



ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



Διατμηματικό πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών :
Λοιμώδη Νοσήματα – Διεθνής Ιατρική : Από το Εργαστήριο στην Κλινική
Πράξη

**Μοριακή επιδημιολογία νοσοκομειακών και μη, βακτηριακών
λοιμώξεων**

Μάριος Δημητρίου

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Ιούνιος 2019

Επιβλέπων :

Μπελούκας Απόστολος, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

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

Μπελούκας Απόστολος, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους βοήθησαν στην εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας. Αρχικά, οφείλω να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, κ. Γαλάνη Αλέξη, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Ιατρικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, κ. Πανοπούλου Μαρία και ειδικότερα τον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, κ. Μπελούκα Απόστολο, ο οποίος είχε την ευθύνη, ανέλαβε την επίβλεψη και την επιστημονική καθοδήγηση για την παρούσα διπλωματική εργασία και με καθοδηγούσε με τις συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκειά της. Επίσης, ευχαριστώ ολόψυχα την Δρ Παππά Όλγα, Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια - Επιστημονική Συνεργάτη του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής για την εμπιστοσύνη, την πολύτιμη βοήθεια και την αμέριστη συμπαράσταση και καθοδήγηση από τα πρώτα πειράματα της μελέτης μέχρι και τα τελικά στάδια της συγγραφής της εργασίας. Πολλά ευχαριστώ αξίζουν και στις διδακτορικές φοιτήτριες του Εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας, τις Κεφάλια Αναστασία – Μαρία και Διολή Χρύσα, οι οποίες επέβλεψαν την εκπαίδευσή μου στο ξεκίνημα της μελέτης, βοήθησαν σε μεγάλο βαθμό για την εκπόνησή της και συνεργάστηκαν μαζί μου άψογα καθ' όλη τη διάρκειά της. Ευχαριστώ και την Δρ Τρυφίνοπούλου Κυριακή από το Τμήμα Μικροβιακής Αντοχής και Μοριακής Τυποποίησης του ΚΕΔΥ για την πολύτιμη βοήθειά της στη διεξαγωγή των επιδημιολογικών αναλύσεων καθώς και τους Δρ Μωραΐτου Ελένη, Δρ Κωστούλα Κώστα και Δρ Βογιατζάκη Ευάγγελο για τη γενικότερη συμβολή τους στην παρούσα εργασία. Τέλος, δεν θα ήθελα να παραλείψω να αναφερθώ στους δικούς μου ανθρώπους, τους οποίους ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου για την καθημερινή στήριξη και βοήθεια από τα πρώτα μου βήματα ως και σήμερα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι νοσοκομειακές λοιμώξεις αποτελούν ένα μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας, αυξάνοντας όχι μόνο την νοσηρότητα και τη θνησιμότητα στους χώρους παροχής υπηρεσιών υγείας, αλλά και τη διάρκεια και το συνολικό κόστος της νοσηλείας. Το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* αποτελεί σημαντικό και συχνό αίτιο λοιμώξεων τόσο στο νοσοκομείο όσο και την κοινότητα, ενώ τα τελευταία χρόνια εμφανίζει υψηλά ποσοστά αντοχής στα αντιβιοτικά. Η καταγραφή των μηχανισμών αντοχής στα προωθημένα αντιβιοτικά και η χρήση μεθόδων μοριακής τυποποίησης χρησιμοποιούνται ως εργαλεία για τη μελέτη της επιδημίας αυτών των λοιμώξεων. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκαν 72 καλά χαρακτηρισμένα κλινικά καλλιεργήματα *P. aeruginosa* προερχόμενα από 2 ελληνικά τριτοβάθμια νοσοκομεία, το νοσοκομείο N1 της Βόρειας Ελλάδας (25 καλλιεργήματα) και το νοσοκομείο N2 της Κεντρικής Ελλάδας (47 καλλιεργήματα), με στόχο τη μελέτη πιθανής επιδημίας καθώς και των οδών μετάδοσης του παθογόνου. Τα καλλιεργήματα ελέγχθηκαν αρχικά για την παρουσία γονιδίων αντοχής για β-λακτάμες μέσω PCR, με 14 καλλιεργήματα να βρίσκονται θετικά για το γονίδιο bla_{VIM}. Έπειτα, τα καλλιεργήματα τυποποιήθηκαν μέσω μίας καινούριας και πολλά υποσχόμενης μοριακής τυποποιητικής τεχνικής, της Double Locus Sequence Typing (DLST), όπου και κατατάχθηκαν σε 41 διαφορετικούς DLST τύπους. Οι επικρατέστεροι εξ' αυτών ήταν οι 8-37 και 32-39, που περιελάμβαναν από 13 πολυανθεκτικά καλλιεργήματα. Στη συνέχεια, διεξήχθη φυλογενετική ανάλυση χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Global optimal eBURST analysis [www.phyloviz.net/goeburst/] για την κατασκευή minimum spanning trees. Μέσω της φυλογενετικής ανάλυσης, επιβεβαιώθηκε η κλωνική σχέση ανάμεσα στους επικρατείς τύπους και στους φαινότυπους αντοχής CARB_R. Τέλος, η συσχέτιση των αποτελεσμάτων της τυποποίησης με επιδημιολογικά δεδομένα των ασθενών κατέληξε στη χαρτογράφηση των DLST τύπων στον χώρο και τον χρόνο. Η χαρτογράφηση έδειξε πως ο τύπος 8-37 εντοπίζεται σε ασθενείς με μεγάλη μέση διάρκεια νοσηλείας και σε αλληλοεπικαλυπτόμενες περιόδους, ενώ ο τύπος 32-39 εντοπίστηκε σε καλλιεργήματα απομονωμένα κατά τις πρώτες 24-48 ώρες της νοσηλείας. Τα τελευταία δεδομένα συσχετίζουν τον τύπο 8-37 με πιθανή ενδονοσοκομειακή διασπορά, ενώ τον τύπο 32-39 με ευρύτερη διασπορά τόσο εντός όσο και εκτός του νοσοκομειακού περιβάλλοντος. Καταλήγοντας, ο συνδυασμός των προφίλ αντοχής των υπό μελέτη καλλιεργημάτων *P. aeruginosa* με τα γενετικά προφίλ που

προέκυψαν από την εφαρμογή της μεθόδου DLST και με τα επιδημιολογικά δεδομένα, μπορεί να αποδειχθεί πολύτιμος για επιδημιολογικές μελέτες τοπικού επιπέδου που διεξάγονται σε σύντομο χρονικό διάστημα, όπως στην παρούσα μελέτη. Παρ' όλα αυτά, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την θέση της μεθόδου DLST, μόνη ή σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους που εμφανίζουν μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα, για τη διερεύνηση επιδημιών και την επιτήρηση στους χώρους παροχής υπηρεσιών υγείας.

ABSTRACT

Nosocomial infections are a major public health problem, because not only they are associated with increased morbidity and mortality in health services, but also with increasing hospitalization duration and overall health system's costs. *Pseudomonas aeruginosa* has been increasingly associated as the aetiological agent of infections in hospitals as well as in the community. Moreover, circulating *P. aeruginosa* isolates have developed high amounts of resistance in currently used antibiotics. Assessment of the molecular mechanisms causing antimicrobial resistance to widely prescribed antibiotics and molecular typing methods are useful tools in order to study the epidemiology of these infections. Hereby, a total of 71 well-characterized clinical *P. aeruginosa* isolates were studied for a potential outbreak and their transmission patterns. *P. aeruginosa* isolates were derived from a variety of clinical specimens and different units of two tertiary Greek hospitals: the Hospital of Northern Greece (N1, 24 isolates) and the Hospital of Central Greece (N2, 47 isolates). The isolates were tested for b-lactams resistance genes to implementing standard PCR protocols and 14/71 (19,7 %) were found to carry the bla_{VIM} gene. Moreover, the Double Locus Sequence Typing (DLST) method was implemented for the molecular typing. The 71 isolates were stratified to 41 different DLST types, with types 8-37 and 32-39 being the predominant ones, including 13 multidrug resistant isolates each. Phylogenetic analysis was conducted using the Global optimal eBURST analysis software [www.phyloviz.net/goeburst/] to create the minimum spanning trees. The latter confirmed clonal relationships between predominant DLST types and CARB_R phenotypes. Last but not least, molecular typing results were correlated with patients' epidemiological data in order to perform the spotmapping of the DLST types in time and space. The spotmapping results showed that DLST type 8-37 was more often in patients with longer average hospitalization duration and within overlapping periods of time, whereas DLST type 32-39 was found in isolates, which were isolated within the first 24-48 hours of hospitalization. These results indicate that DLST type 8-37 potentially spread within the hospital, in contrast with DLST type 32-39 that is associated with a wider dispersal pattern, within both hospital and community. To conclude, combining *P. aeruginosa* resistant profiles, the DLST types and epidemiological data resulted in valuable information for short time and at a local level

epidemics. Nevertheless, more relevant studies are needed to prove DLST method importance, alone or combined with other methods with higher distinctive ability, to study and follow outbreaks as well as the surveillance of relevant epidemics.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κεφάλαιο 1 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ	14
1.1 Λοιμώξεις που σχετίζονται με το σύστημα υγείας	14
1.2 Γενικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
1.3 Γονιδίωμα του βακτηρίου <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
1.4 Μολυσματικότητα του βακτηρίου <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
1.5 Επιδημιολογία του βακτηρίου <i>Pseudomonas aeruginosa</i> στο νοσοκομειακό περιβάλλον	25
1.6 Πολυανθεκτικά στελέχη <i>Pseudomonas aeruginosa</i> και μηχανισμοί αντοχής	27
1.6.1 Εγγενείς μηχανισμοί αντοχής	27
1.6.2 Επίκτητοι μηχανισμοί αντοχής	29
1.6.2.1 Επίκτητοι μηχανισμοί αντοχής στις β-λακτάμες	29
1.6.3 Διασπορά των γονιδίων αντοχής στις β-λακτάμες στο <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
1.7 Μοριακή επιδημιολογία	32
1.7.1 Στόχοι μοριακής επιδημιολογίας	32
1.7.2 Η μοριακή επιδημιολογία ως εργαλείο δημόσιας υγείας	33
1.8 Τυποποίηση	36
1.8.1 Φαινοτυπικές μέθοδοι	37
1.8.2 Μοριακές μέθοδοι τυποποίησης	38
1.8.2.1 Η μέθοδος Double Locus Sequence Typing (DLST)	39
1.9 eBURST και Minimum Spanning Trees	41

Κεφάλαιο 2 : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	44
2.1 Θρεπτικά υποστρώματα	44
2.2 Χημικά και ρυθμιστικά διαλύματα	45
2.3 Στελέχη αναφοράς	45
2.4 Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων	46
2.5 Απομόνωση γενωμικού DNA	47
2.6 Υλικά και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	48
2.7 Έλεγχος παρουσίας γονιδίων αντοχής	49
2.8 Double Locus Sequence Typing (DLST) και ανάλυση των δεδομένων που ελήφθησαν από την αλληλούχιση	51
2.9 eBURST φυλογενετική ανάλυση και κατασκευή των minimum spanning trees	53
2.10 Στατιστική και επιδημιολογική ανάλυση	54
Κεφάλαιο 3 : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	56
3.1 Μοριακή ανίχνευση μηχανισμών αντοχής	56
3.2 Double Locus Sequence Typing (DLST) και φαινότυποι αντοχής	58
3.3 eBURST φυλογενετική ανάλυση	65
3.3.1 eBURST φυλογενετική ανάλυση νοσοκομείου N1	71
3.3.2 eBURST φυλογενετική ανάλυση νοσοκομείου N2	73
3.4 Ανάλυση επιδημιολογικών δεδομένων με τη χρήση του προγράμματος IBM SPSS Statistics	77
3.4.1 Περιγραφή του συνολικού δείγματος	77
3.4.2 Νοσοκομείο N2	78

3.4.3 Νοσοκομείο N1	80
3.5 Χαρτογράφηση των DLST τύπων στον χώρο και τον χρόνο (spotmapping)	81
3.5.1 Νοσοκομείο N1	81
3.5.2 Νοσοκομείο N2	83
Κεφάλαιο 4 : ΣΥΖΗΤΗΣΗ	101
4.1 Φαινότυποι αντοχής	101
4.2 Double Locus Sequence Typing (DLST)	104
4.3 eBURST φυλογενετική ανάλυση	107
4.4 Ανάλυση επιδημιολογικών δεδομένων	110
4.5 Χαρτογράφηση των DLST τύπων στον χώρο και τον χρόνο (spotmapping)	113
4.6 Συμπεράσματα	117
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	119
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	130

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AMEs	Aminoglycoside Modifying Enzymes
AMK	Αμικασίνη
ATM	Αζτρεονάμη
BSIs	Blood Stream Infections
CAIs	Community Acquired Infections
CAP	Community Acquired Pneumonia
CARB _R	Carbapenem resistant
CAUTIs	Catheter Associated Urinary Tract Infections
CAZ	Κεφταζιδίμη
CCs	Clonal complexes
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CIP	Συπροφλοξασίνη
CLABSIs	Central Line Associated Bloodstream Infections
CLSI	Clinical Laboratory Standard Institute
CTX	Κεφοταξίμη
DLST	Double Locus Sequence Typing
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ECDC	European Center for Disease Control and Prevention
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ESBLs	Extended Spectrum Beta Lactamases
EUCAST	European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing

FEP	Κεφεπίμη
GEN	Γενταμικίνη
HAIs	Hospital Acquired Infections
HAP	Hospital Acquired Pneumonia
HCAIs	Healthcare Associated Infections
HCAP	Healthcare Associated Pneumonia
ICEs	Integration and Conjugation Elements
IPM	Ιμπενέμη
MBLs	Metallo-beta-lactamases,
MDR	Multi Drug Resistant
MEM	Μεροπενέμη
MIC	Mean Inhibitory Concentration
MLST	Multi Locus Sequence Typing
MLVA	Multi-locus VNTR Analysis
MRSA	Methicillin Resistant <i>S. aureus</i>
MSTs	Minimum Spanning Trees
NEQAS	National External Quality Assessment Service (United Kingdom)
ORFs	Open Reading Frames
PAO1	<i>P. aeruginosa</i> serotype O1
PBPs	Penicillin-binding proteins
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulse Field Gel Electrophoresis
RAPD-PCR	Random Amplified Polymorphic DNA-PCR
REA	Restriction Endonuclease Analysis
Rep-PCR	Repetitive element palindromic PCR
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RGPs	Regions of Genomic Plasticity
rpm	Rounds per minute
RPs	Resistant Profiles

SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
SSIs	Surgical Site Infections
STRs	Short Tandem Repeats
TBE	Tris-borate-EDTA
TIC	Τικαρκιλίνη
UK	United Kingdom
VAP	Ventilator Associated Pneumonia
VNTR	Variable Number Tandem Repeats
E.M.M.A.	Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας
ΗΠΑ	Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής
Θ/Χ	Θωρακοχειρουργική
ΚΑΑ	Κέντρο Αναπνευστικής Ανεπάρκειας
ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ	Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων
ΚΦΚ	Κεντρικός Φλεβικός Καθετήρας
ΜΑΦ	Μονάδα Αυξημένης Φροντίδας
ΜΕΘ	Μονάδα Εντατικής Θεραπείας
ΜΠΕΚ	Μονάδα Περιτοναϊκής Κάθαρσης
Π/Π	Πανεπιστημιακή Παθολογική
ΤΕΠ	Τμήμα Επείγοντων Περιστατικών

Κεφάλαιο 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Λοιμώξεις που σχετίζονται με το σύστημα υγείας

Οι λοιμώξεις παραδοσιακά ως προς την προέλευσή τους διακρίνονται σε νοσοκομειακές (hospital acquired infections, HAIs) και της κοινότητας (community acquired infections, CAIs), σύμφωνα με τον κλασικό ορισμό του Εθνικού Συστήματος Καταγραφής και Επιδημιολογικής Επιτήρησης Νοσοκομειακών Λοιμώξεων του Center for Disease Control and Prevention (CDC) [1].

Νοσοκομειακές λοιμώξεις ονομάζονται αυτές που προέρχονται από το περιβάλλον ή το προσωπικό ιδρυμάτων που σχετίζονται με υπηρεσίες υγείας [2]. Εντός του όρου αυτού συμπεριλαμβάνονται όχι μόνο τα νοσοκομεία, αλλά και ιδρύματα όπως κέντρα αποκατάστασης, κέντρα υγείας, γηροκομεία κλπ. Η μετάδοση των λοιμώξεων μπορεί να συμβεί με πολλαπλούς τρόπους, όπως με τη χρήση μολυσμένου εξοπλισμού ή μέσω του ιατρονοσηλευτικού προσωπικού, και να εξαπλωθεί εντός του νοσοκομειακού περιβάλλοντος και μεταξύ των νοσηλευόμενων ασθενών [3]. Οι νοσοκομειακές λοιμώξεις αποτελούν ένα μεγάλο πρόβλημα δημόσιας υγείας, μιας και θέτουν σε κίνδυνο την ασφάλεια των ασθενών και παράλληλα αυξάνουν την νοσηρότητα και τη θνησιμότητα. Επιπρόσθετα, έχουν αυξήσει κατά πολύ την διάρκεια και το συνολικό κόστος της νοσηλείας. Οι συνηθέστερες νοσοκομειακές λοιμώξεις είναι αυτές του ουροποιητικού συστήματος (catheter associated urinary tract infections, CAUTIs), του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού συστήματος (μεταξύ αυτών και η ventilator associated pneumonia ή VAP), του χειρουργικού πεδίου (surgical site infections, SSIs), δηλαδή αυτές που προκύπτουν μετεγχειρητικά στο σημείο του σώματος όπου πραγματοποιήθηκε η εγχείριση, και του αίματος, οι οποίες σχετίζονται με κεντρικούς φλεβικούς καθετήρες (central line associated bloodstream infections, CLABSIs) [4, 5].

Λοιμώξεις της κοινότητας χαρακτηρίζονται οι επίκτητες λοιμώξεις των οποίων η ανάπτυξη και η μετάδοση λαμβάνει χώρα εκτός νοσοκομείου, αλλά απαιτούν την μεταφορά του ασθενούς στο νοσοκομείο (π.χ. πνευμονιοκοκκική πνευμονία) ή οι λοιμώξεις με κλινική

εμφάνιση 48 ώρες έπειτα από την εισαγωγή του ασθενούς στο νοσοκομείο για οποιοδήποτε λόγο (π.χ. ανεμοβλογιά) [6]. Στη δεύτερη περίπτωση, πολλές φορές δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρο αν η λοίμωξη μπορεί να χαρακτηριστεί λοίμωξη της κοινότητας. Λοιμώξεις που διαγιγνώσκονται μέσα στις πρώτες 48 ώρες από την εισαγωγή του ασθενούς με πρόσφατη νοσηλεία, ή διαμένοντα σε κλινική ή ίδρυμα ή υποβαλλόμενου σε παρεμβατικούς ιατρικούς χειρισμούς σε εξωνοσοκομειακό περιβάλλον είναι δύσκολο να ταξινομηθούν. Η αυστηρή διάκριση μεταξύ νοσοκομειακής ή από την κοινότητα προέλευσης της λοίμωξης έχει καταστεί λιγότερο σαφής με ορισμένες λοιμώξεις να έχουν μικτά χαρακτηριστικά των δύο τύπων αιτιολογικής προέλευσης.

Δημοσιευμένες μελέτες έχουν ασχοληθεί με αυτό το θέμα καθώς είναι ιδιαίτερα σημαντικό να είναι ξεκάθαρος ο χαρακτηρισμός της λοίμωξης. Στην μελέτη των Friedman και των συνεργατών [7], η οποία περιορίζεται στη διάκριση των βακτηριαμιών σε σχέση με την προέλευσή τους, προτάθηκε το εξής σύστημα ταξινόμησης των βακτηριαμιών :

Βακτηριαμία σχετιζόμενη με υπηρεσίες υγείας: Θετική αιμοκαλλιέργεια κατά την εισαγωγή ή εντός 48 ωρών από την εισαγωγή, εφόσον ο ασθενής πληροί οποιοδήποτε από τα παρακάτω κριτήρια:

- ✓ Λήψη ενδοφλέβιας αντιβιοτικής αγωγής, ή εξειδικευμένη νοσηλευτική φροντίδα έως και 30 ημέρες πριν τη βακτηριαμία.
- ✓ Επίσκεψη σε νοσοκομείο ή κλινική για αιμοκάθαρση ή για λήψη ενδοφλέβιας χημειοθεραπείας.
- ✓ Νοσηλεία για 2 ή περισσότερες ημέρες σε νοσοκομείο έως και 90 ημέρες (3 μήνες) πριν την εκδήλωση της βακτηριαμίας.
- ✓ Διαμονή σε οίκο ευγηρίας ή κέντρο αποκατάστασης ή κλινική.

Βακτηριαμία κοινότητας : Θετική αιμοκαλλιέργεια κατά την εισαγωγή ή εντός 48 ωρών από την εισαγωγή, εφόσον ο ασθενής δεν πληροί τα παραπάνω κριτήρια για βακτηριαμία σχετιζόμενη με υπηρεσίες υγείας.

Το προτεινόμενο σχήμα ταξινόμησης της βακτηριαμίας ισχυροποιήθηκε και από τα ευρήματα μεταγενέστερων μελετών [8-10] και χρησιμοποιείται σήμερα στις περισσότερες προοπτικές ή αναδρομικές μελέτες που ασχολούνται με ασθενείς με βακτηριαμία [11-14].

Τα τελευταία χρόνια, οι αλλαγές στο σύστημα υγειονομικής περίθαλψης έχουν μετατοπίσει ένα σημαντικό μέρος της φροντίδας των ασθενών από τα νοσοκομεία σε μονάδες παροχής υγείας όπως κλινικές, κέντρα αποκατάστασης, οίκους ευγηρίας, ακόμη και ως εξειδικευμένη νοσηλεία κατ' οίκον. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να είναι λιγότερο ευδιάκριτα τα όρια ανάμεσα στις HAIs και CAIs λοιμώξεις. Έτσι, προέκυψε μια επιπλέον κατηγορία, προκειμένου να συμπεριληφθούν λοιμώξεις που εμφανίζονται σε εξωνοσοκομειακούς ασθενείς που έχουν όμως τακτική ή πρόσφατη επαφή με το διευρυμένο πλέον σύστημα παροχής υπηρεσιών υγείας, και καλούνται "λοιμώξεις που συνδέονται με την υγειονομική περίθαλψη" (healthcare associated infections, HAIs). Σε αυτή την νέα κατηγορία περιλαμβάνονται οι λοιμώξεις ασθενών με πρόσφατη επαφή με το σύστημα υγειονομικής περίθαλψης μέσω νοσηλευτικών ιδρυμάτων, κλινικών αιμοκάθαρσης, μονάδων μακροχρόνιας περίθαλψης ή και νοσηλείας σε νοσοκομείο [15-17].

Σύμφωνα με στοιχεία του CDC, 1,7 εκατομμύρια νοσηλευόμενοι στην Αμερική εμφανίζουν HCAI κατά τη νοσηλεία τους και πάνω από 98.000 εξ' αυτών καταλήγουν. Πολλές μελέτες υπολογίζουν την επίπτωση των HAIs από 4,6% έως 9,3% των νοσοκομειακών λοιμώξεων στην Ευρώπη. Η κατηγορία ασθενών που αντιμετωπίζει τα περισσότερα προβλήματα είναι αυτή που συμπεριλαμβάνει άτομα με βεβαρυμένο ιστορικό, καθώς κάθε χρόνο διαγιγνώσκονται περισσότερες από 500.000 HAIs στις μονάδες εντατικής θεραπείας [18].

Μία σχετικά μικρή ομάδα μικροοργανισμών είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση έως και του 87% των νοσοκομειακών λοιμώξεων στο σύνολό τους. Κυριότεροι εκπρόσωποι είναι τα βακτήρια *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* και *oxytoca*, *Enterococcus faecalis* και *faecium*, *Candida albicans* και *glabrata*, οι κοαγκουλάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι και κάποια είδη *Enterobacter* και *Proteus*. Έως και το 20% αυτών των παθογόνων εμφανίζει πολυανθεκτικούς φαινότυπους αντοχής, με τα ανθεκτικότερα στελέχη που προκαλούν τις

λοιμώξεις να προέρχονται πολλές φορές από επιμολυσμένο ιατρικό εξοπλισμό, όπως καθετήρες [19-21].

Οι λοιμώξεις της κοινότητας (CAIs), οι λοιμώξεις που σχετίζονται με την υγειονομική περίθαλψη (HCAIs) και εκείνες που αποκτούνται στο νοσοκομείο (HAIs) αποτελούν 3 διακριτές επιδημιολογικές και κλινικές οντότητες, οι οποίες εμφανίζουν μία τάση αύξησης της θνησιμότητας και της σοβαρότητας της προκαλούμενης νόσου (π.χ. βακτηραιμία, πνευμονία κ.α.), ξεκινώντας από την πρώτη και καταλήγοντας στην τελευταία κατηγορία [15-17]. Σημειώνεται επίσης πως το αντίκτυπο των νοσοκομειακών λοιμώξεων ενδέχεται να είναι έως και 20 φορές μεγαλύτερο σε αναπτυσσόμενες χώρες σε σχέση με τις ανεπτυγμένες [18].

1.2 Γενικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa*

Το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* είναι ένα Gram αρνητικό στρογγυλό βακτήριο μεγέθους 0.5-0.8 μm x 1.5-3.0 μm . Χάρη στο ενιαίο πολικό μαστίγιο που διαθέτει, το βακτήριο μπορεί να κινείται με χαρακτηριστικό ελικοειδή τρόπο [22, 23] το χώμα και το νερό, καθιστώντας το ένα από τα ταχύτερα και πιο ευρέως διαδεδομένα βακτήρια στη φύση. Έχει την ικανότητα να ζεί είτε ως μονοκύτταρο ελεύθερο βακτήριο που κινείται στα διάφορα περιβάλλοντα με τη βοήθεια του μαστιγίου, είτε με την δημιουργία βιολογικού υμενίου (biofilm), μορφή που εντοπίζεται πολλές φορές σε επιφάνειες και διάφορα υποστρώματα που έρχονται σε επαφή με το νερό [23]. Το βακτήριο χρησιμοποιεί εξειδικευμένους μηχανισμούς προκειμένου να έρθει σε επαφή και να προσκολληθεί σε επιφάνειες, αλλά και για να αναπτυχθεί εντός του βιοϋμενίου. Επίσης, μπορεί και επανέρχεται στην ελεύθερη μορφή του μέσω της διαδικασίας που ονομάζεται αποκόλληση ή διασπορά. Έχει παρατηρηθεί πως αφαίρεση του μαστιγίου μειώνει την ικανότητα προσκόλλησης και ανάπτυξης του βακτηρίου, σε οποιαδήποτε επιφάνεια, κατά 90%. Επίσης, τα συστήματα χημειοταξίας που διαθέτει ελέγχουν την κινητικότητά του και συμβάλλουν στην οικολογική διασπορά του ως ένα ευκαιριακό παθογόνο [22, 24].

Το *P. aeruginosa* έχει πολύ απλές διατροφικές απαιτήσεις. Δεν απαιτούνται ιδιαίτεροι παράγοντες για την ανάπτυξή του, ενώ παράλληλα το βακτήριο μπορεί να χρησιμοποιήσει περισσότερες από εβδομήντα πέντε οργανικές ενώσεις. Λόγω αυτών των χαρακτηριστικών, το βακτήριο εμφανίζει μεγάλη προσαρμοστικότητα. 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. Παρ' όλα αυτά, διαφοροποιείται από τα υπόλοιπα είδη του γένους *Pseudomonas*, καθώς δύναται να αναπτυχθεί σε θερμοκρασία έως και 42 °C. Δεν συμμετέχει σε διαδικασίες ζύμωσης, αλλά μπορεί η ανάπτυξή του να προχωρήσει και απουσία οξυγόνου, με την προϋπόθεση πως υπάρχουν διαθέσιμα νιτρικά στο περιβάλλον, τα οποία παίζουν το ρόλο του τελικού δέκτη των ηλεκτρονίων [23, 25, 26]. Επιπρόσθετα, εμφανίζει ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων και χρωστικών, ασθενή αντισηπτικά, αλλά και πολλά ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά [27].

Όπως και άλλα είδη του γένους *Pseudomonas*, το βακτήριο *P. aeruginosa* εκκρίνει 2 τύπους διαλυτών χρωστικών ουσιών, την πυοκυανίνη και την πυοβερδίνη. Η πρώτη είναι υπεύθυνη για τη χαρακτηριστική μπλε-πράσινη απόχρωση των αποικιών του, ενώ η δεύτερη δίνει ένα χρώμα κίτρινο-πράσινο στις αποικίες και προκαλεί έντονο φθορισμό. Ο φθορισμός στο υπεριώδες φως αποδεικνύεται 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 που υπολείπονται σε σίδηρο, αλλά και κατά την πορεία του μεταβολισμού των ιόντων από το βακτήριο [23, 26]. Η παραγωγή της πυοβερδίνης αλλά και η ιδιαίτερη οσμή των αποικιών (γιασεμί) αποτελούν βασικά χαρακτηριστικά προκειμένου να ταυτοποιηθεί το είδος. Οι συνήθεις αποικίες εμφανίζονται επίπεδες, έχοντας ανώμαλα άκρα και με την τάση να απλώνονται πάνω στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού. Η μορφολογία των αποικιών δεν είναι όμως πάντοτε η τυπική, καθώς έχουν διαγνωστεί 6 διαφορετικοί τύποι αποικιών, οι λείες (smooth), οι ξηρές (rough), οι βλενώδεις (mucoid), οι ζελατινώδεις, οι μικρές και εκείνες με μορφή κολοβακτηριδίου. Οι διαφορές στη μορφολογία των αποικιών συνοδεύονται και από βιολογικές, βιοχημικές, αντιγονικές και άλλες, όπως διαφορές στην ευαισθησία των αντιβιοτικών [23, 28].

1.3 Γονιδίωμα του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa*

Το βακτήριο *P. aeruginosa* διαθέτει ένα μεγάλο και πολύπλοκο γονιδίωμα, με την πρώτη προσπάθεια αλληλούχισής του να γίνεται στο στέλεχος PAO1 (*P. aeruginosa* serotype O1), ένα στέλεχος ευρέως χρησιμοποιούμενο σε ερευνητικές μελέτες, το οποίο είχε απομονωθεί αρχικά από τραύμα ασθενούς στην Αυστραλία. Μελέτες αλληλούχησης που πραγματοποιήθηκαν το 2000 έδειξαν πως το στέλεχος αυτό έχει γονιδίωμα μεγέθους 6.3 Mbp, παρουσιάζοντας παράλληλα υψηλή περιεκτικότητα σε G+C (66.6%) και περιέχοντας 5.570 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames, ORFs) [29, 30]. Όπως συμβαίνει και με άλλα βακτηριακά γονιδιώματα, ένα μεγάλο ποσοστό του γονιδιώματος (45.8% των ORFs) αποτελείται από γονίδια χωρίς κάποια καθορισμένη ή γνωστή έως και σήμερα λειτουργία. Τα 372 από το σύνολο των ORFs του *P. aeruginosa* εμπεριέχουν γονίδια με σαφείς και αποδεδειγμένες λειτουργίες, καθώς αυτά συμβάλλουν σε πληθώρα βιολογικών διεργασιών, όπως στην προσκόλληση του βακτηρίου, στην κινητικότητά του, στους μηχανισμούς παθογένειας ή στην αύξηση της προσαρμοστικότητάς του [31]. Το γονιδίωμα του *P. aeruginosa* διαθέτει το μεγαλύτερο σχετικό ποσοστό ρυθμιστικών γονιδίων (8.4%) σε σύγκριση με άλλα βακτήρια, όπου ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων φαίνεται να συμμετέχει σε διεργασίες όπως ο καταβολισμός, η μεταφορά και η εκροή οργανικών συστατικών, ενώ άλλα γονίδια εμπλέκονται σε τέσσερα χημειοτακτικά συστήματα, από τα οποία τουλάχιστον το ένα συμμετέχει στη δημιουργία βιολογικού υμενίου [30].

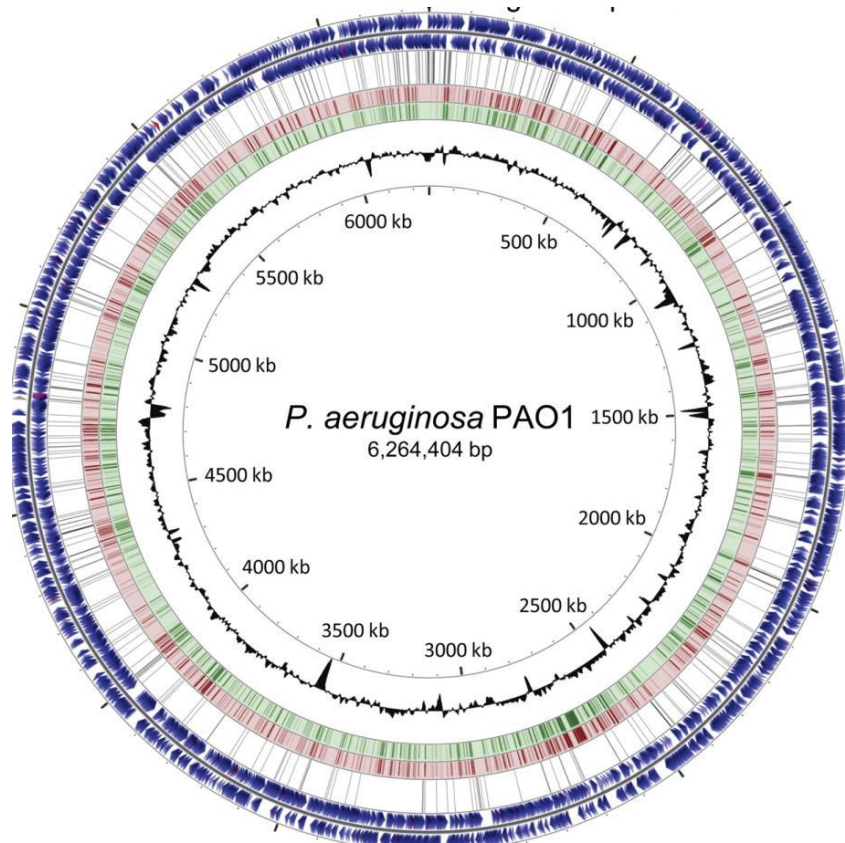
Μετά από συγκριτική ανάλυση ανάμεσα σε γονιδιώματα περιβαλλοντικών και κλινικών στελεχών *P. aeruginosa*, αποκαλύφθηκε πως το γονιδίωμα του βακτηρίου είναι ένα μωσαϊκό σχηματιζόμενο από συντηρημένες αλληλουχίες, οι οποίες αποτελούν και τον πυρήνα του γονιδιώματος (core genome), αλλά και από διάσπαρτα μεταβλητά γενετικά στοιχεία, τα οποία αποτελούν βοηθητικά στοιχεία του γονιδιώματος (accessory genome) [29, 32, 33]. Ο πυρήνας του γονιδιώματος αποτελείται από περισσότερα από 4000 γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν για μεταβολικούς και παθογόνους παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί συναντώνται 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 μεταξύ των στελεχών [29, 31].

Σε αντίθεση με τον πυρήνα του γονιδιώματος, τα βοηθητικά στοιχεία του γονιδιώματος (accessory genome) περιλαμβάνουν γονίδια που μπορεί να εντοπίζονται μόνο σε ορισμένα στελέχη, αλλά να απουσιάζουν από άλλα συγγενικά. Τα γενετικά στοιχεία αυτά έχουν την τάση να συγκεντρώνονται σε ορισμένες θέσεις που λειτουργούν ως «hot spots». Οι Mathee και συνεργάτες (2008), χρησιμοποίησαν τον όρο «περιοχές γενωμικής πλαστικότητας» («Regions of Genomic Plasticity», RGP) για να περιγράψουν αυτές τις θέσεις [29, 34, 35]. Οι γενετικές αλληλουχίες που καταλαμβάνουν πολλές RGP αναφέρονται συχνά ως γονιδιωματικά νησιά (μεγέθους > 10 kb) ή νησίδες (μεγέθους < 10 kb), δηλαδή διακριτά τμήματα DNA που τις περισσότερες φορές έχουν αποκτηθεί με διαδικασίες οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς και ενσωματώνονται συχνά δίπλα ή μέσα σε tRNA γονίδια. Επίσης, χαρακτηρίζονται από διαφορετική περιεκτικότητα σε G+C σε σχέση με το πυρηνικό χρωμόσωμα [33, 34, 36]. Πολλά από τα γονιδιωματικά νησιά εμφανίζουν ικανότητες ενσωμάτωσης στο χρωμόσωμα του ξενιστή, ενώ μπορούν και να αποκοπούν και να μεταφερθούν σε έναν νέο ξενιστή μέσω μετασχηματισμού, σύζευξης ή μεταγωγής [37].

Τα γονιδιωματικά νησιά θεωρείται ότι συμβάλλουν στην ικανότητα στελεχών *P. aeruginosa* να αποικίζουν και να επιβιώνουν σε ακραία περιβάλλοντα, προσδίδοντας στο βακτήριο ειδικούς φαινότυπους του επιτρέπουν την επιβίωση και τον ανταγωνισμό με άλλους μικροοργανισμούς [29, 30, 36, 38]. Αυτό συμβαίνει γιατί περιέχουν γονίδια που κωδικοποιούν για λοιμογόνους παράγοντες (πχ. ελαστάση, εξωτοξίνη A, φωσφολιτάση, και αλκαλική πρωτεάση), αλλά και γονίδια που προσφέρουν αντοχή σε πολλαπλές κατηγορίες αντιβιοτικών [37, 39, 40]. Έτσι, φαίνεται πως τα γενετικά στοιχεία παίζουν καθοριστικό ρόλο στη βιολογία του βακτηρίου, σε συνδυασμό με άλλες γενετικές διεργασίες.

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 [29, 41]. Σημειώνεται πως πολλά από τα γενετικά στοιχεία δεν ταξινομούνται με σαφήνεια σε μία συγκεκριμένη κατηγορία, ενώ κάποια άλλα μπορεί να στερούνται χαρακτηριστικά κατάταξης σε οποιαδήποτε από αυτές τις κατηγορίες. Παρ' όλα αυτά, η χρήση του συγκεκριμένου συστήματος ταξινόμησης παρέχει ένα χρήσιμο πλαίσιο

κατάταξης και αναγνώρισης των στοιχείων που αποτελούν το «accessory genome» του βακτηρίου [35].



Εικόνα 1.1. Το γονιδίωμα του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa* με τα 5.570 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames)[30].

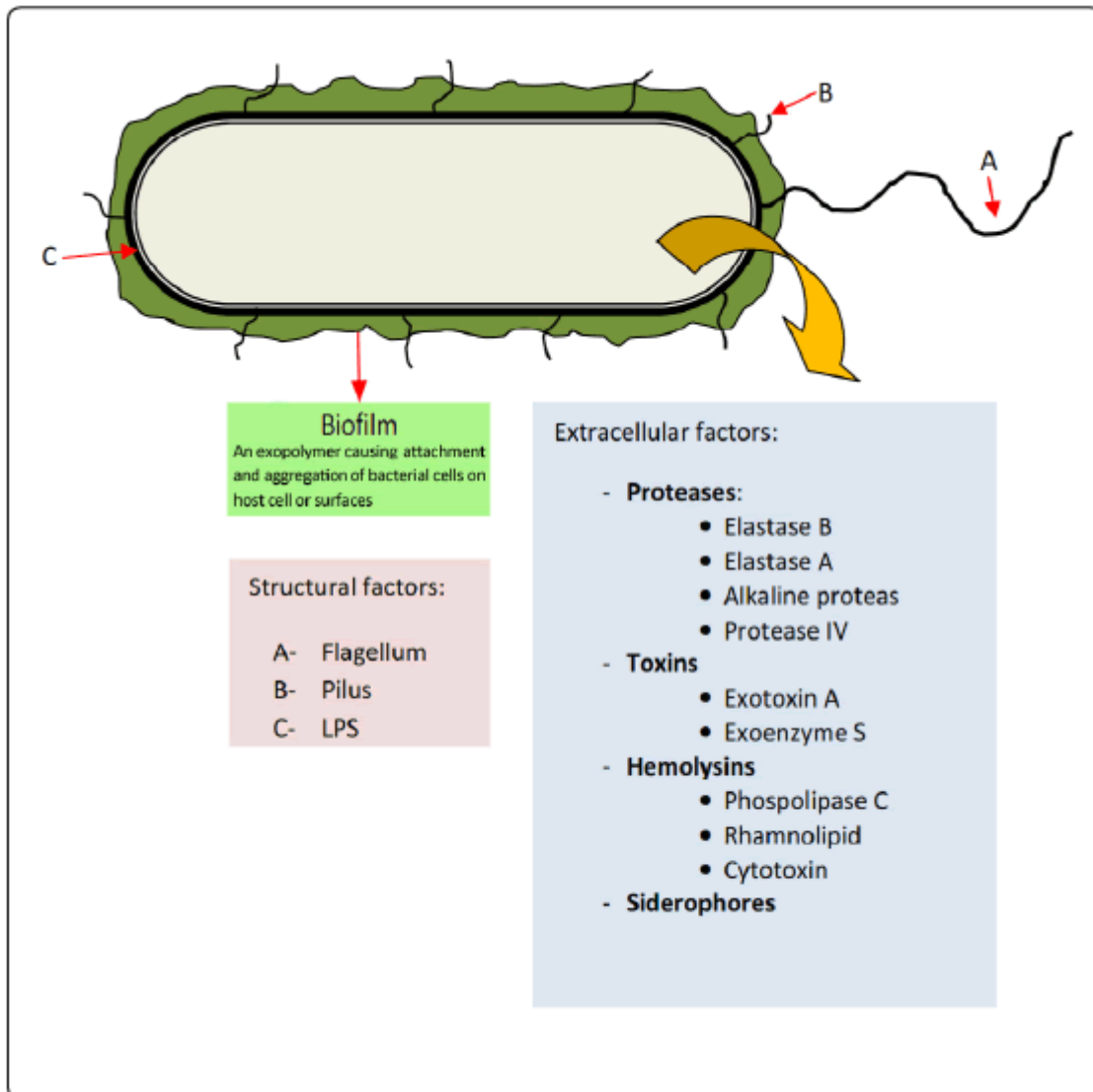
1.4 Μολυσματικότητα του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa*

Το βακτήριο *P. aeruginosa* έχει συνδεθεί από τη δεκαετία του 1960 με πρόκληση λοιμώξεων στον άνθρωπο, όντας το πιο κοινό μολυσματικό παθογόνο σε ασθενείς με αιματολογικές και ογκολογικές διαταραχές. Η ικανότητα του βακτηρίου να επιβιώνει έχοντας ελάχιστες διατροφικές απαιτήσεις και να αντέχει σε μεγάλο εύρος φυσικών συνθηκών του επιτρέπει να ευδοκιμεί τόσο στη κοινότητα όσο και στο νοσοκομειακό περιβάλλον. Η υψηλή μολυσματικότητα και ανθεκτικότητα του βακτηρίου οφείλονται σε διάφορους παράγοντες όπως η λιπο-πολυσακχαριδική φύσεως εξωτερική μεμβράνη του, οι εγγενείς μηχανισμοί αντοχής, αλλά και οι επίκτητοι μηχανισμοί που προσλαμβάνονται μέσω κινητών γενετικών στοιχείων από άλλα βακτήρια. Επιπρόσθετα, η ικανότητα δημιουργίας βιοϋμενίων (biofilms) καθιστά πρόκληση την εύρεση αποτελεσματικής θεραπείας [27, 42, 43].

Το βακτήριο μπορεί να μολύνει οποιαδήποτε εξωτερική θέση ή επιφάνεια του σώματος. Η πλειοψηφία των λοιμώξεων της κοινότητας είναι ήπιες και επιφανειακές, σε αντίθεση με τις νοσοκομειακές λοιμώξεις που είναι συχνότερες και έχουν σοβαρότερο αντίκτυπο στην ανθρώπινη υγεία. Τα ποσοστά μόλυνσης 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, ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς ή ασθενείς με διαταραχές στη μικροβιακή χλωρίδα λόγω αντιμικροβιακής θεραπείας, εμφανίζουν υψηλότερο κίνδυνο μόλυνσης από το βακτήριο [6, 44, 45].

Στην κοινότητα, το βακτήριο εμφανίζεται σε ενδονοσήσια ποικίλου τύπου, όπως πισίνες, υδρομασάζ, διαλύματα φακών επαφής, οικιακοί υγραντήρες, χώμα, ριζόσφαιρα και λαχανικά [45]. Όσον αφορά τους ασθενείς που νοσηλεύονται, η μόλυνσή τους από το βακτήριο είναι πιθανή είτε κατά την εισαγωγή τους είτε κατά τη διάρκεια παραμονής τους στο νοσοκομείο. Το *P. aeruginosa* μπορεί να απομονωθεί από σχεδόν οποιαδήποτε πηγή μέσα στο νοσοκομειακό περιβάλλον, όπως εξοπλισμό αναπνευστικής θεραπείας, αντισηπτικά, σαπούνι, νεροχύτες, σφουγγαρίστρες, φάρμακα, μολυσμένο ιατρικό εξοπλισμό και πισίνες φυσιοθεραπείας και υδροθεραπείας. Μελέτες υποδεικνύουν ότι οι

περιβαλλοντικές πηγές, και ειδικά το νερό, συμβάλλουν καθοριστικά στην επιδημιολογία των νοσοκομειακών λοιμώξεων, συμπεριλαμβάνοντας και τις λοιμώξεις εντός των μονάδων εντατικής θεραπείας [43, 45].



Εικόνα 1.2. Λοιμογόνοι παράγοντες του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa*. Πηγή : <https://www.omicsonline.org/open-access/quorum-sensing-in-bacteria-and-a-glance-on-pseudomonas-aeruginosa-2327-5073.1000156.php?aid=27653>

1.5 Επιδημιολογία του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa* στο νοσοκομειακό περιβάλλον

Το βακτήριο *P. aeruginosa* σχετίζεται με ένα μεγάλο αλλά και ολοένα αυξανόμενο κατάλογο λοιμώξεων. Στις λοιμώξεις της κοινότητας (CAIs) περιλαμβάνονται λοιμώξεις όπως η ελκώδης 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 [46-50]. Οι λοιμώξεις που παρουσιάζουν μεγαλύτερη σοβαρότητα όσον αφορά την έκβασή τους και θεωρούνται περισσότερο επικίνδυνες για τους ασθενείς είναι αυτές που παρατηρούνται εντός των εγκαταστάσεων υγειονομικής περίθαλψης και περιλαμβάνουν την πνευμονία, μολύνσεις του ουροποιητικού και του κυκλοφορικού συστήματος, χειρουργική μόλυνση και δερματική μόλυνση στα σημεία εγκαυμάτων και τραυματισμών [51-54].

Οι ευπαθείς ομάδες ασθενών διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να μολυνθούν από δυνητικά παθογόνα βακτήρια όπως το *P. aeruginosa*. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται οι ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς, και ειδικά εκείνοι που πάσχουν από ουδετεροπενία, καρκίνο στο αίμα, σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS) και σακχαρώδη διαβήτη. Επίσης, οι ασθενείς με κυστική ίνωση αλλά και οι ασθενείς εντός των Μονάδων Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ), εμφανίζουν αυξημένη νοσηρότητα αλλά και θνησιμότητα [42, 43]. Μετά από έρευνα που διεξήγαγε το European Center for Disease Control and Prevention (ECDC) την περίοδο 2011-2012 σχετικά με τις HCAIs, βρέθηκε πως το 9% των λοιμώξεων οφείλεται στο *P. aeruginosa*, το οποίο ταυτοχρόνως ήταν και το τέταρτο πιο κοινό παθογόνο στα ευρωπαϊκά νοσοκομεία [55]. Αντίστοιχη μελέτη του CDC για την ίδια περίοδο, αλλά για την περιοχή των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής (ΗΠΑ), έδειξε πως το 7,1% των HCAIs προκαλούνται από το *P. aeruginosa*. Έρευνες στην Ισπανία για το 2016 τοποθέτησαν το βακτήριο στη δεύτερη θέση, όσον αφορά την αιτιολογία νοσοκομειακής λοίμωξης, με ποσοστό 10,6% [4]. Το ποσοστό αυτό ανεβαίνει μέχρι και στο 13% στην περίπτωση των ΜΕΘ [56]. 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 περισσότερο σε ασθενείς με εγκατεστημένους καθετήρες ούρων συγκριτικά με εκείνους που δεν χρησιμοποιούν τέτοιου είδους συσκευές. Οι λοιμώξεις της ουροποιητικού οδού που έχουν αποκτηθεί από την κοινότητα συγκαταλέγονται στις συχνότερες λοιμώξεις μεταξύ των γυναικών, με περισσότερες από 8 εκατομμύρια ιατρικές επισκέψεις ετησίως στις ΗΠΑ και σημαντικά έξοδα νοσηρότητας και υγειονομικής περίθαλψης [42, 56-58].
- Το βακτήριο έχει αναγνωριστεί ως η 2^η πιο συχνή αιτία πνευμονίας στο νοσοκομείο (hospital acquired pneumonia, HAP) ή πνευμονίας που σχετίζεται με το σύστημα υγειονομικής περίθαλψης (healthcare-associated pneumonia, HCAP) [42] Η πνευμονία της κοινότητας (community acquired pneumonia, CAP) από το βακτήριο *P. aeruginosa* εμφανίζεται σπάνια και κυρίως σε ασθενείς με σοβαρή υποκείμενη νόσο (ασθενείς που έχουν μολυνθεί με HIV, δέκτες μοσχεύματος οργάνων ή μυελού των οστών, ασθενείς με ουδετεροπενία), ενώ σε ακόμα μικρότερη συχνότητα έχει γίνει αναφορά για περιστατικά σε αρχικά υγιή άτομα [42, 59, 60]. Η HCAP είναι παρόμοια με την πνευμονία του νοσοκομείου (HAP) και ευθύνεται για πιο σοβαρές μορφές της νόσου, αλλά και για αυξημένη θνησιμότητα και παρατεταμένη νοσηλεία [17].

Οι λοιμώξεις από το *P. aeruginosa* αντιπροσωπεύουν το 3-7% όλων των λοιμώξεων του αίματος (blood stream infections, BSIs), καθώς και το 23-26% των βακτηριαμιών που προκαλούνται από Gram-αρνητικά βακτήρια. Οι πιο πιθανές πηγές μόλυνσης που οδηγούν και στην ανάπτυξη της νόσου είναι η πνευμονία, η λοίμωξη του παγκρέατος και των χοληφόρων, αλλά και η μόλυνση του ουροποιητικού από καθετήρες [15, 44]. Οι συχνότερες περιπτώσεις ασθενών που εμφανίζουν περιστατικά βακτηριαμιών είναι οι ασθενείς με ανοσοανεπάρκεια, οξεία λευχαιμία ή οι ασθενείς μετά από μεταμόσχευση [42]. Οι λοιμώξεις του αίματος (BSIs) από το *P. aeruginosa* αποκτούνται κυρίως στο νοσοκομειακό περιβάλλον. Η θνησιμότητα σε ασθενείς με βακτηριαμία κυμαίνεται σε υψηλά ποσοστά (27-48%) λόγω της ύπαρξης πολυανθεκτικών στελεχών (multi drug resistant isolates) *P. aeruginosa*, τα οποία προκαλούν περισσότερες δυσκολίες όσον αφορά την εύρεση κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής [15, 44].

1.6 Πολυανθεκτικά στελέχη *Pseudomonas aeruginosa* και μηχανισμοί αντοχής

Η εμφάνιση πολυανθεκτικών στελεχών [Multi Drug Resistant (MDR) isolates] *P. aeruginosa*, δηλαδή στελεχών ανθεκτικών σε τουλάχιστον ένα αντιμικροβιακό παράγοντα από 3 ή περισσότερες διαφορετικές κατηγορίες [61], παρουσιάζει συνεχόμενη αύξηση από το 2000 και έπειτα και πλέον είναι ένα από τα κυριότερα προβλήματα της δημόσιας υγείας ανά τον κόσμο. Ο πολυανθεκτικός φαινότυπος του βακτηρίου μπορεί να προκύψει με: α) ενσωμάτωση γονιδίων αντοχής που προέρχονται από κινητά γενετικά στοιχεία, όπως τα πλασμίδια, β) συνδυασμό επίκτητων και εγγενών μηχανισμών αντοχής, γ) συσσώρευση πολλαπλών χρωμοσωμικών αλλαγών με την πάροδο του χρόνου, δ) μέσω μετάλλαξης σε συγκεκριμένο στόχο, η οποία προκαλεί υπερέκφραση ενός μηχανισμού αντοχής σε πολλές αντιμικροβιακές ουσίες π.χ. μιας αντλίας εκροής [45]. Προηγούμενες μελέτες που ασχολούνται με κλινικά στελέχη *P. aeruginosa* αναφέρουν ότι ο συνδυασμός δύο εγγενών μηχανισμών αντοχής μπορεί να οδηγήσει επίσης στη δημιουργία πολυανθεκτικών στελεχών του βακτηρίου. Τέτοιο παράδειγμα είναι και ο συνδυασμός της μειωμένης διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης (Loss of *oprD*) με την αύξηση του συστήματος αντλίας εκροής (*efflux pumps*), με τον δεύτερο μηχανισμό να είναι γνωστό πως προσδίδει διασταυρούμενη αντοχή σε πολλές κατηγορίες αντιβιοτικών [62-64].

1.6.1 Εγγενείς μηχανισμοί αντοχής

Το βακτήριο *P. aeruginosa* διαθέτει φυσική αντοχή σε πολλές κατηγορίες αντιβιοτικών, όπως στις μακρολίδες, στις τετρακυκλίνες, στην συν-τριμοξαζόλη (*co-trimoxazole*: trimethoprim/sulfamethoxazole), σε πολλές β-λακτάμες αλλά και στις περισσότερες φθοροκινολόνες. Αντίθετα, το βακτήριο δεν ανθίσταται εγγενώς στις καρβοξυπενικυλλίνες (τικαρκιλίνη), ουρεϊδοπενικυλλίνες (πιπερακιλλίνη), στους συνδυασμούς β-λακταμών με αναστολείς β-λακταμάσης (πιπερακιλλίνη/ταζοβακτάμη, τικαρκιλίνη/ κλαβουλανικό οξύ), σε τέταρτης γενιάς αλλά και σε ορισμένες τρίτης γενιάς κεφαλοσπορίνες (κεφεπίμη, κεφταζιδίμη και κεφοπεραζόνη), στις αμινογλυκοσίδες (γενταμικίνη, τομπραμυκίνη και αμικακίνη), στις μονοβακτάμες (αζτρεονάμη), σε κάποιες από τις φθοροκινολόνες (λεβοφλοξασίνη, σιπροφλοξασίνη), στις καρβαπενέμες (ιμιπενέμη, μεροπενέμη και

ερταπενέμη) και στις πολυμυξίνες (κολιστίνη) [42, 65, 66]. Οι σημαντικότεροι εγγενείς μηχανισμοί αντιμικροβιακής αντοχής του βακτηρίου, είναι :

- Χρωμοσωμική κεφαλοσπορινάση AmpC : Το *P. aeruginosa* διαθέτει τη χρωμοσωμική AmpC (ή τάξης III) β-λακταμάση, η υπερέκφραση της οποίας μπορεί να προκληθεί μετά από έκθεση σε μία β-λακτάμη. Τα άγριου τύπου στελέχη παράγουν μόνο μικρές ποσότητες της AmpC. Αν υπάρξει έκθεση σε β-λακτάμη, τότε η έκφραση του ενζύμου αυξάνεται και η παραγωγή του πραγματοποιείται σε μεγαλύτερες ποσότητες. Η αύξηση αυτή οδηγεί σε αύξηση της αντιμικροβιακής αντοχής όχι μόνο στις β-λακτάμες που οδήγησαν στην επαγωγή της έκφρασης, αλλά και σε άλλες β-λακτάμες. Αν ο μηχανισμός αυτός συνδυαστεί με άλλους μηχανισμούς αντοχής, όπως η υπερπαραγωγή αντλιών εκροής ή η μείωση της oprD πορίνης, μπορεί να συμβάλλει στην ανάπτυξη γενικευμένης αντοχής [42, 45, 66].
- Σύστημα αντλίας εκροής (efflux pumps): Το βακτήριο *P. aeruginosa* χρησιμοποιεί συστήματα αντλιών εκροής προκειμένου να εξάγει ουσίες μέσω ενεργητικής μεταφοράς. Η αλληλούχηση του γονιδιώματος του βακτηρίου έχει αποκαλύψει την ύπαρξη συστημάτων εκροής σε 5 υπερ-οικογένειες, εκ των οποίων οι τέσσερις αντλίες εκροής πολλαπλών αντιβιοτικών (multidrug efflux pumps) έχουν χαρακτηριστεί καλά (MexA-MexB-OprM, MexC-MexD-OprJ, MexE-MexF-OprN και MexX-MexY-OprM). Συνολικά, στο γονιδίωμα του βακτηρίου εδράζονται τουλάχιστον 10 διαφορετικά οπερόνια συστημάτων αντλιών εκροής. Η υπερέκφραση μιας από αυτές τις αντλίες εκροής καταλήγει στην αύξηση της μέσης ανασταλτικής συγκέντρωσης (mean inhibitory concentration, MIC) οποιουδήποτε φαρμάκου εξέρχεται μέσω της αντλίας. Κάθε αντλία είναι δυνατόν να σχετίζεται με την ενεργητική εξαγωγή διαφορετικών αντιμικροβιακών ουσιών [42, 66].
- Χαμηλή διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης (Loss of oprD): Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, μεταξύ των οποίων και το *P. aeruginosa*, διαθέτουν στην εξωτερική τους μεμβράνη πρωτεϊνικά κανάλια που ονομάζονται πορίνες. Είναι ήδη αποδεδειγμένο πως μέσω των πορινών μπορούν επίσης να διαπερνούν την εξωτερική μεμβράνη κάποια υδρόφιλα αντιβιοτικά, όπως οι λακτάμες, οι αμινογλυκοσίδες, οι τετρακυκλίνες και μερικές φθοροκινολόνες. Ενδεχόμενη απώλεια συγκεκριμένων πορινών είναι δυνατό να μεταβάλει την ευαισθησία του βακτηρίου σε αντιμικροβιακούς παράγοντες που διέρχονται στο

βακτηριακό κύτταρο. Η πορίνη oprD του βακτηρίου διευκολύνει την διάχυση βασικών αμινοξέων, μικρών πεπτιδίων και των καρβαπενεμών εντός του κυττάρου [42, 45, 66, 67]. Η μειωμένη ή μηδενική έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την πορίνη oprD αποτελεί τον βασικότερο μηχανισμό ανάπτυξης αντοχής έναντι αυτής της κατηγορίας αντιβιοτικών, με εμφάνιση τόσο σε κλινικά όσο και σε περιβαλλοντικά στελέχη *P. aeruginosa* [42, 68]. Μειωμένα επίπεδα έκφρασης του oprD γονιδίου μπορεί να προκύψουν μέσω μεταλλαγών, μετά από επίδραση με σαλικυλικό οξύ και μέσω μηχανισμών κοινής ρύθμισης με την αντλία εκροής πολλαπλών φαρμάκων, που κωδικοποιείται από το mexEF-oprN [45].

1.6.2 Επίκτητοι μηχανισμοί αντοχής

Η επίκτητη αντοχή του βακτηρίου στους αντιμικροβιακούς παράγοντες, είναι κυρίως αποτέλεσμα μεταλλάξεων ή απόκτησης νέων μηχανισμών αντοχής μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων μεταξύ των στελεχών. Στην περίπτωση των μεταλλάξεων, το αποτέλεσμα είναι η υπερέκφραση ενδογενών β-λακταμασών ή αντλιών εκροής, η μειωμένη έκφραση πορινών αλλά και οι τροποποιήσεις σε πρωτεΐνες που αποτελούν στόχο για αντιβιοτικά, όπως οι πρωτεΐνες που προσδένουν πενικιλίνη (penicillin-binding proteins, PBP) ή η DNA γυράση. Η μεταφορά γονιδίων αντοχής αφορά κυρίως γονίδια που κωδικοποιούν β-λακταμάσες [πενικιλινάσες, κεφαλοσπορινάσες, ευρέως φάσματος β-λακταμάσες (extended-spectrum beta lactamases, ESBL), μέταλλο-β-λακταμάσες] ή τα ένζυμα τροποποίησης των αμινογλυκοσίδων (aminoglycoside modifying enzymes, AMEs) [65, 69, 70].

1.6.2.1 Επίκτητοι μηχανισμοί αντοχής στις β-λακτάμες

Οι μηχανισμοί αυτοί αφορούν την παραγωγή β-λακταμασών και αποτελούν τον κύριο μηχανισμό απόκτησης αντοχής στις β-λακτάμες. Οι σημαντικότερες β-λακταμάσες που ανιχνεύονται στο βακτήριο *P. aeruginosa* είναι οι καρβαπενεμάσες, οι πενικιλινάσες, οι ESBLs και η ενδογενής κεφαλοσπορινάση AmpC [65].

1) Καρβαπενεμάσες: Η ολοένα και αυξανόμενη εμφάνιση των καρβαπενεμασών οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην υπερβολική και αλόγιστη χρήση καρβαπενεμών. Από όλες τις τάξεις

στις οποίες κατατάσσονται οι καρβαπενεμάσες, οι καρβαπενεμάσες που ανήκουν στην τάξη B κατά Ambler είναι οι συχνότερα εμφανιζόμενες στο βακτήριο *P. aeruginosa* σε παγκόσμια κλίμακα. Εξαιτίας του δισθενούς κατιόντος Zn^{2+} στο ενεργό κέντρο τους, τα ένζυμα της κατηγορίας αυτής ονομάζονται και μέταλλο-β-λακταμάσες (Metallo-beta-lactamases, MBLs). Τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα MBLs εμφανίζονται συνήθως ως γονιδιακές κασέτες σε ιντεγκρόνια και μπορούν με αυτόν τον τρόπο να μεταβιβαστούν από στέλεχος σε στέλεχος. Είναι επίσης δυνατόν τα ιντεγκρόνια να φέρουν και άλλα γονίδια ανθεκτικότητας εκτός των καρβαπενεμασών, για διαφορετικές κατηγορίες αντιβιοτικών, οδηγώντας στα MDR στελέχη [65, 69].

2) Πενικιλινάσες: Τα ένζυμα αυτά προσδίδουν αντοχή στις καρβοξυπενικιλίνες, ουρεϊδοπενικιλίνες και την κεφοπεραζόνη. Παράλληλα όμως, φαίνεται πως δεν επηρεάζουν τη δράση αντιβιοτικών όπως κεφταζιδίμη, κεφεπίμη, ιμιπενέμη, ενώ δεν μπορούν να παρεμποδίσουν τη δράση των αναστολέων β-λακταμασών [65].

3) Ευρέως φάσματος β-λακταμάσες (ESBLs): Τα μέλη της κατηγορίας υδρολύουν ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες (κεφοταξίμη, κεφτριαξόνη, κεφταζιδίμη), μονοβακτάμες (αζτρεονάμη) και η λειτουργία τους δεν παρεμποδίζεται από τους αναστολείς β-λακταμασών. Τα βακτήρια που παράγουν ESBLs παρουσιάζουν παράλληλη αντοχή σε πολλές κατηγορίες αντιβιοτικών, μειώνοντας έτσι σημαντικά το εύρος των διαθέσιμων θεραπευτικών επιλογών και αυξάνοντας ταυτόχρονα τις λοιμώξεις που προκαλούνται από ESBLs [65, 66, 69].

1.6.3 Διασπορά των γονιδίων αντοχής στις β λακτάμες στο *Pseudomonas aeruginosa*

Η επίκτητη αντοχή του *P. aeruginosa* στις β-λακτάμες στηρίζεται συχνά στην απόκτηση γονιδίων που εκφράζουν ESBLs [71, 72]. Τα ένζυμα της κατηγορίας των ESBLs που εντοπίζονται στο *P. aeruginosa* ανήκουν στις τάξεις A και D κατά Ambler και υποδιαιρούνται σε 8 διαφορετικές υποομάδες, τις β-λακταμάσες τύπου PER, VEB, GES, TEM, SHV, CTX-M, BEL, OXA [73-75]. Η διασπορά των αντίστοιχων γονιδίων είναι παγκόσμια πλέον, καθώς στελέχη *P. aeruginosa* που παράγουν ESBL έχουν ανιχνευθεί σε πολλές διαφορετικές περιοχές ανά τον κόσμο [76-83].

Η αντοχή στις καρβαπενέμες θεωρείται αυτή με τη μεγαλύτερη κλινική σημασία και αιτιολογείται συνήθως από τη δράση των MBLs που ανήκουν στην τάξη B κατά Ambler. Συχνότεροι εκπρόσωποι αυτής της κατηγορίας στο *P. aeruginosa* είναι τα ένζυμα VIM, NDM, IMP. Αναφορές από τη Βόρεια και τη Νότια Αμερική, τη Νοτιοανατολική Ασία αλλά και από ευρωπαϊκές χώρες έχουν συσχετίσει βακτηριακά στελέχη *P. aeruginosa* που παράγουν MBLs με παρατεταμένης διάρκειας και αυξημένης σοβαρότητας νοσοκομειακές επιδημίες [84].

Ειδικότερα, 24 διαφορετικοί μεταλλάκτες του bla_{VIM} γονιδίου έχουν ανιχνευθεί στο *P. aeruginosa*, με το γονίδιο bla_{VIM-2} να εμφανίζει τη μεγαλύτερη διασπορά [85]. Ένζυμα τύπου VIM έχουν βρεθεί σε στελέχη που έχουν συσχετιστεί με επιδημίες σε νοσοκομειακούς χώρους, με συχνότερη εμφάνιση σε χώρες της Μεσογείου [67, 86]. Αντίστοιχα, οι περισσότερες από τις αναφορές για NDM θετικά στελέχη προέρχονται από τις περιοχές της Ινδικής χερσονήσου, των Βαλκανίων και της Μέσης Ανατολής, υποδεικνύοντας τις περιοχές αυτές ως ενδημικές για την κυκλοφορία των συγκεκριμένων γονιδίων. Όσον αφορά τα ένζυμα τύπου IMP, η εξάπλωσή τους είναι παγκόσμια, με αναφορές για 47 διαφορετικές παραλλαγές του ενζύμου IMP-1 σε περισσότερες από 30 χώρες [87, 88].

Η αντοχή στις καρβαπενέμες μπορεί να προέρχεται και από ένζυμα που ανήκουν σε διαφορετικές τάξεις κατά Ambler. Ένζυμα τάξης A, όπως οι καρβαπενεμάσες KPC, αλλά και ένζυμα τύπου GES / IBC, έχουν ταυτοποιηθεί στο *P. aeruginosa*. Ένζυμο τύπου KPC βρέθηκε για πρώτη φορά στο βακτήριο το 2006, αλλά συναντάται σε πολύ μεγαλύτερη συχνότητα στο βακτήριο *Klebsiella pneumoniae* [89-91]. Παγκόσμια διασπορά εμφανίζουν τα ένζυμα τύπου GES / IBC, με αναφορές από την Αργεντινή, τη Γαλλία, τη Βραζιλία, την Ελλάδα και τη Νότια Αφρική [83, 89-92]. Από τα ένζυμα τάξης D, έχουν εμφανιστεί κάποιες παραλλαγές OXA ενζύμων στο *P. aeruginosa* με δράση καρβαπενεμάσης [93, 94].

1.7 Μοριακή επιδημιολογία

Με τον όρο μοριακή επιδημιολογία ονομάζεται ο κλάδος της επιδημιολογίας που μελετά τη διασπορά και τη συνεισφορά γενετικών παραγόντων στη μετάδοση ασθενειών, που οφείλονται σε λοιμογόνους παράγοντες σε ανθρώπινους και ζωικούς πληθυσμούς. Η ανίχνευση αυτών των παραγόντων γίνεται με μεθόδους μοριακής μικροβιολογίας. Στις μέρες μας, η μοριακή επιδημιολογία αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα και διακριτό κλάδο της επιστήμης της επιδημιολογίας, χρησιμοποιώντας εργαλεία μοριακής μικροβιολογίας προκειμένου να καταλήξει σε δεδομένα που στη συνέχεια αναλύονται με περιγραφικές ή πειραματικές τεχνικές. Αποτελεί έναν τομέα διαρκώς εξελισσόμενο, καθώς ακολουθεί σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη των μοριακών τεχνικών και τεχνολογιών. Κάθε νέο τεχνολογικό επίτευγμα που σημειώνεται στον χώρο της μοριακής ανάλυσης, συνεισφέρει στην τελική βελτιστοποίηση των μεθόδων για αναλυτικές επιδημιολογικές έρευνες και στην δημιουργία νέων και πιο σύγχρονων τεχνικών [95].

1.7.1 Στόχοι μοριακής επιδημιολογίας

Η επιδημιολογία των λοιμωδών νοσημάτων, και κατ' επέκταση και η μοριακή επιδημιολογία, ασχολείται με τον χαρακτηρισμό των παρακάτω παραγόντων :

- 1) Τον εντοπισμό της ασθένειας και τη διασπορά της τοπικά και χρονικά
- 2) Τη δεξαμενή μολυσματικών παραγόντων
- 3) Τους τρόπους και τα μοτίβα της μετάδοσης της ασθένειας
- 4) Το περιβάλλον της μετάδοσης
- 5) Τους βιολογικούς παράγοντες που σχετίζονται με το εκάστοτε παθογόνο και επηρεάζουν τη μετάδοση
- 6) Τους βιολογικούς παράγοντες που σχετίζονται με τον εκάστοτε ξενιστή και επηρεάζουν τη μετάδοση
- 7) Περιβαλλοντικοί παράγοντες (οικολογικοί, κοινωνικο-οικονομικοί κλπ)
- 8) Σύνδεση παθογόνου ως αιτιολογικό παράγοντα νεο εμφανιζόμενης ασθένειας ή σύνδεση ασθένειας με έναν μέχρι πρότινος μη σχετιζόμενο μολυσματικό παράγοντα [95, 96].

Το πιο σημαντικό στοιχείο που χαρακτηρίζει την μοριακή επιδημιολογία είναι πως τελικός στόχος της είναι η εύρεση και ταυτόχρονα η βέλτιστη χρήση στρατηγικών παρέμβασης ή και πρόληψης για την επίλυση ζητημάτων δημόσιας υγείας [95].

Μέσω των μεθόδων της μοριακής επιδημιολογίας, οι μικροοργανισμοί συγκρίνονται σε πρώτη φάση μεταξύ τους. Τα αποτελέσματα της σύγκρισης συσχετίζονται άμεσα με τους ξενιστές από τους οποίους έχουν απομονωθεί οι μικροοργανισμοί, αλλά και με το περιβάλλον στο οποίο έχει λάβει χώρα η διασπορά. Έτσι, ο κύριος στόχος της μοριακής επιδημιολογίας είναι η αναγνώριση ή ο αποκλεισμός μίας επιδημιολογικής σχέσης ανάμεσα στους ξενιστές, η οποία βασίζεται στα γονοτυπικά χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών που αλληλεπιδρούν με τους ξενιστές σε καθορισμένο περιβάλλον [95].

1.7.2 Η μοριακή επιδημιολογία ως εργαλείο δημόσιας υγείας

Η μοριακή επιδημιολογία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση μίας σειράς από ζητήματα που αφορούν τα λοιμώδη νοσήματα:

1) Ο εντοπισμός της γεωγραφικής και της χρονικής κατανομής των παραγόντων που σχετίζονται με τα λοιμώδη νοσήματα [97-101].

2) Η διάκριση μεταξύ επιδημικών και ενδημικών συμβάντων. Οι έρευνες μοριακής επιδημιολογίας μπορούν να αποκαλύψουν αν κάποιο λοιμώδες νόσημα που εμφανίζει ένα μοτίβο ενδημικής νόσου είναι στην πραγματικότητα πολλαπλά συσσωρευμένα επιδημικά γεγονότα. Για παράδειγμα, ασθένειες όπως η πνευμονιοκοκκική πνευμονία σπάνια θεωρούνταν μέχρι πρότινος υπεύθυνες για την εμφάνιση επιδημιών. Μέσω των αναλύσεων μοριακής επιδημιολογίας όμως μπορεί να αποκαλυφθεί πως τέτοια νοσήματα μπορούν να εμφανιστούν και με τη μορφή επιδημίας [95, 102, 103].

3) Κατηγοριοποίηση των πληροφοριών με σκοπό την βελτιστοποίηση των στρατηγικών αντιμετώπισης ή / και παρέμβασης. Η μοριακή επιδημιολογία χρησιμοποιείται για την άντληση πληροφοριών σχετικά με το γονιδιακό προφίλ των μικροοργανισμών. Το σύνολο των πληροφοριών δύναται να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό της πηγής απ' όπου προέρχεται το επιδημικό στέλεχος. Στη συνέχεια, ο ερευνητής μπορεί να προτείνει διορθωτικές κινήσεις, καθώς και στρατηγικές που στοχεύουν στην πρόληψη [95, 96].

4) Διάκριση παθογόνων και μη γονοτύπων. Όταν εντός ενός είδους, με την ταξινομική έννοια του όρου, υπάρχουν παθογόνοι και μη παθογόνοι γονότυποι, τότε μόνο μέσω των εργαλείων μοριακής επιδημιολογίας μπορεί να γίνει η μεταξύ τους διάκριση. Ο διαχωρισμός αυτός είναι σημαντικός για τη λήψη κατάλληλης θεραπείας [104, 105].

5) Ανίχνευση νέων τρόπων μετάδοσης ενός λοιμώδους νοσήματος. Η ικανότητα γονοτυπικής ανάλυσης των μικροοργανισμών έχει βοηθήσει στην ανακάλυψη νέων τρόπων μετάδοσης, στοιχείο απαραίτητο για την επιδημιολογική διερεύνηση ενός νοσήματος. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν οι ιοί Zika και Ebola, για τους οποίους βρέθηκε πως η σεξουαλική επαφή αποτελεί τρόπο μετάδοσης, κάτι που δεν ήταν γνωστό μέχρι πρότινος [95, 106-109].

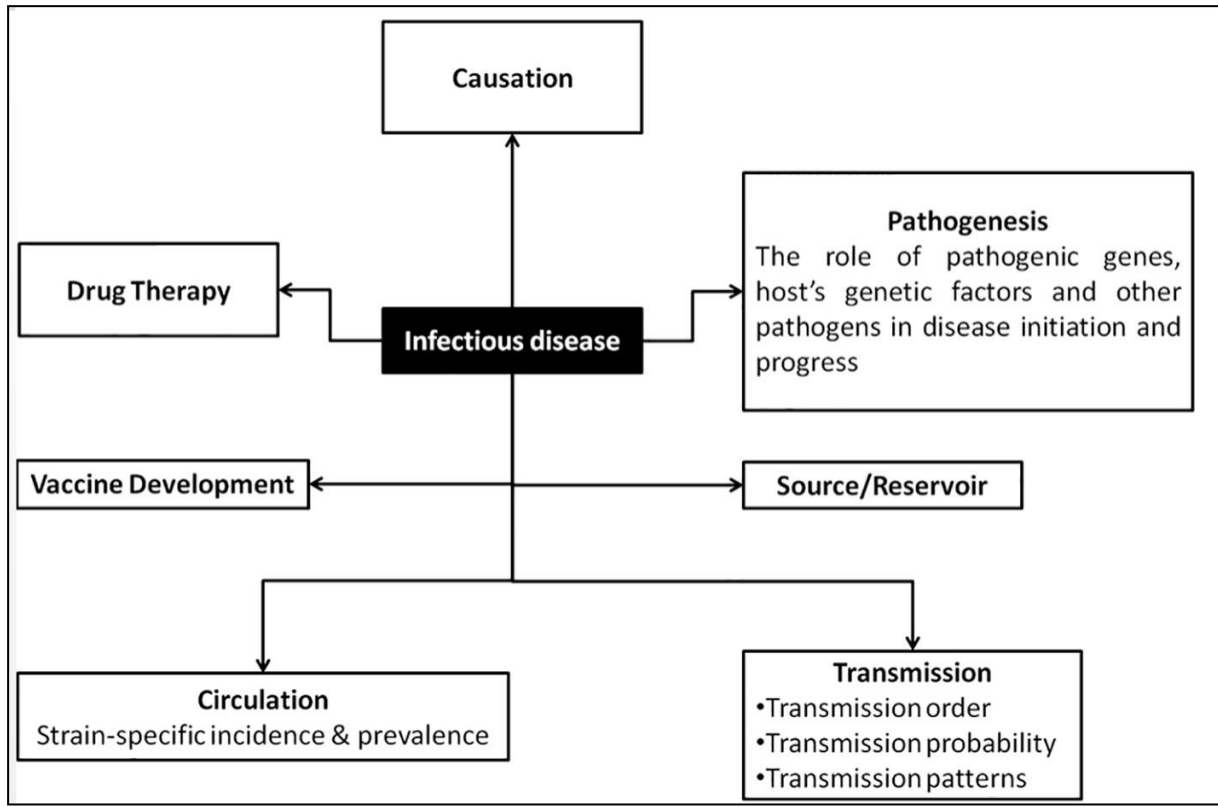
6) Μελέτη της επιδημιολογίας των νοσοκομειακών λοιμώξεων. Με τη χρήση της μοριακής επιδημιολογίας μπορούν να δοθούν απαντήσεις σε ζητήματα που αφορούν την πηγή της λοίμωξης (από τον χώρο του νοσοκομείου ή από την κοινότητα), την πορεία της μέχρι να βρεθεί στους ασθενείς, το αν η λοίμωξη έχει ενδημικό ή επιδημικό χαρακτήρα ή αν υπάρχουν ένας ή περισσότεροι κλώνοι που είναι υπεύθυνοι για τη διασπορά της νόσου [110-112].

7) Βελτίωση της παρακολούθησης και του ελέγχου των λοιμωδών νοσημάτων. Η χρήση μοριακών τεχνικών καταλήγει σε υψηλής ανάλυσης δεδομένα που χρησιμοποιούνται στον σχεδιασμό πιο στοχευμένων δράσεων και παρεμβάσεων. Τα δεδομένα αυτά βοηθούν στην συνεχή παρακολούθηση της νόσου, αλλά και στη δημιουργία ενός σημείου αναφοράς και ελέγχου για νέες μοριακές μεθόδους που θα χρησιμοποιηθούν για τη διεξαγωγή νέων επιδημιολογικών ερευνών [95, 96].

8) Ανάλυση του μικροβιώματος για τη μελέτη μη μολυσματικών ασθενειών. Μέσω των τεχνικών αλληλούχισης νέας γενιάς μπορούν να ταυτοποιηθούν και να ποσοτικοποιηθούν όλοι οι γνωστοί οργανισμοί ενός δείγματος, είτε αυτό είναι ένα περιβαλλοντικό δείγμα είτε δείγμα από υγρό του ανθρώπινου σώματος. Στη δεύτερη περίπτωση, τέτοιες τεχνικές συμπεριλαμβάνουν την ανάλυση και του ανθρώπινου μικροβιώματος. Έχει βρεθεί πως αλλαγές στο εντερικό μικροβίωμα μπορούν να επηρεάσουν την πορεία ασθενειών όπως η παχυσαρκία, ο διαβήτης ή η δυσλιπιδαιμία [95, 113, 114].

9) Διερεύνηση των γενετικών παραγόντων που καθορίζουν τη μετάδοση της ασθένειας. Η μελέτη παραγόντων βιολογικής σημασίας για ένα παθογόνο, και πώς αυτοί αλληλεπιδρούν μεταξύ τους όταν το παθογόνο βρίσκεται εντός ενός ξενιστή, αποτελούν 2 παραμέτρους με

τις οποίες ασχολείται η μοριακή επιδημιολογική έρευνα. Τέτοιοι παράγοντες είναι η ικανότητα προσαρμογής ενός παθογόνου εντός ενός ξενιστή ή η αναγνώριση και αποφυγή των αμυντικών μηχανισμών του [95].



Εικόνα 1.3. Η μοριακή επιδημιολογία και η συσχέτιση με παράγοντες που αφορούν τα λοιμώδη νοσήματα [96].

1.8 Τυποποίηση

Τυποποίηση είναι η διαδικασία κατά την οποία εκτελείται ένας αριθμός φαινοτυπικών ή / και γονοτυπικών αναλύσεων σε βακτηριακά στελέχη και σε επίπεδο είδους - υποείδους, με σκοπό την ταξινόμηση των στελεχών σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά τους [115, 116]. Οι μέθοδοι τυποποίησης χρησιμοποιούνται από κλινικά αλλά και από περιβαλλοντικά εργαστήρια σε επίπεδο ρουτίνας, με στόχο τη μελέτη της διασποράς και της μετάδοσης μικροοργανισμών, όπως επίσης και τη μελέτη της δυναμικής βακτηριακών πληθυσμών σε κλινικά και περιβαλλοντικά ενδιαυτήματα, σε επίπεδο που εκτείνεται από έναν ξενιστή έως και το παγκόσμιο οικοσύστημα [116]. Παράλληλα, οι τυποποιητικές μέθοδοι λειτουργούν ως επιδημιολογικά εργαλεία όσον αφορά την πρόληψη αλλά και τον έλεγχο των λοιμώξεων. Συμβάλλουν στη μελέτη επιδημιών, αλλά και στη διερεύνηση της πορείας μιας μόλυνσης, ενώ μέσω της ανάλυσης και της ερμηνείας των αποτελεσμάτων μπορεί να γίνει λήψη δραστικών μέτρων έναντι της ασθένειας και να σχεδιαστούν τρόποι αντιμετώπισης και περιορισμού της και εν τέλει να επιλεγεί κατάλληλη θεραπεία για τους ασθενείς [115, 117]. Επιπρόσθετα, η τυποποίηση των βακτηρίων έχει συμβάλει ουσιαστικά στην αύξηση της αποτελεσματικότητας των συστημάτων επιτήρησης και έχει δώσει σημαντικά στοιχεία για τον καλύτερο σχεδιασμό στρατηγικών ελέγχου της δημόσιας υγείας [118].

Οι τεχνικές τυποποίησης αξιολογούνται με βάση 2 κύριους άξονες. Ο πρώτος ασχολείται με τη συνολική απόδοση της τεχνικής, συνυπολογίζοντας παράγοντες όπως η διακριτική ισχύς, η αναπαραγωγικότητα, η τυποποιητική ικανότητα και η συμφωνία με άλλες τυποποιητικές μεθόδους. Ο δεύτερος άξονας σχετίζεται με την ευκολία χρήσης της εκάστοτε μεθόδου και περιλαμβάνει το κόστος αλλά και τη διαθεσιμότητα των σχετιζόμενων αντιδραστηρίων και εξοπλισμού, καθώς και την ταχύτητα και την ευκολία στην εκτέλεση της μεθόδου και στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων [117]. Οι βασικές προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούν οι διάφορες μέθοδοι τυποποίησης για να θεωρηθούν αξιόπιστες είναι οι εξής:

- 1) Σταθερότητα όσον αφορά την αρχή της μεθόδου και τα αποτελέσματα που διεξάγονται
- 2) Ικανότητα τυποποίησης του συνόλου των στελεχών μίας έρευνας [τυποποιητικότητα: υπολογίζεται διαιρώντας τον αριθμό των στελεχών που τυποποιήθηκαν με το σύνολο των στελεχών που μελετήθηκαν]

- 3) Υψηλή διακριτική ικανότητα, ώστε να διακρίνονται όλα τα στελέχη της μελέτης, σύμφωνα και με την διαθέσιμη επιδημιολογική εικόνα
- 4) Υψηλή επαναληψιμότητα, προκειμένου τα αποτελέσματα της μεθόδου να μπορούν να αναπαράγονται ανεξαρτήτως χρόνου, τόπου διεξαγωγής και προσωπικού του εργαστηρίου [116]

Σημειώνεται πως τα αποτελέσματα μιας μεθόδου τυποποίησης αξιολογούνται και ερμηνεύονται πάντα σε συνδυασμό με τα πρόσφατα επιδημιολογικά, κλινικά και δημογραφικά δεδομένα. Βασικό εργαλείο για την αξιολόγηση αποτελούν οι διεθνείς βάσεις δεδομένων, μέσω των οποίων εξασφαλίζεται εύκολη πρόσβαση στα δεδομένα αλλά και η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων από μεθόδους τυποποίησης. Μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί διεθνείς βάσεις δεδομένων που παρέχουν καταλόγους πρότυπων στελεχών (π.χ. το www.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. Τα εργαστήρια που εφαρμόζουν χρησιμοποιούν τυποποιητικά σχήματα προτεινόμενα από φορείς, όπως οι προαναφερόμενοι, ώστε να υπάρχει ένας κοινός κώδικας, με βάση τον οποίο μπορούν να επεξεργαστούν και να συγκρίνουν τα αποτελέσματά τους σε κοινές βάσεις δεδομένων [115, 116]. Οι μέθοδοι τυποποίησης χωρίζονται σε 2 μεγάλες κατηγορίες, στις φαινοτυπικές τεχνικές, στις οποίες πραγματοποιείται σύγκριση των μακροσκοπικών αλλά και των μικροσκοπικών βιολογικών χαρακτηριστικών των στελεχών μελέτης, και στις μοριακές μεθόδους, οι οποίες εκμεταλλεύονται τα χαρακτηριστικά του γενετικού υλικού για να συγκρίνουν στελέχη του ίδιου είδους.

1.8.1 Φαινοτυπικές μέθοδοι

Η μελέτη του φαινοτύπου περιλαμβάνει την μελέτη χαρακτηριστικών όπως η μορφολογία των αποικιών, το χρώμα, η οσμή και άλλα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά, όμως οι περισσότερες μέθοδοι τυποποίησης βασίζονται σε χαρακτηριστικά που απαιτούν εξειδικευμένες τεχνικές για να μελετηθούν. Συγκεκριμένα, οι μέθοδοι τυποποίησης αξιολογούν, ποιοτικά και ποσοτικά, την ικανότητα ανάπτυξης βακτηριακών στελεχών υπό την παρουσία συγκεκριμένων ουσιών (όπως αντιβιοτικά, βακτηριακές τοξίνες κ.α.), την

ποικιλία στις μεταβολικές τους λειτουργίες ή στα αντιγόνα της κυτταρικής μεμβράνης και του μαστιγίου κλπ. [116]. Τα παραδοσιακά συστήματα τυποποίησης που βασίζονται σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά χρησιμοποιούνται ευρέως σε κλινικά εργαστήρια ή νοσοκομεία, μιας και το προσωπικό είναι επαρκώς καταρτισμένο και το κόστος διεξαγωγής είναι χαμηλό [119]. Τα συστήματα αυτά εφαρμόζονται επί σειρά ετών, χωρίς όμως να είναι ελεύθερα προβλημάτων όσον αφορά τα κριτήρια απόδοσης. Δεν εμφανίζουν πάντοτε σταθερή διακριτική ικανότητα και χαρακτηρίζονται από χαμηλή ευαισθησία και επαναληψιμότητα, κυρίως λόγω των χαρακτηριστικών που επιλέγονται για μελέτη. Όλες οι μέθοδοι απαιτούν αυστηρό έλεγχο όσον αφορά τις πειραματικές συνθήκες, αφού οι φαινότυποι είναι αρκετά επιρρεπείς στις αλλαγές των περιβαλλοντικών συνθηκών. Επιπλέον, οι περισσότερες φαινοτυπικές μέθοδοι δεν έχουν γενικευμένη εφαρμογή. Οποιοσδήποτε δεδομένος φαινότυπος δεν αντικατοπτρίζει πάντοτε με ακρίβεια τον γονότυπο ενός μικροοργανισμού και επομένως, δεν μπορεί να αποτελέσει αξιόπιστο και σταθερό επιδημιολογικό δείκτη. Για τους παραπάνω λόγους, οι φαινοτυπικές μέθοδοι έχουν αντικατασταθεί σε μεγάλο βαθμό πλέον από τις γονοτυπικές ή μοριακές μεθόδους τυποποίησης [116, 118, 119].

1.8.2 Μοριακές μέθοδοι τυποποίησης

Οι μοριακές τυποποιητικές μέθοδοι βασίζονται στην ποικιλομορφία του γονιδιώματος των βακτηριακών στελεχών, με σκοπό την απόκτηση δεδομένων που αφορούν τη 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) και την συνολική νουκλεοτιδική αλληλούχισή του (π.χ. ενός ή περισσότερων γονιδίων ή ενδογονιδιακών περιοχών).

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 μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με την πηγή μίας μόλυνσης ή τον τρόπο μετάδοσής της, πληροφορίες εξαιρετικά δύσκολο ή αδύνατο να ανιχνευτούν με τις πιο παραδοσιακές φαινοτυπικές μεθόδους. Συνολικά, οι μοριακές μέθοδοι τυποποίησης εμφανίζουν σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των φαινοτυπικών, μιας και χαρακτηρίζονται από υψηλή

αναπαραγωγιμότητα, επαναληψιμότητα και διακριτική ικανότητα αλλά και από ταχύτητα στην απόδοση αποτελεσμάτων, παρέχοντας δεδομένα εύκολα ερμηνεύσιμα και αξιόπιστα. Παρ' όλα αυτά, είναι συνήθως απαιτητικότερες όσον αφορά τους χειρισμούς τους και έχουν υψηλότερο κόστος, γεγονός που πολλές φορές τις αποκλείει από εργαστήρια των δημόσιων νοσοκομείων, αφήνοντας την εφαρμογή τους για τα ερευνητικά εργαστήρια και τα εργαστήρια αναφοράς [117-120].

Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μοριακών τεχνικών τυποποίησης που βασίζονται στην επεξεργασία του γενετικού υλικού: 1) τεχνικές υβριδισμού (κανονικός και ανάστροφος υβριδισμός, ribotyping, array hybridisation), 2) μέθοδοι βασισμένοι στην ανάλυση θραυσμάτων μετά από χρήση περιοριστικών ενζύμων, όπως οι Restriction Endonuclease Analysis (REA) και Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE), 3) μέθοδοι που ολοκληρώνονται με αλληλούχιση του DNA (whole genome sequencing, next generation sequencing, optical mapping κ.ά.) και 4) μέθοδοι που βασίζονται στην ενίσχυση συγκεκριμένων γενετικών στόχων μέσω της χρήσης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) [116, 121]. 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 [116, 118, 119, 121].

1.8.2.1 Η μέθοδος Double Locus Sequence Typing (DLST)

Η DLST είναι μια νέα μοριακή τυποποιητική μέθοδος, η οποία εφαρμόστηκε για πρώτη φορά σε κλινικά πολυανθεκτικά στελέχη *S. aureus* (Methicillin Resistant *S. aureus* - MRSA), με στόχο την ανάπτυξη μιας γρήγορης και οικονομικής μεθόδου για την τυποποίηση και την επιδημιολογική μελέτη βακτηριακών στελεχών [122]. Έκτοτε, χρησιμοποιείται εκτεταμένα σε φυλογενετικές και επιδημιολογικές μελέτες του βακτηρίου *S. aureus* [123, 124], ενώ

έχουν αναπτυχθεί πρωτόκολλα και για άλλους μικροοργανισμούς, όπως τα βακτήρια *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile* και *P. aeruginosa* [125-127].

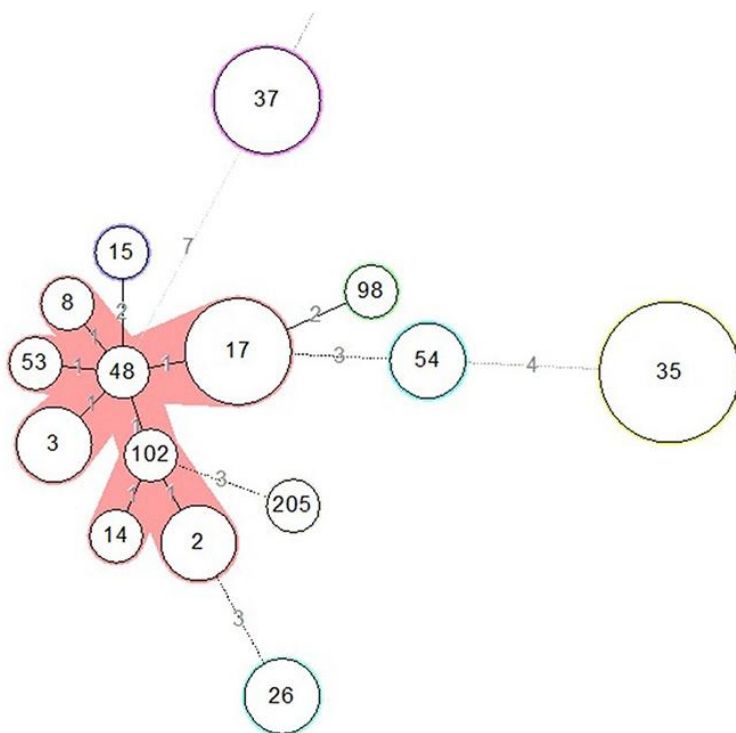
Στο δημοσιευμένο πρωτόκολλο της DLST για το βακτήριο *P. aeruginosa* προτείνεται η μερική αλληλούχιση (single-strand sequencing) δυο ιδιαίτερα μεταβλητών γενετικών τόπων, *ms172* και *ms217*, για την τυποποίηση κλινικών και περιβαλλοντικών στελεχών του βακτηρίου [125]. Οι *ms172* και *ms217* είναι διαγονιδιακοί επαναλαμβανόμενοι γενετικοί τόποι γνωστοί και ως εν σειρά επαναλήψεις μεταβλητού αριθμού (variable number of tandem repeats, VNTRs) ή μινιδоруφόροι (minisatellites) ή μικρές εν σειρά επαναλήψεις (short tandem repeats, STR) [128, 129]. Οι μινιδоруφόροι είναι πολυμορφικές αλληλουχίες που αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες μονάδες μήκους 10-100 bp και εντοπίζονται κατά μήκος του γονιδιώματος [128]. 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. Ο λόγος που οι μινιδоруφόροι χρησιμοποιούνται στην τυποποίηση του βακτηρίου *P. aeruginosa* είναι πως εμφανίζουν μεγαλύτερη σταθερότητα σε σύγκριση με άλλα είδη [130]. Επιπρόσθετα, σε συνδυασμό με την υψηλή αναπαραγωγικότητα και ακρίβεια των αποτελεσμάτων που προσφέρουν, θεωρούνται αξιόπιστοι για την φυλογενετική μελέτη του βακτηρίου [129].

Το νέο τυποποιητικό σχήμα DLST έχει μελετηθεί συγκριτικά με την μέχρι πρότινος ευρέως χρησιμοποιούμενη τυποποιητική μέθοδο MLST [125], η οποία βασίζεται στην αλληλούχιση 7 συντηρημένων γονιδίων. Μετά από μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε έναν μεγάλο αριθμό (281) στελεχών *P. aeruginosa*, αποδείχτηκε ότι τόσο η τυποποιητικότητα όσο και η διακριτική ικανότητα της DLST βρίσκονται στα ίδια επίπεδα με την MLST, οδηγώντας στην εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων, ειδικά όταν διεξάγονται επιδημιολογικές και φυλογενετικές μελέτες σε τοπικό επίπεδο [125, 131]. Η DLST είναι εύκολη στην εφαρμογή της και προσφέρει υψηλή τυποποιητικότητα, διακριτική ικανότητα, αναπαραγωγικότητα και επαναληψιμότητα, ενώ ταυτόχρονα δεν είναι χρονοβόρα, ούτε απαιτείται ειδικός εξοπλισμός για την διεξαγωγή των πειραμάτων. Η μέθοδος διακρίνεται από σταθερότητα και έχει τη δυνατότητα σύγκρισης απομονωμένων στελεχών από έρευνες διάρκειας ολόκληρων μηνών ή και χρόνων [125, 131]

1.9 eBURST και Minimum Spanning Trees

Ο πιο δημοφιλής τρόπος ανάλυσης των γονοτυπικών προφίλ που προκύπτουν από μεθόδους, όπως η MLST και DLST είναι μέσω του αλγορίθμου eBURST [132]. Ο αλγόριθμος απεικονίζει την ανάλυση των δεδομένων σε φυλογενετικά δέντρα, τα οποία αναδεικνύουν τη φυλογενετική σχέση των υπό μελέτη στελεχών. Η συσχέτιση που προκύπτει από τον αλγόριθμο βασίζεται στον αριθμό των νουκλεοτιδικών διαφορών μεταξύ των διάφορων γονοτυπικών προφίλ και έτσι τα στελέχη τοποθετούνται σε κλωνικά συμπλέγματα (clonal complexes, CCs). Η διαδικασία αυτή δίνει μία πρώτη εικόνα για μία πιθανή φυλογενετική σύνδεση μεταξύ τους [133, 134].

Στην περίπτωση της DLST, μετά την εφαρμογή του αλγορίθμου σε ένα σετ δεδομένων που εμπεριέχει όλη την απαιτούμενη γενετική πληροφορία, προκύπτει είναι ένα φυλογενετικό δέντρο (minimum spanning tree, MST) που αποτελείται από διαφορετικούς κλάδους (branches ή clades) και κόμβους (nodes). Τα στελέχη απεικονίζονται στο δέντρο είτε στις θέσεις των κόμβων είτε στις άκρες των κλάδων, όπως τα φύλλα σε ένα πραγματικό δέντρο. Σημειώνεται πως ο στόχος του αλγορίθμου δεν είναι να συνδέσει μεταξύ τους όλα τα στελέχη του πληθυσμού, αλλά αυτά που έχουν λιγότερες νουκλεοτιδικές διαφορές μεταξύ τους, αναδεικνύοντας έτσι διαφορετικά κλωνικά συμπλέγματα [132, 135].



Εικόνα 1.4. Minimum spanning tree στελεχών *C. difficile* βασισμένο σε δεδομένα από τη μέθοδο MLST [136]. Ο αριθμός του κύκλου αντιπροσωπεύει τον εκάστοτε MLST τύπο (Sequence Type, ST). Το μέγεθος του κάθε κόμβου (node) αντιστοιχεί στο πλήθος των στελεχών που κατατάσσονται στον κάθε τύπο. Οι τύποι διαχωρίζονται μεταξύ τους με βάση τις διαφορές στα αλληλία που μελετήθηκαν, οι οποίες αναφέρονται πάνω στους αντίστοιχους κλάδους (branches) με έναν αριθμό.

Η κατασκευή των δέντρων αποτελεί από μόνη της μία ξεχωριστή μέθοδος ανάλυσης αποτελεσμάτων που προκύπτει από τις μοριακές τεχνικές που βασίζονται στην αλληλούχιση. Ένα MST συνδέει τα στελέχη που προστίθενται για ανάλυση με τέτοιο τρόπο ώστε η προστιθέμενη απόσταση ανάμεσα σε όλα τα στελέχη που απαρτίζουν το δέντρο να είναι η μικρότερη δυνατή. Ο βιολογικός λόγος πίσω από αυτό τον σχεδιασμό σχετίζεται με το ότι οι εξελικτικές διαδικασίες πρέπει να επεξηγούνται με όσο λιγότερα γεγονότα γίνεται [137, 138].

Τα MSTs έχουν μετατραπεί σε ένα κοινό εργαλείο ερευνών μοριακής επιδημιολογίας, με το οποίο μπορούν να γίνουν υποθέσεις για την πιθανότερη πορεία μετάδοσης του εκάστοτε παθογόνου. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα για να διερευνήσουν τις σχέσεις μεταξύ μικροοργανισμών σε τοπικό επίπεδο, όπως σε τοπικές επιδημίες ή στη μελέτη μετάδοσης εντός μίας κοινότητας σε μικρό χρονικό διάστημα, όπου

δεν έχει προλάβει να αναπτυχθεί ιδιαίτερη γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των στελεχών [139].

Πρέπει να σημειωθεί πως η τοπολογία των κατασκευών που προκύπτουν από τον συνδυασμό του αλγορίθμου eBURST με την απεικονιστική μεθοδολογία των MSTs θεωρείται αυθαίρετη ως ένα σημείο. Αυτός είναι και ο λόγος που τα τελικά αποτελέσματα από τη χρήση αυτών των εργαλείων δεν μπορούν να δώσουν ακριβείς πληροφορίες για τις εξελικτικές καταβολές των στελεχών εντός ενός κλωνικού συμπλέγματος, ούτε να καταδείξουν το πρώτο στέλεχος που δημιούργησε το εκάστοτε κλωνικό σύμπλεγμα. Ο αλγόριθμος eBURST μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να διερευνηθεί το πως διαφοροποιούνται μεταξύ τους οι βακτηριακοί κλώνοι, αλλά και να δώσει πληροφορίες σχετικά με την εμφάνιση κάποιου επιδημικού κλώνου με κλινική σημασία [135].

Κεφάλαιο 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Θρεπτικά υποστρώματα

- Γενικό θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient agar για ανακαλλιέργειες (LAB008, LAB MTM)

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

- Θρεπτικό υπόστρωμα MacConkey agar No.3 (LAB045, LAB MTM)

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 g σε 1 L απιονισμένου νερού, ρύθμιση του pH στο 7.1 ± 0.2 πριν την αποστείρωση και στη συνέχεια αποστείρωση στους 121°C για 15 min.

- Θρεπτικό υπόστρωμα Mueller Hinton agar για έλεγχο της μικροβιακής ευαισθησίας (LAB039, LAB MTM)

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

- Θρεπτικό υπόστρωμα φύλαξης στελεχών 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 (Na_2HPO_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.

- Εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Pseudomonas agar base/CN-agar (CM0559, OXOID; 117)

Περιέχει (g/L): gelatin peptone 16.0, υδρόλυμα κασεΐνης 10.0, άνυδρο θειικό κάλιο (K_2SO_4) 10.0, άνυδρο χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl_2) 1.4, άγαρ 11.0-18.0. Διάλυση 48.4g σε 1000 ml

απιονισμένου νερού και προσθήκη πριν την αποστείρωση 10 ml γλυκερόλης. Αποστείρωση στους 121 °C για 15 min και στη συνέχεια όταν το υπόστρωμα φτάσει σε θερμοκρασία 45°C-50°C προστίθεται το CN Supplement, το οποίο περιέχει σε (g/L) hexadecyltrimethyl ammonium bromide (cetrimide) 0.2 και nalidixic acid 0.015.

2.2 Χημικά και ρυθμιστικά διαλύματα

- 5x Tris–Borate EDTA Buffer (TBE) (Lot # SLBM1412V, Sigma-Aldrich)

Προσθήκη 85,1 g σε 1 L απεσταγμένου νερού. Για την παρασκευή TBE 0.5x, γίνεται αραίωση ποσότητας του TBE 5x με απεσταγμένο νερό σε σωστή αναλογία.

- EDTA 0.5M (Sigma-Aldrich)

Διάλυση 186.1 g Na₂EDTA*2H₂O 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.

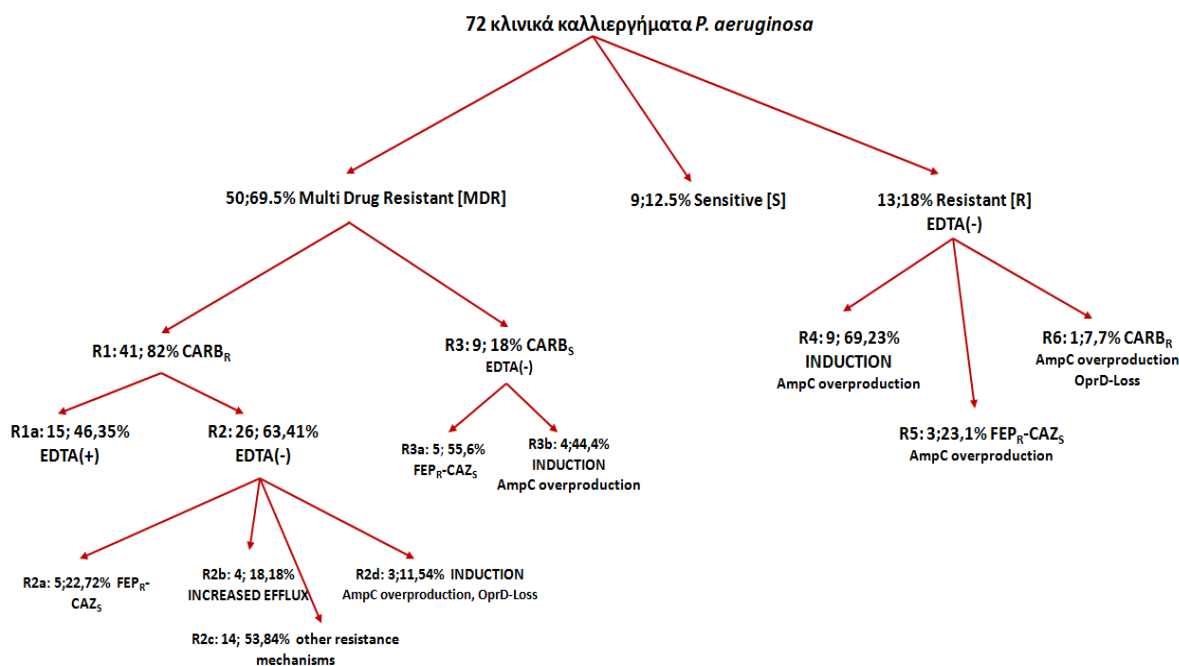
2.3 Στελέχη αναφοράς

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).
- *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.
- Για τα πειράματα ανίχνευσης των γονιδίων αντοχής με την μέθοδο της PCR χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες 4 στελέχη καλά χαρακτηρισμένα από το εργαστήριο 'Μοριακής Ανάλυσης, Μελέτης Μικροβιακής Αντοχής και Νοσοκομειακών Λοιμώξεων' του Κεντρικού Εργαστηρίου Δημόσιας Υγείας, Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.). Συγκεκριμένα τα στελέχη είναι: Kpn 8154 ως θετικός μάρτυρας για το γονίδιο KPC, Kpn 8158 ως θετικός μάρτυρας για το γονίδιο NDM, Pae 8153 ως θετικός μάρτυρας για το γονίδιο VIM, E. coli 8324 ως θετικός μάρτυρας για το γονίδιο OXA 48.

2.4 Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 74 καλά χαρακτηρισμένα κλινικά καλλιεργήματα *P. aeruginosa* (συμπεριλαμβανομένων των στελεχών αναφοράς), τα οποία είναι αποθηκευμένα στο αρχείο στελεχών του Εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας (Ε.Μ.Μ.Α.) του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Τα καλλιεργήματα προέρχονται από καλλιέργειες δειγμάτων νοσηλευόμενων ασθενών από : Α) νοσοκομείο της Βόρειας Ελλάδας (25 καλλιεργήματα), το οποίο θα αποκαλείται στο εξής νοσοκομείο Ν1 και Β) νοσοκομείο της Κεντρικής Ελλάδας (47 καλλιεργήματα), το οποίο θα αποκαλείται στο εξής νοσοκομείο Ν2. Τα καλλιεργήματα έχουν απομονωθεί από ασθενείς νοσηλευόμενους σε διάφορα νοσοκομειακά τμήματα (Μονάδες Εντατικής Θεραπείας, Μονάδες Αυξημένης Φροντίδας, Παθολογικές κλινικές κ.α.) και από ποικίλα κλινικά δείγματα (αίμα, ούρα, βρογχικές εκκρίσεις, σάλιο, πύον, καθετήρες κ.α.) (Πίνακας Ι). Όλα τα καλλιεργήματα έχουν μελετηθεί ως προς την ευαισθησία τους στα αντιβιοτικά σε πρόσφατη ερευνητική εργασία [140] και τα προφίλ αντοχής τους παρουσιάζονται στην εικόνα Ι του Παραρτήματος.



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της κατανομής των ήδη καθορισμένων φαινότυπων αντοχής στα 72 καλλιεργήματα της συλλογής *P. aeruginosa* (Κεφάλαια AM, μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία με τίτλο: «Μοριακή ανάλυση και τυποποίηση κλινικών στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* χρησιμοποιώντας σύγχρονες και καινοτόμες τυποποιητικές μεθόδους», Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, 2018)

2.5 Απομόνωση γενωμικού 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 γενωμικό DNA απομονώθηκε από στελέχη με τη μέθοδο του βρασμού: Μεταφορά αποικιών σε 200-400μl water for injection και βρασμός για 20 min στους 100°C. Ακολουθεί ψύξη των κυττάρων για 7-8 min στους -20°C και φυγοκέντρηση για 5 min σε 10.000 rpm. Το υπερκείμενο περιέχει το βακτηριακό DNA [141].

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

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

- Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές σε συγκέντρωση 10 μΜ. Οι αλληλουχίες τους δίνονται στον Πίνακα II.
- Μίγμα τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (dNTPs): γουανίνης, αδενίνης, θυμίνης και κυτοσίνης, περιεκτικότητας 10 mM από το καθένα (Invitrogen / Thermo Fisher Scientific)
- Διάλυμα MgCl₂ 25 mM (Invitrogen-Thermo Scientific)
- Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer 10x) της Taq DNA πολυμεράσης χωρίς μαγνήσιο (Invitrogen - Thermo Scientific)
- Taq DNA πολυμεράση (recombinant) συγκέντρωσης 5 u/μl (Invitrogen - Thermo Scientific)
- DreamTaq DNA Buffer 10x (περιέχει 20 mM MgCl₂, Thermo Fisher Scientific)
- DreamTaq DNA πολυμεράση (recombinant) συγκέντρωσης 5 U/μl (Thermo Fisher Scientific)
- Θερμικοί κυκλοποιητές: advanced PRIMUS 25 (PEQLAB) και 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems)

Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

100 bp DNA Ladder (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific)

10x Blue Juice, Gel Loading Buffer (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific)

6x DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific)

Agarose Basic (A8963, 0500, Applichem)

Gel Red™ Nucleic Acid Gel Stain 10.000x (Biotium)

SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain, 10.000X concentrate in DMSO (Invitrogen)

Συσκευή ηλεκτροφόρησης 200/2.0 POWER SUPPLY, Thermo Scientific

2.7 Έλεγχος παρουσίας γονιδίων αντοχής

20 καλλιεργήματα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες (CARB_R, 15 EDTA-θετικά και 5 με φαινότυπο FEP_R-CAZ_S) καθώς και 8 CARB_S καλλιεργήματα με φαινότυπο FEP_R-CAZ_S, (Παράρτημα, Πίνακας I, Εικόνα I) ελέγχθηκαν ως προς την παρουσία γονιδίων αντοχής, εφαρμόζοντας προτεινόμενα από την βιβλιογραφία πρωτόκολλα [142-144]. Τα 13 FEP_R-CAZ_S καλλιεργήματα ελέγχθηκαν για τα γονίδια bla_{OXA group I}, bla_{PSE-1}, bla_{OXA group III} [143]. Από αυτά, όσα χαρακτηρίστηκαν ως CARB_R, μελετήθηκαν επιπλέον και για την ύπαρξη της καρβαπενεμάσης OXA-48 [144]. Τα 15 EDTA (+) καλλιεργήματα ελέγχθηκαν για την ύπαρξη των γονιδίων bla_{VIM}, bla_{IMP}, bla_{OXA-48}, bla_{NDM} [142, 144] τα οποία κωδικοποιούν μέταλλο-β-λακταμάσες, ένζυμα ικανά να προσδώσουν αντοχή στις καρβαπενέμες.

Για κάθε καλλιέργημα *P. aeruginosa* πραγματοποιήθηκε ανακαλλιέργεια από το cryovial σε γενικό θρεπτικό υπόστρωμα (Nutrient agar) και ακολούθησε επώαση για 18-24 ώρες στους 37 °C. Το γενωμικό DNA απομονώθηκε με τη μέθοδο του βρασμού.

Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της αντίδρασης [143, 144] είχαν ως εξής:

	Buffer	dNTPs	primers	Taq πολυμεράση	H ₂ O	DNA
Όγκος (μl)	2,5	0,5	1 έκαστος	0,2	16,8	3

Οι συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης [143, 144] ήταν οι ακόλουθες :

Στάδιο διαδικασίας	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	94 °C	5 min	1
Αποδιάταξη	94 °C	30 sec	30
Υβριδισμός	58 °C	30 sec	
Επέκταση	72 °C	30 sec	
Τελική επέκταση	72 °C	10 min	1
Παύση	4 °C	-	-

Για την ανίχνευση των γονιδίων OXA group III εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο των Lee και συνεργατών [143], τροποποιημένο όπως φαίνεται στον πίνακα:

Στάδιο διαδικασίας	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αρχική αποδιάταξη	94 °C	5 min	1
Αποδιάταξη	94 °C	30 sec	30
Υβριδισμός	56 °C	30 sec	
Επέκταση	72 °C	30 sec	

Τελική επέκταση	72 °C	10 min	1
Παύση	4 °C	-	-

Τα PCR προϊόντα αναμείχθηκαν με 1 μl loading buffer και ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1%/ TBE 0,5X για 20'. Οι αναμενόμενες ζώνες για τα γονίδια αντοχής bla_{VIM}, bla_{IMP}, bla_{OXA-48}, bla_{NDM} είναι στις 488 bp, ενώ για το γονίδιο bla_{OXA group I} είναι στις 760 bp , για το γονίδιο bla_{OXA group III} στις 908 bp και για το γονίδιο bla_{PSE-1} στις 700 bp [142-144].

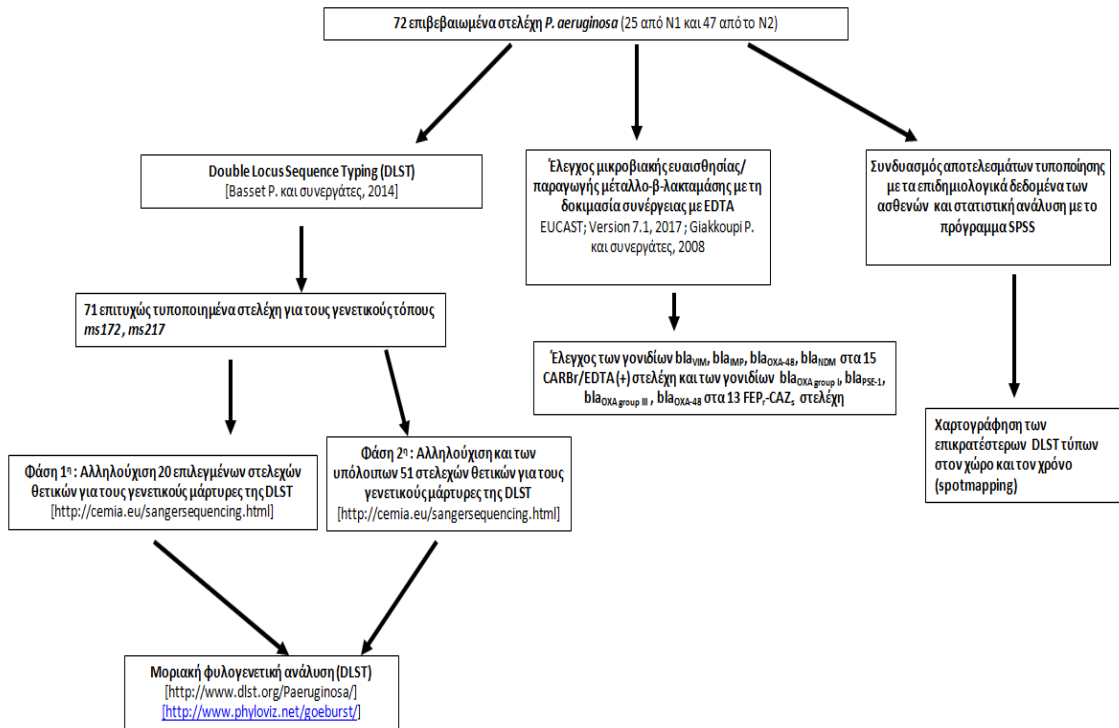
2.8 DLST και ανάλυση των δεδομένων που ελήφθησαν από την αλληλούχιση

Με στόχο την τυποποίηση των 74 κλινικών καλλιεργημάτων του βακτηρίου (συμπεριλαμβανομένων των στελεχών αναφοράς PAO1, NEQAS), χρησιμοποιήθηκε, σε πρόσφατη ερευνητική εργασία [140] μια νέα τυποποιητική μέθοδος, η DLST, σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Basset P. και συνεργατών, 2014 [125]. Η μέθοδος εφαρμόστηκε για τους 2 γενετικούς τόπους *ms172*, *ms217* και τα καλλιεργήματα έδωσαν θετικό αποτέλεσμα και για τους 2, με εξαίρεση ένα καλλιέργημα, το οποίο έδωσε θετικό αποτέλεσμα μόνο για τον γενετικό τόπο *ms217* μετά από 3 επαναλήψεις και χαρακτηρίστηκε ως ατυποποίητο.

Από τα 73 επιτυχώς τυποποιημένα καλλιεργήματα, επιλέχθηκαν 19 για αλληλούχιση κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας από τους Κεφάλαια και συν. [140]. Η επιλογή των καλλιεργημάτων έγινε με στόχο να είναι αντιπροσωπευτικά των φαινοτύπων αντοχής, των κλινικών δειγμάτων και των μονάδων στα 2 νοσοκομεία. Παράλληλα, ο αριθμός των καλλιεργημάτων που επιλέχθηκαν από το κάθε νοσοκομείο ήταν αντιπροσωπευτικός και ανάλογος του αριθμού των καλλιεργημάτων που είχαν συλλεχθεί από το καθένα (5/24 από το νοσοκομείο N1 και 14/47 από το νοσοκομείο N2).

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση των 2 γενετικών τόπων *ms172* και *ms217* και στα υπόλοιπα 52 στελέχη. Το διάγραμμα ροής που παρουσιάζει το σύνολο των

πειραματικών διαδικασιών που ακολουθήθηκαν απεικονίζεται στην εικόνα II του Παραρτήματος.



Εικόνα II. Διαγραμματική απεικόνιση των συνολικών πειραματικών διαδικασιών.

Έπειτα από επεξεργασία όλων των αλληλουχιών που ελήφθησαν με βάση την εργασία των Basset και συνεργατών [125], οι trimmed αλληλουχίες που προέκυψαν υποβλήθηκαν στη βάση δεδομένων της DLST (<http://www.dlst.org/Paeruginosa/>) για τον καθορισμό του DLST τύπου. Εβδομήντα καλλιεργήματα χαρακτηρίστηκαν με γνωστά allele numbers, καθώς σημειώθηκε ταύτιση των αλληλουχιών τους με κάποια από τα ήδη καταχωρημένα loci της βάσης DLST. Για τα 3 καλλιεργήματα για τα οποία δεν βρέθηκαν γνωστά αλλήλια (12, 70, 77, Πίνακας I) ακολουθήθηκε η διαδικασία που προτείνεται από το site της DLST (<http://www.dlst.org/Paeruginosa/>) για την υποβολή νέας αλληλουχίας και καθορίστηκαν διαφορετικά allele numbers. Μέσω της αλληλούχισης των γενετικών τόπων όλων των επιτυχώς τυποποιημένων καλλιεργημάτων, προέκυψε ένας DLST τύπος για το κάθε καλλιεργήμα, το σύνολο των οποίων παρουσιάζεται συνολικά στον Πίνακα I του Παραρτήματος [140].

2.9 eBURST φυλογενετική ανάλυση και κατασκευή των MSTs

Οι αλληλουχίες των καλλιεργημάτων και για τους δυο γενετικούς τόπους της DLST χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό να αξιολογηθούν τα τοπικά φυλογενετικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου, εφαρμόζοντας κατάλληλο πρόγραμμα φυλογενετικής ανάλυσης, το Global optimal eBURST analysis (<http://www.phyloviz.net/goeburst/>) [135]. Το πρόγραμμα έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για φυλογενετική επεξεργασία αλληλουχιών που έχουν αποκτηθεί από στελέχη του βακτηρίου *S. aureus* [123, 145]. Επιλέχθηκε και στη παρούσα εργασία για την ανάλυση των DLST αλληλουχιών των υπό μελέτη *P. aeruginosa* καλλιεργημάτων, καθώς όχι μόνο προτείνεται στο πρωτόκολλο των Basset P. και συνεργατών [125], αλλά έχει εφαρμοστεί προηγουμένως τόσο σε κλινικά στελέχη [140] όσο και σε περιβαλλοντικά στελέχη *P. aeruginosa*, απομονωμένα από ποικίλα υδάτινα ενδιαιτήματα του Ελλαδικού χώρου [68], εφαρμόζοντας τους ίδιους κανόνες και ορισμούς.

2.10 Στατιστική και επιδημιολογική ανάλυση

Το χρονικό διάστημα της διεξαγωγής της μελέτης συλλέχθηκαν δημογραφικά, κλινικά και επιδημιολογικά δεδομένα για τους 71 νοσηλευόμενους ασθενείς από τους οποίους απομονώθηκαν τα επιτυχώς τυποποιημένα καλλιεργήματα *P. aeruginosa*, με χρήση ερωτηματολογίων. Αναλυτικότερα, καταγράφηκαν εκτός των βασικών δημογραφικών στοιχείων (ηλικία και φύλο), κλινικές πληροφορίες για το είδος της λοίμωξης, το κλινικό δείγμα, υποκείμενα νοσήματα, η έκβαση της λοίμωξης και πληροφορίες επιδημιολογικού χαρακτήρα, όπως ημερομηνίες εισόδου και εξόδου του κάθε ασθενούς, ημερομηνία απομόνωσης του παθογόνου, μετακινήσεις του ασθενούς μέσα στο νοσοκομείο κλπ. Το ερωτηματολόγιο που χρησιμοποιήθηκε για την επιδημιολογική μελέτη παρουσιάζεται στην εικόνα III του Παραρτήματος.

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων που αντλήθηκαν από τα ερωτηματολόγια έγινε με το πρόγραμμα IBM® SPSS® Statistics. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων περιελάμβανε την περιγραφή του δείγματος, τόσο σε επίπεδο μικροβιολογικών αποτελεσμάτων όσο και των κλινικών και επιδημιολογικών δεδομένων των ασθενών από τους οποίους απομονώθηκαν.

Ως προς τα μικροβιολογικά δεδομένα, μελετήθηκε η κατανομή των διαφόρων φαινότυπων αντοχής, των υπεύθυνων γονιδίων αντοχής και των DLST τύπων στα καλλιεργήματα που απομονώθηκαν συνολικά και ανά νοσοκομείο νοσηλείας των αντίστοιχων ασθενών, προκειμένου να ανιχνευθούν διαφορές είτε στο προφίλ αντοχής και στα γονίδια αντοχής είτε στους DLST τύπους που κυκλοφορούν στα καλλιεργήματα εντός των 2 νοσοκομείων.

Ειδικότερα για τους DLST τύπους, έγινε προσπάθεια χαρτογράφησης της κατανομής, τουλάχιστον των συχνότερων τύπων, σε σχέση με τους συγκεκριμένους ασθενείς και τον χρόνο και την κλινική νοσηλείας τους κατά την απομόνωση τους, όπως και τις τυχόν μετακινήσεις των ασθενών μεταξύ των διαφόρων τμημάτων του εκάστοτε νοσοκομείου (spotmapping).

Αναλυτικότερα, χρησιμοποιήθηκαν φύλλα Microsoft Excel, στα οποία αρχικά προστέθηκαν βασικά επιδημιολογικά δεδομένα των ασθενών, όπως το φύλο, οι κλινικές νοσηλείας και οι DLST τύποι που καταγράφηκαν. Έπειτα, όλες οι κλινικές νοσηλείας από τις οποίες απομονώθηκαν δείγματα, σημειώθηκαν με ένα διαφορετικό κωδικό χρώμα, έτσι ώστε να ξεχωρίζει κατά την απεικόνιση η περίοδος νοσηλείας σε μία κλινική ή η μετάβαση σε μία διαφορετική κλινική. Στη συνέχεια, σημειώθηκαν τα διαφορετικά κελιά του φύλλου με τέτοιο τρόπο που το κάθε κελί αντιπροσώπευε μία ημέρα του χρόνου, το διπλανό του την αμέσως επόμενη ημέρα κ.ο.κ. Έτσι, το φύλλο σε όλη του την έκταση είχε σημειωμένες τις ημερομηνίες που αφορούσαν όλες τις απομονώσεις στο κάθε νοσοκομείο. Τέλος, στα κελιά που αντιστοιχούσαν στην εκάστοτε ημερομηνία απομόνωσης για το κάθε καλλιέργημα, τοποθετήθηκε κάθε φορά ένα ξεχωριστό σύμβολο που αντιπροσώπευε τον διαφορετικό DLST τύπο. Η οπτικοποίηση όλων αυτών των πληροφοριών δίνει τη δυνατότητα να ανιχνευθούν με έναν ευκολότερο τρόπο επιπρόσθετες πληροφορίες για να μελετηθεί το ενδεχόμενο ενδονοσοκομειακής διασποράς, καθώς καθιστά πιο ευδιάκριτες τις περιόδους συνοσηλείας σε κάποιο τμήμα.

Κεφάλαιο 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μοριακή ανίχνευση μηχανισμών αντοχής

Από τα 20 CARB_R καλλιεργήματα, τα 15 CARB_R / EDTA (+) (31, 35, 37, 38, 40, 41, 44, 49, 50, 52, 53, 59, 62, 65, 71, Πίνακας Ι) ελέγχθηκαν μεταξύ άλλων για την παρουσία του γονιδίου bla_{VIM}, με τα 14/15 καλλιεργήματα να δίνουν θετική PCR αντίδραση για το συγκεκριμένο γονίδιο. Το καλλιεργήμα 62 που ήταν VIM (-) ελέγχθηκε για την παρουσία του γονιδίου bla_{IMP}, όπου δεν προέκυψε και πάλι θετική αντίδραση κατά την PCR. Όλα τα CARB_R / EDTA (+) καλλιεργήματα ήταν αρνητικά κατά τον έλεγχο για τα γονίδια bla_{OXA-48} και bla_{NDM}. Ομοίως και τα 5 CARB_R / FEP_R -CAZ_S καλλιεργήματα (17, 32, 51, 61, 64, Πίνακας Ι) δεν έδωσαν θετική αντίδραση κατά τον έλεγχο για τα bla_{OXA group I}, bla_{PSE-1}, bla_{OXA group III}, bla_{OXA-48}. Τέλος, στα 8 CARB_S / FEP_R - CAZ_S καλλιεργήματα (1, 28, 57, 67, 72, 74, 76, 77, Πίνακας Ι) δεν ανιχνεύθηκε κανένα από τα γονίδια που μελετήθηκαν (bla_{OXA group I}, bla_{PSE-1}, bla_{OXA group III}). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1. Αποτύπωση της μελέτης των γονιδίων αντοχής στα 20 CARB_R και στα 8 CARB_S / FEP_R - CAZ_S καλλιεργήματα που εξετάστηκαν. Με (+/-) συμβολίζεται η παρουσία / απουσία του εκάστοτε γονιδίου, ενώ το κενό συμβολίζει πως το καλλιεργήμα δεν ελέγχθηκε για το συγκεκριμένο γονίδιο.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΜΑ	bla _{OXA group I}	bla _{OXA group III}	bla _{PSE-1}	bla _{OXA-48}	bla _{VIM}	bla _{NDM}	bla _{IMP}
1	-	-	-				
17	-	-	-	-			
28	-	-	-				
31				-	+	-	
32	-	-	-	-			
35				-	+	-	

37				-	+	-	
38				-	+	-	
40				-	+	-	
41				-	+	-	
44				-	+	-	
49				-	+	-	
50				-	+	-	
51	-	-	-	-			
52				-	+	-	
53				-	+	-	
57	-	-	-				
59				-	+	-	
61	-	-	-	-			
62				-	-	-	-
64	-	-	-	-			
65				-	+	-	
67	-	-	-				
71				-	+	-	
72	-	-	-				
74	-	-	-				
76	-	-	-				
77	-	-	-				

3.2 DLST και φαινότυποι αντοχής

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της εργασίας των Κεφάλαια και συνεργατών [140], τα 73/74 καλλιεργήματα (συμπεριλαμβανομένων των στελεχών αναφοράς PAO1, NEQAS) τυποποιήθηκαν επιτυχώς $[(73/74)*100\% = 98,65\%]$. Για 3/73 καλλιεργήματα (12, 70, 77, Πίνακας I), καθορίστηκαν νέοι allele numbers. Συγκεκριμένα, το καλλιεργήμα 12 έδωσε το νέο αλληλίο 135 για τον γενετικό τόπο *ms172*, ενώ τα καλλιεργήματα 70 και 77 έδωσαν επίσης 2 νέα αλληλία, τα 217 και 212 αντιστοίχως, τα οποία αποτελούν παραλλαγές του γενετικού τόπου *ms217* (<http://www.dlst.org/Paeruginosa>). Το σύνολο των DLST τύπων που προέκυψε μετά και την αλληλούχιση και την επεξεργασία παρουσιάζεται συνολικά στον Πίνακα I του Παραρτήματος .

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της μεθόδου DLST αποκάλυψε συνολικά 41 DLST τύπους στο σύνολο των καλλιεργημάτων που αναλύθηκαν, συμπεριλαμβανομένων και των στελεχών αναφοράς PAO1, NEQAS. Οι 8-37 και 32-39 ξεχώρισαν ως οι επικρατέστεροι μεταξύ των τύπων, με ποσοστό εμφάνισης ίσο με 18,31% (13/71 καλλιεργήματα) και για τους δύο στο σύνολο των τυποποιημένων καλλιεργημάτων. Ο τύπος 8-37 εμφανίστηκε μόνο στο νοσοκομείο N2 της κεντρικής Ελλάδας σε ποσοστό 27,66% (13/47), περιλαμβάνοντας καλλιεργήματα από διαφορετικά είδη δειγμάτων, όπως πτύελα, βρογχικές εκκρίσεις, αίμα, ούρα κλπ (Πίνακας I). Ο 32-39, εμφανίστηκε σε καλλιεργήματα απομονωμένα από δείγματα και των δυο νοσοκομείων. Τα καλλιεργήματα απομονώθηκαν από αιμοκαλλιέργειες όσον αφορά το νοσοκομείο N1 της Βόρειας Ελλάδας (6/24, 25%), και από 7 δείγματα αναπνευστικού (πτύελα και βρογχικές εκκρίσεις) του νοσοκομείου N2 της κεντρικής Ελλάδας (7/47, 14,89%).

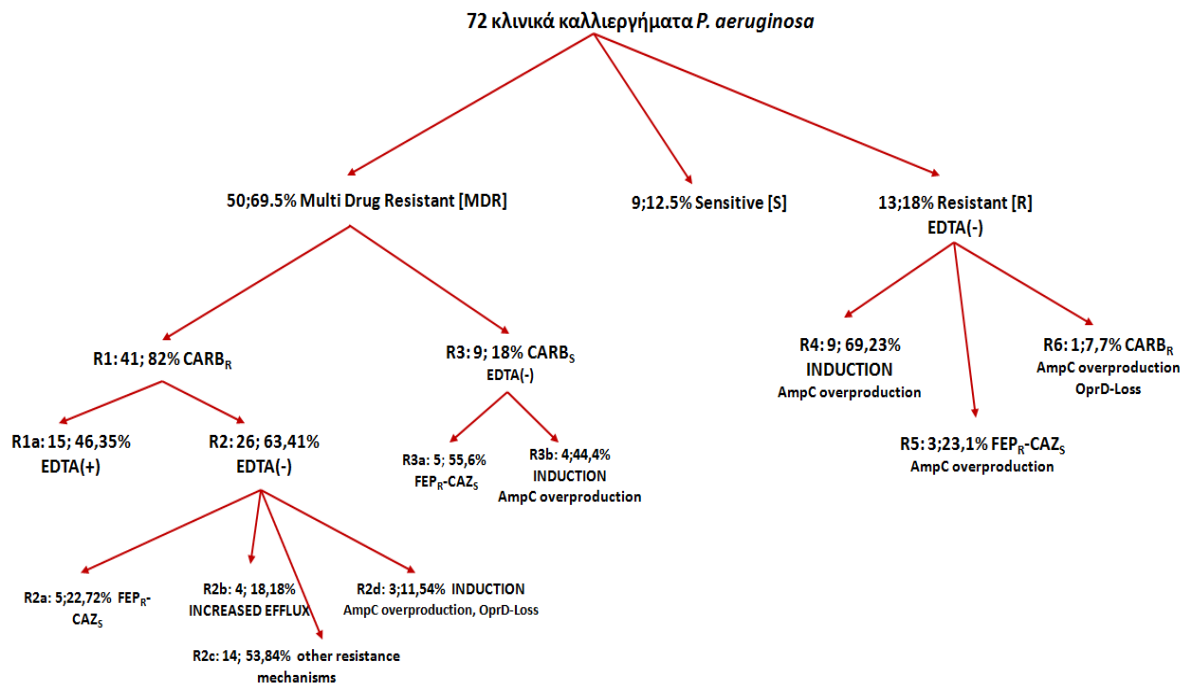
Αναφορικά με τους υπόλοιπους DLST τύπους, 6/41 εμφανίζονται σε 2 ή 3 καλλιεργήματα (DLST τύποι 28-77, 12-54, 20-30, 23-22, 1-83 και 18-156, Πίνακας I). Οι υπόλοιποι 33 τύποι εμφανίζονται μόλις μία φορά στο σύνολο των καλλιεργημάτων και χαρακτηρίστηκαν ως singletons (Πίνακας I).

Η συχνότητα εμφάνισης των επικρατέστερων τύπων, καθώς και οι τύποι που βρέθηκαν σε τουλάχιστον 2 καλλιεργήματα της συλλογής και στα δυο νοσοκομεία παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2. Συχνότητα εμφάνισης των επικρατέστερων DLST τύπων και εκείνων που εμφανίζονται σε τουλάχιστον 2 καλλιεργήματα σε ένα ή/και στα 2 νοσοκομεία. *(N/A): Not Applicable, απουσία του εκάστοτε τύπου από το συγκεκριμένο νοσοκομείο.

DLST ΤΥΠΟΣ	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ N1 (%)	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ N2 (%)
8-37	N/A*	27,7% (13/47)
32-39	25% (6/24)	14,9% (7/47)
28-77	N/A	4,3% (2/47)
12-54	4,2% (1/24)	2,1% (1/47)
20-30	4,2% (1/24)	2,1% (1/47)
23-22	N/A	6,4% (3/47)
18-156	N/A	4,3% (2/47)
1-83	N/A	4,3% (2/47)

Τα 71 καλλιεργήματα της συλλογής που τυποποιήθηκαν, αλλά και το 1 ατυποποίητο, κατατάσσονται σε 11 διαφορετικά προφίλ αντοχής (Resistant Profiles, RP), σύμφωνα με την φαινοτυπική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε από τους Κεφάλαια και συν. [Εικόνα I, [140]. Στην φαινοτυπική ανάλυση δεν συμπεριλήφθηκαν τα στελέχη αναφοράς PAO1, NEQAS.



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της κατανομής των ήδη καθορισμένων φαινοτύπων αντοχής στα 72 καλλιεργήματα της συλλογής *P. aeruginosa* [140].

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Κεφάλαια και συν.[140], ο φαινότυπος R6 εντοπίζεται μόνο σε ένα καλλιεργήμα του νοσοκομείου N1, οι φαινότυποι R1a, R3b, R2d και R5 εμφανίζονται μόνο στο νοσοκομείο N2, ενώ οι υπόλοιποι 6 φαινότυποι (R2a, R2b, R2c, R3a, R4, S) εμφανίζονται και στα 2 νοσοκομεία, με διαφορετικά ποσοστά εμφάνισης στο κάθε νοσοκομείο (Πίνακας 3.3).

Πίνακας 3.3: Συχνότητα εμφάνισης των φαινότυπων αντοχής στα καλλιεργήματα που εξετάστηκαν από τα 2 νοσοκομεία. *(N/A): Not Applicable, απουσία του εκάστοτε τύπου από το συγκεκριμένο νοσοκομείο.

ΠΡΟΦΙΛ ΑΝΤΟΧΗΣ	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ N1 (%)	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ N2 (%)
R1a	N/A*	31,9% (15/47)
R2a	4,2% (1/24)	8,5% (4/47)
R2b	4,2% (1/24)	6,4% (3/47)
R2c	25% (6/24)	17% (8/47)
R2d	N/A	6,4% (3/47)
R3a	4,2% (1/24)	8,5% (4/47)
R3b	N/A	8,5% (4/47)
R4	29,2% (7/24)	4,3% (2/47)
R5	N/A	6,4% (3/47)
R6	4,2% (1/24)	N/A
S	29,2% (7/24)	2,1% (1/47)

Συσχετίζοντας τους φαινότυπους αντοχής με τους DLST τύπους, ξεκινώντας με τους επικρατέστερους, τα 13 καλλιεργήματα του τύπου 8-37 ανήκουν στους φαινότυπους R1a (7/13), R2a (2/13), R2c (4/13), το σύνολο των οποίων είναι ανθεκτικά στις καρβαπενέμες παρουσιάζοντας παράλληλες αντοχές σε διαφορετικές ομάδες αντιβιοτικών. Τα 13 καλλιεργήματα του γονότυπου 32-39 εμφανίζουν φαινότυπους αντοχής R1a και R3a (4/13 έκαστος), R2b (3/13) και R2c (2/13). Όλα τα καλλιεργήματα χαρακτηρίστηκαν ως πολυανθεκτικά, με αντοχή στις καρβαπενέμες, εκτός των καλλιεργημάτων του φαινότυπου R3a. Η κατανομή των υπολοίπων DLST τύπων στους φαινότυπους αντοχής, καταγράφεται αναλυτικά στον Πίνακα 3.4.

Πίνακας 3.4. Κατανομή των διαφορετικών DLST τύπων στους φαινότυπους αντοχής.

ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΜΑΤΩΝ / ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΑΝΤΟΧΗΣ											
	R1a	R2a	R2b	R2c	R2d	R3a	R3b	R4	R5	R6	S
DLST ΤΥΠΟΣ											
8-37	7	2		4							
32-39	4		3	2		4					
12-54					1			1			
28-77	1				1						
20-30							1			1	
23-22	2						1				
1-83		1		1							
18-156	1			1							
25-11											1
40-48								1			
22-44						1					
9-74											1
90-139								1			
67-39		1									
57-100								1			
30-54								1			
29-48											1
135-102											1
24-49											1
9-203								1			
32-54								1			
63-73											1
6-28											1
82-54						1					

17-14				1							
19-93							1				
1-21						1					
21-96		1									
21-26											1
78-17									1		
116-144			1								
15-212						1					
9-19									1		
8-78						1					
28-57					1						
28-25									1		
28-217							1				
4-101								1			
24-91						1					
32-52								1			

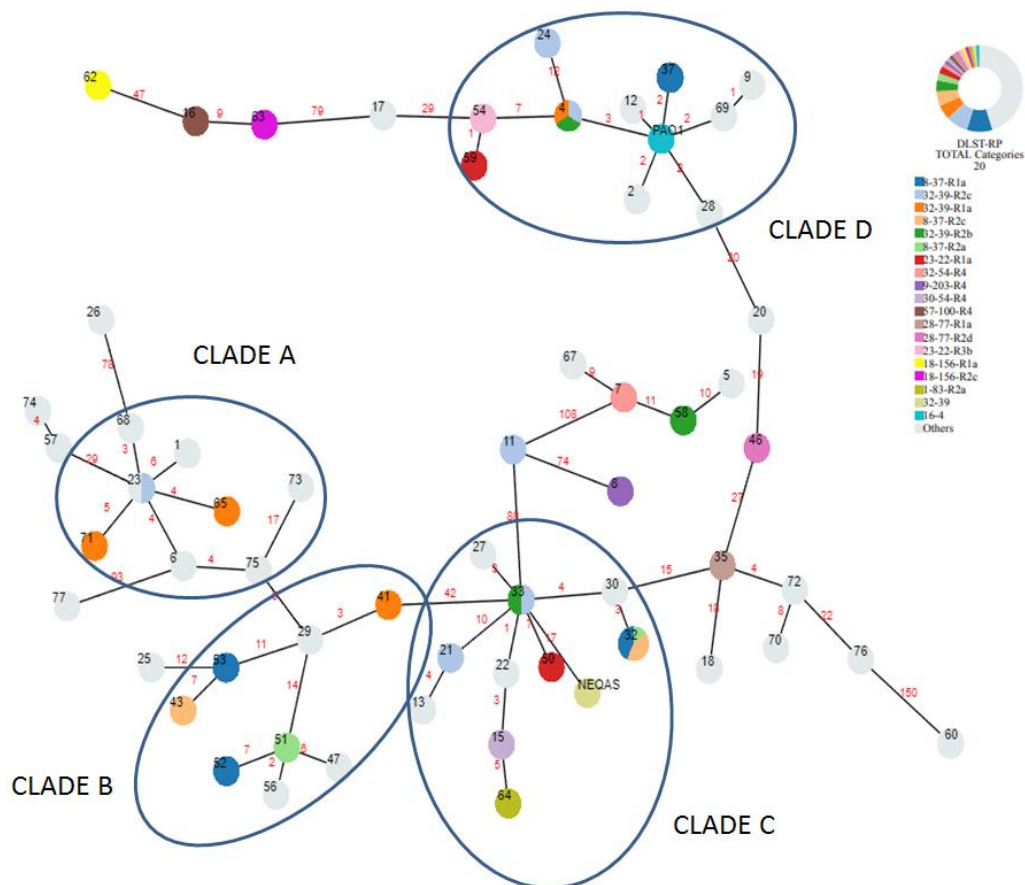
Παρατηρείται πως τα 20 CARB_R και τα 8 CARB_S / FER_R - CAZ_S καλλιεργήματα που μελετήθηκαν για την ύπαρξη γονιδίων αντοχής, παρουσιάζουν μία ποικιλία στους γονότυπούς τους, καθώς κατανέμονται σε 17 διαφορετικούς DLST τύπους (Πίνακας 3.5).

Πίνακας 3.5. Κατανομή των 20 CARB_R και των 8 CARB_S / FER_R-CAZ_S καλλιεργημάτων στους αντίστοιχους DLST τύπους και στους φαινότυπους αντοχής.

ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΜΑΤΟΣ	DLST ΤΥΠΟΣ	ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΑΝΤΟΧΗΣ
1	82-54	R3a
17	67-39	R2a
28	1-21	R3a
31	32-39	R1a
32	8-37	R2a
35	28-77	R1a
37	8-37	R1a
38	8-37	R1a
40	8-37	R1a
41	32-39	R1a
44	8-37	R1a
49	8-37	R1a
50	23-22	R1a
51	8-37	R2a
52	8-37	R1a
53	8-37	R1a
57	78-17	R5
59	23-22	R1a
61	21-96	R2a
62	18-156	R1a
64	1-83	R2a
65	32-39	R1a
67	24-91	R3a
71	32-39	R1a
72	28-25	R5
74	8-78	R3a
76	9-19	R5
77	15-212	R3a

3.3 eBURST φυλογενετική ανάλυση

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν και για τους δυο γενετικούς τόπους της DLST για τα 71 επιτυχώς τυποποιημένα καλλιεργήματα και τα στελέχη αναφοράς PAO1 / NEQAS, επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα Global optimal eBURST analysis για την κατασκευή MSTs [135]. Στις εικόνες 3.1, 3.2, 3.3 παρουσιάζονται 3 MSTs που απεικονίζουν την κατανομή των DLST τύπων των καλλιεργημάτων της συλλογής στους αντίστοιχους φαινότυπους αντοχής.



Εικόνα 3.1 : Minimum spanning φυλογενετική ανάλυση των 71 τυποποιημένων καλλιεργημάτων *P. aeruginosa* της συλλογής και των 2 στελεχών αναφοράς PAO1, NEQAS. Παρουσιάζεται η διασπορά των DLST τύπων στους φαινότυπους αντοχής και για τα δυο νοσοκομεία. Οι συνδυασμοί των DLST τύπων και των φαινοτύπων αντοχής αντικατοπτρίζονται με διαφορετικό χρώμα, ενώ αναγράφονται ενδεικτικά οι αποστάσεις μεταξύ των κόμβων, με βάση τις διαφορές που εντοπίστηκαν (SNPs) στις αλληλουχίες των καλλιεργημάτων και για τους 2 γενετικούς τόπους *ms172*, *ms217*.

Στην Εικόνα 3.1 απεικονίζεται η κατανομή των DLST τύπων στους φαινότυπους αντοχής στο σύνολο των καλλιεργημάτων που τυποποιήθηκαν επιτυχώς. Ξεχωρίζουν 4 κλάδοι (clades A, B, C, D), στον καθένα από τους οποίους ομαδοποιούνται καλλιεργήματα που φέρουν μικρές

διαφορές στις αλληλουχίες των 2 γενετικών τόπων *ms172* και *ms217* (νουκλεοτιδικές παραλλαγές στις αλληλουχίες των στελεχών, Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) και χαρακτηρίζονται ως γενετικά σχετιζόμενα. Παρατηρείται πως τα καλλιεργήματα ενός κλάδου μοιράζονται και άλλα χαρακτηριστικά, όπως αυξημένη αντοχή στις καρβαπενέμες ή τον ίδιο DLST τύπο. Τέλος, σημειώνεται πως υπάρχουν και περιπτώσεις όπου 2 ή και περισσότερα καλλιεργήματα μοιράζονται την ίδια θέση στο δέντρο. Αυτό συμβαίνει όταν οι αλληλουχίες των καλλιεργημάτων για τους γενετικούς τόπους της DLST δεν διαφέρουν μεταξύ τους, οπότε δεν εντοπίζονται SNPs από το πρόγραμμα ανάλυσης. Αυτό απεικονίζεται στο δέντρο με κόμβους (nodes) με διαφορετικά χρωματισμένα τμήματα, όπως ο κόμβος του κλάδου C.

Ο κλάδος A απαρτίζεται από 9 καλλιεργήματα τα οποία ανήκουν σε 6 διαφορετικούς DLST τύπους (12-54, 82-54, 32-39, 20-30, 32-52 και 28-57). Εδώ εμφανίζεται και ο επικρατής 32-39 με 3 καλλιεργήματα (23, 65, 71), τα οποία κατατάσσονται στους φαινότυπους αντοχής R1a (65, 71) και R2c (23). Ο αμέσως επόμενος επικρατέστερος DLST τύπος είναι ο 20-30, με τα καλλιεργήματα 6 και 75, τα οποία ανήκουν στους φαινότυπους αντοχής R6 και R1a αντίστοιχα. Οι υπόλοιποι τύποι συμμετέχουν με ένα καλλιέργημα στον κλάδο (καλλιέργημα 68: 12-54, R2d / καλλιέργημα 1: 82-54, R3a / καλλιέργημα 73: 28-57, R2d / καλλιέργημα 66: 32-52, R4).

Στον κλάδο φαίνεται να συγκεντρώνονται καλλιεργήματα που εμφάνισαν ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες (6/9 καλλιεργήματα // 6, 23, 65, 68, 71, 73, Πίνακας I). Τα 4/6 ανθεκτικά καλλιεργήματα προέρχονται από το νοσοκομείο N2 (65, 68, 71, 73), απομονώθηκαν από δείγματα πτυέλων ή βρογχικών εκκρίσεων ασθενών. Τα υπόλοιπα 2 καλλιεργήματα με ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες απομονώθηκαν από αιμοκαλλιέργειες ασθενών που νοσηλεύτηκαν στο νοσοκομείο N1.

Ο κλάδος B απαρτίζεται από 8 καλλιεργήματα, τα οποία εμφάνισαν αυξημένη αντοχή στις καρβαπενέμες. Τα 5/8 (41, 43, 51, 52, 53) υπάγονται στους 2 επικρατέστερους DLST τύπους, τους 8-37 (41, 43, 52, 53) και 32-39 (51). Τα καλλιεργήματα του τύπου 8-37 χαρακτηρίστηκαν ως R1a (41, 52, 53) και R2c (43), ενώ το καλλιέργημα 51 του τύπου 32-39 ανήκει στον φαινότυπο αντοχής R2a (Πίνακας I).

Τα υπόλοιπα 3 καλλιεργήματα του κλάδου περιγράφηκαν ως εξής : καλλιέργημα 29 : 1-83, R2c / καλλιέργημα 47 : 17-14, R2c / καλλιέργημα 56 : 116-144, R2b (Πίνακας Ι).

Όλα τα καλλιεργήματα του κλάδου προέρχονται απο το νοσοκομείο N2. Τα 3/8 (41, 47, 56) απομονώθηκαν από δείγματα πτυέλων, τα 2/8 (29, 52) από βρογχικές εκκρίσεις ή αιμοκαλλιέργειες (43, 51) και ένα καλλιέργημα (53) απομονώθηκε από καθετήρα (Πίνακας Ι).

Τα 19 καλλιεργήματα που ομαδοποιούνται στον κλάδο C προέρχονται και από τα 2 νοσοκομεία, με το νοσοκομείο N2 να περιλαμβάνει την πλειοψηφία των καλλιεργημάτων (13/19). Τα 8 από τα 13 καλλιεργήματα του κλάδου C που υπάγονται στο νοσοκομείο N2 (32, 36, 38, 39, 40, 44, 45, 49, Πίνακας Ι) ανήκουν στον τύπο 8-37, δεν εμφανίζουν διαφορές στις αλληλουχίες των γενετικών τόπων *ms172*, *ms217* και το πρόγραμμα eBURST τα τοποθετεί στην ίδια θέση στο δέντρο. Το ίδιο συμβαίνει και με τα καλλιεργήματα 33 και 48, τα οποία ανήκουν στον τύπο 32-39. Για τα 6 από τα συνολικά 19 καλλιεργήματα του κλάδου που απομένουν, τα 5 ανήκουν στο νοσοκομείο N1 και το 1 είναι το στέλεχος αναφοράς NEQAS.

Τα 5 καλλιεργήματα (13, 15, 21, 22, 27, Πίνακας Ι) που προέρχονται από το νοσοκομείο N1, έχουν απομονωθεί από αιμοκαλλιέργειες νοσηλευόμενων ασθενών. Από τα 13 καλλιεργήματα του νοσοκομείου N2 (30, 32, 33, 36, 38, 39, 40, 44, 45, 48, 49, 50, 64 Πίνακας Ι), τα 5 έχουν προκύψει από δείγματα πτυέλων (32, 33, 38, 48, 50), τα 4 από δείγματα βρογχικών εκκρίσεων (30, 39, 40, 49), ενώ τα υπόλοιπα 4 από δείγμα ούρων (36), αίματος (44), καθετήρα (45) και από δείγμα πύου (64).

Τα καλλιεργήματα συνολικά κατανέμονται σε 9 διαφορετικούς DLST τύπους, τους 12-54 (27), 29-48 (13), 30-54 (15), 22-44 (22), 1-83 (64), 23-22 (50), 19-93 (30), 8-37 (32, 36, 38, 39, 40, 44, 45, 49) και 32-39 (21, 33, 48 και NEQAS). Με βάση αυτή την κατανομή, τα 12/19 καλλιεργήματα του κλάδου ανήκουν στους επικρατείς DLST τύπους 8-37 και 32-39. Συσχετίζοντας αρχικά τα καλλιεργήματα των 2 επικρατέστερων τύπων με τους φαινότυπους αντοχής (από τη διαδικασία αυτή εξαιρείται το πρότυπο στέλεχος NEQAS), προκύπτει ο πίνακας 3.6 που παρατίθεται παρακάτω.

Πίνακας 3.6. Κατανομή των επικρατέστερων DLST τύπων του κλάδου C στους αντίστοιχους φαινότυπους αντοχής.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΜΑ	DLST ΤΥΠΟΣ	ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΑΝΤΟΧΗΣ
32	8-37	R2a
36	8-37	R2c
38	8-37	R1a
39	8-37	R2c
40	8-37	R1a
44	8-37	R1a
45	8-37	R2c
49	8-37	R1a
21	32-39	R2c
33	32-39	R2c
48	32-39	R2b

Αναφορικά με τα καλλιεργήματα του κλάδου C που ανήκουν σε DLST τύπους διαφορετικούς από τους επικρατείς, αυτά εμφανίζουν τους παρακάτω φαινότυπους αντοχής : καλλιεργήμα 27: 12-54, R4 / καλλιεργήμα 13: 29-48, S / καλλιεργήμα 15: 30-54, R4 / καλλιεργήμα 22: 22-44, R2c / καλλιεργήμα 64: 1-83, R2a / καλλιεργήμα 50: 23-22, R1a / καλλιεργήμα 30: 19-93, R3b. Σημειώνεται πως αυτά τα καλλιεργήματα μοιράζονται σε CARB_R (καλλιεργήματα 22, 50, 64) και CARB_S (καλλιεργήματα 13, 15, 27, 30).

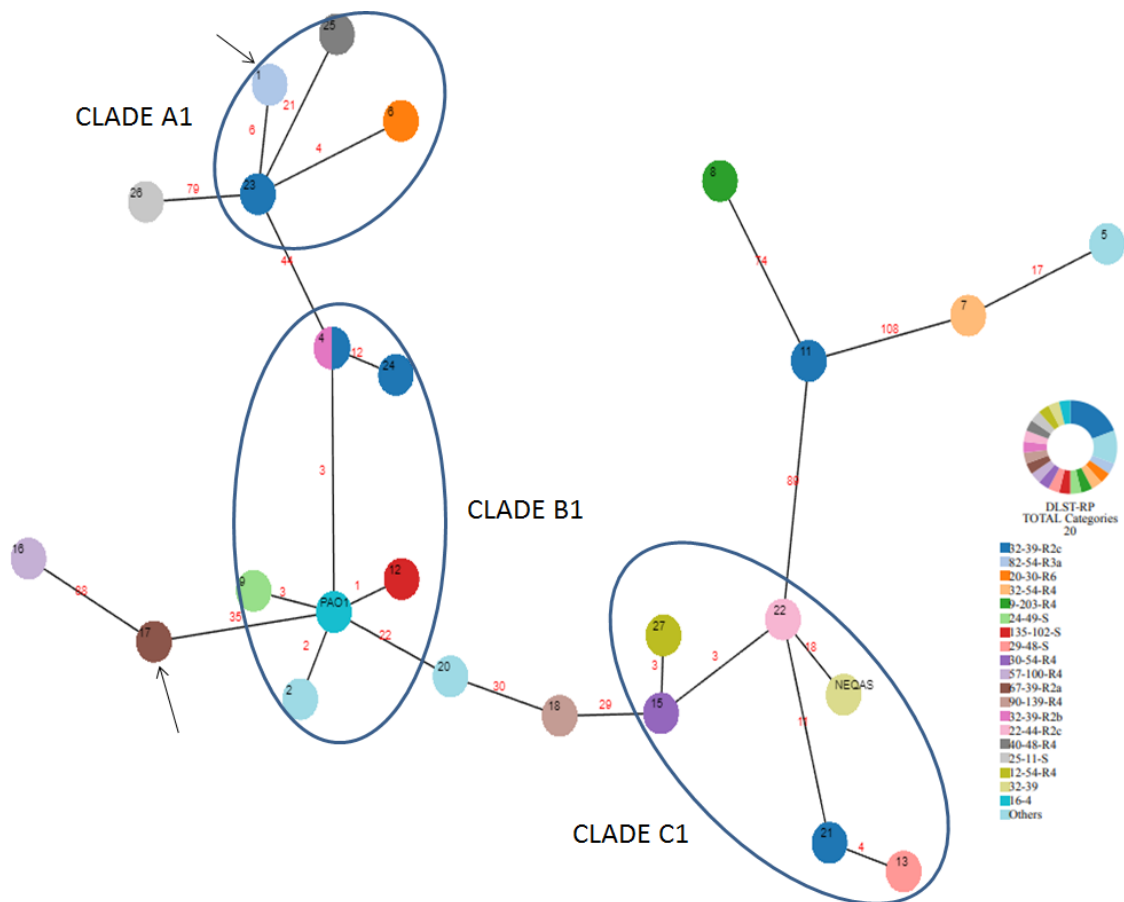
Τέλος, ο κλάδος D αποτελείται από 12 καλλιεργήματα και το δεύτερο στέλεχος αναφοράς PAO1. Σε αυτό το σύνολο των καλλιεργημάτων παρατηρήθηκαν μικρές γενετικές αποστάσεις (μικρότερος αριθμός SNPs). Τα καλλιεργήματα του κλάδου ισομοιράζονται στα 2 νοσοκομεία (6/13 από το κάθε νοσοκομείο), με τα καλλιεργήματα του νοσοκομείου N1 να έχουν όλα απομονωθεί από αιμοκαλλιέργειες, ενώ τα καλλιεργήματα του νοσοκομείου N2 απομονώθηκαν από δείγματα πτυέλων (28, 41, 59, 69), βρογχικών εκκρίσεων (54) και από καθετήρα (37) [Πίνακας I].

Τα καλλιεργήματα του κλάδου κατανέμονται σε 9 διαφορετικούς DLST τύπους, τους 6-28 (2), 1-21 (28), 135-102 (12), 4-101 (69), 24-49 (9), 8-37 (37) , 16-4 (PAO1), 32-39 (4, 19, 24, 41) και 23-22 (54, 59). Η διασπορά DLST των τύπων στους φαινότυπους αντοχής, παρουσιάζεται συνοπτικά στον πίνακα 3.7. Παρατηρείται ότι τα καλλιεργήματα ισομοιράζονται σε CARB_S (2, 9, 12, 28, 53, 69) και CARB_R (4, 19, 24, 37, 41, 59) αναφορικά με τις καρβαπενέμες που μελετήθηκαν.

Πίνακας 3.7. Κατανομή των επικρατέστερων DLST τύπων του κλάδου D στους αντίστοιχους φαινότυπους αντοχής.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΜΑ	DLST ΤΥΠΟΣ	ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΑΝΤΟΧΗΣ
2	6-28	S
9	24-49	S
12	135-102	S
28	1-21	R3a
69	4-101	R4
53	23-22	R3b
59	23-22	R1a
37	8-37	R1a
4	32-39	R2c
19	32-39	R2b
24	32-39	R2c
41	32-39	R1a

3.3.1 eBURST φυλογενετική ανάλυση νοσοκομείου N1

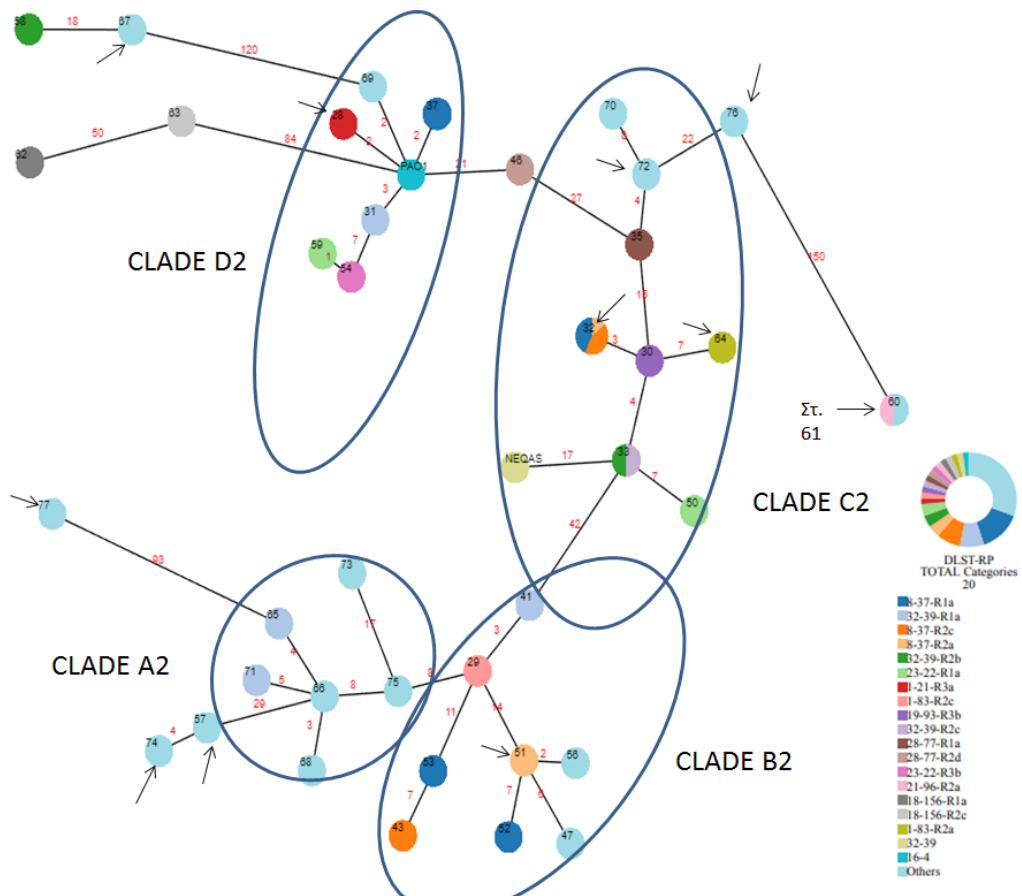


Εικόνα 3.2 : Minimum spanning φυλογενετική ανάλυση των 24 καλλιεργημάτων *P. aeruginosa* που προήλθαν από δείγματα νοσηλευόμενων ασθενών του νοσοκομείου N1 και των 2 στελεχών αναφοράς PAO1, NEQAS. Παρουσιάζεται η κατανομή των DLST τύπων στους φαινότυπους αντοχής που ανιχνεύθηκαν στο νοσοκομείο N1. Με βέλη σημειώνονται τα 2 καλλιεργήματα που ανήκουν στον φαινότυπο FEP_R-CAZ_S.

Στην περίπτωση του νοσοκομείου N1 εμφανίζονται 3 κλάδοι (A1, B1, C1), στους οποίους εντοπίζονται τα 15/26 (συμπεριλαμβανομένων των δυο στελεχών αναφοράς) καλλιεργήματα, καθώς και οι 11 από τους 19 DLST τύπους που ανιχνεύθηκαν συνολικά στο νοσοκομείο. Ο 32-39 επικρατεί με 7 καλλιεργήματα (4, 11, 19, 21, 23, 24, NEQAS), τα οποία εμφανίζονται εντός των 3 κλάδων. Οι υπόλοιποι DLST τύποι εμφανίζονται σε 1 καλλιεργήματα ο καθένας. Παρατηρήθηκαν επίσης 2 καλλιεργήματα με φαινότυπο FEP_R-CAZ_S, (1 και 17) με DLST τύπους 82-54 και 67-39 αντίστοιχα (Πίνακας Ι).

- Ο κλάδος A1 απαρτίζεται από 4 καλλιεργήματα (1, 6, 23, 25), τα οποία χαρακτηρίστηκαν ως εξής : 1 : 82-54, R3a / 6 : 20-30, R6/ 23 : 32-39, R2c/ 25 : 40-48, R4. Το καλλιεργήμα 1 χαρακτηρίστηκε επιπρόσθετα ως CARB_S / FEP_R- CAZ_S (Πίνακας Ι).
- Ο κλάδος B1 περιλαμβάνει 7 καλλιεργήματα, τα οποία κατανέμονται στους τύπους 6-28 (2), 24-49 (9), 135-102 (12), 16-4 (PAO1) και 32-39 (4, 19 και 24). Οι DLST τύποι 6-28, 24-49 και 135-102 περιέχουν ευαίσθητα καλλιεργήματα (S φαινότυπος), ενώ ο DLST τύπος 32-39 περιλαμβάνει καλλιεργήματα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες, με φαινότυπους αντοχής R2c, R2b, R2c αντίστοιχα (Πίνακας Ι).
- Ο τρίτος και τελευταίος κλάδος C1 αποτελείται από 6 καλλιεργήματα, τα οποία αντιστοιχούν στους εξής DLST τύπους και φαινότυπους αντοχής : 15 : 30-54, R4 / 27 : 12-54, R4 / 22 : 22-44, R2c/ 13 : 29-48, S/ 21 : 32-39, R2c / NEQAS : 32-39 (Πίνακας Ι).

3.3.2 eBURST φυλογενετική ανάλυση νοσοκομείου N2



Εικόνα 3.3 : Minimum spanning φυλογενετική ανάλυση των 47 καλλιεργημάτων *P. aeruginosa* που προήλθαν από δείγματα νοσηλευόμενων ασθενών του νοσοκομείου N2 και των 2 στελεχών αναφοράς PAO1, NEQAS. Παρουσιάζεται η διασπορά των DLST τύπων που ανιχνεύθηκαν στο νοσοκομείο N2, στους εκάστοτε φαινότυπους αντοχής. Με μαύρα λεπτά βέλη σημειώνονται τα καλλιεργήματα του νοσοκομείου που ανήκουν στον φαινότυπο $FEP_R\text{-}CAZ_5$.

Στο δέντρο που κατασκευάστηκε από τις αλληλουχίες των καλλιεργημάτων του νοσοκομείου N2 ξεχωρίζουν 4 διαφορετικοί κλάδοι (A2, B2, C2, D2), όπου τοποθετούνται τα 40/49 καλλιεργήματα, συμπεριλαμβανομένων των στελεχών αναφοράς PAO1, NEQAS. Επισημαίνεται πως σε αυτόν τον πληθυσμό εντοπίστηκαν όλα τα $CARB_R / EDTA (+)$

καλλιεργήματα που μελετήθηκαν, όπως και τα υπόλοιπα 11/13 καλλιεργήματα του φαινότυπου FEP_R-CAZ_S.

- Στον A2 εντοπίζονται τα καλλιεργήματα 65 και 71 με DLST τύπο 32-39 και τα καλλιεργήματα 66, 68, 73, 75 τα οποία ανήκουν στους DLST τύπους 32-52, 12-54, 28-57 και 20-30 αντίστοιχα. Τα 2 καλλιεργήματα του τύπου 32-39, καθώς και 2 από τα καλλιεργήματα που αποτελούν singletons (68 και 73), εμφάνισαν αντοχή στις καρβαπενέμες και εντάσσονται στους φαινότυπους αντοχής R1a (65, 71), R2d (68 και 73). Τα δύο καλλιεργήματα των τύπων 32-52 (66) και 20-30 (75) ανήκουν στους φαινότυπους R4 και R3b αντίστοιχα (Πίνακας I).
- Ο κλάδος B2 περιλαμβάνει 8 καλλιεργήματα, όπου τα 5/8 (41, 43, 51, 52, 53) υπάγονται στους 2 επικρατέστερους DLST τύπους, τους 8-37 (41, 43, 52, 53) και 32-39 (51). Τα καλλιεργήματα του τύπου 8-37 εμφάνισαν φαινότυπους αντοχής R1a (41, 52, 53) και R2c (43), ενώ το καλλιεργήμα 51 του τύπου 32-39 χαρακτηρίστηκε ως R2a και ανήκει στην ομάδα των CARB_R / FEP_R - CAZ_S. Τα υπόλοιπα 3 καλλιεργήματα του κλάδου περιγράφηκαν ως εξής : 29 : 1-83, R2c / 47 : 17-14, R2c / 56 : 116-144, R2b (Πίνακας I). Όσον αφορά τον τύπο δείγματος των καλλιεργημάτων, τα 3/8 (41, 47, 56) εντοπίστηκαν σε δείγματα πτυέλων, τα 2/8 σε βρογχικές εκκρίσεις (29, 52) ή αιμοκαλλιέργειες (43, 51) και ένα καλλιεργήμα (53) σε καθετήρα.
- Ο κλάδος C2 είναι ο πολυπληθέστερος καθώς αποτελείται από 17 καλλιεργήματα, συμπεριλαμβανομένου του πρότυπου στελέχους NEQAS. Τα 8/17 έχουν απομονωθεί από δείγματα πτυέλων (32, 33, 35, 38, 48, 50, 70, 72), τα 4 από δείγματα βρογχικών εκκρίσεων (30, 39, 40, 49) και 4 από ποικιλία δειγμάτων, όπως δείγμα ούρων (36), αίματος (44), καθετήρα (45) και από δείγμα πύου (64) (Πίνακας I).

Τα καλλιεργήματα του κλάδου C2 κατανέμονται σε 8 διαφορετικούς DLST τύπους, με 2 από αυτούς να είναι οι επικρατείς 8-37 και 32-39, στους οποίους κατανέμονται τα 11/17 καλλιεργήματα. Η συνολική κατανομή για τον κλάδο έχει ως εξής : 1-83 (64), 23-22 (50), 19-93 (30), 28-77 (35), 28-217 (70), 28-25 (72), 8-37 (32, 36, 38, 39, 40, 44, 45, 49) και 32-39 (33, 48 και NEQAS) (Πίνακας I).

Η συσχέτιση των 2 επικρατών τύπων και των φαινοτύπων αντοχής παρουσιάζεται στον πίνακα 3.8. Στον πίνακα δεν συμπεριλαμβάνεται το πρότυπο στέλεχος NEQAS, που ανήκει στον τύπο 32-39.

Πίνακας 3.8. Κατανομή των επικρατέστερων DLST τύπων του κλάδου C2 στους αντίστοιχους φαινότυπους αντοχής.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΜΑ	DLST ΤΥΠΟΣ	ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΑΝΤΟΧΗΣ
32	8-37	R2a
36	8-37	R2c
38	8-37	R1a
39	8-37	R2c
40	8-37	R1a
44	8-37	R1a
45	8-37	R2c
49	8-37	R1a
33	32-39	R2c
48	32-39	R2b

Για τα καλλιεργήματα του κλάδου C2 που ανήκουν σε DLST τύπους εκτός των επικρατών, η κατανομή έχει ως εξής : 64 : 1-83, R2a / 50 : 23-22, R1a / 35 : 28-77, R1a / 30 : 19-93, R3b / 70 : 28-217, R3b / 72 : 28-25, R5. Φαίνεται ότι τα καλλιεργήματα των μη επικρατών DLST τύπων ισομοιράζονται σε CARB_R (35, 50, 64) και CARB_S (30, 70, 76). Τέλος, σε αυτόν τον κλάδο εντοπίζονται και τα 2 CARB_R FEP_R-CAZ_S (32, 64).

Ο τέταρτος και τελευταίος εμφανής κλάδος D2, απαρτίζεται από 6 καλλιεργήματα της συλλογής και το στέλεχος αναφοράς PAO1, τα οποία μοιράζονται σε 6 διαφορετικούς τύπους, τους 1-21 (28), 4-101 (69), 16-4 (PAO1), 8-37 (37), 32-39 (31), 23-22 (54, 59). Τα καλλιεργήματα των τύπων 1-21, 4-101 και 23-22 (54), χαρακτηρίζονται ως ευαίσθητα στις καρβαπενέμες και ανήκουν στους φαινότυπους R3a, R4 και R3b, παρουσιάζοντας ποικίλες αντοχές στα β-λακταμικά, όπως το καλλιεργήμα 28 του τύπου 1-21 που χαρακτηρίστηκε και ως FER_R-CAZ_S. Τα καλλιεργήματα των υπολοίπων DLST τύπων είναι ανθεκτικά στις καρβαπενέμες και χαρακτηρίζονται ως R1a.

3.4 Ανάλυση επιδημιολογικών δεδομένων με τη χρήση του προγράμματος IBM SPSS Statistics

3.4.1 Περιγραφή του συνολικού δείγματος

Δημογραφικά στοιχεία

Συνολικά, 71 *P.aeruginosa* καλλιεργήματα απομονώθηκαν από καλλιέργειες δειγμάτων 47 (66,2%) νοσηλευόμενων ασθενών του νοσοκομείου N2 και 24 (33,8%) νοσηλευόμενων ασθενών του νοσοκομείου N1. Οι 40 από τους ασθενείς ήταν άνδρες (56,3%) και οι 29 ήταν γυναίκες (40,8%). Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν $69,54 \pm 16,88$ έτη.

Στοιχεία νοσηλείας

Τα υπό μελέτη *P. aeruginosa* καλλιεργήματα απομονώθηκαν από αιμοκαλλιέργειες (24/71, 33,8%), καλλιέργειες πτυέλων (23/71, 32,4%), βρογχικών εκκρίσεων (12/71, 16,9%), κεντρικού φλεβικού καθετήρα (3/71, 4,2%), ούρων (2/71, 2,8%) και πύου (1/71, 1,4%). Όσον αφορά την εστία απομόνωσης, 52,1% των καλλιεργημάτων (37/71) απομονώθηκαν από τον πνεύμονα, 38% (27/71) από το αίμα, 7% (5/71) από το ουροποιητικό και 2,8% (2/71) από το γαστρεντερικό. Με βάση τα διαθέσιμα στοιχεία για την ημερομηνία απομόνωσης σε σχέση με την ημερομηνία εισαγωγής ή το ιστορικό πρόσφατης νοσηλείας σε άλλο ίδρυμα παροχής υπηρεσιών υγείας, 16 περιστατικά (22,5%) θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως HAI και 19 (26,8%) ως HCAI στον συνολικό πληθυσμό, ενώ 36 εκ των περιπτώσεων (50,7%) δεν κατηγοριοποιούνται λόγω έλλειψης δεδομένων. Επίσης, καμία από τις περιπτώσεις δεν κατηγοριοποιήθηκε ως CAI, καθώς κανένας ασθενής δεν συνδέθηκε με αυτόν τον τύπο λοίμωξης. Συνολικά, 53 εκ των ασθενών από τους οποίους απομονώθηκαν τα καλλιεργήματα της μελέτης επιβίωσαν (74,7%), 5 ασθενείς (7%) κατέληξαν, ενώ η έκβαση δεν ήταν γνωστή σε 12 από τους ασθενείς (18,3%).

Ιστορικό

46/71 ασθενείς (64,8%) είχαν ιστορικό νοσηλείας και λήψης αντιβιοτικών τους προηγούμενους 6 μήνες από την απομόνωση των στελεχών, ενώ για 24 από τους συνολικούς ασθενείς (33,8%) δεν ήταν διαθέσιμα τα σχετικά δεδομένα. Μόνο μία

περίπτωση ασθενούς (1,4%) δεν σχετίστηκε με προηγούμενη νοσηλεία ή λήψη αντιβιοτικών έως και 6 μήνες πριν την απομόνωση του στελέχους *P. aeruginosa*.

3.4.2 Νοσοκομείο N2

Δημογραφικά στοιχεία

Στο νοσοκομείο N2, η μέση ηλικία των ασθενών ήταν $71,56 \pm 15,47$ έτη, ενώ άνδρες ήταν οι 28 από τους 47 ασθενείς (59,6%) και γυναίκες οι 17 (36,2%).

Στοιχεία νοσηλείας

Τα *P. aeruginosa* καλλιεργήματα που απομονώθηκαν από ασθενείς του νοσοκομείου N2 προέρχονται από καλλιέργειες πτυέλων (23/47, 48,9%), βρογχικών εκκρίσεων (12/47, 25,5%), αιμοκαλλιέργειες (3/47, 6,4%), καλλιέργειες κεντρικού φλεβικού καθετήρα (3/47, 6,4%), ούρων (2/47, 4,3%), washing (2/47, 4,3%), πύου (1/47, 1,4%) και αποστήματος (1/47, 1,4%). Όσον αφορά την εστία απομόνωσης, 78,7% (37/47) των καλλιεργημάτων απομονώθηκαν από τον πνεύμονα, 10,6% (5/47) από το ουροποιητικό, 6,4% (3/47) από αίμα και 4,3% (2/47) από το γαστρεντερικό. Με βάση τα διαθέσιμα στοιχεία των ερωτηματολογίων για την ημερομηνία απομόνωσης σε σχέση με την ημερομηνία εισαγωγής ή το ιστορικό πρόσφατης νοσηλείας σε άλλο ίδρυμα παροχής υπηρεσιών υγείας, 16 από τις 47 περιπτώσεις (34%) θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως HAI και 19/47 (40,4%) ως HCAI στον συνολικό πληθυσμό, ενώ 12 από το σύνολο των περιπτώσεων του νοσοκομείου N2 (25,5%) δεν κατέστη δυνατό να κατηγοριοποιηθούν λόγω έλλειψης δεδομένων. Συνολικά, 40 εκ των ασθενών του νοσοκομείου N2 από τους οποίους απομονώθηκαν τα καλλιεργήματα της μελέτης επιβίωσαν (85,1%), 5 ασθενείς (10,6%) κατέληξαν ενώ η έκβαση δεν είναι γνωστή για 2 από τους ασθενείς (4,3%).

Οι 26/47 (55,3%) ασθενείς ήταν νοσηλευόμενοι σε πνευμονολογικές κλινικές. Σε ΜΕΘ νοσηλεύτηκε κάποια στιγμή κατά τη διάρκεια της νοσηλείας του το 27,7% των ασθενών, δηλαδή οι 13 από αυτούς. Μετακινήσεις ασθενών μεταξύ διαφορετικών κλινικών καταγράφηκαν σε 33/47 περιπτώσεις (70,2%). Η μέση διάρκεια νοσηλείας των ασθενών στο

νοσοκομείο N2 μέχρι την απομόνωση των στελεχών βρέθηκε να είναι $18,72 \pm 27,98$ ημέρες, ενώ η συνολική μέση διάρκεια νοσηλείας ήταν $62,43 \pm 37,11$ ημέρες.

Ιστορικό

46/47 ασθενείς (97,9%) είχαν νοσηλευτεί τους τελευταίους 6 μήνες πριν την απομόνωση, είχαν λάβει αντιβιοτικά και δεν είχαν πραγματοποιήσει κάποιο ταξίδι στο ίδιο χρονικό διάστημα. Κατά φθίνουσα σειρά συχνότητας, καταγράφηκαν τα ακόλουθα υποκείμενα χρόνια νοσήματα στους ασθενείς από τους οποίους απομονώθηκαν τα υπό μελέτη καλλιεργήματα: Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) (87,2%), αρτηριακή υπέρταση (19%), καρδιακή νόσος (19%), σακχαρώδης διαβήτης (15%), κακοήθειες (8,5%), άλλο (15%).

3.4.3 Νοσοκομείο N1

Δημογραφικά στοιχεία

Στο νοσοκομείο N1, η εικόνα του δείγματος διαφέρει σε κάποιες κατηγορίες σε σχέση με το νοσοκομείο N2. Η μέση ηλικία των ασθενών εμφανίζεται λίγο μικρότερη, στα $65,41 \pm 19,18$ έτη, ενώ οι 24 ασθενείς από το νοσοκομείο μοιράζονται σε 12 άνδρες και 12 γυναίκες.

Στοιχεία νοσηλείας

Το είδος του δείγματος είναι αποκλειστικά αιμοκαλλιέργεια στην περίπτωση του νοσοκομείου N1. Τα δεδομένα των ερωτηματολογίων δεν επαρκούσαν για τον υπολογισμό των ποσοστών ύπαρξης HAI και HCAI στον πληθυσμό, όπως έγινε με το νοσοκομείο N2. Όσον αφορά την έκβαση της νοσηλείας, το επιβεβαιωμένο ποσοστό επιβίωσης των ασθενών του νοσοκομείου N1 είναι 54,2% (13/24), με τους υπόλοιπους ασθενείς να μην κατατάσσονται κάπου, λόγω έλλειψης των απαραίτητων για την κατηγοριοποίησή τους δεδομένων.

Οι συνηθέστερες μονάδες νοσηλείας, είτε αρχικά είτε μεταγενέστερα μέσω μετακινήσεων του εκάστοτε ασθενούς, ήταν οι ΜΕΘ (33,3%), οι παθολογικές μονάδες (25%) και η Ορθοπαιδική μονάδα (20,8%). Μετακινήσεις εντός κλινικών καταγράφηκαν σε τουλάχιστον 9 από τους 24 ασθενείς (37,5%). Τέλος, σε αυτό το νοσοκομείο, η μέση διάρκεια νοσηλείας των ασθενών μέχρι την απομόνωση των στελεχών βρέθηκε $19,40 \pm 21,53$ ημέρες, ενώ η συνολική μέση διάρκεια νοσηλείας ήταν $35,92 \pm 32,20$ ημέρες.

Ιστορικό

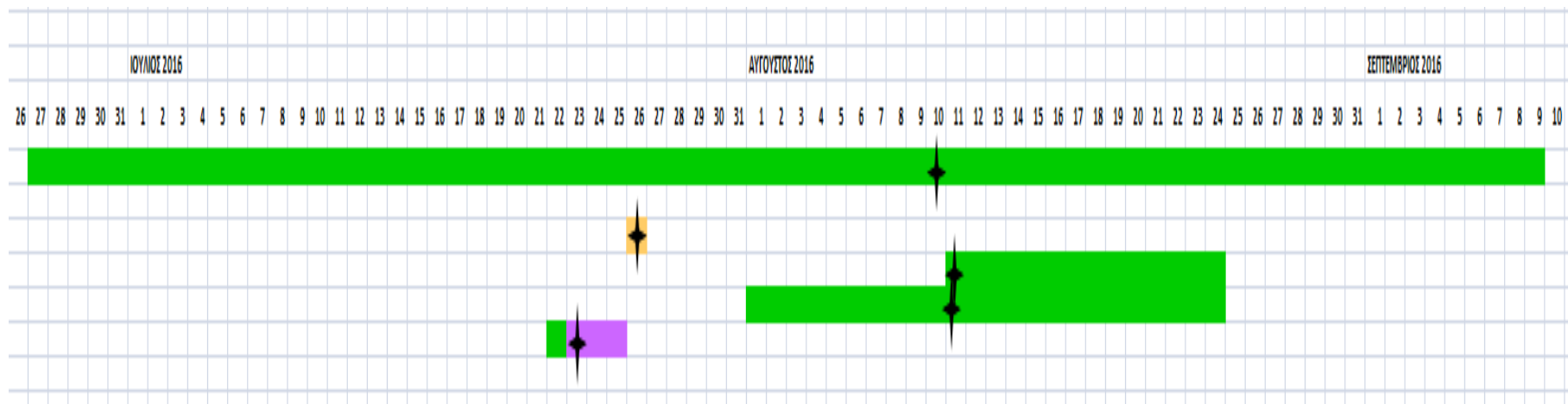
Από τα ερωτηματολόγια που αφορούσαν τους ασθενείς του νοσοκομείου N1 δεν κατέστη εφικτό να αντληθούν οι απαραίτητες πληροφορίες σχετικά με ενδεχόμενη προηγούμενη νοσηλεία στο ίδιο ή σε διαφορετικό ίδρυμα, με τη λήψη αντιβιοτικών ή με κάποιο υποκείμενο νόσημα που είναι πιθανό να είχαν οι ασθενείς.

3.5 Χαρτογράφηση των DLST τύπων στον χώρο και τον χρόνο (spotmapping)

Σύμφωνα με τα κριτήρια που τέθηκαν στην παράγραφο «Στατιστική και επιδημιολογική ανάλυση» των Υλικών και Μεθόδων, για την χαρτογράφηση χρησιμοποιήθηκαν οι DLST τύποι που εμφανίστηκαν τουλάχιστον σε δύο περιπτώσεις σε καλλιεργήματα που απομονώθηκαν από το ίδιο νοσοκομείο. Έτσι, για το νοσοκομείο N1 ερευνήθηκε μόνο ο τύπος 32-39, που απαριθμούσε 6 καλλιεργήματα, ενώ στο νοσοκομείο N2 ερευνήθηκαν οι τύποι 8-37 (13 καλλιεργήματα), 32-39 (7 καλλιεργήματα), 23-22 (3 καλλιεργήματα) και οι 1-83, 18-156, 28-77 (2 καλλιεργήματα έκαστος). Κατά τη διαδικασία αυτή αποτυπώθηκαν τα δεδομένα σχετικά με την ημέρα απομόνωσης του κάθε τύπου, την περίοδο και την κλινική νοσηλείας του κάθε ασθενούς, αλλά και με πιθανές μετακινήσεις μεταξύ διαφορετικών μονάδων εντός του ίδιου νοσοκομείου.

3.5.1 Νοσοκομείο N1

Παρατηρώντας τη χαρτογράφηση για το νοσοκομείο N1, η πρώτη απομόνωση του τύπου 32-39 έλαβε χώρα στις 02/06/2016, από ασθενή της ΜΕΘ, για τον οποίο δεν υπάρχουν περισσότερα δεδομένα. Στις 23/07/2016, ο εν λόγω τύπος απομονώθηκε ξανά σε ασθενή της ΜΕΘ, ο οποίος είχε εισαχθεί στο νοσοκομείο στις 22/07/2016 στην Ορθοπεδική μονάδα. Ο DLST τύπος 32-39 απομονώθηκε πάλι στις 26/07/2016 από ασθενή της Μονάδας Περιτοναϊκής Κάθαρσης (δεν υπάρχουν άλλα δεδομένα για τον συγκεκριμένο ασθενή), και εν συνεχεία από τρεις ασθενείς της Ορθοπεδικής μονάδας στις 10 και στις 11/08/2016. Τα δεδομένα που έχουν συλλεχθεί δείχνουν πως, τουλάχιστον στις 2 από τις 3 αυτές περιπτώσεις, οι ασθενείς νοσηλεύονταν ήδη πολλές ημέρες στη συγκεκριμένη μονάδα.



Εικόνα 3.4. Χαρτογράφηση του τύπου 32-39 στο νοσοκομείο N1. Οι εκάστοτε μονάδες αντιστοιχούν στον εξής χρωματικό κώδικα : Μονάδα Εντατικής Θεραπείας = μοβ / Μονάδα Περιτοναϊκής Κάθαρσης = πορτοκαλί / Ορθοπεδική μονάδα = πράσινο. Ο DLST-τύπος σημειώνεται με ένα σχήμα (σταυρό στην συγκεκριμένη περίπτωση), το οποίο αποτυπώνεται πάνω στο φύλλο σύμφωνα με την ημερομηνία απομόνωσης του συγκεκριμένου τύπου.

3.5.2 Νοσοκομείο N2

Στην περίπτωση του νοσοκομείου N2, η αντίστοιχη ανάλυση θα γίνει για τον κάθε τύπο ξεχωριστά, κατά σειρά συχνότητας.

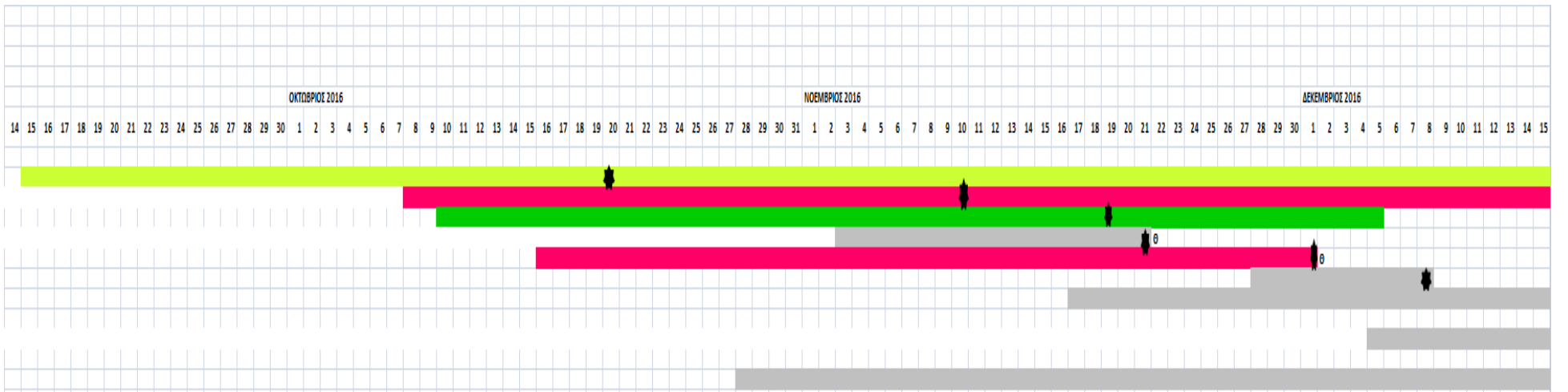
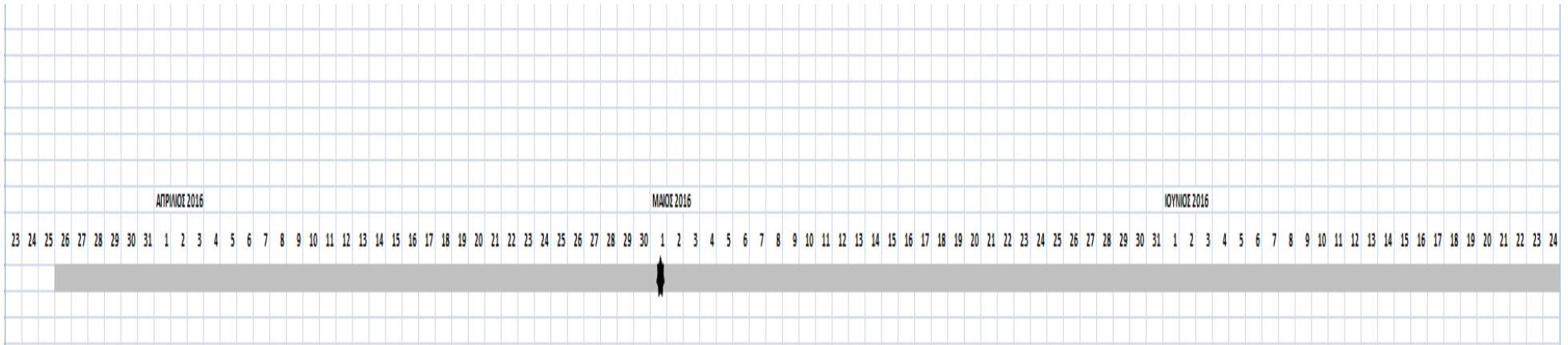
8-37

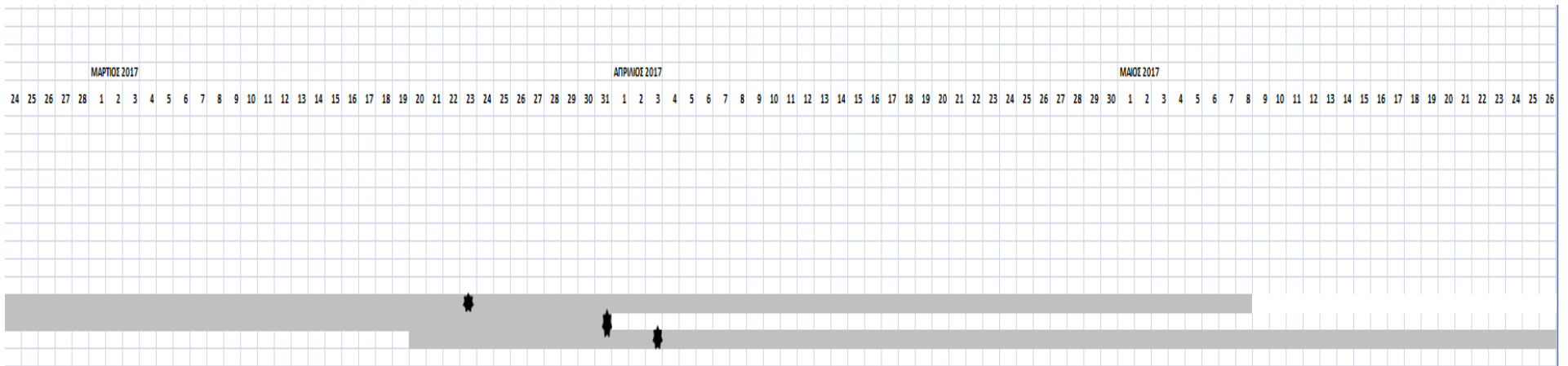
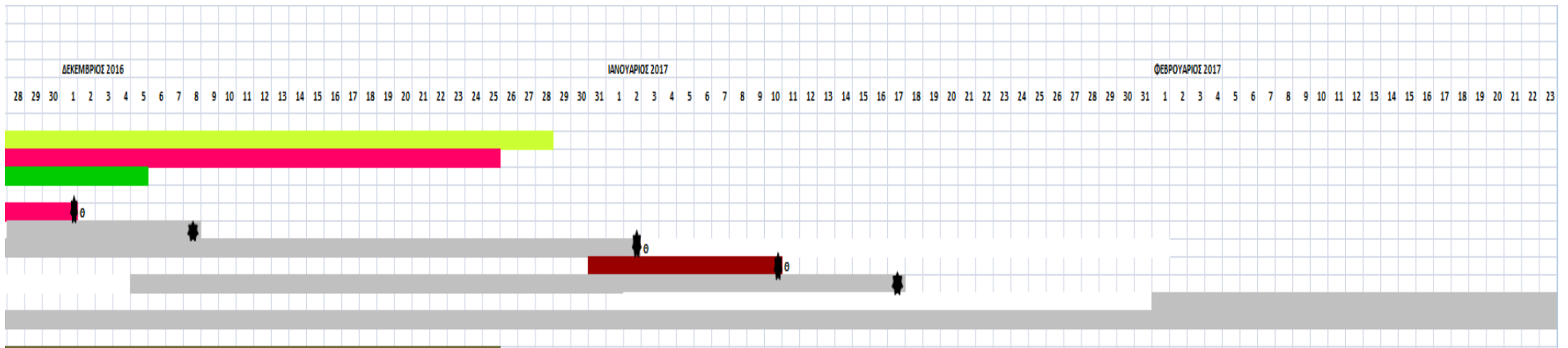
Ο DLST τύπος 8-37 απομονώθηκε για πρώτη φορά την 01/05/2016 από ασθενή νοσηλευόμενο στην 4η Πνευμονολογική μονάδα του νοσοκομείου. Από τα συλλεγόμενα δεδομένα δεν συνάγεται επιδημιολογική συσχέτιση μεταξύ αυτού του ασθενούς και του επόμενου, από τον οποίο απομονώθηκε ο συγκεκριμένος DLST τύπος στις 20/10/2016. Ο λόγος είναι ότι ο δεύτερος ασθενής νοσηλευόταν ήδη για 35 ημέρες στην 5η Πνευμονολογική Μονάδα πριν την απομόνωση. Αντίθετα, οι επόμενοι ασθενείς, από τους οποίους απομονώθηκε *P. aeruginosa* με DLST 8-37, είχαν νοσηλευθεί στη ΜΕΘ το διάστημα από Νοέμβριο 2016 έως Ιανουάριο 2017 (8 ασθενείς) και το διάστημα από 23 Μαρτίου 2017 έως και 3 Απριλίου 2017 (3 ασθενείς). Συνολικά η διασπορά του τύπου στον χώρο και τον χρόνο ακολουθεί στον πίνακα 3.9, ενώ η οπτική αποτύπωση παρουσιάζεται στις εικόνες 3.5.1 – 3.5.4.

Πίνακας 3.9. Καταγραφή των επιδημιολογικών δεδομένων για την χαρτογράφηση του τύπου 8-37 στο νοσοκομείο Ν2. Συνδυάζονται οι ημερομηνίες εισόδου, εξόδου και απομόνωσης για κάθε καλλιέργημα με τις μονάδες νοσηλείας και ακολουθεί σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των στελεχών, προκειμένου να εντοπιστεί τυχόν επιδημιολογική συσχέτιση.

ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΟΥ DLST ΤΥΠΟΥ 8-37 ΣΤΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ Ν2				
ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΜΑΤΟΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΙΣΟΔΟΥ	ΜΟΝΑΔΑ ΝΟΣΗΛΕΙΑΣ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΟΥ DLST ΤΥΠΟΥ 8-37	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΟΔΟΥ
53	26/03/2016	4 ^η ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ (ενδιάμεση μετακίνηση σε ΜΕΘ/ΚΑΑ)	01/05/2016	29/06/2016
32	15/09/2016	5 ^η ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ	20/10/2016	28/12/2016
36	08/10/2016	ΜΕΘ/ΚΑΑ	10/11/2016	25/12/2016
37	10/10/2016	4 ^η ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ	19/11/2016	05/12/2016
38	03/11/2016	2 ^η ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ (ενδιάμεση μετακίνηση σε ΜΕΘ)	21/11/2016	ΘΑΝΑΤΟΣ
39	16/10/2016	ΜΕΘ/ΚΑΑ	01/12/2016	ΘΑΝΑΤΟΣ
40	28/11/2016	ΜΕΘ/ΚΑΑ (ενδιάμεση μετακίνηση σε ΜΑΦ)	08/12/2016	-

43	17/11/2016	ΜΑΦ/ΚΑΑ (ενδιάμεση μετακίνηση σε ΜΕΘ/ΚΑΑ)	02/01/2017	ΘΑΝΑΤΟΣ
44	31/12/2016	ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ	10/01/2017	ΘΑΝΑΤΟΣ
45	05/12/2016	4 ^η ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ (εσωτερική μετακίνηση σε ΜΕΘ/ΚΑΑ)	17/01/2017	-
49	01/02/2017	ΜΕΘ/ΚΑΑ (εσωτερική μετακίνηση σε ΜΑΦ/ΚΑΑ)	23/03/2017	08/05/2017
51	28/10/2016	ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ (εσωτερική μετακίνηση σε ΜΕΘ)	31/03/2017	ΘΑΝΑΤΟΣ
52	20/03/2017	ΜΕΘ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ (εσωτερική μετακίνηση σε ΘΩΡΑΚΟΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ)	03/04/2017	15/07/2017





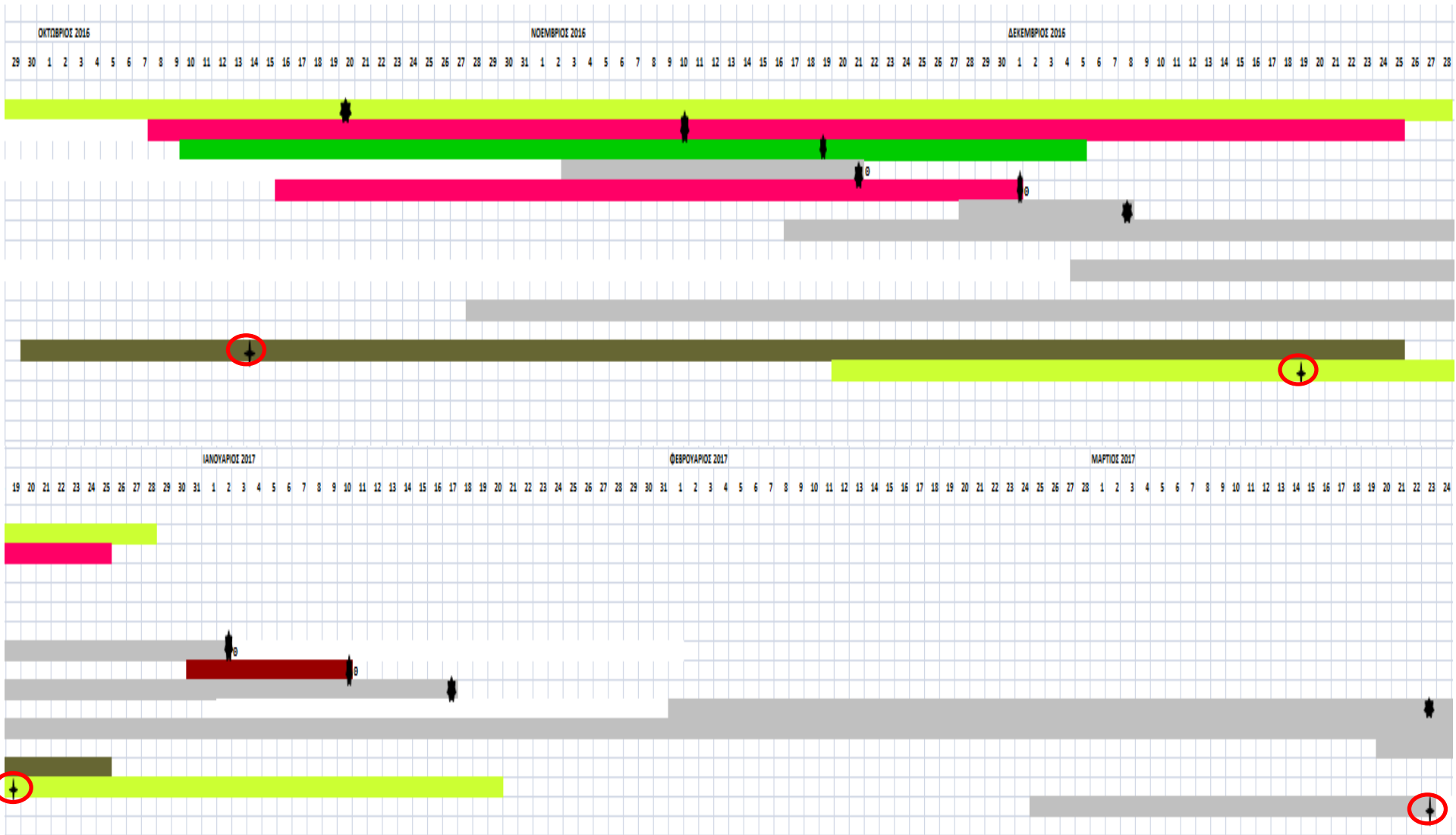
Εικόνες 3.5.1 – 3.5.4. Χαρτογράφηση του τύπου 8-37 στο νοσοκομείο Ν2. Οι εκάστοτε μονάδες αντιστοιχούν στον εξής χρωματικό κώδικα : 5^η Πνευμονολογική μονάδα = ανοιχτό πράσινο / ΜΕΘ-ΚΑΑ = ροζ / 4^η Πνευμονολογική μονάδα = σκούρο πράσινο / Παθολογική μονάδα = σκούρο κόκκινο. Με το γκρι χρώμα συμβολίζεται μετακίνηση μεταξύ κλινικών, για την οποία όμως δεν δίνονταν ακριβείς πληροφορίες. Με «Θ» συμβολίζεται η κατάληξη του ασθενούς, ενώ η απομόνωση του τύπου σημειώνεται με αστέρι στην αντίστοιχη ημερομηνία.

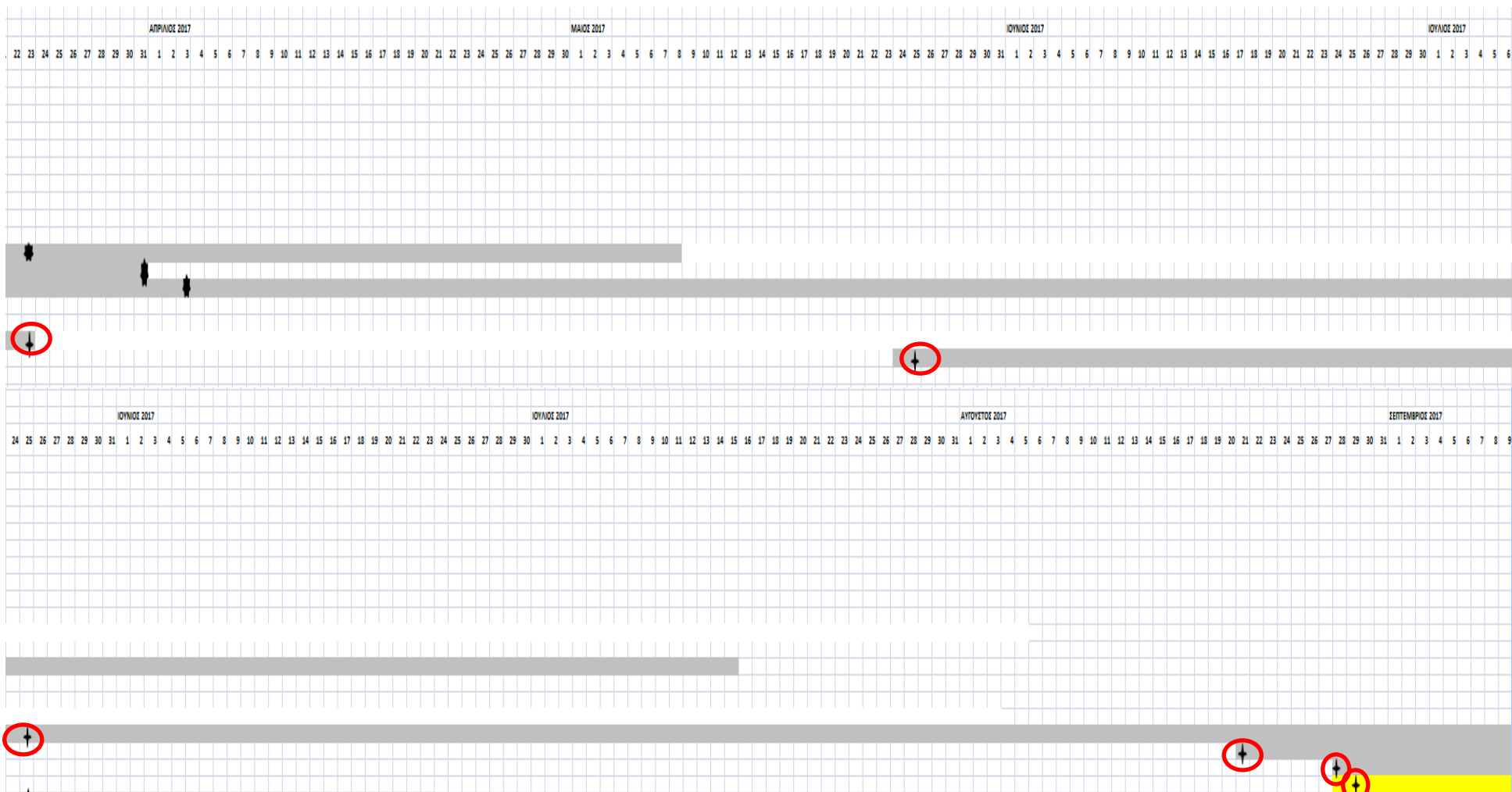
32-39

Ο DLST τύπος 32-39 απομονώθηκε πρώτη φορά στις 14/10/2016 από ασθενή που νοσηλευόταν στην Παθολογική μονάδα. Μετά την πρώτη απομόνωση αυτού του τύπου, ακολούθησαν άλλες 3 απομονώσεις. Όλοι αυτοί οι ασθενείς δεν ήταν δυνατόν να συσχετιστούν επιδημιολογικά, καθώς τα χρονικά διαστήματα που μεσολαβούν από τη μία απομόνωση ως την επόμενη είναι μεγάλα (19/12/2016 – 23/03/2017 – 25/05/2017 οι ημερομηνίες των απομονώσεων με χρονολογική σειρά). Αντιθέτως, οι 3 ασθενείς από τους οποίους προήλθαν οι τελευταίες 3 απομονώσεις του DLST τύπου συμπίπτουν πολύ περισσότερο μεταξύ τους σε σχέση με τις προηγούμενες, καθώς λαμβάνουν χώρα μεταξύ 21/08/2017 και 29/08/2017. Παρ' όλα αυτά, οι ημερομηνίες των αντίστοιχων απομονώσεων ταυτίζονται και στις 3 αυτές περιπτώσεις με την εισαγωγή των ασθενών στο νοσοκομείο. Συνολικά η διασπορά του τύπου στον χώρο και τον χρόνο ακολουθεί στον πίνακα 3.10, ενώ η οπτική του αποτύπωση παρουσιάζεται στις εικόνες 3.6.1 – 3.6.4.

Πίνακας 3.10. Καταγραφή των απαραίτητων στοιχείων για την χαρτογράφηση του τύπου 32-39 στο νοσοκομείο Ν2.

ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΟΥ DLST ΤΥΠΟΥ 32-39 ΣΤΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ Ν2				
ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΜΑΤΟΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΙΣΟΔΟΥ	ΜΟΝΑΔΑ ΝΟΣΗΛΕΙΑΣ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΟΥ DLST ΤΥΠΟΥ 32-39	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΟΔΟΥ
33	30/09/2016	ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ	14/10/2016	25/12/2016
41	20/11/2016	5 ^η ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ	19/12/2016	20/01/2017
48	25/02/2017	4 ^η ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ (εσωτερική μετακίνηση σε ΜΑΦ και ΜΕΘ)	23/03/2017	-
31	24/05/2017	ΜΑΦ/ΚΑΑ	25/05/2017	12/10/2017
58	21/8/2017	ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ (εσωτερική μετακίνηση σε ΤΕΠ)	21/08/2017	20/09/2017
65	28/08/2017	ΤΕΠ (εσωτερική μετακίνηση σε ΜΑΦ)	28/08/2017	25/09/2017
71	28/08/2017	10 ^η ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ	29/08/2017	10/10/2017

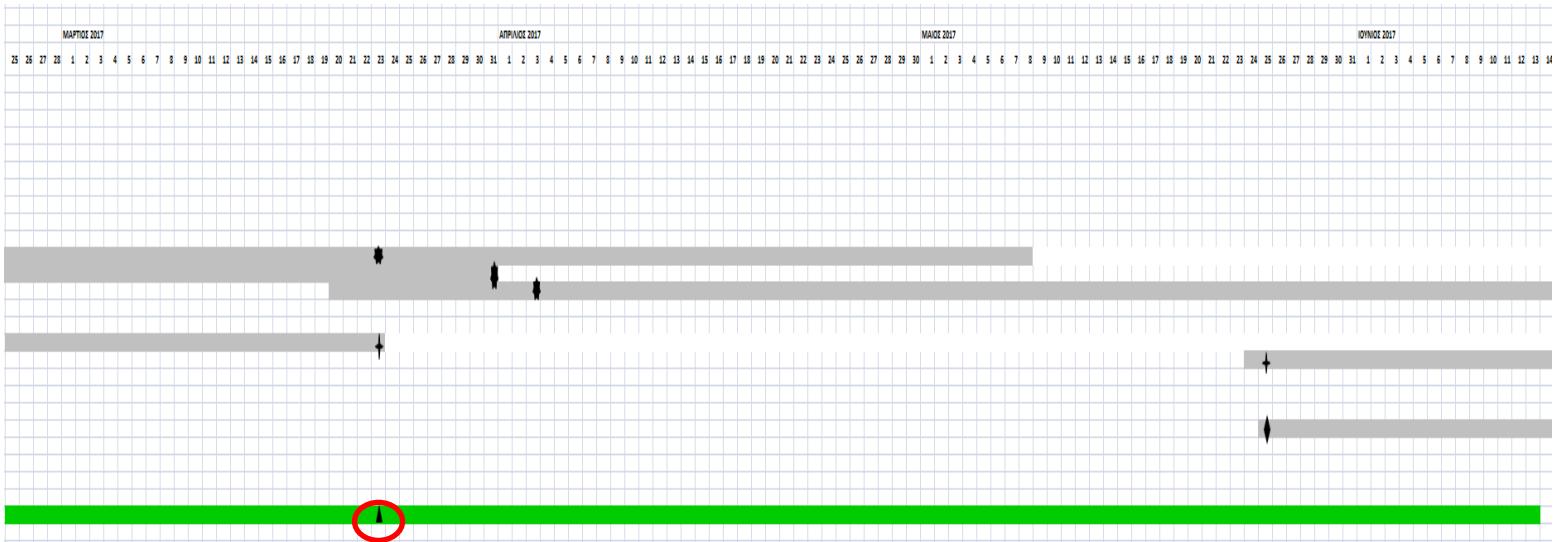
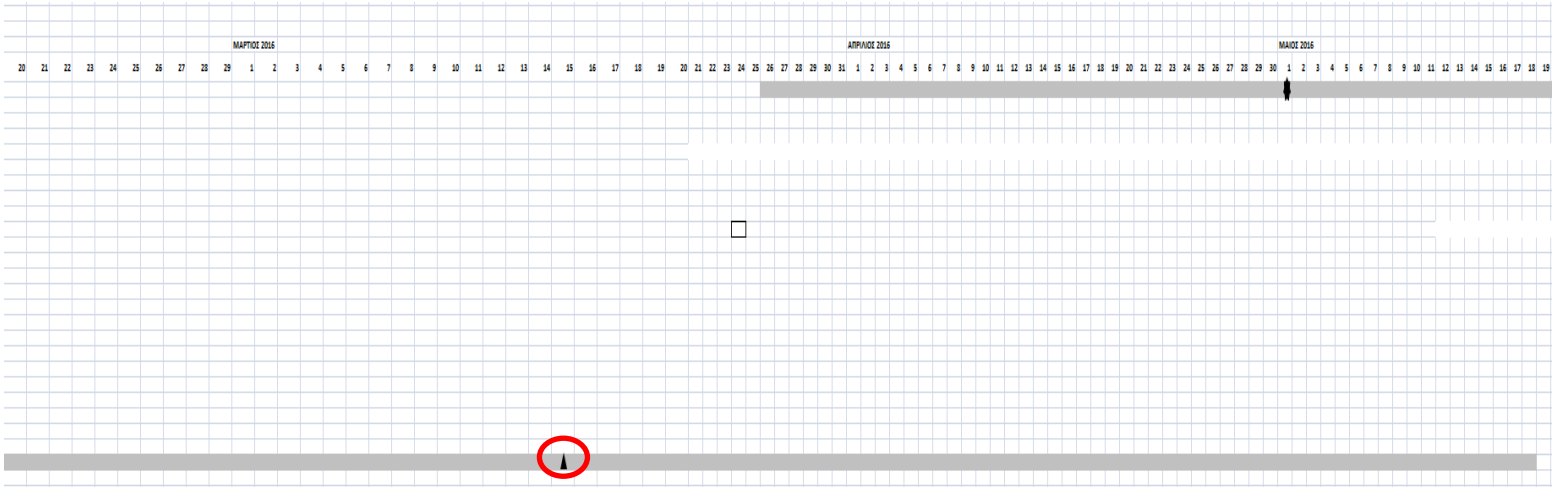


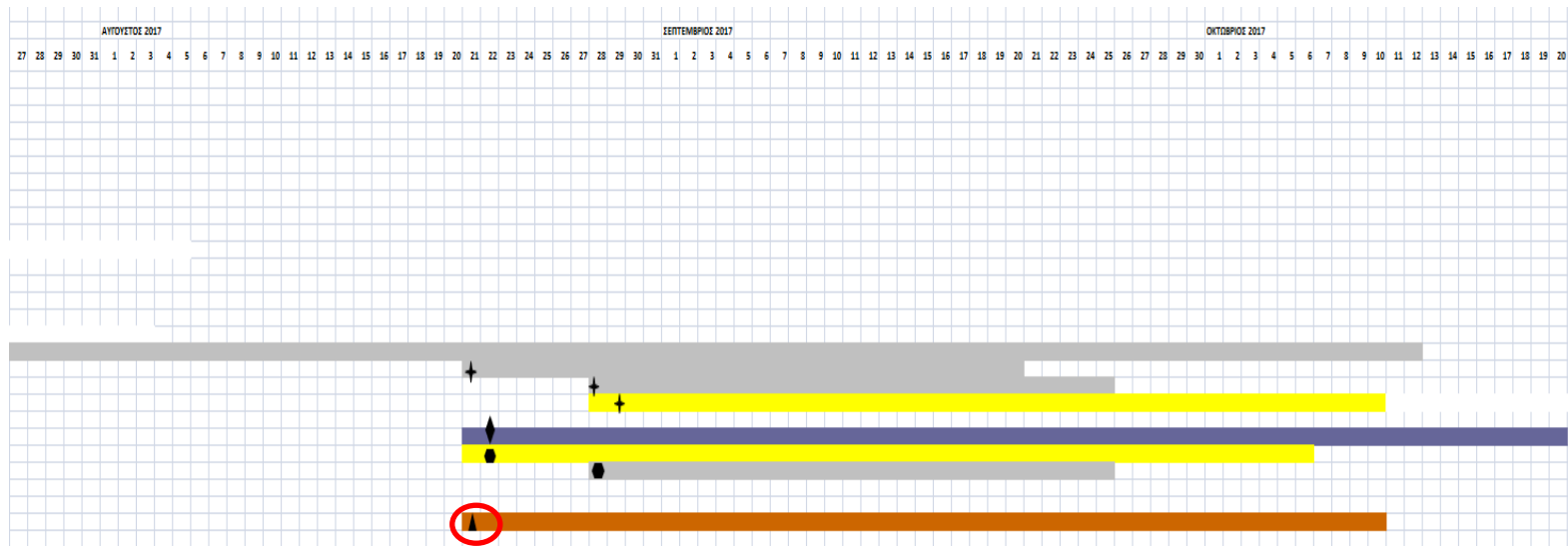


Εικόνες 3.6.1 – 3.6.4. Χαρτογράφηση του τύπου 32-39 στο νοσοκομείο Ν2. Ο χρωματικός κώδικας για τις μονάδες νοσηλείας ορίζεται ως εξής : Πανεπιστημιακή Παθολογική = λαδί / 5^η Πνευμονολογική μονάδα = ανοιχτό πράσινο / 10^η Πνευμονολογική μονάδα = κίτρινο. Με το γκρι χρώμα συμβολίζονται οι μετακινήσεις μεταξύ κλινικών, για τις οποίες δεν ήταν επαρκείς οι πληροφορίες. Η απομόνωση του τύπου σημειώνεται με σταυρό εντός κόκκινου κύκλου στην αντίστοιχη ημερομηνία.

23-22

Ο τύπος 23-22 εμφανίστηκε αρχικά σε ασθενή στις 15/03/2016, ο οποίος είχε μετακινηθεί από την 4^η Πνευμονολογική μονάδα στη ΜΕΘ της Πανεπιστημιακής Παθολογικής κατά την διάρκεια της νοσηλείας του (20/02/2016 – 18/05/2016). Οι άλλες 2 απομονώσεις έγιναν στις 23/03/2017 και στις 21/08/2017 από ασθενείς της 4^{ης} και 6^{ης} Πνευμονολογικής μονάδας αντιστοίχως. Αξίζει να σημειωθεί πως στην πρώτη από αυτές τις 2 περιπτώσεις, ο ασθενής νοσηλευόταν στην ίδια μονάδα από τις 25/02/2017, ενώ στη δεύτερη περίπτωση η απομόνωση πραγματοποιήθηκε την ίδια ημέρα με την εισαγωγή του συγκεκριμένου ασθενούς στο νοσοκομείο. Η οπτική αποτύπωση του DLST τύπου ακολουθεί στις εικόνες 3.7.1 – 3.7.3.

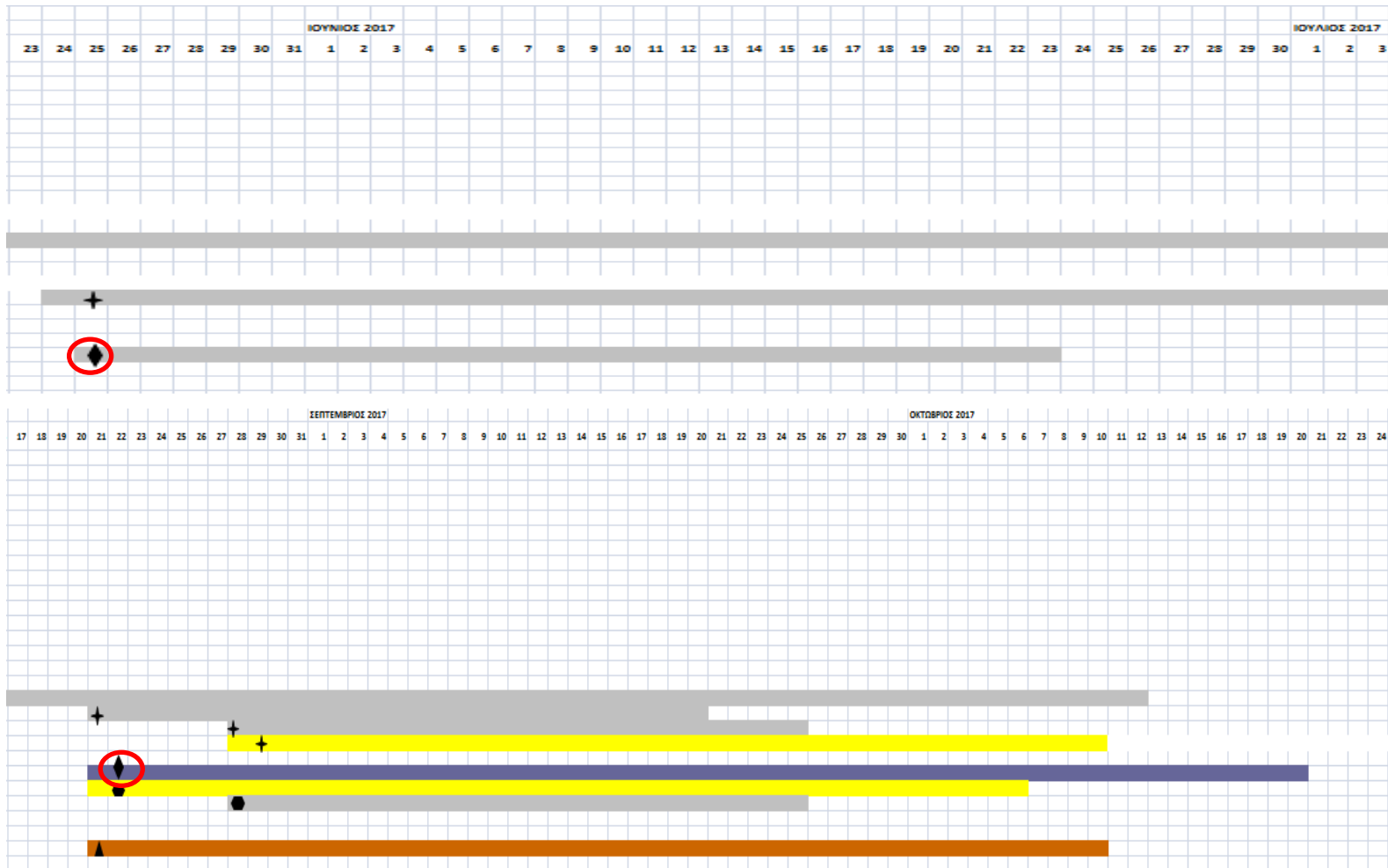




Εικόνες 3.7.1 – 3.7.3 Χαρτογράφηση του τύπου 23-22 στο νοσοκομείο N2. Ο χρωματικός κώδικας για τις μονάδες νοσηλείας ορίζεται ως εξής : 4^η Πνευμονολογική μονάδα = σκούρο πράσινο / 6^η Πνευμονολογική μονάδα = καφέ. Με το γκρι χρώμα συμβολίζονται οι μετακινήσεις μεταξύ κλινικών, για τις οποίες οι πληροφορίες δεν ήταν επαρκείς. Η απομόνωση του τύπου σημειώνεται με τρίγωνο μέσα σε κόκκινο κύκλο και στην αντίστοιχη ημερομηνία.

1-83

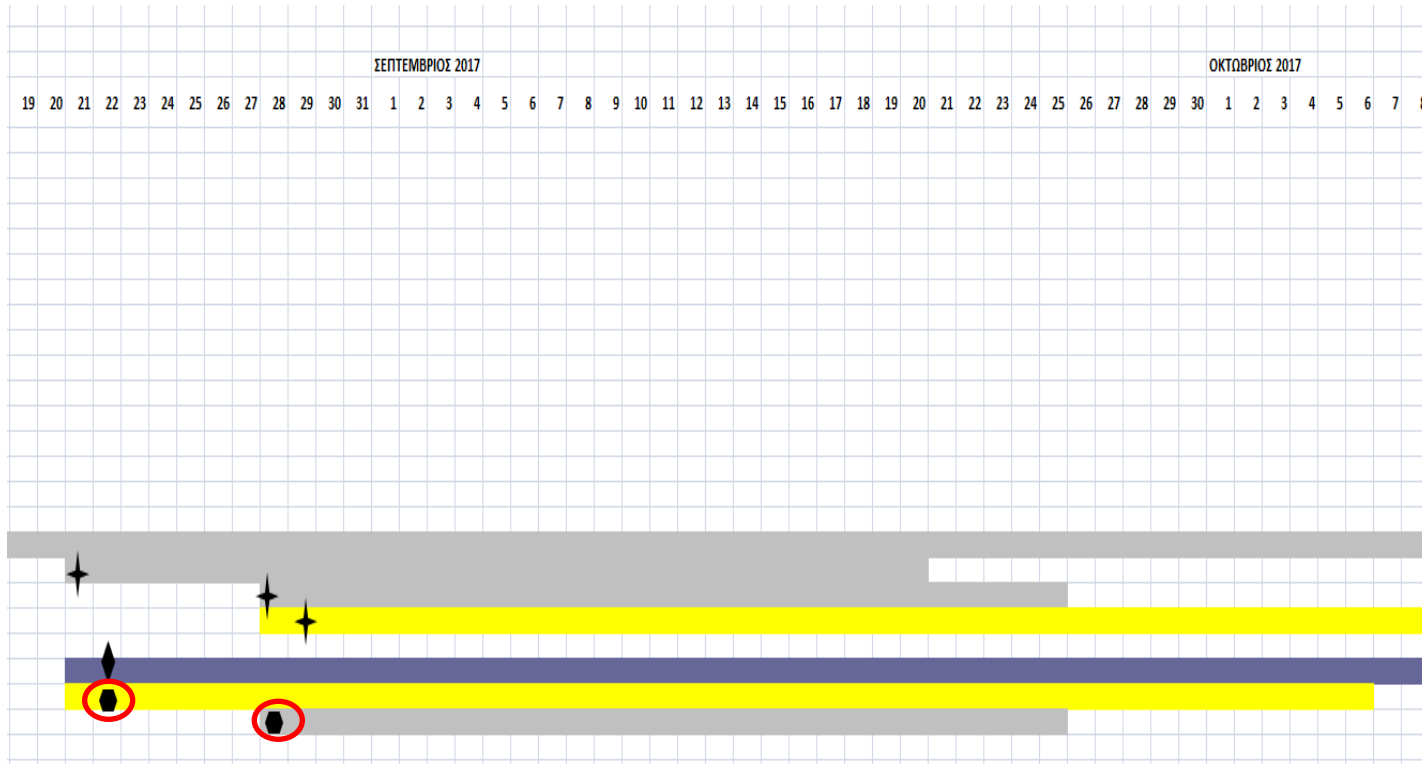
Τα 2 καλλιεργήματα *P. aeruginosa* που κατατάσσονται στον DLST τύπο 1-83 απομονώθηκαν από έναν ασθενή με εσωτερικές μετακινήσεις στο ΤΕΠ και στη ΜΑΦ και από έναν δεύτερο ασθενή της Θωρακοχειρουργικής μονάδας. Τα εν λόγω καλλιεργήματα απομονώθηκαν στις 25/05/2017 και 22/08/2017 αντιστοίχως. Και στις 2 περιπτώσεις, οι ασθενείς είχαν μόλις εισαχθεί στις προαναφερθείσες μονάδες. Η οπτική απεικόνιση για τον συγκεκριμένο DLST τύπο παρατίθεται στις εικόνες 3.8.1 και 3.8.2.



Εικόνες 3.8.1 και 3.8.2. Χαρτογράφηση του τύπου 1-83 στο νοσοκομείο Ν2. Ο χρωματικός κώδικας για τις μονάδες νοσηλείας ορίζεται ως εξής : Θωρακοχειρουργική μονάδα = σκούρο μοβ. Με το γκρι χρώμα συμβολίζονται οι μετακινήσεις μεταξύ κλινικών, για τις οποίες δεν ήταν επαρκείς. Η απομόνωση του τύπου σημειώνεται με ρόμβο μέσα σε κόκκινο κύκλο και στην αντίστοιχη ημερομηνία.

18-156

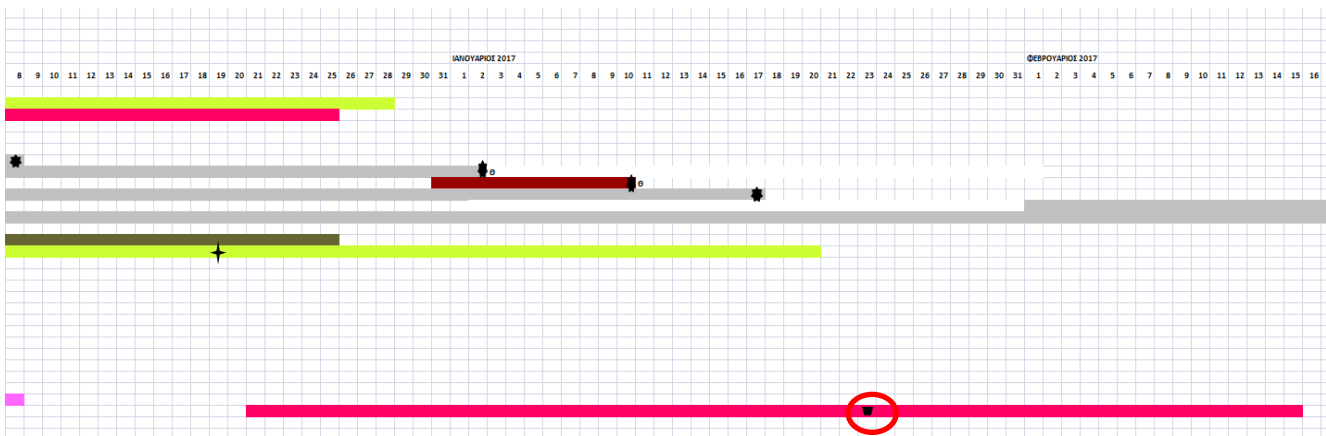
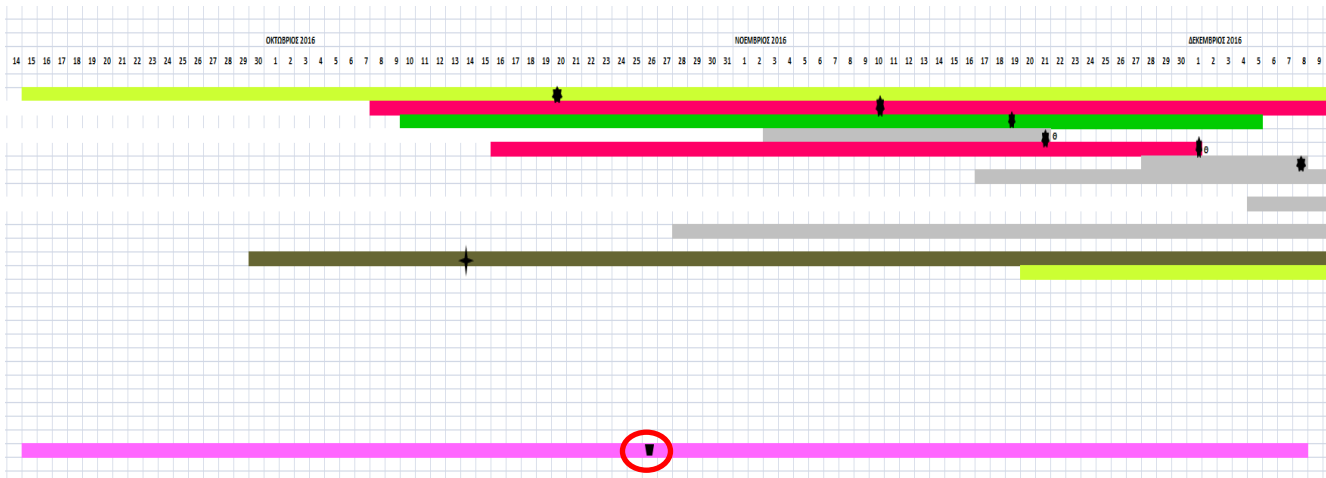
2 καλλιεργήματα *P. aeruginosa* κατατάσσονται στον DLST τύπο 18-156 και απομονώθηκαν από έναν ασθενή της 10^{ης} Πνευμονολογικής μονάδας και από έναν δεύτερο ασθενή που μετακινήθηκε από το ΤΕΠ στη ΜΑΦ. Τα εν λόγω καλλιεργήματα απομονώθηκαν στις 22/08/2016 και 28/08/2016 αντιστοίχως. Και στις 2 περιπτώσεις, οι ασθενείς είχαν μόλις εισαχθεί στις προαναφερθείσες μονάδες. Συγκεκριμένα, η ημερομηνία εισαγωγής για τον πρώτο ασθενή ήταν 21/08/2016 και για τον δεύτερο 28/08/2016. Η οπτική απεικόνιση για τον συγκεκριμένο DLST τύπο παρατίθεται στην εικόνα 3.9.



Εικόνα 3.9. Χαρτογράφηση του τύπου 1-83 στο νοσοκομείο N2. Ο χρωματικός κώδικας για τη μονάδα νοσηλείας ορίζεται ως εξής : 10^1 Πνευμονολογική μονάδα = κίτρινο. Με το γκρι χρώμα συμβολίζεται η μετακίνηση μεταξύ κλινικών, για την οποία δεν υπήρχαν επαρκείς πληροφορίες. Η απομόνωση του τύπου σημειώνεται με το σχήμα του εξαγώνου μέσα σε κόκκινο κύκλο και στην αντίστοιχη ημερομηνία.

28-77

Τα 2 καλλιεργήματα *P. aeruginosa* που χαρακτηρίστηκαν γονοτυπικά ως 28-77 απομονώθηκαν από ασθενείς του ΚΑΑ (ο ένας από τους δύο μετακινήθηκε και στη ΜΕΘ). Οι ημερομηνίες των απομονώσεων ήταν οι 26/10/2016 και 23/01/2017. Σημειώνεται πως και οι 2 ασθενείς είχαν πολυήμερη νοσηλεία εντός των μονάδων πριν την απομόνωση του βακτηρίου. Η απεικόνιση της χαρτογράφησης του εν λόγω τύπου φαίνεται μέσω των εικόνων 3.10.1 και 3.10.2.



Εικόνες 3.10.1 και 3.10.2. Χαρτογράφηση του τύπου 28-77 στο νοσοκομείο Ν2. Ο χρωματικός κώδικας για τις αντίστοιχες μονάδες νοσηλείας ορίζεται ως εξής : ΚΑΑ = μοβ / ΜΕΘ – ΚΑΑ = κόκκινο. Η απομόνωση του τύπου σημειώνεται με το σχήμα του τραpezιού μέσα σε κόκκινο κύκλο και στην αντίστοιχη ημερομηνία.

Κεφάλαιο 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν συνολικά 72 κλινικά καλλιεργήματα (isolates) *P. aeruginosa*, τα οποία απομονώθηκαν από νοσηλευόμενους ασθενείς 2 τριτοβάθμιων νοσοκομείων της ελληνικής επικράτειας, τα νοσοκομεία N1 (Βόρεια Ελλάδα) και N2 (Κεντρική Ελλάδα). Τα καλλιεργήματα έχουν χαρακτηριστεί σε προηγούμενη εργασία ως προς τον φαινότυπο αντοχής τους [140], σύμφωνα με τον οποίο ελέγχθηκαν για την παρουσία γονιδίων που προσδίδουν αντοχή στα β-λακταμικά αντιβιοτικά με εφαρμογή PCR στην παρούσα εργασία. Παράλληλα, τα καλλιεργήματα τυποποιήθηκαν με τη χρήση της μεθόδου DLST και κατατάχθηκαν στους αντίστοιχους DLST τύπους μέσω της πλατφόρμας <http://www.dlst.org/Paeruginosa> [140]. Κατασκευάστηκαν minimum spanning trees (MSTs) με τη χρήση του προγράμματος Global optimal eBURST analysis [www.phyloviz.net/goeburst], προκειμένου να διεξαχθεί φυλογενετική μελέτη. Τέλος, τα αποτελέσματα της τυποποίησης συσχετίστηκαν με επιδημιολογικά δεδομένα που ελήφθησαν μέσω ερωτηματολογίων από το εκάστοτε νοσοκομείο, και ακολούθησε στατιστική επεξεργασία με SPSS.

4.1 Φαινότυποι αντοχής

Η φαινοτυπική ανάλυση των καλλιεργημάτων, που πραγματοποιήθηκε από τους Κεφάλαια και συνεργάτες [140], υπέδειξε συνολικά 11 διαφορετικά προφίλ αντοχής (Εικόνα I). Δέκα από αυτά (10/11) εντοπίστηκαν στο νοσοκομείο N2 και 7/11 στο νοσοκομείο N1 (Πίνακας 3.3). Η πιθανότερη εξήγηση για την κατανομή των φαινοτύπων είναι η ανισοκατανομή των καλλιεργημάτων ανάμεσα στα 2 νοσοκομεία. Τα προφίλ αντοχής R1a, R2a, R2b, R2c, R2d (Εικόνα I) περιέχουν ανθεκτικά στις καρβαπενέμες καλλιεργήματα και εμφανίζονται σε ποσοστό 33,4% στο νοσοκομείο N1 και σε 70% στο νοσοκομείο N2. Το υψηλό ποσοστό των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες καλλιεργημάτων στο νοσοκομείο N2 σε σχέση με το N1 οφείλεται στον φαινότυπο R1a [CARB_R/EDTA(+)] // Εικόνα I], ο οποίος

εμφανίζεται αποκλειστικά σε καλλιεργήματα από το νοσοκομείο N2. Η επικράτηση των CARB_R καλλιεργημάτων στο νοσοκομείο N2 επιβεβαιώνεται και από τα δεδομένα που ελήφθησαν από την επεξεργασία των ερωτηματολογίων, σύμφωνα με τα οποία φαίνεται να έχει γίνει χρήση αντιβιοτικών έως και 6 μήνες πριν την απομόνωση των καλλιεργημάτων. Είναι ευρέως γνωστό πως η εξάπλωση πολυανθεκτικών παθογόνων οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην υπέρμετρη κατανάλωση και γενικότερα στην μη ορθή χρήση των αντιβιοτικών, ανάμεσα σε άλλους παράγοντες [146-149].

Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκαν τα 20/41 CARB_R καλλιεργήματα και από τα 2 νοσοκομεία (Πίνακας I, Εικόνα I) ως προς την παρουσία γονιδίων αντοχής. Τα 15/20 χαρακτηρίστηκαν ως CARB_R / EDTA (+) (31, 35, 37, 38, 40, 41, 44, 49, 50, 52, 53, 59, 62, 65, 71, Πίνακας I) και ελέγχθηκαν μεταξύ άλλων για την παρουσία του γονιδίου bla_{VIM}, με τα 14/15 στελέχη να δίνουν θετική PCR αντίδραση για το συγκεκριμένο γονίδιο. Η επιλογή της συγκεκριμένης κατηγορίας MBLs δεν ήταν τυχαία, καθώς τα ένζυμα τύπου VIM επικρατούν στην περιοχή της Μεσογείου, όπου έχουν συσχετιστεί με επιδημίες προερχόμενες από πολυανθεκτικά στελέχη *P. aeruginosa* σε χώρες όπως η Ελλάδα και η Ισπανία [150-153]. Η ύπαρξη γονιδίου που κωδικοποιεί για την μέταλλο-β-λακταμάση VIM επιβεβαιώνει και τον χαρακτηρισμό των στελεχών ως EDTA+, μετά από πειραματική διαδικασία που διεξήχθη από τους Κεφάλαια και συνεργάτες [140, 154].

Η διασπορά των στελεχών *P. aeruginosa* που παράγουν MBLs έχει περιγραφεί λεπτομερώς στη διεθνή βιβλιογραφία ως ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα δημόσιας υγείας όχι μόνο στις μεσογειακές χώρες, αλλά και παγκοσμίως [120, 155-159]. Στελέχη *P. aeruginosa* θετικά στην ύπαρξη των ενζύμων VIM-1 και VIM-2 έχουν αναφερθεί ως αίτια νοσοκομειακών επιδημιών στην Ιταλία [160, 161] και την Ελλάδα [152, 153, 162, 163]. Η παγκόσμια διασπορά των VIM-2 θετικών *P. aeruginosa* στελεχών είναι γεγονός, καθώς έχουν απομονωθεί από νοσηλευόμενους ασθενείς σε χώρες, όπως η Βενεζουέλα, οι ΗΠΑ, η Ρωσία, η Κορέα κ.α. [150, 164-172]. Η ευρεία διασπορά των MBLs θετικών στελεχών θεωρείται αποτέλεσμα της αλόγιστης χρήσης ευρέως φάσματος β-λακταμών (συμπεριλαμβανομένων των καρβαπενεμών), αμινογλυκοσίδων και κινολονών και έχει συσχετιστεί με επιδημίες

πολυανθεκτικών στελεχών *P. aeruginosa* [56, 151, 173]. Κρίσιμος παράγοντας για τη διασπορά των MBLs γονιδίων είναι η δυνατότητα οριζόντιας μεταφοράς και σε γενετικά πιο απομακρυσμένα στελέχη [174, 175]. Η παρακολούθηση και η ταυτοποίηση των βακτηριακών κλώνων που μεταφέρουν MBLs γονίδια και κυκλοφορούν στα νοσοκομειακά περιβάλλοντα κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική, λόγω της μεγάλης επιδημιολογικής τους σημασίας [153].

Ξεχωριστή αναφορά πρέπει να γίνει στον φαινότυπο FEP_R - CAZ_S, ο οποίος εντοπίστηκε σε 13 καλλιεργήματα της συλλογής, με τα 11 (11/13, 84,6%) να προέρχονται από το νοσοκομείο N2 και τα 2 (15,4%) από το νοσοκομείο N1 (Εικόνα 1, Πίνακας I). Στη παρούσα εργασία, τα FEP_R - CAZ_S καλλιεργήματα (1, 17, 28, 32, 51, 57, 61, 64, 67, 72, 74, 76, 77, Πίνακας I), ελέγχθηκαν για την ύπαρξη των γονιδίων bla_{OXA group I}, bla_{PSE-1}, bla_{OXA group III}. Ο συγκεκριμένος φαινότυπος εμφανίστηκε για πρώτη φορά σε κλινικό στέλεχος *P. aeruginosa* απομονωμένο από δείγμα ορθικού και συνδέθηκε με την παραγωγή της οξασιλλινάσης (καρβαπενεμάση κλάσης D κατά Ambler) OXA-31 [176]. Το ένζυμο OXA-31 εμφανίζει 98% ομοιότητα όσον αφορά την αμινοξική του ακολουθία με το ένζυμο OXA-1, ενώ και τα 2 ένζυμα κατατάσσονται στο OXA group III [143, 177]. Ο ίδιος φαινότυπος έχει παρατηρηθεί σε στελέχη *P. aeruginosa* ακόμη δυο φορές σε μελέτες της διεθνούς βιβλιογραφίας, όπου συνδυάστηκε με υπερέκφραση καναλιών MexCD-OrpJ ή MexAB-OrpM, αλλά και με μια ευρέως φάσματος β-λακταμάση, την PSE-1, η οποία μεταφέρεται μέσω ιντεγκρονίων τάξης 1 [178, 179]. Στην παρούσα εργασία, τα 5/13 FEP_R-CAZ_S καλλιεργήματα ήταν ταυτόχρονα και ανθεκτικά στις καρβαπενέμες και γι' αυτό ελέγχθηκαν και για το γονίδιο bla_{OXA-48}, το οποίο κωδικοποιεί για την καρβαπενεμάση OXA-48. Η καρβαπενεμάση OXA-48 εντοπίζεται σε εντεροβακτηριακά είδη και ιδιαίτερα στο βακτήριο *Klebsiella pneumoniae* [180]. Το ένζυμο έχει βρεθεί σε στελέχη που έχουν συνδεθεί με νοσοκομειακές λοιμώξεις, κυρίως στην περιοχή της Τουρκίας [181-184]. Παρ' όλα αυτά, η διασπορά του OXA-48, αλλά και των τύπου OXA-48 ενζύμων γενικότερα, είναι παγκόσμια, με επίπτωση όχι μόνο για τον νοσοκομειακό χώρο, αλλά και στην κοινότητα και το περιβάλλον [180, 185-188].

4.2 Double Locus Sequence Typing (DLST)

Η μέθοδος DLST αποτελεί μια νέα και πολλά υποσχόμενη τυποποιητική τεχνική, η οποία έχει προταθεί για την διεξαγωγή επιδημιολογικών και φυλογενετικών μελετών σε τοπικό επίπεδο, σε μικρό χρονικό διάστημα και με αρκετά χαμηλότερο κόστος, σε σχέση με τις τεχνικές που βασίζονται στην πλήρη αλληλούχιση των γονιδιωμάτων. Η μέθοδος έχει ήδη χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην επιδημιολογική μελέτη αλλά και στην παρακολούθηση 2 κύριων νοσοκομειακών παθογόνων, *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa*, ενώ πλέον έχουν αναπτυχθεί πρωτόκολλα και για τα βακτήρια *Campylobacter jejuni* και *Clostridium difficile* [122-127, 187].

Μέσω της μεθόδου DLST τυποποιήθηκαν επιτυχώς τα 73/74 καλλιεργήματα, συμπεριλαμβανόμενων και των δύο στελεχών αναφοράς PAO1 και NEQAS (τυποποιητικότητα ίση με 98,65%). 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 [131]. Η απουσία προϊόντος κατά τη διεξαγωγή της DLST μπορεί να οφείλεται σε διαγραφή ενός μέρους ή ολόκληρου του γενετικού τόπου, αλλά και σε πιθανές μετατροπές στην αλληλουχία του μιτιδορυφόρου, όπως για παράδειγμα μετά από ένθεση τρασποζονίου. Η αναδιάταξη του γονιδιώματος στην περιοχή είναι δυνατόν να παρεμποδίζει τη σωστή πρόσδεση των εκκινητών [129, 130].

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της μεθόδου αποκάλυψε συνολικά 41 διαφορετικούς DLST τύπους στο σύνολο των καλλιεργημάτων που αναλύθηκαν (Πίνακας I). Οι τύποι 8-37 και 32-39 εμφανίστηκαν στο μεγαλύτερο ποσοστό στο σύνολο των καλλιεργημάτων (18,31% και για τους δύο) σε στελέχη από ποικιλία κλινικών δειγμάτων, όπως πτύελα, βρογχικές εκκρίσεις, αίμα και ούρα, δεδομένο που διακιολογεί την ευρύτερη διασπορά των συγκεκριμένων τύπων. Παρ' όλα αυτά, ο τύπος 8-37 απομονώθηκε αποκλειστικά στο νοσοκομείο N2, σε αντίθεση με τον

32-39, που εντοπίστηκε και στα 2 νοσοκομεία. Το πρότυπο διασποράς για τον τύπο 8-37 πιθανολογείται ότι οφείλεται σε παράγοντες όπως η ανισοκατανομή των δειγμάτων από τα 2 νοσοκομεία (24 στελέχη από το N1 και 47 από το N2), η διαφορά ηλικίας των ασθενών των 2 νοσοκομείων και το βεβαρυμένο ιστορικό των ασθενών του νοσοκομείου N2. Αντίθετα, ο τύπος 32-39 φαίνεται πως σχετίζεται λιγότερο με παράγοντες όπως η ηλικία ή το ιστορικό των ασθενών.

Από τους υπόλοιπους 39 τύπους που ανέδειξε η μέθοδος DLST, μόνο οι 6 εμφανίστηκαν σε 2 ή 3 καλλιεργήματα (DLST τύποι 28-77, 12-54, 20-30, 23-22, 1-83 και 18-156, Πίνακας Ι). Οι υπόλοιποι 33 απαντώνται μόνο μία φορά στο σύνολο των καλλιεργημάτων και χαρακτηρίστηκαν ως singletons. Η παρουσία υψηλού αριθμού singletons όχι μόνο αναδεικνύει την υψηλή γενετική ποικιλομορφία του πληθυσμού στο σύνολό του, αλλά αποτελεί και έναν δείκτη της υψηλής διακριτικής ικανότητας και της αξιοπιστίας της μεθόδου.

Οι DLST τύποι 90-139, 20-30 και 12-54 που εντοπίστηκαν σε καλλιεργήματα του νοσοκομείου N1 και οι 1-21, 20-30, 21-96 και 12-544, στους οποίους ταξινομήθηκαν καλλιεργήματα του νοσοκομείου N2 (Πίνακας Ι), έχουν αναφερθεί ξανά στην μελέτη των Παππά και συνεργατών (2016), όπου η DLST εφαρμόστηκε σε περιβαλλοντικά *P. aeruginosa* στελέχη απομονωμένα από δείγματα του υδάτινου οικοσυστήματος στην Ελλάδα [68]. Ο DLST τύπος 20-30 έχει σημειωθεί και σε μικρό αριθμό περιβαλλοντικών στελεχών (απομονωμένων από νιπτήρες) σε πανεπιστημιακό νοσοκομείο της Λωζάνης στην Ελβετία, ενώ σε παρόμοια μελέτη που διεξήχθη στο ίδιο νοσοκομείο αναφέρεται η παρουσία του τύπου 20-30 σε 14 κλινικά στελέχη, τα οποία σχετίστηκαν με επιδημία σε Μονάδα Εντατικής Θεραπείας [125, 189]. Αντίστοιχα, ο τύπος 25-11 έχει περιγραφεί σε περιβαλλοντικά δείγματα από ποτάμια και νοσοκομειακά απόβλητα, αλλά και σε κλινικά δείγματα νοσοκομείων από πόλεις της Γαλλίας και του πανεπιστημιακού νοσοκομείου της Λωζάνης [131, 189, 190]. Ο τύπος 1-21 έχει επίσης εντοπιστεί σε περιβαλλοντικά δείγματα από ποτάμια σε περιοχή της Γαλλίας, σε δείγματα απομονωμένα από βρύσες, όπως επίσης και σε 2 κλινικά δείγματα από ασθενείς της μονάδας εγκαυμάτων στο πανεπιστημιακό νοσοκομείο της Λωζάνης [125, 131, 189]. Αξιοσημείωτη τέλος,

είναι η εμφάνιση των 2 κυρίαρχων DLST τύπων της παρούσας μελέτης, 8-37 και 32-39, σε πρόσφατες μελέτες που διεξήχθησαν σε διαφορετικές περιοχές της Γαλλίας, της Δυτικής και Κεντρικής Αφρικής και στην Ελβετία. Συγκεκριμένα, ο τύπος 8-37 βρέθηκε σε κλινικά δείγματα *P. aeruginosa* ενός ελβετικού [189] και διάφορων γαλλικών πανεπιστημιακών νοσοκομείων [131, 191], ενώ ο 32-39 ανιχνεύθηκε τόσο σε κλινικά όσο και σε περιβαλλοντικά στελέχη (κυρίως νοσοκομειακά απόβλητα) σε περιοχές της Γαλλίας [131, 190, 191] και της Νιγηρίας [131, 192].

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε συσχέτιση των DLST τύπων με τους φαινότυπους αντοχής. Τα 13 καλλιεργήματα του τύπου 8-37 είναι ανθεκτικά στις καρβαπενέμες (R1a : 7/13, R2a : 2/13, R2c : 4/13, Πίνακας 3.4). Ο 32-39 περιλαμβάνει 9/13 καλλιεργήματα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες (R1a : 4/13, R2b : 3/13, R2c : 2/13, Πίνακας 3.4), και 4 καλλιεργήματα με φαινότυπο αντοχής R3a, ο οποίος χαρακτηρίζεται ως CARB_S / EDTA (-) / FEP_R - CAZ_S (Εικόνα I). Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός πως η πλειοψηφία των καλλιεργημάτων που ανήκουν στους τύπους 8-37 και 32-39 εμφανίζει ανθεκτικότητα όχι μόνο στις καρβαπενέμες, αλλά και σε άλλες ομάδες αντιβιοτικών. Παράλληλα, το συγκεκριμένο γενετικό προφίλ των καλλιεργημάτων φαίνεται να επικρατεί και στα 2 διαφορετικά νοσοκομεία. Για τα υπόλοιπα καλλιεργήματα της συλλογής δεν παρατηρείται κάποια εμφανής συσχέτιση ανάμεσα στα γονοτυπικά και φαινοτυπικά τους προφίλ. Έτσι, προκύπτουν πολλοί διαφορετικοί συνδυασμοί DLST τύπου και φαινότυπου αντοχής (Πίνακας 3.4).

Τέλος, η γονοτυπική ανάλυση των 13 καλλιεργημάτων με τον φαινότυπο FEP_R - CAZ_S απεκάλυψε 12 διαφορετικούς DLST τύπους (Πίνακας I, [140]). Το αποτέλεσμα συμφωνεί με την μελέτη των Esquisabel και συνεργατών (2011), όπου ο συνδυασμός των τυποποιητικών σχημάτων Rep-PCR/PFGE επέτρεψε την τυποποίηση 47 διαφορετικών κλώνων που έφεραν το φαινότυπο σε νοσοκομείο περιοχής της Ισπανίας [178]. Φαίνεται ότι ο φαινότυπος FEP_R - CAZ_S δεν σχετίζεται με συγκεκριμένα γονοτυπικά προφίλ, αλλά εμφανίζεται σε πληθυσμούς με μεγάλη γενετική ποικιλομορφία.

4.3 eBURST φυλογενετική ανάλυση

Μέσω του αλγόριθμου eBURST και της κατασκευής των minimum spanning trees είναι δυνατό να παρατηρηθούν οι γενετικές αποστάσεις μεταξύ των καλλιεργημάτων και κατά συνέπεια των αντίστοιχων DLST τύπων.

Στους διαφορετικούς κλάδους ενός minimum spanning tree τοποθετούνται καλλιεργήματα που όχι μόνο σχετίζονται γενετικά, αλλά μπορεί να διαθέτουν και άλλα κοινά χαρακτηριστικά, όπως αυξημένη αντοχή στις καρβαπενέμες. Για παράδειγμα, τα 6/9 καλλιεργήματα του κλάδου A (6, 23, 65, 68, 71, 73, Εικόνα 3.1 και Πίνακας I) και τα 8 καλλιεργήματα του κλάδου B του minimum spanning tree για το σύνολο του πληθυσμού (29, 41, 43, 47, 51, 52, 53, 56, Εικόνα 3.1 και Πίνακας I) είναι πολυανθεκτικά. Τα κοινά χαρακτηριστικά που μοιράζονται τα καλλιεργήματα και η γενετική τους συσχέτιση αναδεικνύουν την έντονη κλωνικότητα του υπό μελέτη πληθυσμού, η οποία επιβεβαιώνεται και από την επιδημιολογική ανάλυση. Πράγματι, από τις πληροφορίες των ερωτηματολογίων προέκυψε πως τα 4/6 πολυανθεκτικά καλλιεργήματα του κλάδου A (65, 68, 71, 73, Εικόνα 3.1 και Πίνακας I) απομονώθηκαν από δείγματα πτυέλων ή βρογχικών εκκρίσεων ασθενών νοσηλευόμενων σε πνευμονολογικές μονάδες του νοσοκομείου N2 και σχετίζονται με ΗCΑΙ λοίμωξη. Η συσχέτιση προκύπτει από το μικρό χρονικό διάστημα που μεσολαβεί ανάμεσα στις ημερομηνίες εισαγωγής των ασθενών στο νοσοκομείο (28/08/2017 – 01/09/2017, Πίνακας I) και στις ημερομηνίες απομόνωσης των καλλιεργημάτων (εντός του ίδιου διαστήματος, με διαφορά το πολύ μία μέρα από την αντίστοιχη ημερομηνία εισαγωγής του ασθενούς, Πίνακας I). Συμπερασματικά, από τα επιδημιολογικά δεδομένα προκύπτει πως τα καλλιεργήματα του κλάδου A εμφανίζουν περαιτέρω ομοιότητες μεταξύ τους (απομόνωση από δείγματα ίδιου τύπου και συσχέτιση με συγκεκριμένο μοτίβο διασποράς), οι οποίες αναδεικνύουν ακόμα περισσότερο τον κλωνικό τους χαρακτήρα. Τα 4/8 πολυανθεκτικά καλλιεργήματα του κλάδου B (43, 47, 51, 53, Εικόνα 3.1 και Πίνακας I) έχουν συσχετιστεί με λοίμωξη ΗΑΙ σύμφωνα με τα ερωτηματολόγια, με το ένα από αυτά (καλλιεργήμα 51) να έχει ταυτόχρονα τον πρωτοφανή για ελληνικό νοσοκομείο φαινότυπο FEP_R-CAZ_S. Τα 3/4 κατατάσσονται στον επικρατή DLST τύπο 8-37 (43, 51, 53) και απομονώνονται από ασθενείς που είχαν μετακινηθεί στη Μονάδα Εντατικής

Θεραπείας του νοσοκομείου N2 κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους. Όμως, οι αντίστοιχοι ασθενείς δεν μπορούν να συσχετιστούν περαιτέρω επιδημιολογικά, καθώς οι αντίστοιχες απομονώσεις απείχαν χρονολογικά μεταξύ τους (53 : 01/05/2016, 43 : 02/01/2017, 51 : 31/03/2017 οι αντίστοιχες ημερομηνίες απομόνωσης των καλλιεργημάτων, Πίνακας I).

Στον κλάδο C του minimum spanning tree για το σύνολο του πληθυσμού, τα 13/18 καλλιεργήματα προέρχονται από το νοσοκομείο N2. Τα 8/13 ανήκουν στον επικρατή τύπο 8-37 (καλλιεργήματα 32, 36, 38, 39, 40, 44, 45, 49, Εικόνα 3.1 και Πίνακας I) και 2/13 ανήκουν στον δεύτερο επικρατέστερο τύπο 32-39 (καλλιεργήματα 33 και 48, Εικόνα 3.1 και Πίνακας I). Τα 10 καλλιεργήματα που ανήκουν στους 2 επικρατείς τύπους έχουν χαρακτηριστεί ως CARB_R, με το ένα από αυτά (καλλιεργήμα 32) να εμφανίζει επιπλέον τον φαινότυπο FEP_R-CAZ_S (Πίνακας I). Σύμφωνα με τα ερωτηματολόγια, τα 7/10 CARB_R καλλιεργήματα έχουν απομονωθεί από δείγματα αναπνευστικού (πτύελα ή βρογχικές εκκρίσεις) και σχετίζονται με ΗΑΙ λοιμώξεις (καλλιεργήματα 32, 33, 38, 39, 40, 48, 49, Πίνακας I). Τα 5/7 DLST 8-37 (32, 38, 39, 40, 49, Πίνακας I) προέρχονται από ασθενείς που μετακινήθηκαν στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους, με τα 4/5 να απομονώνονται σε διάστημα μικρότερο των 2 μηνών (20/10/2016 έως 08/12/2016, Πίνακας I). Τα παραπάνω δεδομένα αποτελούν σημαντικές ενδείξεις για την πρόκληση νοσοκομειακής επιδημίας από πολυανθεκτικά στελέχη *P. aeruginosa* του τύπου 8-37.

Συμπερασματικά, παρατηρείται πως καλλιεργήματα του νοσοκομείου N2 με παραπλήσια γονοτυπικά προφίλ εμφανίζουν κλωνικά χαρακτηριστικά και συσχετίζονται με λοιμώξεις που χαρακτηρίζονται είτε από ενδονοσοκομειακή διασπορά είτε από διασπορά στην κοινότητα και εκδήλωση στον νοσοκομειακό χώρο. Παρόμοιες επιδημικές εξάρσεις από έναν κλωνικό πληθυσμό *P. aeruginosa*, και συγκεκριμένα από έναν DLST τύπο, έχουν περιγραφεί στις εργασίες των Basset και συνεργατών (2014) και Tissot και συνεργατών (2016) [125, 189]. Στην πρώτη περίπτωση, ο τύπος 20-30 ανιχνεύθηκε σε 14 κλινικά στελέχη, τα οποία σχετίστηκαν με επιδημία σε Μονάδα Εντατικής Θεραπείας του πανεπιστημιακού νοσοκομείου της Λωζάνης την περίοδο 2002-2004 [125]. Στην δεύτερη περίπτωση, σε 23

νοσηλευόμενους ασθενείς του ίδιου νοσοκομείου εντοπίστηκαν *P. aeruginosa* στελέχη DLST 1-18. Οι νοσηλευόμενοι βρέθηκαν στο νοσοκομείο σε αλληλοεπικαλυπτόμενες περιόδους από τον Ιανουάριο του 2010 ως τον Ιούνιο του 2012 και έτσι επιβεβαιώθηκε η ενδονοσοκομειακή διασπορά [189].

Αντίθετα, ο υποπληθυσμός που απαρτίζεται από τα καλλιεργήματα του νοσοκομείου N1 χαρακτηρίζεται από υψηλότερη ποικιλομορφία, αφού σε 24 καλλιεργήματα του νοσοκομείου αντιστοιχούν 19 διαφορετικοί DLST τύποι (Πίνακας I). Η έντονη ποικιλομορφία πιθανόν να οφείλεται στη δράση χρωμοσωμικών μεταλλάξεων ή/και στην απόκτηση κινητών γενετικών στοιχείων σε διαφορετικές χρονικές περιόδους. Ο επικρατέστερος τύπος του νοσοκομείου N1 είναι ο 32-39, ο οποίος είναι και ο μοναδικός που εμφανίζεται σε περισσότερα από 1 καλλιεργήματα του νοσοκομείου N1 (4, 11, 19, 21, 23, 24, Πίνακας I, Εικόνα 3.2). Παρατηρώντας όμως το minimum spanning tree για το νοσοκομείο N1 (Εικόνα 3.2), προκύπτει πως μόνο τα 3/6 καλλιεργήματα του τύπου βρίσκονται σε κοντινές μεταξύ τους αποστάσεις στο φυλογενετικό δέντρο. Αυτό στοιχειοθετεί πως ακόμα και καλλιεργήματα που ανήκουν σε έναν κοινό DLST τύπο μπορεί να διαφοροποιηθούν μεταξύ τους μετά από την επίδραση μεταλλαγών στο γονιδίωμα, οδηγώντας σε πληθυσμούς με υψηλότερη γενετική ποικιλομορφία [193].

4.4 Ανάλυση επιδημιολογικών δεδομένων

Από την σύγκριση των δημογραφικών δεδομένων ανάμεσα στα 2 νοσοκομεία της μελέτης, παρατηρήθηκε πως η μέση ηλικία των ασθενών του νοσοκομείου N2 ($71,56 \pm 15,47$ έτη) είναι υψηλότερη από την αντίστοιχη των ασθενών του νοσοκομείου N1 ($65,41 \pm 19,18$ έτη). Ο ηλικιακός παράγοντας ενδέχεται να επηρεάζει άμεσα την διασπορά πολυανθεκτικών στελεχών *P. aeruginosa*, καθώς μεγαλύτεροι σε ηλικία ασθενείς είναι συνήθως ασθενείς με πολλαπλά προβλήματα υγείας, των οποίων η νοσηλεία είναι παρατεταμένη. Η παρατεταμένη νοσηλεία σε συνδυασμό με το αποδυναμωμένο ανοσοποιητικό σύστημα αυξάνουν τον κίνδυνο μόλυνσης από το βακτήριο, το οποίο έτσι και αλλιώς έχει τη δυνατότητα να αναπτύσσεται σε πολλά διαφορετικά σημεία των νοσοκομειακών χώρων, όπως για παράδειγμα στον ιατρικό εξοπλισμό, σε νεροχύτες κλπ [6, 43-45].

Μελετώντας τα στοιχεία νοσηλείας για τους ασθενείς των 2 νοσοκομείων παρατηρήθηκε πως τα καλλιεργήματα *P. aeruginosa* προέρχονται από μεγάλη ποικιλία δειγμάτων [πτύελα, βρογχικές εκκρίσεις, ούρα, αίμα, washing, απόστημα, πύον (Πίνακας I)] στην περίπτωση του νοσοκομείου N2, σε αντίθεση με το νοσοκομείο N1 όπου τα στελέχη προέρχονται αποκλειστικά από αιμοκαλλιέργειες. Η ποικιλία των δειγμάτων στο νοσοκομείο N2 αποτελεί κύρια αιτία της ευρείας διασποράς των DLST τύπων. Σημειώνεται πως στο 78,7% των καλλιεργημάτων του νοσοκομείου N2 η εστία απομόνωσης ήταν ο πνεύμονας, γεγονός που συνάδει με την βιβλιογραφία, καθώς το *P. aeruginosa* αποτελεί μία από τις συχνότερες αιτίες πνευμονίας είτε στο νοσοκομείο είτε σε χώρους υγειονομικής περίθαλψης [42]. Παρ' όλα αυτά, θα πρέπει να σημειωθεί πως στο νοσοκομείο N2 νοσηλεύονται κυρίως πάσχοντες με οξεία ή χρόνια νοσήματα του αναπνευστικού, οπότε ήταν αναμενόμενο τα καλλιεργήματα να προέρχονται κατεξοχήν από δείγματα του αναπνευστικού.

Οι 16/47 ασθενείς του νοσοκομείου N2 (34%) συσχετίστηκαν με HAI λοίμωξη, ενώ οι 19/47 (40,4%) με HCAI λοίμωξη. Το βακτήριο *P. aeruginosa* είναι ένα από τα πιο κοινά νοσοκομειακά παθογόνα, υπεύθυνο για την εμφάνιση λοιμώξεων τύπου HAI ή HCAI σε νοσοκομεία ανά τον κόσμο [6, 55, 56]. Τα ποσοστά εμφάνισης HAI ή HCAI

στον πληθυσμό του νοσοκομείου N2 είναι αρκετά υψηλά. Ο μικρός αριθμός των συνολικών δειγμάτων που προήλθαν από τους νοσηλευόμενους ασθενείς του νοσοκομείου N2 συγκριτικά με τον αριθμό δειγμάτων που αναφέρονται σε μελέτες διεθνούς εμβέλειας στη βιβλιογραφία [125, 131, 189, 191, 192] αποτελεί έναν από τους περιορισμούς της παρούσας εργασίας.

Μελετώντας τις κλινικές νοσηλείας των υπό μελέτη ασθενών παρατηρείται ότι η απομόνωση πολυανθεκτικών στελεχών *P. aeruginosa* σχετίζεται με την νοσηλεία στις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας. Πράγματι, το 27,7% των ασθενών του νοσοκομείου N2 (13 ασθενείς) και το 33,3% των ασθενών του νοσοκομείου N1 (8 ασθενείς), νοσηλεύτηκε σε Μονάδα Εντατικής Θεραπείας κάποια στιγμή κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους στα αντίστοιχα νοσοκομεία. Η συσχέτιση των νοσοκομειακών λοιμώξεων από *P. aeruginosa* με τη νοσηλεία στις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας είναι ένα φαινόμενο που συναντάται συχνά στη βιβλιογραφία, όπου τονίζεται πως η επίπτωση του βακτηρίου σε νοσοκομειακές λοιμώξεις σε ασθενείς που νοσηλεύονται σε ΜΕΘ είναι υψηλότερη σε σχέση με άλλες μονάδες [17, 18].

Μετακινήσεις μεταξύ διαφορετικών κλινικών καταγράφηκαν στο 70,2% (33/47) των περιπτώσεων του νοσοκομείου N2, με το αντίστοιχο ποσοστό στο νοσοκομείο N1 να φτάνει το 37,5%. Η διαφορά ανάμεσα στα 2 ποσοστά δεν είναι αντιπροσωπευτική, καθώς τα δεδομένα από τα ερωτηματολόγια για τις μετακινήσεις ασθενών στο νοσοκομείο N1 είναι ελλιπή. Στην περίπτωση του νοσοκομείου N2, όπου όλα τα στοιχεία επιβεβαιώνονται από τα ερωτηματολόγια, το υψηλό ποσοστό των μετακινήσεων μπορεί να εξηγήσει τη μετάδοση των καλλιεργημάτων *P. aeruginosa* εντός των διαφορετικών μονάδων του νοσοκομείου N2, αλλά και τη γενικότερη ευρεία διασπορά των DLST τύπων του νοσοκομείου. Οι αυξημένες μετακινήσεις ασθενών εντός του ίδιου νοσοκομείου ενισχύουν την διασπορά ενός νέου επιδημικού κλώνου σε πολλές διαφορετικές μονάδες, με αποτέλεσμα την εδραίωση μίας νοσοκομειακής επιδημίας [194].

Τέλος, ενδιαφέρον έχει η σύγκριση της συνολικής μέσης διάρκειας νοσηλείας για τα 2 νοσοκομεία. Η συνολική μέση διάρκεια νοσηλείας ήταν ίση με $35,92 \pm 32,20$

ημέρες στην περίπτωση του νοσοκομείου N1, ενώ το αντίστοιχο διάστημα για το νοσοκομείο N2 ήταν ίσο με $62,43 \pm 37,11$ ημέρες. Είναι πιθανό η διαφορά στα 2 χρονικά διαστήματα να προκύπτει από την ηλικία των ασθενών του νοσοκομείου N2 και την ύπαρξη υποκείμενων νοσημάτων που επιβαρύνουν την κατάσταση της υγείας τους. Η αυξημένη διάρκεια νοσηλείας αποτελεί παράγοντα που αυξάνει στατιστικά τις πιθανότητες εμφάνισης νοσοκομειακής λοίμωξης [195, 196]. Στην παρούσα μελέτη, συνδυάζοντας τα υψηλά ποσοστά HAI και HCAI για τον πληθυσμό του νοσοκομείου N2 με τα παραπάνω δεδομένα, γίνεται κατανοητό πως η αυξημένη χρονική διάρκεια νοσηλείας των ασθενών του νοσοκομείου N2 επηρέασε την εμφάνιση νοσοκομειακών λοιμώξεων.

4.5 Χαρτογράφηση των DLST τύπων στον χώρο και τον χρόνο (spotmapping)

Με στόχο μια πιο κατανοητή και ουσιαστική αποτύπωση των δεδομένων που συλλέχθηκαν από τα ερωτηματολόγια, αλλά και μια όσο το δυνατόν πιο αξιόπιστη επιδημιολογική ερμηνεία, επιλέχθηκαν για την χαρτογράφηση οι DLST τύποι που εμφανίστηκαν τουλάχιστον 2 φορές σε καλλιεργήματα του ίδιου νοσοκομείου. Έτσι, για το νοσοκομείο N1 ερευνήθηκε μόνο ο τύπος 32-39, που απαριθμούσε 6 καλλιεργήματα, ενώ στο νοσοκομείο N2 ερευνήθηκαν οι τύποι 8-37 (13), 32-39 (7), 23-22 (3) και οι 1-83, 18-156, 28-77 (2 καλλιεργήματα έκαστος).

Όσον αφορά το νοσοκομείο N1, τα αποτελέσματα της χαρτογράφησης για τον DLST τύπο 32-39 δείχνουν πως η πρώτη απομόνωση καλλιεργήματος που φέρει τον τύπο και μπορεί να συσχετιστεί επιδημιολογικά ως ένα σημείο με τις επόμενες απομονώσεις είναι αυτή στις 23/07/2016 (καλλιέργημα 24, Εικόνα 3.4 και Πίνακας I). Το καλλιέργημα απομονώθηκε από ασθενή της Μονάδας Εντατικής Θεραπείας, ο οποίος αρχικά εισήχθη στην Ορθοπεδική μονάδα του νοσοκομείου. Η νοσηλεία στην Ορθοπεδική μονάδα είναι το στοιχείο που μπορεί να συνδέσει αυτόν τον ασθενή με 2 από τους επόμενους από τους οποίους απομονώθηκε στέλεχος με τον ίδιο DLST τύπο (καλλιεργήματα 4 και 23, Εικόνα 3.4 και Πίνακας I). Οι 2 ασθενείς νοσηλεύονταν και αυτοί στην Ορθοπεδική μονάδα τουλάχιστον για 10 ημέρες πριν την απομόνωση του 32-39 στις 10 και στις 11/08/2016 αντίστοιχα. Σύμφωνα με την χαρτογράφηση πιθανολογείται πως η διασπορά του συγκεκριμένου τύπου έγινε εντός του νοσοκομειακού χώρου μεταξύ των ασθενών. Αυτό το αποτέλεσμα συμφωνεί και με την φυλογενετική ανάλυση για το νοσοκομείο N1, καθώς τα καλλιεργήματα 4, 23, και 24 βρίσκονται αρκετά κοντά μεταξύ τους στο minimum spanning tree. Παρ' όλα αυτά, η συσχέτιση βασίζεται στα δεδομένα 3 στελεχών και γι' αυτό δεν μπορεί να αξιολογηθεί ως κάτι αξιόπιστο, παρά μόνο ως μία υπόθεση για τον τρόπο με τον οποίο διαδόθηκε ο συγκεκριμένος τύπος εντός του νοσοκομείου N1.

Σχετικά με το νοσοκομείο N2, και ξεκινώντας από τον επικρατή DLST τύπο 8-37, τα αποτελέσματα της χαρτογράφησης δείχνουν πως οι 2 πρώτες απομονώσεις του τύπου δεν μπορούν να συσχετιστούν επιδημιολογικά, καθώς μεσολαβεί πολύ

μεγάλο χρονικό διάστημα μεταξύ τους (01/05/2016 για το καλλιέργημα 53, Εικόνα 3.5.1, Πίνακας 3.9 // 20/10/2016 για το καλλιέργημα 32, Εικόνα 3.5.2, Πίνακας 3.9). Από τη δεύτερη απομόνωση και μετά, ακολούθησαν 8 απομονώσεις από τον Νοέμβριο του 2016 έως και τον Ιανουάριο του 2017, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν αρκετές ημέρες έως και μήνες μετά την εισαγωγή των αντίστοιχων ασθενών στο νοσοκομείο (καλλιέργηματα 36, 37, 38, 39, 40, 43, 44, 45, Εικόνες 3.5.2 και 3.5.3, Πίνακας 3.9). Στις 6/8 περιπτώσεις το κοινό στοιχείο ήταν η νοσηλεία των ασθενών στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας. Φαίνεται πως ο DLST τύπος 8-37 παρουσιάζει ένα μοτίβο ενδονοσοκομειακής διασποράς στις συγκεκριμένες περιπτώσεις. Το μοτίβο επιβεβαιώνεται μερικώς και από τη φυλογενετική ανάλυση, καθώς τα καλλιέργηματα 36, 38, 39, 40, 44, 45 εντοπίζονται στον ίδιο κόμβο του minimum spanning tree του νοσοκομείου N2 (Εικόνα 3.3), στοιχείο που υποδεικνύει την κλωνικότητα που χαρακτηρίζει τα καλλιέργηματα. Παρ' όλα αυτά, δεν υπάρχουν πληροφορίες για τις ακριβείς ημερομηνίες των μετακινήσεων των ασθενών, ούτε για το χρονικό διάστημα που ο εκάστοτε ασθενής νοσηλεύτηκε σε διαφορετική κλινική του νοσοκομείου. Επομένως, δεν μπορεί να στηριχτεί με βεβαιότητα η υπόθεση για το αν κάποιοι από τους εν λόγω ασθενείς συνέπεσαν για κάποιο χρονικό διάστημα στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας ή όχι. Το ίδιο μοτίβο ακολουθείται και στις 3 τελευταίες απομονώσεις από ασθενείς το διάστημα 23/3/2017 έως και 3/4/2017 (Εικόνα 3.5.4, Πίνακας 3.9). Και σε αυτές τις 3 περιπτώσεις οι ασθενείς πέρασαν από τη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας κάποια στιγμή κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους στο νοσοκομείο N2.

Ο δεύτερος επικρατής DLST τύπος 32-39 εμφανίζεται αρχικά στο νοσοκομείο N2 σε 4 ασθενείς που νοσηλεύονταν σε διαφορετικές κλινικές νοσηλείας, ενώ και τα διαστήματα που μεσολάβησαν από την μία απομόνωση μέχρι την επόμενη ήταν αρκετά μεγάλα, ξεκινώντας από τις 14/10/2016 (πρώτη απομόνωση) και καταλήγοντας στις 25/05/2017 (τέταρτη κατά σειρά απομόνωση, Εικόνες 3.6.1 – 3.6.3, Πίνακας 3.10). Επομένως, αυτοί οι ασθενείς δεν ήταν δυνατόν να συσχετιστούν επιδημιολογικά μεταξύ τους. Οι 3 απομονώσεις που ακολούθησαν, πραγματοποιήθηκαν εντός του χρονικού διαστήματος 21/08/2017 - 29/08/2017 και συνέπεσαν χρονικά με την εισαγωγή του αντίστοιχου ασθενούς στο νοσοκομείο

(καλλιεργήματα 58, 65, 71, Εικόνα 3.6.4, Πίνακας 3.10). Παράλληλα, και τα 3 καλλιεργήματα εντοπίζονται σε πολύ κοντινούς κόμβους εντός του ίδιου κλάδου (κλάδος A2) του minimum spanning tree του νοσοκομείου N2 (Εικόνα 3.3). Επομένως, για τα 3 εν λόγω καλλιεργήματα *P. aeruginosa* με DLST τύπο 32-39 πιθανολογείται ένα μοτίβο διασποράς εκτός του νοσοκομειακού περιβάλλοντος, ενώ η γενετική τους συγγένεια οδηγεί στο συμπέρασμα πως είναι πιθανό να προέρχονται από κοινή πηγή μόλυνσης.

Εξετάζοντας τα αποτελέσματα της χαρτογράφησης για τους υπόλοιπους DLST τύπους, προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα :

α) Οι ασθενείς από τους οποίους απομονώθηκαν τα 3 καλλιεργήματα *P. aeruginosa* του τύπου 23-22 (50, 54, 59, Πίνακας I) νοσηλεύτηκαν σε Πνευμονολογικές μονάδες του νοσοκομείου (15/03/2016, 23/03/2017 και 21/08/2017 με χρονολογική σειρά, Εικόνες 3.7.1 – 3.7.3). Λόγω της μεγάλης χρονικής απόστασης μεταξύ των απομονώσεων, δεν υπάρχει κάποια άλλη επιδημιολογική σύνδεση μεταξύ των 3 ασθενών. Παράλληλα, δεν φαίνεται να υπάρχει ένα κοινό πρότυπο για τη διασπορά του DLST τύπου στο νοσοκομείο.

β) Οι απομονώσεις των καλλιεργημάτων για τον τύπο 1-83 (καλλιεργήματα 29, 64, Πίνακας I) προήλθαν από 2 νοσηλευόμενους ασθενείς την ίδια μέρα με την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο (25/05/2017 και 22/08/2017 αντιστοίχως, Εικόνες 3.8.1 και 3.8.2). Όμως, δεν συμπίπτουν ούτε οι αντίστοιχες χρονικές περίοδοι ούτε οι μονάδες νοσηλείας των ασθενών, ώστε να μπορέσουν τελικά οι ασθενείς να συσχετιστούν μεταξύ τους.

γ) Οι 2 ασθενείς από όπου απομονώθηκαν τα καλλιεργήματα του DLST τύπου 18-156 (62, 63, Πίνακας I) στις 22 και 28/08/2016 νοσηλεύονταν σε διαφορετικές μονάδες, ενώ οι απομονώσεις έγιναν σχεδόν αμέσως μετά την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο (21 και 28/08/2016 αντίστοιχα, Εικόνα 3.9). Το γεγονός ότι η ημερομηνία απομόνωσης συμπίπτει με την ημερομηνία εισαγωγής δείχνει πως είναι πιθανό να υπάρχει ένα πρότυπο διασποράς εκτός του νοσοκομείου για τον συγκεκριμένο τύπο. Παρατηρώντας και την θέση των καλλιεργημάτων στο minimum spanning tree (Εικόνα 3.3), τοποθετούνται μεν σε κοντινούς κόμβους,

αλλά διακρίνονται από 50 νουκλεοτιδικές διαφορές μεταξύ τους (SNPs). Τα καλλιεργήματα θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν και ως γενετικά μη σχετιζόμενα, κάτι που πιθανά προκύπτει από γεγονότα μετάλλαξης (πχ κάποια ένθεση) στην περιοχή του γενετικού υλικού που μελετάται από την μέθοδο DLST.

δ) Οι ασθενείς από τους οποίους απομονώθηκαν τα 2 καλλιεργήματα *P. aeruginosa* με DLST τύπο 28-77 (35 και 46, Πίνακας Ι) νοσηλεύτηκαν στο Κέντρο Αναπνευστικής Ανεπάρκειας του νοσοκομείου, με τον δεύτερο να μετακινείται και στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας κατά τη νοσηλεία του. Οι απομονώσεις πραγματοποιήθηκαν μετά από πολυήμερη νοσηλεία των ασθενών στο νοσοκομείο. Επίσης, από τη φυλογενετική ανάλυση τα 2 καλλιεργήματα τοποθετούνται σε κοντινές θέσεις στο minimum spanning tree του νοσοκομείου N2 (Εικόνα 3.3), στοιχείο που ενισχύει τη γενετική τους συσχέτιση. Η ενδονοσοκομειακή διασπορά του τύπου 28-77 μεταξύ των 2 ασθενών είναι μία υπόθεση που θα μπορούσε να ισχύει σε αυτή την περίπτωση, αλλά ο αριθμός των συσχετιζόμενων ασθενών και πάλι είναι μικρός και δεν επιτρέπει την διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Επιπλέον, οι αντίστοιχες ημερομηνίες των απομονώσεων (26/10/2016 και 23/01/2017 αντίστοιχα, Εικόνες 3.10.1 και 3.10.2) δεν συμβαδίζουν με αυτή την υπόθεση.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, φαίνεται πως η χρήση της τυποποιητικής μεθόδου DLST σε συνδυασμό με τη φυλογενετική ανάλυση και τη χαρτογράφηση των DLST τύπων στον χώρο και τον χρόνο μπορεί να αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη για τοπικές επιδημιολογικές μελέτες μικρής χρονικής διάρκειας. Η υψηλή τυποποιητικότητα και διακριτική ικανότητα της μεθόδου την καθιστούν ικανή να διαχωρίζει βακτηριακούς πληθυσμούς με υψηλή γενετική ποικιλομορφία. Τα δεδομένα της μεθόδου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διεξαγωγή φυλογενετικών αναλύσεων, όπου τα στελέχη είναι δυνατόν να συσχετιστούν γονοτυπικά μεταξύ τους. Με την χρήση ενός καλά καταγεγραμμένου ιστορικού των αντίστοιχων ασθενών, τα αποτελέσματα της DLST μπορούν να χαρτογραφηθούν και να δημιουργηθούν υποθέσεις σχετικά με το μοτίβο διασποράς του εκάστοτε τύπου, οι οποίες ενισχύονται και από τα δεδομένα που προκύπτουν από τη φυλογενετική ανάλυση. Όλα τα παραπάνω θα οδηγήσουν στην γρηγορότερη και αποτελεσματικότερη

διερεύνηση πιθανών επιδημιών, αλλά και στον σχεδιασμό ουσιαστικότερων και αποδοτικότερων στρατηγικών αντιμετώπισης και εν τέλει πρόληψής τους.

4.6 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 72 κλινικά *P. aeruginosa* καλλιεργήματα προερχόμενα από 2 ελληνικά τριτοβάθμια νοσοκομεία, με στόχο τη μελέτη πιθανής επιδημίας καθώς και των οδών μετάδοσης. Τα καλλιεργήματα ελέγχθηκαν για την παρουσία μηχανισμών αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά, με 14 καλλιεργήματα να προκύπτουν θετικά για το γονίδιο bla_{VIM}. Τα καλλιεργήματα τυποποιήθηκαν με τη χρήση της μεθόδου DLST και κατατάχθηκαν σε 41 διαφορετικούς DLST τύπους, με επικρατέστερους τους 8-37 και 32-39, που περιελάμβαναν από 13 πολυανθεκτικά καλλιεργήματα. Μέσω της φυλογενετικής ανάλυσης, επιβεβαιώθηκε η κλωνική σχέση ανάμεσα στους επικρατείς τύπους και στους φαινότυπους αντοχής CARB_R. Τα επιδημιολογικά δεδομένα έδειξαν : 1) ευρεία διασπορά των DLST τύπων του νοσοκομείου N2 όσον αφορά τον τύπο δείγματος, 2) συσχέτιση του 34 και του 40,4% των ασθενών του N2 με HAI και HCAI λοίμωξη αντίστοιχα, 3) υψηλά ποσοστά νοσηλείας στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας και στα 2 νοσοκομεία (33,3 και 27,7% των ασθενών για N1 και N2 αντίστοιχα), 4) υψηλά ποσοστά μετακινήσεων των ασθενών του νοσοκομείου N2 μεταξύ κλινικών (70,2%), 5) μεγάλη διαφορά στη μέση διάρκεια νοσηλείας στα 2 νοσοκομεία (35,92 ± 32,20 ημέρες για το N1, 62,43 ± 37,11 ημέρες για το N2), 6) υψηλά ποσοστά για προηγούμενη νοσηλεία, λήψη αντιβιοτικών (97,9% των ασθενών) και ΧΑΠ (87,2% των ασθενών) μεταξύ των ασθενών του N2. Τέλος, η χαρτογράφηση των DLST τύπων στον χώρο και τον χρόνο έδειξε πως ο τύπος 8-37 εντοπίζεται σε ασθενείς με μεγάλη μέση διάρκεια νοσηλείας και σε αλληλοεπικαλυπτόμενες περιόδους, ενώ ο τύπος 32-39 εντοπίστηκε σε καλλιεργήματα απομονωμένα κατά τις πρώτες 24-48 ώρες της νοσηλείας. Τα τελευταία δεδομένα συσχετίζουν τον τύπο 8-37 με πιθανή ενδονοσοκομειακή διασπορά, ενώ τον τύπο 32-39 με ευρύτερη διασπορά τόσο εντός όσο και εκτός του νοσοκομειακού περιβάλλοντος.

Καταλήγοντας, ο συνδυασμός φαινοτυπικών, γονοτυπικών και επιδημιολογικών δεδομένων κλινικών στελεχών *P. aeruginosa* είναι πολύτιμος για επιδημιολογικές μελέτες τοπικού επιπέδου που διεξάγονται σε σύντομο χρονικό διάστημα, όπως στην παρούσα μελέτη. Παρ' όλα αυτά, απαιτείται περαιτέρω έρευνα προκειμένου να εδραιωθεί η θέση της μεθόδου DLST, είτε μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους με μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα, στη διερεύνηση επιδημιών, αλλά και στην επιτήρηση στους χώρους παροχής υπηρεσιών υγείας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Garner, J.S., et al., *CDC definitions for nosocomial infections, 1988*. Am J Infect Control, 1988. **16**(3): p. 128-40.
2. Clair, J.D. and S. Colatrella, *Opening Pandora's (tool) Box: health care construction and associated risk for nosocomial infection*. Infect Disord Drug Targets. **13**(3): p. 177-83.
3. Rosenthal, V.D., D.G. Maki, and N. Graves, *The International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC): goals and objectives, description of surveillance methods, and operational activities*. Am J Infect Control, 2008. **36**(9): p. e1-12.
4. CDC. [cited; Available from: <https://www.cdc.gov/hai/infectiontypes.html>].
5. ΚΕΕΛΠΝΟ. [cited; Available from: <https://keelpno.gr/themata-yeias/nosokomeiakes-loimoxeis/>].
6. Greenwood, Medical microbiology, A guide to microbial infections: pathogens, immunity, laboratory diagnosis and control, 17th edition, Broken Hill, 2007.
7. Friedman, N.D., et al., *Health care--associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections*. Ann Intern Med, 2002. **137**(10): p. 791-7.
8. Marschall, J., et al., *Between community and hospital: healthcare-associated gram-negative bacteremia among hospitalized patients*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2009. **30**(11): p. 1050-6.
9. Lenz, R., et al., *The distinct category of healthcare associated bloodstream infections*. BMC Infect Dis. **12**: p. 85.
10. Shorr, A.F., et al., *Healthcare-associated bloodstream infection: A distinct entity? Insights from a large U.S. database*. Crit Care Med, 2006. **34**(10): p. 2588-95.
11. Peleg, A.Y. and D.C. Hooper, *Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria*. N Engl J Med. **362**(19): p. 1804-13.
12. Habib, G., et al., *Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009): the Task Force on the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and the International Society of Chemotherapy (ISC) for Infection and Cancer*. Eur Heart J, 2009. **30**(19): p. 2369-413.
13. Tumbarello, M., et al., *Predictors of mortality in bloodstream infections caused by Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing K. pneumoniae: importance of combination therapy*. Clin Infect Dis. **55**(7): p. 943-50.
14. Daikos, G.L., et al., *Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems*. Antimicrob Agents Chemother. **58**(4): p. 2322-8.
15. Hattemer, A., et al., *Bacterial and clinical characteristics of health care- and community-acquired bloodstream infections due to Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. **57**(8): p. 3969-75.
16. McCarthy, K.L. and D.L. Paterson, *Community-acquired Pseudomonas aeruginosa bloodstream infection: a classification that should not falsely reassure the clinician*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **36**(4): p. 703-711.
17. Venditti, M., et al., *Outcomes of patients hospitalized with community-acquired, health care-associated, and hospital-acquired pneumonia*. Ann Intern Med, 2009. **150**(1): p. 19-26.

18. Haque, M., et al., *Health care-associated infections - an overview*. Infect Drug Resist. **11**: p. 2321-2333.
19. Sievert, D.M., et al., *Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010*. Infect Control Hosp Epidemiol. **34**(1): p. 1-14.
20. Hidron, A.I., et al., *NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2008. **29**(11): p. 996-1011.
21. Weiner, L.M., et al., *Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014*. Infect Control Hosp Epidemiol. **37**(11): p. 1288-1301.
22. Arora, S.K., et al., *Sequence polymorphism in the glycosylation island and flagellins of Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 2004. **186**(7): p. 2115-22.
23. Todar, *Online Textbook of Bacteriology*: www.textbookofbacteriology.net. 2014.
24. Croft, L., et al., *An interactive web-based Pseudomonas aeruginosa genome database: discovery of new genes, pathways and structures*. Microbiology, 2000. **146 (Pt 10)**: p. 2351-64.
25. Bitton, Encyclopedia of Environmental Microbiology, 2002.
26. Μενεγάτου, *Μικροβιολογία II, Υπουργείο Εθνικής Παιδείας και Θρησκευμάτων, σελ. 73-76*. 2001.
27. Sazakli, E., et al., *Comparative typing of Pseudomonas species isolated from the aquatic environment in Greece by SDS-PAGE and RAPD analysis*. J Appl Microbiol, 2005. **99**(5): p. 1191-203.
28. Σαζακλή, *Ταυτοποίηση Pseudomonas spp που απομονώνονται από το υδάτινο περιβάλλον με βιοχημικές, ηλεκτροφορητικές και μοριακές τεχνικές*. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών, 2005.
29. Kung, V.L., E.A. Ozer, and A.R. Hauser, *The accessory genome of Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol Mol Biol Rev. **74**(4): p. 621-41.
30. Stover, C.K., et al., *Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen*. Nature, 2000. **406**(6799): p. 959-64.
31. Tummler, B., et al., *Advances in understanding Pseudomonas*. F1000Prime Rep. **6**: p. 9.
32. Khan, N.H., et al., *Multilocus sequence typing and phylogenetic analyses of Pseudomonas aeruginosa Isolates from the ocean*. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(20): p. 6194-205.
33. Wiehlmann, L., et al., *Population structure of Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(19): p. 8101-6.
34. Mathee, K., et al., *Dynamics of Pseudomonas aeruginosa genome evolution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(8): p. 3100-5.
35. Silby, M.W., et al., *Pseudomonas genomes: diverse and adaptable*. FEMS Microbiol Rev. **35**(4): p. 652-80.
36. Battle, *Genomic islands of Pseudomonas aeruginosa*. FEMS, 2009.
37. Juhas, M., et al., *Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution*. FEMS Microbiol Rev, 2009. **33**(2): p. 376-93.
38. Reuse, D., *Microbial pathogenomics*. 2009.
39. Al-Daraghi, *Detection of Exotoxin A gene in Pseudomonas aeruginosa from Clinical and Environmental samples*. Journal of Al-Nahrain University, 2013.

40. Maatallah, M., et al., *Population structure of Pseudomonas aeruginosa from five Mediterranean countries: evidence for frequent recombination and epidemic occurrence of CC235*. PLoS One. **6**(10): p. e25617.
41. Cornelis, *Pseudomonas Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press, 2008.
42. Driscoll, J.A., S.L. Brody, and M.H. Kollef, *The epidemiology, pathogenesis and treatment of Pseudomonas aeruginosa infections*. Drugs, 2007. **67**(3): p. 351-68.
43. Kerr, K.G. and A.M. Snelling, *Pseudomonas aeruginosa: a formidable and ever-present adversary*. J Hosp Infect, 2009. **73**(4): p. 338-44.
44. Kim, H.S., et al., *Clinical characteristics and outcomes of Pseudomonas aeruginosa bacteremia in febrile neutropenic children and adolescents with the impact of antibiotic resistance: a retrospective study*. BMC Infect Dis. **17**(1): p. 500.
45. Lister, P.D., D.J. Wolter, and N.D. Hanson, *Antibacterial-resistant Pseudomonas aeruginosa: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms*. Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(4): p. 582-610.
46. Gjerde, H. and A. Mishra, *Contact lens-related Pseudomonas aeruginosa keratitis in a 49-year-old woman*. CMAJ. **190**(2): p. E54.
47. Mittal, R., et al., *Current concepts in the pathogenesis and treatment of chronic suppurative otitis media*. J Med Microbiol. **64**(10): p. 1103-16.
48. Bassetti, M., et al., *How to manage Pseudomonas aeruginosa infections*. Drugs Context. **7**: p. 212527.
49. Chiriac, A., et al., *Chloronychia: green nail syndrome caused by Pseudomonas aeruginosa in elderly persons*. Clin Interv Aging. **10**: p. 265-7.
50. Ross, J.J. and H. Shamsuddin, *Sternoclavicular septic arthritis: review of 180 cases*. Medicine (Baltimore), 2004. **83**(3): p. 139-48.
51. Ding, C., et al., *Prevalence of Pseudomonas aeruginosa and antimicrobial-resistant Pseudomonas aeruginosa in patients with pneumonia in mainland China: a systematic review and meta-analysis*. Int J Infect Dis. **49**: p. 119-28.
52. Lamas Ferreiro, J.L., et al., *Pseudomonas aeruginosa urinary tract infections in hospitalized patients: Mortality and prognostic factors*. PLoS One. **12**(5): p. e0178178.
53. Shi, Q., et al., *A retrospective analysis of Pseudomonas aeruginosa bloodstream infections: prevalence, risk factors, and outcome in carbapenem-susceptible and -non-susceptible infections*. Antimicrob Resist Infect Control. **8**: p. 68.
54. Turner, K.H., et al., *Requirements for Pseudomonas aeruginosa acute burn and chronic surgical wound infection*. PLoS Genet. **10**(7): p. e1004518.
55. ECDC, *Point prevalence survey of healthcare associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals*. 2013.
56. Ruiz-Garbajosa, P. and R. Canton, *Epidemiology of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa. Implications for empiric and definitive therapy*. Rev Esp Quimioter. **30 Suppl 1**: p. 8-12.
57. Fujitani, 2010-2017.
58. Gupta, K., T.M. Hooton, and W.E. Stamm, *Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community-acquired urinary tract infections*. Ann Intern Med, 2001. **135**(1): p. 41-50.
59. Hatchette, T.F., R. Gupta, and T.J. Marrie, *Pseudomonas aeruginosa community-acquired pneumonia in previously healthy adults: case report and review of the literature*. Clin Infect Dis, 2000. **31**(6): p. 1349-56.
60. Tsuji, *Community-acquired Pseudomonas aeruginosa pneumonia in previously healthy patients*. MM Case Reports, 2014.

61. Magiorakos, A.P., et al., *Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance*. Clin Microbiol Infect. **18**(3): p. 268-81.
62. Ikonomidis, A., et al., *Efflux system overexpression and decreased OprD contribute to the carbapenem heterogeneity in Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett, 2008. **279**(1): p. 36-9.
63. Lee, J.Y. and K.S. Ko, *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): p. 168-72.
64. Livermore, D.M., *Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa: our worst nightmare?* Clin Infect Dis, 2002. **34**(5): p. 634-40.
65. Balasoiu, M., et al., *Pseudomonas aeruginosa resistance phenotypes and phenotypic highlighting methods*. Curr Health Sci J. **40**(2): p. 85-92.
66. Moradali, M.F., S. Ghods, and B.H. Rehm, *Pseudomonas aeruginosa Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence*. Front Cell Infect Microbiol. **7**: p. 39.
67. Strateva, T. and D. Yordanov, *Pseudomonas aeruginosa - a phenomenon of bacterial resistance*. J Med Microbiol, 2009. **58**(Pt 9): p. 1133-48.
68. Pappa, O., et al., *Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of Pseudomonas aeruginosa Isolates Recovered from Greek Aquatic Habitats Implementing the Double-Locus Sequence Typing Scheme*. Microb Ecol. **74**(1): p. 78-88.
69. Meletis, *Pseudomonas aeruginosa: Multi-Drug-Resistance Development and Treatment Options*. 2013.
70. Lee, J.K., et al., *Alterations in the GyrA and GyrB subunits of topoisomerase II and the ParC and ParE subunits of topoisomerase IV in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa*. Int J Antimicrob Agents, 2005. **25**(4): p. 290-5.
71. Potron, A., L. Poirel, and P. Nordmann, *Emerging broad-spectrum resistance in Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii: Mechanisms and epidemiology*. Int J Antimicrob Agents. **45**(6): p. 568-85.
72. Poirel, L., T. Naas, and P. Nordmann, *Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases*. Antimicrob Agents Chemother. **54**(1): p. 24-38.
73. Lin, S.P., et al., *Phenotypic detection and polymerase chain reaction screening of extended-spectrum beta-lactamases produced by Pseudomonas aeruginosa isolates*. J Microbiol Immunol Infect. **45**(3): p. 200-7.
74. Weldhagen, G.F., L. Poirel, and P. Nordmann, *Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in Pseudomonas aeruginosa: novel developments and clinical impact*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(8): p. 2385-92.
75. Laudy, A.E., et al., *Prevalence of ESBL-producing Pseudomonas aeruginosa isolates in Warsaw, Poland, detected by various phenotypic and genotypic methods*. PLoS One. **12**(6): p. e0180121-e0180121.
76. Peymani, A., et al., *Distribution of bla(TEM), bla(SHV), and bla(CTX-M) genes among ESBL-producing P. aeruginosa isolated from Qazvin and Tehran hospitals, Iran*. Journal of preventive medicine and hygiene. **58**(2): p. E155-E160.
77. Rawat, D. and D. Nair, *Extended-spectrum β -lactamases in Gram Negative Bacteria*. Journal of global infectious diseases. **2**(3): p. 263-274.
78. Garza-Ramos, U., et al., *Widespread of ESBL- and carbapenemase GES-type genes on carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa clinical isolates: a multicenter study in Mexican hospitals*. Diagn Microbiol Infect Dis. **81**(2): p. 135-7.

79. Vatcheva-Dobrevska, R., et al., *Molecular epidemiology and multidrug resistance mechanisms of Pseudomonas aeruginosa isolates from Bulgarian hospitals*. Microb Drug Resist. **19**(5): p. 355-61.
80. Poirel, L., et al., *BEL-1, a novel clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In120 in Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(9): p. 3743-8.
81. Bradford, P.A., *Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat*. Clin Microbiol Rev., 2001.
82. Chen, Z., et al., *Prevalence of ESBLs-producing Pseudomonas aeruginosa isolates from different wards in a Chinese teaching hospital*. International journal of clinical and experimental medicine. **8**(10): p. 19400-19405.
83. Poirel, L., et al., *A nosocomial outbreak of Pseudomonas aeruginosa isolates expressing the extended-spectrum beta-lactamase GES-2 in South Africa*. (0305-7453 (Print)).
84. Japoni, A., et al., *Antibiotic Susceptibility Patterns and Molecular Epidemiology of Metallo-beta-Lactamase Producing Pseudomonas Aeruginosa Strains Isolated From Burn Patients*. Iran Red Crescent Med J. **16**(5): p. e10916.
85. Walsh, T.R., et al., *Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm?* Clin Microbiol Rev, 2005. **18**(2): p. 306-25.
86. Cornaglia, G., H. Giamarellou, and G.M. Rossolini, *Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams?* Lancet Infect Dis. **11**(5): p. 381-93.
87. Johnson, A.P. and N. Woodford, *Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance*. J Med Microbiol. **62**(Pt 4): p. 499-513.
88. Patel, G. and R.A. Bonomo, *"Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases*. Front Microbiol. **4**: p. 48.
89. Pasteran, F., et al., *Novel variant (bla(VIM-11)) of the metallo-{beta}-lactamase bla(VIM) family in a GES-1 extended-spectrum-{beta}-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa clinical isolate in Argentina*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(1): p. 474-5.
90. Dubois, V., et al., *Molecular characterization of a novel class 1 integron containing bla(GES-1) and a fused product of aac3-Ib/aac6'-Ib' gene cassettes in Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(3): p. 638-45.
91. Castanheira, M., et al., *Emergence of the extended-spectrum beta-lactamase GES-1 in a Pseudomonas aeruginosa strain from Brazil: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(6): p. 2344-5.
92. Mavroidi, A., et al., *An integron-associated beta-lactamase (IBC-2) from Pseudomonas aeruginosa is a variant of the extended-spectrum beta-lactamase IBC-1*. J Antimicrob Chemother, 2001. **48**(5): p. 627-30.
93. Sevillano, E., L. Gallego, and J.M. Garcia-Lobo, *First detection of the OXA-40 carbapenemase in P. aeruginosa isolates, located on a plasmid also found in A. baumannii*. Pathol Biol (Paris), 2009. **57**(6): p. 493-5.
94. El Garch, F., et al., *OXA-198, an acquired carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. **55**(10): p. 4828-33.
95. Riley, L.W. and R.E. Blanton, *Advances in Molecular Epidemiology of Infectious Diseases: Definitions, Approaches, and Scope of the Field*. Microbiol Spectr. **6**(6).
96. Eybpoosh, S., et al., *Molecular epidemiology of infectious diseases*. Electron Physician. **9**(8): p. 5149-5158.

97. Russell, C.A., et al., *Influenza vaccine strain selection and recent studies on the global migration of seasonal influenza viruses*. Vaccine, 2008. **26 Suppl 4**: p. D31-4.
98. Lemey, P., et al., *Unifying viral genetics and human transportation data to predict the global transmission dynamics of human influenza H3N2*. PLoS pathogens. **10**(2): p. e1003932-e1003932.
99. Magiorkinis, G., et al., *Integrating phylodynamics and epidemiology to estimate transmission diversity in viral epidemics*. PLoS computational biology. **9**(1): p. e1002876-e1002876.
100. Alizon, S., et al., *Quantifying the epidemic spread of Ebola virus (EBOV) in Sierra Leone using phylodynamics*. Virulence. **5**(8): p. 825-827.
101. Yebra, G., et al., *Analysis of the history and spread of HIV-1 in Uganda using phylodynamics*. The Journal of general virology. **96**(Pt 7): p. 1890-1898.
102. Yamazaki, Y., et al., *Outbreaks of influenza B infection and pneumococcal pneumonia at a mental health facility in Japan*. J Infect Chemother. **23**(12): p. 837-840.
103. Williams, S., et al., *Salmonella in the tropical household environment--Everyday, everywhere*. J Infect. **71**(6): p. 642-8.
104. Anderson, M., P.J. Sansonetti, and B.S. Marteyn, *Shigella Diversity and Changing Landscape: Insights for the Twenty-First Century*. Front Cell Infect Microbiol. **6**: p. 45.
105. Okoro, C.K., et al., *High-resolution single nucleotide polymorphism analysis distinguishes recrudescence and reinfection in recurrent invasive nontyphoidal Salmonella typhimurium disease*. Clin Infect Dis. **54**(7): p. 955-63.
106. Musso, D., et al., *Potential sexual transmission of Zika virus*. Emerg Infect Dis. **21**(2): p. 359-61.
107. Turmel, J.M., et al., *Late sexual transmission of Zika virus related to persistence in the semen*. Lancet. **387**(10037): p. 2501.
108. Christie, A., et al., *Possible sexual transmission of Ebola virus - Liberia, 2015*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. **64**(17): p. 479-81.
109. Mate, S.E., et al., *Molecular Evidence of Sexual Transmission of Ebola Virus*. N Engl J Med. **373**(25): p. 2448-54.
110. Snitkin, E.S., et al., *Tracking a hospital outbreak of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae with whole-genome sequencing*. Sci Transl Med. **4**(148): p. 148ra116.
111. Singh, A., et al., *Application of molecular techniques to the study of hospital infection*. Clinical microbiology reviews, 2006. **19**(3): p. 512-530.
112. Salipante, S.J., et al., *Application of whole-genome sequencing for bacterial strain typing in molecular epidemiology*. Journal of clinical microbiology. **53**(4): p. 1072-1079.
113. Proctor, L.M., *Mycins v Microbes Missing Microbes: How the Overuse of Antibiotics Is Fueling Our Modern Plagues* by Martin J. Blaser (2014) Holt New York, USA. FASEB J. **28**(9): p. 3821-3822.
114. Riley, L.W., E. Raphael, and E. Faerstein, *Obesity in the United States - dysbiosis from exposure to low-dose antibiotics?* Front Public Health. **1**: p. 69.
115. Sabat, A.J., et al., *Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance*. Euro Surveill. **18**(4): p. 20380.
116. van Belkum, A., et al., *Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology*. Clin Microbiol Infect, 2007. **13 Suppl 3**: p. 1-46.
117. Adzitey, F., N. Huda, and G.R. Ali, *Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks*. 3 Biotech. **3**(2): p. 97-107.
118. Ranjbar, R., et al., *Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide*. New Microbiol. **37**(1): p. 1-15.

119. Castro-Escarpulli, *Identification and Typing Methods for the Study of Bacterial Infections: a Brief Review and Mycobacterial as Case of Study*. Archives of Clinical Microbiology,, 2015.
120. Hong, D.J., *Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing Pseudomonas aeruginosa*. Infect Chemother. , 2015.
121. Donelli, G., C. Vuotto, and P. Mastromarino, *Phenotyping and genotyping are both essential to identify and classify a probiotic microorganism*. Microb Ecol Health Dis. **24**.
122. Kuhn, G., P. Francioli, and D.S. Blanc, *Double-locus sequence typing using *clfB* and *spa*, a fast and simple method for epidemiological typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(1): p. 54-62.
123. Basset, P., et al., *Staphylococcus aureus *clfB* and *spa* alleles of the repeat regions are segregated into major phylogenetic lineages*. Infect Genet Evol, 2009. **9**(5): p. 941-7.
124. Vogel, V., et al., *Short term evolution of a highly transmissible methicillin-resistant Staphylococcus aureus clone (ST228) in a tertiary care hospital*. PLoS One. **7**(6): p. e38969.
125. Basset, P. and D.S. Blanc, *Fast and simple epidemiological typing of Pseudomonas aeruginosa using the double-locus sequence typing (DLST) method*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **33**(6): p. 927-32.
126. Stojanov, M., et al., *Development and evaluation of double locus sequence typing for molecular epidemiological investigations of Clostridium difficile*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **35**(2): p. 175-81.
127. Ahmed, M.U., et al., *Double-locus sequence typing using *porA* and *peb1A* for epidemiological studies of Campylobacter jejuni*. Foodborne Pathog Dis. **11**(3): p. 194-9.
128. Lewin, Genes VIII (πρώτος τόμος), Ακαδημαϊκές εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε, 2004.
129. Vu-Thien, H., et al., *Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for longitudinal survey of sources of Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis patients*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(10): p. 3175-83.
130. Onteniente, L., et al., *Evaluation of the polymorphisms associated with tandem repeats for Pseudomonas aeruginosa strain typing*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(11): p. 4991-7.
131. Cholley, P., et al., *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): p. 274-7.
132. Feil, E.J., et al., *eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data*. J Bacteriol, 2004. **186**(5): p. 1518-30.
133. Siarkou, V.I., et al., *Diversification and Distribution of Ruminant Chlamydia abortus Clones Assessed by MLST and MLVA*. PLoS One. **10**(5): p. e0126433-e0126433.
134. Hananta, I.P.Y., et al., *Molecular epidemiology of Neisseria gonorrhoeae strains circulating in Indonesia using multi-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) and Neisseria gonorrhoeae multi-antigen sequence typing (NG-MAST) techniques*. BMC infectious diseases. **18**(1): p. 7-7.
135. Francisco, A.P., et al., *Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach*. BMC Bioinformatics, 2009. **10**: p. 152.
136. Zheng, Y., et al., *Clostridium difficile colonization in preoperative colorectal cancer patients*. Oncotarget. **8**(7): p. 11877-11886.
137. Cormen, *Introduction to Algorithms*. MIT Press, 2001.
138. Kruskal, *On the shortest spanning subtree of a graph and*

- the traveling salesman problem*. Proceedings of the American Mathematical Society, 1956.
139. Salipante, S.J. and B.G. Hall, *Inadequacies of minimum spanning trees in molecular epidemiology*. J Clin Microbiol. **49**(10): p. 3568-75.
 140. Κεφάλια, Α.Μ., *Μοριακή ανάλυση και τυποποίηση κλινικών στελεχών Pseudomonas aeruginosa χρησιμοποιώντας σύγχρονες και καινοτόμες τυποποιητικές μεθόδους*, in *Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής*. 2018, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης.
 141. Fothergill, J.L., et al., *Diagnostic multiplex PCR assay for the identification of the Liverpool, Midlands 1 and Manchester CF epidemic strains of Pseudomonas aeruginosa*. J Cyst Fibros, 2008. **7**(3): p. 258-61.
 142. Castanheira, M., et al., *Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(12): p. 4654-61.
 143. Lee, S., et al., *Prevalence of Ambler class A and D beta-lactamases among clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa in Korea*. J Antimicrob Chemother, 2005. **56**(1): p. 122-7.
 144. NSPH / CPHL KEELPNO, *ECDC WORKSHOP EuSCAPE Capacity building workshop «Train the trainer» Vari, Attica, Greece*
2013.
 145. Sakwinska, O., et al., *Genetic diversity and ecological success of Staphylococcus aureus strains colonizing humans*. Appl Environ Microbiol, 2009. **75**(1): p. 175-83.
 146. Prestinaci, F., P. Pezzotti, and A. Pantosti, *Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon*. Pathog Glob Health. **109**(7): p. 309-18.
 147. Mehrad, B., et al., *Antimicrobial resistance in hospital-acquired gram-negative bacterial infections*. Chest. **147**(5): p. 1413-1421.
 148. Laxminarayan, R., et al., *Antibiotic resistance-the need for global solutions*. Lancet Infect Dis. **13**(12): p. 1057-98.
 149. Maraki, S., et al., *Susceptibility of 2,252 Pseudomonas aeruginosa Clinical Isolates Over 4 Years to 9 Antimicrobials in a Tertiary Greek Hospital*. Chemotherapy. **60**(5-6): p. 334-41.
 150. Pena, C., et al., *Nosocomial spread of Pseudomonas aeruginosa producing the metallo-beta-lactamase VIM-2 in a Spanish hospital: clinical and epidemiological implications*. Clin Microbiol Infect, 2007. **13**(10): p. 1026-9.
 151. Siarkou, V.I., et al., *Molecular epidemiology of outbreak-related pseudomonas aeruginosa strains carrying the novel variant blaVIM-17 metallo-beta-lactamase gene*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(4): p. 1325-30.
 152. Tsakris, A., et al., *Outbreak of infections caused by Pseudomonas aeruginosa producing VIM-1 carbapenemase in Greece*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(3): p. 1290-2.
 153. Koutsogiannou, M., et al., *Spread of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa clones in a university hospital*. J Clin Microbiol. **51**(2): p. 665-8.
 154. Tsakris, A., et al., *A simple phenotypic method for the differentiation of metallo-beta-lactamases and class A KPC carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates*. J Antimicrob Chemother. **65**(8): p. 1664-71.
 155. Gutierrez, O., et al., *Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in Pseudomonas aeruginosa isolates from Spanish hospitals*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(12): p. 4329-35.
 156. Castanheira, M., et al., *Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible Pseudomonas aeruginosa collected during 2009-11 in 14 European and Mediterranean countries*. J Antimicrob Chemother. **69**(7): p. 1804-14.

157. Ferreira, K.M., et al., *First case of infection by metallo-beta-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa in Mato Grosso do Sul, Brazil*. Braz J Infect Dis. **21**(3): p. 359-360.
158. Hashem, H., et al., *Dissemination of metallo-beta-lactamase in Pseudomonas aeruginosa isolates in Egypt: mutation in blaVIM-4*. APMIS. **125**(5): p. 499-505.
159. Jabalameli, F., et al., *Prevalence of metallo-beta-lactamase-encoding genes among carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa strains isolated from burn patients in Iran*. Rev Soc Bras Med Trop. **51**(3): p. 270-276.
160. Cornaglia, G., et al., *Hospital outbreak of carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa producing VIM-1, a novel transferable metallo-beta-lactamase*. Clin Infect Dis, 2000. **31**(5): p. 1119-25.
161. Lagatolla, C., et al., *Endemic carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa with acquired metallo-beta-lactamase determinants in European hospital*. Emerg Infect Dis, 2004. **10**(3): p. 535-8.
162. Giakkoupi, P., et al., *Spread of integron-associated VIM-type metallo-beta-lactamase genes among imipenem-nonsusceptible Pseudomonas aeruginosa strains in Greek hospitals*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(2): p. 822-5.
163. Mavroidi, A., et al., *Carbapenem-hydrolysing VIM-2 metallo- beta-lactamase in Pseudomonas aeruginosa from Greece*. J Antimicrob Chemother, 2000. **46**(6): p. 1041-2.
164. Henrichfreise, B., et al., *Detection of VIM-2 metallo-beta-lactamase in Pseudomonas aeruginosa from Germany*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(4): p. 1668-9.
165. Patzer, J.A., et al., *Emergence and persistence of integron structures harbouring VIM genes in the Children's Memorial Health Institute, Warsaw, Poland, 1998-2006*. J Antimicrob Chemother, 2009. **63**(2): p. 269-73.
166. Yatsuyanagi, J., et al., *Class 1 integron containing metallo-beta-lactamase gene blaVIM-2 in Pseudomonas aeruginosa clinical strains isolated in Japan*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(2): p. 626-8.
167. Yu, Y.S., et al., *Integrations containing the VIM-2 metallo-beta-lactamase gene among imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa strains from different Chinese hospitals*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(11): p. 4242-5.
168. Toleman, M.A., et al., *blaVIM-2-harboring integrons isolated in India, Russia, and the United States arise from an ancestral class 1 integron predating the formation of the 3' conserved sequence*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(7): p. 2636-8.
169. Yakupogullari, Y., et al., *Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa isolate co-expressing extended-spectrum beta-lactamase PER-1 and metallo-beta-lactamase VIM-2 from Turkey*. J Antimicrob Chemother, 2008. **61**(1): p. 221-2.
170. Walsh, F. and T.R. Rogers, *Detection of blaVIM-2 carbapenemase in Pseudomonas aeruginosa in Ireland*. J Antimicrob Chemother, 2008. **61**(1): p. 219-20.
171. Mendes, R.E., et al., *First isolation of bla(VIM-2) in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(4): p. 1433-4.
172. Lee, K., et al., *bla(VIM-2) cassette-containing novel integrons in metallo-beta-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa and Pseudomonas putida isolates disseminated in a Korean hospital*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(4): p. 1053-8.
173. Logan, L.K., et al., *Multidrug- and Carbapenem-Resistant Pseudomonas aeruginosa in Children, United States, 1999-2012*. Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society. **6**(4): p. 352-359.

174. Kazmierczak, K.M., et al., *Multiyear, Multinational Survey of the Incidence and Global Distribution of Metallo-beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. **60**(2): p. 1067-78.
175. Libisch, B., et al., *Molecular typing indicates an important role for two international clonal complexes in dissemination of VIM-producing Pseudomonas aeruginosa clinical isolates in Hungary*. Res Microbiol, 2008. **159**(3): p. 162-8.
176. Aubert, D., et al., *Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(6): p. 1615-20.
177. Bert, F., C. Branger, and N. Lambert-Zechovsky, *Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in Pseudomonas aeruginosa using PCR-restriction fragment length polymorphism*. J Antimicrob Chemother, 2002. **50**(1): p. 11-8.
178. Campo Esquisabel, A.B., et al., *Mechanisms of resistance in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa less susceptible to cefepime than to ceftazidime*. Clin Microbiol Infect. **17**(12): p. 1817-22.
179. Pena, C., et al., *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, 2009. **47**(8): p. 2381-7.
180. Evans, B.A. and S.G. Amyes, *OXA beta-lactamases*. Clin Microbiol Rev. **27**(2): p. 241-63.
181. Carrer, A., et al., *Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae isolates in Istanbul, Turkey*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(8): p. 2950-4.
182. Ece, G., et al., *Detection of blaOXA-48 and clonal relationship in carbapenem resistant K. pneumoniae isolates at a tertiary care center in Western Turkey*. J Infect Public Health. **11**(5): p. 640-642.
183. Candevir Ulu, A., et al., *Molecular epidemiology of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae at a Turkish centre: Is the increase of resistance a threat for Europe? J Glob Antimicrob Resist.* **11**: p. 10-16.
184. Nazik, H., et al., *Coexistence of blaOXA-48 and aac(6')-Ib-cr genes in Klebsiella pneumoniae isolates from Istanbul, Turkey*. J Int Med Res. **39**(5): p. 1932-40.
185. van Duin, D. and Y. Doi, *The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*. Virulence. **8**(4): p. 460-469.
186. Nordmann, P., T. Naas, and L. Poirel, *Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis. **17**(10): p. 1791-8.
187. Mairi, A., et al., *OXA-48-like carbapenemases producing Enterobacteriaceae in different niches*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **37**(4): p. 587-604.
188. Nordmann, P. and L. Poirel, *The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide*. Clin Microbiol Infect. **20**(9): p. 821-30.
189. Tissot, F., et al., *New genotyping method discovers sustained nosocomial Pseudomonas aeruginosa outbreak in an intensive care burn unit*. J Hosp Infect. **94**(1): p. 2-7.
190. Slekovec, C., et al., *Tracking down antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates in a wastewater network*. PLoS One. **7**(12): p. e49300.
191. Cholley, P., et al., *Most multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates from hospitals in eastern France belong to a few clonal types*. J Clin Microbiol. **49**(7): p. 2578-83.
192. Cholley, P., et al., *Population structure of clinical Pseudomonas aeruginosa from West and Central African countries*. PLoS One. **9**(9): p. e107008.

193. Darch, S.E., et al., *Recombination is a key driver of genomic and phenotypic diversity in a Pseudomonas aeruginosa population during cystic fibrosis infection*. Scientific reports. **5**: p. 7649-7649.
194. WHO, *Prevention of hospital-acquired infections : a practical guide* 2002.
195. Wang, L., et al., *Epidemiology and risk factors for nosocomial infection in the respiratory intensive care unit of a teaching hospital in China: A prospective surveillance during 2013 and 2015*. BMC infectious diseases. **19**(1): p. 145-145.
196. Yallew, W.W., A. Kumie, and F.M. Yehuala, *Risk factors for hospital-acquired infections in teaching hospitals of Amhara regional state, Ethiopia: A matched-case control study*. PLoS One. **12**(7): p. e0181145-e0181145.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας Ι: Χαρακτηριστικά και προφίλ μικροβιακής αντοχής των 72 κλινικών καλλιεργημάτων *P. aeruginosa* της συλλογής από τα 2 νοσοκομεία, N1 και N2.

ID	ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ	ΜΟΝΑΔΑ ΝΟΣΗΛΕΙΑΣ	ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	DLST			Zone diameter breakpoint(mm)/EUCAST 2017									ΠΡΟΦΙΛ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ
					DLST ms 172	DLST ms 217	DLST τύπος	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	N1	11/3/2017	ΚΡΑΤΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ	ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	1	1	82-54	10	9	20	11	20	21	33	19	6	R3a: CARB-S, EDTA(-), AmpC, FEP R
2	N1	1/2/2017	ΜΕΘ	ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	1	1	6-28	16	15	21	25	23	24	34	24	32	S: AmpC
3	N1	10/3/2017	ΜΕΘ	ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	0	1		18	15	27	22	26	25	36	26	28	S: AmpC
4	N1	10/8/2016	ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΟΡΘΟΠΕΔΙΚΗ	ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	1	1	32-39	6	6	23	14	15	13	13	6	6	R2c: CARB-R, EDTA(-)
5	N1	30/12/2016	ΨΥΧΙΑΤΡΙΚΗ	ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	1	1	63-73	20	15	26	23	28	24	32	24	30	S: AmpC
6	N1	9/1/2017	ΜΕΘ	ΚΦΚ	1	1	20-30	19	16	26	27	27	10	20	24	29	R6: CARB-R, EDTA(-), oprD, AmpC

7	N1	13/4/2017	ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ	ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	1	1	32-54	18	13	24	21	25	27	35	22	30	R4: CARB-S, EDTA(-), AmpC
8	N1	7/4/2017	ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ	ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	1	1	9-203	18	14	24	24	28	26	34	23	30	R4: CARB-S, EDTA(-), AmpC
9	N1	6/4/2017	ΜΕΘ	ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	1	1	24-49	18	16	24	21	28	25	36	24	28	S: AmpC
11	N1	2/6/2016	ΜΕΘ	ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	1	1	32-39	12	6	20	6	12	15	10	13	6	R3a: CARB-R, EDTA(-)
12	N1	14/11/2016	ΠΡΟ/ΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ	ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	1	1	135-102	23	22	28	28	32	27	38	24	36	S: AmpC
13	N1	29/10/2016	ΝΕΥΡΟΧΕΙΡΟΥΡ ΓΙΚΗ	ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	1	1	29-48	20	19	25	26	26	28	38	24	36	S: AmpC
15	N1	21/4/2017	ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜ ΙΑΚΗ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚ Η	ΚΦΚ	1	1	30-54	17	12	25	24	25	26	37	22	30	R4: CARB-S, EDTA(-), AmpC
16	N1	11/7/2016	ΜΕΘ	ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	1	1	57-100	16	12	25	28	28	25	33	25	30	R4: CARB-S, EDTA(-), AmpC
17	N1	29/7/2016	ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΜΟΝΑΔΑ	ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	1	1	67-39	19	12	24	6	27	11	14	25	28	R2a: CARB-R, EDTA(-), FEP R
18	N1	1/11/2016	ΜΕΘ	ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	1	1	90-139	21	19	26	19	26	30	36	28	6	R4: CARB-S, EDTA(-), AmpC

19	N1	26/7/2016	ΜΠΕΚ	ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	1	1	32-39	6	6	28	6	9	20	15	6	6	R2b: CARB-R, EDTA(-), efflux
20	N1	1/3/2017	ΠΡΟ/ΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ	ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	1	1	9-74	17	16	23	22	24	28	25	24	40	S: AmpC
21	N1	11/8/2016	ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜ ΙΑΚΗ ΟΡΘΟΠΕΔΙΚΗ	ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	1	1	32-39	6	6	24	6	9	12	13	6	6	R2c: CARB-R, EDTA(-)
22	N1	27/5/2016	ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜ ΙΑΚΗ ΟΡΘΟΠΕΔΙΚΗ	ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	1	1	22-44	6	6	24	6	10	13	13	6	6	R2c: CARB-R, EDTA(-)
23	N1	3/8/2016	ΚΡΑΤΙΚΗ ΟΡΘΟΠΕΔΙΚΗ	ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	1	1	32-39	6	6	24	6	9	14	13	6	6	R2c: CARB-R, EDTA(-)
24	N1	23/6/2016	ΜΕΘ	ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	1	1	32-39	6	6	21	13	14	13	14	6	6	R2c: CARB-R, EDTA(-)
25	N1	17/10/2016	ΠΝΕΥΜΟΝΟΛ ΟΓΙΚΗ	ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	1	1	40-48	12	13	24	22	26	26	33	24	28	R4: CARB-S, EDTA(-), AmpC
26	N1	21/6/2016	ΜΕΘ	ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	1	1	25-11	24	19	27	28	26	24	30	27	30	S: AmpC
27	N1	11/10/2016	ΜΕΘ	ΚΦΚ	1	1	12-54	16	13	25	24	26	24	34	22	28	R4: CARB-S, EDTA(-), AmpC

28	N2	26/5/2016	ΤΕΠ	ΠΤΥΕΛΑ	1	1	1-21	17	14	20	14	20	30	29	20	20	R3a: CARB-S, EDTA(-), AmpC, FEP R
29	N2	25/5/2016	ΜΑΦ/ΚΑΑ [Μονάδα Αυξημένης Φροντίδας/Κ έντρο Αναπνευστικ ής Ανεπάρκειας]	ΒΡΟΓΧΙΚΕΣ ΕΚΚΡΙΣΕΙΣ	1	1	1-83	19	14	13	6	9	11	9	9	28	R2c: CARB-R, EDTA(-)
30	N2	25/5/2016	ΜΑΦ/ΚΑΑ [Μονάδα Αυξημένης Φροντίδας/Κ έντρο Αναπνευστικ ής Ανεπάρκειας]	ΒΡΟΓΧΙΚΕΣ ΕΚΚΡΙΣΕΙΣ	1	1	19-93	18	10	17	15	14	20	27	14	25	R3b: CARB-S, EDTA(-), AmpC
31	N2	22/5/2016	ΤΕΠ	ΠΤΥΕΛΑ	1	1	32-39	6	6	14	6	10	6	6	6	6	R1a: CARB-R, EDTA(+)
32	N2	20/10/2016	5η ΠΝΕΥΜ/ΚΗ	ΠΤΥΕΛΑ	1	1	8-37	6	6	17	6	20	6	10	8	6	R2a: CARB-R, EDTA(-), FEP R
33	N2	14/10/2016	Π/Π [ΠΑΝΕΠΙΣΤΗ ΜΙΑΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ]	ΠΤΥΕΛΑ	1	1	32-39	6	6	24	6	8	6	6	13	6	R2c: CARB-R, EDTA(-)
35	N2	26/10/2016	ΚΑΑ/Κέντρο Αναπνευστικ ής Ανεπάρκειας	ΠΤΥΕΛΑ	1	1	28-77	6	6	27	10	14	14	10	6	6	R1a: CARB-R, EDTA(+)

36	N2	10/11/2016	Μ/ΚΑΑ [Μονάδα Εντατικής Θεραπείας/Κ ΕΝΤΡΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙ ΚΗΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ Σ]	ΟΥΡΑ	1	1	8-37	6	7	18	6	10	6	15	6	6	R2c: CARB-R, EDTA(-)
37	N2	19/11/2016	4η ΠΝΕΥΜ/ΚΗ	ΚΑΘΕΤΗΡΑΣ	1	1	8-37	6	8	15	6	6	6	6	6	6	R1a: CARB-R, EDTA(+)
38	N2	21/11/2016	Μ/ΠΠ [ΜΟΝΑΔΑ ΕΝΤΑΤΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ/Π ΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ]	ΠΤΥΕΛΑ	1	1	8-37	6	12	20	6	6	6	6	6	6	R1a: CARB-R, EDTA(+)
39	N2	1/12/2016	Μ/ΚΑΑ [Μονάδα Εντατικής Θεραπείας/Κ ΕΝΤΡΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙ ΚΗΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ Σ]	ΒΡΟΓΧΙΚΕΣ ΕΚΚΡΙΣΕΙΣ	1	1	8-37	6	7	18	6	12	6	13	6	6	R2c: CARB-R, EDTA(-)
40	N2	8/12/2016	Μ/ΚΑΑ [Μονάδα Εντατικής Θεραπείας/Κ ΕΝΤΡΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙ ΚΗΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ Σ]	ΒΡΟΓΧΙΚΕΣ ΕΚΚΡΙΣΕΙΣ	1	1	8-37	6	6	15	6	6	6	6	6	6	R1a: CARB-R, EDTA(+)
41	N2	19/12/2016	5η ΠΝΕΥΜ/ΚΗ	ΠΤΥΕΛΑ	1	1	32-39	6	6	16	6	6	6	6	6	6	R1a: CARB-R, EDTA(+)

43	N2	2/1/2016	Μ/ΚΑΑ [Μονάδα Εντατικής Θεραπείας/Κ ΕΝΤΡΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙ ΚΗΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ Σ]	ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	1	1	8-37	6	7	17	6	6	12	16	6	6	R2c: CARB-R, EDTA(-)
44	N2	10/1/2017	ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ	ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	1	1	8-37	6	8	22	6	8	6	6	6	6	R1a: CARB-R, EDTA(+)
45	N2	17/1/2017	Μ/ΚΑΑ [Μονάδα Εντατικής Θεραπείας/Κ ΕΝΤΡΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙ ΚΗΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ Σ]	ΚΑΘΕΤΗΡΑΣ	1	1	8-37	6	7	21	6	12	6	16	6	6	R2c: CARB-R, EDTA(-)
46	N2	23/1/2017	Μ/ΚΑΑ [Μονάδα Εντατικής Θεραπείας/Κ ΕΝΤΡΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙ ΚΗΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ Σ]	ΒΡΟΓΧΙΚΕΣ ΕΚΚΡΙΣΕΙΣ	1	1	28-77	6	6	23	6	20	6	6	6	6	R2d: CARB-R, EDTA(-), AmpC
47	N2	27/1/2017	7η ΠΝΕΥΜΟΝΟΛ ΟΓΙΚΗ	ΠΤΥΕΛΑ	1	1	17-14	6	6	32	6	13	8	13	9	14	R2c: CARB-R, EDTA(-)
48	N2	23/3/2017	ΜΑΦ/ΚΑΑ [Μονάδα Αυξημένης Φροντίδας/Κ έντρο Αναπνευστικ ής Ανεπάρκειας]	ΠΤΥΕΛΑ	1	1	32-39	10	6	6	6	6	20	13	6	6	R2b: CARB-R, EDTA(-), efflux

49	N2	23/3/2017	ΜΑΦ/ΚΑΑ [Μονάδα Αυξημένης Φροντίδας/Κ έντρο Αναπνευστικ ής Ανεπάρκειας]	ΒΡΟΓΧΙΚΕΣ ΕΚΚΡΙΣΕΙΣ	1	1	8-37	6	8	16	6	6	6	16	6	6	R1a: CARB-R, EDTA(+)
50	N2	23/3/2017	4η ΠΝΕΥΜΟΝΟΛ ΟΓΙΚΗ	ΠΤΥΕΛΑ	1	1	23-22	6	6	24	6	6	10	11	6	6	R1a: CARB-R, EDTA(+)
51	N2	30/3/2017	ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ	ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	1	1	8-37	10	12	22	6	20	11	6	6	6	R2a: CARB-R, EDTA(-), FEP R
52	N2	3/4/21017	Μ/ΠΠ [ΜΟΝΑΔΑ ΕΝΤΑΤΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ/Π ΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ]	ΒΡΟΓΧΙΚΕΣ ΕΚΚΡΙΣΕΙΣ	1	1	8-37	6	9	22	6	8	6	6	6	6	R1a: CARB-R, EDTA(+)
53	N2	1/5/2017	Μ/ΠΠ [ΜΟΝΑΔΑ ΕΝΤΑΤΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ/Π ΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ]	ΚΑΘΕΤΗΡΑΣ	1	1	8-37	6	8	18	6	6	6	6	6	6	R1a: CARB-R, EDTA(+), AmpC

54	N2	15/3/2017	Μ/ΠΠ [ΜΟΝΑΔΑ ΕΝΤΑΤΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ/Π ΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ]	ΒΡΟΓΧΙΚΕΣ ΕΚΚΡΙΣΕΙΣ	1	1	23-22	17	14	22	20	18	22	30	17	29	R3b: CARB-S, EDTA(-), AmpC
56	N2	19/8/2016	5η ΠΝΕΥΜΟΝΟΛ ΟΓΙΚΗ	ΠΤΥΕΛΑ	1	1	116- 144	14	13	16	6	11	25	9	6	9	R2b: CARB-R, EDTA(-), efflux
57	N2	17/8/2016	7η ΠΝΕΥΜΟΝΟΛ ΟΓΙΚΗ	WASHING	1	1	78-17	30	>35	40	6	30	>35	>35	>35	>35	R5: CARB-S, EDTA(-), FEP R
58	N2	21/8/2016	ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ	ΟΥΡΑ	1	1	32-39	11	11	14	6	17	27	15	6	6	R2b: CARB-R, EDTA(-), efflux
59	N2	21/8/2016	6η ΠΝΕΥΜΟΝΟΛ ΟΓΙΚΗ	ΠΤΥΕΛΑ	1	1	23-22	6	6	18	6	6	12	8	6	6	R1a: CARB-R, EDTA(+)
60	N2	23/8/2016	ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ	ΠΤΥΕΛΑ	1	1	21-26	20	17	29	21	26	29	30	20	32	S: AmpC
61	N2	23/8/2016	10η ΝΕΥΜΟΝΟΛΟ ΓΙΚΗ	ΠΤΥΕΛΑ	1	1	21-96	17	17	30	6	22	16	33	27	24	R2a: CARB-R, EDTA(-), FEP R

62	N2	21/8/2016	ΚΑΑ/Κέντρο Αναλνευστικ ής Ανεπάρκειας	ΒΡΟΓΧΙΚΕΣ ΕΚΚΡΙΣΕΙΣ	1	1	18-156	7	8	6	6	13	10	6	6	6	R1a: CARB-R, EDTA(+)
63	N2	22/8/2016	10η ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ	ΑΠΟΣΤΗΜΑ	1	1	18-156	13	11	8	8	11	10	6	6	6	R2c: CARB-R, EDTA(-)
64	N2	22/8/2016	Θ/Χ [ΘΩΡΑΚΟΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ]	ΠΥΟΝ	1	1	1-83	17	16	28	6	20	10	13	22	26	R2a: CARB-R, EDTA(-), FEP R
65	N2	28/8/2016	ΜΑΦ [ΜΟΝΑΔΑ ΑΥΞΗΜΕΝΗΣ ΦΡΟΝΤΙΔΑΣ]	ΒΡΟΓΧΙΚΕΣ ΕΚΚΡΙΣΕΙΣ	1	1	32-39	6	6	12	6	8	6	6	6	6	R1a: CARB-R, EDTA(+)
66	N2	24/8/2016	6η ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ	ΠΤΥΕΛΑ	1	1	32-52	14	11	28	22	21	20	32	20	32	R4: CARB-S, EDTA(-), AmpC
67	N2	28/8/2016	ΕΞΩΤΕΡΙΚΑ ΙΑΤΡΕΙΑ	ΠΤΥΕΛΑ	1	1	24-91	19	15	24	12	19	22	35	18	16	R3a: CARB-S, EDTA(-), AmpC, FEP R
68	N2	28/8/2016	6η ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ	ΠΤΥΕΛΑ	1	1	12-54	6	9	20	6	8	8	11	12	8	R2d: CARB-R, EDTA(-), AmpC

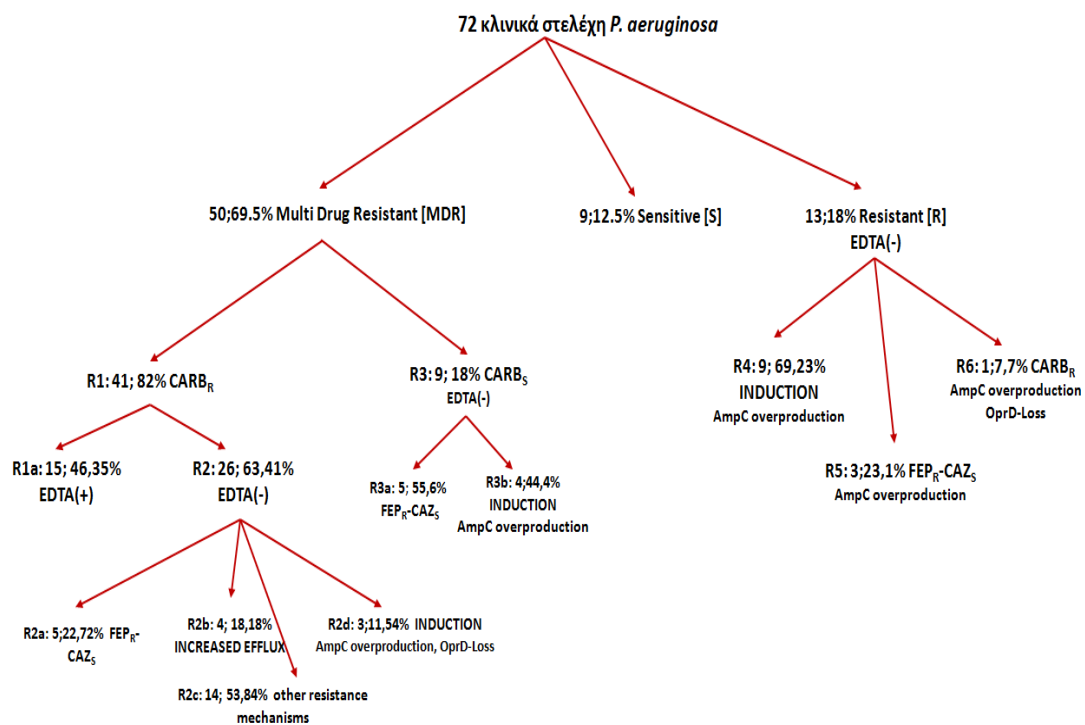
69	N2	25/8/2016	10η ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ	ΠΤΥΕΛΑ	1	1	4-101	16	13	24	20	20	24	31	18	26	R4: CARB-S, EDTA(-), AmpC
70	N2	25/8/2016	7η ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ	ΠΤΥΕΛΑ	1	1	28-217	13	12	20	9	17	26	30	18	18	R3b: CARB-S, EDTA(-), AmpC
71	N2	29/8/2016	10η ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ	ΒΡΟΓΧΙΚΕΣ ΕΚΚΡΙΣΕΙΣ	1	1	32-39	12	9	14	6	6	6	6	6	18	R1a: CARB-R, EDTA(+)
72	N2	29/8/2016	ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ	ΠΤΥΕΛΑ	1	1	28-25	25	23	27	6	21	30	34	30	27	R5: CARB-S, EDTA(-), AmpC FEP R
73	N2	1/9/2016	7η ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ	ΒΡΟΓΧΙΚΕΣ ΕΚΚΡΙΣΕΙΣ	1	1	28-57	11	10	22	9	18	16	25	18	18	R2d: CARB-R, EDTA(-), oprD, AmpC
74	N2	1/9/2016	5η ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ	ΠΤΥΕΛΑ	1	1	8-78	17	12	>35	6	30	>35	>35	>35	22	R3a: CARB-S, EDTA(-), FEP R
75	N2	30/8/2016	7η ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ	ΠΤΥΕΛΑ	1	1	20-30	16	14	23	17	17	23	26	16	11	R3b: CARB-S, EDTA(-), AmpC

76	N2	30/8/2016	7η ΠΝΕΥΜΟΝΟΛ ΟΓΙΚΗ	ΠΤΥΕΛΑ	1	1	9-19	22	15	25	6	24	26	29	19	34	R5: CARB-S, EDTA(-), AmpC, FEP R
77	N2	30/8/2016	9η ΠΝΕΥΜΟΝΟΛ ΟΓΙΚΗ	WASHING	1	1	15- 212	12	13	24	10	19	22	30	20	-	R3a: CARB-S, EDTA(-), AmpC, FEP R
PAO1	Collecti on of Institute Pasteur CIP1041 16				1	1	16-4										
NEQ AS	HPA External Quality Control Scheme				1	1	32-39										

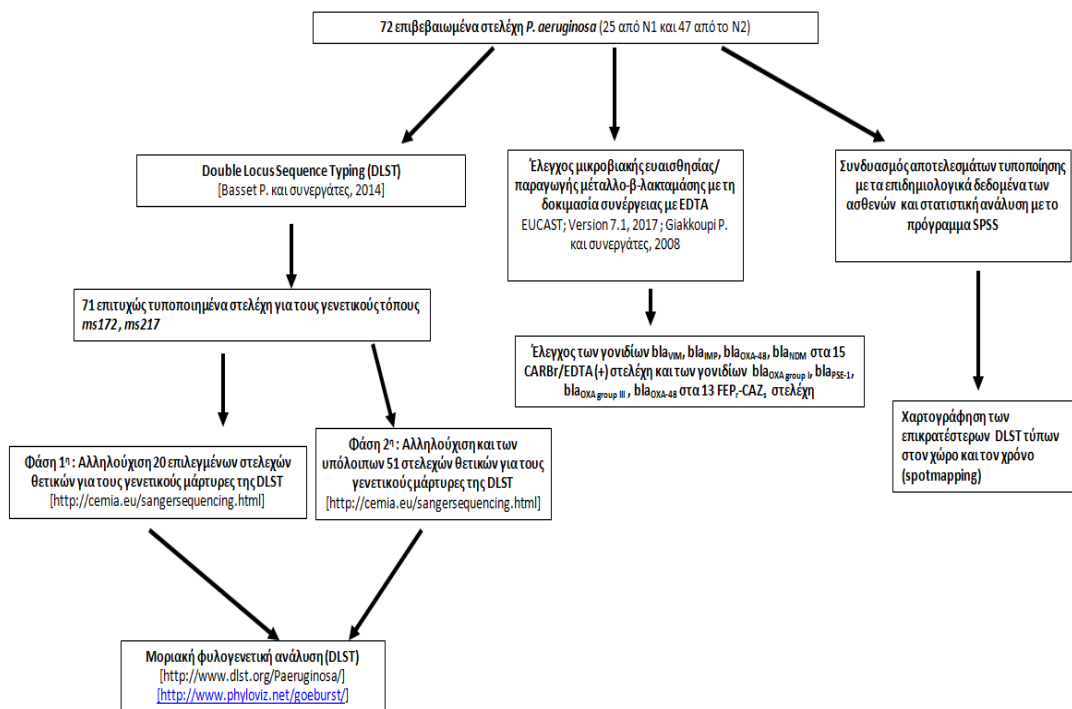
Πίνακας II. Καταγραφή των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, καθώς και των σχετικών με αυτούς πληροφοριών.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή	Tm (°C)	Γονίδιο στόχος	Βιβλιογραφία
NDM-F NDM-R	5'-TGGCAGCACACTTCTATC-3' 5'-AGATTGCCGAGCGACTTG-3'	58	bla _{NDM}	[ECDC WORKSHOP EuSCAPE Capacity building workshop «Train the trainer» NSPH / CPHL KEELPNO, Vari, Attica, Greece, 5-6 September 2013]
OXA-I/R OXA-I/F	5'-CCTGATAGTTGGCTGTGAGC-3' 5'-TGATGCCTAACCCCTCCATC-3'	57	bla _{OXA group I}	Lee et al. , 2005
PSE-1/F PSE-1/R	5'-AATGGCAATCAGCGCTTC-3' 5'-GCGCGACTGTGATGTATA-3'	55	bla _{PSE}	Lee et al. , 2005
OXA-III/F OXA-III/R	5'-AGCCGTAAAAATTAAGCCC-3' 5'-CTTGATTGAAGGTTGGGCG-3'	53	bla _{OXA group III}	Lee et al. , 2005
VIMc/F VIMc/R	5'-ATGGTGTGTTGGTCGCATATC-3' 5'-TGGGCCATTGAGCCAGATC-3'	55	bla _{VIM}	[ECDC WORKSHOP EuSCAPE Capacity building workshop «Train the trainer» NSPH / CPHL KEELPNO, Vari, Attica, Greece, 5-6 September 2013]
IMP-F IMP-R	5'-TGAGCAAGTTATCTGTATTC-3' 5'-GCTGCAACGACTTGTAG-3'	50	bla _{IMP}	Castanheira M. et al., 2004

OXA-48/F OXA-48/R	5'-TTGGTGGCATCGATTATCGG-3' 5'-GAGCACTTCTTTGTGATGGC-3'	57	bla _{OXA-48}	[ECDC WORKSHOP EuSCAPE Capacity building workshop «Train the trainer» NSPH / CPHL KEELPNO, Vari, Attica, Greece, 5-6 September 2013]
oprD-F oprD-R	5'-ATGAAAGTGATGAAGTGGAGC-3' 5'-CAGGATCGACAGCGGATAGT-3'	64	oprD	Basset P. & Blanc D.S. , 2014



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της κατανομής των ήδη καθορισμένων φαινοτύπων αντοχής στα 72 καλλιεργήματα της συλλογής *P. aeruginosa* (Κεφάλαια AM, μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία με τίτλο : «Μοριακή ανάλυση και τυποποίηση κλινικών στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* χρησιμοποιώντας σύγχρονες και καινοτόμες τυποποιητικές μεθόδους», Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, 2018)



Εικόνα II. Διαγραμματική απεικόνιση των συνολικών πειραματικών διαδικασιών.

ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΛΟΙΜΩΣΗΣ

ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο :

ή
Αρχικά (επίθετο-όνομα): ΕΠ:..... ΟΝ:.....

Φύλο: Α Γ

Ημερομηνία Γέννησης : Ημέρα _____/Μήνας _____/Έτος _____

ή
Ηλικία:

ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΑ/ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

1. Ημερομηνία Απομόνωσης		6. ΕΚΒΑΣΗ	
2. Είδος κλινικού δείγματος		α. Επιβίωση	
3. Εστία απομόνωσης		β. Βελτίωση	
4. Το ίδιο βακτηρίδιο απομονώθηκε στη ΜΕΘ σε άλλο ασθενή το προηγούμενο 10 ήμερο		γ. Θάνατος	
5. Αν είναι λοίμωξη ή αποικισμός ή αδιευκρίνιστης κλινικής σημασίας		7. VITEK	

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΣΘΕΝΟΥΣ

1. Ημερομηνία εισαγωγής (Εσωτερικός/Εξωτερικός ΑΣΘΕΝΗΣ)	
2. HOSPITAL ACQUIRED OR COMMUNITY /HEALTH CARE ASSOCIATE	
3. Μονάδα/Κλινική Νοσηλείας	
4. ΕΣΩΤΕΡΙΚΕΣ ΜΕΤΑΚΙΝΗΣΕΙΣ	
α. Υπάρχει καινό τμήμα βρογχοσκοπήσεων	
β. Υπάρχουν καινά πνευμονολογικά ιατρεία διάγνωσης	
γ. Μετακινήσεις από κλινική σε κλινική	
δ. Άλλες μετακινήσεις του ασθενούς	
5. Ημερομηνία Εξόδου	
6. ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΠΑΡΕΜΑΒΑΣΕΙΣ (Παρεμβατικός χειρισμός έως 72 ώρες πριν την έναρξη της βακτηριαιμίας)	
α. Κεντρικός φλεβικός καθετήρας	δ. Βρογχοσκόπηση
β. Ουροκαθετήρας	ε. Χειρουργική επέμβαση
γ. Διασωλήνωση	
7. ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΑΣΘΕΝΟΥΣ	
α. Έχει νοσηλευτεί τους προηγούμενους 6 μήνες?	
β. Έχει πάρει αντιβιοικά τους προηγούμενους 6 μήνες?	
γ. Νοσηλεύεται σε άλλο ίδρυμα (Long Term Care Facilities)?	
δ. Υπάρχει υποκείμενο νόσημα?	
ε. Έχει ταξιδέψει τους προηγούμενους 6 μήνες?	

1

Εικόνα III. Παράδειγμα του ερωτηματολογίου που χρησιμοποιήθηκε για την συλλογή δεδομένων από νοσηλευόμενους ασθενείς στα νοσοκομεία N1 και N2.