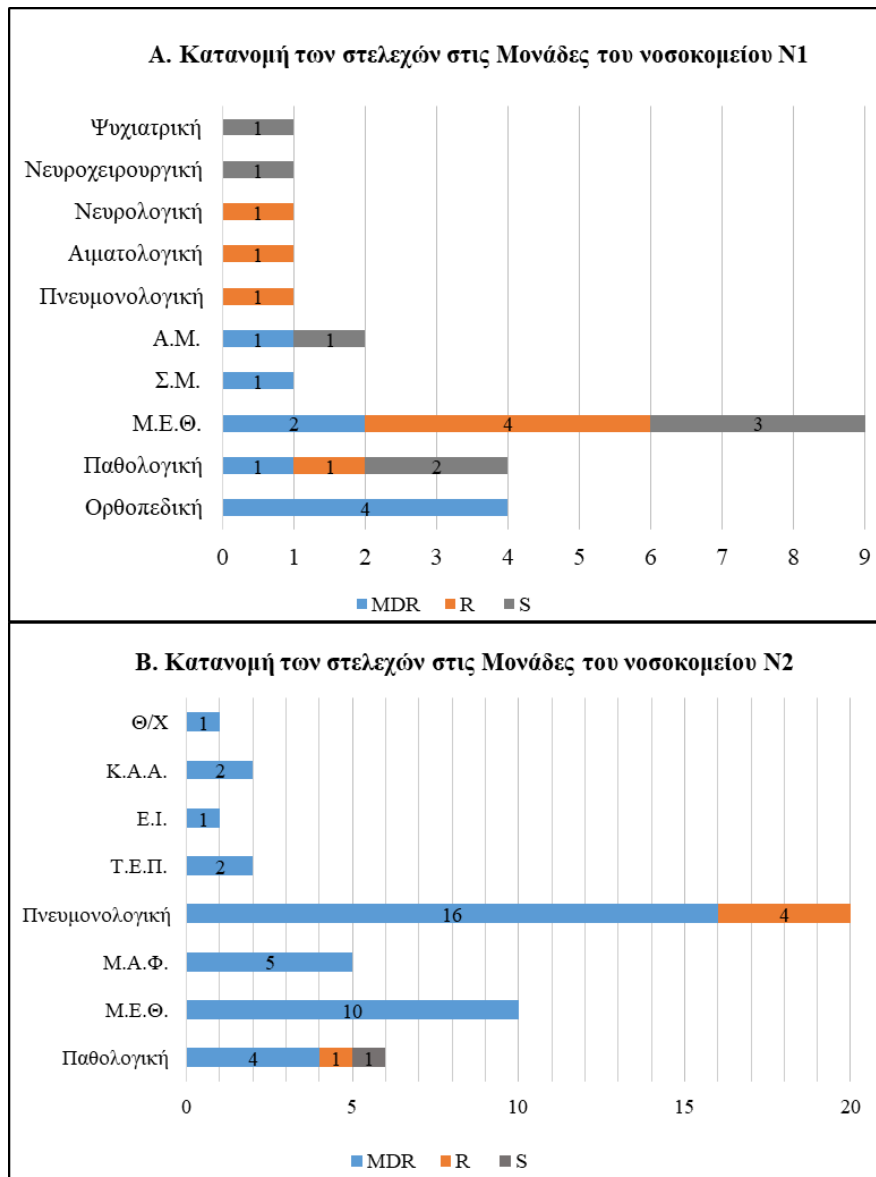


### 3.2 Φαινοτυπικές Δοκιμασίες Ελέγχου Μικροβιακής Ευαισθησίας των στελεχών / Ανίχνευση Μηχανισμών Αντοχής

Σύμφωνα με τους Magiorakos A.P. και συνεργάτες (2011), Πολυανθεκτικά στελέχη (Multi Drug Resistant, MDR) καλούνται τα στελέχη που εμφανίζουν αντοχή σε τουλάχιστον ένα αντιβιοτικό σε 3 ή περισσότερες κατηγορίες αντιμικροβιακών, ενώ Ανθεκτικά (Resistant, R) καλούνται τα στελέχη που εμφανίζουν αντοχή σε ένα αντιβιοτικό σε 1 ή/και δυο κατηγορίες αντιμικροβιακών (Magiorakos A.P. και συνεργάτες 2011). Τέλος, Ευαίσθητα (Sensitive, S) είναι τα στελέχη που δεν παρουσιάζουν αντοχή σε κανένα αντιβιοτικό όλων των κατηγοριών των αντιμικροβιακών. Έτσι, τα στελέχη αρχικά τοποθετήθηκαν σε 3 κατηγορίες: Ευαίσθητα/Sensitive (S: 9/72, 12.5%) με την πλειοψηφία τους να προέρχονται από τα δείγματα του Νοσοκομείου της Βορείας Ελλάδας (N1), Ανθεκτικά/Resistant (R: 13/72, 18%) με 8 στελέχη από το Νοσοκομείο N1 και 5 από το Νοσοκομείο της Κεντρικής Ελλάδας (N2) και Πολυανθεκτικά/Multi Drug Resistant (MDR: 50/72, 69.5%) εκ των οποίων τα 41 είναι απομονωμένα από το Νοσοκομείο N2 (Εικόνα 3.2.1). Στην Εικόνα 3.2.2 παρουσιάζεται η κατανομή των τριών φαινοτύπων αντοχής (MDR, R και S) στις Μονάδες των 2 νοσοκομείων, από τις οποίες είχαν απομονωθεί αρχικά τα 72 στελέχη.



Εικόνα 3.2.1: Κατανομή των προφίλ αντοχής (MDR, R και S) στα νοσοκομεία N1 και N2 για το σύνολο των *P. aeruginosa* στελεχών.

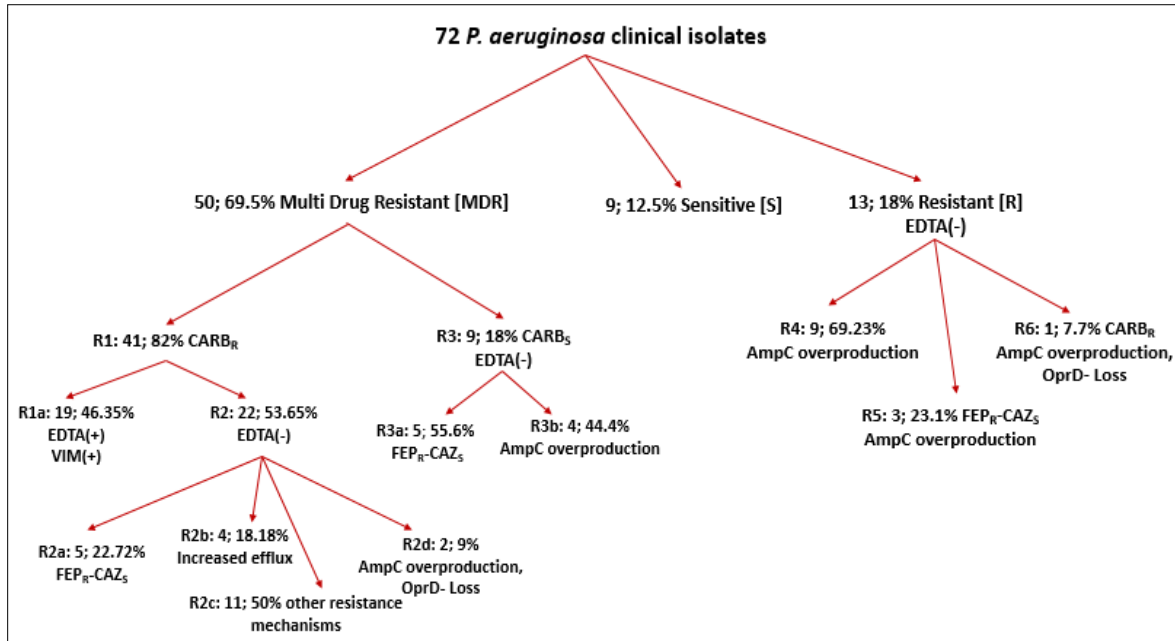


**Εικόνα 3.2.2:** (Α) Κατανομή των 25 *P. aeruginosa* στελεχών στις Μονάδες του νοσοκομείου N1 και (Β) των 47 *P. aeruginosa* στελεχών στις Μονάδες του νοσοκομείου N2 σύμφωνα με τους 3 φαινοτύπους αντοχής MDR, R και S.

*A.M.*: Αγνωστη Μονάδα, *Σ.Μ.*: Στεφανιαία Μονάδα, *Μ.Ε.Θ.*: Μονάδα Εντατικής Θεραπείας, *Θ/Χ*: Θωρακοχειρουργική, *Κ.Α.Α.*: Κέντρο Αναπνευστικής Ανεπάρκειας, *Ε.Ι.*: Εξωτερικά Ιατρεία, *Τ.Ε.Π.*: Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών, *Μ.Α.Φ.*: Μονάδα Αυξημένης Φροντίδας.

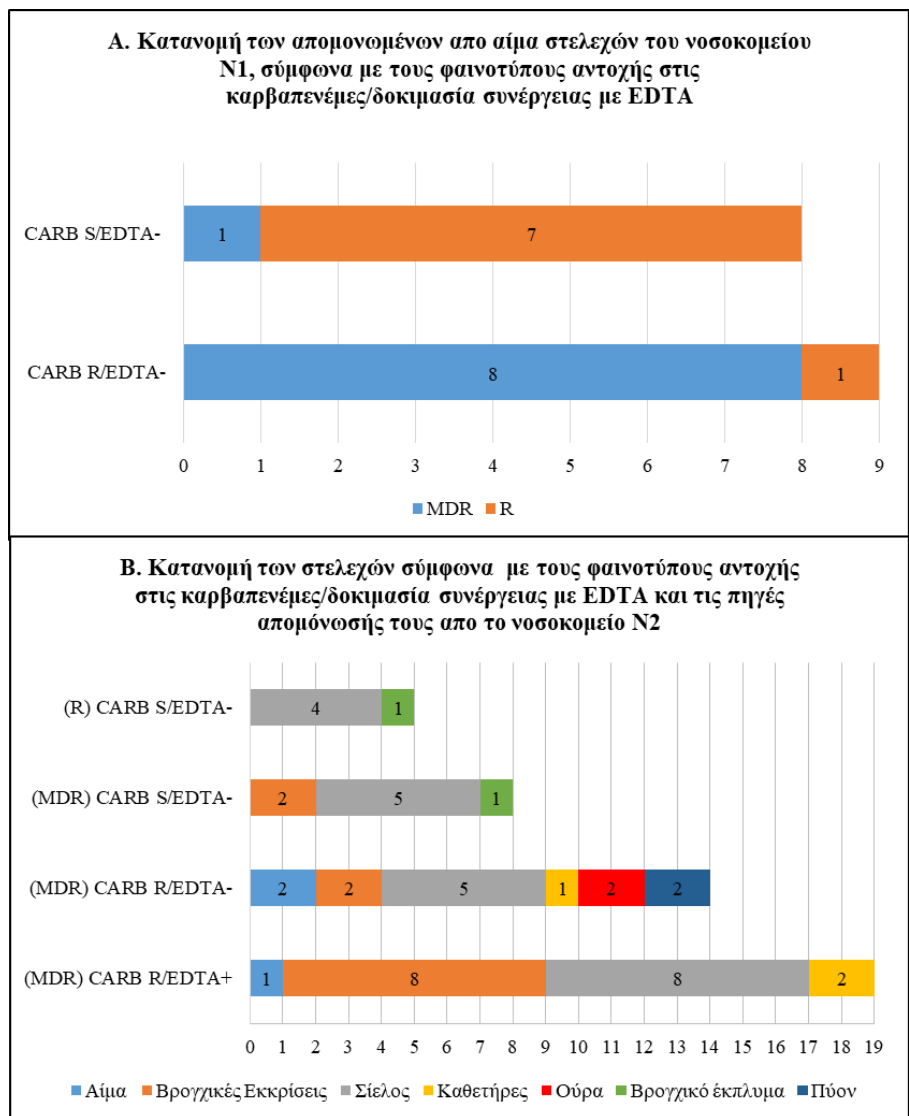
Στη συνέχεια, μελετήθηκαν τα MDR στελέχη για την αντοχή τους στις διάφορες κατηγορίες αντιμικροβιακών, ξεκινώντας με τις καρβαπενέμες· έτσι τα 50 πολυανθεκτικά

στελέχη χωρίστηκαν σε 41 στελέχη (8 από το νοσοκομείο N1 και 33 από το νοσοκομείο N2) CARB<sub>R</sub> (CARBAPENEM RESISTANT, 82%) [Resistant Phenotype (RP) R1] και 9 (1 από το νοσοκομείο N1 και 8 από το νοσοκομείο N2) CARB<sub>S</sub> (CARBAPENEM SENSITIVE, 18%) [RP R3], σύμφωνα με τις αντοχές τους στα αντιβιοτικά MEM και IPM (Εικόνα 3.2.3, Πίνακας Π2).

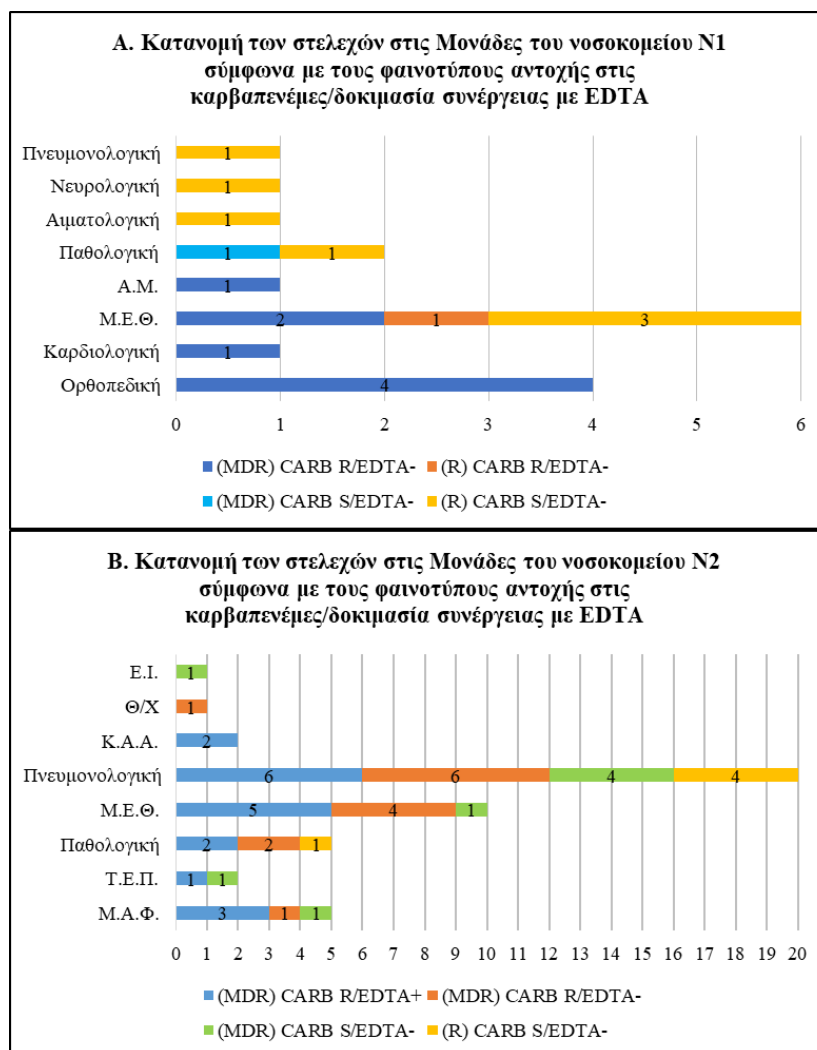


**Εικόνα 3.2.3:** Σχηματική απεικόνιση της κατανομής των παρατηρούμενων φαινοτύπων αντοχής στα 72 *P. aeruginosa* στελέχη της συλλογής.

Τα 8 CARB<sub>R</sub> από το νοσοκομείο N1 προέρχονται από καλλιέργειες αίματος (Εικόνα 3.2.4), κυρίως από ασθενείς της Ορθοπαιδικής Μονάδας (4/8) και της Μονάδας Εντατικής Θεραπείας (2/8) του νοσοκομείου (Εικόνα 3.2.5), ενώ τα 33 CARB<sub>R</sub> από το νοσοκομείο N2 έχουν απομονωθεί από ποικίλα κλινικά δείγματα και κλινικές του νοσοκομείου (Εικόνα 3.2.4, Εικόνα 3.2.5).



**Εικόνα 3.2.4:** Κατανομή των MDR και R *P. aeruginosa* στελεχών (A) στο νοσοκομείο N1 και (B) στο νοσοκομείο N2 σύμφωνα με τις πηγές απομόνωσής τους καθώς και τους φαινοτύπους αντοχής στις καρβαπενέμες και τη δοκιμασία συνέργειας με EDTA.



**Εικόνα 3.2.5:** (Α) Κατανομή των MDR και R *P. aeruginosa* στελεχών στις Μονάδες (Α) του νοσοκομείου N1 και (Β) του νοσοκομείου N2, σύμφωνα με τους φαινοτύπους αντοχής στις καρβαπενέμες και τη δοκιμασία συνέργειας με EDTA.

*Α.Μ.*: Άγνωστη Μονάδα, *Σ.Μ.*: Στεφανιαία Μονάδα, *Μ.Ε.Θ.*: Μονάδα Εντατικής Θεραπείας, *Θ/Χ*: Θωρακοχειρουργική, *Κ.Α.Α.*: Κέντρο Αναπνευστικής Ανεπάρκειας, *Ε.Ι.*: Εξωτερικά Ιατρεία, *Τ.Ε.Π.*: Τμήμα Επιγόντων Περιστατικών, *Μ.Α.Φ.*: Μονάδα Αυξημένης Φροντίδας.

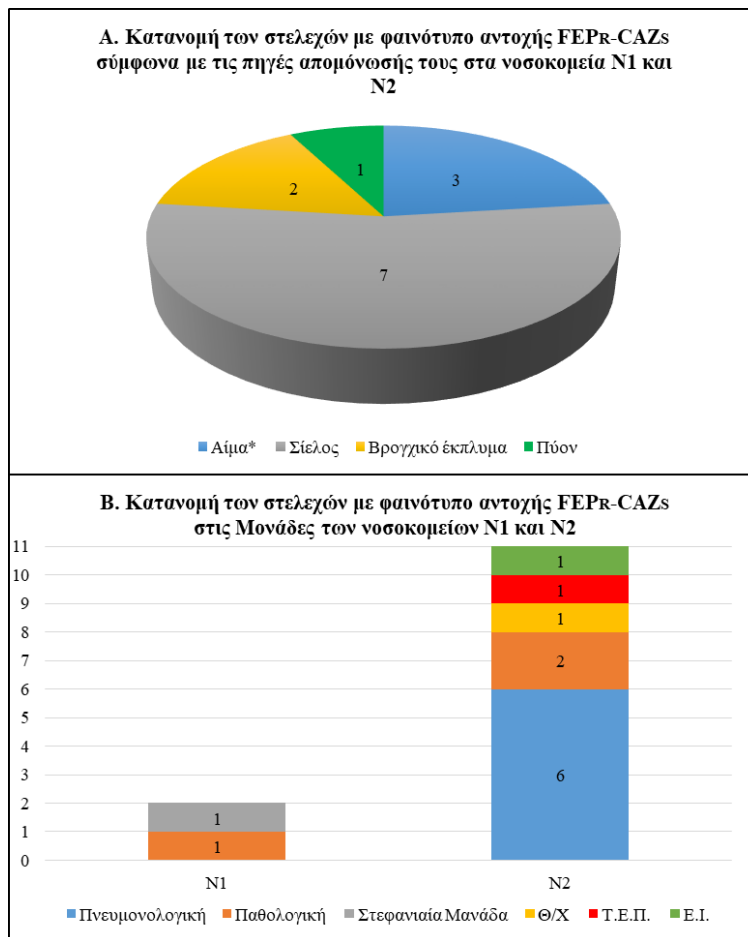
Ο έλεγχος της παραγωγής μέταλλο-β-λακταμάσης (MBL) ανέδειξε 19 EDTA(+) στελέχη αποκλειστικά CARB<sub>R</sub> (19/41, 46.35%) [RP R1a], πιθανά λόγω παραγωγής της VIM MBL, ενώ το 53.65% (22/41) των CARB<sub>R</sub> χαρακτηρίστηκε ως EDTA(-) [RP R2] (Εικόνα 3.2.3, Πίνακας Π2). Τα τελευταία μελετήθηκαν για άλλους μηχανισμούς αντοχής (εκτός της VIM MBL), όπου: για 4 στελέχη [στελέχη 19, 48, 56 και 58 (4/22, 18.18%)] με

MEM<sub>R</sub>+IPM<sub>S</sub> θεωρήθηκε ότι υπάρχει υπερπαραγωγή κάποιου καναλιού (increased efflux) [RP R2b], σε δυο στελέχη [στελέχη 68 και 73 (2/22, 9%)] παρατηρήθηκε υπερπαραγωγή της χρωμοσωμικής AmpC β-λακταμάσης και πιθανή απώλεια της OprD πορίνης (loss of OprD) με MEM<sub>S</sub>+IPM<sub>R</sub> [RP R2d], σε 5 στελέχη [στελέχη 17, 32, 51, 64 και 61 (5/22, 22.72%)] παρατηρήθηκε αντοχή στη κεφεπίμη και ευαισθησία στην κεφταζιδίμη [RP R2a], ένας φαινότυπος που δεν περιγράφεται στους μη-ενζυματικούς μηχανισμούς (Livermore D.M. και συνεργάτες 2002) και στη συνέχεια θα αναφέρεται ως FEP<sub>R</sub>-CAZ<sub>S</sub>, ενώ τα υπόλοιπα 11 στελέχη (50%) της κατηγορίας MDR/EDTA(-) διαθέτουν άλλους μηχανισμούς αντοχής, πιθανά ευρέους φάσματος β-λακταμάσες (Extended Spectrum β-Lactamases, ESBLs) [RP R2c] (**Εικόνα 3.2.3, Πίνακας Π2**). Όσον αφορά τα 9 στελέχη της κατηγορίας MDR/CARB<sub>S</sub> είναι όλα EDTA(-) και εμφάνισαν δυο φαινοτύπους αντοχής: 4 στελέχη [στελέχη 75, 30, 54 και 70 (4/9, 44.4%)] με υπερπαραγωγή της χρωμοσωμικής AmpC β-λακταμάσης [RP R3b] και 5 στελέχη [στελέχη 1, 74, 77, 28 και 67 (5/9, 55.6%)] με τον νέο φαινότυπο FEP<sub>R</sub>-CAZ<sub>S</sub> [RP R3a] (**Εικόνα 3.2.3, Πίνακας Π2**). Τα MDR στελέχη όσον αφορά τις υπόλοιπες κατηγορίες αντιβιοτικών, εμφάνισαν πλήρη αντοχή και στις δυο αντιψευδομονικές κεφαλοσπορίνες, κεφεπίμη και κεφταζιδίμη, εκτός των προαναφερθέντων στελεχών με τον φαινότυπο αντοχής FEP<sub>R</sub>-CAZ<sub>S</sub>, και στην αντιψευδομονική πενικιλίνη με τον αναστολέα της, τικαρκιλίνη+κλαβουλανικό οξύ (TCC) και στην μονοπακτάμη που ελέγχθηκε, την αζτρεονάμη (ATM) (**Εικόνα 3.2.3, Πίνακας Π2**).

Παρατηρήθηκε πως όλα τα MDR στελέχη (8/9 CARB<sub>R</sub> και 1/9 CARB<sub>S</sub>) του νοσοκομείου N1 είναι αρνητικά στην παραγωγή μέταλλο-β-λακταμασών [EDTA(-)], ενώ ο φαινότυπος CARB<sub>R</sub>/EDTA(+) παρατηρήθηκε αποκλειστικά σε MDR στελέχη του νοσοκομείου N2 (19/41), με τα υπόλοιπα 22 (14/41 CARB<sub>R</sub> και 8/41 CARB<sub>S</sub>) να είναι EDTA(-). Τα CARB<sub>R</sub>/EDTA(+) στελέχη του νοσοκομείου N2 έχουν απομονωθεί κυρίως από βρογχικές εκκρίσεις (8/19) και σίελο (8/19) (**Εικόνα 3.2.4**) από ποικίλες κλινικές Μονάδες του νοσοκομείου (**Εικόνα 3.2.5**).

Τα 13 R στελέχη είναι όλα EDTA(-) και εμφάνισαν 3 φαινοτύπους αντοχής: 9 στελέχη [στελέχη 7, 8, 15, 16, 25, 27, 66, 69 και 18 (9/13, 69.23%)] με υπερπαραγωγή της χρωμοσωμικής AmpC β-λακταμάσης [RP R4], 3 στελέχη [στελέχη 57, 72 και 76 (3/13, 23.1%)] με τον νέο φαινότυπο FEP<sub>R</sub>-CAZ<sub>S</sub> [RP R5] και 1 στέλεχος [στέλεχος 6 (1/13,

7.7%)] με υπερπαραγωγή της χρωμοσωμικής AmpC β-λακταμάσης και πιθανή απώλεια της OprD πορίνης (loss of OprD) με MEM<sub>S</sub>+ IPM<sub>R</sub> [RP R6] (Εικόνα 3.2.3, Πίνακας Π2). Όλα τα R στελέχη (8 στελέχη) του νοσοκομείου N1 έχουν απομονωθεί από καλλιέργειες αίματος και διάφορες κλινικές Μονάδες, ενώ η πλειοψηφία των R στελεχών (4/5), που προέρχονται από το νοσοκομείο N2, έχουν απομονωθεί κυρίως από δείγματα σιέλου από την Πνευμονολογική Μονάδα (Εικόνα 3.2.4, Εικόνα 3.2.5). Στην Εικόνα 3.2.6 που ακολουθεί, παρουσιάζεται η κατανομή των συνολικά 13 στελεχών (10/13 MDR και 3/13 R) με τον νέο φαινότυπο FEP<sub>R</sub>-CAZ<sub>S</sub> στα κλινικά δείγματα και στις Μονάδες των δύο νοσοκομείων, από όπου απομονώθηκαν.

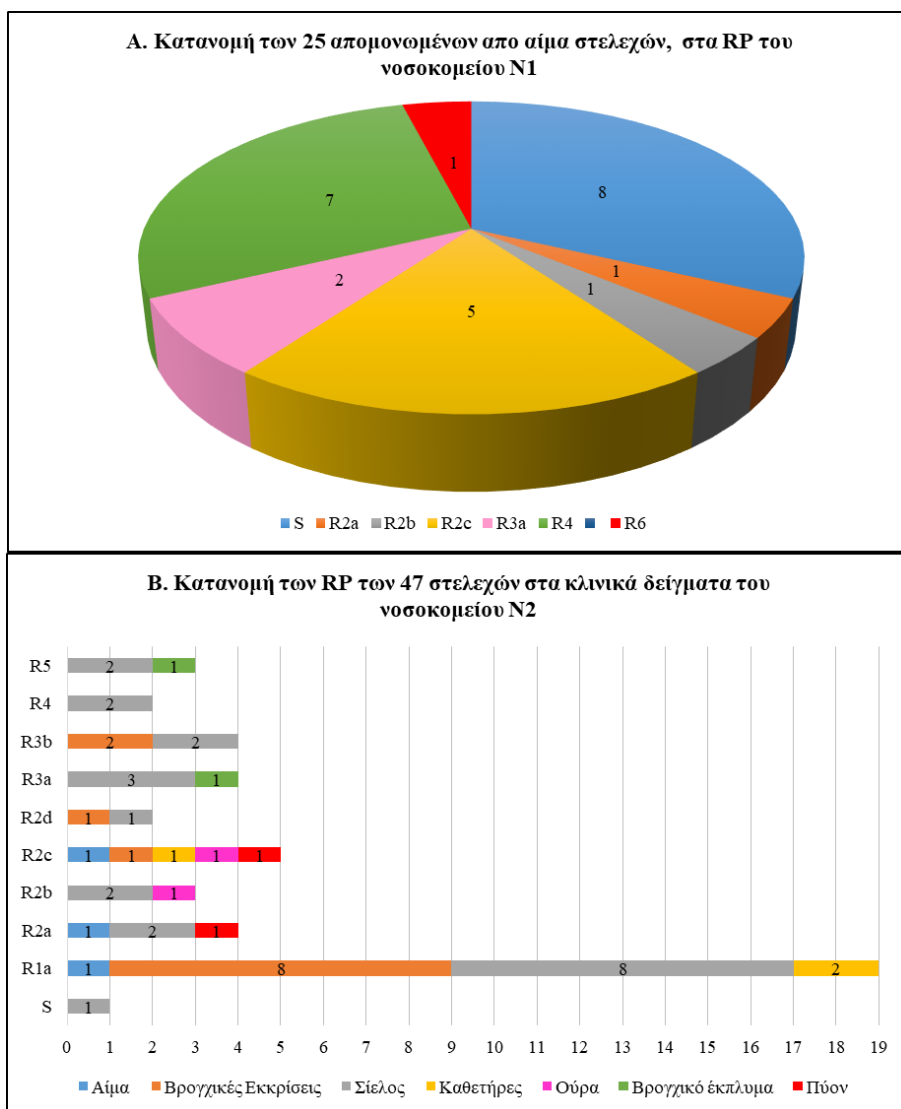


**Εικόνα 3.2.6:** Κατανομή των 13 *P. aeruginosa* στελεχών με φαινότυπο αντοχής FEP<sub>R</sub>-CAZ<sub>S</sub> (A) στις κλινικές πηγές και (B) στις κλινικές Μονάδες απομόνωσής τους από τα δυο νοσοκομεία N1 και N2.

*Αίμα\**: 2/3 στελέχη προέρχονται από το νοσοκομείο N1 και 1/3 από το νοσοκομείο N2.

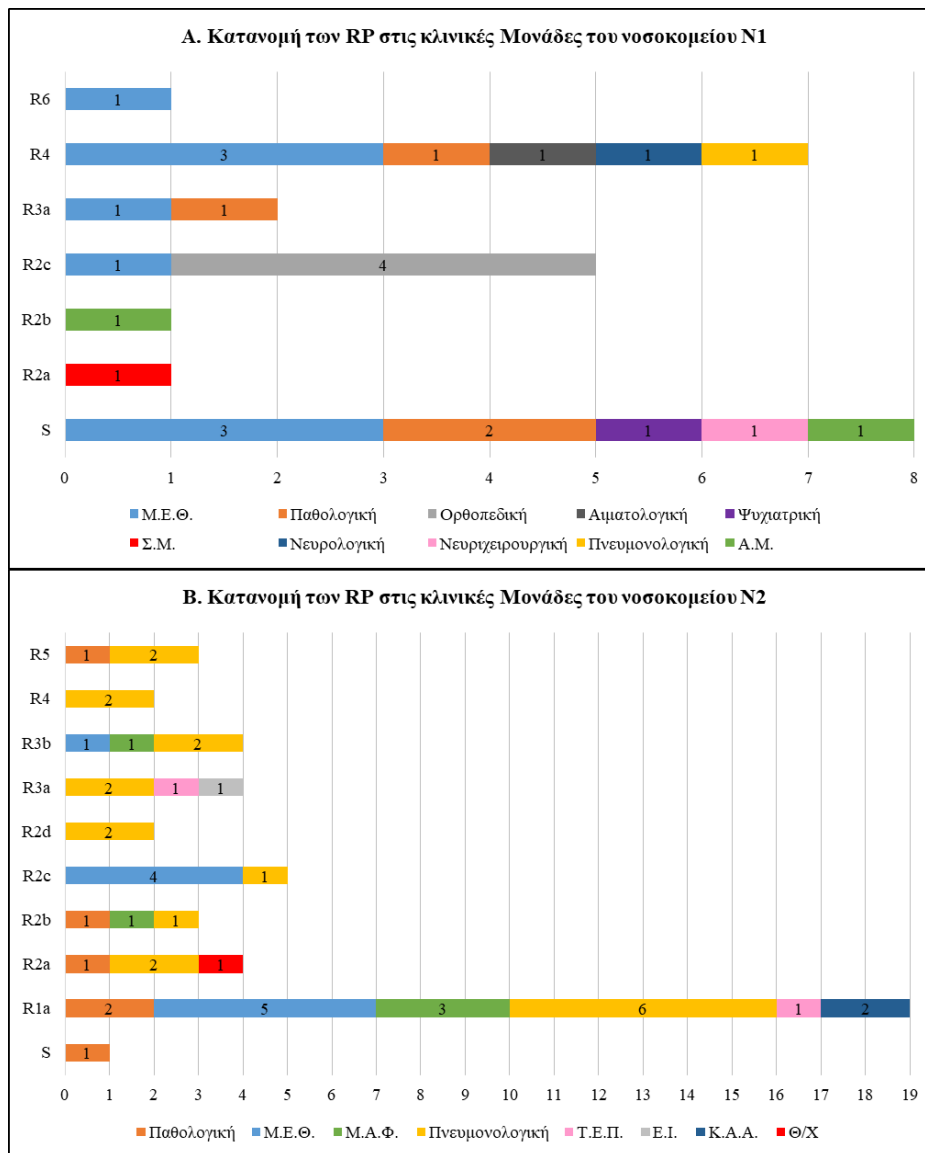
Θ/Χ: Θωρακοχειρουργική, Τ.Ε.Π.: Τμήμα Επιγόντων Περιστατικών, Ε.Ι.: Εξωτερικά Ιατρεία.

Το σύνολο των φαινοτύπων αντοχής (RP) που παρατηρήθηκε στο κάθε νοσοκομείο, παρουσιάζεται στις **Εικόνες 3.2.7 και 3.2.8** που ακολουθούν. Στην **Εικόνα 3.2.7** τα προφίλ αντοχής κατανέμονται στα διάφορα κλινικά δείγματα των νοσοκομείων στα οποία εμφανίστηκαν, ενώ η **Εικόνα 3.2.8** παρουσιάζει την κατανομή τους στις κλινικές Μονάδες των 2 νοσοκομείων. Αθροιστικά σημειώθηκαν 11 RP, εκ των οποίων 6/11 (S, R2a, R2b, R2c, R3a και R4) είναι κοινά και στα 2 νοσοκομεία, 1/11 εμφανίζεται μόνο στο νοσοκομείο N1 (RP R6) και 4/11 RP (R1a, R2d, R3b, και R5) υπάρχουν αποκλειστικά σε στελέχη του νοσοκομείου N2.





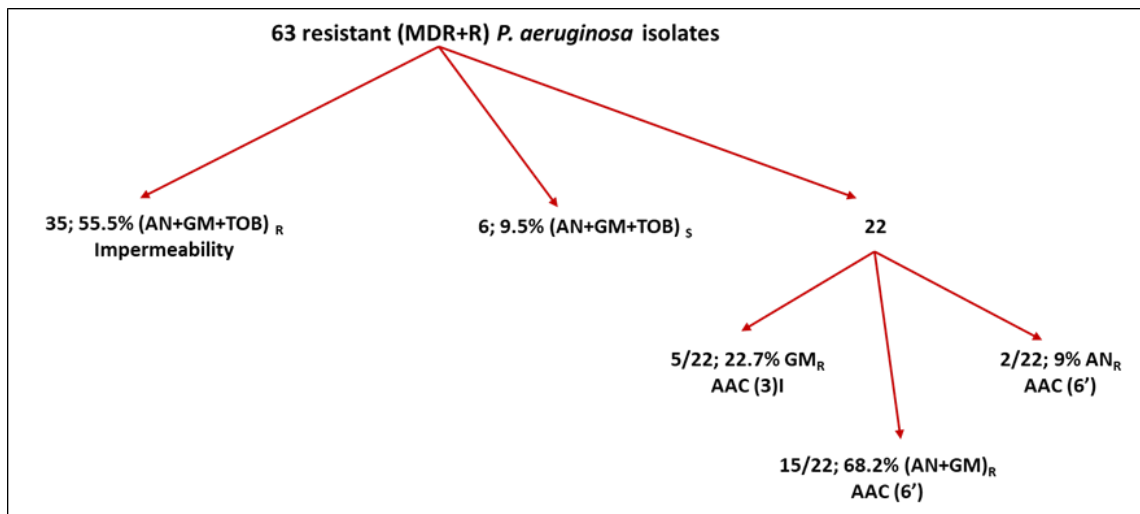
**Εικόνα 3.2.7:** Κατανομή των φαινοτύπων αντοχής (RP) στα κλινικά δείγματα (Α) του νοσοκομείου N1 και (Β) του νοσοκομείου N2.



**Εικόνα 3.2.8:** Κατανομή των φαινοτύπων αντοχής (RP) στις κλινικές Μονάδες (Α) του νοσοκομείου N1 και (Β) του νοσοκομείου N2.

*A.M.: Αγνωστη Μονάδα, Σ.Μ.: Στεφανιαία Μονάδα, Μ.Ε.Θ.: Μονάδα Εντατικής Θεραπείας, Θ/Χ: Θωρακοχειρουργική, Κ.Α.Α.: Κέντρο Αναπνευστικής Ανεπάρκειας, Ε.Ι.: Εξωτερικά Ιατρεία, Τ.Ε.Π.: Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών, Μ.Α.Φ.: Μονάδα Αυξημένης Φροντίδας.*

Τέλος, η πλειοψηφία των στελεχών έδωσε πλήρης αντοχή και στις 3 αμινογλυκοσίδες που ελέγχθηκαν, AN, GM και TOB, σε ποσοστό 55.5% (35/63 στελέχη), όπου σύμφωνα με τους Livermore D.M. και συνεργάτες αυτό εμφανίζεται σπάνια όταν υπάρχει αυξημένη έλλειψη διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης (Livermore D.M. και συνεργάτες 2002). Ευαίσθητα και στις τρεις αμινογλυκοσίδες ήταν μόνο 6 στελέχη (6/63, 9.5%), ενώ το υπόλοιπο 35% (22/63) έδωσε ευαισθησία στη TOB και αντοχή σε 1 [5/22, 22.7% GM<sub>R</sub> - 2/22, 9% AN<sub>R</sub>] ή και στις δυο άλλες αμινογλυκοσίδες [15/22, 68.2% (AN+GM)<sub>R</sub>] (Εικόνα 3.2.9, Πίνακας Π2).

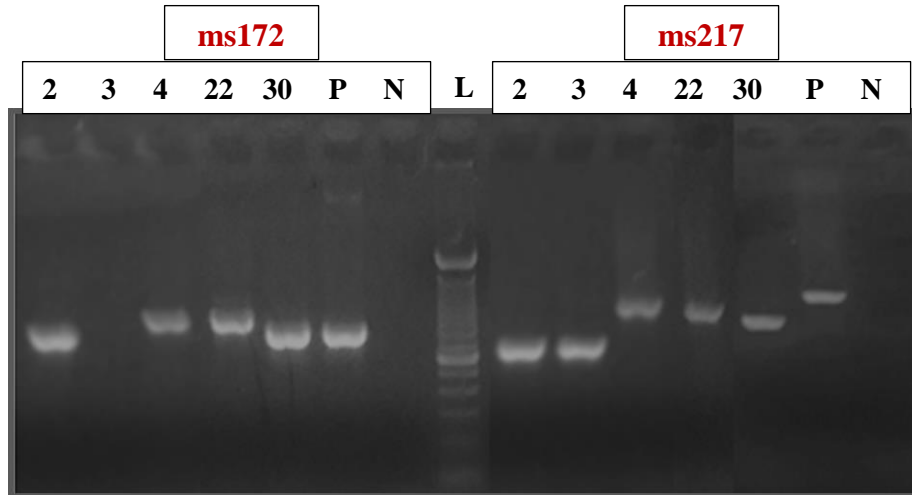


**Εικόνα 3.2.9:** Σχηματική απεικόνιση της κατανομής των παρατηρούμενων φαινοτύπων αντοχής στις αμινογλυκοσίδες των 63 ανθεκτικών *P. aeruginosa* στελεχών της συλλογής.

### 3.3 Double Locus Sequence Typing (DLST)

Σε συνολικά 74 στελέχη (συμπεριλαμβανομένων και των 2 στελεχών αναφοράς PAO1 και NEQAS), τα οποία έδωσαν θετικό αποτέλεσμα για το γονίδιο *16s rRNA* με την χρήση και των τριών ζευγών εκκινητών (βλέπε Παράγραφο 3.1), εφαρμόστηκε η τυποποιητική μέθοδος DLST για τους 2 γενετικούς τόπους *ms172*, *ms217*. Τα 73/74 στελέχη ήταν θετικά και για τους 2 γενετικούς τόπους, με τυποποιητικότητα περίπου ίση με  $\approx 99\%$  ( $73/74 \times 100\% = 98.6\%$ ). Ένα στέλεχος από την συλλογή (στέλεχος 3, 1.3%) (Πίνακας Π2) έδωσε θετικό αποτέλεσμα μόνο για τον γενετικό τόπο *ms217* (Εικόνα 3.3.1)

μετά από 3 επαναλήψεις και χαρακτηρίστηκε ως ατυποποίητο. Στην **Εικόνα 3.3.1** που ακολουθεί, παρουσιάζεται η ηλεκτροφορητική εικόνα επιλεγμένων στελεχών και τα αντίστοιχα μοριακά τους βάρη. Όπως ήταν αναμενόμενο, τα μοριακά βάρη μεταξύ των στελεχών ποικίλουν για τον κάθε γενετικό τόπο.



**Εικόνα 3.3.1:** Ηλεκτροφορητική εικόνα των στελεχών 2, 3, 4, 22, 30 για τους γενετικούς τόπους *ms172* και *ms217*. *P*: *PAO1*, *N*: αρνητικό control, *L*: Ladder.

### 3.4 Ανάλυση των δεδομένων που ελήφθησαν από την αλληλούχιση

Συνολικά 21 στελέχη (συμπεριλαμβανομένων και των 2 στελεχών αναφοράς *PAO1* και *NEQAS*), τα οποία έδωσαν θετικό αποτέλεσμα για το γονίδιο *16s rRNA* με την χρήση και των τριών ειδικών εκκινητών (*PA-SS-F/R*, *PA-GS-F/R* και *314F-518R*, **Πίνακας Π1**) και τυποποιήθηκαν επιτυχώς από το νέο τυποποιητικό σχήμα *DLST*, επιλέχθηκαν για αλληλούχιση. Η επιλογή των στελεχών έγινε με στόχο να αντιπροσωπεύουν ένα ευρύ φάσμα φαινοτύπων αντοχής, κλινικών δειγμάτων και Μονάδων στα 2 νοσοκομεία (**Πίνακας Π2**) και ο αριθμός των στελεχών που επιλέχθηκαν από το κάθε νοσοκομείο είναι εξίσου αντιπροσωπευτικός και ανάλογος του συνολικού αριθμού των στελεχών που έχουν συλλεχθεί από το καθένα (5/25 στελέχη από το νοσοκομείο *N1* και 14/47 στελέχη από το νοσοκομείο *N2*).

Η αλληλούχιση των προϊόντων της *PCR* για το *16s rRNA* γονίδιο πραγματοποιήθηκε με την χρήση των ειδικών εκκινητών για το είδος *P. aeruginosa*. Οι επεξεργασμένες αλληλουχίες υποβλήθηκαν σε *BLAST*-alignment και ταυτοποιήθηκαν ως

*P.aeruginosa*, καθώς εμφάνισαν 100% ομοιότητα (ή 99% σε χαμηλό ποσοστό) με τις 10 πρώτες καταχωρημένες *16s rDNA* αλληλουχίες με τις οποίες συγκρίθηκαν και οι οποίες ανήκουν στο είδος *P. aeruginosa*. Για τα 21 στελέχη πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση των 2 γενετικών τόπων *ms172* και *ms217* και έπειτα από επεξεργασία (Basset P. και συνεργάτες 2014), οι επεξεργασμένες αλληλουχίες υποβλήθηκαν στη βάση δεδομένων της DLST (<http://www.dlst.org/Paeruginosa/>) για τον καθορισμό του γονότυπου. Όλα τα στελέχη χαρακτηρίστηκαν με γνωστά allele numbers, καθώς σημειώθηκε ταύτιση των αλληλουχιών τους με κάποια από τα ήδη καταχωρημένα loci της βάσης DLST.

### **3.5 eBURST φυλογενετική ανάλυση και κατασκευή των minimum spanning trees**

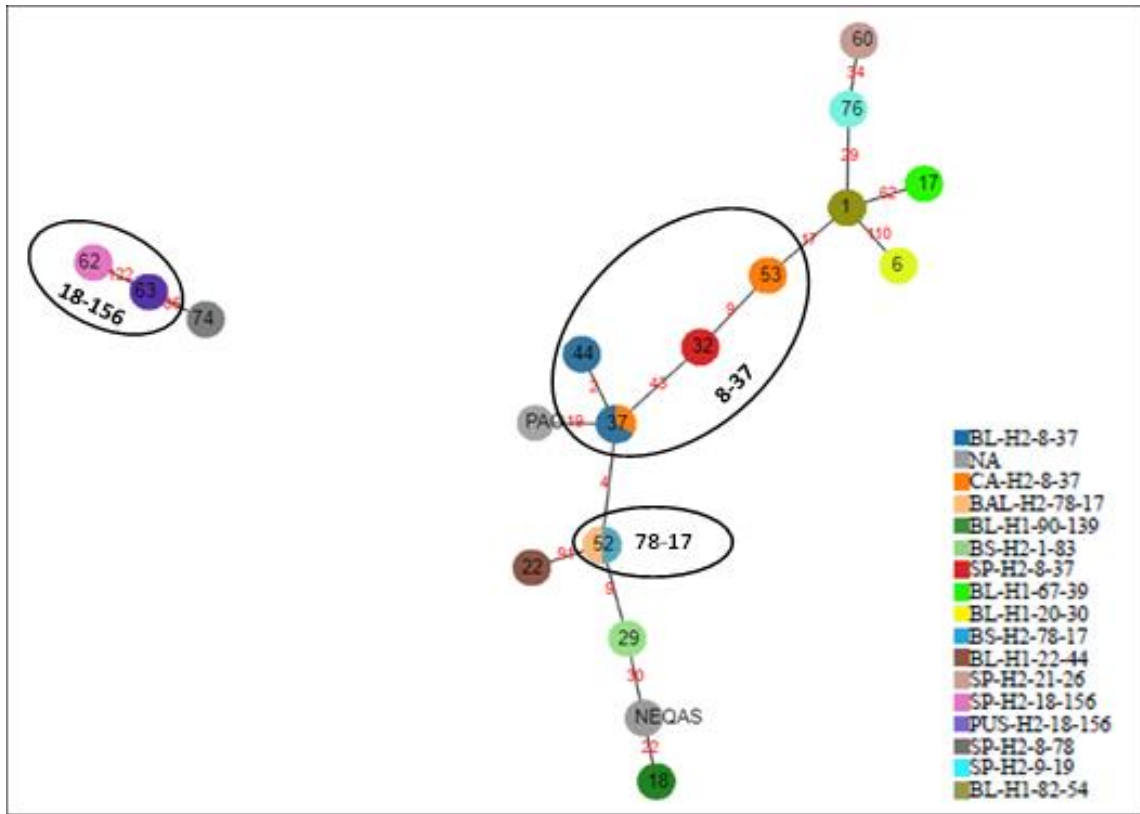
Συνολικά 21 στελέχη της συλλογής (συμπεριλαμβανομένων και των 2 στελεχών αναφοράς PAO1 και NEQAS), τα οποία επιλέχθηκαν για αλληλούχιση (βλέπε Παράγραφο 3.4), αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Global optimal eBURST. Η ανάλυση αποκάλυψε έναν κυρίαρχο τύπο, όπου το αλληλόμορφο 8 του γενετικού τόπου *ms172* παρουσιάστηκε συνδυασμένο με το αλληλόμορφο 37 του γενετικού τόπου *ms217* (DLST-type 8-37). Επιπλέον, το αλληλόμορφο 8 εμφανίστηκε συνδεδεμένο με το αλληλόμορφο 78 του γενετικού τόπου *ms217*, δημιουργώντας ένα διαφορετικό DLST-τύπο (8-78) για το στέλεχος 74 (**Εικόνα 3.5.1, Πίνακας 3.5.1**). Ο κυρίαρχος τύπος 8-37 παρουσιάστηκε σε 6/19 στελέχη της συλλογής, τα οποία προέρχονται αποκλειστικά από το Νοσοκομείο της Κεντρικής Ελλάδας (N2) και έχουν απομονωθεί από κλινικά δείγματα αίματος (3/6), σιέλου (1/6) και καθετήρες (2/6) (**Εικόνα 3.5.1, Πίνακας 3.5.1**). Στο νοσοκομείο N2 σημειώθηκαν και οι 2 αμέσως επόμενοι επικρατέστεροι DLST-τύποι: ο 78-17, σε 2/19 στελέχη απομονωμένα από δείγμα βρογχικών εκκρίσεων και βρογχικού εκπλύματος και ο τύπος 18-156, επίσης σε 2/19 στελέχη, απομονωμένα από κλινικό δείγμα σιέλου και πύον (**Εικόνα 3.5.1, Πίνακας 3.5.1**). Από τα υπόλοιπα 4 στελέχη του νοσοκομείου N2 που αναλύθηκαν, 3 στελέχη με DLST-τύπους 21-26, 8-78 και 9-19, προέρχονται από κλινικά δείγματα σιέλου και 1 στέλεχος, με τύπο 1-83, είναι απομονωμένο από δείγμα βρογχικών εκκρίσεων (**Εικόνα 3.5.1, Πίνακας 3.5.1**). Τα 5/19 υπό μελέτη στελέχη της συλλογής προέρχονται από το Νοσοκομείο της Βόρειας Ελλάδας (N1), απομονώθηκαν

αποκλειστικά από δείγματα αίματος και κατανέμονται σε ποσοστό 20% στους 5 DLST-τύπους: 82-54, 20-30, 67-39, 90-139 και 22-44 (**Εικόνα 3.5.1, Πίνακας 3.5.1**). Οι DLST-τύποι για τα στελέχη αναφοράς ήταν NEQAS: 32-39 και PAO1: 16-4 (**Εικόνα 3.5.1, Πίνακας 3.5.1**).

**Πίνακας 3.5.1:** Χαρακτηριστικά των 21 στελεχών *P. aeruginosa* (συμπεριλαμβανομένων και των 2 στελεχών αναφοράς PAO1 και NEQAS/ RS: Reference Strains) της συλλογής που χρησιμοποιήθηκαν για την eBURST ανάλυση και την κατασκευή των minimum spanning trees.

*BAL: Bronchial washing, H1: Hospital of Northern Greece, H2: Hospital of Central Greece.*

ID	Hospital	Source	Locus <i>ms172</i>	Locus <i>ms217</i>	Resistance Profile
1	H1	BLOOD	82	54	R3a: CARB-S, EDTA(-), AmpC, FEP R
6	H1	BLOOD	20	30	R6: CARB-R, EDTA(-), oprD, AmpC
17	H1	BLOOD	67	39	R2a: CARB-R, EDTA(-), FEP R
18	H1	BLOOD	90	139	R4: CARB-S, EDTA(-), AmpC
22	H1	BLOOD	22	44	R2c: CARB-R, EDTA(-)
29	H2	BRONCHIAL SECRETIONS	1	83	R1a: CARB-R, EDTA(+)
32	H2	SPUTUM	8	37	R2a: CARB-R, EDTA(-), FEP R
37	H2	CATHETER	8	37	R1a: CARB-R, EDTA(+)
43	H2	BLOOD	8	37	R2c: CARB-R, EDTA(-)
44	H2	BLOOD	8	37	R1a: CARB-R, EDTA(+)
51	H2	BLOOD	8	37	R2a: CARB-R, EDTA(-), AmpC, FEP R
52	H2	BRONCHIAL SECRETIONS	78	17	R1a: CARB-R, EDTA(+)
53	H2	CATHETER	8	37	R1a: CARB-R, EDTA(+), AmpC
57	H2	BAL	78	17	R5: CARB-S, EDTA(-), FEP R
60	H2	SPUTUM	21	26	S: AmpC
62	H2	SPUTUM	18	156	R1a: CARB-R, EDTA(+)
63	H2	PUS	18	156	R2c: CARB-R, EDTA(-)
74	H2	SPUTUM	8	78	R3a: CARB-S, EDTA(-), FEP R
76	H2	SPUTUM	9	19	R5: CARB-S, EDTA(-), AmpC, FEP R
PAO1	Collection of Institute Pasteur CIP104116		16	4	
NEQAS	HPA External Quality Control Scheme		32	39	



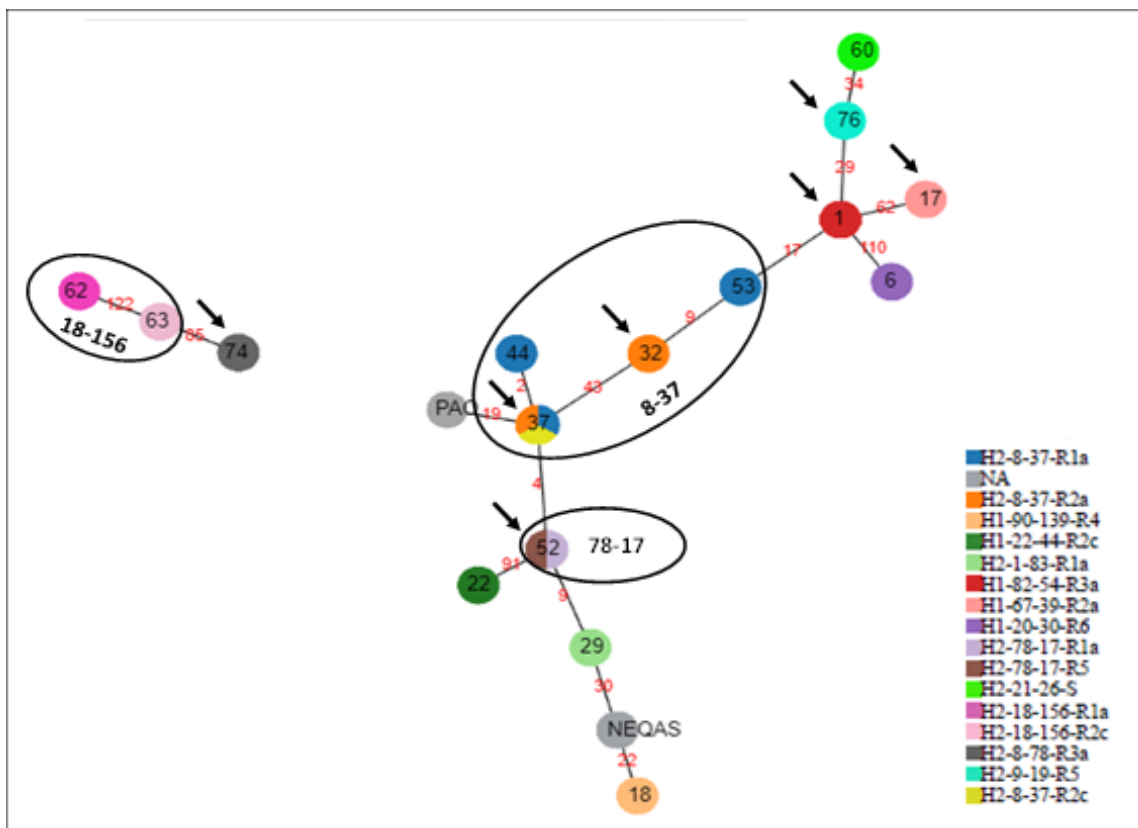
**Εικόνα 3.5.1:** Minimum Spanning φυλογενετική ανάλυση των 21 *P. aeruginosa* στελεχών (συμπεριλαμβανομένων και των 2 στελεχών αναφοράς PAO1 και NEQAS) βασισμένη στα δεδομένα της DLST. Παρουσιάζεται η κατανομή των DLST-τύπων στα ποικίλα κλινικά δείγματα των νοσοκομείων N1 και N2.

*BL: Blood, CA: Catheter, BAL: Bronchial washing, BS: Bronchial secretions, SP: Sputum, NA: Not applicable, H1: Hospital of Northern Greece, H2: Hospital of Central Greece.*

Τα 19 υπό μελέτη στελέχη της συλλογής κατατάσσονται σε 8 διαφορετικά προφίλ αντοχής (Resistant profiles, RP), εκ των οποίων οι R4 και R6, εντοπίζονται μόνο στα στελέχη του νοσοκομείου N1, οι φαινότυποι R1a, S και R5 εμφανίζονται μόνο στο νοσοκομείο N2 και τέλος, οι 3 φαινότυποι R3a, R2a και R2c σημειώνονται και στα 2 νοσοκομεία (**Εικόνα 3.5.2, Πίνακας 3.5.1**). Ο φαινότυπος R1a εντοπίζεται αποκλειστικά στο νοσοκομείο N2 σε 6/19 της συλλογής, εκ των οποίων τα 3 στελέχη ανήκουν στον κυρίαρχο DLST-τύπο 8-37, 2 στελέχη κατατάσσονται στους αμέσως επόμενους επικρατέστερους τύπους 78-17 και 18-156 και τέλος, 1 στέλεχος ανήκει στον DLST-τύπο 1-83 (**Εικόνα 3.5.2, Πίνακας 3.5.1**). Ακολουθεί ο φαινότυπος R2a που εμφανίζεται σε

3/19 στελέχη: 1 στέλεχος από το νοσοκομείο N1 με DLST-τύπο 67-39 και σε 2 στελέχη από το νοσοκομείο N2, που κατατάσσονται στον κυρίαρχο DLST-τύπο 8-37 (**Εικόνα 3.5.2, Πίνακας 3.5.1**). Ο φαινότυπος R2c σημειώνεται επίσης σε 3/19 στελέχη της συλλογής, εκ των οποίων το 1 προέρχεται από το νοσοκομείο N1 και έχει γονότυπο 22-44, ενώ τα υπόλοιπα 2 είναι από το νοσοκομείο N2 και ανήκουν στον κυρίαρχο DLST-τύπο 8-37 και στον 2<sup>ο</sup> επικρατέστερο τύπο 18-156 (**Εικόνα 3.5.2, Πίνακας 3.5.1**). Τέλος, ο φαινότυπος R3a που εμφανίζεται σε 2/19 στελέχη, ο R5 που σημειώνεται επίσης σε 2/19 στελέχη και οι 3 φαινότυποι αντοχής S, R6 και R4, που εμφανίζονται σε 1 στέλεχος έκαστος, κατανέμονται σε 7 διαφορετικούς DLST-τύπους, οι οποίοι είναι διασκορπισμένοι στα 2 υπό μελέτη νοσοκομεία. (**Εικόνα 3.5.2, Πίνακας 3.5.1**).

Η κατανομή του νέου φαινοτύπου FEP<sub>R</sub>-CAZ<sub>S</sub> στους DLST-τύπους των στελεχών, παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.5.2**. Ο νέος φαινότυπος εντοπίζεται σε 7/19 στελέχη, τα οποία κατατάσσονται σε 6 διαφορετικούς DLST-τύπους: Στον κυρίαρχο DLST-τύπο 8-37 ανήκουν 2/7 στελέχη (32 και 51- R2a), ένα στέλεχος (57- R5) στο 2<sup>ο</sup> επικρατέστερο τύπο 78-17, ενώ τα υπόλοιπα 4/7 FEP<sub>R</sub>-CAZ<sub>S</sub> στελέχη (1 και 74- R3a, 17- R2a και 76- R5) κατατάσσονται στους 4 διαφορετικούς DLST-τύπους 82-54, 8-78, 67-39 και 9-19, αντίστοιχα (**Εικόνα 3.5.2**).



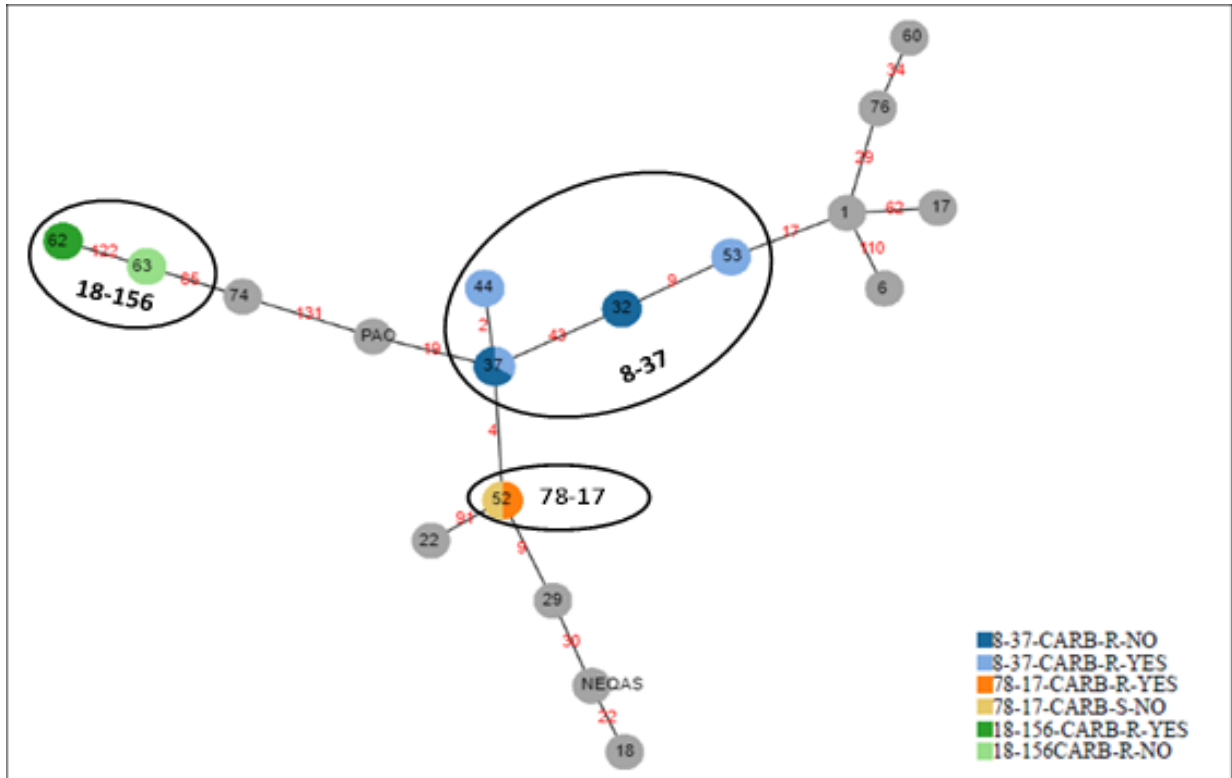
**Εικόνα 3.5.2:** Minimum Spanning φυλογενετική ανάλυση των 21 *P. aeruginosa* στελεχών (συπεριλαμβανομένων και των 2 στελεχών αναφοράς PAO1 και NEQAS), όπου παρουσιάζεται η κατανομή των φαινοτύπων αντοχής στους διάφορους DLST-τύπους των νοσοκομείων N1 και N2. Τα στελέχη με τον νέο φαινότυπου FEP<sub>R</sub>-CAZ<sub>S</sub> σημειώνονται με βέλη.

NA: Not applicable, H1: Hospital of Northern Greece, H2: Hospital of Central Greece.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, VIM producers στελέχη [φαινότυπος CARB<sub>R</sub>/EDTA(+)- R1a] εντοπίστηκαν αποκλειστικά στο νοσοκομείο N2. Από τα 14 στελέχη του νοσοκομείου N2 που αναλύθηκαν, 6 είναι θετικά για την παραγωγή μέταλλο-β-λακταμασών και κατανέμονται στους 3 κύριους DLST-τύπους 8-37 (3/6), 78-17 (1/6), 18-156 (1/6) (**Εικόνα 3.5.3**) και στον τύπο 1-83 (1/6) (**Πίνακας 3.5.1**). Τα υπόλοιπα 8/14 στελέχη της συλλογής του νοσοκομείου, τα μισά στελέχη χαρακτηρίστηκαν ως CARB<sub>R</sub>/EDTA(-), δηλαδή αρνητικά στην παραγωγή μέταλλο-β-λακταμασών και τοποθετούνται στον κυρίαρχο DLST-τύπο 8-37 με ποσοστό 75% (3/4) και στον αμέσως επόμενο επικρατέστερο τύπο 18-156 με ποσοστό 25% (1/4) (**Εικόνα 3.5.3**), ενώ τα άλλα μισά στελέχη ήταν CARB<sub>S</sub> (3/4) και S (1/4), τα οποία είναι διασκορπισμένα σε 4 DLST-



τύπους του νοσοκομείου (Πίνακας 3.5.1). Όσον αφορά το νοσοκομείο N1, τα 3/5 στελέχη που χαρακτηρίστηκαν ως CARB<sub>R</sub> είναι VIM(-) και ανήκουν στους τύπους 20-30, 22-44 και 67-39 (Πίνακας 3.5.1). Τα υπόλοιπα 2/5 στελέχη του νοσοκομείου έχουν φαινότυπο CARB<sub>S</sub> και κατατάσσονται σε 2 DLST-τύπους (Πίνακας 3.5.1).



**Εικόνα 3.5.3:** Minimum Spanning φυλογενετική ανάλυση βασισμένη στα δεδομένα της DLST. Παρουσιάζεται η κατανομή των CARB<sub>R</sub>/EDTA(+) και των CARB<sub>R</sub>/EDTA(-) στους 3 επικρατέστερους DLST-τύπους. *NA: Not applicable, YES: EDTA(+), NO: EDTA(-).*

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία συλλέχθηκαν, απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν, καλλιεργητικά και μοριακά με την αλληλούχιση περιοχών του *16s rRNA* γονιδίου (Spilker P. και συνεργάτες 2004, Fothergill J.L. και συνεργάτες 2008), κλινικά στελέχη του βακτηρίου *P. aeruginosa*. Για τα επιβεβαιωμένα στελέχη, προσδιορίστηκε στη συνέχεια το προφίλ αντοχής τους και ο προσδιορισμός των πιθανών μηχανισμών αντοχής σύμφωνα με τα φαινοτυπικά τους χαρακτηριστικά. Τέλος, εφαρμόστηκε το τυποποιητικό σχήμα Double Locus Sequence Typing (DLST) των Basset P. & Blanc D.S. (2014) για τον προσδιορισμό των γενετικών προφίλ των στελεχών, αλλά και για περαιτέρω μελέτη της διασποράς των φαινοτυπικών προφίλ στα γενετικά προφίλ που προέκυψαν κατά τη φυλογενετική μελέτη.

### 4.1 Μοριακή Ταυτοποίηση με αλληλούχιση του *16s rDNA*

Η αλληλούχιση του *16s rRNA* γονιδίου θεωρείται ο «χρυσός κανόνας» (Gold standard) στον καθορισμό των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των βακτηρίων και έχει εφαρμοστεί σε πολυάριθμες μελέτες (Chun J. & Goodfellow M. 1995, Anzai Y. και συνεργάτες 2000, Liu L. και συνεργάτες 2002, Nakayama A. και συνεργάτες 2005, Gong J. και συνεργάτες 2007, Kalita M. και συνεργάτες 2017). Το γονίδιο διαθέτει υψηλό βαθμό σταθερότητας και συντήρησης, επηρεάζεται σε ελάχιστο βαθμό από την οριζόντια μεταφορά γονιδίων και συνεπώς, αποτελεί τον πιο κατάλληλο συντηρημένο γενετικό δείκτη για την φυλογενετική ανάλυση και ταξινόμηση βακτηριακών στελεχών σε πολλαπλά επίπεδα (όπως γένη, είδη και υποείδη) (Woo P.C.Y. και συνεργάτες 2008, Bodilis J. και συνεργάτες 2012). Η μοριακή ανάλυση της *16s rDNA* αλληλουχίας παρέχει υψηλής ακρίβειας ταυτοποίηση με ταχύτερα και πιο αξιόπιστα αποτελέσματα σε σύγκριση με άλλες συμβατικές μεθόδους (Clarridge J.E. 2004, Asghari F.B. και συνεργάτες 2013). Στην παρούσα ερευνητική μελέτη, η μέθοδος εφαρμόστηκε σε συνολικά 77 στελέχη *P. aeruginosa*, τα οποία προήλθαν από 2 νοσοκομεία: Νοσοκομείο της Βόρειας Ελλάδας (N1, 27/77 στελέχη) και Νοσοκομείο της Κεντρικής Ελλάδας (N2, 50/77 στελέχη), καθώς και

στα δύο στελέχη αναφοράς PAO1 και NEQAS. Τα στελέχη της συλλογής έχουν απομονωθεί από ποικίλα βιολογικά δείγματα και διαφορετικές μονάδες των δύο νοσοκομείων, στο χρονικό διάστημα 2016-2017 (**Εικόνα 2.5.1, Πίνακας Π2**). Η ανίχνευση του *16s rRNA* γονιδίου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση 3 διαφορετικών ζευγών εκκινητών, ειδικών για το είδος *P. aeruginosa*, το γένος *Pseudomonas* (Spilker T. και συνεργάτες 2004, Fothergill J.L. και συνεργάτες 2008) και τα βακτήρια (Fothergill J.L. και συνεργάτες 2008) (**Πίνακας Π1**). Τα 74/79 στελέχη της συλλογής (συμπεριλαμβανομένων και των 2 στελεχών αναφοράς PAO1 και NEQAS) έδωσαν θετικό αποτέλεσμα για το γονίδιο *16s rRNA* και με τα 3 ζεύγη των εκκινητών, ενώ 5/79 στελέχη ήταν θετικά μόνο για το γένος *Pseudomonas* και το βασιλείο βακτήρια, όμως όχι για το είδος *P. aeruginosa* (**Πίνακας Π2**).

Οι ειδικοί εκκινητές για το είδος *P. aeruginosa* (PA-SS-F/R, **Πίνακας Π1**) είναι συμπληρωματικοί αντίστοιχα για τις υπερμεταβλητές περιοχές V2 και V8 του γονιδίου *16s rRNA*, των οποίων οι αλληλουχίες (signature sequences) είναι ειδικές για τη μοριακή ταυτοποίηση του είδους *P. aeruginosa*, τη διαφοροποίηση του από άλλα είδη βακτηρίων αυξάνοντας έτσι την διακριτική ικανότητα της μεθόδου (Spilker T. και συνεργάτες 2004, Bodilis J. και συνεργάτες 2012). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί πως η ευαισθησία και η ακρίβεια της μεθόδου με την χρήση των συγκεκριμένων εκκινητών ισούται με 100% (Spilker T. και συνεργάτες 2004), γεγονός που ενισχύει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης. Συνεπώς, τα 5 στελέχη της συλλογής που έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα για το είδος *P. aeruginosa* με τη χρήση των συγκεκριμένων εκκινητών, θεωρήθηκαν πως δεν ανήκουν στο είδος *P. aeruginosa* αλλά πιθανόν σε κάποιο άλλο είδος. Πολυάριθμες μελέτες υποστηρίζουν ότι η μοριακή ανάλυση του *16s rRNA* γονιδίου προσφέρει υψηλής ακρίβειας ταυτοποίηση σε σύγκριση με άλλες φαινοτυπικές ή βιοχημικές μεθόδους ταυτοποίησης που χρησιμοποιούνται σε επίπεδο ρουτίνας στα κλινικά εργαστήρια (Clarridge J.E. 2004, Spilker T. και συνεργάτες 2004, Janda J.M. και συνεργάτες 2007, Kim M. και συνεργάτες 2008, Rajendhran J. & Gunasekaran P. 2011, De Melo Oliveira M.J. και συνεργάτες 2013). Επίσης, στην μελέτη των Spilker T. και συνεργάτες (2004) αναφέρονται πολλές περιπτώσεις λανθασμένης αρχικής ταυτοποίησης του βακτηρίου *P. aeruginosa* με εφαρμογή εμπορικών τεστ και άλλων φαινοτυπικών μεθόδων, οι οποίες επιβεβαιώθηκαν με εφαρμογή ανίχνευσης του *16s rRNA* γονιδίου και

την χρήση των ειδικών εκκινητών για το είδος *P. aeruginosa* (PA-SS-F/R, Πίνακας Π1) και το γένος *Pseudomonas* (PA-GS-F/R, Πίνακας Π1) που χρησιμοποιήθηκαν και στη παρούσα μελέτη (Spilker T. και συνεργάτες 2004). Λαμβάνοντας υπ' όψιν την αποδεδειγμένη υψηλή αξιοπιστία και διακριτική ικανότητα της μεθόδου, τα 5 στελέχη που έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα με τη χρήση των ειδικών εκκινητών για το είδος *P. aeruginosa*, δεν συμπεριλήφθηκαν στην περαιτέρω μελέτη των στελεχών.

## 4.2 Έλεγχος Μικροβιακής Ευαισθησίας

Κατά τον έλεγχο της μικροβιακής ευαισθησίας του υπό εξέταση πληθυσμού, η πλειοψηφία των στελεχών εμφάνισε Πολυαντοχή (MDR: 50/72, 69.5%) στα ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιψευδομονικά [κυρίως απομονωμένων από το νοσοκομείο N2 (41/50 στελέχη)], ενώ ένα αρκετά χαμηλότερο ποσοστό χαρακτηρίστηκε ως Ανθεκτικό (R: 13/72, 18%), σύμφωνα πάντα με τους επίσημους ορισμούς που δίνονται από τους Magiorakos A.P. και συνεργάτες (Magiorakos A.P. και συνεργάτες 2011). Τέλος, υπήρχε και ένα μικρό ποσοστό που ήταν ευαίσθητο σε όλα τα αντιβιοτικά που μελετήθηκαν (S: 9/72, 12.5%) (Εικόνα 3.2.3, Πίνακας Π2). Η συρροή των πολύ-ανθεκτικών στελεχών στο νοσοκομείο N2, λαμβάνοντας υπόψη την ανισοκατανομή του υπό εξέταση βακτηριακού πληθυσμού, θα μπορούσε να εξηγηθεί γεωγραφικά, από το μέγεθος του νοσοκομείου και τις διαφορετικές κλινικές που διαθέτει το καθένα, αλλά κυρίως από τα διαφορετικά χαρακτηριστικά των ασθενών που εξυπηρετεί το κάθε νοσοκομείο. Σίγουρα, μια εμπειριστατωμένη επιδημιολογική μελέτη λαμβάνοντας υπόψη τα ιστορικά των ασθενών, εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες, αλλά και αυξάνοντας τον αριθμό των στελεχών από τη Βόρεια Ελλάδα, θα δώσει μια πιο σαφή εικόνα της κατανομής των μικροβιακών προφίλ αντοχής στα υπό μελέτη νοσοκομεία.

Η πολυαντοχή των κλινικών *P. aeruginosa* στελεχών είναι ένα θέμα καλά μελετημένο και η βιβλιογραφία είναι πλούσια σε σχετική πληροφορία (Livermore D.M., 2002, Driscoll J.A. και συνεργάτες 2007, Strateva T. & Yordanov D. 2009, Laxminarayan R. και συνεργάτες 2013, Meletis G. & Bagkeri M. 2013). Αποτελεί ένα παγκόσμιο πρόβλημα, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας, το οποίο έχει αυξήσει την θνησιμότητα και την μακρά νοσηλεία των ασθενών, κυρίως των ανοσοκατασταλασμένων, και ως συνέπεια το κόστος της Δημόσιας Υγείας (Laxminarayan R. και συνεργάτες 2013,

Meletis G. & Bagkeri M. 2013, Maraki S. και συνεργάτες 2015). Δυστυχώς όμως ακόμη και σήμερα οι επιστημονικές ομάδες δυσκολεύονται να περιορίσουν τόσο το φαινόμενο της πολυαντοχής του βακτηρίου όσο και την απόκτηση νέων επίκτητων μηχανισμών και την μετάδοση αυτών σε άλλους μικροοργανισμούς. Πολλές μελέτες ισχυρίζονται ότι αυτό οφείλεται κυρίως στο μεγάλο γενετικό υλικό που διαθέτει το βακτήριο, το οποίο του προσφέρει υψηλή γενετική ικανότητα στο να προσαρμόζεται σε περιβαλλοντικές αλλαγές και να επιβιώνει παντού, ακόμη και σε περιβάλλοντα φτωχά σε διατροφικά συστατικά (Stover C.K. και συνεργάτες 2000, Al- Daraghi W.A. & Abdullah Z.H. 2013, Tümmler B. και συνεργάτες 2014).

Οι καρβαπενέμες είναι τα πιο διαδεδομένα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στη κλινική πράξη για την αντιμετώπιση των βακτηριακών λοιμώξεων (Livermore D.M. 2002, Morill H.J. και συνεργάτες 2015, Potter R.F. και συνεργάτες 2016), ενώ η αντοχή των *P. aeruginosa* στελεχών σε αυτές αποτελούν πάντα ένα σοβαρό πρόβλημα για τον κλινικό γιατρό. Στον υπό εξέταση πληθυσμό της παρούσας εργασίας, το 82% των MDR στελεχών χαρακτηρίστηκε ως CARB<sub>R</sub> δίνοντας αντοχή σε μία ή και στις δυο καρβαπενέμες που ελέγχθηκαν (IPM+MEM) (**Εικόνα 3.2.3, Πίνακας Π2**). Το υψηλό ποσοστό των ανθεκτικών στελεχών στις καρβαπενέμες στην Ελλάδα δεν αποτελεί έκπληξη καθώς, σύμφωνα με τα δεδομένα του WHONET (The Greek System for the Surveillance of Antimicrobial Resistance, [www.mednet.gr/whonet/](http://www.mednet.gr/whonet/)) για το 1<sup>ο</sup> εξάμηνο του 2016, ανάλυση *P. aeruginosa* στελεχών απομονωμένα από αιμοκαλλιέργειες από διάφορα νοσοκομεία και κλινικές της Ελλάδας δείχνει ότι τα CARB<sub>R</sub> εμφανίζονται σε ποσοστό  $\geq 50\%$  (**Πίνακας 4.1**)· παράλληλα τα δεδομένα αυτά ενισχύονται και από την βιβλιογραφία (Samonis G. και συνεργάτες 2012, Liakopoulos A. και συνεργάτες 2013).

**Πίνακας 4.1:** Ποσοστά CARB<sub>R</sub> *P. aeruginosa* στελεχών απομονωμένα από αιμοκαλλιέργειες από διάφορα νοσοκομεία/κλινικές της Ελλάδας το 1<sup>ο</sup> εξάμηνο του 2016. Τα δεδομένα αποστέλλονται από τα νοσοκομεία στην ομάδα του WHONET GREECE για περαιτέρω μελέτη και επεξεργασία (<http://www.mednet.gr/whonet/>).

All ward types (incidence per 10,000 patient days)										
Isolated organism	*Weighted Average	GR027	GR001	GR011	GR032	GR007	GR005	GR037	GR048	GR031
		(NoB:486)	(NoB:501)	(NoB:352)	(NoB:200)	(NoB:305)	(NoB:341)	(NoB:500)	(NoB:239)	(NoB:410)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3,10	2,84	3,58	1,69	4,93	3,37	0,56	2,66	0,44	4,66
» <i>A. baumannii</i> [Carbapenem resistant]	2,95	2,68	3,35	0,68	4,93	3,37	0,56	2,49	0,44	4,33
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,59	2,21	1,85	0,34	3,94	3,57	2,24	3,32	0,00	2,83
» <i>P. aeruginosa</i> [Carbapenem resistant]	1,05	1,26	1,04	0,00	2,96	2,18	0,84	0,66	0,00	0,83
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4,19	2,68	3,46	1,01	5,92	3,37	4,76	3,49	0,00	4,16
» <i>K. pneumoniae</i> [Carbapenem resistant]	2,86	1,10	2,42	0,00	4,44	2,38	3,36	2,66	0,00	2,83

Ένας από τους πιο κοινούς επίκτητους μηχανισμούς αντοχής που εμφανίζεται στο βακτήριο *P. aeruginosa* είναι η παραγωγή της μέταλο-β-λακταμάσης VIM, η οποία πρώτο-χαρακτηρίστηκε από τους Lauretti L. και συνεργάτες στην Ιταλία το 1999 και από τότε έχει εξαπλωθεί σχεδόν σε όλη την Ευρώπη [Lauretti L. και συνεργάτες 1999, The European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS), <http://www.rivm.nl/earss/>]. Στην Ελλάδα ο μηχανισμός πρώτο-παρατηρήθηκε σε κλινικά στελέχη *P. aeruginosa*, όπου εντοπίστηκε η VIM-2 MBL από τους Tsakris A. και συνεργάτες το 2000 (Tsakris A. και συνεργάτες 2000). Στη συνέχεια, η εξάπλωση της VIM-2 MBL ήταν ραγδαία, καθώς κωδικοποιείται από γονίδιο που εδράζεται σε ιντεγκρόνιο τάξης 1 και μεταφέρεται εξαιρετικά εύκολα από στέλεχος σε στέλεχος (Giakkouri P. και συνεργάτες 2003, Siarkou V.I. και συνεργάτες 2009, Koutsogiannou M. και συνεργάτες 2013). Ο υπό εξέταση πληθυσμός της παρούσας εργασίας εξετάστηκε φαινοτυπικά για την παραγωγή MBL με εφαρμογή του EDTA test (Giakkouri P. και συνεργάτες 2008). Το 46.35% των CARB<sub>R</sub> στελεχών ήταν θετικό κατά την φαινοτυπική δοκιμή [EDTA(+)- R1a] και θεωρήθηκαν VIM-2 producers σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά και τους ορισμούς της διεθνής βιβλιογραφίας (Tsakris A. και συνεργάτες 2000, Giakkouri P. και συνεργάτες 2003, Koutsogiannou M. και συνεργάτες 2013, Kazmlerczak K.M. και συνεργάτες 2016) (Εικόνα 3.2.3, Πίνακας Π2). Στον υπό εξέταση πληθυσμό, στελέχη VIM-2 producers εντοπίστηκαν αποκλειστικά στο νοσοκομείο N2 και σχεδόν αποκλειστικά από κλινικά δείγματα ασθενών των Πνευμονολογικών Μονάδων και των Μονάδων Εντατικής Θεραπείας. Το βακτήριο είναι γνωστό ότι αποικίζει τους

πνεύμονες ασθενών με Κυστική Ίνωση με πολύ-ανθεκτικά στελέχη VIM-2 producers (Stefani S. και συνεργάτες 2017), αλλά είναι ευρέως διαδεδομένο και σε ασθενείς με άλλα αναπνευστικά προβλήματα (Horianopoulou M. και συνεργάτες 2006, Guzek A. και συνεργάτες 2017). Έτσι, η απομόνωση στελεχών MDR/VIM-2 producers από κλινικά δείγματα όπως πτύελα και βρογχικές εκκρίσεις δεν αποτέλεσε έκπληξη, παρόλο που είναι η πρώτη φορά που ο συγκεκριμένος *P. aeruginosa* πληθυσμός του νοσοκομείου N2 εξετάζεται ως προς τη παραγωγή MBL.

Το υπόλοιπο 53.65% των CARB<sub>R</sub> στελεχών ήταν αρνητικό κατά την φαινοτυπική δοκιμή [EDTA(-)] και μελετήθηκε για άλλους μηχανισμούς αντοχής οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την αντοχή στις καρβαπενέμες. Η φαινοτυπική επεξεργασία των στελεχών σε συνδυασμό με άρθρα της διεθνούς βιβλιογραφίας ξεχώρισε έναν νέο φαινότυπο, τον FEP<sub>R</sub>- CAZ<sub>S</sub> (Εικόνα 3.2.3, Πίνακας Π2), ο οποίος αναφέρθηκε πρώτη φορά σε ένα κλινικό στέλεχος *P. aeruginosa* απομονωμένο από δείγμα ορθικού και συνδέθηκε με την παραγωγή μιας οξασιλλινάσης (καρβαπενεμάση κλάσης D), την OXA-31 (Aubert D. και συνεργάτες 2001). Από τότε ο συγκεκριμένος φαινότυπος έχει αναφερθεί άλλες δυο φορές σε κλινικά στελέχη *P. aeruginosa* απομονωμένα από δείγματα του αναπνευστικού συστήματος και από τραύματα και συνδέθηκαν και στις δυο περιπτώσεις με υπρέκφραση καναλιών και με μια ευρέου φάσματος β-λακταμάση (MexCD-OprJ, MexAB-OprM, integron based PSE-1 b-lactamase) (Peña C. και συνεργάτες 2009, Esquisabel C.A.B. και συνεργάτες 2011), ποτέ όμως δεν έχει παρατηρηθεί σε *P. aeruginosa* πληθυσμό από τα Ελληνικά νοσοκομεία. Στη παρούσα εργασία ο φαινότυπος FEP<sub>R</sub>- CAZ<sub>S</sub> εμφανίζεται κυρίως στο νοσοκομείο N2 στην Κεντρική Ελλάδα από κλινικά δείγματα ασθενών των πνευμονολογικών μονάδων, αλλά και σε δύο στελέχη αιμοκαλλιέργειας από το νοσοκομείο N1 στη Βόρεια Ελλάδα (Εικόνα 3.2.6, Πίνακας Π2).

Στους υπόλοιπους μηχανισμούς αντοχής για τα CARB<sub>R</sub>/ EDTA(-) ανήκουν εγγενής μηχανισμοί αντοχής, όπως υπερπαραγωγή της χρωσομοσωμικής AmpC β-λακταμάσης, απώλεια της πορίνης D και υπρέκφραση καναλιών, ιδιαίτερα συχνόι σε κλινικά στελέχη *P.aeruginosa* (Bonomo R.A. και συνεργάτες 2006, Ikonmidis A. και συνεργάτες 2008, Cabot G. και συνεργάτες 2011), ενώ στο 50% αυτών πιθανολογείται η παραγωγή ευρέου φάσματος β-λακταμασών (Vourli S. και συνεργάτες 2004, Ranellou K. και συνεργάτες

2011, Sarwat T. και συνεργάτες 2015) (**Εικόνα 3.2.3, Πίνακας Π2**) ή και συνδυασμός των παραπάνω με τελικό μικροβιακό προφίλ την αντοχή στις καρβαπενέμες.

Όσον αφορά το 36% των CARB<sub>R</sub> + R, όπου παρατηρήθηκε παράλληλη έκφραση όλων των παραπάνω μηχανισμών αντοχής, θεωρείται αναμενόμενο, καθώς η διασπορά των στελεχών και κατ' επέκταση των μηχανισμών αντοχής στα διάφορα κλινικά τμήματα είναι πλέον καθεστώς, ένα θέμα καλά μελετημένο και επίκαιρο (Sarwat T. και συνεργάτες 2015, Sharma N. και συνεργάτες 2016). Η επιδημιολογική συσχέτιση των στελεχών της παρούσας εργασίας με τις κλινικές, τους ασθενείς και ποικίλους άλλους εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες δεν αποτελεί στόχο της εργασίας και έτσι δεν θα συζητηθεί περαιτέρω, παρ' όλα αυτά, πραγματοποιήθηκε κατανομή των παρατηρούμενων φαινοτυπικών προφίλ και μηχανισμών αντοχής (αντοχή στις καρβαπενέμες, παραγωγή μεταλλο-β-λακταμάσης, νέος φαινότυπος FEP<sub>R</sub>-CAZ<sub>S</sub>) στις Μονάδες και τα κλινικά δείγματα των 2 νοσοκομείων (**Εικόνες 3.2.2-3.2.8**).

Τέλος, τα 63 MDR+R στελέχη παρουσίασαν επιπλέον μηχανισμούς αντοχής που σχετίζονται με την αντοχή/μειωμένη ευαισθησία στις αμινογλυκοσίδες που μελετήθηκαν (AN+GM+TOB) (**Εικόνα 3.2.9, Πίνακας Π2**). Παρατηρήθηκε ότι όταν δίνουν αντοχή στην τομπραμυκίνη δίνουν αντοχή και στα άλλα δυο αντιβιοτικά, όπου σύμφωνα με τη βιβλιογραφία πιθανολογείται μειωμένη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης με παράλληλη υπερέκφραση καναλιών και γονίδια αντοχής (AAC, AAD, APH), τα οποία εδράζουν σε ιντεγκρόνια (Livermore D.M. και συνεργάτες 2002, Morita Y. και συνεργάτες 2014, Teixeira και συνεργάτες 2016). Η απομόνωση ανθεκτικών στις αμινογλυκοσίδες *P. aeruginosa* στελεχών από δείγματα του αναπνευστικού συστήματος δεν είναι κάτι σπάνιο (Bagheri-Nesami M. και συνεργάτες 2017), αλλά χρήζει περαιτέρω μελέτης και ανίχνευσης κινητών γενετικών μονάδων που συμμετέχουν στη διασπορά των συγκεκριμένων γονιδίων αντοχής στους ασθενείς με βαριά αναπνευστικά προβλήματα και όχι μόνο.

### **4.3 Τυποποίηση με την εφαρμογή της DLST μεθόδου**

Εν αντιθέσει με την πρότυπη μέθοδο αλληλούχισης του *16s rDNA*, η DLST μέθοδος είναι μια καινούρια και πολλά υποσχόμενη τυποποιητική τεχνική, η οποία προτάθηκε για την διεξαγωγή επιδημιολογικών και φυλογενετικών μελετών σε τοπικό



επίπεδο, σε μικρό χρονικό διάστημα και με χαμηλό κόστος. Η μέθοδος, έχει ήδη χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην επιδημιολογική μελέτη και παρακολούθηση 2 κύριων νοσοκομειακών παθογόνων, *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa*, ενώ πλέον αναπτύσσονται πρωτόκολλα για όλο και περισσότερους μικροοργανισμούς. Έχει αποδειχτεί έως τώρα ότι η μέθοδος παράγει αξιόπιστα και σταθερά αποτελέσματα ακόμη και όταν ο υπό εξέταση βακτηριακός πληθυσμός έχει απομονωθεί σε μεγάλα χρονικά διαστήματα, μέσα σε μήνες ή ακόμη και χρόνια (Basset P. & Blanc D.S. 2014, Stojanov M. και συνεργάτες 2016). Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε συνολικά 74 στελέχη *P. aeruginosa* (συμπεριλαμβανομένων και των δύο στελεχών αναφοράς PAO1 και NEQAS), τα οποία ήταν θετικά για το γονίδιο *16s rRNA* και με τα 3 ζεύγη των εκκινητών (βλέπε Παράγραφο 3.1). Τα 73/74 στελέχη έδωσαν θετικό σήμα και για τους 2 γενετικούς τόπους *ms172* και *ms217*, ενώ 1 στέλεχος (στέλεχος 3, Πίνακας Π2) έδωσε θετικό αποτέλεσμα μόνο για τον γενετικό τόπο *ms217* (Εικόνα 3.3.1), ακόμη και μετά από συνεχείς επαναλήψεις· έτσι κατηγοριοποιήθηκε ως ατυποποίητο, με αποτέλεσμα η τυποποιητικότητα της μεθόδου να ισούται με  $\approx 99\%$ .

Μελέτες σύγκρισης της DLST μεθόδου με τις ευρέως χρησιμοποιούμενες τυποποιητικές μεθόδους Multi Locus Sequence Typing (MLST) και Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) επιβεβαιώνουν την υψηλή αξιοπιστία και χρησιμότητα της DLST στις επιδημιολογικές και φυλογενετικές μελέτες του βακτηρίου *P. aeruginosa* (Basset P. & Blanc D.S. 2014, Cholley P. και συνεργάτες 2015). Τυποποιητικότητα μικρότερη από 100% με την εφαρμογή της DLST έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία από τους Cholley P. και συνεργάτες (2015), όπου για τα 281 υπό εξέταση στελέχη η τυποποιητικότητα για τους γενετικούς τόπους *ms172* και *ms217* ήταν 96.4% και 99.3%, αντίστοιχα, ενώ υπήρξαν και στελέχη (0.7%) που έδωσαν null alleles και για τους 2 τόπους (Cholley P. και συνεργάτες 2015). Παρά την ύπαρξη ατυποποίητων στελεχών για τον 1 ή και τους 2 γενετικούς τόπους, η ομοιότητα που παρατηρήθηκε όσον αφορά τα αποτελέσματα και τη διακριτική ικανότητα μεταξύ των μεθόδων DLST και MLST, οδήγησε τους Cholley P. και συνεργάτες (2015) στο συμπέρασμα ότι η DLST αποτελεί ισχυρό εργαλείο τυποποίησης και σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές (π.χ. PFGE, Whole genome sequencing) θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά στην διερεύνηση ή/και πρόληψη επιδημιών (Cholley P. και συνεργάτες 2015). Αντίστοιχη μελέτη για το βακτήριο *methicillin-resistant*

*Staphylococcus aureus* (MRSA), οδήγησε στο συμπέρασμα ότι κανένα τυποποιητικό σχήμα δεν θα έπρεπε να εφαρμόζεται μόνο του. Εν αντιθέσει, ο συνδυασμός δεδομένων από διαφορετικές τυποποιητικές μεθόδους, μπορεί να οδηγήσει στην ακριβή περιγραφή και κατανόηση της επιδημιολογίας και φυλογένεσης των βακτηρίων (Basset P. και συνεργάτες 2010).

Η DLST, όπως και όλες οι μοριακές μέθοδοι αλληλούχισης, χαρακτηρίζεται από υψηλή αναπαραγωγιμότητα και επαναληψιμότητα και διακρίνεται από τις υπόλοιπες τεχνικές, καθώς προτείνει την μερική αλληλούχιση (Single-strand sequencing) τμημάτων των 2 μεταβλητών γενετικών τόπων, *ms172* και *ms217*. Τα *ms172*, *ms217* είναι διαγονιδιακοί επαναλαμβανόμενοι γενετικοί τόποι γνωστοί ως εν σειρά επαναλήψεις μεταβλητού αριθμού (Variable Number of Tandem Repeats, VNTRs) ή μινιδορυφόροι (minisatellites) ή μικρές εν σειρά επαναλήψεις (Short Tandem Repeats, STRs) (Blanc D.S. 2004, Lewin B. 2004). Οι 2 προτεινόμενοι πολυμορφικοί γενετικοί μάρτυρες, μεταξύ πολλών άλλων, είχαν αρχικά μελετηθεί από τους Onteniente L. και συνεργάτες (2003) και τους Vu-Thien H. και συνεργάτες (2007) σε κλινικά στελέχη *P. aeruginosa*, με σκοπό την ανάπτυξη μιας γρήγορης, οικονομικής και ιδιαίτερα πληροφοριακής γονοτυπικής μεθόδου [Multiple-Locus Variable-number tandem-repeat (VNTR) Analysis, MLVA] (Onteniente L. και συνεργάτες 2003, Vu-Thien H. και συνεργάτες 2007). Αξίζει να σημειωθεί πως και στις 2 δημοσιευμένες μελέτες σημειώθηκαν μηδενικά αλλήλια (null alleles) για τους γενετικούς τόπους, ακόμα και μετά από πολλαπλές επαναλήψεις. Έτσι, η παρουσία null alleles και σε στέλεχος της παρούσας εργασίας δεν αποτελεί έκπληξη, καθώς όπως έχει ήδη αναφερθεί η απουσία προϊόντος μπορεί να οφείλεται σε διαγραφή ενός μέρους ή ολόκληρου του γενετικού τόπου, αλλά και σε πιθανές μετατροπές στην αλληλουχία του μινιδορυφόρου, οι οποίες είναι δυνατό να οδηγήσουν σε εσφαλμένη πρόσδεση των εκκινητών (Onteniente L. και συνεργάτες 2003, Vu-Thien H. και συνεργάτες 2007).

Υπάρχουν πολλοί μηχανισμοί που μπορούν να προκαλέσουν δομικές αλλαγές και αναδιατάξεις στην αλληλουχία των VNTRs, με αποτέλεσμα την αποσταθεροποίησή τους (Lopes J. και συνεργάτες 2002). Ένα από τα πιο συχνά φαινόμενα, είναι η ύπαρξη μεταθετών στοιχείων (τρανσποζόνια) στο γονιδίωμα των βακτηρίων, τα οποία εκτός του ότι αποτελούν σημαντική πηγή ποικιλομορφίας είναι υπεύθυνα για την εισαγωγή μεταλλάξεων. Οι πιο απλές μορφές τρανσποζονίων είναι οι αλληλουχίες ένθεσης (insertion

sequences, IS), οι οποίες αποτελούν φυσιολογικά συστατικά των βακτηριακών χρωμοσωμάτων και πλασμιδίων και μπορούν να προάγουν γεγονότα αναδιάταξης του DNA. Τα τρανσποζόνια έχουν την δυνατότητα να εκτελούν απλή διαμοριακή μετάθεση, όπου μπορούν να μετακινηθούν από την μία θέση του γονιδιώματος σε κάποια άλλη και πολλές φορές η επιλογή της θέσης ενσωμάτωσης είναι τυχαία (Lewin B. 2004). Προβλήματα στον πολλαπλασιασμό των γενετικών τόπων λόγω υψηλής εμφάνισης IS αλληλουχιών παρατηρήθηκαν και από τους Vu-Thien H. και συνεργάτες (2007), γεγονός που επιβεβαιώνει την απρόβλεπτη δράση αυτών των γενετικών στοιχείων (Vu-Thien H. και συνεργάτες 2007). Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι οι Vu-Thien H. και συνεργάτες (2007), από ένα σύνολο 15 πολυμορφικών δεικτών (συμπεριλαμβανομένων των *ms172*, *ms217*), πρότειναν τη χρήση μόνο 10 μινιδоруφόρων μέσα στους οποίους συμπεριλαμβάνεται ο γενετικός τόπος *ms217* αλλά όχι ο *ms172* (Vu-Thien H. και συνεργάτες 2007). Η βιβλιογραφία που υπάρχει για την νέα τυποποιητική μέθοδο DLST είναι περιορισμένη και συνεπώς, για την διερεύνηση των προβλημάτων που εμφανίζονται κατά τον πολλαπλασιασμό του γενετικού τόπου *ms172*, θα χρειαστούν περαιτέρω μελέτες (όπως δοκιμές με νέα ζεύγη ειδικών εκκινητών) που ξεφεύγουν από τα όρια της συγκεκριμένης μελέτης. Παρόλα αυτά η DLST είναι μια πολλά υποσχόμενη και πολύτιμη εναλλακτική λύση για την τυποποίηση του βακτηρίου σε επίπεδο ρουτίνας (Pérez-Losada M. και συνεργάτες 2013, Tissot F. και συνεργάτες 2016).

Συνολικά, 21 στελέχη (συμπεριλαμβανομένων και των 2 στελεχών αναφοράς (PAO1 και NEQAS), τα οποία τυποποιήθηκαν επιτυχώς από τη νέα μέθοδο DLST, επιλέχθηκαν για την περαιτέρω ανάλυσή τους με το πρόγραμμα Global optimal eBURST. Συγκεκριμένα, από τη συλλογή επιλέχθηκαν 5/25 στελέχη από το νοσοκομείο N1 στη Βόρεια Ελλάδα και 14/47 στελέχη από το νοσοκομείο N2 στη Κεντρική Ελλάδα, τα οποία αντιπροσωπεύουν τους βασικούς φαινοτύπους αντοχής, αλλά και τα κύρια κλινικά δείγματα και Μονάδες των 2 νοσοκομείων (**Πίνακας Π2**). Η μέθοδος της DLST ήταν ικανή να προσδώσει ένα ήδη γνωστό allele number για όλα τα υπό μελέτη στελέχη (**Πίνακας 3.5.1**). Η ανάλυση αποκάλυψε τον κυρίαρχο DLST-τύπο 8-37, ο οποίος επικράτησε σε 6/14 στελέχη του νοσοκομείου N2, ενώ οι αμέσως επόμενοι επικρατέστεροι τύποι ήταν οι 78-17 και 18-156, όπου έκαστος παρουσιάστηκε σε 2 στελέχη επίσης στο νοσοκομείο N2. Τα υπόλοιπα 4/14 στελέχη του νοσοκομείου N2, αλλά και τα 5 υπό μελέτη

στελέχη του νοσοκομείου N1 εμφανίζονται διάσπαρτα σε 9 διαφορετικούς DLST-τύπους (**Πίνακας 3.5.1**). Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονιστεί πως η εμφάνιση των επικρατέστερων DLST-τύπων μόνο στο νοσοκομείο N2 και η κατάταξη των 5 στελεχών του νοσοκομείου N1 σε 5 διαφορετικούς τύπους, θα μπορούσε να εξηγηθεί λαμβάνοντας υπόψη την ανισοκατανομή των υπό εξέταση στελεχών στα 2 νοσοκομεία, αλλά αποτελεί και μια πρώτη ένδειξη ότι τα στελέχη του νοσοκομείου N1 χαρακτηρίζονται από μια γονοτυπική ποικιλομορφία. Όπως αναφέρεται και στην Παράγραφο 3.4 ο αριθμός των στελεχών που επιλέχθηκε για ανάλυση eBURST ήταν αντιπροσωπευτικός και ανάλογος του συνολικού αριθμού των στελεχών που έχουν συλλεχθεί από το κάθε νοσοκομείο. Είναι σίγουρο πως αυξάνοντας τα στελέχη της συλλογής του Νοσοκομείου της Βόρειας Ελλάδας και αναλύοντας όλα τα βακτηριακά στελέχη και των 2 νοσοκομείων, θα είναι δυνατή η πλήρης απεικόνιση της κατανομής και επικράτειας των διάφορων DLST-τύπων στα υπό μελέτη νοσοκομεία.

Μία μεγάλη ποικιλία μοριακών τυποποιητικών μεθόδων π.χ PFGE, MLST, DDSL, RAPD κ.α. χρησιμοποιούνται εκτενώς εδώ και πολλά χρόνια στις επιδημιολογικές μελέτες του βακτηρίου *P. aeruginosa*, σε αντίθεση με το νέο τυποποιητικό σχήμα DLST, για το οποίο η βιβλιογραφία που υπάρχει είναι περιορισμένη (Smith S. και συνεργάτες 2012). Οι DLST-τύποι 90-139 και 20-30 οι οποίοι παρουσιάστηκαν σε 2 R στελέχη (στελέχη 18 και 6, αντίστοιχα) του νοσοκομείου N1 (**Εικόνα 3.5.1, Πίνακας 3.5.1**), έχουν αναφερθεί ξανά σε προηγούμενη μελέτη (Pappa O. και συνεργάτες 2016), όπου το νέο τυποποιητικό σχήμα εφαρμόστηκε σε περιβαλλοντικά στελέχη *P. aeruginosa* απομονωμένα από το υδάτινο οικοσύστημα. Ο γονότυπος 90-139 παρουσιάστηκε σε συνολικά 5 περιβαλλοντικά στελέχη, απομονωμένα από διάφορες υδάτινες πηγές στην Αττική (2/5), Πελοπόννησο (2/5) και Κυκλάδες (1/5), ενώ ο γονότυπος 20-30 εντοπίστηκε σε 1 στέλεχος απομονωμένο από κολυμβητική δεξαμενή της Αττικής· όλα τα στελέχη εμφάνισαν ευαίσθητα προφίλ αντοχής [φαινότυπος non-wild (NW): ευαίσθητα σε όλα τα αντιβιοτικά εκτός των ticarcillin (TIC) και wild (W): ευαίσθητα σε όλα τα αντιβιοτικά χωρίς επίκτητη ή εγγενή αντοχή] (Pappa O. και συνεργάτες 2016). Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι οι ίδιοι γονότυποι κυκλοφορούν τόσο σε κλινικά όσο και σε περιβαλλοντικά ενδιαιτήματα· παρόλα αυτά στην παρούσα εργασία εντοπίζονται σε διαφορετικά γεωγραφικά τμήματα της Ελλάδας (Βόρεια Ελλάδα) και σε στελέχη με ανθεκτικό προφίλ αντοχής (**Πίνακας 3.5.1**). Ο

γονότυπος 20-30 έχει σημειωθεί και σε μικρό αριθμό περιβαλλοντικών στελεχών (απομονωμένων από νιπτήρες) σε νοσοκομείο της Γαλλίας (Tissot F. και συνεργάτες 2016), ενώ αξιοσημείωτη είναι η εμφάνιση του κυρίαρχου DLST-τύπου 8-37 τόσο σε κλινικά όσο και σε περιβαλλοντικά στελέχη *P. aeruginosa* σε 2 πρόσφατες μελέτες (Choley P. και συνεργάτες 2015, Tissot F. και συνεργάτες 2016). Σε παρόμοια μελέτη που διεξήχθη σε πανεπιστημιακό νοσοκομείο της Σουηδίας, αναφέρεται η παρουσία του γονότυπου 20-30 σε 14 κλινικά στελέχη, τα οποία σχετίστηκαν με επιδημία σε Μονάδα Εντατικής Θεραπείας, ενώ 2 ασθενείς εμφάνισαν τον τύπο 22-44 (Basset P. & Blanc D.S. 2014), ο οποίος εντοπίστηκε σε 1/5 στελέχη της συλλογής του νοσοκομείου N1 στην παρούσα μελέτη. Με εξαίρεση την μελέτη των Pappa O. και συνεργάτες (2016), δεν έχουν διεξαχθεί άλλες επιδημιολογικές μελέτες που να αναδεικνύουν την κυκλοφορία των μηχανισμών αντοχής στους γονότυπους με βάση την DLST μέθοδο (Pappa O. και συνεργάτες 2016). Η τυποποίηση διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην επιδημιολογική μελέτη του βακτηρίου *P. aeruginosa* και παρέχει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τις κλωνικές σχέσεις μεταξύ των ανθεκτικών στελεχών στο νοσοκομειακό περιβάλλον. Η ανάδειξη των κλωνικών σχέσεων μπορεί να αποκαλύψει τους τρόπους εξάπλωσης και μετάδοσης των κλωνικών στελεχών μεταξύ των ασθενών και συνεπώς συμβάλει σημαντικά στην αποτελεσματική εφαρμογή μεθόδων επιτήρησης (Smith S. και συνεργάτες 2012, Gur S.D. & Aksoz N. 2016).

#### **4.4 Συσχέτιση φαινοτυπικών και γονοτυπικών δεδομένων**

Τα 19 στελέχη της συλλογής στα οποία εφαρμόστηκε η DLST, προέρχονται από ποικίλα κλινικά δείγματα (**Εικόνα 3.5.1, Πίνακας 3.5.1**) και κατατάσσονται σε 8 διαφορετικά προφίλ αντοχής/RP: R4, R6 (σε 2 στελέχη του νοσοκομείου N1 της Βόρειας Ελλάδας) R1a, R5 και S (σε 6, 2 και 1 στελέχη του νοσοκομείου N2 της Κεντρικής Ελλάδας) και τέλος, οι 3 φαινότυποι R3a, R2a και R2c, οι οποίοι κατανέμονται στα υπόλοιπα 8 στελέχη και στα 2 νοσοκομεία (**Εικόνα 3.5.2, Πίνακας 3.5.1**). Παρατηρήθηκε ότι στο νοσοκομείο N2, ο φαινότυπος R2a εμφανίζεται αποκλειστικά σε 2/6 στελέχη του κυρίαρχου DLST-τύπου 8-37 και ο φαινότυπος R1a κατανέμεται στα μισά στελέχη (3/6) που φέρουν τον συγκεκριμένο γονότυπο (**Εικόνα 3.5.2, Πίνακας 3.5.1**). Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι μια πρώτη μικρή ένδειξη ότι το γενετικό προφίλ των στελεχών ίσως

να καθορίζει την κυκλοφορία των διαφόρων φαινοτύπων αντοχής στα νοσοκομειακά περιβάλλοντα. Για τα υπόλοιπα στελέχη της συλλογής του νοσοκομείου N2 δεν παρουσιάζεται κάποια εμφανή συσχέτιση των γονότυπων με τους φαινοτύπους αντοχής, ενώ αντίστοιχη ποικιλομορφία εμφανίζουν και τα 5 στελέχη του νοσοκομείου N1, όπου το καθένα διαθέτει διαφορετικό γονοτυπικό και φαινοτυπικό προφίλ (**Εικόνα 3.5.2, Πίνακας 3.5.1**). Η έλλειψη συσχέτισης μεταξύ γενετικών προφίλ και προφίλ μικροβιακής αντοχής έχει παρατηρηθεί σε έρευνα που διεξήχθη από τους Smith S. και συνεργάτες (2012), η οποία ομοίως στηρίχτηκε στην μελέτη ενός μικρού αριθμού κλινικών στελεχών (20 στελέχη) (Smith S. και συνεργάτες 2012). Συνεπώς, προκειμένου να μελετηθεί η κατανομή των φαινοτύπων αντοχής στους διάφορους DLST-τύπους των 2 νοσοκομείων, είναι απαραίτητη η αλληλούχιση όλων των στελεχών της συλλογής.

Ο νέος φαινότυπος FEP<sub>R</sub>- CAZ<sub>S</sub> εντοπίστηκε σε συνολικά 7/19 στελέχη της συλλογής, τα οποία ανήκουν σε συνολικά 6 διαφορετικούς DLST-τύπους (**Εικόνα 3.5.2, Πίνακας 3.5.1**). Παρά την ευρεία κατανομή του σε ποικίλους γονότυπους, 3 από τα 5 FEP<sub>R</sub>- CAZ<sub>S</sub> στελέχη του νοσοκομείου N2 κατατάσσονται στον κυρίαρχο τύπο 8-37 (2/3) και στον τύπο 8-78 (1/3) (**Εικόνα 3.5.2**), γεγονός που ίσως υποδειλώνει την πιθανή σχέση του νέου φαινότυπου με το αλληλόμορφο 8 του γενετικού τόπου *ms172*. Αυτή η υπόθεση χρήζει περαιτέρω μελέτης και ανάλυσης όλων των FEP<sub>R</sub>-CAZ<sub>S</sub> στελεχών της συλλογής του νοσοκομείου, προκειμένου να εκτιμηθεί η σχέση του συγκεκριμένου φαινότυπου με το αλληλόμορφο 8. Σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο νοσοκομείο Bellvitge της Ισπανίας (Peña C. και συνεργάτες 2009), η εφαρμογή της τυποποιητικής μεθόδου PFGE αποκάλυψε την ύπαρξη ενός μόνο επιδημικού κλώνου *P. aeruginosa* με τον νέο φαινότυπο, ο οποίος εντοπίστηκε σε συνολικά 51 ασθενείς. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με μία άλλη μελέτη στην Ισπανία, όπου ο συνδυασμός των τυποποιητικών σχημάτων Rep-PCR/PFGE επέτρεψε την ταυτοποίηση 47 διαφορετικών κλώνων που φέρουν τον νέο φαινότυπο (Esquisabel C.A.B. και συνεργάτες 2011). Και στις 2 έρευνες, τα στελέχη απομονώθηκαν από μία μεγάλη ποικιλία κλινικών δειγμάτων. Στην παρούσα μελέτη, καθίσταται ως επιτακτική ανάγκη η περαιτέρω ανάλυση της κλωνικότητας του νέου φαινότυπου, ο οποίος έχει υψηλή κλινική σημασία (Peña C. και συνεργάτες 2009) και φαίνεται να εντοπίζεται πρώτη φορά σε Ελληνικά νοσοκομεία. Σύμφωνα με τα έως τώρα αποτελέσματα της μελέτης, η ποικιλομορφία που εμφανίζεται

στα γενετικά προφίλ των 7 FEP<sub>R</sub>-CAZ<sub>S</sub> στελεχών είναι υψηλή και παρόλο που υπάρχει μία αρχική ένδειξη συσχέτισης του νέου φαινότυπου με το αλληλόμορφο 8 (*ms172*), ο αριθμός των στελεχών που αναλύθηκαν από την συλλογή είναι μικρός για να ενισχύσει την υπόθεση αυτή. Για την μελέτη της κατανομής του νέου φαινότυπου στους γονότυπους των στελεχών των 2 νοσοκομείων και για την εξακρίβωση της συσχέτισής του με το αλληλόμορφο 8 (*ms172*), είναι απαραίτητη η ανάλυση των γονοτυπικών προφίλ όλων των στελεχών της συλλογής.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, παραγωγή μέταλλο-β-λακταμασών [CARB<sub>R</sub>/EDTA(+)] εντοπίστηκε αποκλειστικά σε στελέχη του νοσοκομείου N2. Από τα 14 στελέχη του νοσοκομείου N2 που χρησιμοποιήθηκαν για φυλογενετική ανάλυση τα 6 χαρακτηρίστηκαν ως VIM-2 producers (**Πίνακας 3.5.1**), ενώ φαίνεται ενδιαφέρον πως τα 5/6 κατανέμονται στους 3 επικρατέστερους DLST-τύπους 8-37 (3/5), 78-17 (1/5) και 18-156 (1/5) (**Εικόνα 3.5.3**). Από τα υπόλοιπα 8/14 EDTA(-) στελέχη του νοσοκομείου, μόνο τα 4 ήταν CARB<sub>R</sub>, εκ των οποίων 3 κατανέμονται στον κυρίαρχο DLST-τύπο 8-37 και 1 στον 2<sup>ο</sup> επικρατέστερο 18-156. Σύμφωνα με την **Εικόνα 3.5.3**, από τους 3 επικρατέστερους DLST-τύπους που κυριαρχούν στο νοσοκομείο N2, μόνο το 1 από τα 2 στελέχη που κατατάσσονται στον τύπο 78-17 χαρακτηρίστηκε ως CARB<sub>S</sub>. Η υψηλή διασπορά ενδημικών και επιδημικών CARB<sub>R</sub> και MBL producers στελεχών θεωρείται εδώ και πολλά χρόνια ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα της Δημόσιας Υγείας στις μεσογειακές χώρες, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας (Gutierrez O. και συνεργάτες 2007). Σύμφωνα με τα έως τώρα δεδομένα της παρούσας μελέτης, ο κυρίαρχος γονότυπος 8-37 δείχνει να σχετίζεται άμεσα με την κυκλοφορία του φαινότυπου CARB<sub>R</sub> και τη διασπορά VIM producers στελεχών στο νοσοκομείο N2. Επίσης, ο φαινότυπος αντοχής στις καρβαπενέμες πιθανόν να σχετίζεται και με τον αμέσως επόμενο επικρατέστερο γονότυπο 18-156. Παρόλο που οι υποθέσεις αυτές χρήζουν περαιτέρω μελέτης, σύμφωνα με τους Gutierrez O. και συνεργάτες (2007) η διασπορά CARB<sub>R</sub> κλώνων του είδους έχει σημειωθεί τόσο ενδονοσοκομειακά όσο και μεταξύ διαφορετικών νοσοκομείων και αποτελεί σύνθητες φαινόμενο (Gutierrez O. και συνεργάτες 2007).

Όσον αφορά την παραγωγή μέταλλο-β-λακταμασών, η διασπορά VIM producers στελεχών έχει ήδη περιγραφεί σε διάφορες μονάδες νοσοκομείων της Αττικής καθώς και σε άλλες περιοχές της Ελλάδας (Giakkoupi P. και συνεργάτες 2003, Koutsogiannou M.

και συνεργάτες 2013). Η παρακολούθηση και ταυτοποίηση των κλώνων που μεταφέρουν γονίδια MBL στα νοσοκομειακά περιβάλλοντα έχει ύψιστη επιδημιολογική σημασία (Koutsogiannou M. και συνεργάτες 2013). Η υψηλή εμφάνιση MBL producer στελεχών έχει προκύψει από την χρήση ευρέου φάσματος β-λακταμασών (συμπεριλαμβανομένων των καρβαπενέμων), αμινογλυκοσίδων και κινολόνων και έχει συσχετιστεί με επιδημίες MDR *P. aeruginosa* (Siarkou V.I. και συνεργάτες 2009). Η κατανομή των MBL γονιδίων σε γονότυπους κλινικών στελεχών χρησιμοποιώντας κυρίως τις πρότυπες μεθόδους PFGE (Tsakris A. και συνεργάτες 2000, Gutierrez O. και συνεργάτες 2007, Siarkou V.I. και συνεργάτες 2009, Viedma E. και συνεργάτες 2012, Koutsogiannou M. και συνεργάτες 2013), MLST (Libisch A. και συνεργάτες 2008, Dobrevska R.V. και συνεργάτες 2013), RAPD (Giakkouri P. και συνεργάτες 2003, Libisch A. και συνεργάτες 2008) κ.α., έχει αναλυθεί εκτενώς στη διεθνή βιβλιογραφία. Είναι ήδη γνωστό πως το σύμπλεγμα CC11 που περιέχει bla<sub>VIM</sub>+ στελέχη είναι ιδιαίτερα διαδεδομένο στην περιοχή της Μεσογείου και όχι μόνο (Libisch A. και συνεργάτες 2008). Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι συγκεκριμένα γονίδια που κωδικοποιούν μέταλλο-β-λακταμάσες έχουν την τάση να συσσωρεύονται σε συγκεκριμένους γονότυπους (Tsakris A. και συνεργάτες 2000, Siarkou V.I. και συνεργάτες 2009, Viedma E. και συνεργάτες 2012, Koutsogiannou M. και συνεργάτες 2013). Εκτός, όμως από την κλωνική διασπορά των MBL, bla<sub>VIM</sub> γονίδια μπορούν να μεταφερθούν και σε γενετικά απομακρυσμένα στελέχη, διαφορετικών γονοτύπων, μέσω οριζόντιας μεταφοράς τρανσποζονίων ή/και πλασμιδίων (Libisch A. και συνεργάτες 2008). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, παρόλο που υπάρχουν ενδείξεις συσχέτισης των MBL producer στελεχών του Νοσοκομείου Ν2 με τον κυρίαρχο DLST-τύπο, ταυτόχρονα υπάρχουν επιπλέον 3 στελέχη με τον συγκεκριμένο μηχανισμό αντοχής, που κατανέμονται σε άλλους 3 γονότυπους. Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί, πως για την ορθή μελέτη της κατανομής των VIM producers στελεχών στους διάφορους DLST-τύπους, δεν απαιτείται μόνο η τυποποίηση όλων των EDTA(+) στελεχών της συλλογής, αλλά και η μοριακή ανίχνευση των bla<sub>VIM</sub> γονιδίων (πχ bla<sub>VIM1</sub>, bla<sub>VIM2</sub>, bla<sub>VIM17</sub> κ.α.) που φέρει το καθένα. Συμπερασματικά, ο φαινοτυπικός έλεγχος παραγωγής μέταλλο-β-λακταμασών (EDTA τεστ) δεν επαρκεί να ερμηνεύσει τον τρόπο μετάδοσης και κυκλοφορίας των MBL στους DLST γονότυπους του νοσοκομείου, καθώς θα πρέπει να είναι γνωστή η ταυτότητα της κάθε MBL που φέρει το κάθε στέλεχος. Συνεπώς, τα έως



τώρα δεδομένα της μελέτης δεν μπορούν να υποστηρίξουν με βεβαιότητα την κλωνική σχέση του φαινότυπου με τον κυρίαρχο DLST-τύπο 8-37.

#### 4.5 Φυλογενετική ανάλυση

Από την eBURST ανάλυση και την κατασκευή των minimum spanning trees για τον υπό εξέταση πληθυσμό, είναι δυνατό να παρατηρηθούν οι γενετικές αποστάσεις μεταξύ των στελεχών και κατά συνέπεια των DLST-τύπων. Όσον αφορά τους κυριότερους γονότυπους, τα στελέχη που ανήκουν στον κυρίαρχο DLST-τύπο 8-37 απεικονίζονται δίπλα στο στέλεχος PAO1 (DLST-type 16-4) και στα στελέχη του τύπου 78-17 (στελέχη 52 και 57), γεγονός που αναδεικνύει την κοντινή γενετική απόσταση αυτών των γονοτύπων (**Εικόνες 3.5.1-3.5.3**). Αντιθέτως, ο DLST-τύπος 18-156 διαχωρίζεται από τους υπόλοιπους και είναι πιο απομακρυσμένος πιθανών εξαιτίας μεγαλύτερης γενετικής απόστασης (**Εικόνες 3.5.1-3.5.3**). Από την ανάλυση παρατηρήθηκε πως 3/6 στελέχη (37, 43 και 51) που ανήκουν στον κυρίαρχο DLST-τύπο 8-37 καθώς και τα 2 στελέχη 52, 57 που κατατάσσονται στον 2<sup>ο</sup> επικρατέστερο τύπο 78-17, τοποθετούνται αντίστοιχα σε κοινούς κόμβους και συνεπώς, έχουν οριστεί ως το ίδιο στέλεχος με 100% ομοιότητα στην αλληλουχία των 2 γενετικών τόπων *ms172* και *ms217* (Gur S.D. & Aksoz N. 2016). Σύμφωνα με τα επιδημιολογικά τους δεδομένα, τα στελέχη αυτά, έχουν απομονωθεί από διαφορετικές Μονάδες του νοσοκομείου Ν2 στην Κεντρική Ελλάδα, από διαφορετικά κλινικά δείγματα και σε διαφορετικές ημερομηνίες (**Πίνακας Π2**). Το στέλεχος 37 είναι απομονωμένο στις 19/11/2016 από την 4<sup>η</sup> Πνευμονολογική Μονάδα από καθετήρα, το στέλεχος 43 απομονώθηκε στις 2/1/2017 από αίμα ασθενή στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας/Κέντρο Αναπνευστικής Ανεπάρκειας, ενώ το στέλεχος 51 στις 30/3/2017 από την Παθολογική Μονάδα από αίμα επίσης. Αντίστοιχα, τα στελέχη 52 και 57 με γονότυπο 78-17 έχουν απομονωθεί στις 3.4.17 από δείγμα βρογχικών εκκρίσεων στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας/ Παθολογική και στις 17/8/2016 από δείγμα βρογχικού εκκρίματος της 7<sup>η</sup> Παθολογική Μονάδα, αντίστοιχα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η εμφάνιση συγκεκριμένων κλώνων σε διαφορετικές Μονάδες του νοσοκομείου μπορεί να είναι αποτέλεσμα είτε περιβαλλοντικής μόλυνσης, από την οποία πηγάζει ο κλώνος είτε μεταφοράς τους από το προσωπικό του νοσοκομείου σε κοινόχρηστους χώρους ή θαλάμους ασθενών (Gur S.D. & Aksoz N. 2016).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως όλα τα προαναφερθέντα στελέχη των δύο κλώνων χαρακτηρίζονται το καθένα από διαφορετικό προφίλ αντοχής: αναλύοντας τα δεδομένα για τα 3 στελέχη του κυρίαρχου DLST-τύπου με 100% ομοιότητα στην αλληλουχία τους (**Πίνακας Π2**), παρατηρείται πως έχουν απομονωθεί με διαφορά περίπου 2 μηνών το καθένα και μέσα σε αυτό το διάστημα υπάρχουν ενδείξεις ανάπτυξης διαφορετικών μηχανισμών αντοχής: απώλεια έκφρασης μέταλλο-β-λακταμάσης (VIM) (στέλεχος 43) ή εμφάνιση του νέου φαινοτύπου FEP<sub>R</sub>-CAZ<sub>S</sub>, πιθανά μέσω υπερέκφρασης καναλιών ή την απόκτηση ESBL (π.χ. PSE-1 b-lactamase) (στέλεχος 51) (Peña C. και συνεργάτες 2009, Esquisabel C.A.B. και συνεργάτες 2011) (**Εικόνα 3.5.2, Πίνακας 3.5.1**). Αντίστοιχα, το στέλεχος 57 με γονότυπο 78-17 έχει χαρακτηριστεί ως R, με φαινότυπο FEP<sub>R</sub>-CAZ<sub>S</sub> και ευαίσθητο στις καρβαπενέμες, ενώ 8 μήνες μετά εντοπίζεται στέλεχος ίδιας αλληλουχίας (στέλεχος 52) σε διαφορετική Μονάδα του νοσοκομείου N2, έχοντας όμως MDR φαινότυπο αντοχής και μια μέταλλο-β-λακταμάση (**Εικόνα 3.5.2, Πίνακας 3.5.1**). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, στελέχη που ανήκουν στον ίδιο κλώνο δεν είναι απαραίτητο να διαθέτουν τον ίδιο φαινότυπο αντοχής (Freitas A.L.P. & Barth A.L. 2002, Lureiro M.M. και συνεργάτες 2002, Gur S.D. & Aksoz N. 2016). Η φαινοτυπική ποικιλομορφία που παρατηρήθηκε πιθανόν να οφείλεται στη δράση χρωμοσωμικών μεταλλάξεων ή/και στην απόκτηση κινητών γενετικών στοιχείων, που φέρουν γονίδια αντοχής, σε διαφορετικές χρονικές περιόδους (Gur S.D. & Aksoz N. 2016). Επίσης, τα πρότυπα αντοχής των στελεχών μπορεί να διαφέρουν μεταξύ διαφορετικών μονάδων στο ίδιο νοσοκομείο λόγω των διαφορετικών θεραπευτικών σχημάτων (χρήση αντιβιοτικών) που εφαρμόζονται σε αυτές (Gur S.D. & Aksoz N. 2016). Συμπερασματικά, με βάση τα παραπάνω δεδομένα, υπάρχουν ενδείξεις πως τα προαναφερθέντα στελέχη των δύο κλώνων, κατάφεραν να μετακινηθούν και να εξαπλωθούν μεταξύ ασθενών σε διαφορετικές κλινικές Μονάδες του νοσοκομείου. Η κυκλοφορία των στελεχών πιθανόν να οφείλεται σε μολυσμένο ιατρικό εξοπλισμό, διασταυρούμενη μόλυνση μέσω του προσωπικού, ενώ πολύ σημαντικό ρόλο συνήθως κατέχουν οι περιβαλλοντικές πηγές των νοσοκομειακών θαλάμων, όπως νιπτήρες, κουζίνες, υγραντήρες κ.α. στις οποίες το βακτήριο εγκαθίσταται και επιβιώνει για μεγάλα χρονικά διαστήματα (Greenwood D. και συνεργάτες 2007, Gur S.D. & Aksoz N. 2016, Tissot F. και συνεργάτες 2016).

## 4.6 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, στην παρούσα εργασία, σε μια συλλογή κλινικών στελεχών *P. aeruginosa* του Ελλαδικού χώρου, τα οποία ταυτοποιήθηκαν αρχικά με την αλληλούχιση περιοχών του *16s rRNA* γονιδίου, εφαρμόστηκε το νέο τυποποιητικό σχήμα DLST και προσδιορίστηκαν τα προφίλ αντοχής τους. Η αντοχή στις καρβαπενέμες (CARB<sub>R</sub>), ένας φαινότυπος διαδεδομένος στα νοσοκομειακά περιβάλλοντα του Ελλαδικού χώρου, παρουσιάστηκε σε πολύ υψηλό ποσοστό του υπό εξέταση πληθυσμού, ενώ ένας νέος φαινότυπος, ο FEP<sub>R</sub>- CAZ<sub>S</sub> εμφανίστηκε για πρώτη φορά στα συγκεκριμένα περιβάλλοντα. Η φυλογενετική ανάλυση, παρόλο τον μικρό αριθμό στελεχών που εφαρμόστηκε, αποκάλυψε την κατανομή ποικίλων φαινοτυπικών προφίλ σε στελέχη που ανήκουν στους ίδιους DLST-τύπους, αλλά και την πιθανή κλωνική συσχέτιση μηχανισμών αντοχής με συγκεκριμένους γονότυπους. Συγκεκριμένα, αποκαλύφθηκε η πιθανή κλωνική σχέση του CARB<sub>R</sub> φαινοτύπου με τους 2 επικρατέστερους DLST-τύπους, ενώ ενδείξεις συσχέτισης του νέου φαινοτύπου FEP<sub>R</sub>- CAZ<sub>S</sub> με το αλληλόμορφο 8 (*ms172*) και των MBL producers στελεχών με τον κυρίαρχο γονότυπο, ενισχύουν την υπόθεση ότι το γενετικό προφίλ των στελεχών είναι ικανό να καθορίζει την κυκλοφορία των διαφόρων φαινοτύπων αντοχής στα νοσοκομειακά περιβάλλοντα. Η περαιτέρω ανάλυση της κατανομής των ποικίλων φαινοτύπων αντοχής στα γενετικά προφίλ (DLST-τύποι) του υπό μελέτη βακτηριακού πληθυσμού, θα μπορούσε να έχει σημαντική επίδραση στη μελέτη της προέλευσης και εξάπλωσης της μικροβιακής αντοχής στα νοσοκομειακά περιβάλλοντα. Τα αποτελέσματα αυτά θα ήταν ιδιαίτερα σημαντικά σε μελλοντικές επιδημιολογικές μελέτες και στην αύξηση της αποτελεσματικότητας των συστημάτων επιτήρησης.

## 4.7 Προοπτικές και μελλοντικοί στόχοι

Τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας ενισχύουν τη πιθανή κλωνική συσχέτιση των φαινοτύπων αντοχής στα υπό μελέτη ενδονοσοκομειακά στελέχη της συλλογής. Παραμένει σημαντικό να ολοκληρωθεί ο πλήρης μοριακός χαρακτηρισμός των συγκεκριμένων στελεχών και η συσχέτιση αυτού με τα αντίστοιχα επιδημιολογικά δεδομένα. Εν συντομία, στα μελλοντικά πειράματα περιλαμβάνονται:

A) Ολοκλήρωση της αλληλούχησης όλων των στελεχών της συλλογής, στα οποία εφαρμόστηκε η μέθοδος DLST, με στόχο να πραγματοποιηθεί πλήρης φυλογενετική ανάλυση του υπό εξέταση βακτηριακού πληθυσμού και να μελετηθεί το γενετικό τους προφίλ.

B) Ανίχνευση γονιδίων αντοχής και συσχέτιση με το προφίλ μικροβιακής ευαισθησίας. Η μοριακή ανίχνευση γονιδίων αντοχής σε συνδυασμό με τη φυλογενετική ανάλυση των στελεχών, κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική με στόχο να αναδειχθεί η φαινοτυπική και γενετική ποικιλομορφία τους, καθώς και να επιβεβαιωθούν οι κλωνικές σχέσεις των φαινοτύπων αντοχής με συγκεκριμένους γονότυπους.

Γ) Λεπτομερής επιδημιολογική μελέτη, συσχετίζοντας τα στελέχη της παρούσας εργασίας με τις κλινικές, το ιστορικό των ασθενών καθώς και άλλους εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες. Η συλλογή των επιδημιολογικών δεδομένων από τα 2 υπό μελέτη νοσοκομεία και η δημιουργία επιδημικών καμπύλων διασποράς, θα δώσει πιθανά μια πιο σαφή εικόνα της κατανομής και του τρόπου εξάπλωσης των γονοτύπων και των προφίλ αντοχής των υπό εξέταση κλινικών στελεχών μεταξύ των ασθενών στα 2 νοσοκομεία. Επίσης, είναι δυνατό να οδηγήσει στο χαρακτηρισμό τυχόν επιδημικών στελεχών μέσα στο συγκεκριμένο βακτηριακό πληθυσμό.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adzitey F., Huda N., Rahmat Al G.R. (2013)**, Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks, 3 Biotech, 3:97–107
- Ahmed M.U., Dunn L., Valcanis M., Hogg G., Ivanova E.P. (2014)**, Double-locus sequence typing using *porA* and *peb1A* for epidemiological studies of *Campylobacter jejuni*, Foodborne Pathog Dis, 11(3):194-9 (doi: 10.1089/fpd.2013.1634)
- Al-Daraghi W.A. & Abdullah Z.H., (2013)**, Detection of Exotoxin A gene in *Pseudomonas aeruginosa* from Clinical and Environmental samples, Journal of Al-Nahrain University, 16(2):167- 172
- Anzai Y., Kim H., Park J.Y., Wakabayashi H., Oyaizu H. (2000)**, Phylogenetic affiliation of the *pseudomonads* based on *16S rRNA* sequence, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50:1563–1589
- Arora S.K., Wolfgang M.C., Lory S., Ramphal R. (2004)**, Sequence Polymorphism in the Glycosylation Island and Flagellins of *Pseudomonas aeruginosa*, Journal of Clinical Microbiology, 186(7):2115–2122
- Asghari F.B., Nikaeen M., Mirhendi H. (2013)**, Rapid monitoring of *Pseudomonas aeruginosa* in hospital water systems: a key priority in prevention of nosocomial infection, FEMS Microbiol Lett, 343:7–81
- Aubert D., Poirel L., Chevalier J., Leotard S., Pages J.M., Nordmann P. (2001)**, Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*, Antimicrob Agents Chemother., 45(6):1615-20
- Balasoiu M., Balasoiu A.T., Manescu R., Avramescu C., Ionete O. (2014)**, *Pseudomonas aeruginosa* Resistance Phenotypes and Phenotypic Highlighting Methods, Current Health Sciences Journal, 40(2):85-92
- Battle E.S., Rello J. and Hauser A.R., (2009)**, Genomic islands of *Pseudomonas aeruginosa*, FEMS, Microbiol Lett, 290:70–78
- Bitton G. (2002)**, Encyclopedia of Environmental Microbiology, 5:2632-2638
- Basset P., Basic-Hammer N., Kuhn G., Vogel V., Sakwinska O. & Blanc D.S. (2009)**, *Staphylococcus aureus* *clfB* and *spa* alleles of the repeat regions are segregated into major phylogenetic lineages. Infection, Genetics and Evolution, 9: 941-947
- Basset P. & Blanc D.S. (2014)**, Fast and simple epidemiological typing of *Pseudomonas aeruginosa* using the double-locus sequence typing (DLST) method, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 33(6):927-32
- Basset P., Senn L., Prod'hom G., Bille J., Francioli P., Zanetti G., Blanc D.S. (2010)**, Usefulness of double locus sequence typing (DLST) for regional and international epidemiological surveillance of *methicilin-resistant Staphylococcus aureus*, Clinical Microbiology and Infection, 16(8):1289–1296
- Bagheri-Nesami M., Sadegh Rezai M., Ahangarkani F., Rafiei A., Nikkhah A., Eslami G., Shafahi K., Hajalibeig A., Rezvan Khajavi R. (2017)**, Multidrug and co-resistance patterns of non-fermenting Gram-negative bacilli involved in ventilator-associated pneumonia carrying class 1 integron in the North of Iran, GERMS, 7(3):123-131

- Blanc D.S. (2004)**, The use of molecular typing for epidemiological surveillance and investigation of endemic nosocomial infections, *Infection, Genetics and Evolution*, 4:193–197
- Bodilis J., Nsigue-Meilo S., Besaury L., Quillet L. (2012)**, Variable Copy Number, Intra-Genomic Heterogeneities and Lateral Transfers of the *16S rRNA* Gene in *Pseudomonas*, *PLoS ONE* 7(4): 1-14
- Bonomo R.A. & Szabo D. (2006)**, Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*, *Clin Infect Dis*, 43(2):49–56
- Cabot G., Ocampo-Sosa A.A., Tubau F., Macia M.D., Rodríguez C., Moya B., Zamorano L., Suárez C., Peña C., Martínez-Martínez L., Oliver A. (2011)**, Overexpression of AmpC and efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study, *Antimicrob Agents*, 55(5):1906-11, doi: 10.1128/AAC.01645-10
- Castro-Escarpulli G., Alonso-Aguilar N.M., Sánchez G.R., Bocanegra-García V., Guo X., Juárez-Enríquez S.R., Luna-Herrera J., Martínez C.M., Ma Guadalupe A.A. (2015)**, Identification and Typing Methods for the Study of Bacterial Infections: a Brief Review and Mycobacterial as Case of Study, *Archives of Clinical Microbiology*, 7(1): 3
- Chakravorty S., Helb D., Burday M., Connell N., Alland D. (2007)**, A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria, *J Microbiol Methods*, 69(2):330–339, DOI:10.1016/j.mimet.2007.02.005.
- Cholley P., Stojanov M., Hocquet D., Thouverez M., Bertrand X., Blanc D.S. (2015)**, Comparison of double-locus sequence typing (DLST) and multilocus sequence typing (MLST) for the investigation of *Pseudomonas aeruginosa* populations, *Diagn Microbiol Infect Dis*, 82(4):274–277 (doi:10.1016/j.diagmicrobio.2015.03.027)
- Chun J. & Goodfellow M. (1995)**, A phylogenetic Analysis of the Genus *Nocardia* with *16s rRNA* Gene Sequences, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(2): 240-245
- Clarridge J.E. (2004)**, Impact of *16S rRNA* Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases, *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4):840–862
- Cornelis P. (2008)**, *Pseudomonas* Genomics and Molecular Biology, Caister Academic Press, 24-44
- Croft L., Beatson S.A., Whitchurch C.B., Huang B., Blakeley R.L., Mattick J.S. (2000)**, An interactive web-based *Pseudomonas aeruginosa* genome database : discovery of new genes, pathways and structures, *Microbiology*, 146:2351–2364
- De Melo Oliveira J.M., Abels S., Zbinden R., Bloemberg G.V., Zbinden A. (2013)**, Accurate identification of fastidious Gram-negative rods: integration of both conventional phenotypic methods and *16S rRNA* gene analysis, *BMC Microbiology*, 13:162, <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-162>
- De Reuse H. & Bereswill S. (2009)**, *Microbial pathogenomics*, Karger, 6:137
- Dobrevska R.V., Mulet X., Ivanov I., Zamorano L., Dobрева E., Velinov T., Kantardjiev T., Oliver A. (2013)**, Molecular Epidemiology and Multidrug Resistance Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Bulgarian Hospitals, *Microbial Drug Resistance* 19(5):355-361

**Donelli G., Vuotto C., Mastromarino P. (2013)**, Phenotyping and genotyping are both essential to identify and classify a probiotic microorganism, *Microbial Ecology in Health & Disease*, 24: 20105

**Driscoll J.A., Brody S.L., Kollef M.H. (2007)**, The Epidemiology, Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections, *Drugs*, 67 (3):351-368

**Esquisabel C.A.B., Rodríguez M.C., Campo-Sosa A.O., Rodríguez C., Martínez-Martínez L. (2011)**, Mechanisms of resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* less susceptible to cefepime than to ceftazidime, *Clin Microbiol Infect.*, 17(12):1817-22, doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03530.x

**Fair R.J. & Tor Y. (2014)**, Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century, *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 6:25-64

**Fiore M., Maraolo A.E., Gentile I., Borgia G., Leone S., Sansone P., Passavanti M.B., Aurilio C., Pace M.C. (2017)**, Current concepts and future strategies in the antimicrobial therapy of emerging Gram-positive spontaneous bacterial peritonitis, *World J Hepatol.*, 9(30):1166–1175, DOI: 10.4254/wjh.v9.i30.1166

**Fothergill J.L., Upton A.L., Pitt T.L., Hart C.A., Winstanley C. (2008)**, Diagnostic multiplex PCR assay for the identification of the Liverpool, Midlands 1 and Manchester CF epidemic strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Cystic Fibrosis*, 7:258–261

**Francisco A.P., Bugalho M., Ramirez M., Carriço A.J. (2009)**, Global optimal eBURST analysis of multi locus typing data using a graphic matroid approach, *BMC Bioinformatics*, 18(10):152 (doi: 10.1186/1471-2105-10-152)

**Freitas A.L.P. & Barth A.L. (2002)**, Antibiotic Resistance and Molecular Typing of *Pseudomonas aeruginosa*: Focus on imipenem, *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 6(1):1-7

**Fujitani S., Moffett K.S., Yu V.L., (2010-2017)**, antimicrobe, <http://www.antimicrobe.org/b112.asp>

**Giakkoupi P., Petrikos G., Tzouveleki L.S., Tsonas S., The WHONET GREECE Study Group, Legakis N.J., Vatopoulos A.C. (2003)**, Spread of Integron-Associated VIM-Type Metallo- $\beta$ -Lactamase Genes among Imipenem-Nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* Strains in Greek Hospitals, *J Clin Microbiol.*, 41(2):822-825

**Giakkoupi P., Vourli S., Polemis M., Kalapothaki V., Tzouveleki L.S., Vatopoulos A.C. (2008)**, Supplementation of growth media with Zn<sup>2+</sup> facilitates detection of VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa*, *J Clin Microbiol*, 46:1568–9

**Gong J., Si W., Forster R.J., Huang R., Yu H., Yin Y., Yang C., Han Y. (2007)**, *16S rRNA* gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca, *FEMS Microbiology Ecology*, 59(1):147–157, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00193.x>

**Greenwood D., Slack R., Peutherer J., Barrer M. (2007)**, *Medical microbiology, A guide to microbial infections: pathogens, immunity, laboratory diagnosis and control*, 17<sup>th</sup> edition, Broken Hill, p.864

**Gupta K., Hooton T.M., Stamm W.E. (2001)**, Increasing Antimicrobial Resistance and the Management of Uncomplicated Community-Acquired Urinary Tract Infections, *Ann Intern Med.*, 135:41-50.

**Gupta R.S. (2016)**, Impact of genomics on the understanding of microbial evolution and classification: the importance of Darwin's views on classification, *FEMS Microbiology Reviews*, 40(4):520–553, DOI: 10.1093/femsre/fuw011

**Gur S.D. & Aksoz N. (2016)**, Molecular typing of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains by using RAPD-PCR, *Minerva Biotechnologica*, 28(2):104-113

**Gutierrez O., Juan C., Cercenado E., Navarro F., E. Bouza, Coll P., Perez J.L., Oliver A. (2007)**, Molecular Epidemiology and Mechanisms of Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Spanish Hospitals, *Antimicrobials agents and chemotherapy*, 51(12): 4329–4335

**Guzek A., Korzeniewski K., Tomaszewski D., Rybicki Z., Zwolińska E. (2017)**, Bacteriological Assessment of Pneumonia Caused by Gram-Negative Bacteria in Patients Hospitalized in Intensive Care Unit, *Biol.*, 955:39-46, doi: 10.1007/5584\_2016\_163

**Hancock R.E. & Speert D.P. (2000)**, Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment, *Drug Resist Updat*, 3(4):247-255

**Hattermer A., Hauser A., Diaz M., Scheetz M., Shah N., Allen J.P., Porhomayon J., El-Solha A.A. (2013)**, Bacterial and Clinical Characteristics of Health Care- and Community-Acquired Bloodstream Infections Due to *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(8):3969–3975

**Hatchette T.F., Gupta R., Marrie J.T. (2000)**, *Pseudomonas aeruginosa* Community-Acquired Pneumonia in Previously Healthy Adults: Case Report and Review of the Literature, *Clinical Infectious Diseases*, 31:1349–56

**Horianopoulou M., Legakis N.J., Kanellopoulou M., Lambropoulos S., Tsakris A., Falagas M.E. (2006)**, Frequency and predictors of colonization of the respiratory tract by VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* in patients of a newly established intensive care unit, *J Med Microbiol.*, 10:1435-9

**Igbiosa E.O., Odjadjare E.E., Igbiosa I.H., Orhue O.P., Omoigberale M.N. & Amhanre N.I. (2012)**, Antibiotic synergy interaction against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from an abattoir effluent environment, *The Scientific World Journal*, a:308034 (doi: 10.1100/2012/308034)

**Ikonomidis A., Tsakris A., Kantzanou M., Spanakis N., Maniatis A.N., Pournaras S. (2008)**, Eflux system overexpression and decreased OprD contribute to the carbapenem heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa*, *FEMS Microbiol Lett*, 279(1):36–39

**Janda J.M. & Abbott S.L (2007)**, *16S rRNA* Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9): 2761–2764

**Juhas M., van der Meer J.R., Gaillard M., Harding R.M., Hood D.W., Crook D.W. (2009)**, Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution, *FEMS, Microbiol Rev.* 33:376–393

**Kalita M. & Malek W. (2017)**, Molecular phylogeny of Bradyrhizobium bacteria isolated from root nodules of tribe Genisteae plants growing in southeast Poland, *Systematic and Applied Microbiology*, <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.09.001>



- Kapoor G., Saigal S., Elongavan A. (2017)**, Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology*, 33(3):300-305. doi:10.4103/joacp.JOACP\_349\_15
- Kazmierczak K.M., Rabine S., Hackel M., McLaughlin R.E., Biedenbach D.J., Bouchillon S.K., Sahn D.F., Bradford P.A. (2015)**, Multiyear, Multinational Survey of the Incidence and Global Distribution of Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob Agents Chemother.*, 60(2):1067-78, doi: 10.1128/AAC.02379-15
- Kerr K.G. & Snelling A.M. (2009)**, *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary, *Journal of Hospital Infection*, 73:338-344
- Khan N.H., Mahbuba A., Susumu Y., Shoichi H., Akira Y., Kazuhiro K., (2008)**, Multilocus Sequence Typing and Phylogenetic Analyses of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from the Ocean, *Applied and Environmental Microbiology*, 74(20):6194–6205
- Kidd T. J., Ritchie S. R., Ramsay K. A., Grimwood K., Bell S. C., Rainey P. B., (2012)**, *Pseudomonas aeruginosa* Exhibits Frequent Recombination, but Only a Limited Association between Genotype and Ecological Setting, *PLOS ONE*, 7(9):1-14
- Kim H.S., Park B.K., Kim S.K., Han S.B., Lee J.W., Lee D.G., Chung N.G., Cho B., Jeong D.C., Kang J.H. (2017)**, Clinical characteristics and outcomes of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in febrile neutropenic children and adolescents with the impact of antibiotic resistance: a retrospective study, *BMC Infectious Diseases*, 17:500
- Kim M., Heo S.R., Choi S.H., Kwon H., Park J.S., Seong M.W., Lee D.H., Park K.U., Song J., Kim E.C. (2008)**, Comparison of the MicroScan, VITEK 2, and Crystal GP with *16S rRNA* sequencing and MicroSeq 500 v2.0 analysis for coagulase-negative Staphylococci, *BMC Microbiology*, 8:233
- Koonin E.V. (2005)**, Orthologs, Paralogs, and Evolutionary Genomics, *Annu. Rev. Genet.*, 39:309–38
- Koutsogiannou M., Drougka E., Liakopoulos A., Jelastopulu E., Petinaki E., Anastassiou E.D., Spiliopoulou I., Christofidou M. (2013)**, Spread of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clones in a university hospital, *J Clin Microbiol.*, 51(2):665-8, doi: 10.1128/JCM.03071-12
- Kuhn G., Francioli P., Blanc D.S. (2007)**, Double-Locus Sequence Typing Using *clfB* and *spa*, a Fast and Simple Method for Epidemiological Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 45(1): 54-62
- Kummerer K. (2004)**, Resistance in the environment, *J Antimicrob Chemother*, 54:311–320 (doi: 10.1093/jac/dkh325)
- Kung V.L., Ozer E.A., Hauser A.R., (2010)**, The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*, *American Society for Microbiology*, 74(4):621-641
- Lane D.J., Pace B., Olsen G.J., Stahl D.A., Sogin M.L., Pace N.R. (1985)**, Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 82(20):6955–9

- Lauretti, L., Riccio, M. L., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R. & Rossolini, G. M. (1999)**, Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 1584–1590
- Laxminarayan R., Duse A., Wattal C., Zaidi A.K.M., Wertheim H.F.L., Sumpradit N., Vlieghe E., Hara G.L., Gould I.M., Goossens H., Greko C., So A.D., Bigdeli M., Tomson G., Woodhouse W., Ombaka E., Peralta A.Q., Qamar F.N., Mir F., Kariuki S., Bhutta Z.A., Coates A., Bergstrom R., Wright G.D., Brown E.D., Cars O. (2013)**, Antibiotic resistance-the need for global solutions, *Lancet Infect Dis*, 13:1057-1098
- Lee J.Y. & Ko K.S. (2012)**, OprD mutations and inactivation, expression of efflux pumps and AmpC, and metallo- $\beta$ -lactamases in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea, *Int J Antimicrob Agents*, 40(2):168-72 (doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.04.004)
- Lewin B. (2004)**, Genes VIII (πρώτος τόμος), Ακαδημαϊκές εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε., Αλεξανδρούπολη, σελ. 158, 655-664
- Liakopoulos A., Mavroidi A., Katsifas E.A., Theodosiou A., Karagouni A.D., Miriagou V., Petinaki E. (2013)**, Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* from central Greece: molecular epidemiology and genetic analysis of class I integrons
- Libisch A., Watine J., Balogh B., Gacs M., Muzslay M., Szabo G., Fuzi M. (2008)**, Molecular typing indicates an important role for two international clonal complexes in dissemination of VIM-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Hungary, *Research in Microbiology* 159:162-168
- Lister P.D., Wolter D.J., Hanson N.D. (2009)**, Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms, *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4):582–610
- Liu L., Coenye T., Burns J.L., Whitby P.W., Stull T.L., LiPuma J.J. (2002)**, Ribosomal DNA-Directed PCR for Identification of *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* Recovered from Sputum Samples from Cystic Fibrosis Patients, *Journal of clinical microbiology*, 40(4):1210–1213
- Livermore D.M. (2002)**, Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare?, *Clinic Infect Dis*, 34(5):634-640
- Lopes J., Debrauwere H., Buard, J., Nicolas A. (2002)**, Instability of the human minisatellite CEB1 in rad27Delta and dna2–1 replication-deficient yeast cells. *EMBO J*. 21:3201–3211
- Loureiro .M.M, de Moraes B.A., Mendonça V.L.F, Quadra M.R.R., Pinheiro G.S., Asensi M.D. (2002)**, *Pseudomonas aeruginosa*: Study of Antibiotic Resistance and Molecular Typing in Hospital Infection Cases in a Neonatal Intensive Care Unit from Rio de Janeiro City, Brazil, *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 97(3):387-394
- Maatallah M., Cheriaa J., Backhrouf A., Iversen A., H. Grundmann, Do T., Lanotte P., Mastouri M., Elghmati M.S., Rojo F., Mejdí S., Giske C.G. (2011)**, Population Structure of *Pseudomonas aeruginosa* from Five Mediterranean Countries: Evidence for Frequent Recombination and Epidemic Occurrence of CC235, *PLoS ONE*, 6(10):1-11

- Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C. G., Harbarth S., Hindler J.F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D.L., Rice L.B., Stelling J., Struelens M.J., Vatopoulos A., Weber J.T., Monnet D.L. (2012)**, Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance, *Clin Microbiol Infect*, 18:268–281
- Maraki S., Mantadakis E., Nioti E., Samonis G. (2015)**, Susceptibility of 2,252 *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates Over 4 Years to 9 Antimicrobials in a Tertiary Greek Hospital, *Chemotherapy*, 60:334–341, DOI: 10.1159/000437252
- Mathee K., Narasimhan G., Valdes C., Qiu X., Matewish J.M., Koehrsen M., Rokas A., Yandava C.N., Engels R., Zeng E., Olavarietta R., Doud M, Smith R.S., Montgomery P., White J.R., Godfrey P.A., Kodira C., Birren B., Galagan J.E. Lory S. (2008)**, Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution, *PNAS*, 105(8):3100- 3105
- Matuschek E., Brown D.F.J., Kahlmeter G. (2014)**, Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories, *Clinical Microbiology and Infection*, 20(4):O255–O266, DOI: 10.1111/1469-0691.12373
- McCarthy K.L. & Paterson D.L. (2016)**, Community-acquired *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: a classification that should not falsely reassure the clinician, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, DOI 10.1007/s10096-016-2852-0
- Meletis G. & Bagkeri M. (2013)**, *Pseudomonas aeruginosa*: Multi-Drug-Resistance Development and Treatment Options, *Infection Control*:33-56, DOI: 10.5772/55616
- Μενεγάτου Δ., Νικολοπούλου- Ντέρου Ε., Παυλινέρη Π. (2001)**, Μικροβιολογία ΙΙ, Υπουργείο Εθνικής Παιδείας και Θρησκευμάτων, Αθήνα, σελ. 73-76
- Morrill H.J., Pogue J.M., Kaye K.S., LaPlante K.L. (2015)**, Treatment Options for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections, *OFID* 1-15
- Morita Y., Tomida J., Kawamura Y. (2014)**, Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials, *Frontiers in Microbiology, Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy*, 4(422):1-8
- Mulvey M.R. & Simor A.E. (2009)**, Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be, *CMAJ*, 180(4):408-415
- Nakayama A., Saito R., Matsuzaki M., Yano Y., Yoshida K. (2005)**, Phylogenetic analysis based on *16S rRNA* gene sequences of deep-sea bacteria isolated from intestinal contents of deep-sea fishes retrieved from the abyssal zone, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 51:385–394
- Ntushelo K. (2013)**, Identifying bacteria and studying bacterial diversity using the 16S ribosomal RNA gene-based sequencing techniques: A review, *Afr. J. Microbiol. Res.*, 7(49):5533-5540, DOI:10.5897/AJMR2013.5966
- Onteniente L., Brisse S., Tassios P.T., Vergnaud G. (2003)**, Evaluation of the polymorphisms associated with tandem repeats for *Pseudomonas aeruginosa* strain typing. *J Clin Microbiol*, 41:4991–4997

- Pappa O., Beloukas A., Vantarakis A., Mavridou A., Kefala A.M., Galanis A. (2016)**, Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from Greek aquatic habitats implementing the Double Locus Sequence Typing scheme, *Microbial Ecology*, doi:10.1007/s00248-016-0920-8.
- Peña C., Suarez C., Tubau F., Juan C., Moya B., Dominguez M.A., Oliver A., Pujol M., Ariza J. (2009)**, Nosocomial Outbreak of a Non-Cefepime-Susceptible Ceftazidime-Susceptible *Pseudomonas aeruginosa* Strain Overexpressing MexXY-OprM and Producing an Integron-Borne PSE-1  $\beta$ -Lactamase, *J Clin Microbiol.*, 47(8): 2381–2387.
- Pérez-Losada M., Cabezas P., Castro-Nallar E. & Crandall K.A. (2013)**, Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology, *Infect Genet Evol*, 16:38-53 (doi: 10.1016/j.meegid.2013.01.009)
- Potter R.F., D'Souza A.W. and Dantas G. (2016)**, The rapid spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, *Drug Resist Updat*, 29:30–46, doi:10.1016/j.drup.2016.09.002
- Prestinaci F., Pezzotti P., Pantosti A. (2015)**, Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon, *Pathogens and Global Health*, 109(7):309-318
- Rajendhran J. & Gunasekaran P. (2011)**, Microbial phylogeny and diversity: Small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond, *Microbiological Research*, 166:99-110
- Ranellou K., Kadlec K., Poulou A., Voulgari E., Vriani G., Schwarz S., Tsakris A. (2012)**, Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates of the international clonal complex 11 carrying the blaPER-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase gene in Greece, *J Antimicrob Chemother*, 67(2):357-61, doi: 10.1093/jac/dkr471
- Ranjbar R., Ali Karami A., Farshad S., Giammanco G.M., Mamma C. (2014)**, Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide, *New Microbiologica*, 37:1-15
- Sabat A. J., Budimir A., Nashev D., Sá-Leão R., van Dij J. M., Laurent F., H. Grundmann, Friedrich A. W. (2013)**, Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance, *Euro Surveillance*, 18(4):1-15
- Sakwinska O., Kuhn G., Balmelli C., Francioli P., Giddey M., Perreten V. et al (2009)**, Genetic Diversity and Ecological Success of *Staphylococcus aureus* Strains Colonizing Humans, *Appl Environ Microbiol*, 75(1):175–183 (doi: 10.1128/AEM.01860-08)
- Samonis G., Maraki S., Karageorgopoulos D.E., Vouloumanou E.K., Falagas M.E. (2012)**, Synergy of fosfomycin with carbapenems, colistin, netilmicin, and tigecycline against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 31(5):695-701. doi: 10.1007/s10096-011-1360-5
- Sarwat T., Rashid M., Rastogi V., Chander Y. (2015)**, A Comparative Study of AntibioGram of *Pseudomonas aeruginosa* in Hospital and Community Acquired Infections, *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 1:286-291
- Σαζακλή Ε. (2005)**, Ταυτοποίηση *Pseudomonas spp* που απομονώνονται από το υδάτινο περιβάλλον με βιοχημικές, ηλεκτροφορητικές και μοριακές τεχνικές, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών.

**Sazakli E., Leotsinidis M., Vantarakis A. & Papapetropoulou M. (2005)**, Comparative typing of *Pseudomonas* spp isolated from the aquatic environment in Greece by SDS- page and RAPD analysis, *J. Appl. Microbiol.* 99 (5), 1191–1203

**Sharma N., Anita K., Gupta A.K., Walia G., Bakhshi R. (2016)**, A retrospective study of antimicrobial resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from urine samples over last three years (2013-2015), *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*, 5(4):1551-1554

**Shi Z., Ren D., Hu S., Hu X., Wu L., Lin H., Hu J., Zhang G. & Guo L. (2015)**, Whole genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* F9676, an antagonistic bacterium isolated from rice seed, *J Biotechnol*, 10(211):77-8 (doi:10.1016/j.jbiotec.2015.07.015)

**Siarkou V.I., Vitti D., Protonotariou E., Ikonomidis A., Sofianou D. (2009)**, Molecular epidemiology of outbreak-related *pseudomonas aeruginosa* strains carrying the novel variant blaVIM-17 metallo-beta-lactamase gene, *Antimicrob Agents Chemother.*, 53(4):1325-30. doi:10.1128/AAC.01230-08

**Sibila O., Laserna E., Maselli D.J., Fernandez J.F., Mortensen E.M., Anzueto A., GRANT Waterer G., Restrepo M.I. (2015)**, Risk factors and antibiotic therapy in *P. aeruginosa* community-acquired pneumonia, *Respirology*, doi: 10.1111/resp.12506

**Silby M.W., Winstanley C., Godfrey S.A.C., Levy S.B., Jackson R.W. (2011)**, *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable, *FEMS, Microbiol Rev*, 35:652–680

**Smith S., Ganiyu O., John R., Fowora M., Akinsinde K., Odeigah P. (2012)**, Antimicrobial Resistance and Molecular Typing of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Surgical Wounds in Lagos, Nigeria, *Acta Medica Iranica*, Vol. 50(6): 433-438

**Spencer D.H., Kas A., Smith E.E., Raymond C.K., Sims E.H., Hastings M., Burns J.L., Kaul R., Olson M.V. (2003)**, Whole-Genome Sequence Variation among Multiple Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Bacteriology*, 185(4):1316–1325

**Spilker T., Coenye T., Vandamme P., LiPuma J.J. (2004)**, PCR-Based Assay for Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from Other *Pseudomonas* Species Recovered from Cystic Fibrosis Patients, *Journal of Clinical Microbiology* Vol 42(5): 2074–2079

**Sridhar Rao P.N.**, [www.microrao.com](http://www.microrao.com) (Last edited on June 2006)

**Stefani S., Campana S. Cariani L., Carnovale V., Colombo C., Lleo M.M., Iula V.D., Minicucci L., Morelli P., Pizzamiglio G., Taccetti G. (2017)**, Relevance of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis, *Int J Med Microbiol.*, 307(6):353-362, doi: 10.1016/j.ijmm.2017.07.004.

**Stojanov M., Magalhaes B., Terletsky V., Basset P., Prod'hom G., Greub G., Senn L., Blanc D.S. (2016)**, Development and evaluation of double locus sequence typing for molecular epidemiological investigations of *Clostridium difficile*, *Euro J Clin Microbiol & Infect Dis*, 35(2):175-181

**Stover C.K., X.Q. Pham, A.L. Erwin, S.D. Mizoguchi, P. Warrenner, M.J. Hickey, F.S.L. Brinkman, W.O. Hufnagle, D.J. Kowalik, M. Lagrou, R.L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L.L. Brody, S.N. Coulter, K.R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G.K.-S. Wong, Z. Wu, I.T. Paulsen, J. Reizer, M.H. Saier, R.E.W. Hancock, S.Lory, M.V.**

**Olson (2000)**, Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen, Nature, 406:959-964

**Strachan T. & Read A.P. (2004)**, Human Molecular Genetics 3, Garland Science:262, ISBN: 0815341849, 9780815341840

**Strateva T. & Yordanov D. (2009)**, *Pseudomonas aeruginosa*- a phenomenon of bacterial resistance, J Med Microbiol, 58(9):1133-1148 (doi: 10.1099/jmm.0.009142-0)

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, 2017. (<http://www.eucast.org>.)

**Teixeira B., Hectorina Rodulfo H., Numirin Carreno N., Militza Guzman M., Elsa Salazar E., De Donato M. (2016)**, Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Cumana, Venezuela, Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 58:13, <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-9946201658013>

**Thrane S.W., Taylor V.L., Lund O., Lam J.S., Jelsbak L. (2016)**, Application of WGS data for O-specific antigen analysis and in silico serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates., J Clin Microbiol, 54(7):1782-82

**Tissot F., Blanc D.S., Basset P., Zanetti G., Berger M.M. Que Y.A., Eggimann P. & Senn, L. (2016)**, New genotyping method discovers sustained nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in an intensive care burn unit, J Hosp Infect, 94(1):2-7

**Todar K. (2014)** Online Textbook of Bacteriology: [www.textbookofbacteriology.net](http://www.textbookofbacteriology.net)

**Tsakris A., Pournaras S., Woodford N., Palepou M.F.I., Babini G.S., Douboyas J., Linermore D.M. (2000)**, Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece, Journal of clinical microbiology, 38(3): 1290-1292

**Tsuji S., Saraya T., Tanaka Y., Makino H., Yonetani S., Araki K., Kurai D., Ishii H., Takizawa H., Goto H. (2014)**, Community-acquired *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in previously healthy patients, MM Case Reports, DOI 10.1099/jmmcr.0.000281

**Tümmler B., Wiehlmann L., Klockgether J., Cramer N. (2014)**, Advances in understanding *Pseudomonas*, F1000Prime Reports, 6:9

**Van Belkum A., Tassios T.P., Dijkshoom L., Hangman S., Fry N.K., Fussing V., Green J., Feil E., Gerner-Smidt P., Brisse S., Struelens M. (2007)**, Guidelines for the validation and the application of typing methods for use in bacterial epidemiology, Clin Microbiol Infect Dis, 13(3):1-46

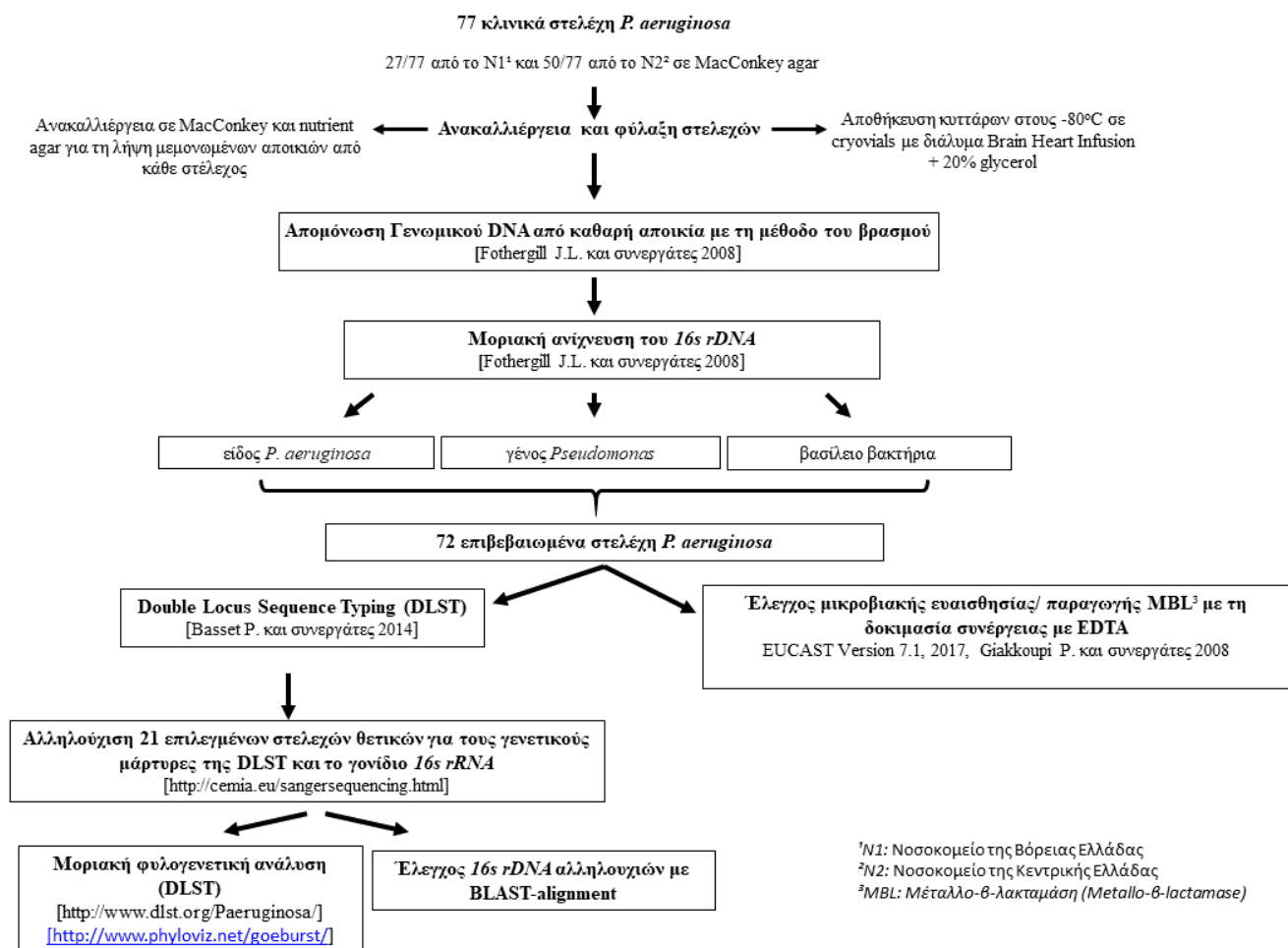
**Venditti M., Falcone M., Corrao S., Licata G., Serra P. and the Study Group of the Italian Society of Internal Medicine (2009)**, Outcomes of Patients Hospitalized With Community-Acquired, Health Care-Associated, and Hospital-Acquired Pneumonia, Ann Intern Med., 150:19-26

**Ventola C.L. (2015)**, the Antibiotic Resistance Crisis Part 1: Causes and Threats, Pharmacy & Therapeutics, 40(4):277-283

**Viedma E., Juan C., Villa J., Barrado L., Orellana M.A., Sanz F., Otero J.R., Oliver A., Chaves F. (2012)**, VIM-2-producing Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175 Clone, Spain. Emerging Infectious Diseases, 18(8):1235-41

- Vogel V., Falquet L., Calderon-Copete S.P., Basset P., Blanc D.S. (2012)**, Short term evolution of a highly transmissible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone (ST228) in a tertiary care hospital, PLoS One, 7(6):e38969
- Vourli, S., P. Giakkoupi, V. Miriagou, E. Tzelepi, A. C. Vatopoulos, L. S. Tzouvelekis (2004)**, Novel GES/IBC extended-spectrum beta-lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria, FEMS Microbiol. Lett., 234:209-213.
- Vu-Thien H., Corbineau G., Hormigos K., Fauroux B., Corvol H., Cle´ment A., Vergnaud G., Pourcel C. (2007)**, Multiple-locus variable number tandem-repeat analysis for longitudinal survey of sources of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol, 45: 3175–3183
- Wiehlmann L., Wagner G., Cramer N., Siebert B., Gudowius P., Morales G., Kohler T., van Delden C., Weinel C., Slickers P., Tummler B. (2007)**, Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*, PNAS, 104(19):8101–8106
- Wolfgang M. C., Kulasekara B. R., Liang X., Boyd D., Wu K., Yang Q., Miyada C. G., Lory S. (2003)**, Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, PNAS, 100(14):8484–8489
- Woo P.C.Y., Lau S.K.P., Teng J.L.L., Tse H., Yuen K.-Y. (2008)**, Then and now: use of *16S rDNA* gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories, Clin Microbiol Infect, 14:908–934
- Yang B., Wang Y., Qian P.-Y. (2016)**, Sensitivity and correlation of hypervariable regions in *16S rRNA* genes in phylogenetic analysis, BMC Bioinformatics, 17:135, DOI: 10.1186/s12859-016-0992-y

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



**Εικόνα Π1:** Διάγραμμα ροής των πειραματικών διαδικασιών που ακολουθήθηκαν στην παρούσα μελέτη.



**Πίνακας Π1:** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Όνομα εκκινητών	Γονίδιο στόχος	Αλληλουχία εκκινητών (5'-3')	Θερμοκρασία καλής λειτουργίας εκκινητών (Tm)	Μήκος προϊόντος PCR (bp)	Βιβλιογραφία
217F	<i>ms217</i>	TTCTGGCTGTCGCGACTGAT	64°C	Μεταβλητό	Basset P. και συνεργάτες 2014
217R		GAACAGCGTCTTTTCCTCGC			
172F	<i>ms172</i>	GGATTCTCTCGCACGAGGT	60°C	Μεταβλητό	
172R		TACGTGACCTGACGTTGGTG			
PA-SS-F	<i>16s rRNA</i> ( <i>P.aeruginosa</i> )	GGGGGATCTTCGGACCTCA	58°C	956	Spilker T. και συνεργάτες 2004, Fothergill J.L. και συνεργάτες 2008
PA-SS-R		TCCTTAGAGTGCCACCCG			
PA-GS-F	<i>16s rRNA</i> ( <i>Pseudomonas</i> )	GACGGGTGAGTAATGCCTA	54°C	618	
PA-GS-R		CACTGGTGTTCCTTCCTATA			
314F	<i>16s rRNA</i> (bacteria)	CCTACGGGAGGCAGCAG	53°C	560	Fothergill J.L. και συνεργάτες 2008
518R		CCGTCAATTCMTTTGAGTTT			

**Πίνακας Π2:** Χαρακτηριστικά και προφίλ μικροβιακής αντοχής των συνολικά 77 στελεχών *P. aeruginosa* της συλλογής από τα 2 Νοσοκομεία της Ελλάδας.

*Abbreviations:* H1: Hospital of Northern Greece, H2: Hospital of Central Greece, B.S: Bronchial Secretions, BAL: Bronchial Washing, C.B.D: Center of Breath Deficiency, ICU: Intensive Care Unit, NI: Not Identified

ID	Hospital	Date collected	Location	Source	DLST			16s		Zone diameter breakpoint(mm)/EUCAST 2017									Resistance Profile
					ms172	ms217	LOCUS	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas / Bacteria</i>	AMK S≥18 R<15	GEN: S≥15 R<15	ATM: S≥50 R<16	FEP: S≥19 R<19	CAZ: S≥19 R<19	IPM: S≥20 R<17	MEM: S≥24 R<18	TIC: S≥18 R<18	CIP: S≥26 R<26	
1	H1	11/3/2017	PATHOLOGICAL CLINIC	BLOOD	1	1	82-54	1	1/1	10	9	20	11	20	21	33	19	6	R3a: CARB-S, EDTA(-), AmpC, FEP R
2	H1	1/2/2017	ICU	BLOOD	1	1		1	1/1	16	15	21	25	23	24	34	24	32	S: AmpC
3	H1	10/3/2017	-	BLOOD	0	1		1	1/1	18	15	27	22	26	25	36	26	28	S: AmpC
4	H1	10/8/2016	ORTHOPEDIC CLINIC	BLOOD	1	1		1	1/1	6	6	23	14	15	13	13	6	6	R2c: CARB-R, EDTA(-)
5	H1	30/12/2016	PSYCHIATRIC CLINIC	BLOOD	1	1		1	1/1	20	15	26	23	28	24	32	24	30	S: AmpC
6	H1	9/1/2017	ICU	BLOOD	1	1	20-30	1	1/1	19	16	26	27	27	10	20	24	29	R6: CARB-R, EDTA(-), oprD, AmpC
7	H1	13/4/2017	HAEMATOLOGY CLINIC	BLOOD	1	1		1	1/1	18	13	24	21	25	27	35	22	30	R4: CARB-S, EDTA(-), AmpC
8	H1	7/4/2017	PATHOLOGICAL CLINIC	BLOOD	1	1		1	1/1	18	14	24	24	28	26	34	23	30	R4: CARB-S, EDTA(-), AmpC
9	H1	6/4/2017	ICU	BLOOD	1	1		1	1/1	18	16	24	21	28	25	36	24	28	S: AmpC
10	H1	22/3/2017	HAEMATOLOGY CLINIC	BLOOD	0	0		0	1/1	6	6	6	7	28	17	30	28	10	NI
11	H1	2/6/2016	ICU	BLOOD	1	1		1	1/1	12	6	20	6	12	15	10	13	6	R3a: CARB-R, EDTA(-)
12	H1	14/11/2016	PATHOLOGICAL CLINIC	BLOOD	1	1		1	1/1	23	22	28	28	32	27	38	24	36	S: AmpC
13	H1	29/10/2016	NEUROSURGICAL	BLOOD	1	1		1	1/1	20	19	25	26	26	28	38	24	36	S: AmpC

14	H1	9/3/2017	HAEMATOLOGY CLINIC	BLOOD	0	0		0	1/1	21	16	14	16	22	34	18	6	19	NI
15	H1	21/4/2017	NEUROLOGICAL CLINIC	BLOOD	1	1		1	1/1	17	12	25	24	25	26	37	22	30	R4: CARB-S, EDTA(-), AmpC
16	H1	11/7/2016	ICU	BLOOD	1	1		1	1/1	16	12	25	28	28	25	33	25	30	R4: CARB-S, EDTA(-), AmpC
17	H1	29/7/2016	CARDIOLOGY CLINIC	BLOOD	1	1	67-39	1	1/1	19	12	24	6	27	11	14	25	28	R2a: CARB-R, EDTA(-), FEP R
18	H1	1/11/2016	ICU	BLOOD	1	1	90-139	1	1/1	21	19	26	19	26	30	36	28	6	R4: CARB-S, EDTA(-), AmpC
19	H1	26/7/2016	-	BLOOD	1	1		1	1/1	6	6	28	6	9	20	15	6	6	R2b: CARB-R, EDTA(-), efflux
20	H1	1/3/2017	PATHOLOGICAL CLINIC	BLOOD	1	1		1	1/1	17	16	23	22	24	28	25	24	40	S: AmpC
21	H1	11/8/2016	ORTHOPEDIC CLINIC	BLOOD	1	1		1	1/1	6	6	24	6	9	12	13	6	6	R2c: CARB-R, EDTA(-)
22	H1	27/5/2016	ORTHOPEDIC CLINIC	BLOOD	1	1	22-44	1	1/1	6	6	24	6	10	13	13	6	6	R2c: CARB-R, EDTA(-)
23	H1	3/8/2016	ORTHOPEDIC CLINIC	BLOOD	1	1		1	1/1	6	6	24	6	9	14	13	6	6	R2c: CARB-R, EDTA(-)
24	H1	23/6/2016	ICU	BLOOD	1	1		1	1/1	6	6	21	13	14	13	14	6	6	R2c: CARB-R, EDTA(-)
25	H1	17/10/2016	PNEUMOLOGICAL	BLOOD	1	1		1	1/1	12	13	24	22	26	26	33	24	28	R4: CARB-S, EDTA(-), AmpC
26	H1	21/6/2016	ICU	BLOOD	1	1		1	1/1	24	19	27	28	26	24	30	27	30	S: AmpC
27	H1	11/10/2016	ICU	BLOOD	1	1		1	1/1	16	13	25	24	26	24	34	22	28	R4: CARB-S, EDTA(-), AmpC
28	H2	26/5/2016	EMERGENCY DPT	SPUTUM	1	1		1	1/1	17	14	20	14	20	30	29	20	20	R3a: CARB-S, EDTA(-), AmpC, FEP R
29	H2	25/5/2016	INCREASED CARE UNIT / C.B.D.	B.S.	1	1	1-83	1	1/1	19	14	13	6	9	11	9	9	28	R1a: CARB-R, EDTA(+)
30	H2	25/5/2016	INCREASED CARE UNIT / C.B.D.	B.S.	1	1		1	1/1	18	10	17	15	14	20	27	14	25	R3b: CARB-S, EDTA(-), AmpC
31	H2	22/5/2016	EMERGENCY DPT	SPUTUM	1	1		1	1/1	6	6	14	6	10	6	6	6	6	R1a: CARB-R, EDTA(+)
32	H2	20/10/2016	5th PNEUMOLOGICAL	SPUTUM	1	1	8-37	1	1/1	6	6	17	6	20	6	10	8	6	R2a: CARB-R, EDTA(-), FEP R
33	H2	14/10/2016	UN. PATHOLOGY	B.S.	1	1		1	1/1	6	6	24	6	8	6	6	13	6	R1a: CARB-R, EDTA(+)
34	H2	13/10/2016	UN. PATHOLOGY	SPUTUM	0	0		0	1/1	21	20	>35	21	29	23	28	6	30	NI
35	H2	26/10/2016	C.B.D.	SPUTUM	1	1		1	1/1	6	6	27	10	14	14	10	6	6	R1a: CARB-R, EDTA(+)

36	H2	10/11/2016	ICU/C.B.D.	URINE	1	1		1	1/1	6	7	18	6	10	6	15	6	6	R2c: CARB-R, EDTA(-)
37	H2	19/11/2016	4th PNEUMOLOGICAL	CATHETER	1	1	8-37	1	1/1	6	8	15	6	6	6	6	6	6	R1a: CARB-R, EDTA(+)
38	H2	21/11/2016	ICU/PATHOLOGICAL	SPUTUM	1	1		1	1/1	6	12	20	6	6	6	6	6	6	R1a: CARB-R, EDTA(+)
39	H2	1/12/2016	ICU/C.B.D.	B.S.	1	1		1	1/1	6	7	18	6	12	6	13	6	6	R2c: CARB-R, EDTA(-)
40	H2	8/12/2016	ICU/C.B.D.	B.S.	1	1		1	1/1	6	6	15	6	6	6	16	6	6	R1a: CARB-R, EDTA(+)
41	H2	19/12/2016	5th PNEUMOLOGICAL	SPUTUM	1	1		1	1/1	6	6	16	6	6	6	6	6	6	R1a: CARB-R, EDTA(+)
42	H2	22/12/2016	ICU/C.B.D.	SPUTUM	0	0		0	1/1	6	6	8	6	23	14	37	26	16	NI
43	H2	2/1/2017	ICU/C.B.D.	BLOOD	1	1	8-37	1	1/1	6	7	17	6	6	12	16	6	6	R2c: CARB-R, EDTA(-)
44	H2	10/1/2017	PATHOLOGICAL CLINIC	BLOOD	1	1	8-37	1	1/1	6	8	22	6	8	6	6	6	6	R1a: CARB-R, EDTA(+)
45	H2	17/1/2017	ICU/C.B.D.	CATHETER	1	1		1	1/1	6	7	21	6	12	6	16	6	6	R2c: CARB-R, EDTA(-)
46	H2	23/1/2017	ICU/C.B.D.	B.S.	1	1		1	1/1	6	6	23	6	20	6	6	6	6	R1a: CARB-R, EDTA(+), AmpC
47	H2	27/1/2017	7th PNEUMOLOGICAL	SPUTUM	1	1		1	1/1	6	6	32	6	13	8	13	9	14	R1a: CARB-R, EDTA(+)
48	H2	23/3/2017	INCREASED CARE UNIT/ C.B.D.	SPUTUM	1	1		1	1/1	10	6	6	6	6	20	13	6	6	R2b: CARB-R, EDTA(-), efflux
49	H2	23/3/2017	INCREASED CARE UNIT/ C.B.D.	B.S.	1	1		1	1/1	6	8	16	6	6	6	16	6	6	R1a: CARB-R, EDTA(+)
50	H2	23/3/2017	4th PNEUMOLOGICAL	SPUTUM	1	1		1	1/1	6	6	24	6	6	10	11	6	6	R1a: CARB-R, EDTA(+), AmpC
51	H2	30/3/2017	PATHOLOGICAL CLINIC	BLOOD	1	1	8-37	1	1/1	10	12	22	6	20	11	6	6	6	R2a: CARB-R, EDTA(-), AmpC, FEP R
52	H2	3/4/21017	ICU/ PATHOLOGICAL CLINIC	B.S.	1	1	78-17	1	1/1	6	9	22	6	8	6	6	6	6	R1a: CARB-R, EDTA(+)
53	H2	1/5/2017	ICU/ PATHOLOGICAL	CATHETER	1	1	8-37	1	1/1	6	8	18	6	6	6	6	6	6	R1a: CARB-R, EDTA(+), AmpC
54	H2	15/3/2017	ICU/ PATHOLOGICAL CLINIC	B.S.	1	1		1	1/1	17	14	22	20	18	22	30	17	29	R3b: CARB-S, EDTA(-), AmpC
55	H2	17/8/2016	5th PNEUMOLOGICAL	BAL	0	0		0	1/1	24	23	25	15	22	30	21	6	24	NI
56	H2	19/8/2016	5th PNEUMOLOGICAL	SPUTUM	1	1		1	1/1	14	13	16	6	11	25	9	6	9	R2b: CARB-R, EDTA(-), efflux

57	H2	17/8/2016	7th PNEUMOLOGICAL	BAL	1	1	78-17	1	1/1	30	>35	40	6	30	>35	>35	>35	>35	R5: CARB-S, EDTA(-), FEP R
58	H2	21/8/2016	PATHOLOGICAL CLINIC	URINE	1	1		1	1/1	11	11	14	6	17	27	15	6	6	R2b: CARB-R, EDTA(-), efflux
59	H2	21/8/2016	6th PNEUMOLOGICAL	SPUTUM	1	1		1	1/1	6	6	18	6	6	12	8	6	6	R1a: CARB-R, EDTA(+)
60	H2	23/8/2016	PATHOLOGICAL CLINIC	SPUTUM	1	1	21-26	1	1/1	20	17	29	21	26	29	30	20	32	S: AmpC
61	H2	23/8/2016	10th PNEUMOLOGICAL	SPUTUM	1	1		1	1/1	17	17	30	6	22	16	33	27	24	R2a: CARB-R, EDTA(-), FEP R
62	H2	21/8/2016	C.B.D.	SPUTUM	1	1	18-156	1	1/1	7	8	6	6	13	10	6	6	6	R1a: CARB-R, EDTA(+)
63	H2	22/8/2016	10th PNEUMOLOGICAL	PUS	1	1	18-156	1	1/1	13	11	8	8	11	10	6	6	6	R2c: CARB-R, EDTA(-)
64	H2	22/8/2016	THORAKO/SURGICAL	PUS	1	1		1	1/1	17	16	28	6	20	10	13	22	26	R2a: CARB-R, EDTA(-), FEP R
65	H2	28/8/2016	INCREASED CARE UNIT	B.S.	1	1		1	1/1	6	6	12	6	8	6	6	6	6	R1a: CARB-R, EDTA(+)
66	H2	24/8/2016	6th PNEUMOLOGICAL	SPUTUM	1	1		1	1/1	14	11	28	22	21	20	32	20	32	R4: CARB-S, EDTA(-), AmpC
67	H2	28/8/2016	OUTPATIENTS	SPUTUM	1	1		1	1/1	19	15	24	12	19	22	35	18	16	R3a: CARB-S, EDTA(-), AmpC, FEP R
68	H2	28/8/2016	6th PNEUMOLOGICAL	SPUTUM	1	1		1	1/1	6	9	20	6	8	8	11	12	8	R2d: CARB-R, EDTA(-), AmpC
69	H2	25/8/2016	10th PNEUMOLOGICAL	SPUTUM	1	1		1	1/1	16	13	24	20	20	24	31	18	26	R4: CARB-S, EDTA(-), AmpC
70	H2	25/8/2016	7th PNEUMOLOGICAL	SPUTUM	1	1		1	1/1	13	12	20	9	17	26	30	18	18	R3b: CARB-S, EDTA(-), AmpC
71	H2	29/8/2016	10th PNEUMOLOGICAL	B.S.	1	1		1	1/1	12	9	14	6	6	6	6	6	18	R1a: CARB-R, EDTA(+)
72	H2	29/8/2016	PATHOLOGICAL CLINIC	SPUTUM	1	1		1	1/1	25	23	27	6	21	30	34	30	27	R5: CARB-S, EDTA(-), AmpC FEP R
73	H2	1/9/2016	7th PNEUMOLOGICAL	B.S.	1	1		1	1/1	11	10	22	9	18	16	25	18	18	R2d: CARB-R, EDTA(-), oprD, AmpC
74	H2	1/9/2016	5th PNEUMOLOGICAL	SPUTUM	1	1	8-78	1	1/1	17	12	>35	6	30	>35	>35	>35	22	R3a: CARB-S, EDTA(-), FEP R
75	H2	30/8/2016	7th PNEUMOLOGICAL	SPUTUM	1	1		1	1/1	16	14	23	17	17	23	26	16	11	R3b: CARB-S, EDTA(-), AmpC
76	H2	30/8/2016	7th PNEUMOLOGICAL	SPUTUM	1	1	9-19	1	1/1	22	15	25	6	24	26	29	19	34	R5: CARB-S, EDTA(-), AmpC, FEP R

77	H2	30/8/2016	9th PNEUMOLOGICAL	BAL	1	1		1	1/1	12	13	24	10	19	22	30	20	-	R3a: CARB-S, EDTA(-), AmpC, FEP R
PAO1	Collection of Institute Pasteur CIP104116				1	1	16-4	1	1/1										
NEQAS	HPA External Quality Control Scheme				1	1	32-39	1	1/1										

