

ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Α. Τσακρής

Διατελέσαντες πρώην Διευθυντές:

Καθηγητής Ν. Ι. Λεγάκης 1996-2006

Αν. Καθηγήτρια Α. Τσελένη - Κωτσοβίλη 2006-2009

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ
ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *STREPTOCOCCUS*
*PNEUMONIAE***

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ Σ. ΦΛΟΥΝΤΖΗ

ΙΑΤΡΟΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ - ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2013

Ιπποκράτειος Όρκος στην Αρχαία Ελληνική

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἱστορας ποιεύμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε. Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωυτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξῃν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοις τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἱητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἵρξῃν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑψηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἄγνων δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἡγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγχεόντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. Παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιорκοῦντι, τάναντία τουτέων.

Ιπποκράτειος Όρκος στην Νέα Ελληνική

Ορκίζομαι στον Απόλλωνα τον Ιατρό και τον Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και σε όλους τους Θεούς επικαλούμενος τη μαρτυρία τους, να τηρήσω πιστά κατά τη δύναμη και την κρίση μου αυτό τον όρκο και το συμβόλαιό μου αυτό.

Να θεωρώ αυτόν που μου δίδαξε αυτήν την τέχνη ίσο με τους γονείς μου και να μοιραστώ μαζί του τα υπάρχοντά μου και τα χρήματά μου, αν έχει ανάγκη φροντίδας. Να θεωρώ τους απογόνους του ίσους με τα αδέρφια μου και να τους διδάξω την τέχνη αυτή αν θέλουν να τη μάθουν, χωρίς αμοιβή και συμβόλαιο.

Και να μεταδώσω με παραγγελιές, οδηγίες και συμβουλές όλη την υπόλοιπη γνώση μου και στα παιδιά μου και στα παιδιά εκείνου που με δίδαξε και στους άλλους μαθητές που έχουν κάνει γραπτή συμφωνία μαζί μου και σε αυτούς που έχουν ορκιστεί στον ιατρικό νόμο και σε κανέναν άλλο.

Και να θεραπεύω τους πάσχοντες κατά τη δύναμή μου και κατά την κρίση μου χωρίς ποτέ, εκουσίως, να τους βλάψω ή να τους αδικήσω.

Και να μη δώσω ποτέ σε κανένα, έστω και αν μου το ζητήσει, θανατηφόρο φάρμακο, ούτε να δώσω ποτέ τέτοια συμβουλή, ομοίως, να μη δώσω ποτέ σε γυναίκα φάρμακο για να αποβάλλει. Να διατηρήσω δε τη ζωή μου καθαρή και αγνή, και να μη χειρουργήσω πάσχοντες από λίθους, αλλά να αφήσω την πράξη αυτή για τους ειδικούς.

Και σε όποια σπίτια κι αν μπω, να μπω για την ωφέλεια των πασχόντων αποφεύγοντας κάθε εκούσια αδικία και βλάβη και κάθε γενετήσια πράξη και με γυναίκες και με άνδρες, ελεύθερους και δούλους.

Και ό,τι δω ή ακούσω κατά την άσκηση του επαγγέλματός μου, ή κι εκτός, για τη ζωή των ανθρώπων, που δεν πρέπει ποτέ να κοινοποιηθεί, να σιωπήσω και να το κρατήσω μυστικό.

Αν τον όρκο μου αυτό τηρήσω πιστά και δεν τον αθετήσω, είθε να απολαύσω για πάντα την εκτίμηση όλων των ανθρώπων για τη ζωή μου και για την τέχνη μου, αν όμως παραβώ και αθετήσω τον όρκο μου να υποστώ τα αντίθετα από αυτά.

Μέλη τριμμελούς επιτροπής: Καθηγητής κ. Ν. Ι. Λεγάκης
Αν. Καθηγητής κ. Λ. Τζουβελέκης (Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ)
Επ. Καθηγητής κ. Ι. Παπαπαρασκευάς

Ημερομηνία ορισμού τριμμελούς επιτροπής: 3 Φεβρουαρίου 2005

Ημερομηνία κατάθεσης πρωτοκόλλου: 4 Μαρτίου 2005

Ημερομηνία κατάθεσης πρώτης έκθεσης προόδου: 24 Ιουνίου 2009

Ημερομηνία κατάθεσης δεύτερης έκθεσης προόδου: 21 Απριλίου 2010

Ημερομηνία κατάθεσης τρίτης έκθεσης προόδου: 21 Μαρτίου 2011

Ημερομηνία κατάθεσης διατριβής: 16 Ιανουαρίου 2013

Ημερομηνία κρίσης διατριβής: 26 Μαρτίου 2013

Μέλη επταμελούς επιτροπής: Καθηγητής Κος Ν. Ι. Λεγάκης
Αν. Καθηγητής Κος Λ. Τζουβελέκης
Αν. Καθηγητής Κος Σ. Χατζηπαναγιώτου
Αν. Καθηγητής Κος Γ. Δαΐκος
Επ. Καθηγητής Κος Π. Τ. Τάσιος
Επ. Καθηγητής Κος Ι. Παπαπαρασκευάς
Επ. Καθηγήτρια Κα Ε. Πιπεράκη

Βαθμός διδακτορικής διατριβής: ΑΡΙΣΤΑ

Στους γονείς μου Σωτήρη & Βιβή Φλούντζη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
Βιογραφικό	8
Γενικό μέρος	10
1. Εισαγωγή	10
2. Γενικά μικροβιολογικά δεδομένα	12
3. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά	15
α. Μέθοδοι	15
β. Οδηγίες διεθνών οργανισμών (CLSI, EUCAST)	16
4. Μηχανισμοί αντοχής του πνευμονιοκόκκου και γενετική βάση της αντοχής	18
α. Μεταμόρφωση/Μετασχηματισμός	18
β. Τρανσποζόνια	19
5. Κατηγορίες αντιβιοτικών όπου εμφανίζεται αντοχή	20
α. β-λακτάμες	20
β. Μακρολίδες-λινκοσαμίδες-στρεπτογραμμίνες (MLS _B)	23
γ. Τετρακυκλίνες	29
δ. Κοτριμοξαζόλη	30
ε. Κινολόνες	31
στ. Χλωραμφαινικόλη	32
ζ. Ριφαμπικίνη	32
6. Επιδημιολογία της αντοχής στην Ελλάδα και διεθνώς	33
7. Παθογένεια-Παράγοντες λοιμογονικότητας	36
α. Έλυτρο	36
β. Πνευμονολυσίνη	37
γ. Αυτολυσίνη	38
δ. IgA πρωτεάση	38
8. Προδιαθεσικοί παράγοντες για πνευμονιοκοκκική νόσο	38
9. Αποικισμός από πνευμονιόκοκκο	39
10. Νόσοι από πνευμονιόκοκκο	40
α. Διεισδυτικές λοιμώξεις (μηνιγγίτιδα-μικροβιαμία)	40
β. Μη διεισδυτικές λοιμώξεις (μέση πυώδης ωτίτιδα-παραρρινοκολπίτιδα-πνευμονία)	42
11. Πρόληψη της νόσου - Εμβολιασμός κατά του πνευμονιοκόκκου	44
α. Επίδραση στην επίπτωση της νόσου	46
β. Επίδραση στην επιδημιολογία της αντοχής	48
12. Συμβατική Διάγνωση του πνευμονιοκόκκου	50
α. Καλλιέργεια	50
β. Αντιγόνο ούρων	51
13. Μοριακή γενετική του πνευμονιοκόκκου	51
α. Μοριακή διάγνωση της πνευμονιοκοκκικής νόσου	51
β. Μοριακή διερεύνηση της αντοχής	54
γ. Μοριακή τυποποίηση των στελεχών	55

Ειδικό μέρος	59
1. Σκοπός	60
2. Υλικό και Μέθοδοι	61
3. Αποτελέσματα	72
4. Συζήτηση - Συμπεράσματα	77
 Βιβλιογραφία	 87
 Παράρτημα 1 - Εικόνες και Γραφήματα	 111
 Παράρτημα 2 - Πίνακες Αποτελεσμάτων	 124
 Παράρτημα 3 – Δεδομένα νουκλεοτιδικών αλληλουχιών	 130
 Περίληψη	 160
 Summary	 162
 Ευχαριστίες	 164

Συνοπτικό Βιογραφικό Σημείωμα

Προσωπικά Στοιχεία

Πατρώνυμο: Σωτήριος
Υπηκοότητα: Ελληνική
Επάγγελμα: Ιατρός - Ειδικευμένη Βιοπαθολόγος
Ημ. Γέννησης: 06-04-1974
Διεύθυνση Οικίας: Αχιλλέως 12, Γλυφάδα
Κινητό Τηλέφωνο: 6943907065
e-mail address: aflountzi@med.uoa.gr, fanastasia@hotmail.com

Σπουδές

2001: Πτυχίο Ιατρικής με βαθμό αποφοίτησης «Λίαν Καλώς»
(Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης)
1994: Ιατρική σχολή Πανεπιστημίου Ρώμης «LA SAPIENZA»
1992: Απολυτήριο Λυκείου με βαθμό αποφοίτησης «Λίαν Καλώς»
(Βαρβάκειος Πειραματική Σχολή)

Υποψήφια Διδάκτωρ

Τίτλος Διδακτορικού: Μηχανισμοί ανοχής στα αντιβιοτικά στελεχών πνευμονιόκοκκου
Επιβλέπων Καθηγητής: Λεωνίδας Τζουβέλης, Αναπληρωτής Καθηγητής
Μικροβιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
Πανεπιστήμιο: Τμήμα Μικροβιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

Φοίτηση :

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα της Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας
με κατεύθυνση τα Λοιμώδη Νοσήματα (Σεπτέμβριος 2012).

Υποτροφίες

1999-2000: Υποτροφία από Ι.Κ.Υ. (Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών)-Κλινική
άσκηση τετράμηνης διάρκειας στην Γυναικολογική, Μαιευτική
και Νευρολογική Πανεπιστημιακή Κλινική της Ιατρικής Σχολής
του Πανεπιστημίου του Βερολίνου «Freie Universität»,
Νοσοκομείο «BENJAMIN FRANKLIN»

Ξένες Γλώσσες

Proficiency in English-University of Cambridge
First Certificate in English-University of Cambridge
Certificat Pratique de Langue Francaise Iere degree-Universite de
Paris-Sorbonne Paris IV
Γνώση Ιταλικής γλώσσας σε υψηλό επίπεδο
Γνώση Γερμανικής γλώσσας σε ικανοποιητικό επίπεδο
Γνώση Ισπανικής γλώσσας σε επίπεδο αρχαρίων

Επαγγελματική Εμπειρία

Απρίλιος 2011 Συμμετοχή στην Εκπαιδευτική διαδικασία του Μεταπτυχιακού
προγράμματος Δημόσιας Υγείας του Τομέα Μικροβιολογίας της
Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας.

Οκτώβριος 2009

-έως σήμερα

Έναρξη σύμβασης εργασίας στο Κεντρικό Εργαστήριο Δημόσιας
Υγείας (Κ.Ε.Δ.Υ.) του Κέντρου Ελέγχου Λοιμώξεων και
Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ)

α.Κέντρο αναφοράς Λεγεωνέλλας Νοτίου Ελλάδος
β.Εργαστήριο ανίχνευσης και μοριακής τυποποίησης ιών στα τρόφιμα

Ιούνιος 2009	Επιτυχούσα στις εξετάσεις ειδικότητας της Ιατρικής Βιοπαθολογίας.
06/2004 – 03/2009	Ειδικότητα στην Ιατρική Βιοπαθολογία στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Λαϊκό».
10/2007 – έως σήμερα	Εκπαιδευτρια στο Ι.Ε.Κ. του Ε.Κ.Α.Β. στο μάθημα της Μικροβιολογίας.
05/2003 – 06/2004	Βοηθός ερευνήτρια στο Εργαστήριο Μοριακής Διάγνωσης Βακτηριακών Λοιμώξεων στο Τμήμα Μικροβιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
2002-2003	12μηνη εργασία ως αγροτικός ιατρός στο Κέντρο Υγείας Σάμης Κεφαλληνίας
2001	3μηνη εργασία στο Γενικό Νομαρχιακό Νοσοκομείο Κεφαλληνίας στην Παθολογική, Καρδιολογική και Χειρουργική Κλινική (στα πλαίσια της τρίμηνης εκπαίδευσης ως αγροτικός ιατρός)
2001	3μηνη κλινική άσκηση στην Πανεπιστημιακή Χειρουργική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών (Ιπποκράτειο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών)
1999-2001	Κλινική άσκηση σε Πανεπιστημιακές Κλινικές της Ιατρικής Σχολής Κρήτης (ΠΕ.ΠΑ.Γ.Ν.Η)
1999-2000	Κλινική άσκηση στο νοσοκομείο «Benjamin Franklin» του Πανεπιστημίου του Βερολίνου «Freie Universitat», συνολικής διάρκειας 4μηνών στις ακόλουθες κλινικές: Μαιευτική, Γυναικολογία και Νευρολογία.
1998	Κλινική άσκηση 6μηνες διάρκειας στην Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου της Ρώμης «LA SAPIENZA»

Μέλος Επιστημονικών Εταιρειών

Μέλος του Ιατρικού Συλλόγου Αθηνών

Μέλος της Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας

Μέλος της Εταιρείας Κλινικής Μικροβιολογίας και Εργαστηριακής Διαγνωστικής

Μέλος της Εταιρείας Ιατρικής Βιοχημείας

Ερευνητική Δραστηριότητα

18 ερευνητικές εργασίες που παρουσιάστηκαν σε Ελληνικά και Ξένα Συνέδρια στους τομείς Μικροβιολογίας, Λοιμωξιολογίας και Δημόσιας Υγείας.

Δημοσιεύσεις

1 εργασία υπό δημοσίευση στο Journal of Chemotherapy με τίτλο:

“Genetic basis of aminoglycoside resistance following changes in aminoglycoside prescription patterns”.

Chris Kosmidis, Maria Giannopoulou, Anastasia Flountzi, Antonis Markogiannakis, Dimitris

Goukos, George Petrikos, George L Daikos, Konstantina Tzanetou

Infectious Diseases and Antimicrobial Chemotherapy Research Laboratory, First Department of Propaedeutic Medicine, University of Athens, Athens, Greece,

και 2 εργασίες υπό διορθώσεις.

Γενικό μέρος

1. Εισαγωγή

Domain: Bacteria

Phylum: Firmicutes

Class: Bacilli

Order: Lactobacillales

Family: Streptococcaceae

Genus: *Streptococcus*

Species: *S. pneumoniae*

Ο *Streptococcus pneumoniae* απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1881, ταυτόχρονα αλλά ανεξάρτητα από δύο επιστήμονες, τον Αμερικανό στρατιωτικό ιατρό George Sternberg και τον Γάλλο χημικό Louis Pasteur. Από το 1920, η ονομασία που του δόθηκε ήταν *Diplococcus pneumoniae*, λόγω της χαρακτηριστικής εμφάνισης διπλοκόκκου σε δείγματα πτυέλων επεξεργασμένα με χρώση Gram. Μετονομάστηκε σε *Streptococcus pneumoniae*, το 1974 λόγω της ανάπτυξής του υπό τη μορφή αλύσων μέσα σε υγρά καλλιεργητικά υλικά.

Μορφολογικά είναι ένας Gram-θετικός διπλόκοκκος με λογχοειδές σχήμα, διατάσσεται κατά ζεύγη ή σχηματίζει αλυσίδες μικρού μήκους. Είναι αερόβιος και εκλεκτικά αναερόβιος και περιβάλλεται από παχύ έλυτρο με πολυσακχαρίτες που του προσδίδουν αντιγονικές ιδιότητες.

Είναι παθογόνος αποκλειστικά για τους ανθρώπους και αποτελεί το σημαντικότερο αίτιο πνευμονίας της κοινότητας και θανάτων από πνευμονία της κοινότητας. Η παθογόνος δράση του οφείλεται στην παρουσία ελύτρου και στην μεγάλη διεισδυτική του ικανότητα.

Ανευρίσκεται στο οροφάρυγγα υγιών ατόμων: 10% των ενηλίκων, 20-40% των παιδιών και 60% των βρεφών σε βρεφονηπιακούς σταθμούς. Οι φορείς αποτελούν πηγή μετάδοσης.

Στον άνθρωπο προκαλεί οξείες λοιμώδεις νόσους οι οποίες διαχωρίζονται σε διεισδυτικές και μη-διεισδυτικές. Στις πρώτες κατατάσσεται η μηνιγγίτιδα (κυρίως σε παιδιά), η κυτταρίτιδα και η μικροβιαίμια-σηψαιμία, ενώ η λοβώδης πνευμονία, η μέση πυώδης ωτίτιδα (συχνή σε βρέφη και παιδιά) και η βρογχοπνευμονία ανήκουν στις μη-διεισδυτικές.

Κατά την διάρκεια των τελευταίων ετών, το σημαντικότερο επιδημιολογικό πρόβλημα που έχει ανακύψει είναι η αύξηση της αντοχής των πνευμονιοκόκκων στα αντιβιοτικά, ενώ παράλληλα σημαντικές διαφορές στην γεωγραφική κατανομή της αντοχής και στην αντίστοιχη συσχέτιση με τους επικρατούντες οροτύπους έχουν επίσης σημειωθεί.

Η πρώτη αναφορά στελέχους πνευμονιοκόκκου μη ευαίσθητου στην πενικιλίνη σημειώθηκε το 1977 με τιμές Ελάχιστης Ανασταλτικής Πυκνότητας (ΕΑΠ) 0,12-1,0 mg/L. Στην Ευρώπη (Alexander Project)¹, τα μεγαλύτερα ποσοστά αντοχής στην πενικιλίνη εμφανίζονται στην Ισπανία (αντοχή 24,8% και ενδιάμεση ευαισθησία 7,3%). Σε παγκόσμιο επίπεδο αναφέρονται ποσοστά μη ευαισθησίας έως και 55% στο Χόνγκ-Κόνγκ¹. Τα ποσοστά μη ευαισθησίας στις μακρολίδες, που αποτελούν την εναλλακτική λύση επί παρουσίας αντοχής στα β-λακταμικά, παρουσιάζουν αύξηση και σε μερικές περιοχές ξεπερνούν αυτά στην πενικιλίνη. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι στις χώρες με υψηλά ποσοστά αντοχής στην πενικιλίνη, υπάρχει μια τάση ελάττωσης της δραστηριότητας και των μακρολιδών². Τα ποσοστά αυτά αγγίζουν το 80% στην Άπω Ασία (Ταϊβάν, Χονγκ Κονγκ), ενώ είναι 17% στις ΗΠΑ¹. Στην Ευρώπη τα μεγαλύτερα ποσοστά ανευρίσκονται στην Γαλλία (46%), στην Ισπανία (33%) και στην Ιταλία (29%)¹. Για την Ιταλία, να αναφερθεί ότι είναι ίσως η μόνη χώρα με υψηλή αντοχή στις μακρολίδες και αρκετά χαμηλά ποσοστά αντοχής στην πενικιλίνη. Θεωρείται ότι η αύξηση της αντίστασης στις μακρολίδες σε αυτές τις χώρες σχετίζεται άμεσα με την εκτεταμένη χορήγηση μακράς-δράσης μακρολιδών¹.

Στην Ελλάδα η πλειονότητα των μελετών είναι συνήθως τοπικού χαρακτήρα και αρκετές από αυτές αφορούν στελέχη από ρινοφαρυγγική φορεία, γεγονός που δεν μπορεί να αποτυπώσει την συνολική κατάσταση σε πολυκεντρικό επίπεδο. Φαίνεται πάντως ότι υπάρχει μια τάση αύξησης της αντοχής και εμφάνισης πολυανθεκτικών στελεχών³. Σε γενικές γραμμές στην Ελλάδα, οι πλέον πρόσφατες μελέτες για την αντοχή στον πνευμονιόκοκκο που αφορούσαν διεισδυτικές λοιμώξεις και οξεία μέση ωτίτιδα, υποδεικνύουν ποσοστά ενδιάμεσης ευαισθησίας στην πενικιλίνη 9,2% και 47% και αντοχής 0,8% και 10% αντίστοιχα⁴. Για την αντοχή στην ερυθρομυκίνη τα ποσοστά κυμαίνονταν για τις διεισδυτικές λοιμώξεις στο 38,5% και την οξεία μέση ωτίτιδα στο 48,7%⁴.

Η εμφάνιση αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά συνήθως οφείλεται σε μεταλλάξεις στα γονίδια των πενικιλινοδεσμευτικών πρωτεϊνών (PBP's) μέσω των οποίων δρουν τα εν λόγω αντιβιοτικά⁵⁻⁷. Η αντοχή στις μακρολίδες οφείλεται συνήθως στους μηχανισμούς μεθυλίωσης του RNA ή της ενεργούς εκροής του αντιβιοτικού^{8,9}. Στην πρώτη περίπτωση η έκφραση του γονιδίου *ermB* που κωδικοποιεί για μία ριβοσωμιακή μεθυλάση οδηγεί σε μεταβολές σε θέσεις-στόχους της 23 rRNA υποομάδας και στην έκφραση υψηλού επιπέδου αντοχής σε όλες τις μακρολίδες και την κλινδαμυκίνη^{8,9}. Στην δεύτερη περίπτωση, μέσω μιας ATP-εξαρτώμενης αντλίας εκροής που κωδικοποιείται από το γονίδιο *mefE* και που έχει ως αποτέλεσμα χαμηλού βαθμού αντοχή στις μακρολίδες με 14- και 15-μελή δακτύλιο λακτόνης, ενώ η ευαισθησία στην κλινδαμυκίνη και στις 16-μερείς μακρολίδες, παραμένει^{8,9}.

Η εμφάνιση αντοχής στα άλλα είδη αντιβιοτικών παρουσιάζεται (α) για την τριμεθοπρίμη μέσω αλλαγής μίας νουκλεοτιδικής βάσης στην θέση 100 του γονιδίου της διϋδροφολικής αναγωγάσης^{5,7,10}, (β) για την ριφαμικίνη με τη αλλαγή μιας βάσης στο γονίδιο για την RNA πολυμεράση B^{5,7,10}, (γ) για την χλωραμφαινικόλη η αντοχή φαίνεται να είναι πλασμιδιακά

αποκτώμενη^{5,7,10}, ενώ (δ) η αντοχή στις φθοριοκινολόνες σημειώνεται μέσω μεταλλάξεων σε περιοχές των γονιδίων *parC* και *gyrA*^{5,7,10}.

Στο Γενικό Μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής παρουσιάζονται οι μηχανισμοί αντοχής, οι κλινικές εκδηλώσεις και η επιδημιολογία του πνευμονιοκόκκου στην Ελλάδα και διεθνώς. Στο Ειδικό Μέρος μελετώνται οι φαινότυποι αντοχής, η μοριακή βάση των μηχανισμών αντοχής στελεχών πνευμονιοκόκκου στα συχνότερα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά στη χώρα μας και περιγράφεται η συσχέτισή τους, με συγκεκριμένους οροτύπους. Με τη μελέτη αυτή αναμένεται να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα για τη δυναμική της μικροβιακής αντοχής στον πνευμονιοκόκκο που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βάση για την εφαρμογή και εξέλιξη των προγραμμάτων εμβολιασμού.

2. Γενικά μικροβιολογικά δεδομένα

Ο *S. pneumoniae* απομονώνεται συχνότερα από παιδιά τους χειμερινούς μήνες και αντίθετα από τους άλλους στρεπτοκόκκους, διατάσσεται συνήθως με τη μορφή διπλοκόκκων. Από άποψη φυλογενετικής εξέλιξης, συγγενεύει στενά με τους στρεπτοκόκκους της γλωρίδας *S. mitis* και *S. oralis*.

Αναπτύσσεται εύκολα στο αιματούχο άγαρ, όχι όμως και στο απλό θρεπτικό άγαρ χωρίς συμπλήρωμα ερυθρών. Μετά από 24ωρη επώαση σε άγαρ με 5% ερυθρά αλόγου, οι αποικίες του πνευμονιοκόκκου εμφανίζονται κυκλικές, γυαλιστερές, ημιδιαφανείς, με υπερυψωμένη περιφέρεια και χαμηλότερο κέντρο και περιβάλλονται από ζώνη α-αιμόλυσεως. Αν το καλλιέργημα επωασθεί για ένα ακόμη 24ωρο, η κοίλανση γίνεται εντονότερη και οι αποικίες παίρνουν χαρακτηριστική κοίλη μορφή, σαν πιατάκια. Όταν το μικρόβιο αναπτυχθεί σε σοκολατόχρωμο άγαρ, η α-αιμόλυση είναι πιο έντονη και ταυτόχρονα παρατηρείται αποχρωματισμός του υλικού στην περιοχή κάτω από την αποικία. Όσο πυκνότερο είναι το καλλιέργημα, τόσο μεγαλύτερος είναι ο αποχρωματισμός, ο οποίος οφείλεται στην παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου και είναι στοιχείο διαφοροδιαγνωστικό του είδους. Οι αποικίες αυτολύονται γρήγορα από τα αυτολυτικά ένζυμα του βακτηρίου και στη θέση τους, παραμένουν τα ίχνη της αποικίας σαν φαντάσματα αποικιών (phantom colonies). Στελέχη του μικροβίου που χάνουν το έλγτρό τους, δίνουν αποικίες θαμπές, ρυτιδιασμένες.

Ο *S. pneumoniae* αναπτύσσεται σε ζωμό TSA (trypticase soy broth) και προκαλεί ομοιόμορφη θόλωση σε αντίθεση με τους άλλους στρεπτοκόκκους που προκαλούν κροκυδώδη ανάπτυξη στο ζωμό. Αναπτύσσεται τόσο σε αερόβιες όσο και σε ανερόβιες συνθήκες. Σε αναερόβιες συνθήκες εμφανίζεται η δράση της Ο-πνευμονολυσίνης, δηλαδή ζώνη β-αιμόλυσης γύρω από τις αποικίες του, ενώ στην αερόβια επώαση η Ο-πνευμονολυσίνη δεν δρα. Η ανάπτυξη του βακτηρίου ευνοείται από τη παρουσία CO₂ 10%, ενώ το H₂O₂ δεν παράγεται κατά την αναερόβια επώαση.

Όσον αφορά στις βιοχημικές ιδιότητές του, διασπά τα σάκχαρα με παραγωγή οξέος (γλυκόζη, γαλακτόζη, φρουκτόζη, σουκρόζη, μαλτόζη, ραφινόζη και ινουλίνη), όχι όμως την δουλσιτόλη και την σορβιτόλη. Οι ειδικές ιδιότητες που χρησιμοποιούνται στην ταυτοποίηση είναι: οπτοχίνη, διαλυτότητα χολής και δοκιμασία CAMP, στις οποίες δίνει θετική αντίδραση, ενώ δεν αναπτύσσεται παρουσία εσκουλίνης, χολής και NaCl 6,5%. Τέλος, οι αντιδράσεις πυρρολινοδάσης και αντιγόνου κατά Lancefield είναι αρνητικές.

Είναι πολύ ευαίσθητο μικρόβιο και θανατώνεται στους 52° C σε 15 λεπτά, ενώ αυτολύεται στα καλλιεργήματα. Στα πτύελα των πασχόντων διατηρείται ζων, μόνο εφόσον αυτά συντηρηθούν στο ψυγείο.

Η αντιγονική του δομή μοιάζει με αυτή των άλλων στρεπτοκόκκων, όμως διαφοροποιείται στο ότι διαθέτει ένα παχύ έλυτρο. Όλες οι ουσίες του κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταρικής μεμβράνης έχουν αντιγονικές ιδιότητες, με ισχυρότερο το αντιγόνο του ελύτρου.

Συνοπτικά είναι: 1) το Αντιγόνο ελύτρου ή SSS-ουσία (Species Specific Substance), το οποίο είναι πολυσακχαριδικό αντιγόνο και αποτελείται από γλυκουρονικό οξύ ενωμένο με αμινοσάκχαρα, τα οποία προσδίδουν την αντιγονική ειδικότητα. Βάσει της αντιγονικής διαφοράς του ελύτρου (δοκιμασία οροτυπίας), οι πνευμονιόκοκκοι διαχωρίζονται σε τουλάχιστον 93 οροτύπους. Επικρατέστεροι ορότυποι είναι κυρίως οι 1,3,6,7,8 και 18 στις λοιμώξεις των ενηλίκων και οι 6,14,19 και 23 στα παιδιά.

Η παραγωγή της ουσίας SSS, καθορίζεται από γονίδια που μπορεί να μεταβιβασθούν. Επίσης η συγκεκριμένη ουσία ανθίσταται στη φαγοκυττάρωση, παρεμβαίνοντας στον οψωνισμό, παρουσιάζει αντοχή στα λυτικά ένζυμα φαγοκυττάρων και έτσι προστατεύει ή επιβραδύνει το θάνατο των πνευμονιοκόκκων που έχουν φαγοκυτταρωθεί. Τα αντισώματα κατά του ελύτρου αντιδρούν με πολυσακχαριδικά αντιγόνα και άλλων μικροβίων, όπως *Klebsiella* spp., αλλά και ομάδων αίματος. 2) Το Αντιγόνο M που είναι πρωτεΐνη του κυτταρικού τοιχώματος και ομοιάζει με την M-ουσία των στρεπτοκόκκων A-ομάδας, αλλά δεν σχετίζεται καθόλου με τη παθογονικότητα του μικροβίου, ενώ και τα αντισώματα κατά της M-ουσίας δεν προστατεύουν από πνευμονιοκοκκική νόσο. Η αντιγονική της ειδικότητα συμβαδίζει με την ειδικότητα του αντιγόνου του ελύτρου ενώ δεν έχει αντιγονική ομοιότητα με πρωτεϊνικά αντιγόνα άλλων στρεπτοκόκκων. 3) Το Αντιγόνο C είναι το πολυσακχαριδικό αντιγόνο του κυτταρικού τοιχώματος, ίδιο σε όλους τους πνευμονιοκόκκους με μικρές χημικές διαφορές και ουσιαστικά είναι το αντιγόνο του είδους. Αποτελεί μέρος του Forssman αντιγόνου των πνευμονιοκόκκων (λιποτειχοϊκό οξύ) και δεν είναι το C-σακχαριδικό κατά Lancefield αντιγόνο, το οποίο δεν διαθέτει το συγκεκριμένο μικρόβιο. Εδράζεται στην έσω και έξω επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος. 4) Το Τειχοϊκό οξύ είναι συνδεδεμένο με το κυτταρικό τοίχωμα και είναι το αντίγονο με τη μεγαλύτερη ανοσογονικότητα, προκαλώντας την παραγωγή αντισωμάτων. 5) Το Αντιγόνο Forssman είναι κοινό σε όλα τα στελέχη πνευμονιοκόκκων, αναστέλλει τη δράση των αυτολυτικών ενζύμων, όπως μιας αμιδάσης

που είναι το κυριότερο αυτολυτικό ένζυμο. 6) Άλλα αντιγόνα απομονώνονται, ανάλογα και με το ερευνητικό ενδιαφέρον, όπως οι πενικιλινο-δεσμευτικές πρωτεΐνες (PBPs).

Ο *S. pneumoniae* δεν παράγει ισχυρές ή πολλές τοξίνες και ακόμη και αυτές που παράγει δεν έχουν ιδιαίτερο παθογονικό ρόλο. Η κυριότερη είναι η πνευμονολυσίνη για την οποία γίνεται αναφορά σε επόμενο κεφάλαιο και είναι οξυγονοευαίσθητη. Άλλη τοξίνη είναι η πορφυρογόνος τοξίνη, όπου σε αυτήν αποδίδεται το εξάνθημα που δύναται να παρουσιασθεί κατά τη πνευμονιοκοκκική νόσο, καθώς και νευραμινιδάση που συμβάλλει στη διεισδυτικότητα του μικροβίου.

Η ταυτοποίηση του πνευμονιοκόκκου και ιδιαίτερα ο διαχωρισμός του από τους πρασινίζοντες στρεπτοκόκκους με τους οποίους έχει κοινά χαρακτηριστικά, γίνεται 1) μέσω της χρώσης κατά Gram, όπου φαίνονται οι λογχοειδείς Gram θετικοί διπλόκοκκοι, 2) μέσω της καλλιέργειας σε σοκολατόχρωμο άγαρ όπου μετά από 24ωρη-48ωρη επώαση αεροβίως, το υλικό πρασινίζει και αποχρωματίζεται η περιοχή κάτω από τις αποικίες, 3) μέσω της δοκιμασίας ευαισθησίας στην οπτοκίνη όπου στο τρυβλίο καλλιέργειας του στελέχους τοποθετείται δισκίο 6 mm εμποτισμένο με οπτοκίνη (δ/μα 1:400) και μετά από 24ωρη επώαση παρουσία CO₂ 5% στους 35° C, παρατηρείται ζώνη αναστολής ανάπτυξης γύρω από το δισκίο ≥ 14 mm, εάν πρόκειται για πνευμονιόκοκκο. Αν η ζώνη είναι < 14 mm, θα πρέπει να γίνουν και άλλες δοκιμές, όπως, 4) δοκιμή διαλυτότητας στη χολή, όπου το καλλιέργημα του στελέχους σε ζωμό ή το εναιώρημα καλλιεργήματος σε άγαρ διαυγάζει, αν προστεθεί σε αυτό χολή, 5) δοκιμή ζυμώσεως ινουλίνης, όπου το στέλεχος καλιεργείται σε ζωμό ή πεπτονούχο υγρό με 1% ινουλίνη και έναν δείκτη, όπως ερυθρό της φαινόλης και μετά από 24ωρη επώαση, αλλάζει η χροιά του υλικού, αν πρόκειται για πνευμονιόκοκκο, 6) δοκιμή εξοιδήσεως ελύτρου, η οποία γίνεται είτε σε καλλιεργήματα του στελέχους ή σε παθολογικό υλικό (π.χ. ENY) και χρησιμοποιούνται ένας ή περισσότεροι πολυδύναμοι αντι-οροί, 7) ορολογική τυποποίηση είδους και τύπων του πνευμονιοκόκκου με ειδικούς αντι-ορούς, συνήθως πολυδύναμους ή και μονοδύναμους και γίνεται με τη μέθοδο της συγκόλλησης πάνω σε πλάκα. Η αναζήτηση αντιγόνου του μικροβίου σε εκκρίματα πραγματοποιείται με την μέθοδο της συγκολλητινοαντίδρασης latex ή της ανοσοενζυμικής διαδικασίας. Η αναζήτηση αντισωμάτων κατά του πνευμονιοκόκκου στον ορό ασθενών πραγματοποιείται με έμμεση αιμοσυγκόλληση ερυθρών, ραδιοανοσολογική μέθοδος (RIA) ή ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA.

Εμφανίζει μεγάλη γενετική ευελιξία, λόγω του συχνού ανασυνδυασμού μεταξύ των διαφόρων στελεχών του βακτηρίου. Η μεταφορά γονιδίων γίνεται με τη διαδικασία της βακτηριακής μεταμόρφωσης και μπορεί να οδηγήσει στην έκφραση ελύτρου διαφορετικού οροτύπου. Η πειραματική μεταφορά γονιδίων του ελύτρου μεταξύ πνευμονιοκόκκων, αποτέλεσε τη βάση της απόδειξης ότι το DNA περιέχει γενετικές πληροφορίες του κυττάρου.

Αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία των πνευμονιοκοκκικών νόσων είναι η πενικιλίνη, οι κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς, οι μακρολίδες, η κο-τριμοξαζόλη, η κλινδαμυκίνη,

οι νεώτερες φθοριοκινολόνες, οι τετρακυκλίνες, η βανκομυκίνη, η χλωραμφενικόλη, η ριφαμπικίνη, η λινεζολίδα και ο συνδυασμός στρεπτογραμμινών κινολιστίνη+νταλφοπριστίνη.

3. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

3.α. Μέθοδοι

Μέθοδος διάχυσης δισκίων

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος είναι η **μέθοδος διάχυσης δίσκων κατά Kirby –Bauer**. Σε τρυβλίο με αιματούχο άγαρ ενοφθαλμίζεται ομοιόμορφα ποσότητα 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ cfu/ml) του προς εξέταση μικροβίου και στην συνέχεια στην επιφάνειά του τοποθετούνται δισκία από διηθητικό χαρτί εμποτισμένα με γνωστές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών. Το τρυβλίο επωάζεται σε συνθήκες 5% CO₂ και τα αντιβιοτικά διαχέονται στο άγαρ. Όσο αυξάνεται η απόσταση διάχυσης από τους δίσκους, μειώνεται η συγκέντρωση των αντιβιοτικών και αν το αντιβιοτικό είναι δραστικό έναντι στο συγκεκριμένο μικρόβιο, σχηματίζεται γύρω από το δίσκο, μετά την επώαση, μία ζώνη αναστολής της ανάπτυξης του μικροβίου. Η διάμετρος της ζώνης συγκρίνεται με τις αντίστοιχες διαμέτρους που υπάρχουν σε ειδικούς πίνακες αναφοράς, για κάθε αντιβιοτικό και στη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται. Κατ' αυτό το τρόπο, το μικρόβιο χαρακτηρίζεται ως ευαίσθητο, μετρίως ανθεκτικό κι ανθεκτικό για το αντιβιοτικό προς εξέταση. Ανάλογα με το αν κάποιο αντιβιοτικό είναι ευδιάλυτο ή δυσδιάλυτο, δηλαδή διαχέεται πιο εύκολα ή πιο δύσκολα στο άγαρ αντίστοιχα, η ζώνη αναστολής είναι αντίστοιχα, μεγαλύτερη ή μικρότερη. Η μέθοδος διάχυσης δισκίων είναι μια απλή μέθοδος που δίνει ποιοτικά αποτελέσματα (αλλά όχι ποσοτικά).

Μέθοδοι αραιώσεων σε ζωμό

Με τη μέθοδο των αραιώσεων σε ζωμό υπολογίζεται η **Ελάχιστη Ανασταλτική Πυκνότητα (ΕΑΠ)**. Επίσης, εάν απαιτηθεί για τον έλεγχο της θεραπείας μπορεί να υπολογισθεί και η **Ελάχιστη Βακτηριοκτόνος Πυκνότητα (ΕΒΠ)** για να διαπιστωθεί εάν το αντιβιοτικό είναι βακτηριοστατικό ή βακτηριοκτόνο.

Χρησιμοποιούνται πλάκες μικροτιτλοποίησης με βυθίσματα, στα οποία ετοιμάζεται σειρά διαδοχικών αραιώσεων του αντιβιοτικού και στις οποίες προστίθεται το εναιώρημα του υπό εξέταση βακτηρίου. Στη συνέχεια επωάζονται σε συνθήκες 5% CO₂, ελέγχονται και η μικρότερη αραιώση που δεν παρατηρείται ανάπτυξη είναι η τιμή της ΕΑΠ.

Στην περίπτωση που απαιτείται ο υπολογισμός ΕΒΠ, από τις αραιώσεις που δεν παρατηρείται ανάπτυξη πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια σε αιματούχο άγαρ. Αν παρατηρηθεί ανάπτυξη, προσδιορίζεται η **ΕΒΠ** και στην συνέχεια συγκρίνεται με την ΕΑΠ για να διαπιστωθεί εάν το αντιβιοτικό είναι βακτηριοστατικό ή βακτηριοκτόνο.

Πλέον οι δοκιμασίες αραιώσης έχουν αυτοματοποιηθεί και στο εμπόριο διατίθενται έτοιμες πλάκες μικροτιτλοποίησης που περιλαμβάνουν έως και 96 κυψελίδες με γνωστές συγκεντρώσεις

αντιβιοτικών που βρίσκονται σε κατεψυγμένη ή λυοφιλοποιημένη μορφή. Το μόνο που απαιτείται είναι η παρασκευή εναιωρήματος του βακτηρίου προς εξέταση το οποίο ενοφθαλμίζεται με ειδικό διανομέα. Στην πλάκα περιλαμβάνονται θετικοί μάρτυρες με μικρόβιο, χωρίς αντιβιοτικό και αρνητικοί που περιέχουν μόνο ζωμό, για τον αποκλεισμό επιμόλυνσης. Η θολερότητα/ανάπτυξη παρατηρείται είτε διά γυμνού οφθαλμού είτε, όπως πλέον εφαρμόζεται στα μεγάλα κλινικά εργαστήρια, με «σκανάρισμα» των πλακών μέσα από ειδικά συστήματα, τα οποία αποστέλλουν τα δεδομένα σε υπολογιστή και έτσι εκτυπώνονται οι τιμές των ΕΑΠ.

Μέθοδος ταινιών διαβαθμισμένης συγκέντρωσης σε άγαρ

Σε τρυβλία θρεπτικού αιματούχου άγαρ ενοφθαλμίζεται το βακτήριο, τοποθετείται μία ταινία πλαστικοποιημένη που είναι εμποτισμένη με διαδοχικές αυξανόμενες συγκεντρώσεις του υπό εξέταση αντιβιοτικού και επωάζεται σε συνθήκες σε συνθήκες 5% CO₂. Το σημείο που αρχίζει να διαφαίνεται η αναστολή της ανάπτυξης του βακτηρίου αντιστοιχεί στην ΕΑΠ.

Άλλες μέθοδοι

Πρόκειται για δοκιμασίες όπως ο προσδιορισμός της ικανότητας του βακτηρίου για την **παραγωγή β-λακταμασών**, στην οποία χρησιμοποιείται μία κεφαλοσπορίνη που μετά τη διάνοιξη του β-λακταμικού δακτυλίου, αλλάζει χρώμα έτσι καταδεικνύεται η παραγωγή του ενζύμου από το μικρόβιο. Άλλη σημαντική δοκιμασία, είναι η **μέτρηση της συγκέντρωσης ενός αντιβιοτικού στον ορό** του ασθενούς, ειδικά όταν κάποιο αντιβιοτικό είναι τοξικό.

3.β. Οδηγίες διεθνών οργανισμών (CLSI, EUCAST)

Στο παρελθόν τα στελέχη πνευμονιοκόκκου παρουσίαζαν ευαισθησία στα αντιμικροβιακά φάρμακα, σε επίπεδα τα οποία μπορούσαν να επιτευχθούν εύκολα με τις συνηθισμένες δόσεις. Τα τελευταία χρόνια όμως, ο πνευμονιόκοκκος φαίνεται να εμφανίζει αυξανόμενη αντοχή στην πενικιλίνη και άλλα αντιμικροβιακά. Σύμφωνα με τις οδηγίες των διεθνών οργανισμών (CLSI, EUCAST), τα όρια ευαισθησίας για τις β-λακτάμες σε λοιμώξεις του ΚΝΣ διαφέρουν από τα όρια σε λοιμώξεις εκτός ΚΝΣ, εξαιτίας των κατά πολύ υψηλότερων επιπέδων του φαρμάκου σε ιστούς εκτός του ΚΝΣ. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται οι οδηγίες του CLSI¹¹. Οι αρχικές οδηγίες για τα όρια ευαισθησίας των β-λακταμικών αντιβιοτικών ήταν προσανατολισμένα στη θεραπεία της μηνιγγίτιδας. Εξαιτίας της σταδιακής ανόδου των MIC τα επόμενα χρόνια, όλο και περισσότερα στελέχη αναφέρονταν ως ενδιάμεσης ευαισθησίας ή ανθεκτικά στην πενικιλίνη, με αποτέλεσμα οι περισσότεροι κλινικοί ιατροί να χρησιμοποιούν περισσότερο προωθημένα αντιβιοτικά ακόμη και για λοιμώξεις εκτός ΚΝΣ. Όμως, αναδρομικές και προοπτικές μελέτες σε ενήλικους και παιδιά έδειξαν ότι η χρήση της πενικιλίνης σε πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις εκτός της μηνιγγίτιδας που προκαλούνται από στελέχη μη ευαίσθητα στην πενικιλίνη συνοδεύονταν από έκβαση συγκρίσιμη με αυτή λοιμώξεων από ευαίσθητα στην πενικιλίνη στελέχη. Αυτές οι παρατηρήσεις οδήγησαν

στη διαπίστωση ότι το όριο ευαισθησίας $\leq 0,06$ mg/L για την πενικιλίνη δεν αφορά την πνευμονία και άλλες λοιμώξεις εκτός ΚΝΣ, με συνέπεια το όριο να ορισθεί στο ≤ 2 mg/L για αυτές τις λοιμώξεις. Επιπλέον, και για την κεφτριαξόνη υπάρχουν διαφορετικά όρια ευαισθησίας για λοιμώξεις ΚΝΣ και λοιμώξεις εκτός ΚΝΣ.

Πίνακας 1. Όρια ευαισθησίας του πνευμονιοκόκκου σε β-λακταμικά αντιμικροβιακά

Αντιμικροβιακό	Τιμές ΕΑΠ (mg/L)		
	Ευαίσθητο	Ενδιάμεσο	Ανθεκτικό
Πενικιλίνη (από το στόμα)	$\leq 0,06$	0,12-1	≥ 2
Πενικιλίνη (ενδοφλεβίως)			
Λοίμωξη εκτός ΚΝΣ	≤ 2	4	≥ 8
Λοίμωξη ΚΝΣ	$\leq 0,06$		$\geq 0,12$
Αμοξικιλίνη			
Λοίμωξη εκτός ΚΝΣ	≤ 2	4	≥ 8
Κεφτριαξόνη, κεφοταξίμη			
Λοίμωξη εκτός ΚΝΣ	≤ 1	2	≥ 4
Λοίμωξη ΚΝΣ	$\leq 0,5$	1	≥ 2

Πίνακας 2. Γενετική βάση της αντοχής στον πνευμονιόκοκκο

Συζευκτικά ή σύνθετα τρανσποζόνια	Tn916-Tn1545, Tn3951, Tn3701, Tn3872, Tn5251-Tn5253 cat, tet(M), erm(B)
Στοιχεία σχετιζόμενα με συζευκτικά τρανσποζόνια	Mega (μεταφέρει το mefE/mel) Tn1207.1 (μεταφέρει το mefA/mel)
Πλασμίδια	pC194 (ενσωμάτωση στο Tn5252)
Σημειακές μεταλλάξεις και/ή ανασυνδυασμός	pbp tet(M) QRDR τοποϊσομεράσης II dhfr dhps rpoB

4. Μηχανισμοί αντοχής του πνευμονιοκόκκου και γενετική βάση της αντοχής

Το γονιδίωμα του πνευμονιοκόκκου περιέχει ένα κυκλικό μόριο DNA και μικρά πλασμίδια, $2,1 \times 10^6$ ζεύγη βάσεων, 1553 γονίδια απαραίτητα για την επιβίωση του βακτηρίου, 154 γονίδια που σχετίζονται με τη λοιμογόνο δύναμη του και 176 γονίδια που αφορούν στον μη διεισδυτικό φαινότυπο του. Ο πνευμονιοκόκκος χρησιμοποιεί αρκετούς διαφορετικούς μηχανισμούς αντοχής, μεταξύ των οποίων τρανσποζόνια, σημειακές μεταλλάξεις και σπάνια πλασμίδια. Στον Πίνακα 2 περιγράφονται συνοπτικά οι μηχανισμοί αντοχής¹².

4.a. Μεταμόρφωση/Μετασχηματισμός

Η διαδικασία αυτή, μαζί με την τροποποίηση των πενικιλινο-δεσμευτικών πρωτεϊνών (PBPs) αποτελούν τους κύριους μηχανισμούς ανάπτυξης αντοχής του *S. pneumoniae* στα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Κατά τη μεταμόρφωση/μετασχηματισμό γονίδια μεταφέρονται από ένα βακτήριο σε ένα άλλο ως 'γυμνό DNA' σε διάλυμα. Μέσω αυτής της διαδικασίας, φάνηκε ότι το γενετικό υλικό μεταφέρεται από ένα βακτήριο σε ένα άλλο.

Ο Frederick Griffith, το 1928 στην Αγγλία, ήταν ο πρώτος που πειραματίστηκε, χρησιμοποιώντας δύο στελέχη πνευμονιοκόκκων και ποντίκια ως πειραματόζωα. Το ένα στέλεχος ήταν παθογόνο με ιδιότητα πρόκλησης πνευμονίας και έλυτρο πολυσακχαριδικό που απέτρεπε τη φαγοκυττάρωση και το άλλο μη παθογόνο, άνευ ελύτρου, χωρίς ιδιότητα πρόκλησης πνευμονίας. Ο Griffith θέλησε να ελέγξει εάν ενίοντας νεκρά (μετά από θέρμανση) παθογόνα ελυτροφόρα στελέχη θα μπορούσαν να αποτελέσουν εμβόλιο έναντι της πνευμονίας για τα ποντίκια. Η έκβαση για τα ποντίκια ήταν θανατηφόρα μετά από ένεση ζώντων παθογόνων ελυτροφόρων στελεχών, ενώ η έγχυση μη παθογόνων μη ελυτροφόρων ή νεκρών παθογόνων ελυτροφόρων στελεχών, δεν ήταν. Η έγχυση τέλος μείγματος ζώντων μη παθογόνων μη ελυτροφόρων και νεκρών παθογόνων ελυτροφόρων στελεχών είχε μοιραία έκβαση για τα περισσότερα από τα ποντίκια, δείχνοντας ουσιαστικά ότι ο συνδυασμός τους προκαλεί τη λοίμωξη. Μέσω της τελευταίας έγχυσης, κατάφερε να απομονώσει ζώντα ελυτροφόρα παθογόνα στελέχη από το αίμα των θανόντων ποντικιών. Φαίνεται ότι το γενετικό υλικό από τα νεκρά παθογόνα στελέχη, είχε εισαχθεί με κάποιο τρόπο στα ζώντα μη παθογόνα κύτταρα και τα είχε μετατρέψει σε παθογόνα ελυτροφόρα.

Σε επόμενα πειράματα βρέθηκε ότι η μεταμόρφωση/μετασχηματισμός πραγματοποιούνταν και χωρίς πειραματόζωα αλλά με τη χρήση θρεπτικού ζωμού. Για να καθορισθεί το στοιχείο που προκάλεσε τη μεταμόρφωση χρειάστηκε να εξαχθούν χημικά συστατικά από τα νεκρά παθογόνα κύτταρα, σύμφωνα με μελέτες που το 1944 ανακάλυψαν ότι πίσω από την μεταμόρφωση μη παθογόνων στελεχών *S. pneumoniae* σε παθογόνα ήταν η μεταφορά DNA μεταξύ των βακτηριακών κυττάρων¹³⁻¹⁵. Φάνηκε πλέον ξεκάθαρα, ο ρόλος του DNA, ως φορέα γενετικής πληροφορίας.

Τα περισσότερα είδη βακτηρίων δεν μπορούν να προσλάβουν ελεύθερο γενετικό υλικό από το περιβάλλον και μάλιστα παράγουν νουκλεάσες που αναγνωρίζουν και εξουδετερώνουν «ξένο» γενετικό υλικό. Κάποια βακτήρια όμως, όπως ο *Haemophilus influenzae*, οι πνευμονιόκοκκοι κ.ά., προσλαμβάνουν το DNA μετά από λύση βακτηριακών κυττάρων ή τεχνητή εξαγωγή. Αυτό γίνεται κάτω από ειδικές συνθήκες, συνήθως στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Το DNA εισέρχεται στο κύτταρο, ενσωματώνεται στο χρωμόσωμα του κυττάρου με αναδυνδυσμό, ο οποίος καθοδηγείται από μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, την RecA που προσδένεται στα DNA κυττάρου και δότη. Το νέο κύτταρο ονομάζεται ανασυνδυασμένο ή υβρίδιο. Η διαδικασία αυτή είναι περισσότερο πετυχημένη όταν αφορά σε συγγενικά είδη κυττάρων, καθώς ο ανασυνδυασμός συμβαίνει μόνο όταν υπάρχει επαρκής ομολογία στην αλληλουχία των νουκλεϊκών οξέων. Επίσης είναι σημαντικό το κύτταρο-δέκτης να είναι επιδεκτικό, δηλαδή, να έχει καταστεί διαπερατό σε μεγάλα μόρια, όπως μόριο του DNA που μεταφέρεται, όσο μικρό κι αν είναι. Ο αριθμός των γονιδίων προς μεταφορά είναι σχετικά μικρός. Το συχνότερα χρησιμοποιούμενο βακτήριο σε πειράματα μετασχηματισμού/ μεταμόρφωσης είναι το *E. coli*.

4.β. Τρανσποζόνια

Αποτελούν δομές πάνω στο γενετικό υλικό του μικροοργανισμού (χρωμόσωμα ή πλασμίδιο) με ικανότητα μετακίνησης από μόριο σε μόριο DNA. Τα απλούστερα τρανσποζόνια, που καλούνται και αλληλουχίες εισδοχής (insertion sequences -IS), κωδικοποιούν ένα ένζυμο την τρανσποσάση που καταλύει την μετακίνησή τους, ενώ φέρουν στα άκρα τους τις λεγόμενες ανάστροφες αλληλουχίες (inverted repeats) 20-100 βάσεων απαραίτητες για την μετακίνησή τους. Τα πλέον σύνθετα τρανσποζόνια αποτελούνται από δύο IS που περιβάλουν σειρά γονιδίων παθογένειας, αντοχής κ.λ.π. Ειδική κατηγορία τρανσποζονίων είναι αυτά της οικογένειας TnA-Tn3 που έχουν ειδική δομή, ενώ φαίνεται να παίζουν - σημαντικό ρόλο στην δημιουργία και διάδοση της πολυαντοχής στα αντιβιοτικά. Τα integrons είναι τμήματα των τρανσποζονίων της οικογένειας TnA-Tn3.

Πειράματα στα οποία επετεύχθη η μεταφορά της αντοχής μεταξύ στελεχών πνευμονιοκόκκου μέσω σύζευξης αποτέλεσαν τη βάση για την περιγραφή των τρανσποζονίων, τα οποία αποτελούν σημαντικό μηχανισμό αντοχής στον πνευμονιόκοκκο, σε αντίθεση με τα πλασμίδια, τα οποία κυρίως ενέχονται σε άλλα είδη στρεπτοκόκκου. Τα τρανσποζόνια είναι δομές DNA οι οποίες έχουν τη δυνατότητα μεταφοράς μεταξύ διαφορετικών μικροοργανισμών με τη βοήθεια γονιδίων που περιέχουν τα ίδια, χωρίς δηλαδή να χρησιμοποιούν τους μηχανισμούς μεταφοράς, γενετικού υλικού του ξενιστή. Τα συζευκτικά τρανσποζόνια ευθύνονται για τη διασπορά της αντοχής στις μακρολίδες, τετρακυκλίνες και χλωραμφαινικόλη.

Αρχικά, το 1986, περιγράφηκε το τρανσποζόνιο Tn1545, μεγέθους 25,3 kb, σε πολυανθεκτικά στελέχη πνευμονιοκόκκου. Το τρανσποζόνιο αυτό προσδίδει αντοχή στην καναμυκίνη και άλλες αμινογλυκοσίδες μέσω μιας φωσφοτρανσφεράσης (*aphA-3*), στην κατηγορία μακρολιδών-

λινκοσαμιδών-στρεπτογραμινών B μέσω του γονιδίου *ermAM* και στην τετρακυκλίνη και μινοκυκλίνη μέσω του γονιδίου *tetM*.¹⁶

Η οικογένεια τρανσποζονίων Tn916-Tn1545 είναι υπεύθυνη για το μεγαλύτερο ποσοστό της αντοχής στις μακρολίδες και τετρακυκλίνες στον πνευμονιόκοκκο. Σε μία μελέτη, όλα τα στελέχη πνευμονιόκοκκου ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη περιείχαν αλληλουχίες της ιντεγκράσης του Tn1545.¹⁷ Επίσης, το τρανσποζόνιο Tn5253, μεγέθους 65,5kb, είναι σύνθετο τρανσποζόνιο που αποτελείται από το Tn5251, το οποίο περιέχει το *tet(M)*, και το Tn5252, το οποίο περιέχει το *cat*. Ένα άλλο σύνθετο τρανσποζόνιο, το Tn3872, που βρέθηκε σε στελέχη οροτύπου 23F και 6B, αποτελείται από το Tn917 και Tn916 και περιέχει το *erm(B)*.

5. Κατηγορίες αντιβιοτικών όπου εμφανίζεται αντοχή

Πίνακας 3. Μοριακοί μηχανισμοί αντοχής στον πνευμονιόκοκκο σε διάφορα αντιμικροβιακά

Ομάδα	Μηχανισμός
β-λακτάμες	Τροποποιημένες PBPs
Μακρολίδες	- <i>erm</i> (23S rRNA μεθυλτρανσφεράση) -Μεταλλάξεις στο 23S rRNA ή σε γονίδια των ριβοσωμικών πρωτεϊνών L4 και L22 -Εκροή αντιβιοτικού μέσω αντλίας <i>mefE</i> και <i>mefA/mel</i>
Κινολόνες	-Μεταλλάξεις στη DNA γυράση (<i>gyrA</i>) και τοποϊσομεράση (<i>parC</i>) -Εκροή αντιβιοτικού (<i>pmrR</i>)
Τετρακυκλίνες	-Πρωτεΐνες προστασίας του ριβοσώματος <i>tet(M)</i> και <i>tet(O)</i>
Χλωραμφαινικόλη	<i>CAT</i> ένζυμο τροποποίησης της χλωραμφαινικόλης
Κο-τριμοξαζόλη	Μεταλλάξεις στα γονίδια <i>dhfr</i> και <i>dhps</i>
ΡΙφαμπικίνη	Μεταλλάξεις στο γονίδιο RNA πολυμεράσης (<i>rpoB</i>)

5.α. β-λακτάμες

Στο βακτηριακό τοίχωμα το στρώμα πεπτιδογλυκάνης αποτελείται από πολυμερή επαναλαμβανόμενων διασασκαριτών, της N-ακετύλ-γλυκοζαμίνης (NAG) και του N-ακετύλ-μουραμικού οξέως (NAM). Συνδεδεμένο με το NAG είναι ένα πεπτίδιο με τουλάχιστον 3 αμινοξέα

(L-αλανίνη, D-ισογλουταμίνη και L-λυσίνη) που λέγεται δομικό πεπτίδιο (stem peptide), ενώ μαζί με τους διασακχαρίτες, αποτελούν το μουροπεπτίδιο.

Το σημαντικό τελευταίο βήμα στην κατασκευή του στρώματος της πεπτιδογλυκάνης, είναι η σύνδεση των δομικών πεπτιδίων ενός πολυμερούς, με τα δομικά πεπτίδια του γειτονικού του (διαπλεγμένη σύνδεση ή cross-linking), η οποία συμβάλλει στην ακεραιότητα του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Η διαπλεγμένη σύνδεση διευκολύνεται από ένζυμα-πεπτιδάσες, των οποίων το ενεργό κέντρο καταλύει τον σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ αμινοξέων, ενώ παράλληλα, το φυσικό υπόστρωμα αυτών των ενζύμων, είναι τα αμινοξέα των δομικών πεπτιδίων.

Τα β-λακταμικά συνδέονται με τις πεπτιδάσες, εμποδίζοντας την δράση τους, αφού μιμούμενα τα δομικά πεπτίδια (φυσικά υποστρώματα) ανταγωνίζονται για την ίδια θέση στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Το αποτέλεσμα είναι η αδυναμία σχηματισμού διαπλεγμένης σύνδεσης με επιπτώσεις στο στρώμα πεπτιδογλυκάνης του βακτηρίου.

Οι πεπτιδάσες αυτές είναι γνωστές, λόγω του πρώτου β-λακταμικού που μελετήθηκε, την πενικιλίνη, ως πενικιλινο-δεσμευτικές πρωτεΐνες (PBP's). Στον *S. pneumoniae* είναι γνωστές τουλάχιστον 6 PBP's (1A, 1B, 2A, 2B, 2X και 3) που κωδικοποιούνται από τα αντίστοιχα γονίδια και διαχωρίζονται σε δύο κύριες ομάδες, τις υψηλού μοριακού βάρους τάξης 1 και 2 (1A, 1B, 2A, 2B και 2X) και η χαμηλού μοριακού βάρους τάξης 3. Οι υψηλού μοριακού βάρους, PBP 1A, 2B και 2X, είναι οι κυριότεροι στόχοι των β-λακταμικών. Κάθε είδος βακτηρίου παράγει ένα συγκεκριμένο συνδυασμό PBPs, οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τα αμινοξέα, άρα και στην διάταξη του μορίου, με αποτέλεσμα την διαφορετική συγγένεια τους προς τα υποστρώματα, όπως τα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Σε αντιβιοτικά, π.χ. με μεγαλύτερη συγγένεια, χρειάζεται μικρότερη συγκέντρωση για την αναστολή ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

Στον *S. pneumoniae* η πενικιλίνη, η αμοξυκιλίνη και η κεφτριαξόνη, έχουν μεγαλύτερη συγγένεια σε σχέση με την κεφακλόρη και άλλα β-λακταμικά.

Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά δρουν κατά του *S. pneumoniae* αναστέλλοντας τη δράση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην παραγωγή της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος, των PBPs. Η αντοχή στα β-λακταμικά αντιβιοτικά επιτυγχάνεται μέσω μεταλλάξεων στα *pbp* γονίδια με αποτέλεσμα την μειωμένη συγγένεια για αυτά τα αντιβιοτικά και την εμφάνιση του φαινομένου του μωσαϊκισμού. Η δομή των PBPs αναπαριστάται στην Εικόνα 1.

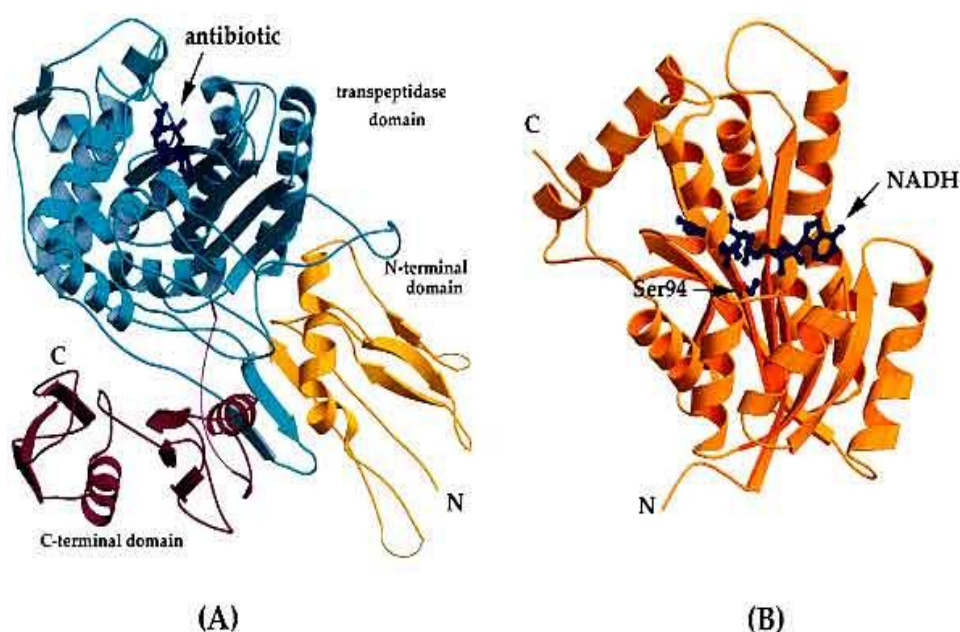
Χρειάζονται πολυάριθμες μεταλλάξεις σε πολλαπλά *pbp* γονίδια, ώστε να προκύψουν στελέχη πνευμονιοκόκκων μετρίως ή πλήρως ανθεκτικά.¹⁸ Στην κλινική πράξη μάλιστα, το πιο πιθανό σενάριο είναι η αντοχή αυτή να είναι αποτέλεσμα μεταφοράς DNA από συγγενικά είδη στρεπτοκόκκων (*S. mitis*, *S. oralis*) και ενσωμάτωσης στο χρωμόσωμα του *S. pneumoniae*¹⁹⁻²⁵. Οι τροποποιημένες PBPs έχουν μικρότερη συγγένεια (affinity) για τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, με αποτέλεσμα να απαιτείται μεγαλύτερη συγκέντρωση του σκευάσματος.

Η αντοχή στην πενικιλίνη προκαλείται από τροποποιημένες PBPs, με σημαντικότερες για τον πνευμονιόκοκκο τις 2X, 2B και λιγότερο την 1A. Οι 2X και 2B μπορούν από μόνες τους να

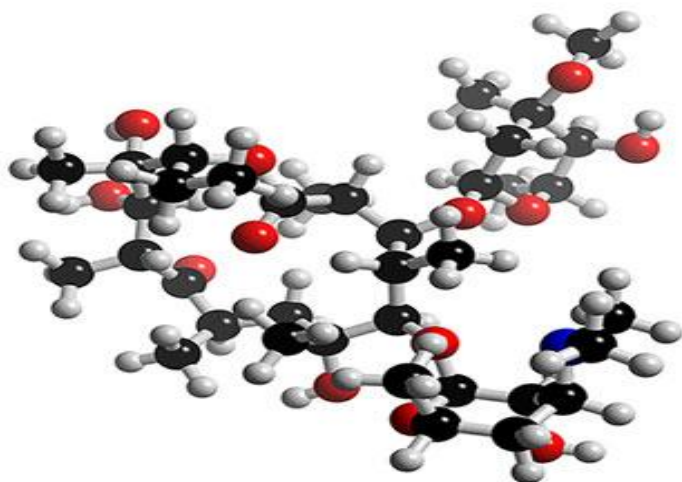
προσδώσουν ανθεκτικό φαινότυπο. Μεταλλαγές στην 1A προσδίδουν υψηλού επιπέδου αντοχή μόνον εφόσον συνυπάρχουν και μεταλλαγές σε μία από τις 2X ή 2B. Για την αντοχή στις κεφαλοσπορίνες ευθύνονται οι PBP 1A και 2X, ενώ η PBP 2B παίζει ρόλο στην αντοχή στην πενικιλίνη.²⁶⁻²⁸

Για να είναι κλινικά σημαντική η αύξηση των MIC στις β-λακτάμες, απαιτείται η παρουσία μεταλλάξεων σε περισσότερες της μιας PBP. Στελέχη στα οποία η MIC της πενικιλίνης είναι ≥ 1 γενικά έχουν μεταλλάξεις στις PBP2B, PBP2X και PBP1A.²⁹ Επίσης, στελέχη με υψηλού επιπέδου αντοχή στην κεφοταξίμη είχαν αλλαγές στις PBP2X και PBP1A.^{30, 31}

Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί σε εργαστηριακά στελέχη ότι σημειακές μεταλλάξεις οδηγούν σε αντοχή στις β-λακτάμες, όπως, για παράδειγμα, η μετάλλαξη T550A στην PBP 2X, η οποία προκαλεί αντοχή στην κεφοταξίμη και υπερευαισθησία στην πενικιλίνη, και η μετάλλαξη T446A στην PBP 2B.³² Τέλος, μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια εκτός των PBPs, έχουν ανιχνευθεί σε ανθεκτικά στις β-λακτάμες στελέχη, όπως το γονίδιο *CroA*, που συμμετέχει στη σύνθεση του τειχοϊκού οξέος.



Εικόνα 1. Δομή πενικιλινोδεσμευτικών πρωτεϊνών (PBP)



Εικόνα 2. Δομή της ερυθρομυκίνης

5.β. Μακρολίδες-Λινκοσαμίδες-Στρεπτογραμμίνες Β (ομάδα MLS_B)

Τα MLS αντιβιοτικά είναι αναστολείς της πρωτεϊνσύνθεσης (Εικόνα 3). Αν και εν γένει θεωρούνται βακτηριοστατικά αντιβιοτικά, ειδικά για τον πνευμονιόκοκκο θεωρούνται βακτηριοκτόνα. Εξαιτίας της κατάχρησης των μακρολιδών στη θεραπεία λοιμώξεων του αναπνευστικού, η αντοχή του πνευμονιόκοκκου σε αυτή την κατηγορία αντιμικροβιακών έχει αυξηθεί σημαντικά. Παγκοσμίως, η αντοχή του πνευμονιόκοκκου στις μακρολίδες έχει ξεπεράσει την αντοχή στην πενικιλίνη (Εικόνα 4 και 5).³³⁻³⁵

Κυριότεροι τύποι αντοχής (Εικόνα 6):

1. Αντοχή μέσω **αντλίας εκροής**, εκφράζεται μέσω του γονιδίου *mef*, το οποίο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή μίας **ATP-εξαρτώμενης αντλίας εκροής** για τις μακρολίδες με 14- και 15-μελή δακτύλιο λακτόνης (Εικόνα 7).

Σε κάποιες χώρες, όπως στις ΗΠΑ, η εκροή του αντιβιοτικού είναι ο συχνότερος μηχανισμός αντοχής στις μακρολίδες. Η αντοχή αυτού του τύπου είναι συνήθως χαμηλού επιπέδου (MIC ≤16) και περιλαμβάνει τις μακρολίδες 14 και 15 ατόμων, ενώ δεν επηρεάζει τις μακρολίδες 16 ατόμων, τις λινκοσαμίδες και τις στρεπτογραμμίνες (φαινότυπος M). Το γονίδιο *mef* κωδικοποιεί αντλία εκροής μακρολιδών. Το γονίδιο αυτό περιγράφηκε ως *mef*(A) στον πυογόνο στρεπτόκοκκο και ως *mef*(E) στον πνευμονιόκοκκο, τα 2 αυτά γονίδια όμως εμφανίζουν >80% ομοιότητα και περιγράφονται ως *mef*(A/E). Ένα άλλο γονίδιο, το *msr*(D), ανάλογο ενός γονιδίου του σταφυλοκόκκου, έχει επίσης περιγραφεί στον πνευμονιόκοκκο.

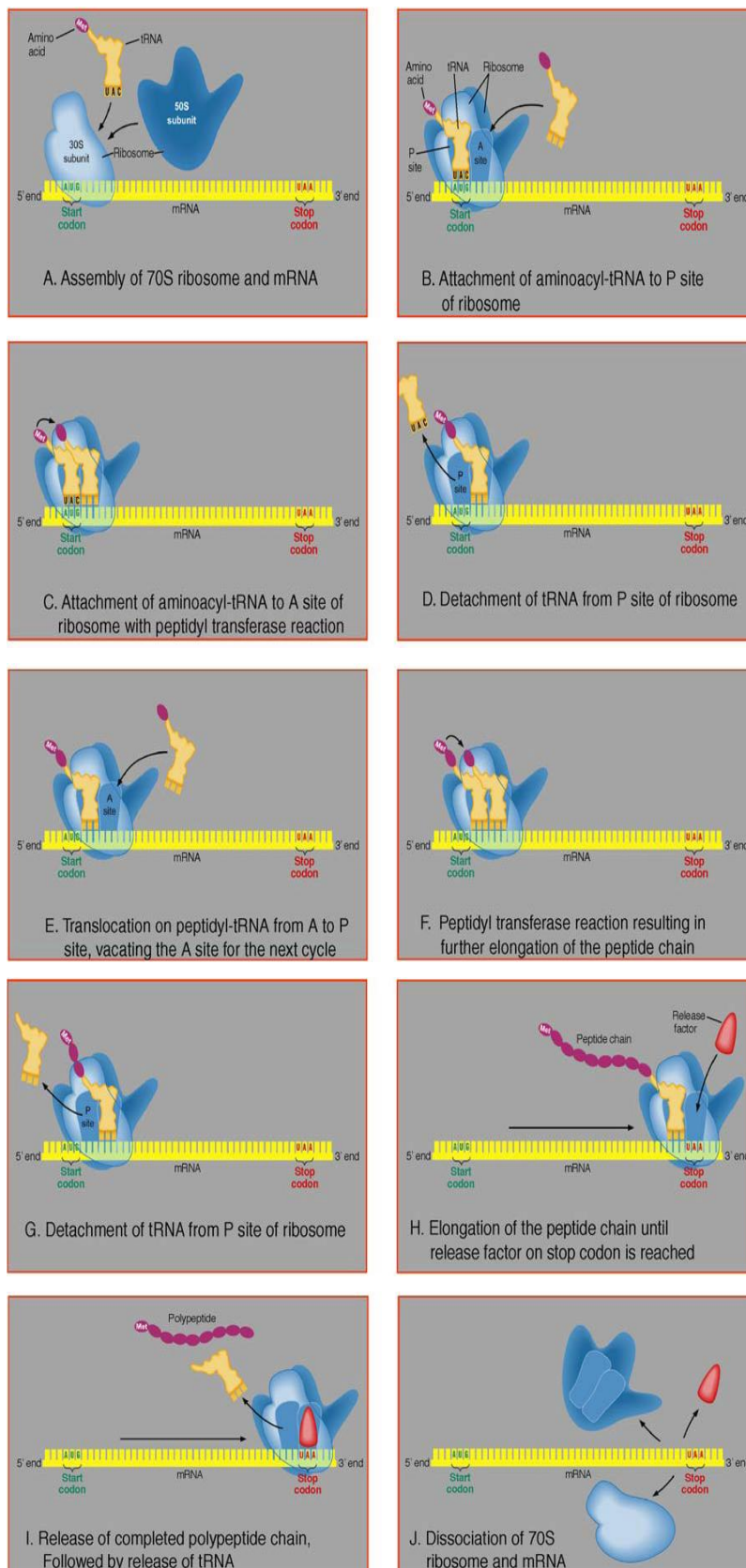
2. **Τροποποίηση στόχου** που εκφράζεται μέσω του γονιδίου *ermB*, όπου η **μεθυλίωση μιας αδενίνης στο 23S rRNA** οδηγεί σε ελλειμματική σύνδεση των 14-, 15- και 16-μελών μακρολιδών, λινκοζαμίδων και στρεπτογραμίνης Β στην κοινή τους θέση στόχου στην **50S** ριβοσωμιακή υπομονάδα.

Οι μακρολίδες αναστέλλουν τη σύνθεση των βακτηριακών πρωτεϊνών μέσω της σύνδεσής τους σε μία εσοχή της 23S υπομονάδας του ριβοσώματος.

Η τροποποίηση του στόχου συνίσταται σε μεθυλίωση μιας βάσης στην περιοχή V του 23S rRNA (A2058). Εξαιτίας της μεθυλίωσης, το αντιβιοτικό δεν μπορεί πλέον να εισέλθει στην εσοχή του ριβοσώματος και για το λόγο αυτό προκαλείται αντοχή υψηλού επιπέδου, που δεν αναστρέφεται με τη χρήση υψηλών δόσεων (MIC $\geq$ 64). Αντοχή προκαλείται με αυτό το μηχανισμό στις μακρολίδες 14, 15 και 16 ατόμων, στις λινκοσαμίδες και στις στρεπτογραμμίνες Β (φαινότυπος MLS_B). Η διασταυρούμενη αντοχή με αυτές τις ομάδες αντιβιοτικών οφείλεται στο γεγονός ότι τα σημεία δέσμευσής τους στο ριβόσωμα είναι παραπλήσια αυτού των μακρολιδών. Συνήθως, υπεύθυνο για αυτό το μηχανισμό αντοχής είναι το γονίδιο *erm(B)*, ενώ κάποιες φορές μπορεί να ενέχεται και το γονίδιο *erm(TR)*, το οποίο ανήκει στην ομάδα *erm(A)*.³⁶

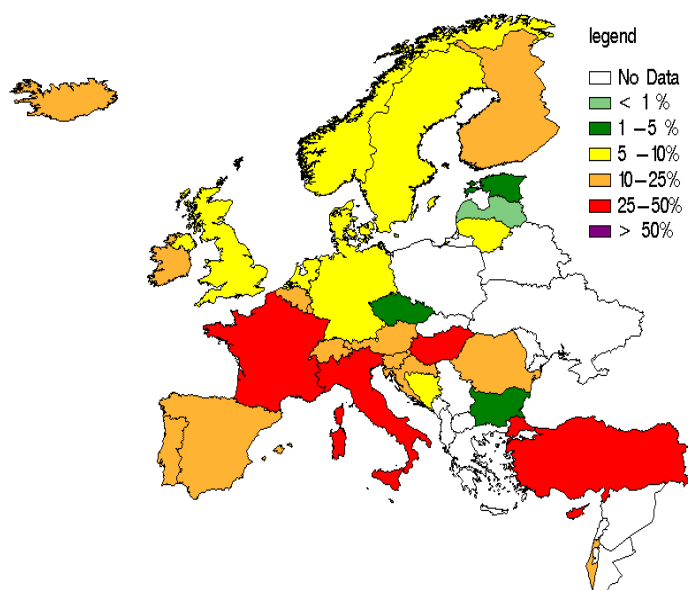
Ένας μηχανισμός που παρατηρείται όλο και συχνότερα σε στελέχη πνευμονιοκόκκου είναι η μετάλλαξη στις ριβοσωμιακές πρωτεΐνες L4 και L22.

Ο προσδιορισμός των φαινοτύπων αντοχής στις μακρολίδες γίνεται με την μέθοδο επαγωγής των δύο δισκίων (ερυθρομυκίνης-κλινδαμυκίνης) – Double disk diffusion test (Εικόνα 6). Η ιδιοσυστασιακή ή επαγωγίμη αυτή αντοχή μπορεί να ανιχνευθεί μέσω της εν λόγω δοκιμασίας, όταν ένα δισκίο κλινδαμυκίνης (2 μ g) τοποθετείται σε απόσταση 12 mm από ένα δισκίο ερυθρομυκίνης (15 μ g) πάνω σε ένα τρυβλίο Mueller Hinton Blood Agar (MHB), όπου έχει επιστρωθεί το ελαιώδες του μικροβίου. Το τρυβλίο επωάζεται σε ατμόσφαιρα CO₂ στους 35° C για 20 με 24 ώρες και κατόπιν παρατηρούνται οι διάμετροι αναστολής. Ανάλογα με τις διαμέτρους αναστολής, ένα στέλεχος μπορεί να χαρακτηριστεί ανθεκτικό σε ερυθρομυκίνη και κλινδαμυκίνη, οπότε ο φαινότυπος αντοχής είναι ο ιδιοσυστασιακός (CR-MLS_B), ανθεκτικό μόνο στην ερυθρομυκίνη και άρα με φαινότυπο αντοχής τον M, ενώ αν στην ζώνη αναστολής της κλινδαμυκίνης παρουσιαστεί ένας ευθειαςμός, ακριβώς απέναντι από το δισκίο της ερυθρομυκίνης, δίνοντας στην ζώνη αναστολής της κλινδαμυκίνης το σχήμα του γράμματος D (ζώνη D), τότε υπάρχει αντοχή MLS_B επαγωγίμου τύπου και ο φαινότυπος είναι ο IR (IR-MLS_B).



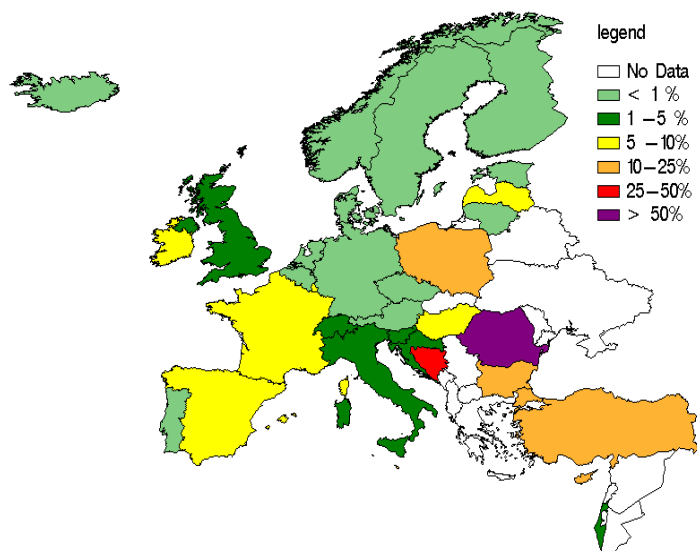
Εικόνα 3. Τρόπος δράσης των μακρολιδών (MR Jacobs et al., Clin Lab Med, 2004)

Proportion of Erythromycin non susceptible *S. pneumoniae* isolates in participating countries in 2008
(c) EARSS



Εικόνα 4. Ποσοστά μη ευαίσθητων στην ερυθρομυκίνη στελεχών *S. pneumoniae* σε Ευρωπαϊκές χώρες το 2008.

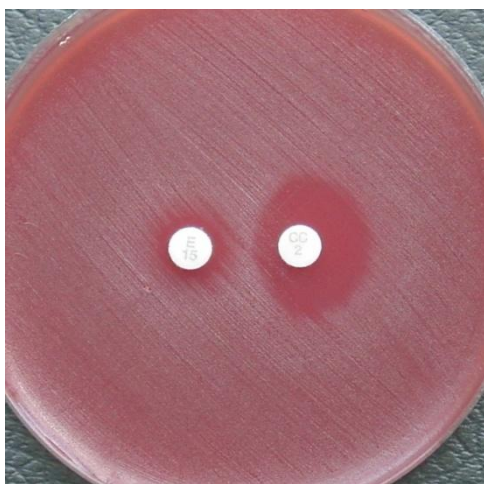
Proportion of Penicillin high resistant *S. pneumoniae* isolates in participating countries in 2008
(c) EARSS



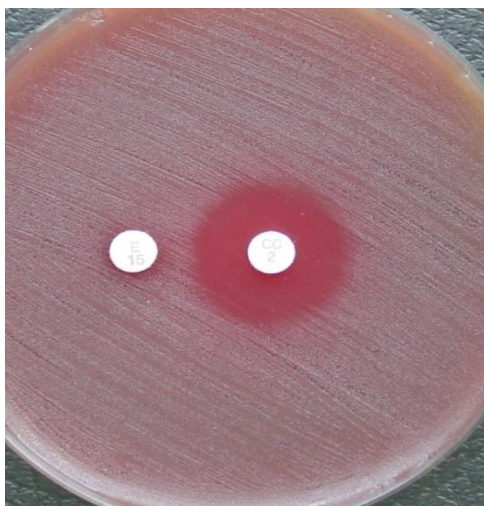
Εικόνα 5. Ποσοστά στελεχών *S. pneumoniae* με υψηλού επιπέδου αντοχή στην πενικιλίνη, σε Ευρωπαϊκές χώρες το 2008.



Φαινότυπος CR-MLS_B
Γονίδιο *ermB*



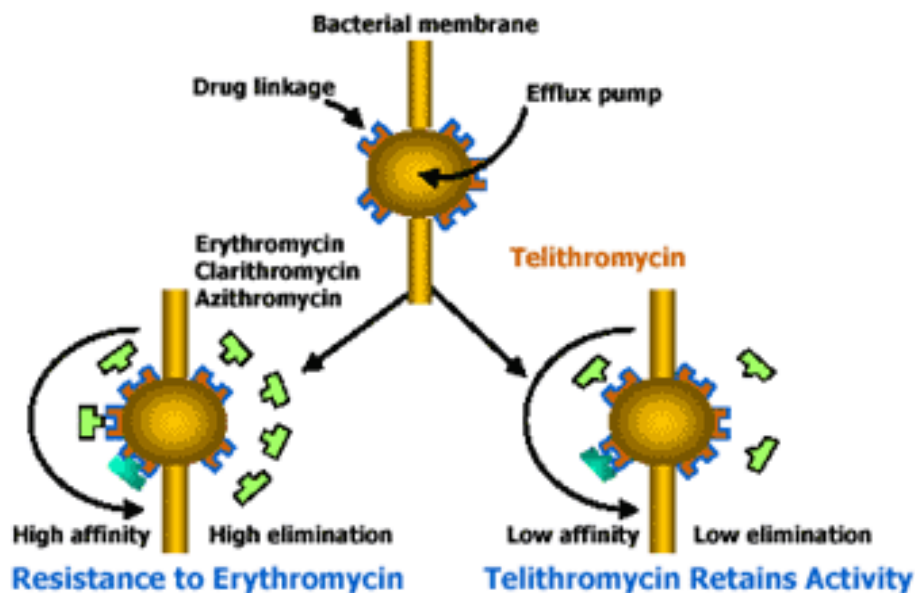
Φαινότυπος IR-MLS_B
Γονίδιο *ermTR*



Φαινότυπος M
Γονίδιο *mefA/E*

Εικόνα 6. Φαινότυποι MLS_B - Δοκιμασία δύο δίσκων (Double disk diffusion test).

Efflux Mechanism of Resistance: Mef (A)



Adapted from Zhanel GG, et al. *Drugs* 2002;62:1771-1804.
Bearden DT, et al. *Pharmacother* 2001;21:1204.

39

Εικόνα 7. Μηχανισμός αντοχής μέσω αντλίας εκροής

USA	<i>mef</i>
Canada	<i>mef</i>
Japan	<i>ermB</i>
Hong Kong	<i>mef</i>
Finland	<i>mef</i>
Russia	<i>mef</i>
Germany	<i>mef ermB</i>
Belgium	<i>ermB</i>
Poland	<i>ermB</i>
France	<i>ermB</i>
Greece	<i>mef</i>
Spain	<i>mef</i>
Italy	<i>ermB</i>
Romania	<i>ermB</i>
Slovakia	<i>ermB</i>
Bulgaria	<i>mef</i>
Slovenia	<i>ermB</i>
Czech Rep.	<i>ermB</i>

Εικόνα 8. Επικρατέστεροι μηχανισμοί MLS_B αντοχής σε στελέχη *S. pneumoniae* ανά χώρα

5.γ. Τετρακυκλίνες

Οι τετρακυκλίνες είναι ομάδα φυσικών ή ημισυνθετικών αντιβιοτικών με πυρήνα hydronaphthacene και 4 δακτυλίους με διάφορες προσθετικές ομάδες. Γνωστότερες, οι βραχείας δράσης (τετρακυκλίνη, οξυτετρακυκλίνη), οι ενδιάμεσης δράσης (διμεκλοκυκλίνη) και οι μακράς δράσης (δοξυκυκλίνη, μινοκυκλίνη). Είναι αναστολείς πρωτεϊνοσύνθεσης, αντιδρώντας αντιστρεπτά με την βακτηριακή ριβοσωμιακή υπομονάδα 30S, εμποδίζοντας την σύνδεση του t-RNA με την ειδική θέση σύνδεσης στο ριβόσωμα.

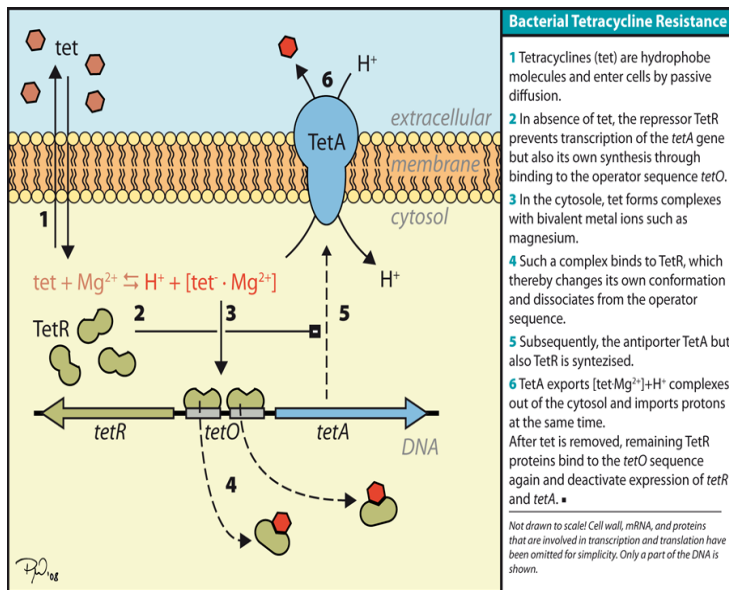
Οι κυριότεροι μηχανισμοί αντοχής είναι (Εικόνα 9):

- **Προστασία ριβοσώματος (στόχου)**

Αποτελεί τον κύριο μηχανισμό αντοχής που ανευρίσκεται σε στα στελέχη *S. pneumoniae*. Πρόκειται για την προστασία της υπομονάδας 30S του ριβοσώματος από τη σύνδεση σε αυτήν του αντιβιοτικού. Την προστατευτική αυτή δράση ασκούν οι πρωτεΐνες TetM και TetO, που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *tetM* και *tetO*, με το *tetM* να είναι το συχνότερο στον πνευμονιόκοκκο, ενώ γενικά στα Gram θετικά βακτήρια, συναντούμε τα *tetM*, *tetO*, *tetP*, *tetS* και *otrA*.^{37,38} Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν δράση GTPάσης η οποία φαίνεται να συμμετέχει στην απομάκρυνση των τετρακυκλινών από το ριβόσωμα. Ο γονιδιακός έλεγχος αυτού του μηχανισμού, βρίσκεται σε μεταθετά γονιδιακά στοιχεία. Το γονίδιο *tetM* μεταφέρεται σε συζευκτικά τρανσποζόνια, τα οποία μπορεί να περιέχουν επίσης και γονίδια όπως το *ermB* για αντοχή στις μακρολίδες. Αυτό το γενετικό περιβάλλον εξηγεί τη συνεχιζόμενη υψηλή αντοχή του πνευμονιόκοκκου στις τετρακυκλίνες παρά την ελάττωση της χρήσης του, εφόσον το γονίδιο επιλέγεται εξαιτίας της πίεσης από τη χρήση μακρολιδών. Το γενετικό περιβάλλον του *tetO* δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Επιπλέον, τροποποίηση του tRNA μπορεί επίσης να ευθύνεται για την αντοχή του πνευμονιόκοκκου στις τετρακυκλίνες.

- **Αντλίες εξώθησης τετρακυκλινών**

Η τετρακυκλίνη εξωθείται εκτός του κυττάρου με μηχανισμό αντλίας της κυτταρικής μεμβράνης. Είναι πλασμιδιακής προέλευσης και ο κυριότερος μηχανισμός αντοχής στις τετρακυκλίνες περισσότερο για Gram-αρνητικά και λιγότερο για Gram-θετικά βακτήρια. Γονίδια που κωδικοποιούν για τον συγκεκριμένο μηχανισμό αντοχής στα Gram-θετικά βακτήρια, είναι τα *tetK*, *tetL*, *tetP* και *otrB*.



Εικόνα 9. Μηχανισμοί αντοχής στις τετρακυκλίνες.

5.δ. Κο-τριμοξαζόλη

Η αντοχή στην τριμεθοπρίμη οφείλεται στην αντικατάσταση ενός αμινοξέος (ισολευκίνη από λευκίνη) στο ένζυμο DHFR (dihydrofolate reductase). Το ένζυμο αυτό ανάγει το διϋδροφολικό οξύ σε τετραϋδροφολικό οξύ χρησιμοποιώντας NADPH ως δότη ηλεκτρονίων και κωδικοποιείται από το γονίδιο *dhfr*. Τα βακτήρια διαθέτουν τέτοια ένζυμα DHFR. Τα ένζυμα αυτά ρυθμίζουν την ποσότητα τετραϋδροφολικού στο κύτταρο, όπου η ουσία αυτή, όπως και τα παράγωγά της είναι απαραίτητα για τη σύνθεση πρόδρομων ουσιών νουκλεϊκών οξέων και άρα η ενδεχόμενη έλλειψη ή μη φυσιολογική τους λειτουργία, οδηγεί σε αδυναμία κυτταρικής ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού. Τα κωδικοποιημένα μέσω πλασμιδίων DHFR, εμφανίζουν υψηλού επιπέδου αντοχή στην τριμεθοπρίμη. Η τριμεθοπρίμη δρα ανασταλτικά στη λειτουργία του ενζύμου, οπότε σε μεταλλάξεις του γονιδίου αναπτύσσεται αντίσταση. Η αντοχή στις σουλφοναμίδες σχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί τη DHPS (dihydropteroate synthase), και συγκεκριμένα μία μετάλλαξη που οδηγεί στην προσθήκη 2 αμινοξέων. Το DHPS είναι ένα ένζυμο το οποίο παράγει διϋδροπτεροϊκό οξύ σε βακτήρια, αποτελώντας στόχο για τις σουλφοναμίδες, οι οποίες ανταγωνίζονται για τη θέση σύνδεσης με το παρα-αμινοβενζοϊκό οξύ (PABA). Κωδικοποιείται από το γονίδιο *dhps* το οποίο βρίσκεται σε χρωμόσωμα είτε σε διάφορα πλασμίδια που σχετίζονται με αντιμικροβιακή αντοχή. Στελέχη πνευμονιοκόκκου που είναι ανθεκτικά στην τριμεθοπρίμη συνήθως είναι ανθεκτικά και στο συνδυασμό. Εξαιτίας της εκτεταμένης χρήσης κο-τριμοξαζόλης για προφύλαξη σε ασθενείς με AIDS, η αντοχή του πνευμονιοκόκκου σε αυτό το αντιβιοτικό είναι πιο έκδηλη σε αυτόν τον πληθυσμό.

5.ε. Κινολόνες (Εικόνα 10)

Η DNA γυράση είναι υπεύθυνη για την υπερελίκωση του βακτηριακού DNA. Τα γονίδια *gyrA* και *gyrB* κωδικοποιούν για τις αντίστοιχες υπομονάδες του ενζύμου, ενώ η τοποϊσομεράση IV είναι υπεύθυνη για τον διαχωρισμό των δύο θυγατρικών αλύσων του DNA μόλις τελειώσει η αντιγραφή. Τα γονίδια *parC* και *parE* κωδικοποιούν για το ένζυμο αυτό. Πολλές από τις παλαιές κινολόνες συνδέονταν εκλεκτικά περισσότερο με την DNA γυράση παρά με την τοποϊσομεράση IV, ενώ οι νεότερες έχουν την τάση να συνδέονται και με τα δύο ένζυμα.

Οι κινολόνες σχηματίζουν ένα σύμπλοκο με το διπλής έλικας μόριο του DNA και το ένζυμο (DNA γυράση ή τοποϊσομεράση IV) εμποδίζοντας την αντιγραφή του DNA. Η δράση τους είναι διπλή: α) αναστέλλουν την λειτουργία του ενζύμου και β) «κλειδώνουν» το ένζυμο μέσα στο DNA αποτρέποντας το, να κινηθεί καθ' όλο το μήκος της αντιγραφικής «φουρκέτας».

Η αναστολή της DNA γυράσης, καθιστά μη δυνατή την σύνδεση της διπλής έλικας του DNA με συνέπεια την συσσώρευση τοξικών προϊόντων και τον τελικό θάνατο του βακτηριακού κυττάρου.

Στην περίπτωση της τοποϊσομεράσης, η αναστολή του διαχωρισμού των θυγατρικών αλύσων του DNA που συμβαίνει αργότερα στον κύκλο ζωής του βακτηρίου, οδηγεί αργά αλλά σταθερά σε διακοπή της αντιγραφής.

Όσον αφορά στους μηχανισμούς αντοχής, κυρίως επιτυγχάνεται μέσω μεταλλάξεων στις DR περιοχές που αφορούν την αντοχή στις κινολόνες (QRDRs) των γονιδίων *parC* και *gyrA*, τα οποία κωδικοποιούν για τις α υπομονάδες της DNA-γυράσης και τοποϊσομεράσης IV, ή των γονιδίων *gyrB* και *parE* που κωδικοποιούν για τις β υπομονάδες των ιδίων ενζύμων.

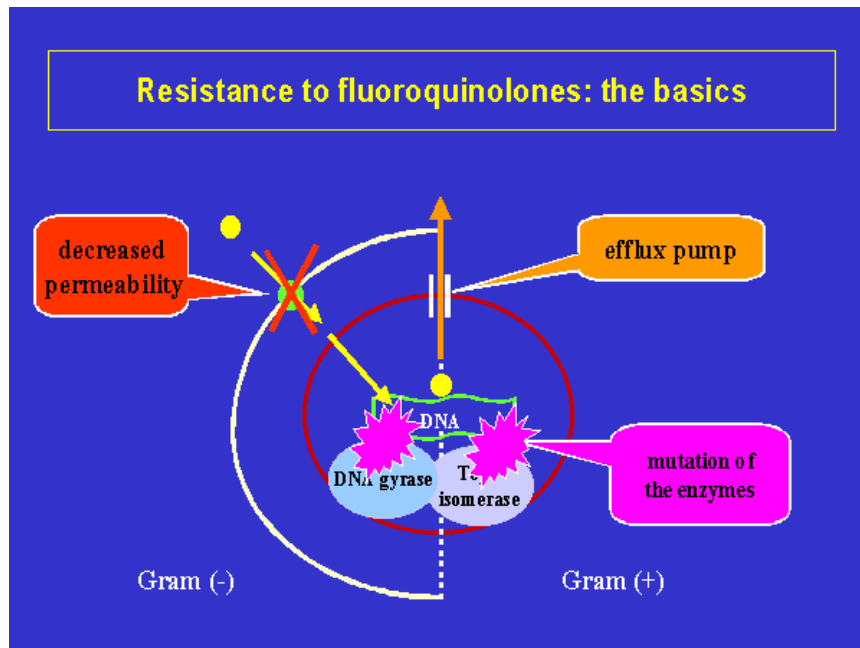
Η αντοχή είναι σε δύο στάδια: μία μετάλλαξη που μεταβάλλει την συγγένεια μεταξύ φθοριοκινολονών και του στόχου στον οποίο συνδέονται και επάγουν την αντιμικροβιακή δράση και μια επακόλουθη μετάλλαξη σε δευτερογενή στόχο που οδηγεί σε περαιτέρω ελάττωση της *in vitro* δραστηριότητας. Οι μεταλλάξεις αυτές μπορεί να είναι αυτόματες (*de novo*) ή μέσω πρόσληψης DNA από άλλα βακτήρια.

Οι δύο διαδοχικές μεταλλάξεις αφορούν η μεν πρώτη συνήθως στο γονίδιο-στόχο της κάθε κινολόνης (*parC* για τη σιπροφλοξασίνη και λεβοφλοξασίνη ή *gyrA* για τη μοξιφλοξασίνη και γκατιφλοξασίνη) και οδηγεί σε στέλεχος με ελαττωμένη MIC στις κινολόνες, χωρίς όμως να ξεπερνά τα breakpoints της αντοχής, ενώ η δεύτερη, σε διαφορετικό συνήθως γονίδιο, οδηγεί σε υψηλότερου επιπέδου αντοχή. Μελέτες έδειξαν ότι όταν η MIC της λεβοφλοξασίνης είναι 2 mg/L, είναι πιθανό να υπάρχουν στελέχη με την πρώτη μετάλλαξη, και επομένως υπάρχει πιθανότητα θεραπευτικής αποτυχίας.

Μερικά στελέχη *S. pneumoniae* έχουν εμφανίσει αντοχή στις κινολόνες μέσω ενός μηχανισμού αντλίας εκροής (efflux). Πρόκειται για μια πρωτεΐνη εκροής, την PmrA, ενδογενή

πρωτεΐνη, η οποία θεωρείται ότι ευθύνεται για την δημιουργία πολυαντοχής. Πιθανολογείται η αντοχή να οφείλεται σε αυτόματη μετάλλαξη (*de novo*) και τέτοιες αντλίες εκροής φαίνεται να παίζουν κάποιο ρόλο στην αντοχή του πνευμονιοκόκκου στη σιπροφλοξασίνη.

Η αντοχή του πνευμονιοκόκκου στις κινολόνες παραμένει σε χαμηλά επίπεδα, όμως η αυξανόμενη χρήση των αντιμικροβιακών αυτών για τις λοιμώξεις κατωτέρου αναπνευστικού απαιτεί περαιτέρω επιτήρησή της.



Εικόνα 10. Μηχανισμοί αντοχής στις φθοριοκινολόνες.

5. στ. Χλωραμφαινικόλη

Η αντοχή του πνευμονιοκόκκου στη χλωραμφαινικόλη προκαλείται από την ακετυλίωσή της από μία ακετυλτρανσφεράση (CAT). Το γονίδιο *cat* περιέχεται σε ένα συζευκτικό τρασποζόνιο, το Tn5253, όπως αναφέρθηκε ανωτέρω. Στελέχη πνευμονιοκόκκου ανθεκτικά στη χλωραμφαινικόλη έχει βρεθεί ότι περιέχουν αλληλουχίες ομόλογες προς το πλασμίδιο του σταφυλοκόκκου pC194.

5.ζ. Ριφαμπικίνη

Η αντοχή στη ριφαμπικίνη σχετίζεται με τροποποιήσεις στην υποομάδα β της RNA πολυμεράσης, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *rpoB*. Προς το παρόν η αντοχή του πνευμονιοκόκκου στη ριφαμπικίνη είναι σπάνια.

6. Επιδημιολογία της αντοχής στην Ελλάδα και διεθνώς

Με την ανακάλυψη της πενικιλίνης τη δεκαετία του 1940, η θνητότητα της πνευμονιοκοκκικής πνευμονίας μειώθηκε σημαντικά, λόγω της εξαιρετικής δραστηριότητας του αντιβιοτικού (όλα τα στελέχη πνευμονιοκόκκου ήταν ευαίσθητα σε συγκεντρώσεις πενικιλίνης $\leq 0,01$ mg/L). Αν και με πειράματα στο εργαστήριο είχαν παρασκευασθεί τεχνητά στελέχη με αντοχή, για πρώτη φορά παρατηρήθηκε μειωμένη ευαισθησία στην πενικιλίνη σε κλινικό στέλεχος τη δεκαετία του 1960 στην Βοστώνη.³⁹ Μετά το 1990, η αντοχή επεκτάθηκε και στις κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς.⁴⁰ Στην συνέχεια, η αντοχή επεκτάθηκε σε διάφορες περιοχές του κόσμου (Νότιος Αφρική, Αυστραλία, Ισπανία) κατά την διάρκεια της δεκαετίας του 1970, ενώ από το 1980 και μετά αποτελεί πλέον παγκόσμιο φαινόμενο.⁴¹⁻⁴⁴ Η επίπτωση πάντως των ανθεκτικών ή με ενδιάμεση ευαισθησία στην πενικιλίνη στελεχών ποικίλλει από χώρα σε χώρα. Τα ποσοστά των μη ευαίσθητων στελεχών ξεπερνούν το 50% σε κάποιες χώρες ή περιοχές (Ισπανία, Γαλλία, Ασία), ενώ παραμένουν χαμηλότερα σε άλλες (Φινλανδία, Σουηδία, Γερμανία). Στην Βόρεια Αμερική τέλος κυριαρχεί η ενδιάμεση ευαισθησία και όχι η πλήρης αντοχή.⁴⁵⁻⁵¹

Η προηγούμενη χρήση αντιβιοτικών είναι ο κυριότερος παράγοντας κινδύνου για λοιμώξεις από ανθεκτικούς πνευμονιοκόκκους, ενώ άλλοι παράγοντες είναι η ηλικία κάτω των 5 ετών, και η παραμονή σε βρεφονηπιακούς σταθμούς.^{52,53} Επιπλέον, παράγοντες κινδύνου για διεισδυτική νόσο από ανθεκτικό πνευμονιοκόκκο αποτελούν η προηγούμενη χρήση αντιβιοτικών, η διαμονή σε οίκους ευγηρίας, η πρόσφατη νοσηλεία, η λοίμωξη από HIV, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, η πρόσφατη λοίμωξη αναπνευστικού, η υποκείμενη ανοσοκαταστολή και η απομόνωση πνευμονιοκόκκου από άλλη εστία εκτός του αίματος. Η διασπορά ανθεκτικών στελεχών μεταξύ ατόμων σε βρεφονηπιακούς σταθμούς, νοσοκομεία, οίκους ευγηρίας, φυλακές, κέντρα αστέγων και γενικά σε μέρη όπου παρατηρείται συγχρωτισμός, διευκολύνει την αύξηση των ποσοστών αντοχής.

Όσον αφορά στις μακρολίδες, η αντοχή του πνευμονιοκόκκου αυξήθηκε παράλληλα με την αντοχή στην πενικιλίνη. Όπως θα ήταν αναμενόμενο, η αντοχή στις μακρολίδες συσχετίζεται με την κατανάλωση αυτής της ομάδας αντιβιοτικών και τις συνήθειες συνταγογράφησης σε διάφορες χώρες. Στα μέσα της δεκαετίας του 1990, η αντοχή στις μακρολίδες ξεπέρασε το 20% σε αρκετές χώρες, αν και υπήρχε μεγάλη διαφορά από χώρα σε χώρα με τα ποσοστά να κυμαίνονται από $<3\%$ έως $>70\%$.^{54, 55} Όταν ανθεκτικοί κλώνοι πνευμονιοκόκκου διεισδύσουν σε μία περιοχή, η αντοχή συνήθως αυξάνεται ταχέως. Η κλωνική διασπορά είναι σημαντικός μηχανισμός διάδοσης της αντοχής και τα παιδιά αποτελούν σημαντική δεξαμενή διασποράς ανθεκτικών κλώνων.⁵⁶

Το ποσοστό των πολυανθεκτικών στελεχών και των διαφόρων κλώνων πνευμονιοκόκκου επίσης ποικίλλει από χώρα σε χώρα. Μελέτες από τις ΗΠΑ μεταξύ 1994-2007 έδειξαν ότι το 9-24% των στελεχών ήταν πολυανθεκτικά (MDR), δηλαδή ανθεκτικά σε τουλάχιστον 3 κατηγορίες αντιβιοτικών.⁵⁷⁻⁵⁹ Σε μία μελέτη από 15 ευρωπαϊκές χώρες το 2004-2005, το 15,8% ήταν MDR, με μεγάλες διαφορές μεταξύ χωρών (0-42,9%).⁵⁹ Τα ποσοστά MDR ήταν μεγαλύτερα στην Ασία

(26,8% μεταξύ 2000-2001) με ιδιαίτερα αυξημένα ποσοστά σε ορισμένες χώρες (Βιετνάμ 71,4%, Κορέα 45,2%).⁶⁰ Αντιθέτως, τα ποσοστά των MDR στη Βραζιλία ήταν χαμηλά (4,6%).⁶¹ Η διασπορά αυτών των στελεχών διευκολύνεται από τη χρήση των αντιβιοτικών, ενώ η χρήση μιας κατηγορίας αντιβιοτικών προωθεί την εμφάνιση αντοχής και σε αντιβιοτικά άλλης κατηγορίας. Τα ποσοστά MDR είναι αυξημένα σε περιοχές με μεγάλη πληθυσμιακή πυκνότητα, σε περιοχές που συνορεύουν με περιοχές στις οποίες είναι αυξημένη η συχνότητα MDR, καθώς και σε περιοχές με αυξημένη κατανάλωση αντιβιοτικών.

Η δραματική αύξηση της αντοχής παγκοσμίως οφείλεται στη διασπορά ορισμένων διεθνών κλώνων. Το διεθνές επιδημιολογικό δίκτυο του πνευμονιοκόκκου - Pneumococcal Molecular Epidemiology Network, ταξινομεί αυτούς τους κλώνους ανάλογα με τη χώρα στην οποία απομονώθηκαν αρχικά, τον ορότυπο του αρχικού κλώνου και τον αύξοντα αριθμό του κλώνου, π.χ. Spain23F-1 ή France 9V-3). Σε μια μελέτη¹⁵⁸ που διενεργήθηκε στην Ισπανία όπου από την δεκαετία του 1980 η αντοχή στην πενικιλίνη ήταν κοινή στη χώρα αυτή, συνδέθηκε με τους εξής πέντε κλώνους: Spain23F-1, Spain6B-2, Spain9V-3, Spain14-5 και τον κλώνο 19FST87, οι οποίοι έχουν ήδη συσχετισθεί με αντοχή στην ερυθρομυκίνη και το φαινόμενο της πολυαντοχής. Ο κλώνος Sweden15A-25 (ST63)¹⁵⁸ είναι ένας κλώνος με διεθνή διασπορά που εμφανίζει το φαινόμενο της ανταλλαγής ελύτρου με διαφόρους οροτύπους (14,19A, 19F και 23F) (www.mlst.net) και έχει περιγραφεί στην Ισπανία ως αίτιο περιστατικών μηνιγγίτιδας και πολυανθεκτικών-και στη σιπροφλοξασίνη-στελεχών. Ο κλώνος 19F-ST87¹⁵⁸ έχει βρεθεί σε Ισπανία, Πορτογαλία και Ιταλία (www.mlst.net). Οι κλώνοι Spain23F-1 και Spain6B-2¹⁵⁸ κυριαρχούν στην Ισπανία τις τελευταίες 2 δεκαετίες, αλλά μετά την εισαγωγή του 7δύναμου συζευγμένου εμβολίου το 2001, παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση στην εμφάνιση των κλώνων Spain23F-1 και Spain6B-2. Ο κλώνος 19A-ST276¹⁵⁸, ένα SLV του κλώνου Denmark14-32-ST230, έχει βρεθεί σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες και έχει συσχετισθεί με τους οροτύπους/οροομάδες 14, 19, 20, 23 και 24 (www.mlst.net). Τα στελέχη των οροτύπων 19F και 19A που είχαν την μεγαλύτερη συχνότητα απομόνωσης μεταξύ των ερυθρομυκίνη ανθεκτικών στελεχών στην προαναφερθείσα μελέτη, στην πλειονότητά τους, ανήκαν στους διεθνείς κλώνους Sweden15A-25, Denmark14-32 και Spain23F-1¹⁵⁸, σαν αποτέλεσμα του φαινόμενου ανταλλαγής ελύτρου. Variant του κλώνου Spain9V-3¹⁵⁸ βρέθηκε να εμπεριέχει το γονίδιο *mef*(E) μεταξύ στελεχών οροτύπου 14 στην Ισπανία, ενώ στη Γερμανία¹⁵⁸ ο κλώνος England14-9 βρέθηκε να εμπεριέχει το γονίδιο *mef*(A). Η συσχέτιση των γονιδίων *erm*(B) και *mef*(E) φαίνεται να οφείλεται στην κλωνική διασπορά του Taiwan19F-14 κλώνου και λιγότερο στην διάδοση των Taiwan23F-15 και Spain23F-1 κλώνων¹⁵⁸.

Έξι ορότυποι, οι 6A, 6B, 9V, 14, 19F, 23F, αποτελούν πάνω από το 80% των ανθεκτικών στην πενικιλίνη ή τις μακρολίδες στελεχών *S. pneumoniae* παγκοσμίως.⁵⁹ Η παρουσία αυτών των οροτύπων ποικίλλει από χώρα σε χώρα.

Σε μία Πανελλήνια μελέτη της αντοχής του πνευμονιοκόκκου τα έτη 2004-2006, μελετήθηκαν 780 στελέχη φορέας σε παιδιά έως 6 ετών και 89 κλινικά στελέχη από ενηλίκους⁶². Τα ποσοστά

αντοχής αναγράφονται στον Πίνακα 4. Δεν παρατηρήθηκε αντοχή στη μοξιφλοξασίνη και λεβοφλοξασίνη, αν και 3,5% των παιδιατρικών και 23,2% των κλινικών στελεχών ενηλίκων είχαν MIC σιπροφλοξασίνης >2mg/L. Υψηλά ποσοστά αντοχής παρατηρήθηκαν στην πενικιλίνη, μακρολίδες, τετρακυκλίνες και στην κο-τριμοξαζόλη. Συχνότεροι ορότυποι και στους δύο πληθυσμούς ήταν οι 19F, 14, 23F και 6B.

Πίνακας 4. Ποσοστά (%) αντοχής σε διάφορα αντιμικροβιακά ανθεκτικών στελεχών πνευμονιοκόκκου

	Στελέχη φορείας	Κλινικά στελέχη
πενικιλίνη	34,7	48,3
υψηλού επιπέδου	14,4	25,8
κεφουροξίμη	25,1	46,1
κεφτριαξόνη	1	5,6
υψηλού επιπέδου	0,1	2,2
ερυθρομυκίνη	33,5	48,3
τετρακυκλίνη	26,4	32,6
κοτριμοξαζόλη	44,2	40,4

Άλλη Πανελλήνια μελέτη, έδειξε ότι οι πιο συχνοί ορότυποι ήταν ο 14 (44.6%) στις διεισδυτικές λοιμώξεις, ο 19F (43.5%) στις μη διεισδυτικές λοιμώξεις και ο 6B (22.8%) σε στελέχη από φορεία.⁶³ Μεταξύ των διεισδυτικών στελεχών, η κάλυψη του 7-δύναμου εμβολίου ήταν 75.3%. Οι αντοχές στις διάφορες κατηγορίες ασθενών αναφέρονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Ποσοστά (%) αντοχής του πνευμονιοκόκκου στα κυριότερα αντιμικροβιακά.

Αντιβιοτικό	Διεισδυτικές λοιμώξεις	Μη διεισδυτικές λοιμώξεις	Φορεία	Σύνολο
Πενικιλίνη	17.2	53	43.2	44.6
Ενδιάμεση	16.6	26.5	30.6	31.8
Υψηλού επιπέδου	0.5	16.5	12.6	12.9
Αμοξικιλίνη	0	3.4	2.9	2.7
Ενδιάμεση		3.4	2.9	2.7
Κεφοταξίμη	1.1	1.4	0.5	1.2
Ενδιάμεση	1.1	1.2	0	1
Υψηλού επιπέδου	0	0.2	0.5	0.2
Ερυθρομυκίνη	30.1	49.8	36.4	43.6
M	25.8	35.1	16	29.6
CR	3.2	13.6	17	12.4
IR	1.1	1.1	3.4	1.5
Κο-τριμοξαζόλη	23.7	49	44.2	43.5
Χλωραμφαινικόλη	1.6	5.6	10.6	5.9
Τετρακυκλίνη	10.2	41.7	35	34.7
Κλινδαμυκίνη	3.2	13.6	17	12.4
ΡΙφαμπικίνη	0	0.3	0	0.2
Πολυανθεκτικά	11.3	44	36.8	36.6

7. Παθογένεια-Παράγοντες λοιμογονικότητας

7.α. Έλυτρο

Το αντιγόνο του ελύτρου είναι κρίσιμος παράγοντας παθογονικότητας του πνευμονιοκόκκου. Σχεδόν όλα τα κλινικά στελέχη πνευμονιοκόκκου περιβάλλονται από έλυτρο, το οποίο αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες ολιγοσακχαριτών που συντίθενται και πολυμερίζονται στο κυτταρόπλασμα και εν συνεχεία μεταφέρονται στο εξωτερικό του κυττάρου από τρανφεράσες. Με βάση τις αντιγονικές διαφορές του ελύτρου, διακρίνονται 91 διαφορετικοί ορότυποι πνευμονιοκόκκου.

Το έλυτρο του πνευμονιοκόκκου παίζει σημαντικό ρόλο στην αποτροπή της φαγοκυττάρωσης από τα κύτταρα του ξενιστή. Έχει αντιφαγοκυτταρικές ιδιότητες, γιατί αναστέλλει την εναπόθεση συμπληρώματος και τη φαγοκυττάρωση, εάν δεν υπάρχει ειδικό του οροτύπου αντίσωμα, που δρα

ως οφωνή. Σε κάθε ορότυπο αντιστοιχείται ένας αριθμός και όσοι εμφανίζουν δομική συγγένεια μεταξύ τους ταξινομούνται μαζί. Το 90% περίπου των περιστατικών πνευμονίας και μηνιγγίτιδας από πνευμονιόκοκκο, με συνοδή βακτηραιμία, προκαλούνται από 23 οροτύπους. Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί που εξηγούν το ρόλο του ελύτρου στην παθογένεια της λοίμωξης είναι:

- η αδυναμία των φαγοκυττάρων, λόγω απουσίας ειδικών υποδοχέων, να αναγνωρίσουν τους πολυσακχαρίτες του ελύτρου
- η παρουσία ηλεκτροχημικών δυνάμεων που απωθούν τα φαγοκύτταρα
- η απενεργοποίηση του συμπληρώματος
- η αδυναμία αναγνώρισης από τα κύτταρα του ξενιστή των αντισωμάτων έναντι του κυτταρικού τοιχώματος του πνευμονιοκόκκου, τα οποία είναι προσκολλημένα στο κυτταρικό τοίχωμα αλλά επικαλύπτονται από το έλυτρο.

7.β. Πνευμονολυσίνη

Ο πνευμονιόκοκκος παράγει σχετικά περιορισμένο αριθμό τοξινών, σε αντίθεση με μικροοργανισμούς όπως ο *Streptococcus pyogenes*, που παράγουν αρκετές διαφορετικές τοξίνες. Η κυριότερη τοξίνη του πνευμονιοκόκκου είναι η πνευμονολυσίνη. Η συγκεκριμένη τοξίνη απελευθερώνεται μετά την autolysis του βακτηρίου και προκαλεί βλάβη στις κυτταρικές μεμβράνες εισερχόμενη σε αυτές αλληλεπιδρώντας με τη χοληστερόλη. Δρα αναστέλλοντας τη χημειοταξία των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων, ενώ ασκεί κυτταροτοξική δράση στα φαγοκύτταρα και στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού. Επίσης, αναστέλλει τη φαγοκυττάρωση, την οξειδωτική έκρηξη, τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων, αλλά και τη σύνθεση των ανοσοσφαιρινών. Επιπλέον, ενεργοποιεί το συμπλήρωμα και επάγει την παραγωγή του παράγοντα νέκρωσης των όγκων και της ιντερλευκίνης 1, προκαλώντας έτσι φλεγμονώδη αντίδραση. Η τοξίνη αυτή, χρησιμοποιούμενη σε πειραματικά μοντέλα, επάγει τα κλινικά χαρακτηριστικά της λοβώδους πνευμονίας και συμβάλλει στην θνητότητα από τη νόσο, ενώ η λοίμωξη από στελέχη πνευμονιοκόκκου που δεν παράγουν την τοξίνη συνοδεύεται από σημαντική ελάττωση της θνητότητας.⁶⁴ Διαφορετικές περιοχές του μορίου της πνευμονολυσίνης ευθύνονται για την κυτταροτοξική της δράση και για τη δράση στο συμπλήρωμα.

Μετά από *in vitro* λοίμωξη ανθρώπινων μακροφάγων από πνευμονιόκοκκο, παρατηρείται αύξηση της έκφρασης αρκετών γονιδίων και η πλειοψηφία των αλλαγών αυτών αφορά την απάντηση στη πνευμονολυσίνη. Επίσης, μετά από πνευμονιοκοκκική πνευμονία, αυξάνονται τα αντισώματα έναντι της τοξίνης αυτής, ενώ η παρουσία τους σχετίζεται με μικρότερο κίνδυνο συνύπαρξης βακτηραιμικής νόσου.⁶⁵⁻⁶⁷ Φαίνεται ότι η πνευμονολυσίνη είναι ανοσογονική και ενδέχεται να κριθεί κατάλληλη για τη δημιουργία νέου αντιπνευμονιοκοκκικού εμβολίου.

7.γ. Αυτολυσίνη

Η αυτολυσίνη είναι μια πρωτεΐνη του πνευμονιοκόκκου, η οποία όταν ενεργοποιηθεί διασπά τις πεπτιδικές γέφυρες που συγκρατούν τη δομή της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος και διασπά το κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου, συμβάλλοντας έτσι στην αναδιαμόρφωση του σχήματος του κυττάρου και τη λύση του. Επιπλέον, διαδραματίζει ρόλο στην παθογένεια της λοίμωξης απελευθερώνοντας από το κυτταρικό τοίχωμα ουσίες όπως η πνευμονολυσίνη, αλλά και θραύσματα της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος, τα οποία ενεργοποιούν το συμπλήρωμα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, μια μαζική φλεγμονώδη αντίδραση η οποία κατέχει σημαντικό ρόλο στη παθογένεια της πνευμονιοκοκκικής πνευμονίας και μηνιγγίτιδας. Στελέχη που δεν παράγουν αυτολυσίνη είναι λιγότερο λοιμογόνα σε πειραματικά μοντέλα, ενώ η παραγωγή αντισώματος έναντι της αυτολυσίνης προσφέρει κάποια προστασία στη λοίμωξη.⁶⁸

7.δ. IgA πρωτεάση

Η IgA είναι η κυριότερη ανοσοσφαιρίνη που απαντάται στις αναπνευστικές εκκρίσεις και αποτελεί αμυντικό μηχανισμό του οργανισμού κατά των διηθητικών λοιμώξεων. Πάνω από το 90% της IgA είναι IgA1. Όπως και οι άλλοι δύο κύριοι παθογόνοι μικροοργανισμοί που προκαλούν μηνιγγίτιδα, έτσι και ο πνευμονιόκοκκος παράγει εξωκυττάρια πρωτεάση, που διασπά το αντίσωμα στη περιοχή της άρθρωσης (hinge). Ο πνευμονιόκοκκος παράγει μία IgA1 πρωτεάση, η οποία απενεργοποιεί την IgA εξουδετερώνοντας έτσι ένα σημαντικό αμυντικό μηχανισμό του οργανισμού. Η IgA1 πρωτεάση επιτρέπει στο βακτήριο να διαφεύγει από τη προστατευτική δράση του κυριότερου ισότυπου ανοσοσφαιρίνης, που συναντάται στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα.

8. Προδιαθετικοί παράγοντες για πνευμονιοκοκκική νόσο

Ο πνευμονιόκοκκος είναι μικρόβιο του σώματος του ανθρώπου και ζώων. Δεν επιζεί στο φυσικό περιβάλλον και ζει, χωρίς να προκαλεί νόσο στους βλενογόννους του ανώτερου αναπνευστικού του ανθρώπου. Πηγή μόλυνσης για τον άνθρωπο είναι συνήθως κάποιος ασθενής από πνευμονιοκοκκική νόσο, που διαθέτει σε αφθονία το μικρόβιο μέσα στις εξιδρωματικές βλάβες του και το διασπείρει στο περιβάλλον του, ένας φορέας ή αυτόχθονη χλωρίδα. Η ύπαρξη προδιαθεσικών παραγόντων είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη της νόσου.

Οι προδιαθετικοί παράγοντες για πνευμονιοκοκκική νόσο είναι:

- 1) Οι διαταραχές παραγωγής αντισωμάτων που διακρίνονται σε: α) πρωτοπαθείς και περιλαμβάνουν τη Συγγενή αγαμμασφαιριναιμία, τη Κοινή ποικίλλουσα (επίκτητη) υπογαμμασφαιριναιμία και την Επιλεκτική ανεπάρκεια υποομάδος IgG και β) δευτεροπαθείς που περιλαμβάνουν παθήσεις όπως το Πολλαπλούν μυέλωμα, τη Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, το Λέμφωμα και τη Λοίμωξη από τον ιό HIV.

- 2) Οι διαταραχές συμπληρώματος (πρωτοπαθείς ή δευτεροπαθείς), όπως η ελάττωση ή απουσία του C1, C2, C3, C4.
- 3) Οι διαταραχές του αριθμού των ουδετεροφίλων που διακρίνονται σε: α) πρωτοπαθείς όπως η Κυκλική ουδετεροπενία και β) δευτεροπαθείς που περιλαμβάνουν την Ουδετεροπενία φαρμακευτικής αιτιολογίας και την Απλαστική αναιμία.
- 4) Οι διαταραχές της λειτουργικότητας των ουδετεροφίλων που παρατηρούνται σε καταστάσεις όπως ο Αλκοολισμός, η Κίρρωση ήπατος, ο Σακχαρώδης διαβήτης, η Θεραπεία με κορτικοειδή και η Νεφρική ανεπάρκεια.
- 5) Η αναποτελεσματική αντιμετώπιση πνευμονιοκοκκικής βακτηριαίμιας που διακρίνεται σε: α) πρωτοπαθή και περιλαμβάνει την Συγγενή ασπληνία και υποσπληνία και β) δευτεροπαθή που περιλαμβάνει καταστάσεις όπως η Σπληνεκτομή και η Δρεπανοκυτταρική αναιμία.
- 6) Διάφορα πολυπαραγοντικά αίτια, όπως οι ακραίες ηλικίες, η θεραπεία με κορτικοειδή, ο υποσιτισμός, η κίρρωση ήπατος, η νεφρική ανεπάρκεια, ο σακχαρώδης διαβήτης, ο αλκοολισμός, κλπ.
- 7) Ο αυξημένος κίνδυνος έκθεσης που υπάρχει σε: παιδικούς σταθμούς, στρατόπεδα, φυλακές και χώρους φιλοξενίας αστέγων.
- 8) Η προηγηθείσα λοίμωξη αναπνευστικού, όπως η λοίμωξη από ιό της Γρίπης.
- 9) Οι διάφορες φλεγμονώδεις καταστάσεις, το κάπνισμα, το βρογχικό άσθμα και η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια.

9. Αποικισμός από πνευμονιόκοκκο

Ο πνευμονιόκοκκος παρουσιάζει μία προτίμηση στον αποικισμό του ρινοφάρυγγα, που έγκειται στην ικανότητά του να προσκολλάται στα επιθηλιακά κύτταρα της περιοχής με τη βοήθεια ειδικών μορίων (επιφανειακό αντιγόνο A, choline-binding proteins). Στη συνέχεια, η ικανότητα του πνευμονιόκοκκου για περαιτέρω διείσδυση οφείλεται στην αλληλεπίδρασή του με τον παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Συχνά βρίσκεται μαζί με άλλα βακτήρια όπως *Haemophilus influenzae* και *Moraxella catarrhalis*.

Διασπείρεται μέσω σταγονιδίων του αναπνευστικού και τα παιδιά αποτελούν την κύρια πηγή μετάδοσης προς τους ενήλικες. Σε παγκόσμιο επίπεδο, τα ποσοστά φορείας είναι υψηλότερα στα μικρά παιδιά (40–60%), σε σύγκριση με τα μεγαλύτερα παιδιά (12%), τους εφήβους (6–10%) και τους ενήλικες (3–4%)²⁴¹. Ο αποικισμός από τον πνευμονιόκοκκο είναι μία δυναμική διαδικασία, όπου συνήθως ένας ορότυπος του μικροβίου ανευρίσκεται κάθε φορά, με το πρώτο στέλεχος που θα βρεθεί, να αποικίζει για περισσότερο χρονικό διάστημα τον ρινοφάρυγγα. Είναι επίσης συχνή η ανάκτηση του ίδιου οροτύπου.

Σε όλες τις ηλικίες, η συχνότητα αυξάνει αν γίνουν επανειλημμένες καλλιέργειες και φτάνει το 40-60% σε παιδιά βρεφονηπιακών σταθμών και γενικά σε πληθυσμούς όπου παρατηρείται

συγχρωτισμός, όπως ορφανοτροφεία, κ.ά. Επίσης, μετά από πρόσφατη ιογενή λοίμωξη, ρινοφαρυγγική φορεία της μητέρας και παθητικό κάπνισμα²⁴¹. Η πρότερη χρήση αντιβιοτικών δεν φαίνεται να αλλάζει τα ποσοστά φορείας, όμως φαίνεται να επάγει τον αποικισμό με ανθεκτικά στα αντιβιοτικά στελέχη και ειδικά στις β-λακτάμες²⁴¹. Τους πρώτους μήνες της ζωής, η φορεία είναι πιο συχνή και στα μικρά παιδιά τα ποσοστά αποικισμού μπορεί να ξεπερνούν το 40%. Μία μελέτη από τις ΗΠΑ έδειξε ότι ο αποικισμός παρατηρείται για πρώτη φορά στην ηλικία των 6 μηνών και διαρκεί κατά μέσο όρο για 4 μήνες.⁶⁹ Αντίθετα, ο αποικισμός παρατηρήθηκε αρκετά νωρίτερα, ακόμα και τις πρώτες εβδομάδες της ζωής, σε παιδιά κοινωνικά ασθενέστερων τάξεων. Στους ενήλικους ο αποικισμός διαρκεί για μικρότερο διάστημα, περίπου 2-4 εβδομάδες. Επιπλέον, ο αποικισμός είναι συχνότερος τις ψυχρότερες εποχές του χρόνου, αν και ο πνευμονιόκοκκος μπορεί να απομονώνεται από το ρινοφάρυγγα καθ'όλη τη διάρκεια του έτους.⁶⁹

Ο αποικισμός όσον αφορά στο παθογόνο, του επιτρέπει την ανταλλαγή γενετικού υλικού και την πιθανότητα απόκτησης ιδιοτήτων λοιμογονικών αλλά και ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Στον ξενιστή, προωθείται η φυσική ανοσία μέσω των Β-λεμφοκυττάρων έναντι της πολυσακχαριδικής κάψουλας, που είναι ο μεγαλύτερος παράγοντας λοιμογονικότητας. Οι ορότυποι χαμηλής ανοσογονικότητας, όπως οι 6,14,19 και 23 είναι αυτοί που ανευρίσκονται στο ρινοφάρυγγα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, αλλά και οι πιο πιθανοί να εμφανίσουν αντοχή σε σχέση με τους περισσότερους ανοσογόνους ορότυπους²⁴¹.

10. Νόσοι από πνευμονιόκοκκο

10.α. Διεισδυτικές λοιμώξεις (μηνιγγίτιδα - μικροβαιμία)

Οι διεισδυτικές πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις ορίζονται από την απομόνωση του πνευμονιοκόκκου σε στείρους υπό φυσιολογικές συνθήκες ιστούς, όπως το αίμα, το πλευριτικό υγρό και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Η επίπτωση της διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, λόγω της επιδημίας από τον ιό HIV, αλλά και την ανάδυση στελεχών *Streptococcus pneumoniae*, ανθεκτικών στα αντιβιοτικά.

Με τον όρο βακτηριακή μηνιγγίτιδα εννοούμε οξεία λοίμωξη του κεντρικού νευρικού συστήματος με συμμετοχή των μηνίγγων. Οι συνηθέστεροι υπεύθυνοι λοιμογόνους παράγοντες είναι οι *Neisseria meningitidis*, *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* τύπου b και λιγότερο συχνά ο β-αιμολυτικός στρεπτόκοκκος ομάδας B, Gram (-) μικρόβια και *Listeria* spp.

Ο *S. pneumoniae* είναι το συχνότερο αίτιο βακτηριακής μηνιγγίτιδος, με την εξαίρεση περιόδων επιδημιών μηνιγγιτιδοκοκκικής νόσου. Η πρόσβαση του πνευμονιοκόκκου στο κεντρικό νευρικό σύστημα γίνεται είτε από το μέσο ους ή από τους παραρρινίους κόλπους, είτε με αιματογενή διασπορά.

Στα παιδιά, ο μηνιγγιτιδόκοκκος, ο πνευμονιόκοκκος και ο αιμόφιλος ινφλουέντζας τύπου b προκαλούν πάνω από το 75% όλων των κρουσμάτων βακτηριακής μηνιγγίτιδας και είναι

υπεύθυνοι για το 90% της βακτηριακής μηνιγγίτιδας. Τα τελευταία χρόνια λόγω της συστηματικής εφαρμογής υποχρεωτικού εμβολιασμού έχει καταγραφεί σημαντική μείωση των περιστατικών μηνιγγίτιδας από αιμόφιλο ινφλουέντζας, ενώ αναμένεται αντίστοιχη μείωση των περιστατικών μηνιγγίτιδας από πνευμονιόκοκκο.

Στους ενήλικες επικρατεί ο πνευμονιόκοκκος ακολουθούμενος από το μηνιγγιτιδόκοκκο και έπεται η λιστέρια, η οποία εμφανίζει ιδιαίτερα αυξημένη συχνότητα στους άνω των 50 ετών (όπως και στα νεογνά). Λιγότερο συχνά βακτηριακά αίτια όπως ο σταφυλόκοκκος, ο στρεπτόκοκκος ομάδας B, τα εντεροβακτηριοειδή και η λιστέρια προκαλούν νόσο σε ευαίσθητους πληθυσμούς, κυρίως ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς.

Η μετάδοση των λοιμογόνων παραγόντων γίνεται με άμεση επαφή από άτομο σε άτομο με σταγονίδια των αναπνευστικών εκκρίσεων.

Οι ορότυποι που επικρατούν και σχετίζονται με τις διεισδυτικές λοιμώξεις, ποικίλλουν ανάλογα με την ηλικία, τη χώρα αλλά και το πέρασμα του χρόνου²⁴¹. Στα μικρά παιδιά και σε ανοσοκατεσταλμένους ξενιστές, κυριαρχούν συνήθως λιγότερο ανοσογόνοι ορότυποι (π.χ. 6, 14, 19 και 23). Περισσότερο διεισδυτικοί ορότυποι (π.χ. 1, 5, και 7) τείνουν να μολύνουν άτομα χωρίς υποκείμενα νοσήματα. Σε παγκόσμιο επίπεδο, επτά ορότυποι είναι υπεύθυνοι για την πλειονότητα των περιστατικών διεισδυτικών λοιμώξεων (1, 5, 6A, 6B, 14, 19F και 23F). Οι ορότυποι 1, 5, 6A/6B, και 14 είναι οι επικρατόντες ορότυποι που προκαλούν διεισδυτικές λοιμώξεις στις περισσότερες χώρες²⁴¹ και ειδικά στις αναπτυσσόμενες. Οι ορότυποι 1, 5 και 6A δεν περιλαμβάνονται στο συζευγμένο επταδύναμο εμβόλιο, ενώ υπάρχουν και φυσικές διακυμάνσεις στους ορότυπους που είναι υπεύθυνοι για διεισδυτικές λοιμώξεις σε διαφορετικές χρονικές στιγμές²⁴¹.

Η θνητότητα από πνευμονιοκοκκική μηνιγγίτιδα κυρίως στα παιδιά, είναι τουλάχιστον δύο φορές υψηλότερη από τη μηνιγγιτιδοκοκκική.⁷⁰ Παρόλο τη μεγάλη σημασία της επιδημιολογικής επιτήρησης της νόσου σε ευρωπαϊκό επίπεδο, δεν υπάρχει πλήρης καταγραφή των επιδημιολογικών στοιχείων είτε λόγω της απουσίας εθνικών επιδημιολογικών κέντρων είτε της παρουσίας δυο ή περισσότερων κέντρων ανά χώρα, προκαλώντας μεγάλο πρόβλημα στην επιδημιολογική επιτήρηση της νόσου.

Η Ελλάδα επιτηρεί τη μηνιγγίτιδα ως σύνολο, δηλαδή συλλέγει στοιχεία τόσο για τη μηνιγγιτιδοκοκκική νόσο (που αποτελεί συνήθως τον κύριο στόχο της επιτήρησης), όσο για τη λοιπή βακτηριακή αλλά και την άσηπτη μηνιγγίτιδα.

Το τμήμα επιδημιολογικής επιτήρησης και παρέμβασης του ΚΕΕΛΠΝΟ συγκεντρώνει στοιχεία για τα κρούσματα μηνιγγίτιδας από όλη τη χώρα, τα οποία προέρχονται από την υποχρεωτική δήλωση, από τις Διευθύνσεις Υγείας των Νομαρχιών και μετά από καθημερινή επικοινωνία με το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας της Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας. Ακολουθεί επικοινωνία με το νοσοκομείο όπου νοσηλεύεται ο ασθενής προκειμένου να ληφθούν συμπληρωματικές πληροφορίες σχετικά με την κλινική εικόνα και τα εργαστηριακά ευρήματα του

ασθενούς. Κεφαλαιώδους σημασίας είναι η αιτιολογική κατάταξη του κρούσματος προκειμένου να ληφθούν σε συνεργασία με τη Διεύθυνση Υγείας όλα τα απαραίτητα μέτρα (χημειοπροφύλαξη, όταν χρειάζεται, ή εμβολιασμός), ώστε να αποτραπεί η διασπορά της νόσου σε όλα τα άτομα που ήρθαν σε στενή επαφή με το κρούσμα.

Τα στοιχεία καταγράφονται και αναλύονται κατά εβδομάδα, μήνα, έτος, νομαρχία δήλωσης, υπεύθυνο μικροοργανισμό, τύπο κρούσματος, ηλικία και φύλο, προκειμένου να διαπιστωθούν επιδημικές εξάρσεις. Η αύξηση των κρουσμάτων οδήγησε το Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας, τόσο στη μοριακή ταυτοποίηση των κλινικών δειγμάτων, όσο και στην τυποποίηση του μικροοργανισμού ως προς τους συχνότερους οροτύπους. Από τα επιδημιολογικά δεδομένα που προέκυψαν, φαίνεται ότι τα κρούσματα μειώθηκαν κατά την πενταετία 2006-2008 σε σχέση με την προηγούμενη πενταετία (2000-2005) με περαιτέρω μείωση την τριετία 2008-2011. Η μοριακή τυποποίηση ως προς τους ορότυπους για τη μετά εμβολίου εποχή (2005), έδειξε ότι υπάρχει αύξηση των οροτύπων 19A, 3, 7F/A και 1 που δεν περιλαμβάνονται στο επτάδυναμο συζευγμένο εμβόλιο.

Σε μηνιγγίτιδα από πνευμονιόκοκκο δεν ενδείκνυται χορήγηση χημειοπροφύλαξης στα άτομα που ήρθαν σε επαφή με το κρούσμα, ενώ ο αντιπνευμονιοκοκκικός εμβολιασμός έχει αποδειχθεί αποτελεσματικό μέσο στην πρόληψη διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου.

Η πνευμονιοκοκκική βακτηριαιμία, σε 20% περίπου των περιστατικών οδηγεί σε θάνατο. Πρόκειται για μια επιπλοκή της πνευμονιοκοκκικής πνευμονίας, που παρουσιάζεται σε περίπου 25% των ασθενών. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν πυρετό, κεφαλαλγία και μυαλγίες.

10.β. Μη διεισδυτικές λοιμώξεις (μέση πυώδης ωτίτιδα-παραρινικολπίτιδα-πνευμονία)

Οι μη διεισδυτικές πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις προκαλούνται όταν τα στελέχη που αποικίζουν το ρινοφάρυγγα μεταφέρονται σε ανατομικές περιοχές από τις οποίες δεν απομακρύνονται άμεσα. Φυσιολογικά, όταν τα βακτηρίδια αποκτούν πρόσβαση στους παραρρινίους κόλπους, στην ευσταχιακή σάλπιγγα ή στους βρόγχους, η δράση των κροσσών τα απομακρύνει.

Η μέση πυώδης ωτίτιδα είναι φλεγμονή του μέσου ωτός. Εμφανίζεται στη περιοχή μεταξύ του τυμπανικού υμένα και του έσω ωτός, συμπεριλαμβανομένης της ευσταχιακής σάλπιγγας. Το συχνότερο σύμπτωμα είναι η ωταλγία. Η οξεία μέση ωτίτιδα (ΟΜΩ) προκαλείται πιο συχνά από ιούς και συνοδεύει συνήθως ιογενή λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού. Μπορεί να οδηγήσει σε βακτηριακή ωτίτιδα σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα. Η μέση ωτίτιδα συνήθως αυτοϊάται μέσα σε 2-6 εβδομάδες. Σε σοβαρές περιπτώσεις, η τυμπανική μεμβράνη μπορεί να υποστεί ρήξη, που ενώ είναι μια εξαιρετικά επώδυνη διαδικασία, συνδέεται σχεδόν πάντα με δραματική ανακούφιση της πίεσης και της ωταλγίας. Η μέση ωτίτιδα συνήθως προκαλείται από ιούς, βακτήρια, μύκητες. Ο *S. pneumoniae* είναι το συχνότερο αίτιο οξείας μέσης ωτίτιδας τόσο στα

παιδιά όσο και στους ενήλικες. Άλλα αίτια είναι: *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, και *Moraxella catarrhalis*.

Προοπτικές μελέτες έδειξαν ότι η μέση ωτίτιδα έπεται σε αρκετές περιπτώσεις του αποικισμού του ρινοφάρυγγα από κάποιο νέο ορότυπο πνευμονιοκόκκου, αν και τις περισσότερες φορές ο αποικισμός δεν ακολουθείται από κλινική νόσο.⁷¹

Η παραρινοκολπίτιδα - ιγμορίτιδα είναι φλεγμονή των παραρρινίων κόλπων, η οποία μπορεί να οφείλεται σε λοίμωξη, αλλεργία ή να είναι αυτοάνοσης αιτιολογίας. Το πιο συχνό αίτιο είναι οι ιοί και τα συμπτώματα υποχωρούν μέσα σε 10 ημέρες. Το φάσμα των μικροοργανισμών που προκαλούν οξεία βακτηριακή παραρινοκολπίτιδα είναι παρόμοιο με της οξείας μέσης ωτίτιδας. Όπως και στη μέση ωτίτιδα, η συμφόρηση του βλεννογόνου εξαιτίας ιογενούς λοίμωξης είναι προδιαθεσικός παράγοντας για την πρόκληση παραρινοκολπίτιδας. Η οξεία παραρινοκολπίτιδα βακτηριακής προέλευσης προκαλείται κυρίως από τα παθογόνα *S. pneumoniae*, *H. influenzae* και *Moraxella catarrhalis*. Άλλα βακτηριακά παθογόνα είναι: *Staphylococcus aureus* και άλλα είδη στρεπτοκόκκων, αναερόβια βακτήρια και λιγότερο συχνά Gram-αρνητικά βακτήρια. Η ιογενής ιγμορίτιδα διαρκεί συνήθως 7 έως 10 ημέρες, ενώ η βακτηριακή είναι η πιο επίμονη. Περίπου το 0,5% έως 2% των ιογενών ιγμορίτιδων καταλήγουν σε επακόλουθη βακτηριακή ιγμορίτιδα. Επιπλοκές της παραρινοκολπίτιδας είναι η εγκεφαλίτιδα, τα αποστήματα, η μηνιγγίτιδα, και άλλες απειλητικές για τη ζωή καταστάσεις.

Η πνευμονιοκοκκική πνευμονία παραμένει και σήμερα μια από τις σημαντικότερες αιτίες νοσηρότητας και θνητότητας παγκοσμίως. Ο *S. pneumoniae* είναι η αιτία για: το 75% όλων των πνευμονιών, επί ενήλικων που εισάγονται σε νοσοκομείο, το 90% όλων των θανάτων από πνευμονία, επί ενήλικων που εισάγονται σε νοσοκομείο, το 20% των περιπτώσεων μηνιγγίτιδας και το 9% των περιπτώσεων βακτηριαιμίας⁷². Επίσης, όσον αφορά στα ηλικωμένα άτομα, το 70% των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων παρατηρείται σε άτομα άνω των 60 ετών, το 64% των ατόμων άνω των 65 ετών με πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις δεν είχαν άλλους παράγοντες κινδύνου παρά μόνο την ηλικία, ενώ η θνητότητα σ' αυτή την ηλικία είναι 40% και δε διαφέρει μεταξύ ασθενών με ή χωρίς χρόνια νοσήματα.⁷³ Η παθογένεια της πνευμονίας σχετίζεται με: μικροεισρόφηση, εισπνοή μικρών ή μεγάλων αεροσταγονιδίων, εισρόφηση του περιεχομένου του στομάχου, αιματογενή διασπορά καθώς και με νόσο κατά συνέχεια ιστού. Είναι σημαντικό ότι το 20% του πληθυσμού (κυρίως παιδιατρικού) τους χειμερινούς μήνες είναι αποικισμένο με πνευμονιόκοκκο. Τα συμπτώματα συνήθως περιλαμβάνουν ρίγος, υψηλό εμπύρετο, εφίδρωση, δύσπνοια, θωρακικό άλγος, μυαλγία, κόπωση και παραγωγικό βήχα. Η επίπτωση της λοίμωξης είναι 8-15 περιπτώσεις/1000άτομα/έτος. Στις ΗΠΑ διαγιγνώσκονται περίπου 5,6 εκατομμύρια περιπτώσεις/έτος, ενώ 1,1 εκατομμύρια περιπτώσεις / έτος απαιτούν νοσηλεία και η πνευμονιοκοκκική πνευμονία είναι η 7η αιτία θανάτου στις ΗΠΑ. Η θνητότητα αγγίζει το 1% σε

εξωνοσοκομειακούς ασθενείς, το 12% στις περιπτώσεις που απαιτούν νοσηλεία και το 40% στις περιπτώσεις που απαιτούν νοσηλεία σε ΜΕΘ.⁷⁴

Οι ορότυποι του μικροβίου που επικρατούν στις μη διεισδυτικές λοιμώξεις είναι αυτοί που επικρατούν και στις διεισδυτικές λοιμώξεις, στη προ και μετά της έναρξης του εμβολιασμού εποχή.

11. Πρόληψη της νόσου - Εμβολιασμός κατά του πνευμονιοκόκκου

Τα εμβόλια που χρησιμοποιούνται για την πρόληψη της πνευμονιοκοκκικής νόσου είναι το πολυσακχαριτιδικό, το οποίο χρησιμοποιείται στους ενήλικες, και τα νεότερα συζευγμένα εμβόλια, τα οποία παρουσιάζουν καλύτερη ανοσογονικότητα σε παιδιά και για το λόγο αυτό έχουν ένδειξη για χρήση σε παιδιά κάτω των 2 ετών.

Το πολυσακχαριτιδικό εμβόλιο του πνευμονιοκόκκου χρησιμοποιείται από το 1983 και ενδείκνυται σε ενήλικες με αυξημένο κίνδυνο σοβαρής διηθητικής νόσου, όπως άτομα άνω των 65 ετών και άτομα με χρόνιες παθήσεις. Τα υποκείμενα νοσήματα για τα οποία ενδείκνυται ο εμβολιασμός με το 23-δύναμο πολυσακχαριτιδικό εμβόλιο διακρίνονται ανάλογα με την ομάδα κινδύνου και είναι⁷⁵:

Για τα Ανοσοεπαρκή άτομα, η Χρόνια καρδιακή νόσος (πλην υπέρτασης), η Χρόνια πνευμονική νόσος (συμπεριλαμβανομένου του άσθματος), ο Σακχαρώδης διαβήτης, η Διαρροή εγκεφαλονωτιαίου υγρού, τα Κοχλιακά εμφυτεύματα, ο Αλκοολισμός, η Χρόνια ηπατική νόσος και το Κάπνισμα.

Για τα Άτομα με ασπληνία, η Δρεπανοκυτταρική νόσος και άλλες αιμοσφαιρινοπάθειες, η Συγγενής ή επίκτητη ασπληνία, η Σπληνική δυσλειτουργία ή Σπληνεκτομή.

Για τα Ανοσοκατεσταλμένα άτομα, οι Συγγενείς ή Επίκτητες Ανοσοανεπάρκειες, η Λοίμωξη από τον ιό HIV, η Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, το Νεφρωσικό σύνδρομο, οι Λευχαιμίες, τα Λεμφώματα, η Νόσος Hodgkin, η Γενικευμένη κακοήθεια, τα Νοσήματα που απαιτούν θεραπεία με ανοσοκατασταλτικά φάρμακα, κορτικοειδή ή ακτινοβολίες, η Μεταμόσχευση οργάνων και το Πολλαπλό μυέλωμα.

Το 23δύναμο πολυσακχαριτιδικό εμβόλιο (PPSV-23) περιλαμβάνει τους ορότυπους 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F και 33F και έχει ένδειξη να γίνεται επιπλέον του συζευγμένου και τουλάχιστον 2 μήνες μετά την τελευταία δόση αυτού, σε παιδιά κάτω των 2 ετών που ανήκουν σε ομάδες με αυξημένο κίνδυνο νόσησης από σοβαρές πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις. Μια αναμνηστική δόση PPSV-23 συνιστάται να γίνεται 5 χρόνια μετά την πρώτη δόση στα άτομα αυτά.

Το κύριο μειονέκτημα των πολυσακχαριτιδικών εμβολίων είναι η έλλειψη αποτελεσματικότητας σε ηλικίες κάτω των δύο ετών. Ο κίνδυνος νόσησης είναι μεγάλος και οφείλεται στο γεγονός ότι η ανοσιακή απάντηση των εμβολίων δε διεγείρει τα Τ-λεμφοκύτταρα.

Τα πολυσακχαριδικά εμβόλια δεν είναι ανοσογόνα σε βρέφη, δε μειώνουν τη φορεία, και δεν παράγουν ανοσολογική μνήμη.

Το πρώτο συζευγμένο πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο, το οποίο άρχισε να εφαρμόζεται το 2000 στις ΗΠΑ, ήταν το επταδύναμο, το οποίο περιείχε 7 όλιγο- και πολυ-σακχαρίτες του ελύτρου του πνευμονιόκκοκου των ορότυπων 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F που είχαν συζευχθεί με μία μη τοξική μορφή της διφθεριτικής πρωτεΐνης CRM197. Οι ορότυποι αυτοί κάλυπταν πάνω από το 73% των ορότυπων που ήταν υπεύθυνοι για τις διεισδυτικές πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις στην Ελλάδα. Έχει αποδειχθεί αποτελεσματικό για την πρόληψη της διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου της παιδικής ηλικίας στις ΗΠΑ, στον Καναδά και στην Ωκεανία. Ωστόσο, τα δεδομένα δείχνουν ότι η κάλυψη που προσφέρει μειώνεται σε 48-74% σε χώρες της Ευρώπης, της Αφρικής, της Λατινικής Αμερικής και σε ορισμένες χώρες της Ασίας.

Το συζευγμένο 7-δύναμο εμβόλιο παρουσιάζει καλύτερη ανοσογονικότητα σε παιδιά μικρότερα των 2 ετών. Στην Ελλάδα, εντάχθηκε στο Εθνικό Πρόγραμμα Εμβολιασμών τον Ιανουάριο του 2006. Χορηγείται σε 4 δόσεις, στις ηλικίες 2, 4, 6 μηνών, με επαναληπτική δόση το 12-15^ο μήνα. Το εμβόλιο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε ενήλικες, στους οποίους είναι εξίσου αποτελεσματικό με το πολυσακχαριτιδικό εμβόλιο, δεν έχει όμως αποδειχθεί ότι υπερέχει και για το λόγο αυτό προτείνεται ακόμη η χρήση του 23-δύναμου εμβολίου στους ενήλικες.

Όμως η μεταβολή στην επιδημιολογία είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση άλλων οροτύπων που δεν περιλαμβάνονται στο επταδύναμο εμβόλιο. Το γεγονός της αντικατάστασης (replacement) οδήγησε στην ανάγκη παρασκευής και νέων εμβολίων 2ης γενεάς. Το επόμενο εμβόλιο που κυκλοφόρησε ήταν το 10-δύναμο συζευγμένο εμβόλιο πνευμονιοκόκκου και του μη τυποποιήσιμου αιμόφιλου της ινφλουέντσας (NTHi), το οποίο εντάχθηκε στο ΕΠΕ το 2009, και περιελάμβανε επιπλέον του 7δύναμου τους ορότυπους 1, 5 και 7F. Η καινοτομία του 10-δύναμου είναι η σύζευξη των πολυσακχαριτών με την πρωτεΐνη του μη τυποποιήσιμου αιμόφιλου της ινφλουέντσας (NTHi), που ως ενεργό αντιγόνο μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή αντισωμάτων έναντι του NTHi. Τα μη τυποποιήσιμα στελέχη του NTHi προκαλούν λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού, όπως (οξεία μέση ωτίτις, παραρρινοκολπίτις) και εξάρσεις χρόνιας πνευμονοπάθειας.

Τον Ιούνιο του 2010 εγκρίθηκε η χρήση του 13-δύναμου συζευγμένου εμβολίου σε παιδιά στις ΗΠΑ. Περιέχει τους ορότυπους 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F και 23F του *S. pneumoniae*. Ιδιαίτερη σημασία έχει ο ορότυπος 19A που εμφανίζει αύξηση και στη χώρα μας τα τελευταία χρόνια²⁵², προκαλεί διεισδυτική νόσο και είναι ανθεκτικός στην πενικιλίνη.

Πολυκεντρική μελέτη που διεξήχθη στη χώρα μας έδειξε ότι ο ορότυπος 19A είναι το συχνότερο αίτιο διεισδυτικής νόσου από πνευμονιόκοκκο και οξείας μέσης ωτίτιδας, σε παιδιά κάτω των 5 ετών στη χώρα μας, ενώ είναι συχνά πολυανθεκτικός σε θεραπείες πρώτης γραμμής²⁵³. Μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα από τη χρήση του PCV-13 τα στοιχεία για την αποτελεσματικότητά του είναι ενθαρρυντικά. Στις ΗΠΑ στοιχεία από 8 μεγάλα νοσοκομεία

υποδεικνύουν μια μείωση 36% των περιστατικών διεισδυτικών λοιμώξεων σε παιδιά, ένα χρόνο μετά την εισαγωγή του εμβολίου με αντίστοιχη μείωση κατά 45% των περιπτώσεων από τον ορότυπο 19A²⁵⁴. Σημαντική μείωση των δηλωθέντων περιστατικών διεισδυτικής νόσου από τους 6 επιπρόσθετους ορότυπους του εμβολίου καταγράφηκε επίσης από το Health Protection Agency της Μεγάλης Βρετανίας στα παιδιά κάτω των 2 ετών και ειδικά από τους ορότυπους 19A και 7F^{255,256}. Στη Γερμανία τρία χρόνια μετά την ένταξη των συζευγμένων εμβολίων 2ης γενιάς καταγράφονται λιγότερα περιστατικά διεισδυτικής νόσου από τους ορότυπους 1, 3, 7F και 19A σε παιδιά κάτω των 2 ετών²⁵⁷. Στη χώρα μας, μέσα στο πρώτο χρόνο κυκλοφορίας του PCV-13 καταγράφηκε μείωση 23,3% των περιστατικών πνευμονιοκοκκικής μηνιγγίτιδας σε παιδιά κάτω των 5 ετών²⁵⁸ και σύμφωνα με τα εγχώρια επιδημιολογικά δεδομένα, το 13-δύναμο εμβόλιο φαίνεται να καλύπτει το 89,7% των στελεχών του πνευμονιοκόκκου που προκαλούν διεισδυτική νόσο. Το 13-δύναμο εμβόλιο έχει αντικαταστήσει πλέον το 7-δύναμο πνευμονιοκοκκικό και η σύσταση εφαρμογής του επεκτείνεται και σε ενήλικες με αυξημένο κίνδυνο νόσησης.

Το εμβόλιο πήρε έγκριση το Δεκέμβριο του 2011 για χρήση σε ενήλικες άνω των 50 ετών. Το ACIP (Advisory Committee on Immunization Practices) δεν έχει ακόμα εκδώσει συστάσεις για χρήση του PCV13 σε όλους τους ενήλικες ηλικίας ≥ 50 ετών. Οι κατευθυντήριες οδηγίες για τη χρήση του εμβολίου σε όλες τις ομάδες ενηλίκων ηλικίας ≥ 50 ετών βρίσκονται ακόμα σε εκκρεμότητα και μελέτες βρίσκονται σε εξέλιξη. Τον Ιούνιο του 2012, το ACIP συνέστησε τη χρήση του PCV13 σε ενήλικες με ανοσοκαταστολή ηλικίας ≥ 19 ετών, με λειτουργική ή ανατομική ασπληνία, σε άτομα με διαφυγή εγκεφαλονωτιαίου υγρού, ή άτομα που φέρουν εμφυτεύματα του κοχλία. Η επιτυχία της συλλογικής ανοσίας (αγέλης) στον γενικό πληθυσμό των ενηλίκων με την διάθεση του PCV7 για παιδιά, δεν παρατηρήθηκε και μεταξύ των ανοσοκατεσταλμένων ασθενών. Επειδή η πιθανότητα λοίμωξης από πνευμονιόκοκκο μεταξύ ανοσοκατεσταλμένων ενηλίκων παραμένει σε υψηλό ποσοστό και η χρήση του 13δύναμου εμβολίου σε παιδιά δεν φαίνεται να εξαλείφει έμμεσα τους οροτύπους του PCV13 από ανοσοκατεσταλμένους ενήλικες, το ACIP κατέληξε ότι το PCV13 θα πρέπει να συστήνεται για τη συγκεκριμένη ομάδα ενηλίκων. Εντούτοις, το PCV13 από μόνο του ίσως να μην προσφέρει επαρκή κάλυψη για νοσογόνους ορότυπους του πνευμονιοκόκκου και ως εκ τούτου το ACIP κατέληξε ότι και τα δύο εμβόλια, το PCV13 και το PPSV23, θα πρέπει να συνιστώνται σε ενήλικες που ανήκουν στις προαναφερθείσες κατηγορίες υψηλού κινδύνου.

11.α. Επίδραση στην επίπτωση της νόσου

Μετά την ένταξη του 7-δύναμου πνευμονιοκοκκικού εμβολίου στο πρόγραμμα εμβολιασμών των ΗΠΑ, παρατηρήθηκε μείωση κατά 98% της διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου από ορότυπους του εμβολίου σε βρέφη και νήπια μικρότερα των 5 ετών, σε σύγκριση με την περίοδο

πριν την εφαρμογή του εμβολιασμού. Επιπλέον, μειώθηκε κατά 55% και η εμφάνιση νόσου σε ενήλικες άνω των 50 ετών που δεν είχαν εμβολιαστεί.⁷⁶⁻⁷⁹

Είναι σημαντικό να αναφερθεί η σημαντική μείωση της εμφάνισης των διεισδυτικών πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων από τους ορότυπους του εμβολίου που διαπιστώθηκε σε πολλά ευρωπαϊκά κράτη, όπως μείωση κατά 39% στις πνευμονιοκοκκικές μηνιγγίτιδες και 29% στις βακτηριακές σε παιδιά κάτω των 2 ετών στη Γαλλία²⁴², μείωση κατά 50% της διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου σε παιδιά κάτω των 2 ετών στη Γερμανία²⁴³ και κατά 40% στην Ισπανία²⁴⁴, κατά 95% ελάττωση των διεισδυτικών λοιμώξεων από ορότυπους του PCV-7 σε παιδιά κάτω των 5 ετών στην Νορβηγία²⁴⁵, κατά 89% σε παιδιά <2 ετών στη Δανία²⁴⁶ και κατά 98% στην ίδια ηλικιακή ομάδα στην Αγγλία και Ουαλία. Στις ΗΠΑ η μείωση των διεισδυτικών λοιμώξεων από τους 7 ορότυπους του εμβολίου σε παιδιά κάτω των 5 ετών έφθασε το 100% το 2007, που αντιπροσώπευε μια συνολική μείωση κατά 76% των συνολικών περιστατικών της νόσου²²⁶. Αντίστοιχα για τους ενήλικες άνω των 65 ετών, στα πλαίσια της συλλογικής ανοσίας, η μείωση των διεισδυτικών πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων από τους ορότυπους του PCV-7 έφθασε το 92% και το 37% συνολικά για όλα τα περιστατικά της νόσου²²⁶. Σημαντικά ήταν τα οφέλη και στις μη διεισδυτικές λοιμώξεις, αφού για παράδειγμα καταγράφηκε μείωση 22% στο συνολικό αριθμό νοσηλίων παιδιών κάτω του 1 έτους με CAP στις ΗΠΑ²⁴⁸, μείωση κατά 70,5% των νοσηλίων πνευμονιοκοκκικής πνευμονίας στην Ιταλία²⁴⁹ και κατά 48% των περιστατικών οξείας μέσης ωτίτιδας με ωτόρροια στη χώρα μας²⁵⁰. Επίσης, παρατηρήθηκε μια σημαντική ελάττωση που επέφερε η χρήση του εμβολίου, στη ρινοφαρυγγική φορεία των ορότυπων του εμβολίου, που σε πρόσφατη μελέτη από την Ολλανδία ανέρχεται σε 92% σε παιδιά 24 μηνών και 94% στους γονείς τους²⁵¹.

Σύμφωνα με την Πανελλήνια μελέτη επίπτωσης των οροτύπων του πνευμονιοκόκκου, το επταδύναμο συζευγμένο εμβόλιο εκτιμήθηκε ότι προσφέρει προστασία έναντι 71,7% των παιδιατρικών στελεχών από φορεία και έναντι του 51,3% των κλινικών στελεχών ενηλίκων.

Έτσι, η χορήγηση του επταδύναμου εμβολίου μείωσε σημαντικά τη νόσηση από τους οροτύπους που περιλαμβάνει. Συγκεκριμένα, μείωσε την επίπτωση της διεισδυτικής νόσου (μηνιγγίτιδα, σηψαιμία), την επίπτωση της πνευμονίας και της ωτίτιδας, όπως και την αντοχή στελεχών πνευμονιοκόκκου ανθεκτικών στην πενικιλίνη.

Η αύξηση των περιστατικών από ορότυπους που δεν περιλαμβάνονται στο εμβόλιο είναι υπαρκτή, με κύριο παράδειγμα τον ανθεκτικό ορότυπο 19A, δεν μπορεί όμως να επισκιάσει την πολύ σημαντικότερη μείωση της διεισδυτικής νόσου από τους οροτύπους του εμβολίου.

Τα πρώτα αποτελέσματα από την πρόσφατη εφαρμογή του 13-δύναμου συζευγμένου εμβολίου έχουν ήδη παρουσιαστεί. Το 2011, την πρώτη χρονιά εφαρμογής του εμβολίου στις ΗΠΑ, παρατηρήθηκε ελάττωση της φορείας των οροτύπων που περιλαμβάνονται στο νέο εμβόλιο (1,3,5,6A, 7F, 9A) σε παιδιά κάτω των 12 μηνών, από 7.3/100 σε 1.3/100. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε το ίδιο φαινόμενο στις ηλικίες 12-59 μηνών.⁸⁰ Σε μία άλλη μελέτη από τις ΗΠΑ

(Massachusetts), η επίπτωση της διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου ελαττώθηκε από 20.2/100000 σε 14/100000 παιδιά κάτω των 5 ετών, αν και το ποσοστό των περιστατικών που προκλήθηκαν από οροτύπους του PCV13 δεν ελαττώθηκε σημαντικά (από 66.7% σε 59.2%).⁸¹ Επιπλέον, δεδομένα από μια άλλη περιοχή των ΗΠΑ (Αλάσκα) έδειξαν σημαντική ελάττωση των περιστατικών διεισδυτικής νόσου από οροτύπους του εμβολίου (από 38.2/100000 σε 6.9/100000) αλλά και μία ελάττωση (μη στατιστικά σημαντική) των περιπτώσεων που οφείλονται σε ορότυπους που δεν περιλαμβάνονταν στο εμβόλιο (από 18.2/100000 σε 8.6/100000).⁸²

11.β. Επίδραση στην επιδημιολογία της αντοχής

Μελέτες έχουν δείξει ότι ο εμβολιασμός με το επταδύναμο συζευγμένο εμβόλιο του πνευμονιόκοκκου (PCV7) έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ρινοφαρυγγικού αποικισμού από ανθεκτικά στην πενικιλίνη στελέχη *Streptococcus pneumoniae*, την ελάττωση επίπτωσης των οροτύπων που περιέχονται στο εμβόλιο και την αντικατάστασή τους από ορότυπους που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό, όπως οι 1, 5, 6Α και κυρίως ο 19Α⁸³⁻⁸⁷.

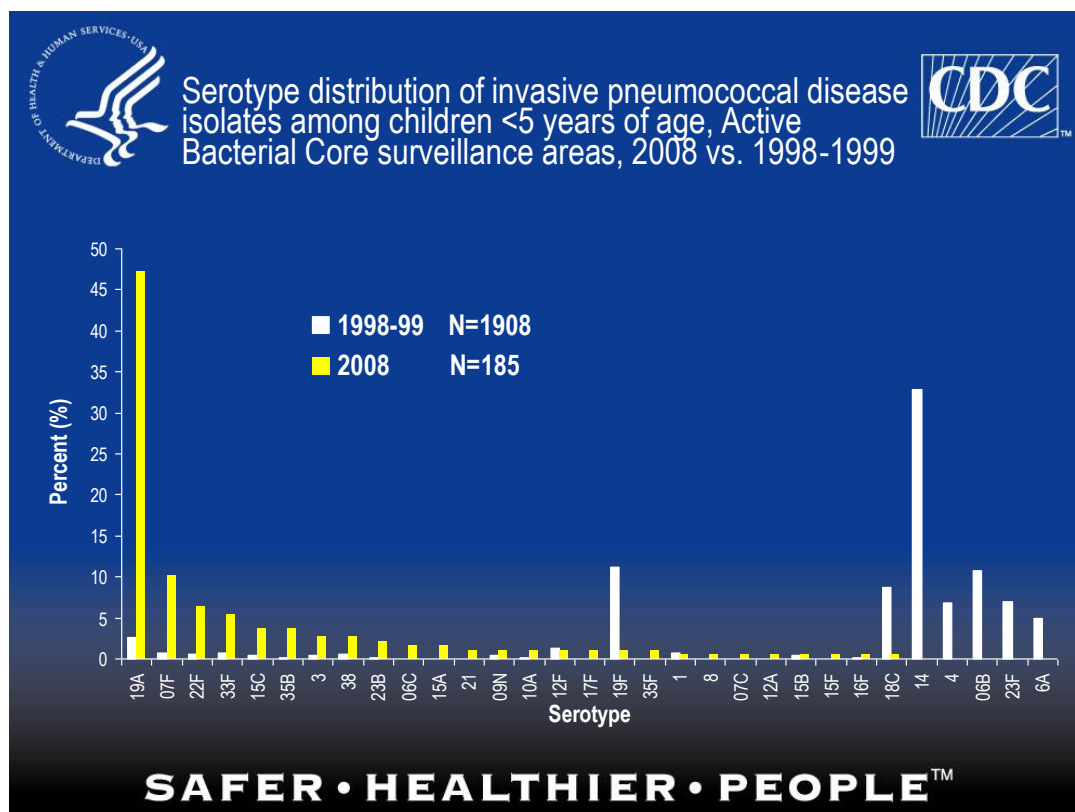
Το εμβόλιο του πνευμονιόκοκκου μπορεί να ελαττώσει τα ποσοστά αντοχής σε εμβολιασμένα αλλά και σε ανεμβολίαστα άτομα, εμποδίζοντας τη μεταφορά ανθεκτικών στα αντιβιοτικά οροτύπων, προστατεύοντας τους εμβολιασμένους πληθυσμούς και αποτρέποντας την εξάπλωση της νόσου σε άλλους. Επιπλέον, η μείωση της χρήσης αντιβιοτικών που καθίσταται δυνατή εξαιτίας της συνολικής ελάττωσης των κρουσμάτων διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου σε όλες τις ηλικίες, οδηγεί και σε συνολική ελάττωση της αντοχής.

Ωστόσο, ένα επακόλουθο της μείωσης της επίπτωσης των οροτύπων που περιέχονται στο εμβόλιο είναι η αύξηση των περιστατικών που οφείλονται σε ορότυπους που δεν περιλαμβάνονται στο PCV7. Ο αντίκτυπος της αντικατάστασης των οροτύπων που προκαλείται από τον εμβολιασμό δεν είναι πλήρως κατανοητός. Οι Pelton et al. μελέτησαν δύο κοινότητες λίγο μετά την εισαγωγή του προγράμματος εμβολιασμού με το επταδύναμο συζευγμένο εμβόλιο PCV7 και διαπίστωσαν ότι ενώ ο αποικισμός με τους ορότυπους του εμβολίου μειώθηκε από 22% σε 2% από το 2000 έως το 2003, ο επιπολασμός των οροτύπων που δεν περιλαμβάνονται στο εμβόλιο αυξήθηκε από 7% έως 16%.⁸⁸ Αν και ο αποικισμός από ανθεκτικό στην πενικιλίνη *S. pneumoniae* αρχικά μειώθηκε, τα στελέχη με ενδιάμεση ευαισθησία στην πενικιλίνη αυξήθηκαν στα 2 έτη μετά την εφαρμογή του εμβολιασμού. Η μεταβολή αυτή κατά κύριο λόγο εξηγείται από την αύξηση του ορότυπου 19Α ο οποίος χαρακτηρίζεται από ενδιάμεση ευαισθησία στην πενικιλίνη. Ο ορότυπος 19Α είναι ο κύριος ορότυπος που δεν περιλαμβάνεται στο εμβόλιο και κυριαρχεί σε παγκόσμιο επίπεδο, είναι κλινικά σημαντικός, και ιδιαίτερα πολυανθεκτικός. Μια μελέτη από τους Hicks et al. επιβεβαίωσε τον ορότυπο 19Α ως το κυρίαρχο μετά την εφαρμογή του PCV7 αίτιο διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου σε παιδιά και ηλικιωμένους.⁸⁹ Επιπλέον, η αύξηση της διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου από τον ανθεκτικό ορότυπο 19Α μπορεί επίσης να εμφανιστεί και χωρίς

την εφαρμογή του εμβολιασμού. Συγκεκριμένα, μελέτες δείχνουν αύξηση του οροτύπου αυτού σε περιοχές που χαρακτηρίζονται από εκτεταμένη χρήση αντιβιοτικών, υπογραμμίζοντας τη σημασία των στρατηγικών για τον περιορισμό της χρήσης αντιβιοτικών.

Μετά την εφαρμογή του εμβολιασμού με το PCV7, το ποσοστό των ανθεκτικών στελεχών οροτύπου 15 και 19A αυξήθηκε. Στην Κορέα, αυξήσεις στην επίπτωση των οροτύπων 6A και 19A παρατηρήθηκαν ακόμη και πριν την εφαρμογή του εμβολίου. Στην Ταϊβάν, μετά την εφαρμογή του εμβολιασμού, παρατηρήθηκε το 2007 αύξηση των περιστατικών από στελέχη οροτύπου 19A με μεγάλη λοιμογονικότητα.

Στην Εικόνα 11 παρουσιάζονται τα ποσοστά των διαφόρων οροτύπων σύμφωνα με τα στοιχεία του CDC πριν και μετά την εφαρμογή του εμβολίου, δηλαδή τις περιόδους 1998-1999 και 2008.



Εικόνα 11. Ποσοστά οροτύπων διεισδυτικής πνευμονιοκοκκικής νόσου προ και μετά την εφαρμογή του 7-δύναμου συζευγμένου εμβολίου (στοιχεία CDC).

Σε μια μελέτη από 41 νοσοκομεία των ΗΠΑ, τα στελέχη ανθεκτικά στην πενικιλίνη ($MIC \geq 2$) ελαττώθηκαν από 21,5% το 1999-2000 σε 14,6% το 2004-2005, ενώ η αντοχή στην ερυθρομυκίνη δεν άλλαξε (25,7% και 29,1% αντίστοιχα). Επιπλέον, τα ποσοστά των διαφόρων οροτύπων άλλαξαν μεταξύ των δύο περιόδων. Η επίπτωση του 19A αυξήθηκε από 1,5% σε 35,4% και του οροτύπου 35B αυξήθηκε από 1,2% σε 12,5%, ενώ η επίπτωση των οροτύπων που περιέχονται στο εμβόλιο PCV7 ελαττώθηκε (όπως των 23F, 9V, 6B και 14). Η πλειοψηφία των ανθεκτικών στην πενικιλίνη στελεχών ανήκε σε 2 κλώνους, τον Taiwan19F-14 και τον Utah19F-24.⁹⁰ Επιπλέον, μία μελέτη από τον Καναδά στελεχών από διεισδυτικές λοιμώξεις σε παιδιά ηλικίας 2-4 ετών διαπίστωσε ελάττωση στα ανθεκτικά στελέχη μεταξύ 2000-2006.⁹¹ Αυτή η ελάττωση οφείλεται σε περιορισμό των στελεχών που περιλαμβάνονται στο PCV7. Επίσης, στην Ισπανία, παρατηρήθηκε ότι η αντοχή, όπως και το ποσοστό των PCV7 στελεχών, αυξήθηκαν τις δεκαετίες 1980 και 1990, ενώ στη συνέχεια ελαττώθηκαν τη δεκαετία του 2000, προφανώς ως συνέπεια της χορήγησης του εμβολίου. Από μια άλλη μελέτη από την Ισπανία, το ποσοστό των πνευμονιοκόκκων με ελαττωμένη ευαισθησία στην πενικιλίνη ελαττώθηκε από 39,5% το 2002-2004 σε 18,2% το 2005-2007.⁹² Αντίθετα, στη Φινλανδία, παρατηρήθηκε αύξηση της αντοχής στην πενικιλίνη (από 8% σε 16%) και στην ερυθρομυκίνη (από 16% σε 28%) μεταξύ 2002 και 2006 σαν αποτέλεσμα της επικράτησης διαφόρων διεθνών κλώνων.⁹³

12. Συμβατική Διάγνωση του πνευμονιοκόκκου

12.α. Καλλιέργεια

Η καλλιέργεια για την ανεύρεση πνευμονιοκόκκου διενεργείται συνήθως σε πτύελα, αλλά και πύο ωτίτιδας, πύο αποστημάτων, θωρακικού εμπύηματος, διάφορα εξιδρώματα, ρινικό επίχρισμα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό και φλεβικό αίμα. Το θρεπτικό υλικό εκλογής είναι το αιματούχο άγαρ σε δύο τρυβλία, ενώ χρησιμοποιείται και σοκολατόχρωμο άγαρ ταυτόχρονα ή σε ανακαλλιέργειες. Όταν πρόκειται για πτύελα, είναι σημαντικό να τηρηθεί η τεχνική της σωστής συλλογής δείγματος, η ρευστοποίηση με N-ακέτυλο-L-κυστεΐνη 2%. Η καλλιέργεια γίνεται σε 2 τρυβλία με αιματούχο άγαρ (το ένα επωάζεται σε αναερόβιες συνθήκες και το άλλο σε συνθήκες 5% CO₂), ενώ επιπλέον χρησιμοποιούνται σοκολατόχρωμο άγαρ, άγαρ McConkey, Sabouraud και θειογλυκολικός ζωμός, με επώαση στους 37⁰ C. Όσων αφορά στα υπόλοιπα δείγματα, η διαδικασία της καλλιέργειας είναι η ίδια με την προαναφερόμενη. Για το αίμα διενεργείται αιμοκαλλιέργεια, η οποία στο 25% περίπου των ασθενών μπορεί να αποδειχθεί θετική. Στη συνέχεια, τα τρυβλία επωάζονται για 24 ώρες σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες και μετά το πέρας της επώασης, αναζητούνται οι χαρακτηριστικές αποικίες του πνευμονιοκόκκου. Αν ανιχνευθούν, γίνεται από αυτές χρώση Gram και εφ' όσον πρόκειται για Gram-θετικούς διπλόκοκκους, γίνεται ανακαλλιέργεια για απομόνωση

σε σοκολατόχρωμο και αιματούχο άγαρ. Από αυτές τις ανακαλλιέργειες, θα γίνουν και οι δοκιμές ταυτοποίησης του μικροβίου.

Επίσης, σε δείγματα πτυέλων με άφθονη μικροβιακή χλωρίδα, προκειμένου αναγνωρισθεί το μικρόβιο, είναι δυνατόν να γίνει χρώση ελύτρου με αλκοολικό διάλυμα φουξίνης 2%. Οι πνευμονιόκοκκοι φαίνονται βαθυκόκκινοι και περιβάλλονται από μία ρόδινη άλω, που αποτελεί το έλυτρό τους. Η χρώση αυτή μπορεί να γίνει και σε άλλα δείγματα εκτός των πτυέλων.

12.β. Ανίχνευση αντιγόνου πνευμονιοκόκκου

Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η ανίχνευση αντιγόνου στα ούρα. Η ταχεία δοκιμασία ανοσοχρωματογραφίας που ανιχνεύει το αντιγόνο πολυσακχαρίτη ομάδος C του κυτταρικού τοιχώματος το οποίο είναι κοινό για όλα τα στελέχη πνευμονιοκόκκου έχει αποδείξει τη χρησιμότητά του στην κλινική πράξη για τη διάγνωση της πνευμονίας σε ενήλικες. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου στη διάγνωση της πνευμονίας της κοινότητας είναι 77-88% και 67-100% αντίστοιχα. Εν τούτοις, σε όλες τις μελέτες, ένα ποσοστό ασθενών με θετική αιμοκαλλιέργεια ή καλλιέργεια πτυέλων είχαν αρνητική δοκιμασία αντιγόνου. Επίσης, η δοκιμασία μπορεί να παραμένει θετική για εβδομάδες μετά τη νόσο, ενώ μπορεί να υπάρχουν και διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλα είδη στρεπτοκόκκου. Τέλος, η ειδικότητά της σε παιδιά είναι περιορισμένη, εφόσον μπορεί να είναι θετική και σε φορεία πνευμονιοκόκκου σε αυτόν τον πλυθισμό. Για τους λόγους αυτούς, η δοκιμασία πρέπει να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες διαγνωστικές μεθόδους.

Αν και η χρήση της δοκιμασίας αντιγόνου έχει καθιερωθεί σε δείγματα ούρων, μελέτες έχουν δείξει ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πλευριτικό υγρό, βρογχοκυψελιδικό έπλυμα και σε θρεπτικά υλικά αιμοκαλλιιεργειών σε ενήλικες και παιδιά με πνευμονία της κοινότητας. Επομένως, ειδικά στα παιδιά, η χρήση της δοκιμασίας αντιγόνου από στείρα βιολογικά υλικά μπορεί αποτελέσει μια εναλλακτική επιλογή.

13.Μοριακή γενετική του πνευμονιοκόκκου

13.α. Μοριακή διάγνωση της πνευμονιοκοκκικής νόσου

Η συμβατική διάγνωση της πνευμονιοκοκκικής νόσου παρουσιάζει δυσκολίες, εξαιτίας της τάσης του πνευμονιοκόκκου να αυτολύεται όταν φτάσει σε στατική φάση ανάπτυξης σε καλλιέργεια, εξαιτίας του σχετικά μικρού ποσοστού θετικών αιμοκαλλιιεργειών σε διηθητική πνευμονιοκοκκική νόσο, της ελάττωσης της ευαισθησίας των καλλιιεργειών όταν έχει προηγηθεί λήψη αντιμικροβιακών και της δυσκολίας στη λήψη δειγμάτων από το κατώτερο αναπνευστικό στην περίπτωση της πνευμονίας.⁹⁴ Οι λόγοι αυτοί επιβεβαιώνουν τη χρησιμότητα των μοριακών μεθόδων στη διάγνωση της πνευμονιοκοκκικής νόσου.

Όσον αφορά στην οξεία βακτηριακή μηνιγγίτιδα από στελέχη *S. pneumoniae*, η ταχεία εξέλιξη των συμπτωμάτων και η απαίτηση άμεσης θεραπείας οδήγησαν στην αναγκαιότητα εφαρμογής μοριακών τεχνικών για ακριβή και ταχεία διάγνωση, δίδοντας σημαντικές πληροφορίες για τη διαχείριση και τον έλεγχο της νόσου. Οι τεχνικές αυτές πλεονεκτούν ως προς την ταχύτητα, την ακρίβεια και την υψηλή ευαισθησία.

Με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) η ανίχνευση και ταυτοποίηση του λοιμογόνου παράγοντα μπορεί να επιτευχθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα, ενώ η τεχνική επηρεάζεται λιγότερο -σε σχέση με τις συμβατικές τεχνικές- από τη χορήγηση αντιμικροβιακής αγωγής, πριν την εισαγωγή του ασθενούς στο νοσοκομείο.

Η μοριακή ανίχνευση του πνευμονιοκόκκου γίνεται με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης - PCR. Η αρχή της PCR έγκειται στον πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA με εκθετική μορφή και στην συνέχεια στην οπτικοποίηση του αποτελέσματος με διάφορες τεχνικές. Από ένα μόνο τμήμα DNA, μπορούν να προκύψουν δισεκατομμύρια αντίγραφα του μέσα μικρό χρονικό διάστημα με αποτέλεσμα να γίνεται ορατό με ηλεκτροφόρηση σε αгарόζη, με την χρήση σημασμένων ιχνηθετών, κλπ. Η κάθε άλυσος του DNA στόχου, χρησιμεύει ως πρότυπο για τη σύνθεση του DNA. Σε αυτό, προστίθεται περίσσεια νουκλεοτιδίων προς ενσωμάτωση στο νέο μόριο DNA και η όλη αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο DNA πολυμεράση. Επίσης στο αρχικό δείγμα προστίθενται μικρά τμήματα νουκλεϊκού οξέος, οι εκκινητές, ώστε να δοθεί το έναυσμα για την έναρξη της αντίδρασης. Οι εκκινητές είναι συμπληρωματικοί ως προς τα άκρα του τμήματος DNA που επιθυμούμε να ενισχύσουμε. Οι εκκινητές υβριδοποιούνται με τα προς ενίσχυση τμήματα και η πολυμέραση αναλαμβάνει τη σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλύσεων.

Ένας πλήρης κύκλος μιας PCR αντίδρασης περιλαμβάνει τρία στάδια:

- Αποδιάταξη του DNA (denaturation)
- Προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (annealing)
- Επιμήκυνση των εκκινητών (extension)

Ένας πλήρης τέτοιος κύκλος περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες και γίνεται αυτόματα από τους θερμοκυκλοποιητές (thermal cyclers). Σε μια τυπική αντίδραση, το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 94° C για 1 λεπτό. Στη συνέχεια προστίθενται οι εκκινητές σε περίσσεια, τα νουκλεοτίδια και η DNA πολυμεράση. Οι εκκινητές συνδεόνται στο μονόκλωνο DNA και προσαρμόζονται με υβριδισμό στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA εκμαγείου με ψύξη του δείγματος στους 50 – 60° C για 1 λεπτό. Ακολουθεί επώαση στους 72° C για 1 λεπτό, για την επιμήκυνση των εκκινητών, όπου δημιουργούνται 2 αντίγραφα του DNA στόχου. Οι διαδικασίες αυτές γίνονται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης, με εκθετικό ρυθμό, οπότε απαιτούνται αρκετοί κύκλοι για να επιτευχθεί ικανοποιητικός αριθμός αντιγράφων. Σε κάθε κύκλο που διαρκεί περίπου πέντε λεπτά η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται.

Καθώς η διαδικασία επαναλαμβάνεται, οι νεοσύστατες αλύσεις με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για τη σύνθεση DNA. Μετά από μερικούς κύκλους το επικρατές

προϊόν είναι ένα τμήμα DNA που το μέγεθος του αντιστοιχεί στην μεταξύ των δύο εκκινητών απόσταση. Στη πράξη 20 με 30 κύκλοι της αντίδρασης είναι αρκετοί για την αποτελεσματική ενίσχυση του προς εξέταση τμήματος DNA.

Τα απαραίτητα αντιδραστήρια τοποθετούνται μέσα σε ειδικά σωληνάρια και έπειτα στο θερμοκυκλοποιητή, στο οποίο μπορούν να ρυθμιστούν οι παράμετροι που καθορίζουν την αντίδραση, όπως θερμοκρασίες, χρόνοι και αριθμός των κύκλων.

Το γονίδιο-στόχος που μελετήθηκε αρχικά, είναι το γονίδιο της πνευμονολυσίνης (*ply*). Μελέτες που χρησιμοποίησαν ανίχνευση του γονιδίου για διάγνωση διηθητικής πνευμονιοκοκκικής νόσου κατέληξαν σε χαμηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Προσφάτως έγινε γνωστό ότι το γονίδιο *ply* μπορεί να ανιχνευθεί και σε στρεπτοκόκκους όπως ο *S. mitis* και ο *S. pseudopneumoniae*.

Πιο ειδικά γονίδια-στόχοι για μοριακή ανίχνευση είναι το γονίδιο της αυτολυσίνης (*lytA*), το pneumococcal surface adhesion gene (*psaA*), και το γονίδιο *spn9802*.⁹⁵ Οι Carvalho et al. συνέκριναν 3 διαφορετικά γονίδια: τα *ply*, *lytA* και *psaA* και βρήκαν ότι το *lytA* είναι το πιο ειδικό με δεύτερο το *psaA*.⁹⁶ Το γονίδιο *lytA* δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα 21 στελέχη στρεπτοκόκκου που ελέγχθηκαν. Οι Rello et al. χρησιμοποίησαν το γονίδιο της αυτολυσίνης και κατέληξαν σε καλύτερα αποτελέσματα⁹⁷.

Η χρησιμότητα της PCR στο αίμα, στη διάγνωση διηθητικής πνευμονιοκοκκικής νόσου έχει απασχολήσει αρκετούς ερευνητές. Οι αρχικές μελέτες που χρησιμοποίησαν τη πνευμονολυσίνη ήταν απογοητευτικές. Στη συνέχεια όμως, σε επόμενη μελέτη, φάνηκε ότι η δοκιμασία ήταν θετική σε 62% ενηλίκων ασθενών με επιβεβαιωμένη ή πιθανή πνευμονιοκοκκική πνευμονία, ενώ η αιμοκαλλιέργεια ήταν θετική μόνο στο 37%. Στη συγκεκριμένη μελέτη μάλιστα είχαν αποκλειστεί οι ασθενείς που είχαν λάβει αντιμικροβιακά.⁹⁷ Σε άλλες μελέτες αποδείχθηκε η ανωτερότητα της PCR για το γονίδιο *lytA* σε σύγκριση με την καλλιέργεια αίματος και σε ασθενείς που είχαν προηγουμένως θεραπευθεί με αντιμικροβιακά.⁹⁸ Η PCR έχει επίσης χρησιμοποιηθεί και σε δείγματα πλευριτικού υγρού από ασθενείς με παραπνευμονική συλλογή.⁹⁹ Τα γονίδια που ανιχνεύθηκαν σε αυτές τις μελέτες ήταν το *ply*, *lytA* και *wzg/cpsA*.

Συνήθως, εφαρμόζονται τεχνικές της πολλαπλής αντίδρασης της πολυμεράσης (multiplex PCR, mPCR), έτσι ώστε να είναι δυνατή η ταχεία και ταυτόχρονη ανίχνευση των κύριων αιτιών βακτηριακής μηνιγγίτιδας με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Όπως, μέθοδος multiplex PCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση των μικροοργανισμών *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* type b και *Listeria monocytogenes*. Από δεδομένα του Κέντρου Αναφοράς Μηνιγγίτιδας της Ε.Σ.Δ.Υ. αναφέρεται ότι ένα μεγάλο ποσοστό των κλινικών δειγμάτων από περιστατικά πνευμονιοκοκκικής μηνιγγίτιδας (54%) επιβεβαιώθηκε με την εφαρμογή της multiplex PCR σε αντίθεση με την καλλιέργεια (33,9%).¹⁰⁰

13.β. Μοριακή διερεύνηση της αντοχής

Η μοριακή διάγνωση της αντοχής έχει εφαρμοσθεί για τα γονίδια που αφορούν στην αντοχή στελεχών πνευμονιοκόκκων σε μακρολίδες, λινκοσαμίδες και στρεπτογραμμίνες B (MLS_B) (γονίδια αντοχής *mefA/E*, *ermB* και *ermTR*), σε β-λακτάμες (γονίδια *pbp1a*, *pbp2b* και *pbp2x*), τετρακυκλίνες (γονίδια αντοχής *tetM* και *tetO* και φθοριοκινολόνες (γονίδια αντοχής *gyrA*, *gyrB*, *parC* και *parE*).^{37,95,101,102} Για τη διερεύνηση των μηχανισμών αντοχής που αφορούν στα παραπάνω αντιμικροβιακά, χρησιμοποιείται γενετικό υλικό από το απομονωμένο κλινικό στέλεχος (isolate) το οποίο με τη σειρά του απομονώνεται από κλινικά δείγματα ασθενών, όπως αναπνευστικές εκκρίσεις (πτύελα, βρογχικές εκκρίσεις κ.τ.λ.), ωτικό έκκριμα, ρινικό έκκριμα, αίμα και Ε.Ν.Υ με χρήση της τεχνικής της PCR. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πρωτόκολλα PCR για την ανίχνευση των διαφόρων γονιδίων αντοχής προς τις κατηγορίες αντιβιοτικών που αναφέρονται.^{17,36-38,95,101-109}

Η περαιτέρω διερεύνηση της αντοχής και η ανίχνευση γονιδίων αντοχής στον πνευμονιόκοκκο, ενέχει και την εφαρμογή της χρήσης των περιοριστικών ενζύμων μετά από την διαδικασία της PCR. Τα περιοριστικά ένζυμα είναι ειδική κατηγορία ενζύμων που τέμνουν το DNA σε συγκεκριμένα σημεία. Ανευρίσκονται σε βακτήρια, προστατεύοντας το βακτηριακό γονιδίωμα και υδρολύοντας (εάν χρειασθεί) το DNA των φάγων. Κεκαθαρμένες μορφές αυτών των ενζύμων χρησιμοποιούνται στη μοριακή βιολογία και μικροβιολογία. Τα περιοριστικά ένζυμα αναγνωρίζουν και πέπτουν μόνο μια συγκεκριμένη αλληλουχία νουκλεοτιδικών βάσεων του DNA και πάντα με τον ίδιο τρόπο. Λόγω της υψηλής ειδικότητας των ενζύμων η πλήρης πέψη του DNA, παρέχει μια αναπαραγωγίμη διάταξη θραυσμάτων, που διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση πηκτής αгарόζης ή πολυακρυλαμίδης, όπως και στη συμβατική μέθοδο PCR. Μέσω αυτής της τεχνικής, επιτυγχάνεται η ανάλυση της λύσης χρωμοσωμικού ή πλασμιδιακού DNA κα είναι μια εύχρηστη μέθοδος για τον καθορισμό παραλλαγών στις αλληλουχίες το DNA.

Συγκεκριμένα, η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον πνευμονιόκοκκο αλλά και άλλα μικρόβια, περιλαμβάνει σύγκριση του αριθμού και μεγέθους των θραυσμάτων που παράγονται από την πέψη με ένα περιοριστικό ένζυμο ή ενδονουκλεάση (restriction enzyme) το οποίο κόβει σε σταθερή θέση το DNA, έχοντας περιοχή αναγνώρισης από 4 bp έως 6 bp. Οι παραλλαγές στη διάταξη των θραυσμάτων μετά από πέψη με περιοριστικό ένζυμο ονομάζονται “αποτύπωμα περιοριστικών ειδικών πολυμορφικών θέσεων βακτηριακού DNA” – Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLPs) και μπορεί να δημιουργηθούν με ανακατάταξη, παρεμβολή αλληλουχιών, καταστροφή DNA ή αντικατάσταση βάσης στη περιοχή αναγνώρισης του ενζύμου.

Η επιλογή του περιοριστικού ενζύμου εξαρτάται από δύο σημαντικά κριτήρια: 1) τα θραύσματα πρέπει να είναι κατάλληλα για ανάλυση όσον αφορά στο μέγεθος και στη συχνότητα και 2) δεν πρέπει να είναι πολλά προς αποφυγή ζωνών αλληλοεπικάλυψης. Ένα τυπικό πρωτόκολλο PCR-RFLP περιλαμβάνει: α) απομόνωση και καθαρισμό του DNA, β) πολλαπλασιασμό του υπό εξέταση τμήματος με PCR, γ) επεξεργασία του με ένα ή περισσότερα

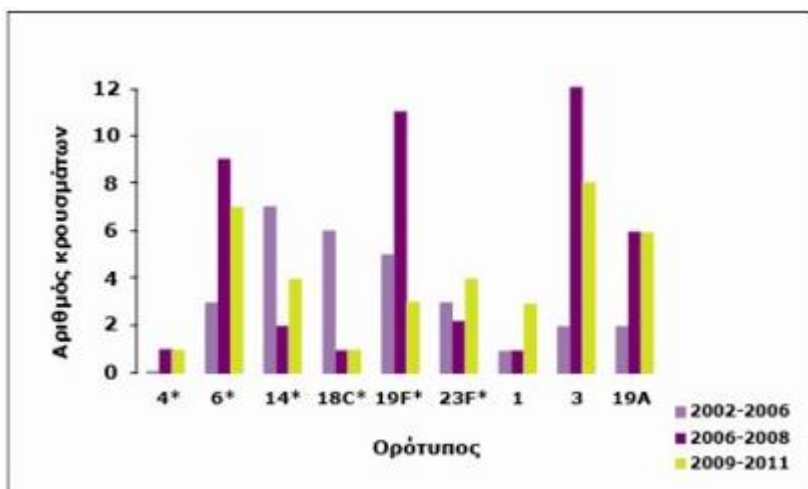
περιοριστικά ένζυμα κάτω από ειδικές συνθήκες δ) διαχωρισμό των θραυσμάτων σε πηκτή αгарόζης και ε) οπτικοποίηση τους μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο.

13.γ. Μοριακή τυποποίηση των στελεχών

Όσον αφορά στη τυποποίηση στελεχών πνευμονιοκόκκου με απομόνωση του μικροοργανισμού από κλινικά δείγματα, καταρχήν, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι πολυπλεκτικής PCR για τον προσδιορισμό των οροτύπων στελεχών *Streptococcus pneumoniae*, όπως η μέθοδος που προτείνεται από τους Pai et al.¹¹⁰. Στη χώρα μας (στο Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας) εφαρμόζεται η μέθοδος μοριακής τυποποίησης στελεχών με απομόνωση του μικροοργανισμού και η χρήση multiplex PCR για την ταυτόχρονη τυποποίηση εννιά οροτύπων του *Streptococcus pneumoniae* (1, 3, 4, 6, 14, 18, 19A, 19F, 23F), όπου έξι ορότυποι εξ' αυτών, περιλαμβάνονται στο επταδύναμο συζευγμένο εμβόλιο. Η μοριακή τυποποίηση ως προς τους ορότυπους για τη μετά εμβολίου εποχή (2005), έδειξε ότι υπάρχει αύξηση των οροτύπων 19A, 3 και 1 που δεν περιλαμβάνονται στο επταδύναμο συζευγμένο εμβόλιο (Εικόνα 12). (Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας, Ε.Σ.Δ.Υ.).

Επίσης, οι Tarrago et al. προσδιόρισαν τους ορότυπους πνευμονιοκόκκων από το πλευριτικό υγρό παιδιατρικών ασθενών με αρνητικές καλλιέργειες¹¹³. Με τη χρήση real-time PCR με ειδικά TaqMan MGB probes που στοχεύουν σε αλληλουχίες DNA εντός του γονιδίου του πολυσακχαριδικού ελύτρου, έγινε διαφοροποίηση μεταξύ των οροτύπων 1, 3, 5, 4, 6A, 6B, 7F/A, 8, 9V/A/N/L, 14, 15B/C, 18C/B, 19A, 19F/B/C, 23F και 23A. Η ευαισθησία την μεθόδου ήταν μεγάλη, με ανίχνευση DNA σε 87,5% των δειγμάτων πλευριτικού υγρού (με αρνητικές καλλιέργειες). Οι συχνότεροι ορότυποι ήταν οι 1, 7F και 3 (34,3%, 16,4% και 11,9% αντίστοιχα).

Οι Azzari et al. προσδιόρισαν τους ορότυπους εφαρμόζοντας multiplex PCR σε διάφορα κλινικά δείγματα (αίμα, ENY, πλευριτικό υγρό) τα οποία προηγουμένως είχαν ελεγχθεί με RT-PCR για την παρουσία γονιδίου του πνευμονιοκόκκου¹¹⁴. Χρησιμοποίησαν 31 ζεύγη εκκινητών για τους ορότυπους 1, 3, 4, 5, 6A/B, 7F/A, 7C/B, 8, 9V/A, 10A, 11A/D/F, 12A/B/F, 14, 15A, 15B/C, 16F, 17F, 18A/B/C/F (δύο ζεύγη εκκινητών), 19A, 19F, 20, 22A/F, 23F, 31, 33A/F, 34, 35B, 35F και 38F.



Εικόνα 12. Επικρατέστεροι ορότυποι *S. pneumoniae* ως αίτια μηνιγγίτιδας κατά τις περιόδους προ και μετά την εφαρμογή του 7-δύναμου εμβολίου. (Κέντρο Αναφοράς Μηνιγγίτιδας - Ε.Σ.Δ.Υ.)

Η τυποποίηση στελεχών πνευμονιοκόκκου επιτυγχάνεται επίσης με τη μέθοδο της Ηλεκτροφόρησης σε Παλλόμενο Πεδίο – Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE), κατά την οποία έχουμε τη δημιουργία κατατομών χρωμοσωμικών θραυσμάτων λύσεως, χωρίς την απαίτηση μεθόδων υβριδοποίησης με ιχνηθέτες. Χρησιμοποιούνται περιοριστικά ένζυμα που υδρολύουν το DNA κατά μεγάλα διαστήματα με αποτέλεσμα τη δημιουργία ευμεγέθων θραυσμάτων χρωμοσωμικού DNA που διαχωρίζονται με ηλεκτροφορητικές διαδικασίες. Ένα από τα πρωτόκολλα που προτείνεται στη βιβλιογραφία είναι των Mc Ellistrem et al. 2000¹¹¹. Η τεχνική PFGE χρησιμοποιείται κυρίως στην διερεύνηση σε τοπικό επίπεδο της κλωνικής διασποράς συγκεκριμένων στελεχών.

Προκειμένου να κατανοήσουμε την πληθυσμιακή βιολογία των στελεχών πνευμονιοκόκκου και να απαντήσουμε σε σημαντικά θέματα που αφορούν σε αυτά, χρειάζεται ο μοριακός χαρακτηρισμός μεγάλου αριθμού καταλλήλων δειγμάτων από φορεία και από κλινικά δείγματα που να αντιπροσωπεύουν τις ποικίλλες και διαφορετικές εκδηλώσεις της πνευμονιοκοκκικής νόσου. Γι' αυτό το λόγο, αναπτύχθηκε μια τεχνική που ονομάστηκε “Τυποποίηση μέσω του προσδιορισμού της αλληλουχίας πολλαπλών γενετικών τόπων - Multilocus Sequence Typing (MLST)”. Η τεχνική βασίζεται στην τυποποίηση πολλαπλών γενετικών τόπων και χαρακτηρίζει μικροβιακά στελέχη χρησιμοποιώντας τις αλληλουχίες DNA από θραύσματα πολλών αλληλόμορφων δομικών (housekeeping) γονιδίων. Χρησιμοποιούνται θραύσματα μεγέθους περίπου 450-500 bp από κάθε γονίδιο στα οποία προσδιορίζεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία. Για κάθε δομικό γονίδιο οι διαφορετικές αλληλουχίες που υπάρχουν σε ένα βακτήριο, αποτελούν διακριτά αλλήλια και για κάθε απομονωθέν στέλεχος τα αλλήλια σε κάθε ένα γενετικό τόπο προσδιορίζουν το προφίλ αλληλίων ή τον τύπο αλληλουχιών/κλώνος (sequence type - ST). Η μέθοδος MLST υπολογίζει απ'ευθείας τις παραλλαγές των DNA αλληλουχιών μέσα στο πλαίσιο

των δομικών γονιδίων και χαρακτηρίζει τα στελέχη με βάση το μοναδικό τους, προφίλ αλληλίων. Η διαδικασία του MLST περιλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό με PCR και τον επακόλουθο προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Οι διαφορές στα νουκλεοτίδια μεταξύ στελεχών μπορούν να ελεγχθούν σε ποικίλο αριθμό γονιδίων και αυτό εξαρτάται από το ποσοστό διακριτικής ικανότητας που αναζητείται κάθε φορά. Όλα αυτά τα στοιχεία των εκάστοτε στελεχών, καταχωρούνται σε μια βάση δεδομένων και στην ανάλυσή τους γίνεται πάντα σύγκριση των αλληλικών προφίλ. Έτσι είναι δυνατή η επίτευξη επιδημιολογικών και φυλογενετικών μελετών. Ο συσχετισμός μεταξύ των στελεχών εμφανίζεται με τη μορφή δενδρογραμμάτων που είναι ένας απλός τρόπος παρουσίασης στελεχών με όμοια ή πολύ όμοια αλληλικά προφίλ και θεωρείται ότι προέρχονται από ένα κοινό πρόγονο. Στη βιβλιογραφία ένα πρωτόκολλο MLST που χρησιμοποιείται συχνά και αφορά στον πνευμονιόκοκκο, είναι των Enright et al. 1998¹¹².

Δεδομένου ότι η μέθοδος βασίζεται στην PCR, παρέχει τη δυνατότητα χαρακτηρισμού του κλώνου ή κλώνων απευθείας σε βιολογικά υλικά σε περιπτώσεις όπου η καλλιέργεια είναι αρνητική, με αποτέλεσμα την επιδημιολογική παρακολούθηση της εξέλιξης του μικροοργανισμού. Έτσι, καθίσταται δυνατή η τυποποίηση των στελεχών από κλινικά δείγματα χωρίς την απομόνωση του μικροοργανισμού.

Η μοριακή τυποποίηση στελεχών με σκοπό τη φυλογενετική ταξινόμησή τους σε κλώνους και τη δημιουργία δενδρογραμμάτων είναι εξαιρετικής σημασίας για την ανίχνευση του τρόπου διασποράς του πνευμονιοκόκκου και άλλων μικροβίων μέσα στον πληθυσμό μίας χώρας, αλλά και πέραν αυτής σε όλο τον κόσμο, καθώς και στον προσδιορισμό των κλώνων των στελεχών που επικρατούν σε κάθε περιοχή, σε κάθε χώρα και σε κάθε ήπειρο και τις μεταβολές που επέρχονται μέσα από το πέρασμα του χρόνου και την εμφάνιση σημαντικών συμβάντων που επηρεάζουν τη μικροβιακή οικολογία, όπως η μετανάστευση, η αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών, κ.τ.λ.

Τα δενδρογράμματα είναι σχέδια στα οποία φαίνονται οι εξελικτικές σχέσεις μεταξύ οργανισμών και μοιάζουν με τα δένδρα και τις διακλαδώσεις τους. Κάθε σημείο συγκεκριμένου κλάδου ενός δενδρογράμματος καθορίζεται από συγκεκριμένο χαρακτηριστικό, κοινό στα διάφορα είδη που ανήκουν σε αυτόν. Τα δενδρογράμματα των μικροοργανισμών κατασκευάζονται με βάση τις αλληλουχίες rRNA, όπου η μικρή υπομονάδα του rRNA που χρησιμοποιείται αποτελείται από 1500 βάσεις και οι υπολογισμοί γίνονται από ειδικό λογισμικό υπολογιστών. Τα στάδια κατασκευής του είναι ως εξής: 1) Καθορίζεται η αλληλουχία βάσεων στο μόριο rRNA για τον μικροοργανισμό και οι αλληλουχίες στοιχίζονται, 2) Υπολογίζεται το ποσοστό ομοιότητας μεταξύ των ειδών (των αλληλουχιών) και 3) Κατασκευάζεται το δενδρόγραμμα, όπου το μήκος των οριζοντίων γραμμών αντιστοιχεί στο ποσοστό ομοιότητας, κάθε σημείο διακλάδωσης, κόμβος, αντιστοιχεί σε πρόγονο όλων των ειδών μετά από αυτό και κάθε κόμβος χαρακτηρίζεται και από ένα ποσοστό ομοιότητας του rRNA με όλα τα είδη πέραν του κόμβου. Όλα τα είδη άνω του

κόμβου έχουν παρόμοιες αλληλουχίες tRNA, γεγονός που υποδεικνύει ότι προήλθαν από κοινό πρόγονο στον κόμβο.

Ειδικό μέρος

1. **Σκοπός**
2. **Υλικά και Μέθοδοι**
3. **Αποτελέσματα**
4. **Συζήτηση - Συμπεράσματα**

1. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι :

1. Η διερεύνηση της αντοχής στελεχών πνευμονιοκόκκου που απομονώθηκαν στην Ελλάδα την περίοδο 2001-2004 στα κυριότερα αντιμικροβιακά φάρμακα.
2. Η διερεύνηση των υποκείμενων μηχανισμών αντοχής που ευθύνονται για την αντοχή.
3. Ο συσχετισμός μεταξύ των φαινοτύπων και των γονοτύπων αντοχής και των αντίστοιχων οροτύπων.

2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Συγκέντρωση στελεχών

Η συλλογή περιλαμβάνει 1.033 στελέχη *S. pneumoniae* τα οποία απομονώθηκαν από δύο κύριες πηγές:

1. Από λοιμώξεις σε παιδιατρικούς ασθενείς, ηλικίας έως και 14 ετών που νοσηλεύθηκαν ή έλαβαν θεραπεία στα τρία μεγαλύτερα νοσοκομεία της Αθήνας, το Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία», το Νοσοκομείο Παίδων «Π. & Α. Κυριακού» και το Νοσοκομείο Παίδων Πεντέλης, κατά την περίοδο 2001-2004.
2. Από ρινοφαρυγγική φορεία σε υγιή παιδιά ηλικίας 3 έως 6 ετών που συγκεντρώθηκαν από 10 κέντρα φύλαξης - παιδικοί σταθμοί, κατά την περίοδο Ιανουαρίου - Μαρτίου 2003. Τα κριτήρια απόρριψης από την μελέτη φορείας, ήταν η λήψη αντιβιοτικών μέσα στους προηγούμενους 3 μήνες και η παρουσία λοίμωξης αναπνευστικού ή χρόνιας νόσου.

Για την σύγκριση των αποτελεσμάτων, έγινε ομαδοποίηση των στελεχών σε τρεις ομάδες: στελέχη από διεισδυτικές λοιμώξεις (ΣΔΛ), στελέχη από μη διεισδυτικές λοιμώξεις (ΣΜΔΛ) και στελέχη από φορεία (ΣΦ). Ως ΣΔΛ ορίστηκε η περίπτωση εκείνη κατά την οποία το στέλεχος απομονώθηκε από αίμα, ΕΝΥ, αρθρικό ή άλλο βιολογικό υγρό. Ως ΣΜΔΛ ορίστηκε η περίπτωση κατά την οποία το στέλεχος απομονώθηκε από ωτικές, ρινικές, οφθαλμικές εκκρίσεις, φαρυγγικά επιχρίσματα, πτύελα, βρογχικές εκκρίσεις, πύον μαστοειδούς απόφυσης και συνυπήρχε εικόνα λοίμωξης. Ως ΣΦ ορίστηκε η περίπτωση κατά την οποία το στέλεχος απομονώθηκε από ρινοφαρυγγικό επίχρισμα χωρίς εικόνα λοίμωξης και στα πλαίσια ελέγχου φορείας.

2.2 Ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους

Η ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους, έγινε με την χρήση ειδικών για τον πνευμονιόκοκκο, βιοχημικών αντιδράσεων, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως στο Γενικό Μέρος.

Η αντίδραση ταυτοποίησης του πνευμονιοκόκκου πραγματοποιήθηκε με την χρήση δισκίων οπτοχίνης συγκέντρωσης 5μg της Oxoid Ltd. (Basingstoke, Hamshire, UK).

Η οπτοχίνη είναι μια χημική ουσία που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση του στρεπτόκοκκου της πνευμονίας, ο οποίος είναι ευαίσθητος στην παρουσία της και για τον διαχωρισμό του, από τους άλλους α-αιμολυτικούς στρεπτοκόκκους, όπως οι πρασινίζοντες στρεπτόκοκκοι, οι οποίοι είναι ανθεκτικοί. Τα στελέχη που είναι ευαίσθητα στην οπτοχίνη θα παρουσιάσουν ζώνη αναστολής γύρω από το δισκίο οπτοχίνης, ενώ τα στελέχη που είναι ανθεκτικά θα παρουσιάσουν μικρότερη ζώνη ή ανάπτυξη έως τα όρια του δισκίου.

Η δοκιμασία ευαισθησίας στην οπτοκίνη πραγματοποιείται στο τρυβλίο καλλιέργειας του στελέχους, όπου τοποθετείται δισκίο 6 mm εμποτισμένο με οπτοχίνη (δ/μα 1:400) και μετά από

24ωρη επώαση παρουσία CO₂ 5% και στους 35⁰C, παρατηρείται ζώνη αναστολής ανάπτυξης γύρω από το δισκίο ≥ 14 mm, εάν πρόκειται για πνευμονιόκοκκο. Αν η ζώνη είναι < 14 mm, θα πρέπει να γίνουν και άλλες δοκιμές.

2.3 Τυποποίηση στελεχών (οροτυπία)

Η οροτυπία των στελεχών έγινε με την χρήση της αντίδρασης οροτυπίας Neufeld - Quellung και με εμπορικά διαθέσιμους αντιορούς (Statens Seruminstitut, Copenhagen, Denmark).

Η αντίδραση Quellung είναι μια βιοχημική αντίδραση, κατά την οποία ειδικά αντισώματα (αντιοροί) προσδένονται στην βακτηριακή κάψα μικροβίων όπως *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Salmonella* spp. και *Streptococcus* ομάδος B. Η αντίδραση αυτή επιτρέπει την αναγνώριση των ειδών αυτών στο μικροσκόπιο.

Συγκεκριμένα, αναμιγνύεται μια σταγόνα πυκνού εναιώρηματος κυττάρων του εκάστοτε μικροβίου με μια σταγόνα κυανού του μεθυλενίου και μια σταγόνα από κάθε έναν από την σειρά αντιορών-αντισωμάτων έναντι των διαφόρων τύπων των μικροβίων. Το διάλυμα επωάζεται σε κλίβανο στους 37⁰ C για 30 λεπτά και στη συνέχεια μικροσκοπείται. Ο κάθε ένας από τους αντιορούς, περιέχει ένα ομόλογο αντικαψιδικό αντίσωμα έναντι συγκεκριμένου καψιδικού αντιγόνου, που για τον πνευμονιόκοκκο είναι το αντιγόνο του ελύτρου ή ουσία SSS (Species Specific Substance). Ο αντιορός που αντιστοιχεί στον τύπο του πνευμονιοκόκκου σχηματίζει συμπλέγματα αντιγόνου - αντισώματος πάνω στο έλυτρο, το οποίο φαίνεται στην μικροσκόπηση σαν στεφάνη γύρω από το κύτταρο. Όταν η εξέταση είναι θετική, το έλυτρο του μικροβίου γίνεται αδιαφανές (θολό) και φαίνεται να μεγεθύνεται σχεδόν στο διπλάσιο.

2.4 Έλεγχος ευαισθησίας

Ο έλεγχος ευαισθησίας πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο διάχυσης δισκίων κατά Kirby-Bauer στα αντιμικροβιακά πενικιλίνη, κεφοταξίμη, ερυθρομυκίνη, κλινδαμυκίνη, κοτριμοξαζόλη, τετρακυκλίνη, χλωραμφαινικόλη και ριφαμπικίνη. Χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία Müller-Hinton άγαρ, το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 5% ερυθρά προβάτου και η επώαση των τρυβλίων έγινε σε συνθήκες 5% CO₂ στους 37⁰ C για 24 ώρες.

Η ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (ΕΑΠ) των αντιμικροβιακών πενικιλίνη, κεφοταξίμη, οφλοξασίνη και αμοξυκιλλίνη προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ταινιών διαβατισμένης συγκέντρωσης (E-test, bioMerieux, Marcy L' Etoile, France) σε τρυβλία Müller-Hinton άγαρ εμπλουτισμένο με 5% ερυθρά προβάτου και τις ίδιες συνθήκες επώασης.

Ο έλεγχος ποιότητας πραγματοποιήθηκε με την χρήση του στελέχους *S. pneumoniae* ATCC 49619 και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων έγινε με βάση τις οδηγίες του οργανισμού¹¹.

2.5 Φαινότυποι αντοχής

Ο προσδιορισμός των φαινοτύπων αντοχής στις μακρολίδες έγινε με την μέθοδο των δύο δισκίων (ερυθρομυκίνη και κλινδαμυκίνη)²¹⁷. Τα στελέχη *S. pneumoniae* ανθεκτικά στις μακρολίδες (ερυθρομυκίνη), μπορούν να παρουσιάζουν ιδιοσυστασιακή ή επαγωγίμη αντοχή στις λινκοσαμίδες (κλινδαμυκίνη), ή αντοχή μόνο στην μακρολίδες. Οι μορφές αυτές της αντοχής μπορεί να ανιχνευθούν μέσω της εν λόγω δοκιμασίας, όταν ένα δισκίο κλινδαμυκίνης (2 μg) τοποθετείται σε απόσταση 12-15 mm από ένα δισκίο ερυθρομυκίνης (15μg) πάνω σε ένα τρυβλίο Mueller Hinton άγαρ εμπλουτισμένο με 5% ερυθρά προβάτου, όπου έχει επιστρωθεί με αποστειρωμένο βαμβακοφόρο στυλέο, ομοιόμορφα, σε τρεις κατευθύνσεις το ελαιώρημα του μικροβίου, ισοδύναμο με 0,5 της κλίμακας McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ cfu/ml). Το τρυβλίο επωάζεται σε ατμόσφαιρα CO₂ στους 35° C για 20 με 24 ώρες και κατόπιν παρατηρούνται οι διάμετροι αναστολής. Ανάλογα με τις διαμέτρους αναστολής, ένα στέλεχος πνευμονιοκόκκου μπορεί να χαρακτηριστεί ως ανθεκτικό και στα δύο αντιβιοτικά (μηδενική διάμετρος αναστολής), οπότε ο φαινότυπος αντοχής είναι ο ιδιοσυστασιακός CR (CR-MLS_B), ανθεκτικό μόνο στην ερυθρομυκίνη και άρα με φαινότυπο αντοχής τον M, ενώ αν στην ζώνη αναστολής της κλινδαμυκίνης παρουσιαστεί ένας ευθειςσμός, ακριβώς απέναντι από το δισκίο της ερυθρομυκίνης, δίνοντας στην ζώνη αναστολής της κλινδαμυκίνης το σχήμα του λατινικού γράμματος D (ζώνη D), τότε υπάρχει αντοχή MLS_B επαγωγίμου τύπου και ο φαινότυπος είναι ο IR (IR-MLS_B).

2.6 Εκχύλιση DNA

Η απομόνωση ολικού DNA από τα στελέχη τα οποία μελετήθηκαν με μοριακές τεχνικές, έγινε χρησιμοποιώντας είτε την εμπορική μέθοδο στηλών Nucleospin (Macherey-Nagel, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, είτε την αδρή μέθοδο βρασμού με σωματίδια Chelex.

Η μέθοδος Chelex βασίζεται στην καταστροφή του βακτηριακού τοιχώματος με θέρμανση και με την χρήση ενός διαλύματος επιφανειοδραστικών ουσιών (TEN) και σφαιριδίων ρεσίνης. Το διάλυμα TEN παρασκευάζεται αναμειγνύοντας 50 ml Tris 1M, 100 ml EDTA 0,5 M, pH 8, 25 ml NaCl 3M, συμπλήρωση με αποστειρωμένο, απιονισμένο H₂O έως τα 500 ml, ρύθμιση του pH στο 7,5 και τέλος αποστείρωση του διαλύματος σε κλίβανο για να είναι έτοιμο προς χρήση. Τα υπόλοιπα αντιδραστήρια που είναι απαραίτητα στη μέθοδο αυτή είναι: 1) Ειδικά σφαιρίδια – Chelating resin 100 gr (Chelex 100) (Sigma), 2) Διάλυμα Igepal (Sigma), 3) Διάλυμα Tween 20 - Polyoxyethylenesorbitan monolaurate, (Sigma), 4) Διάλυμα SDS - Sodium Dodecyl Sulfate, (ICN Biomedicals Inc. Ohio).

Κατά τη διαδικασία ετοιμάζονται τα ειδικά σωληνάρια όπου θα πραγματοποιηθεί η εκχύλιση του DNA, όσα και τα στελέχη που μελετώνται, με 1 ml διάλυμα TEN και αρκετή ποσότητα από το

καλλιέργημα του στελέχους από αιματούχο άγαρ με τον τρόπο που αναφέρθηκε στο Γενικό Μέρος της διατριβής. Γίνεται ανάδευση και φυγοκέντρωση στις 10.000 rpm για 1 min, στους 4°C και απόρριψη του υπερκειμένου με το χέρι. Επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία για 2^η φορά και προετοιμάζεται ο αναδευτής με θερμότητα (thermomixer) στους 95°C για 5 min. Επαναλαμβάνεται η προηγούμενη διαδικασία για 3^η φορά και φυλάσσονται τα σωληνάρια με το ίζημα. Στη συνέχεια προετοιμάζεται το διάλυμα Chelex με 0,5 gr σφαιριδίων Chelex, 15 μl SDS 10%, 50 μl Tween 20, 50 μl Igepal και dH₂O μέχρι να συμπληρωθούν 5 ml δ/τος συνολικά (υπολογισμένο δ/μα για εκχύλιση 10 στελεχών). Το διάλυμα αναδεύεται μόνο με ειδικό ρύγχος πιπετών και όχι με άλλο τρόπο. Προετοιμάζεται άλλη μία σειρά σωληναρίων καθαρών για τα αντίστοιχα στελέχη και σε κάθε ένα προστίθενται 200 μl δ/τος Chelex και 2 μl ιζήματος. Γίνεται σύντομη ανάδευση και επώαση στον θερμικό αναδευτή στους 95°C για 5 min. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 10.000 rpm για 10 sec και το υπερκείμενο υγρό, όχι τα σφαιρίδια, μεταφέρεται σε καθαρά σωληνάρια. Το υλικό των σωληναρίων είναι πλέον έτοιμο προς χρήση.

2.7 Εφαρμογή της PCR στην διερεύνηση των μηχανισμών αντοχής στα αντιβιοτικά MLS_B

Η ανίχνευση των γονιδίων-μηχανισμών της MLS_B αντοχής πραγματοποιήθηκε με πολλαπλασιασμό τμήματος των γονιδίων *mef*, *ermB* και *ermTR*, με την τεχνική της PCR, σύμφωνα με την βιβλιογραφία^{36,102,103}. Τα αντιδραστήρια για την εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: MgCl₂ 25 mM (Promega Co. Madison, Wisconsin, USA), ρυθμιστικό διάλυμα 10X (KCl 50 mM και TrisHCl 10 mM) (Promega), διάλυμα δινουκλεοτιδίων dATP, dCTP, dGTP, dTTP συγκέντρωσης 10 mM (Promega), διάλυμα εκκινητών (ευθύς - forward και αντίστροφο - reverse) συγκέντρωσης 10 pmol (VBC, Biotech Service, Gmbtt, Vienna, Austria) και διάλυμα Taq πολυμεράσης 5 u/μl - 500 u (Promega).

2.7.1 Γονίδιο *mefA/E*

Το Master Mix (μείγμα της PCR) για κάθε μία αντίδραση PCR που αφορούσε στο γονίδιο *mef*, αποτελούνταν από: 20.4 μl dH₂O, 1.8 μl MgCl₂, 3 μl ρυθμιστικό διάλυμα 10X, 0.6 μl από κάθε δινουκλεοτίδιο (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.6 μl από κάθε εκκινητή και 0.2 μl Taq πολυμεράση. Ο συνολικός όγκος για κάθε αντίδραση ήταν στα 29 μl, στον οποίο προστίθονταν 1 μl εκχυλισμένο DNA του προς μελέτη στελέχους, ώστε ο τελικός όγκος να ανέρχεται στα 30 μl.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών για τα αντίστοιχα γονίδια ήταν: *mefA/E* forward: AGT ATC ATT AAT CAC TAG TGC και *mefA/E* reverse: TTC TTC TGG TAC TAA AAG TGG. Το μήκος της αλληλουχίας του γονιδίου που πολλαπλασιάζεται είναι 348 ζεύγη βάσεων (Εικόνα 1 – Παράρτημα 1).

Το πρόγραμμα των αντιδράσεων PCR στον θερμοκυκλοποιητή ήταν:

ένας κύκλος	4 min στους 94 ⁰ C (αρχική θέρμανση)
35 κύκλοι	30 sec στους 94 ⁰ C (αποδιάταξη)
	1 min στους 55 ⁰ C (υβριδισμός εκκινητών)
	1 min και 30 sec στους 72 ⁰ C (επιμήκυνση)
ένας κύκλος	7 min στους 72 ⁰ C
παραμονή	20 ⁰ C έως την απόσυρση των προϊόντων PCR

2.7.2 Γονίδιο *ermB*

Το Master Mix (μείγμα της PCR) για κάθε μία αντίδραση PCR που αφορούσε στο γονίδιο *ermB*, αποτελούνταν από: 20.4 μl dH₂O, 1.8 μl MgCl₂, 3 μl ρυθμιστικό διάλυμα 10X, 0.6 μl από κάθε δινουκλεοτίδιο (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.6 μl από κάθε εκκινητή και 0.2 μl Taq πολυμεράση. Ο συνολικός όγκος για κάθε αντίδραση ήταν στα 29 μl, στον οποίο προστίθονταν 1 μl εκχυλισμένο DNA του προς μελέτη στελέχους, ώστε ο τελικός όγκος να ανέρχεται στα 30 μl.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών για τα αντίστοιχα γονίδια ήταν: *ermB* forward: GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA, *ermB* reverse: AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC. Το μήκος της αλληλουχίας του γονιδίου που πολλαπλασιάζεται είναι 639 ζεύγη βάσεων (Εικόνα 2 – Παράρτημα 1).

Το πρόγραμμα των αντιδράσεων PCR στον θερμοκυκλοποιητή ήταν:

ένας κύκλος	4 min στους 94 ⁰ C (αρχική θέρμανση)
35 κύκλοι	30 sec στους 94 ⁰ C (αποδιάταξη)
	1 min στους 58 ⁰ C (υβριδισμός εκκινητών)
	1 min και 30 sec στους 72 ⁰ C (επιμήκυνση)
ένας κύκλος	7 min στους 72 ⁰ C
παραμονή	20 ⁰ C έως την απόσυρση των προϊόντων PCR

2.7.3 Γονίδιο *ermTR*

Το Master Mix (μείγμα της PCR) για κάθε μία αντίδραση PCR που αφορούσε στο γονίδιο *ermTR*, αποτελούνταν από: 20.5 μl dH₂O, 1.8 μl MgCl₂, 3 μl ρυθμιστικό διάλυμα 10X, 0.6 μl από κάθε δινουκλεοτίδιο (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.6 μl από κάθε εκκινητή και 0.1 μl Taq πολυμεράση. Ο συνολικός όγκος για κάθε αντίδραση ήταν στα 29 μl, στον οποίο προστίθονταν 1 μl εκχυλισμένο DNA του προς μελέτη στελέχους, ώστε ο τελικός όγκος να ανέρχεται στα 30 μl.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών για τα αντίστοιχα γονίδια ήταν III₈: GCA TGA CAT AAA CCT TCA και III₁₀: AGG TTA TAA TGA AAC AGA. Ο συνδυασμός των εκκινητών δίνει το μήκος της αλληλουχίας του γονιδίου που πολλαπλασιάζεται και είναι 205 ζεύγη βάσεων (Εικόνα 3 – Παράρτημα 1).

Το πρόγραμμα των αντιδράσεων PCR στον θερμοκυκλοποιητή ήταν:

ένας κύκλος	4 min στους 94 ⁰ C (αρχική θέρμανση)
-------------	---

35 κύκλοι	30 sec στους 94 ⁰ C (αποδιάταξη)
	1 min στους 46 ⁰ C (υβριδισμός εκκινητών)
	1 min και 30 sec στους 72 ⁰ C (επιμήκυνση)
ένας κύκλος	7 min στους 72 ⁰ C
παραμονή	20 ⁰ C έως την απόσυρση των προϊόντων PCR

2.7.4 Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης για τα γονίδια αντοχής *MLS_B*

Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της PCR έγινε με την χρήση γέλης αгарόζης 2% και ηλεκτροφόρηση στα 118-120 V στην ηλεκτροφορητική συσκευή για 20-25 min. Για την παρασκευή της γέλης χρησιμοποιήθηκαν 25 ml TBE διαλύματος, το οποίο παρασκευάστηκε από 54 gr σκόνης Tris-Base, 27,5 gr Βορικού οξέως σε σκόνη, 20 ml EDTA 0,5 M pH 8 και dH₂O 800 ml (για 1 lt TBE). Επίσης, 225 ml dH₂O, 5 gr Αγαρόζης (Promega Co.) και 12 μl Βρωμιούχου Αιθιδίου. Για την σύγκριση των μοριακών βαρών των θραυσμάτων της ηλεκτροφόρησης και τον ακριβή προσδιορισμό τους, χρησιμοποιήθηκε σαν δείκτης βάρους το Gene Ruler 100bp DNA Ladder (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc. Canada) και σαν χρωστική φόρτωσης στα προϊόντα PCR, το Blue Orange 6X Loading Dye (Promega Co.). Για το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφορητικής συσκευής χρησιμοποιήθηκαν 130 ml TBE, 1.170 ml dH₂O και 65 μl Βρωμιούχο Αιθίδιο. Χρησιμοποιήθηκαν 10 μl προϊόντος PCR σε κάθε βύθισμα της γέλης.

2.7.5 Προσδιορισμός των υποτύπων *mefA/E* με την χρήση της PCR-RFLP

Ο προσδιορισμός των υποτύπων των γονιδίων *mefA/E* έγινε με την τεχνική της PCR-RFLP¹⁰⁴ με την χρήση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *Bam*H1³⁵. Η συγκεκριμένη τεχνική βασίζεται στην πέψη των προϊόντων της PCR με περιοριστικό ένζυμο. Τα περιοριστικά ένζυμα αναγνωρίζουν μια συγκεκριμένη αλληλουχία νουκλεοτιδικών βάσεων του DNA και στην συνέχεια τέμνουν την αλυσίδα στο συγκεκριμένο σημείο. Λόγω της υψηλής ειδικότητας των ενζύμων η πλήρης πέψη του DNA, παρέχει μια αναπαραγώγιμη διάταξη θραυσμάτων, που διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση πηκτής αгарόζης ή πολυακρυλαμίδης, όπως και στη συμβατική μέθοδο PCR. Οι παραλλαγές στη διάταξη των θραυσμάτων μετά από πέψη με περιοριστικό ένζυμο ονομάζονται “αποτύπωμα περιοριστικών ειδικών πολυμορφικών θέσεων βακτηριακού DNA” – Restriction Fragment Length Polymorfism (RFLPs) και μπορεί να δημιουργηθούν με ανακατάταξη, παρεμβολή αλληλουχιών, καταστροφή DNA ή αντικατάσταση βάσης στη περιοχή αναγνώρισης του ενζύμου. Στη παρούσα διατριβή, η περιοριστική ενδονουκλεάση *Bam*H1 χρησιμοποιήθηκε για την πέψη του προϊόντος PCR για το γονίδιο *mefA/E*, μεγέθους 348 ζευγών βάσεων, σε *mefA* και *mefE*. Συγκεκριμένα, η *Bam*H1, δεν έχει κανένα σημείο τομής για το *mefE*, ενώ τέμνει το *mefA*, σε 2 θραύσματα μεγέθους 284 και 64 ζευγών βάσεων.

Όσον αφορά στη διαδικασία που ακολουθήθηκε, σε κάθε σωληνάριο αντίδρασης μετά την ολοκλήρωση της PCR, προστέθηκε απευθείας το περιοριστικό ένζυμο, η περιοριστική ενδονουκλεάση *Bam*H1 (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc. Canada), σε μορφή διαλύματος, μετά τη λήξη της PCR. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε μία αντίδραση ήταν: 10 μl προϊόντος PCR, 18 μl dH₂O, ελεύθερου νουκλεασών, 2 μl 10X ρυθμιστικό διάλυμα (Fermentas) και 2 μl περιοριστικού ενζύμου (10-20u), τα οποία αναδεύτηκαν προσεκτικά, φυγοκεντρήθηκαν για μερικά δευτερόλεπτα (spin down) και στη συνέχεια επώαστηκαν σε θερμικό αναδευτήρα για 16 ώρες στους 37°C. Μετά από την επώαση, η αντίδραση πέψης με το περιοριστικό ένζυμο διεκόπη με τη χρήση EDTA 0,5 M pH 8, 1,5 μl (Εικόνα 4 – Παράρτημα 1).

Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της πέψης με την περιοριστική ενδονουκλεάση, έγινε με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης 1,5%, η οποία παρασκευάστηκε όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, με μόνη διαφορά την σύγκέντρωση της αгарόζης που ήταν 1,5% αντί για 2% και με την ίδια διαδικασία φόρτωσης και ηλεκτροφόρησης.

2.8 Εφαρμογή της PCR στην διερεύνηση των μηχανισμών αντοχής στις τετρακυκλίνες

Η ανίχνευση των γονιδίων-μηχανισμών της αντοχής στις τετρακυκλίνες, πραγματοποιήθηκε με πολλαπλασιασμό τμήματος των γονιδίων *tetM* και *tetO* με την τεχνική της πολυπλεκτικής (multiplex) PCR σύμφωνα με τα αντίστοιχα πρωτόκολλα στην βιβλιογραφία^{37, 38}.

Τα αντιδραστήρια για την εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: MgCl₂ 25 mM (Promega Co. Madison, Wisconsin, USA), ρυθμιστικό διάλυμα 10X (KCl 50 mM και TrisHCl 10 mM) (Promega), διάλυμα δινουκλεοτιδίων dATP, dCTP, dGTP, dTTP συγκέντρωσης 10 mM (Promega), διάλυμα εκκινητών (ευθύς - forward και αντίστροφο – reverse) συγκέντρωσης 10 pmol (VBC, Biotech Service, Gmbtt, Vienna, Austria) και διάλυμα Taq πολυμεράσης 5 u/μl – 500 u (Promega).

2.8.1 Γονίδια *tetM* – *tetO*

Το Master Mix (μείγμα της PCR) για κάθε μία αντίδραση PCR που αφορούσε στα γονίδια *tetM* και *tetO*, αποτελούνταν από: 27.5 μl dH₂O, 3 μl MgCl₂, 10 μl ρυθμιστικό διάλυμα 5X, 1 μl από κάθε δινουκλεοτίδιο (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 μl από κάθε εκκινητή (Forward και Reverse) και 0.5 μl Taq πολυμεράση. Ο συνολικός όγκος για κάθε αντίδραση ήταν στα 49 μl, στον οποίο προστίθονταν 1 μl εκχυλισμένο DNA του προς μελέτη στελέχους, ώστε ο τελικός όγκος να ανέρχεται στα 50 μl.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών για το γονίδιο *tetM* ήταν *tetM* forward: GTT TAT CAC GGA AGT GCA και *tetM* reverse: GGA GCC CAG AAA GGA TTC GG. Το μήκος της αλληλουχίας του γονιδίου που πολλαπλασιάζεται είναι 686 ζεύγη βάσεων.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών για το γονίδιο *tetO* ήταν *tetO* forward: AAC TTA GGC ATT CTG GCT CAC και *tetO* reverse: TCC CAC TGT TCC ATA TCG TCA. Το μήκος της αλληλουχίας του γονιδίου που πολλαπλασιάζεται είναι 519 ζεύγη βάσεων (Εικόνα 5 – Παράρτημα 1).

Το πρόγραμμα των αντιδράσεων PCR στον θερμοκυκλοποιητή ήταν κοινό και για τους δύο στόχους:

ένας κύκλος	4 min στους 94°C (αρχική θέρμανση)
35 κύκλοι	40 sec στους 94°C (αποδιάταξη)
	30 sec στους 44°C (υβριδισμός εκκινητών)
	1 min στους 72°C (επιμήκυνση)
ένας κύκλος	3 min στους 72°C
παραμονή	20°C έως την απόσυρση των προϊόντων PCR

2.8.2 Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης για τα γονίδια αντοχής στην τετρακυκλίνη

Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της PCR έγινε με την χρήση γέλης αγαρόζης 1.5 % και ηλεκτροφόρηση στα 118-120 V στην ηλεκτροφορητική συσκευή για 20-25 min, όπως αναφέρθηκε ανωτέρω.

2.9 Εφαρμογή της PCR στην διερεύνηση των μηχανισμών αντοχής στις β-λακτάμες

Η διερεύνηση των μηχανισμών αντοχής στα β-λακταμικά, σε ανθεκτικά στελέχη στην πενικιλίνη ή/και την κεφοταξίμη έγινε με πολλαπλασιασμό τμήματος 1.150 ζευγών βάσεων των γονιδίων των πρωτεϊνών PBP1A, 2B και 2X με την τεχνική της PCR σύμφωνα με τα αντίστοιχα πρωτόκολλα στην βιβλιογραφία^{25, 105, 106, 107} και επακόλουθο προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Τα αντιδραστήρια για την εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: GoTaq Colorless Master Mix (έτοιμο μίγμα Taq DNA πολυμεράσης, δινουκλεοτιδίων και MgCl₂ σε ρυθμιστικό διάλυμα) (Promega Co. Madison, Wisconsin, USA) και εκκινητές συγκέντρωσης 10 pmol/μl ο κάθε ένας (VBC, Biotech Service, Gmbtt, Vienna, Austria).

2.9.1 Γονίδιο *pbp1A*

Το Master Mix (μείγμα της PCR) για κάθε μία αντίδραση PCR που αφορούσε στο γονίδιο *pbp1A*, αποτελούνταν από: 21 μl dH₂O, 25 μl GoTaq Colorless Master Mix και 1 μl από κάθε εκκινητή (Forward και Reverse). Ο συνολικός όγκος για κάθε αντίδραση ήταν στα 48 μl, στον οποίο προστίθονταν 2 μl εκχυλισμένο DNA του προς μελέτη στελέχους, ώστε ο τελικός όγκος να ανέρχεται στα 50 μl.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών για τα αντίστοιχα γονίδια ήταν: *pbp1A* forward TGG GAT GGA TGT TTA CAC AAA TG και *pbp1A* reverse TGT GCT GGT TGA TGA GGA TTC TG. Το

μήκος της αλληλουχίας του γονιδίου που πολλαπλασιάζεται είναι 1,3 kb (Εικόνα 6 – Παράρτημα 1).

Το πρόγραμμα των αντιδράσεων PCR στον θερμοκυκλοποιητή ήταν:

ένας κύκλος	4 min στους 94 ⁰ C (αρχική θέρμανση)
35 κύκλοι	30 sec στους 94 ⁰ C (αποδιάταξη)
	30 sec στους 55 ⁰ C (υβριδισμός εκκινητών)
	1 min στους 72 ⁰ C (επιμήκυνση)
ένας κύκλος	7 min στους 72 ⁰ C
παραμονή	20 ⁰ C έως την απόσυρση των προϊόντων PCR

2.9.2 Γονίδιο *pbp2B*

Το Master Mix (μείγμα της PCR) για κάθε μία αντίδραση PCR που αφορούσε στο γονίδιο *pbp2B*, αποτελούνταν από: 21 μl dH₂O, 25 μl GoTaq Colorless Master Mix και 1 μl από κάθε εκκινητή (Forward και Reverse). Ο συνολικός όγκος για κάθε αντίδραση ήταν στα 48 μl, στον οποίο προστίθονταν 2 μl εκχυλισμένο DNA του προς μελέτη στελέχους, ώστε ο τελικός όγκος να ανέρχεται στα 50 μl.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών για τα αντίστοιχα γονίδια ήταν: *pbp2B* forward GAT CCT CTA AAT GAT TCT CAG GTG και *pbp2B* reverse CAA TTA GCT TAG CAA TAG GTG TTG G. Το μήκος της αλληλουχίας του γονιδίου που πολλαπλασιάζεται είναι 1,4 kb (Εικόνα 7 – Παράρτημα 1).

Το πρόγραμμα των αντιδράσεων PCR στον θερμοκυκλοποιητή ήταν:

ένας κύκλος	3 min στους 94 ⁰ C (αρχική θέρμανση)
30 κύκλοι	1 min στους 94 ⁰ C (αποδιάταξη)
	2 min στους 50 ⁰ C (υβριδισμός εκκινητών)
	6 min στους 72 ⁰ C (επιμήκυνση)
ένας κύκλος	7 min στους 72 ⁰ C
παραμονή	20 ⁰ C έως την απόσυρση των προϊόντων PCR

2.9.3 Γονίδιο *pbp2X*

Το Master Mix (μείγμα της PCR) για κάθε μία αντίδραση PCR που αφορούσε στο γονίδιο *pbp2X*, αποτελούνταν από: 21 μl dH₂O, 25 μl GoTaq Colorless Master Mix και 1 μl από κάθε εκκινητή (Forward και Reverse). Ο συνολικός όγκος για κάθε αντίδραση ήταν στα 48 μl, στον οποίο προστίθονταν 2 μl εκχυλισμένο DNA του προς μελέτη στελέχους, ώστε ο τελικός όγκος να ανέρχεται στα 50 μl.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών για τα αντίστοιχα γονίδια ήταν: *pbp2X* forward TAT GAA AAG GAT CGT CTG GG και *pbp2X* reverse AGA GAG TCT TTC ATA GCT GAA GC. Το

μήκος της αλληλουχίας του γονιδίου που πολλαπλασιάζεται είναι 1,1 kb (Εικόνα 8 – Παράρτημα 1).

Το πρόγραμμα των αντιδράσεων PCR στον θερμοκυκλοποιητή ήταν:

ένας κύκλος	4 min στους 94 ⁰ C (αρχική θέρμανση)
30 κύκλοι	30 sec στους 94 ⁰ C (αποδιάταξη)
	1 min στους 61 ⁰ C (υβριδισμός εκκινητών)
	2 min στους 72 ⁰ C (επιμήκυνση)
ένας κύκλος	7 min στους 72 ⁰ C
παραμονή	20 ⁰ C έως την απόσυρση των προϊόντων PCR

2.9.4 Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης για τα γονίδια αντοχής *pbp 1A/2B/2X*

Για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της PCR που αφορούσε στα παραπάνω γονίδια, έγινε χρήση γέλης αгарόζης 2% και ηλεκτροφόρηση στα 118-120 V στην ηλεκτροφορητική συσκευή για 20-25 min, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

2.9.5 Καθαρισμός προϊόντων PCR και αλληλούχηση νουκλεοτιδικής αλυσού (sequencing)

Για να πραγματοποιηθεί η διαδικασία προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, τα προϊόντα της PCR, είναι ανάγκη να “καθαριστούν” από τα υπόλοιπα στοιχεία του διαλύματος της αντίδρασης. Τέτοια στοιχεία είναι κυρίως υπολείμματα εκκινητών ή περίσσεια δινουκλεοτιδίων (dNTP's) που θα μπορούσαν να επιδράσουν αρνητικά στην αντίδραση αλληλούχησης, αλλά και άλλες ουσίες όπως ανταγωνιστικά ένζυμα ή συστατικά του ρυθμιστικού διαλύματος που θα μπορούσαν να δημιουργήσουν προβλήματα στη περίπτωση αυτή.

Τα προϊόντα της PCR που αφορούσαν σε όλα τα *pbp* γονίδια αντοχής, υποβλήθηκαν σε καθαρισμό με την εμπορική μέθοδο στηλών Nucleospin Extract II-Protocol PCR clean-up (Macherey-Nagel, Germany).

Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας έγινε μέσω εταιρείας παροχής υπηρεσιών αλληλούχησης νουκλεοτιδικών αλυσίδων (sequencing) και χρησιμοποιήθηκε ένας Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems).

Οι αλληλουχίες των εσωτερικών εκκινητών για την αλληλούχηση του *pbp1A* γονιδίου ήταν:

pbp1A Seq1: AAG CTC AAA AAC ATC TGT GGG
pbp1A Seq2: AGT AGT GAA AAA ATG GCT GCT G
pbp1A Seq3: CTG GGG TTC TGC TAT GAA ACC
pbp1A Seq4: TAC TCC ACT CTA CAA CTG GG
pbp1A Seq5: TTC GTA TTT AAA AAT GGT GCT CG
pbp1A Seq6: GCA GCC ATT TTT TCA CTA CTT G

pbp1A Seq7: GTA GCT CCA GAT GAA ATG TTT G

pbp1A Seq8: ATG GCT GCT GCT TAT GCT GCC

pbp1A Seq9: CCA ACA AAC ATT TCA TCT GGA GC

Οι αλληλουχίες των εσωτερικών εκκινητών για την αλληλούχηση του *pbp2B* γονιδίου ήταν:

pbp2B Seq1: ATT CCT TGG GAA CGG TAA CC

pbp2B Seq2: CGA GGA GCC ACA CGA ACA CC

Για την αλληλούχηση του *pbp2X* γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές της αρχικής PCR.

2.9.6 Ανάλυση και σύγκριση αποτελεσμάτων

Μετά την παραλαβή των αλληλουχιών, έγινε ανάλυση των αποτελεσμάτων με το λογισμικό Data Analysis in Molecular Biology and Evolution (DAMBE V5.1.5, University of Ottawa, Ottawa, Canada) και την χρήση του αλγορίθμου ClustalW.

2.9.7 Έλεγχος ποιότητας

Για έλεγχο ποιότητας της τεχνικής sequencing χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα στελέχη *S. pneumoniae* ATCC 700669 και ATCC 49619.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Γενικά δεδομένα

Κατά την διάρκεια της μελέτης απομονώθηκαν συνολικά, 1.033 στελέχη *Streptococcus pneumoniae*, εκ των οποίων τα 186 ανήκαν στην ομάδα ΣΔΛ (αίμα, Ε.Ν.Υ. και λοιπά βιολογικά υγρά), τα 641 στελέχη ανήκαν στην ομάδα ΣΜΔΛ (ωτικές, ρινικές, οφθαλμικές εκκρίσεις, φαρυγγικά επιχρίσματα, πτύελα, βρογχικές εκκρίσεις, πύον μαστοειδούς απόφυσης κ.α.), ενώ 206 στελέχη ανήκαν στην ομάδα ΣΦ.

Τα 827 στελέχη των ομάδων ΣΔΛ και ΣΜΔΛ απομονώθηκαν από 448 άρρενα άτομα-ασθενείς (54,2%) και 379 θήλεα (45,8%), ενώ οι ηλικίες των ασθενών κυμαίνονταν από τις 22 ημέρες έως τα 14 χρόνια, με 103 από τους ασθενείς, να είναι έως και 2 ετών.

Όσον αφορά στα κλινικά δείγματα, τα 186 στελέχη της ομάδας ΣΔΛ προέρχονταν κυρίως από αιμοκαλλιέργειες (161 στελέχη), ενώ 20 στελέχη προέρχονταν από καλλιέργειες ΕΝΥ και 5 στελέχη από άλλα κλινικά δείγματα. Τα 641 στελέχη της ομάδας ΣΜΔΛ προέρχονταν κυρίως από ωτικά δείγματα ασθενών με μέση πυώδη ωτίτιδα, οφθαλμικές εκκρίσεις και λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος (438, 106 και 97 στελέχη, αντίστοιχα).

Τα 206 στελέχη της ομάδας ΣΦ ελήφθησαν από 873 παιδιά, με ποσοστό φορέας 23,6%.

3.2 Αποτελέσματα οροτυπίας

Ο ορότυπος 19F επικρατούσε ανάμεσα στο σύνολο των στελεχών, με δεύτερο σε συχνότητα τον ορότυπο 14 και ακολουθούσαν οι υπόλοιποι ορότυποι 6B, 23F κ.τ.λ. Η αναλυτική κατανομή των οροτύπων παρουσιάζεται στο Γράφημα 1 (Παράρτημα 1).

Η σύγκριση της κατανομής των επικρατούντων οροτύπων αποκάλυψε διαφορές μεταξύ των στελεχών των τριών ομάδων. Συγκεκριμένα, στην ομάδα ΣΔΛ κυριαρχούσε ο ορότυπος 14, στην ομάδα ΣΜΔΛ κυριαρχούσε ο ορότυπος 19F και στην ομάδα ΣΦ κυριαρχούσε ο ορότυπος 6B. Η κατανομή των οροτύπων των στελεχών της συλλογής σε συνάρτηση με τα κλινικά δείγματα, παρουσιάζεται στο Γράφημα 2 (Παράρτημα 1).

3.3 Γενικά αποτελέσματα αντοχής

Τα συνολικά ποσοστά αντοχής των στελεχών πνευμονιοκόκκου της συλλογής στα αντιμικροβιακά πενικιλίνη, αμοξυκιλίνη, κεφοταξίμη, ερυθρομυκίνη, κλινδαμυκίνη, κο-τριμοξαζόλη, τετρακυκλίνη και χλωραμφαινικόλη ήσαν 44,6%, 2,7%, 1,2%, 43,6%, 12,4%, 43,5%, 34,7% και 5,9%, αντίστοιχα.

Ειδικότερα για τα β-λακταμικά αντιβιοτικά, η συνολική αντοχή στην πενικιλίνη και στην κεφοταξίμη σημειώθηκε σε ποσοστά 44,6% και 1,2%, αντίστοιχα. Συγκριτικά στις τρεις ομάδες (ΣΔΛ, ΣΜΔΛ, ΣΦ) τα ποσοστά αντοχής φαίνονται στον Πίνακα 1 (Παράρτημα 2). Τα ποσοστά πλήρους και ενδιάμεσης αντοχής σε πενικιλίνη και κεφοταξίμη παρουσιάζονται στους Πίνακες 2

και 3 (Παράρτημα 2). Στελέχη με αντοχή στην αμοξυκιλλίνη απομονώθηκαν μόνο σποραδικά από μη διεισδυτικές λοιμώξεις και φορεία, ενώ είναι εμφανές ότι τα ποσοστά αντοχής των στελεχών που απομονώθηκαν σε μη διεισδυτικές λοιμώξεις και σε φορεία, ήταν υψηλότερα σε σχέση με αυτά, των στελεχών που ενεπλάκησαν σε διεισδυτικές λοιμώξεις.

Η συνολική αντοχή στην ερυθρομυκίνη και στην κλινδαμυκίνη, καθώς και τα επιμέρους ποσοστά των ομάδων ΣΔΛ, ΣΜΔΛ και ΣΦ παρουσιάζονται στους Πίνακες 4 και 5 (Παράρτημα 2), ενώ όπως φαίνεται στον Πίνακα 6 (Παράρτημα 2), ο φαινότυπος M επικρατούσε στις μη διεισδυτικές λοιμώξεις και διεισδυτικές λοιμώξεις, ενώ ο φαινότυπος CR επικρατούσε μεταξύ των στελεχών από φορεία.

Όσον αφορά στην τετρακυκλίνη τα ποσοστά αντοχής μεταξύ των στελεχών ΣΔΛ, ΣΜΔΛ και ΣΦ ανέρχονταν σε 10,2%, 41,7% και 35%, αντίστοιχα.

Τα ποσοστά αντοχής στην κο-τριμοξαζόλη ήταν επίσης υψηλά με μεγαλύτερο το 49% που αφορούσε τα στελέχη ΣΜΔΛ.

Πολυαντοχή, δηλαδή αντοχή σε τουλάχιστον τρεις ή περισσότερες κατηγορίες αντιμικροβιακών ήταν συχνή μεταξύ των στελεχών των ομάδων ΣΜΔΛ και ΣΦ (44% και 36,8%, αντίστοιχα), χωρίς σημαντικές ηλικιακές διαφορές, ενώ στην ομάδα ΣΔΛ ήταν χαμηλότερη (11,3%), αν και η ανάλυση ανά ηλικία ανέδειξε πολυαντοχή σε ποσοστό 71,4% στις ηλικίες ≤ 2 ετών.

3.4 Αποτελέσματα αντοχής ανά ορότυπο

Η κατανομή στους κυριότερους ορότυπους των στελεχών με αντοχή στην πενικιλλίνη φαίνεται στον Πίνακα 7 (Παράρτημα 2). Η αντίστοιχη κατανομή των 12 ανθεκτικών στελεχών στη κεφοταξίμη στους κυριότερους οροτύπους έδειξε ότι η συντριπτική πλειοψηφία ανήκαν στον ορότυπο 19F (10 στελέχη, 83%), ενώ από ένα στέλεχος ανήκε στους ορότυπους 19nonF και 11.

Η κατανομή στους κυριότερους ορότυπους των στελεχών με αντοχή στην ερυθρομυκίνη παρουσιάζεται στον Πίνακα 8, ενώ η αντίστοιχη κατανομή των στελεχών με αντοχή στην τετρακυκλίνη φαίνεται στον Πίνακα 9 (Παράρτημα 2).

Η κατανομή των φαινοτύπων αντοχής στην ερυθρομυκίνη-κλινδαμυκίνη σε σχέση με τους κυριότερους ορότυπους (Πίνακας 10 - Παράρτημα 2) ανέδειξε συσχέτιση μεταξύ του φαινότυπου M και των οροτύπων 19F, 14 και 19nonF και μεταξύ του φαινότυπου CR και των οροτύπων 6B και 23F.

Όσον αφορά την πολυαντοχή των στελεχών, στον ορότυπο 19F επικρατούσαν οι φαινότυποι αντοχής PenErySxtTet και PenEryTet (49,4% και 7,6%, αντίστοιχα), χωρίς διαφοροποίηση ανάμεσα στις τρεις ομάδες μελέτης, ενώ στον ορότυπο 14 επικρατούσαν οι φαινότυποι αντοχής PenEry και EryCliSxt (35,3% και 5,9%, αντίστοιχα), αν και ειδικά στα στελέχη οροτύπου 14 της ομάδας ΣΔΛ επικρατούσε ο φαινότυπος Ery. Μεταξύ των στελεχών οροτύπου 23F οι συχνότεροι φαινότυποι αντοχής ήταν ο PenEryCliSxtTetCmp και PenSxt (14% και 10%, αντίστοιχα). Τέλος,

στα στελέχη οροτύπου 9V οι συχνότεροι φαινότυποι ήταν οι PenSxt και Pen (54,4% και 6,3%, αντίστοιχα).

3.5 Διερεύνηση μηχανισμών MLS_B αντοχής γενικά και ανά ορότυπο

Η εφαρμογή της μεθόδου PCR για διερεύνηση των μηχανισμών αντοχής MLS_B πραγματοποιήθηκε σε 157 από τα 248 ανθεκτικά στις μακρολίδες στελέχη οροτύπου 19F, σε 64 από τα 104 ανθεκτικά στις μακρολίδες στελέχη οροτύπου 14, καθώς και σε 33, 12, 1, 3, 2 και 1 στελέχη των λιγότερο συχνά απαντούμενων οροτύπων 6B, 23F, 9V, 19nonF, 6nonB και 3. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 11 (Παράρτημα 2).

Η συσχέτιση της φαινοτυπικής έκφρασης της αντοχής και του υποκείμενου μοριακού μηχανισμού έδειξε ότι:

- Σε 201 στελέχη ανθεκτικά σε ερυθρομυκίνη οροτύπων 19F, 14, 6B, 23F, 9V, 19nonF, 6nonB και 3, επιβεβαιώθηκε η παρουσία των γονιδίων *mef*, *ermB* και *ermTR* και συσχετίστηκε πλήρως με την φαινοτυπική έκφραση της αντοχής (M, CR, ή IR)
- Σε 72 στελέχη ανθεκτικά σε ερυθρομυκίνη οροτύπων 19F, 14, 6B, 23F, 9V, 19nonF, 6nonB και 3, δεν ανιχνεύθηκε κανένα γονίδιο, υποδηλώνοντας άλλο μηχανισμό αντοχής ή ανεπάρκεια των πρωτοκόλλων που χρησιμοποιήθηκε να ανιχνεύσει την αντοχή.

Διπλή ύπαρξη γονιδίου αντοχής (*mef* και *ermB*) ανιχνεύθηκε σε τρία στελέχη, που εξέφραζαν όλα τον φαινότυπο CR (ανά ένα οροτύπων 19F, 14 και 6B). Επίσης διπλή ύπαρξη γονιδίου αντοχής (*mef* και *ermTR*) ανιχνεύθηκε σε ένα στέλεχος οροτύπου 19F που εξέφραζε τον φαινότυπο IR.

Ο προσδιορισμός των υποτύπων των γονιδίων *mefA/E*, πραγματοποιήθηκε σε 147 στελέχη οροτύπων 19F, 14, 6B, 23F, 11 και 15, στα οποία εφαρμόστηκε η τεχνική PCR- RFLP με την χρήση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *BamH1*. Ο υπότυπος *mefE* επικρατούσε έναντι του *mefA* σε ποσοστό 86% στο σύνολο των *mef*-θετικών στελεχών, όμως η κατανομή ανά ορότυπο έδειξε ότι ο υπότυπος *mefA* υπερείχε μεταξύ των στελεχών του οροτύπου 14, ενώ μεταξύ των στελεχών όλων των άλλων οροτύπων ο επικρατών υπότυπος ήταν ο *mefE*, όπως φαίνεται στον Πίνακα 12 (Παράρτημα 2).

3.6 Διερεύνηση μηχανισμών αντοχής στην τετρακυκλίνη γενικά και ανά ορότυπο

Η εφαρμογή της μεθόδου PCR, όσον αφορά στην αντοχή στην τετρακυκλίνη, έγινε σε 207 από τα 358 στελέχη πνευμονιοκόκκων που ήταν ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη. Ειδικότερα ελέγχθηκαν 151, 28, 11, 11, 3, 1, 1 και 1 στελέχη των οροτύπων 19F, 6B, 14, 23F, 19nonF, 6nonB, 9V και 3, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 13 (Παράρτημα 2).

Σε επτά στελέχη βρέθηκαν και τα δύο γονίδια *tetM* και *tetO* (τρία στελέχη οροτύπου 19F, δύο στελέχη οροτύπου 14 και από ένα στέλεχος οροτύπων 6B και 23F, αντίστοιχα). Επίσης σε 33 από τα στελέχη δεν ανιχνεύθηκε κανένα από τα δύο γονίδια (21 στελέχη οροτύπου 19F, εννιά στελέχη οροτύπου 14 και τρία στελέχη οροτύπου 6B).

3.7 Διερεύνηση μηχανισμών αντοχής στις β-λακτάμες γενικά και ανά ορότυπο

Για την διερεύνηση των μηχανισμών αντοχής στις β-λακτάμες, πραγματοποιήθηκε κατηγοριοποίηση των στελεχών, ανάλογα με τις τιμές της Ελάχιστης Ανασταλτικής Πυκνότητας (ΕΑΠ) της πενικιλίνης και της κεφοταξίμης, σε 2 ομάδες μελέτης: (α) την **ομάδα Α** που αποτελούσαν 14 στελέχη (12 στελέχη οροτύπου 19F, ένα στέλεχος οροτύπου 19nonF και ένα στέλεχος οροτύπου 11) με ΕΑΠ πενικιλίνης > 2 mg/L (ενδιαμέση ευαισθησία και αντοχή) και ΕΑΠ κεφοταξίμης ≥ 2 mg/L (ενδιάμεση ευαισθησία και αντοχή) και (β) την **ομάδα Β** που αποτελούσαν 116 στελέχη (80, 13, 12, 7, 2, 1 και 1 στελέχη των οροτύπων 19F, 14, 9V, 23F, 6B, 9nonV και 19) με ΕΑΠ πενικιλίνης > 2 mg/L (ενδιαμέση ευαισθησία και αντοχή) και ΕΑΠ κεφοταξίμης ≤ 1 mg/L (ευαισθησία).

Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε σε 9 από τα 14 στελέχη της ομάδας Α και σε 18 από τα 116 στελέχη της ομάδας Β, με τυχαία επιλογή. Με βάση τις αλληλουχίες που προσδιορίστηκαν, κατασκευάστηκαν δένδρογράμματα (Εικόνες 9, 10 και 11). Ο συσχετισμός των αποτελεσμάτων της ομαδοποίησης με τα αποτελέσματα της MIC και την οροτυπία ανέδειξε τα ακόλουθα δεδομένα για την κάθε PBP:

- i. Σχετικά με την PBP1A, ανιχνεύθηκαν κλώνοι που αντιστοιχούσαν σε συγκεκριμένους συνδυασμούς οροτύπων/φαινοτύπων. Ειδικότερα τα ανθεκτικά και στις δύο β-λακτάμες στελέχη 19F της ομάδας Α μαζί με ένα στέλεχος οροτύπου 6B της ομάδας Β κατηγοριοποιούνται μαζί (κλώνος 1) και διαφοροποιούνται καθαρά σε σχέση με τα λοιπά στελέχη της ομάδας Β που ήταν ανθεκτικά μόνο στην πενικιλίνη (κλώνοι 2 και 3, Εικόνα 9).
- ii. Σχετικά με την PBP2B, υπήρξε μια συσχέτιση των στελεχών οροτύπου 19F της ομάδας Α (με αντοχή και στις δύο β-λακτάμες) τα οποία κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο ομάδες (κλώνοι 1 και 2) μαζί με το στέλεχος του οροτύπου 6B της ομάδας Β που αναφέρθηκε ανωτέρω. Αντίθετα στα στελέχη της ομάδας Β δεν υπήρξε συσχέτιση με βάση την ΕΑΠ των αντιβιοτικών ή τον ορότυπο και όλες οι ομάδες που διαχωρίστηκαν αποτελούνταν από μεικτούς πληθυσμούς.
- iii. Η κατηγοριοποίηση τέλος με βάση την νουκλεοτιδική αλληλουχία της PBP2X απέδωσε δύο διακριτούς κλώνους, έναν με στελέχη κυρίως οροτύπου 19F της ομάδας Α και το στέλεχος οροτύπου 6B της ομάδας Β που αναφέρθηκε ανωτέρω (κλώνος 1) και έναν με στελέχη διαφορετικών οροτύπων της ομάδας Β (κλώνος 2).

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα αποτελέσματα και των τριών PBPs, μια ομάδα ανθεκτικών και στα δύο β-λακταμικά αντιβιοτικά στελεχών οροτύπου 19F και ένα στέλεχος οροτύπου 6B ομαδοποιούνται μαζί και στα τρία δένδρογράμματα. Αντίθετα, η ομαδοποίηση των λοιπών στελεχών δεν ήταν σταθερή στις τρεις PBPs.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 Γενικά

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε μια μεγάλη και πολυκεντρική συλλογή στελεχών *Streptococcus pneumoniae* που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα παιδών που νοσηλεύθηκαν ή επισκέφτηκαν τα τρία μεγαλύτερα Παιδιατρικά Νοσοκομεία στον Ελλαδικό χώρο (που εξυπηρετούν τον νομό Αττικής, την Κεντρική Ελλάδα και τα νησιά του Αιγαίου, ώστε το δείγμα ασθενών να είναι αντιπροσωπευτικό). Η συλλογή έγινε κατά την διάρκεια της περιόδου προ της έναρξης της χρήσης του 7δύναμου συζευγμένου εμβολίου του πνευμονιοκόκκου. Η παρούσα προσπάθεια αποτελεί την πρώτη ουσιαστικά πολυκεντρική και συστηματική καταγραφή και χαρτογράφηση των δεδομένων των πνευμονιοκόκκων σε παιδιατρικές λοιμώξεις στην Ελλάδα. Αν και αποσπασματικές προσπάθειες είχαν γίνει στο παρελθόν^{3, 4, 218-220}, για πρώτη φορά μια συστηματική πολυκεντρική καταγραφή επιχειρείται. Έτσι τα παρόντα δεδομένα μπορούν να αποτελέσουν βάση και σημείο αναφοράς για κάθε περαιτέρω μελέτη στην συνέχεια.

Στην παρούσα μελέτη καταγράφονται τα ποσοστά αντοχής, οι ορότυποι των στελεχών που απομονώθηκαν, καθώς και τα αποτελέσματα της διερεύνησης και προσδιορισμού των μοριακών μηχανισμών αντοχής έναντι των κυριότερων αντιμικροβιακών παραγόντων που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων. Για την επίτευξη του σκοπού αυτού έγινε εφαρμογή διαφόρων μοριακών τεχνικών και παραλλαγών τους, με βάση πάντα την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Μέσω των δεδομένων της συλλογής των στελεχών προσδιορίστηκαν τα ποσοστά συχνότητας ή μη, των οροτύπων του μικροβίου, οι φαινότυποι αντοχής προς κάθε αντιμικροβιακό παράγοντα, οι τύποι των φαινοτύπων αυτών και τα επιμέρους ποσοστά τους. Μέσω της παρούσας μελέτης επετεύχθη επίσης, η ανίχνευση των μοριακών μηχανισμών – γονιδίων που εμπλέκονται σε κάθε περίπτωση και η συσχέτισή τους με τους αντίστοιχους φαινοτύπους αντοχής αλλά και σημαντικές συσχετίσεις που αφορούν στην επιδημιολογία της αντοχής, της επικράτησης ή όχι, συγκεκριμένων οροτύπων και ποιών και της επίπτωσης των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων, σε συνάρτηση με την εφαρμογή των διαφόρων ειδών εμβολίων, στην μετά του εμβολιασμού περίοδο.

Ο πληθυσμός της μελέτης αποτελείται από παιδιατρικούς ασθενείς, με την πλειοψηφία των ασθενών να είναι κάτω από την ηλικία των 2 ετών, επιτρέποντας έτσι την εξαγωγή σημαντικών συμπερασμάτων για αυτήν την ηλικιακή ομάδα. Τα απομονωθέντα δείγματα εκπροσωπούν όλο το φάσμα των κλινικών εκδηλώσεων του πνευμονιοκόκκου, εφόσον αφορούν τόσο σε διεισδυτικές και μη διεισδυτικές πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις, όσο και σε φορεία.

4.2 Οροτυπία

Στο σύνολο των στελεχών, ο συχνότερος ορότυπος ήταν ο 19F, ακολουθούμενος από τους οροτύπους 14, 6B και 23F, γεγονός που υποδηλώνει ικανοποιητική κάλυψη από το επταδύναμο συζευγμένο εμβόλιο (75,3%). Η κάλυψη υπήρξε ακόμη μεγαλύτερη σε διεισδυτικές λοιμώξεις και ηλικίες ≤ 2 ετών, παρά σε μεγαλύτερα σε ηλικία παιδιά. Τα συγκεκριμένα δεδομένα συμφωνούν με μελέτες από τις Ηνωμένες Πολιτείες και την Ευρώπη¹⁶⁹⁻¹⁷¹, όπως επίσης και με μια μελέτη παιδιατρικής ρινοφαρυγγικής φορείας και κλινικών ενηλίκων στελεχών από την Ελλάδα⁶² στην περίοδο 2004-2006. Στη συγκεκριμένη μελέτη, εκτιμήθηκε ότι η κάλυψη από το επταδύναμο εμβόλιο ήταν 71,7% για τα στελέχη φορείας, ενώ ήταν μικρότερη (51,3%) για τα κλινικά στελέχη που απομονώθηκαν από ενηλίκους.

Παρατηρήθηκε μια διαφοροποίηση στην κατανομή των οροτύπων μεταξύ των τριών κύριων ομάδων λοιμώξεων (ΣΔΛ, ΣΜΔΛ και ΣΦ). Στην ομάδα ΣΔΛ κυριαρχούσε ο ορότυπος 14 και ακολουθούσαν οι 6B, 9V και 19F, ενώ σπάνια ήταν η ανίχνευση των οροτύπων 1, 3, 4 και 18C, γεγονός που, διέφερε από τους οροτύπους που επικρατούσαν σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες εκείνη τη χρονική στιγμή¹⁶⁹⁻¹⁷². Αντίθετα, στην ομάδα ΣΜΔΛ κυριαρχούσε ο ορότυπος 19F και ακολουθούσαν οι ορότυποι 14, 23F, 6B και 9V. Τέλος, στην ομάδα ΣΦ, κυριαρχούσε ο ορότυπος 6B, ακολουθούμενος από τους οροτύπους 19F, 14, 23F και 9V. Τα στελέχη που απομονώθηκαν από υγιή άτομα παρουσίαζαν μια ομοιόμορφη κατανομή, σε αντίθεση με τα στελέχη που απομονώθηκαν από λοιμώξεις, διεισδυτικές ή μη διεισδυτικές, στα οποία παρατηρήθηκε κάποιος επικρατών ορότυπος. Αυτή η διαφορά στον επιπολασμό των διαφόρων οροτύπων εξηγεί και τις διαφορές που παρατηρήθηκαν στην αντοχή των στελεχών στα διάφορα αντιμικροβιακά, όπως αναλύεται στη συνέχεια.

4.3 Αντοχή στους αντιμικροβιακούς παράγοντες

Τα μεγαλύτερα συνολικά ποσοστά αντοχής των στελεχών πνευμονιοκόκκου της συλλογής στα αντιμικροβιακά, παρατηρήθηκαν στα αντιμικροβιακά πενικιλίνη, ερυθρομυκίνη, κο-τριμοξαζόλη και τετρακυκλίνη.

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, στην Ευρώπη και συγκεκριμένα στις χώρες της Μεσογείου, όπως Ελλάδα, Γαλλία, Ιταλία, Βέλγιο και Ισπανία, εμφανίζονται τα υψηλότερα ποσοστά αντοχής στις μακρολίδες σε στελέχη πνευμονιοκόκκου, ενώ τα ανάλογα ποσοστά, είναι χαμηλότερα σε χώρες της Βόρειας Ευρώπης²²¹, με τα χαμηλότερα να σημειώνονται στην Τσεχία, την Ολλανδία και τη Σουηδία²²¹. Μάλιστα, αυτές οι διαφορές, είναι πιθανόν να σχετίζονται με διαφορές στα ποσοστά κατανάλωσης μακρολιδών αντιβιοτικών (European Surveillance of Antibiotic Consumption), καθώς και με την διασπορά πολυανθεκτικών κλώνων. Στην Βόρειο Αμερική, τα υψηλότερα ποσοστά αντοχής παρουσιάζονται στις Η.Π.Α., ενώ στον Καναδά και το Μεξικό, είναι χαμηλότερα. Υπερβολικά υψηλά ποσοστά αντοχής, δηλαδή από 70% περίπου, έως

και πάνω από 90%, παρουσιάζονται σε ασιατικές χώρες όπως Κίνα, Ιαπωνία και Ταϊβάν²²¹. Έχει βρεθεί σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ύπαρξης αντοχής σε ερυθρομυκίνη και τετρακυκλίνη¹⁴⁶, ενώ είναι συχνό εύρημα η συνύπαρξη αντοχής σε μακρολίδες και β-λακταμικά αντιβιοτικά μεταξύ στελεχών πνευμονιοκόκκου, των συχνότερα απομονούμενων οροτύπων. Αυτά τα πολυανθεκτικά στελέχη ανήκουν σε διεθνείς κλώνους, όπως περιγράφονται από Δίκτυο Μοριακής Επιδημιολογίας Πνευμονιοκόκκου (Pneumococcal Molecular Epidemiology Network)¹⁵⁸.

Ανάμεσα στις τρεις ομάδες της μελέτης, πιο ανθεκτικά ήταν τα στελέχη από τις ομάδες ΣΜΔΛ και ΣΦ σε σύγκριση με την ομάδα ΣΔΛ. Ειδικά στην ομάδα ΣΜΔΛ, αξίζει να σημειωθεί, ότι τα ποσοστά μη-ευαισθησίας σε κοινά αντιμικροβιακά ήταν ιδιαίτερα υψηλά. Η απομόνωση των περισσότερων στελεχών διεισδυτικών λοιμώξεων, ήταν από περιστατικά οξείας μέσης ωτίτιδας την οποία ακολούθησε παρακέντηση τυμπανικού υμένα ή από λοιμώξεις αναπνευστικού με απαραίτητη την εισαγωγή σε νοσοκομείο, γεγονός που πιθανολογεί το να επιλέχθηκαν μερικώς τα στελέχη από μη διεισδυτικές λοιμώξεις, ενώ το τελευταίο με τη σειρά του, μπορεί να εξηγήσει την διαφορετική κατανομή των οροτύπων μεταξύ των στελεχών από διεισδυτικές λοιμώξεις και ρινοφαρυγγική φορεία. Ένα παράδειγμα αποτελούν στελέχη οροτύπου 19F, με πολυανθεκτικότητα, τα οποία κυριαρχούσαν στην ομάδα ΣΜΔΛ, ενώ στην ομάδα ΣΦ το ποσοστό ανίχνευσής τους ήταν πολύ μικρό. Επίσης, όσον αφορά στη φορεία, όπου και εκεί τα ποσοστά αντοχής έναντι αντιμικροβιακών παραγόντων ήταν αρκετά υψηλά, κατέδειξαν, ότι υπήρχε μια διασπορά πολυανθεκτικών στελεχών πνευμονιοκόκκων μέσα στην κοινότητα.

Το φαινόμενο της πολυαντοχής, δηλαδή, ανθεκτικότητα σε τρία ή περισσότερα αντιμικροβιακά φάρμακα, κυριαρχούσε μεταξύ των στελεχών ΣΜΔΛ και ΣΦ, χωρίς να υπάρχουν διαφορές στις ηλικίες των ασθενών, ενώ μεταξύ των στελεχών ΣΔΛ σημειώθηκε σε χαμηλότερα ποσοστά. Τέλος, η μελέτη της πολυαντοχής σε σχέση με τις ηλικιακές ομάδες των ασθενών ανέδειξε ένα αρκετά υψηλό ποσοστό εμφάνισης πολυανθεκτικότητας σε παιδιά έως ή κάτω των 2 ετών.

4.4 Αντοχή στην πενικιλίνη

Τα ποσοστά μη ευαισθησίας στην πενικιλίνη ήταν υψηλότερα μεταξύ των ΣΜΔΛ και ΣΦ, σε σχέση με το αντίστοιχο ποσοστό των ΣΔΛ (17,2%) και μάλιστα, συγκριτικά με αντίστοιχα ποσοστά από άλλες Μεσογειακές χώρες, εκτός της Ιταλίας, ήταν χαμηλότερο¹⁷¹⁻¹⁷⁴. Η υψηλού επιπέδου αντοχή στην πενικιλίνη στα ΣΔΛ ήταν μόνο στο 0,5%, ενώ ήταν αρκετά υψηλότερη στα ΣΜΔΛ και ΣΦ (16,5% και 12,6% αντίστοιχα). Τα ποσοστά ενδιάμεσης αντοχής στην πενικιλίνη σε σχέση με αυτά της πλήρους αντοχής ήταν μεγαλύτερα, 31,8% έναντι 12,9% αντίστοιχα επί του συνόλου των ανθεκτικών στην πενικιλίνη στελεχών και η ενδιάμεσου επιπέδου αντοχή στην πενικιλίνη στα ΣΔΛ ήταν στο 16,6%, ενώ στα ΣΜΔΛ και ΣΦ ήταν και σε αυτή τη περίπτωση, υψηλότερα (36,5% και 30,6% αντίστοιχα). Από τα ανωτέρω συνάγεται το συμπέρασμα ότι η

πενικιλίνη ενδέχεται να έχει περισσότερες πιθανότητες να αποτελέσει επιτυχή θεραπεία σε περιστατικά διεισδυτικών λοιμώξεων.

Επίσης θα πρέπει να σημειωθεί ότι η σποραδική και μόνο εμφάνιση μη ευαίσθητων στην αμοξυκιλλίνη στελεχών στις ομάδες ΣΜΔΛ και ΣΦ με ταυτόχρονη απουσία τους στην ομάδα ΣΔΛ, θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ένδειξη ότι η αμοξυκιλλίνη παραμένει δραστική έναντι των ανθεκτικών στην πενικιλίνη, στελεχών πνευμονιοκόκκου. Όσον αφορά στην κεφοταξίμη, τα ποσοστά μη ευαισθησίας μεταξύ των στελεχών προερχόμενα και από τις τρεις ομάδες ήταν αρκετά χαμηλά.

4.5 Αντοχή στην τετρακυκλίνη

Τα ποσοστά αντοχής στην τετρακυκλίνη, ανέρχονταν σε 34,7% στο σύνολο των στελεχών, αλλά στα στελέχη ΣΜΔΛ και ΣΦ (41,7% και 35% αντίστοιχα) ήταν υψηλότερα σε σχέση με το ποσοστό αντοχής των στελεχών ΣΔΛ (10,2%). Παρόμοια εικόνα, διαπιστώθηκε και σε άλλες κατηγορίες αντιμικροβιακών παραγόντων, όπως η κο-τριμοξαζόλη και η χλωραμφαινικόλη.

4.6 MLS_B αντοχή

Όσον αφορά στην αντοχή MLS_B, τα ποσοστά αντοχής στην ερυθρομυκίνη είναι υψηλότερα σε σχέση με αυτά στην πενικιλίνη και στις τρεις ομάδες στελεχών. Η αύξηση της αντοχής, σε σχέση με παλαιότερες μελέτες, αφορούσε κυρίως τις ΣΜΔΛ, ενώ βρέθηκε και σε συμφωνία με την παγκόσμια αυξητική τάση της αντοχής των πνευμονιοκόκκων στις μακρολίδες^{175,169,171,174,176-177}. Με βάση τα ανωτέρω, η επιλογή της ερυθρομυκίνης είναι επισφαλής σε όλες τις ομάδες στελεχών.

Ο Μ φαινότυπος αντοχής, κυριαρχούσε μεταξύ των στελεχών ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη έναντι των άλλων φαινοτύπων, CR και IR, με το μεγαλύτερο ποσοστό να παρατηρείται στα στελέχη ΣΜΔΛ σε σχέση με τα στελέχη ΣΔΛ και ΣΦ. Αντίθετα, ο φαινότυπος αντοχής CR κυριαρχούσε κυρίως στα στελέχη ΣΦ και κατόπιν στα στελέχη ΣΜΔΛ. Τέλος, ο φαινότυπος IR ανιχνεύθηκε σε πολύ μικρά ποσοστά και στις τρεις κατηγορίες. Η επικράτηση του Μ φαινοτύπου αντοχής που διαπιστώθηκε, ήταν σε συμφωνία με την αυξανόμενη ανεύρεσή του στην Ευρώπη λόγω της διασποράς του ST9 κλώνου του οροτύπου 14¹⁷⁸⁻¹⁷⁹.

Τα ποσοστά αντοχής στην κλινδαμυκίνη είναι χαμηλότερα σε σχέση με την ερυθρομυκίνη, όπου στο σύνολο των στελεχών ανέρχεται στο 12,4%, ενώ τα υψηλότερα σημειώνονται σε στελέχη ΣΦ και ΣΜΔΛ. Επειδή το ποσοστό ανίχνευσης του φαινοτύπου αντοχής IR (επαγωγίμου), είναι αρκετά χαμηλό σε όλες τις κατηγορίες και στο σύνολο των στελεχών, θα μπορούσε να εξετασθεί η χρήση της κλινδαμυκίνης ως εναλλακτική επιλογή σε περιπτώσεις αλλεργίας στις β-λακτάμες.

4.7 Αντοχή ανά ορότυπο

Στην πενικιλίνη, τα υψηλότερα ποσοστά αντοχής αφορούσαν τον ορότυπο 19F, ενώ ακολουθούσαν οι ορότυποι 14, 23F, 6B και 9V. Ομοίως, στην κεφοταξίμη, τα στελέχη του οροτύπου 19F εμφάνισαν την υψηλότερη αντοχή, ενώ ακολουθούσαν οι ορότυποι 19nonF και 11 σε πολύ μικρότερα ποσοστά.

Τα υψηλότερα ποσοστά αντοχής σε ερυθρομυκίνη και τετρακυκλίνη σημειώθηκαν μεταξύ των στελεχών των οροτύπων 19F και 14, στους οποίους επικρατούσε ο M φαινότυπος αντοχής. Σχετικά με τους λοιπούς ορότυπους (6B, 23F, 9V, 19nonF, 6nonB και 3), τα ποσοστά αντοχής ήταν αρκετά χαμηλότερα, με την μεγαλύτερη αντοχή να σημειώνεται μεταξύ των στελεχών οροτύπου 6B, ακολουθούμενος από τον 23F και τον 9V. Ο φαινότυπος αντοχής CR επικρατούσε μεταξύ των στελεχών των οροτύπων 6B, 23F και 3, ο φαινότυπος M κυριαρχούσε μεταξύ των στελεχών των οροτύπων 9V, 19nonF, ενώ στα στελέχη οροτύπου 6nonB, οι φαινότυποι M και CR, ανιχνεύθηκαν στο ίδιο ποσοστό.

Τα στελέχη οροτύπου 19F ήταν συχνότερα πολυανθεκτικά (αντοχή σε τρεις ή περισσότερες ομάδες αντιβιοτικών) σε σχέση με τους λοιπούς ορότυπους.

Η αντίστοιχη κατανομή των οροτύπων των ανθεκτικών στελεχών σε πενικιλίνη, ερυθρομυκίνη και τετρακυκλίνη που παρουσιάζεται στην διεθνή βιβλιογραφία, κατά την προ της έναρξης του εμβολιασμού περίοδο, δεν διαφέρει και τόσο πολύ από της παρούσας μελέτης. Οι ορότυποι που επικρατούν είναι κυρίως οι ορότυποι που συναντούμε στην σύνθεση του 7-δύναμου συζευγμένου εμβολίου, συν κάποιοι ακόμη σε μικρότερο ποσοστό, όπως οι 19A, 7F, 6A, 15A και 1. Η παγκόσμια αυξητική τάση της αντοχής στον πνευμονιόκοκκο έχει συσχετισθεί με τη διασπορά διαφόρων οροτύπων του βακτηρίου (6A, 6B, 9V, 14, 15A, 19F, 19A και 23F), οι αποκαλούμενοι «παιδιατρικοί ορότυποι». Στις Η.Π.Α., επτά ορότυποι (6A, 6B, 9V, 14, 19F, 19A και 23F) ευθύνονταν για το 90% της αντοχής στελεχών πνευμονιοκόκκου στην πενικιλίνη⁴⁵. Μετά την εισαγωγή του 7-δύναμου εμβολίου στις Η.Π.Α., παρατηρήθηκε μια δραματική μείωση της επίπτωσης διεισδυτικών λοιμώξεων σε παιδιά ≤ 5 ετών, η οποία συνδέθηκε με την μείωση της επίπτωσης διεισδυτικών λοιμώξεων από ορότυπους του 7-δύναμου συζευγμένου εμβολίου^{225, 226}, ενώ συγχρόνως, αυξήθηκε η επίπτωσή τους, σε όλες τις ηλικιακές ομάδες²²⁶, από τον ορότυπο 19A που δεν περιλαμβάνεται στο εμβόλιο. Ο ορότυπος 19A είναι πολυανθεκτικός και θεωρείται ότι η αύξηση στα ποσοστά εμφάνισης λοιμώξεων από αυτόν, μπορεί να οφείλεται, εν μέρει, στο φαινόμενο της «ανταλλαγής κάψας» (capsular switching) μεταξύ των στελεχών των οροτύπων του εμβολίου²²⁸. Στις Η.Π.Α. όλοι οι ορότυποι που περιλαμβάνονταν στο 7-δύναμο συζευγμένο εμβόλιο, επικρατούσαν στην προ της εφαρμογής του εμβολίου εποχή, με τον ορότυπο 14 να προεξάρχει και να ακολουθούν ο 6B και ο 19F, καθώς και οι λοιποί σε μικρότερα ποσοστά²²⁹, ενώ στην μετέπειτα εποχή, της εισαγωγής του 7-δύναμου εμβολίου, παρατηρήθηκε μια αλλαγή στους κυρίαρχους ορότυπους με τους 14 και 19F να ελαττώνονται και να αυξάνουν ο 19A και λοιποί μη περιλαμβανόμενοι στο εμβόλιο, ορότυποι. Τα περισσότερα ανθεκτικά στελέχη σε μακρολίδες και

πενικιλίνη, τετρακυκλίνη ανήκαν στους οροτύπους 14 και 19F, αυτά με ανθεκτικότητα ή ενδιάμεση ευαισθησία στην πενικιλίνη και ευαισθησία στις μακρολίδες στους οροτύπους 6B, 23F, 9V, 14 και 19A και τα πολυανθεκτικά στελέχη αποτελούνταν από τους οροτύπους 9V, 6B, 14, 23F και 19A²²⁹. Στην Λατινική Αμερική, τα περισσότερα ανθεκτικά στελέχη στην πενικιλίνη ανήκαν στον ορότυπο 14, ακολουθούμενος από τους 5, 1, 6A/C, 23F, 7F, 9V, 19F, 18C, 19A, 9N και με κάποιες διαφορές στην κατανομή ανάλογα με τη χώρα²³².

Στις Ευρωπαϊκές χώρες, όπως η Ισπανία²²³ η Ιταλία²³³, η Γαλλία²³⁶, η Δανία²³⁷, η Ουγγαρία²³⁸, η Πολωνία²³⁹, η Νορβηγία²⁴⁰, η Φινλανδία⁹³ και άλλες, εμφανίζεται η αντοχή στα αντιβιοτικά να σχετίζεται με τους οροτύπους του 7-δύναμου συζευγμένου εμβολίου πριν την εφαρμογή του, ενώ μετά να παρατηρείται ελάττωση της ανεύρεσης των εν λόγω οροτύπων μεταξύ ανθεκτικών στελεχών πνευμονιοκόκκου και εμφάνιση οροτύπων μη συμπεριλαμβανομένων στο εμβόλιο, όπως ο 19A²²³. Στην Πολωνία ιδιαίτερα, εμφανίζονται και ποσοστά αντοχής στην τετρακυκλίνη, από τα υψηλότερα στην Ευρώπη¹⁸⁷. Στην Γερμανία, όπου τα ποσοστά αντοχής στις μακρολίδες είναι γενικά χαμηλότερα από άλλες χώρες της Νότιας Ευρώπης^{1,230,231}, παρατηρείται μια παρόμοια εικόνα, με τα στελέχη, ιδίως του οροτύπου 14 αλλά και του 19F, να εμφανίζουν τη μεγαλύτερη αντοχή, αυξανόμενη με τα χρόνια²²⁸. Μάλιστα, τα ποσοστά αντοχής μεταξύ στελεχών των οροτύπων του 7-δύναμου, 10-δύναμου και 13-δύναμου εμβολίου ήταν υψηλότερα σε σχέση με αυτά των στελεχών των οροτύπων που δεν περιλαμβάνονται²²⁸. Στην Ιαπωνία, η πλειονότητα των ανθεκτικών στελεχών σε πενικιλίνη και μακρολίδες αποτελούνταν από στελέχη των οροτύπων του 7-δύναμου συζευγμένου εμβολίου και στελέχη με ενδιάμεση ευαισθησία στην πενικιλίνη, οροτύπων 14, 23A, 6A, 6B και 3¹²¹. Στην Σαουδική Αραβία²³⁵, το Κουβέϊτ²³⁵, την Ταϊβάν²²⁴ και την Κίνα²²², η πλειονότητα των ανθεκτικών στελεχών ανήκε σε οροτύπους του 7-δύναμου εμβολίου, όπως και στην Κορέα, μόνο που εδώ υπήρχαν επιπρόσθετα και οι ορότυποι 19A και 11A¹⁵¹, ενώ στην Τουρκία, πέραν των οροτύπων του 7-δύναμου εμβολίου που επικρατούσαν μεταξύ των ανθεκτικών στελεχών σε πενικιλίνη, μακρολίδες και τετρακυκλίνη, ανευρέθησαν και οι ορότυποι 9V, 19A και 23B²³⁴.

4.8 Διερεύνηση μηχανισμών αντοχής

Μέσω της εφαρμογής μοριακών μεθόδων, έγινε δυνατή η διερεύνηση και ο προσδιορισμός των γονιδίων και άρα των μηχανισμών αντοχής που ενεπλάκησαν στην τελική έκφρασή της, φαινοτυπικά.

4.8.1 Μηχανισμοί MLS_B αντοχής γενικά και ανά ορότυπο

Στους κυριότερους οροτύπους (19F και 14), όπου επικρατούσε ο φαινότυπος M, ανιχνεύθηκε στην πλειονότητα των στελεχών το γονίδιο *mef*, που δρα μέσω του μηχανισμού αντλίας εκροής και έτσι επιβεβαιώθηκε και η φαινοτυπική δοκιμασία ανίχνευσης. Παρόμοια εικόνα διαπιστώθηκε και

στα στελέχη με φαινότυπο CR, όπου κυρίως ανιχνεύθηκε το γονίδιο *ermB*, δηλαδή ο μηχανισμός μεθυλίωσης του ριβοσώματος. Η ανίχνευση σε δύο στελέχη δύο γονιδίων (*mef* και *ermB*) με παράλληλη διαπίστωση του CR φαινότυπου αντοχής, έδειξε ότι το *ermB* γονίδιο επικρατεί στην φαινοτυπική έκφραση της αντοχής έναντι του *mef* γονιδίου. Ομοίως και το γονίδιο *ermTR* επικρατεί έναντι του *mef*, όπως φάνηκε στο ένα στέλεχος φαινοτύπου IR όπου ανιχνεύθηκαν και τα δύο γονίδια.

Μεταξύ των λιγότερα συχνών οροτύπων (6B, 23F, 9V, 19nonF, 6nonB και 3), όπου τα περισσότερα στελέχη τους εξέφραζαν φαινοτυπικά την CR-MLS_B αντοχή, ανιχνεύθηκε το γονίδιο *ermB* στην πλειονότητα των στελεχών, ενώ σε ένα στέλεχος οροτύπου 6B με φαινότυπο CR, ανιχνεύθηκε διπλό γονίδιο *mef* και *ermB*. Επίσης μεταξύ των στελεχών με φαινότυπο M των εν λόγω οροτύπων, το γονίδιο *mef* ανιχνεύθηκε στα περισσότερα από αυτά.

Συνολικά, η συσχέτιση φαινοτύπων και γονιδιακής αντοχής MLS_B, έδειξε ότι στα περισσότερα ανθεκτικά στελέχη με φαινότυπο M, CR ή IR επιβεβαιώθηκε η παρουσία των γονιδίων *mef*, *ermB* και *ermTR*, αντίστοιχα, ενώ σε ορισμένα, δεν ανιχνεύθηκε κανένα γονίδιο και αποδόθηκε η ανάπτυξη της αντοχής σε κάποιο άλλο, συνήθως σπάνιο σε συχνότητα, μηχανισμό αντοχής ή σε ανεπάρκεια του πρωτοκόλλου που χρησιμοποιήθηκε να ανιχνεύσει την αντοχή, όπως έχει περιγραφεί συχνά και στην βιβλιογραφία.

Συμπερασματικά, στην Ελλάδα, τα στελέχη *S. pneumoniae* που απομονώθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη, προ της ενάρξης του εμβολιασμού, παρουσίασαν την αντοχή στην ερυθρομυκίνη να επικρατεί σε συγκεκριμένους οροτύπους και συγκεκριμένα, να αποδίδεται στον μηχανισμό αντλίας εκροής (*mef* γονίδιο) στα στελέχη των οροτύπων 19F και 14 και στον μηχανισμό μεθυλίωσης του ριβοσώματος (*ermB* γονίδιο) στα στελέχη των οροτύπων 6B και 23F. Βέβαια, είναι σημαντικό να τονισθεί ότι η πιθανή αλλαγή των επικρατούντων οροτύπων μετά την εφαρμογή του εμβολίου μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγή των αντίστοιχων μηχανισμών αντοχής. Συγκριτικά, οι επικρατέστεροι μηχανισμοί MLS_B αντοχής σε στελέχη *S. pneumoniae*, στην Ευρώπη, τις Ηνωμένες Πολιτείες, τον Καναδά, την Ιαπωνία και το Χόνγκ Κόνγκ εμφανίζονται στην Εικόνα 8 στο Γενικό Μέρος της διατριβής.

Η διερεύνηση του υποτύπου του γονιδίου *mef* (*mefA/E*) με την τεχνική της PCR-RFLP έδειξε ότι σε όλους τους ορότυπους, εκτός του 14, επικρατούσε ο υπότυπος *mefE*, ο οποίος ανιχνεύθηκε στο μεγαλύτερο ποσοστό των στελεχών με *mef*-θετικό γονίδιο, ενώ ο υπότυπος *mefA* υπερείχε μεταξύ των στελεχών του οροτύπου 14. Οι διεθνείς αναφορές δείχνονται σχετικά με αυτό το θέμα. Σε κάποιες μελέτες στη βιβλιογραφία, παρουσιάζεται ο υπότυπος *mefA*, να επικρατεί, όπως για παράδειγμα στην Γερμανία¹⁸⁰, στη Ρωσία¹⁸¹, στη Νορβηγία¹⁸², στην Ιταλία³⁵, αλλά και να υπάρχει μια συσχέτιση μεταξύ του υποτύπου *mefA* και του οροτύπου 14¹⁸³. Σε μελέτες από άλλες χώρες, εκτός Ευρώπης, όπως η Αργεντινή, τα ποσοστά ανεύρεσης των εν λόγω υποτύπων, είναι παραπλήσια¹⁸⁴, ενώ σε άλλη μελέτη που είχε διεξαχθεί στην Ελλάδα¹⁸⁵, πριν την έναρξη του εμβολιασμού, αλλά και στην Ισπανία, φάνηκε η επικράτηση του υποτύπου *mefE*¹⁸⁶. Φαίνεται ότι η

τοπική διασπορά και οι επιδημιολογικές ιδιαιτερότητες παίζουν σημαντικό ρόλο στην επικράτηση ενός εκ των δύο υποτύπων.

4.8.2 Μηχανισμοί ανοχής στην τετρακυκλίνη γενικά και ανά ορότυπο

Στην πλειονότητα των ανθεκτικών στην τετρακυκλίνη στελεχών ανιχνεύθηκε το γονίδιο *tetM* (μηχανισμός προστασίας του ριβοσώματος). Σε ένα μικρό ποσοστό των στελεχών που εξετάστηκαν, δεν ανιχνεύθηκε κανένα γονίδιο και επομένως, η ανοχή στην τετρακυκλίνη αποδόθηκε σε κάποιο άλλο, σπανιότερο μηχανισμό, ενώ σε ένα μικρό αριθμό στελεχών, των πιο συχνών οροτύπων, ανευρέθη η παρουσία διπλού γονιδίου *tetM* και *tetO*.

Συμπερασματικά, στην Ελλάδα, η ανοχή στη τετρακυκλίνη επίσης επικρατεί σε συγκεκριμένους οροτύπους και αποδίδεται σε μηχανισμό προστασίας του ριβοσώματος (*tetM* γονίδιο). Το γεγονός αυτό, της επικράτησης του γονιδίου *tetM*, έναντι του *tetO*, καθώς και της παρουσίας των δύο αυτών γονιδίων μαζί, είναι εμφανές μέσα από μελέτες και σε άλλες χώρες, ειδικά στην Πολωνία^{187,188}, στην Ιταλία^{189,190} και σε άλλη μελέτη που διεξήχθη στην Ελλάδα¹⁹¹. Επίσης, σε μία μελέτη από τις Η.Π.Α.¹⁹², φαίνεται όχι μόνο η επικράτηση του γονιδίου *tetM* για την ανοχή στην τετρακυκλίνη, αλλά και το μικρό ποσοστό ανεύρεσης της παρουσίας διπλού γονιδίου *tetM* – *tetO* και του ακόμη μικρότερου ποσοστού ανεύρεσης *tetO*. Τέλος, από έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί στην Ισπανία^{193,194}, διαφαίνεται όχι μόνο η κυριαρχία του γονιδίου *tetM*, αλλά και η δυνατή συσχέτισή του γενετικά, με το γονίδιο *ermB*, το οποίο είναι υπεύθυνο για την εμφάνιση της ιδιοσυστασιακής MLS_B ανοχής (φαινότυπος CR), όπως και στην παρούσα μελέτη.

4.8.3 Μηχανισμοί ανοχής στις β-λακτάμες γενικά και ανά ορότυπο

Όσον αφορά στις β-λακτάμες, η διερεύνηση της γονιδιακής ανοχής μέσω μοριακών μεθόδων, έγινε δυνατή μετά από κατηγοριοποίηση των στελεχών ανάλογα με τις τιμές της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (ΕΑΠ) της πενικιλίνης και κεφοταξίμης (ομάδα Α με τιμή ΕΑΠ > 2 για την πενικιλίνη και ≥ 2 για την κεφοταξίμη και ομάδα Β με τιμή ΕΑΠ > 2 για την πενικιλίνη και ≤ 1 για την κεφοταξίμη).

Με βάση την αλληλουχία της PBP1A ανιχνεύονται τρεις κύριοι κλώνοι που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένους συνδυασμούς οροτύπων/φαινοτύπων. Συγκεκριμένα διακρίνονται, ο κλώνος No 1 με στελέχη οροτύπου 19F ομάδος Α ανθεκτικά και στις δύο β-λακτάμες και ένα στέλεχος 6B ομάδος Β που κατηγοριοποιούνται μαζί και ξεχωρίζουν από τα στελέχη των άλλων δύο κλώνων, τα οποία ανήκουν μόνο στην ομάδα Β, δηλαδή παρουσιάζουν ανοχή μόνο στην πενικιλίνη και όχι στην κεφοταξίμη, ο κλώνος No 2 με στελέχη οροτύπου 14 ομάδος Β και ο κλώνος No 3 με στελέχη οροτύπων 19F και 23F της ομάδος Β.

Με βάση την νουκλεοτιδική αλληλουχία της PBP2B, οι ομαδοποιήσεις που προέκυψαν αποτελούνται από μεικτούς πληθυσμούς. Μία συσχέτιση που ξεχώρισε, ήταν σε στελέχη οροτύπου 19F ανθεκτικών και στις δύο β-λακτάμες, δηλαδή ομάδος Α, τα οποία κατηγοριοποιήθηκαν σε 2

κλώνους μαζί με το στέλεχος 6B ομάδος B που αναφέρθηκε παραπάνω. Οι υπόλοιπες ομάδες που προέκυψαν ήταν, μία με στελέχη οροτύπων 19F και 23F ομάδος B, μία με στελέχη οροτύπου 14 ομάδος B και μία τελευταία με στελέχη διαφόρων οροτύπων, όπως 14, 19F, 9V ομάδος B και με μόνο ένα στέλεχος οροτύπου 11 να κατηγοριοποιείται μαζί και να ανήκει στην ομάδα A.

Τέλος, με βάση την νουκλεοτιδική αλληλουχία της PBP2X, αποδόθηκαν δύο διακριτοί κλώνοι με βάση τον φαινότυπο αντοχής, δηλαδή την ΕΑΠ στις δύο β-λακτάμες, ένας με στελέχη οροτύπου 19F ομάδος A (εκτός από ένα στέλεχος που ανήκε στην ομάδα B) και το στέλεχος οροτύπου 6B που αναφέρθηκε παραπάνω και ένας κλώνος με στελέχη διαφόρων οροτύπων, κυρίως 19F, 23F και λιγότερα οροτύπου 11 που ανήκαν στην ομάδα B.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα δενδρογράμματα των τριών PBPs, φαίνεται καθαρά ότι μια ομάδα στελεχών οροτύπου 19F ανθεκτικών στις δύο β-λακτάμες (αλλά και σε άλλα αντιβιοτικά), της ομάδος A και ένα στέλεχος οροτύπου 6B ομάδος B παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα στην νουκλεοτιδική αλληλουχία και των τριών PBPs και κατηγοριοποιούνται μαζί και στις τρεις περιπτώσεις, υποδεικνύοντας έτσι πιθανή κοινή καταγωγή των γονιδίων. Αντίθετα, η ομαδοποίηση των υπολοίπων στελεχών της ομάδος B, δηλαδή με αντοχή στην πενικιλίνη και ευαισθησία στην κεφοταξίμη δεν είναι ίδια στις τρεις PBPs.

Κάποια συμπεράσματα που μπορούν να εξαχθούν από την παρούσα μελέτη, όσον αφορά στην αντοχή στις δύο β-λακτάμες, είναι ότι η μικροβιακή αντοχή στην κεφοταξίμη φαίνεται να συσχετίζεται κυρίως με αλλαγές της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στην PBP2X και στην PBP1A, και λιγότερο με αλλαγές της αλληλουχίας της PBP2B. Η αντοχή στην πενικιλίνη φαίνεται να συσχετίζεται με αλλαγές σε όλες τις υπό μελέτη PBPs. Η μελέτη της μικροβιακής αντοχής στην πενικιλίνη και την κεφοταξίμη, που προέκυψαν μέσα από την παρούσα διατριβή, επιβεβαιώνεται από τις σχετικές μελέτες που ανευρίσκονται στην διεθνή βιβλιογραφία^{105-106,199-202,206}, ενώ ο ρόλος που διαδραματίζει η κάθε μία από τις κύριες PBPs που εμπλέκονται στη διαμόρφωσή της, μπορεί να είναι διαφορετικός. Συγκεκριμένα, μεταλλάξεις που αφορούν στην PBP2X και στην PBP1A σχετίζονται με υψηλού επιπέδου αντοχή στην πενικιλίνη¹⁹⁵⁻¹⁹⁷, όπως και στην κεφοταξίμη¹⁹⁶⁻¹⁹⁸, μάλιστα επιπρόσθετες διαφοροποιήσεις στην PBP1A, μπορούν να αυξήσουν την MIC της πενικιλίνης σε επίπεδα ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ και της κεφοταξίμης σε επίπεδα ≥ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ^{105,203}. Πειράματα μεταμόρφωσης στο εργαστήριο, έδειξαν ότι η υψηλού επιπέδου αντοχή στην πενικιλίνη επιτυγχάνεται με αλλαγές στις PBP1A, ή/και 2X,^{203,212} ενώ η χαμηλού επιπέδου αντοχή στην πενικιλίνη, μπορεί να προκληθεί από αλλαγές στις PBP2B και 2X^{205,206,212,213}. Επίσης, η υψηλού επιπέδου αντοχή στις β-λακτάμες γενικά, φαίνεται να σχετίζεται με την παρουσία μεγάλου αριθμού μεταλλάξεων στα αμινοξέα των συντηρημένων περιοχών των αμινοξέων («συντηρημένα μοτίβα»), της κάθε μίας από τις κύριες PBPs, αλλά και στην ανίχνευση μεταλλάξεων σε περισσότερες της μίας από αυτές¹²⁶. Όσον αφορά στην ενδιάμεση αντοχή στη πενικιλίνη, φαίνεται να υπάρχει μεγάλη συσχέτιση με μεταλλάξεις που συμβαίνουν μόνο σε μία ή και δύο από τις κύριες PBPs²⁰⁴.

Η συσχέτιση μεταξύ της ανάπτυξης χαμηλού επιπέδου αντοχής στις κεφαλοσπορίνες και μεταλλάξεων στην PBP2X, διαφαίνεται από πολλές μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία^{105,198,205,206}, όπως επίσης και η ισχυρή σχέση μεταξύ της αντοχής σε κεφαλοσπορίνες, όπως η κεφοταξίμη και η κεφουροξίμη και μεταλλάξεων στην PBP2X²¹⁰⁻²¹² και στην PBP1A^{211,212}, ενώ το επίπεδο ευαισθησίας άλλων κεφαλοσπορινών, όπως της κεφακλόρης και της κεφπροξίλης, καθώς και της πενικιλίνης, προσδιορίζεται μέσα από μεταλλάξεις στις κύριες PBPs, 1A, 2X και 2B^{211,212}, όπως έχει ήδη αναφερθεί και παραπάνω.

Στο επίπεδο της μοριακής δομής των πενικιλινο-δεσμευτικών πρωτεϊνών, φαίνεται πως οι μονήρεις αντικαταστάσεις αμινοξέων μέσα ή κοντά στις συντηρημένες περιοχές STMK της PBP2X και SSN της PBP2B, αποτελούν τις κυρίαρχες μορφές αλλαγών που καθορίζουν τα στελέχη πνευμονιοκόκκων με ενδιάμεση αντοχή στην πενικιλίνη. Μία αντικατάσταση αμινοξέως στην περιοχή STMK της PBP1A, επιπρόσθετα, σε αυτές τις μεταλλάξεις, φαίνεται να συνδέεται με την εμφάνιση στελεχών πνευμονιοκόκκων με πλήρη αντοχή στην πενικιλίνη. Ένα σημαντικό εύρημα, ήταν ότι μια δεύτερη αντικατάσταση στην περιοχή STMK της PBP2X, συσχετίστηκε με τα περισσότερα ανθεκτικά στελέχη και με στελέχη όπου η MIC στις αμινοπενικιλίνες ήταν μεγαλύτερη της πενικιλίνης²¹⁰.

Η απόκτηση και η διασπορά της αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά στελεχών πνευμονιοκόκκων, είναι μια αρκετά πολύπλοκη διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει κλωνική διασπορά, οριζόντια μεταφορά γενετικού υλικού (DNA), αλλά και σημειακές μεταλλάξεις.

Βιβλιογραφία

1. Adam D. Global antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 2002 Jul;50 Suppl:1-5.
2. Baquero F, Baquero-Artigao G, Canton R, Garcia-Rey C. Antibiotic consumption and resistance selection in *Streptococcus pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 2002 Dec;50 Suppl S2:27-37.
3. Syrogiannopoulos GA, Grivea IN, Katopodis GD, Geslin P, Jacobs MR, Beratis NG. Carriage of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Greek infants and toddlers. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000 Apr;19(4):288-93.
4. Zissis NP, Syriopoulou V, Kafetzis D, Daikos GL, Tsilimingaki A, Galanakis E, et al. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive infections and acute otitis media in children. Eur J Pediatr 2004 Jul;163(7):364-8.
5. Appelbaum PC. Resistance among *Streptococcus pneumoniae*: Implications for drug selection. Clin Infect Dis 2002 Jun 15;34(12):1613-20.
6. Cunha BA. Penicillin resistance in pneumococcal pneumonia. Antibiotics with low resistance potential are effective and pose less risk. Postgrad Med 2003 Jan;113(1):42-4, 7-8, 52-4.
7. Jacobs MR. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology and patterns of resistance. Am J Med 2004 Aug 2;117 Suppl 3A:3S-15S.
8. Lynch JJ, Martinez FJ. Clinical relevance of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* for community-acquired pneumonia. Clin Infect Dis 2002 Mar 1;34 Suppl 1:S27-46.
9. Nuermberger E, Bishai WR. The clinical significance of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae*: it's all relative. Clin Infect Dis 2004 Jan 1;38(1):99-103.
10. Klugman KP. The successful clone: the vector of dissemination of resistance in *Streptococcus pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 2002 Dec;50 Suppl S2:1-5.
11. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 21st Informational Supplement. CLSI Document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
12. Tuomanen EI. The Pneumococcus: ASM Press, 2004.
13. Avery OT, Macleod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus type III. Oswald Theodore Avery (1877-1955). Clin Orthop Relat Res 2000 Oct(379 Suppl):S3-8.
14. Mc CM, Avery OT. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types; effect of desoxyribonuclease on the biological activity of the transforming substance. J Exp Med 1946 Feb;83:89-96.

15. McCarty M, Avery OT. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Iii. An Improved Method for the Isolation of the Transforming Substance and Its Application to Pneumococcus Types Ii, Iii, and Vi. *J Exp Med* 1946 Jan 31;83(2):97-104.
16. Martin P, Trieu-Cuot P, Courvalin P. Nucleotide sequence of the tetM tetracycline resistance determinant of the streptococcal conjugative shuttle transposon Tn1545. *Nucleic Acids Res* 1986 Sep 11;14(17):7047-58.
17. Montanari MP, Cochetti I, Mingoia M, Varaldo PE. Phenotypic and molecular characterization of tetracycline- and erythromycin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003 Jul;47(7):2236-41.
18. Dowson CG, Hutchison A, Spratt BG. Extensive re-modelling of the transpeptidase domain of penicillin-binding protein 2B of a penicillin-resistant South African isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 1989 Jan;3(1):95-102.
19. Chi F, Nolte O, Bergmann C, Ip M, Hakenbeck R. Crossing the barrier: evolution and spread of a major class of mosaic pbp2x in *Streptococcus pneumoniae*, *S. mitis* and *S. oralis*. *Int J Med Microbiol* 2007 Nov;297(7-8):503-12.
20. Johnsborg O, Eldholm V, Bjornstad ML, Havarstein LS. A predatory mechanism dramatically increases the efficiency of lateral gene transfer in *Streptococcus pneumoniae* and related commensal species. *Mol Microbiol* 2008 Jul;69(1):245-53.
21. Hakenbeck R, Konig A, Kern I, van der Linden M, Keck W, Billot-Klein D, et al. Acquisition of five high-Mr penicillin-binding protein variants during transfer of high-level beta-lactam resistance from *Streptococcus mitis* to *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 1998 Apr;180(7):1831-40.
22. Potgieter E, Chalkley LJ. Relatedness among penicillin-binding protein 2b genes of *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist* 1995 Spring;1(1):35-42.
23. Sibold C, Henrichsen J, Konig A, Martin C, Chalkley L, Hakenbeck R. Mosaic pbpX genes of major clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* have evolved from pbpX genes of a penicillin-sensitive *Streptococcus oralis*. *Mol Microbiol* 1994 Jun;12(6):1013-23.
24. Dowson CG, Coffey TJ, Kell C, Whiley RA. Evolution of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*; the role of *Streptococcus mitis* in the formation of a low affinity PBP2B in *S. pneumoniae*. *Mol Microbiol* 1993 Aug;9(3):635-43.
25. Dowson CG, Hutchison A, Brannigan JA, George RC, Hansman D, Linares J, et al. Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 Nov;86(22):8842-6.
26. Ubukata K, Chiba N, Hasegawa K, Kobayashi R, Iwata S, Sunakawa K. Antibiotic susceptibility in relation to penicillin-binding protein genes and serotype distribution of

- Streptococcus pneumoniae* strains responsible for meningitis in Japan, 1999 to 2002. Antimicrob Agents Chemother 2004 May;48(5):1488-94.
27. Chesnel L, Carapito R, Croize J, Dideberg O, Vernet T, Zapun A. Identical penicillin-binding domains in penicillin-binding proteins of *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates with different levels of beta-lactam resistance. Antimicrob Agents Chemother 2005 Jul;49(7):2895-902.
 28. Tian SF, Chu YZ, Chen BY. Molecular characteristics of penicillin-binding protein 2b, 2x, and 1a sequences in penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates in Shenyang, China. Can J Microbiol 2008 Jun;54(6):489-94.
 29. Smith AM, Klugman KP. Amino acid mutations essential to production of an altered PBP 2X conferring high-level beta-lactam resistance in a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2005 Nov;49(11):4622-7.
 30. Chiu CH, Su LH, Huang YC, Lai JC, Chen HL, Wu TL, et al. Increasing ceftriaxone resistance and multiple alterations of penicillin-binding proteins among penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Taiwan. Antimicrob Agents Chemother 2007 Sep;51(9):3404-6.
 31. Hotomi M, Billal DS, Shimada J, Suzumoto M, Yamauchi K, Fujihara K, et al. High prevalence of *Streptococcus pneumoniae* with mutations in pbp1a, pbp2x, and pbp2b genes of penicillin-binding proteins in the nasopharynx in children in Japan. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec 2006;68(3):139-45.
 32. Maurer P, Koch B, Zerfass I, Krauss J, van der Linden M, Frere JM, et al. Penicillin-binding protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*: three new mutational pathways for remodelling an essential enzyme into a resistance determinant. J Mol Biol 2008 Mar 7;376(5):1403-16.
 33. Kim SH, Song JH, Chung DR, Thamlikitkul V, Yang Y, Wang H, et al. Changing trends in antimicrobial resistance and serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates in Asian countries: an Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) study. Antimicrob Agents Chemother 2012 Mar;56(3):1418-26.
 34. www.earss.rivm.nl.
 35. Montanari MP, Mingoia M, Cochetti I, Varaldo PE. Phenotypes and genotypes of erythromycin-resistant pneumococci in Italy. J Clin Microbiol 2003 Jan;41(1):428-31.
 36. Seppala H, Skurnik M, Soini H, Roberts MC, Huovinen P. A novel erythromycin resistance methylase gene (ermTR) in *Streptococcus pyogenes*. Antimicrob Agents Chemother 1998 Feb;42(2):257-62.
 37. Roberts MC, Pang Y, Riley DE, Hillier SL, Berger RC, Krieger JN. Detection of Tet M and Tet O tetracycline resistance genes by polymerase chain reaction. Mol Cell Probes 1993 Oct;7(5):387-93.

38. Olsvik B, Olsen I, Tenover FC. Detection of tet(M) and tet(O) using the polymerase chain reaction in bacteria isolated from patients with periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 1995 Apr;10(2):87-92.
39. Kislak JW, Razavi LM, Daly AK, Finland M. Susceptibility of pneumococci to nine antibiotics. *Am J Med Sci* 1965 Sep;250(3):261-8.
40. McDougal LK, Rasheed JK, Biddle JW, Tenover FC. Identification of multiple clones of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 1995 Oct;39(10):2282-8.
41. Jacobs MR, Koornhof HJ, Robins-Browne RM, Stevenson CM, Vermaak ZA, Freiman I, et al. Emergence of multiply resistant pneumococci. *N Engl J Med* 1978 Oct 5;299(14):735-40.
42. Appelbaum PC, Bhamjee A, Scragg JN, Hallett AF, Bowen AJ, Cooper RC. *Streptococcus pneumoniae* resistant to penicillin and chloramphenicol. *Lancet* 1977 Nov 12;2(8046):995-7.
43. Hansman D, Glasgow H, Sturt J, Devitt L, Douglas R. Increased resistance to penicillin of pneumococci isolated from man. *N Engl J Med* 1971 Jan 28;284(4):175-7.
44. Jenkins SG, Brown SD, Farrell DJ. Trends in antibacterial resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolated in the USA: update from PROTEKT US Years 1-4. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2008;7:1.
45. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Lexau C, Reingold A, et al. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *N Engl J Med* 2000 Dec 28;343(26):1917-24.
46. Perez-Trallero E, Martin-Herrero JE, Mazon A, Garcia-Delafuente C, Robles P, Iriarte V, et al. Antimicrobial resistance among respiratory pathogens in Spain: latest data and changes over 11 years (1996-1997 to 2006-2007). *Antimicrob Agents Chemother* 2010 Jul;54(7):2953-9.
47. Cohen R, Bingen E, Levy C, Benani M, Thollot F, Klink Z, et al. Antibiotic resistance of pneumococci and *H. influenzae* isolated from the nasopharyngeal flora of children with acute otitis media between 2006 and 2010. *Arch Pediatr* 2011 Aug;18(8):926-31.
48. Nilsson P, Laurell MH. A 10-year follow-up study of penicillin-non-susceptible *S. pneumoniae* during an intervention programme in Malmo, Sweden. *Scand J Infect Dis* 2006;38(10):838-44.
49. Imohl M, Reinert RR, van der Linden M. Serotype-specific penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Germany from 1992 to 2008. *Int J Med Microbiol* 2010 Jun;300(5):324-30.
50. Gherardi G, Fallico L, Del Grosso M, Bonanni F, D'Ambrosio F, Manganelli R, et al. Antibiotic-resistant invasive pneumococcal clones in Italy. *J Clin Microbiol* 2007 Feb;45(2):306-12.

51. Kojima F, Nakagami Y, Takemori K, Iwatani Y, Fujimoto S. Penicillin susceptibility of non-serotypeable *Streptococcus pneumoniae* from ophthalmic specimens. *Microb Drug Resist* 2006 Fall;12(3):199-202.
52. Lynch JP, 3rd, Zhanel GG. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology and risk factors, evolution of antimicrobial resistance, and impact of vaccines. *Curr Opin Pulm Med* 2010 May;16(3):217-25.
53. Matsumoto A, Hosoya M, Kawasaki Y, Katayose M, Kato K, Suzuki H. The emergence of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* and host risk factors for carriage of drug-resistant genes in northeastern Japan. *Jpn J Infect Dis* 2007 Feb;60(1):10-3.
54. Jacobs MR, Felmingham D, Appelbaum PC, Gruneberg RN. The Alexander Project 1998-2000: susceptibility of pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infection to commonly used antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother* 2003 Aug;52(2):229-46.
55. File TM, Jr., Tan JS. International guidelines for the treatment of community-acquired pneumonia in adults: the role of macrolides. *Drugs* 2003;63(2):181-205.
56. Farrell DJ, Jenkins SG, Brown SD, Patel M, Lavin BS, Klugman KP. Emergence and spread of *Streptococcus pneumoniae* with erm(B) and mef(A) resistance. *Emerg Infect Dis* 2005 Jun;11(6):851-8.
57. Thornsberry C, Brown NP, Draghi DC, Evangelista AT, Yee YC, Sahm DF. Antimicrobial activity among multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolated in the United States, 2001-2005. *Postgrad Med* 2008 Sep;120(3 Suppl 1):32-8.
58. Johnson DM, Stilwell MG, Fritsche TR, Jones RN. Emergence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1999-2003). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006 Sep;56(1):69-74.
59. Lynch JP, 3rd, Zhanel GG. *Streptococcus pneumoniae*: does antimicrobial resistance matter? *Semin Respir Crit Care Med* 2009 Apr;30(2):210-38.
60. Song JH, Jung SI, Ko KS, Kim NY, Son JS, Chang HH, et al. High prevalence of antimicrobial resistance among clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates in Asia (an ANSORP study). *Antimicrob Agents Chemother* 2004 Jun;48(6):2101-7.
61. Brandileone MC, Casagrande ST, Guerra ML, Zanella RC, Andrade AL, Di Fabio JL. Increase in numbers of beta-lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage. *J Med Microbiol* 2006 May;55(Pt 5):567-74.
62. Poulakou G, Katsarolis I, Matthaiopoulou I, Tsiodras S, Kanavaki S, Hatzaki D, et al. Nationwide surveillance of *Streptococcus pneumoniae* in Greece: patterns of resistance and serotype epidemiology. *Int J Antimicrob Agents* 2007 Jul;30(1):87-92.

63. Paraskakis I, Kafetzis DA, Chrisakis A, Papavasiliou H, Kirikou H, Pangalis A, et al. Serotypes and antimicrobial susceptibilities of 1033 pneumococci isolated from children in Greece during 2001-2004. Clin Microbiol Infect 2006 May;12(5):490-3.
64. Greenwood Dea. Medical Microbiology: A Guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Diagnosis and Control. : Churchill Livingstone; 17 edition (6 Jun 2007).
65. Hirst RA, Kadioglu A, O'Callaghan C, Andrew PW. The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. Clin Exp Immunol 2004 Nov;138(2):195-201.
66. Garcia-Suarez Mdel M, Cima-Cabal MD, Florez N, Garcia P, Cernuda-Cernuda R, Astudillo A, et al. Protection against pneumococcal pneumonia in mice by monoclonal antibodies to pneumolysin. Infect Immun 2004 Aug;72(8):4534-40.
67. Briles DE, Hollingshead SK, Paton JC, Ades EW, Novak L, van Ginkel FW, et al. Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*. J Infect Dis 2003 Aug 1;188(3):339-48.
68. Hirst RA, Gosai B, Rutman A, Guerin CJ, Nicotera P, Andrew PW, et al. *Streptococcus pneumoniae* deficient in pneumolysin or autolysin has reduced virulence in meningitis. J Infect Dis 2008 Mar 1;197(5):744-51.
69. Gray BM, Dillon HC, Jr. Epidemiological studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: antibody to types 3, 6, 14, and 23 in the first two years of life. J Infect Dis 1988 Nov;158(5):948-55
70. Ενημερωτικό δελτίο ΚΕΕΛΠΝΟ Φεβρουάριος 2012 Ap 12.
71. Faden H, Duffy L, Wasielewski R, Wolf J, Krystofik D, Tung Y. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. Tonawanda/Williamsville Pediatrics. J Infect Dis 1997 Jun;175(6):1440-5.
72. Noah ND. Vaccination against pneumococcal infection. BMJ 1988 Nov 26;297(6660):1351-2.
73. Belgian consensus on pneumococcal vaccine. Working Party on Pneumococcal Vaccine. Acta Clin Belg 1996;51(5):350-6.
74. Sutton PD. Births, marriages, divorces, and deaths: Provisional data for January 2003. National vital statistics reports; vol 52 no 1. Hyattsville, Maryland: National Center for Health Statistics. 2003.
75. Centers for Disease Control and Prevention (CDC); Advisory Committee on Immunization Practices. Updated recommendations for prevention of invasive pneumococcal disease among adults using the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23). MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2010 Sep 3;59(34):1102-6.

76. O'Brien KL, Millar EV, Zell ER, Bronsdon M, Weatherholtz R, Reid R, et al. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal colonization among immunized and unimmunized children in a community-randomized trial. *J Infect Dis* 2007 Oct 15;196(8):1211-20.
77. Millar EV, Watt JP, Bronsdon MA, Dallas J, Reid R, Santosham M, et al. Indirect effect of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal colonization among unvaccinated household members. *Clin Infect Dis* 2008 Oct 15;47(8):989-96.
78. Davies TA, Yee YC, Bush K, Sahm D, Evangelista A, Goldschmidt R. Effects of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on U.S. levofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist* 2008 Sep;14(3):187-96.
79. Barricarte A, Castilla J, Gil-Setas A, Torroba L, Navarro-Alonso JA, Irisarri F, et al. Effectiveness of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine: a population-based case-control study. *Clin Infect Dis* 2007 Jun 1;44(11):1436-41.
80. Hsu K LA, Stevenson A, Pelton E. Early evidence of 13 valent pneumococcal conjugate vaccine impact on carriage of vaccine serotypes. Infectious Diseases Society of America annual meeting. Boston, October 20-23, 2011.
81. Yildirim I HK, Stevenson A, Pelton S. Invasive pneumococcal disease in Massachusetts children following introduction of PCV13. Infectious Diseases Society of America annual meeting. Boston, October 20-23, 2011.
82. Bruce M WJ, Zulz T et al. Invasive pneumococcal disease in Alaska: impact of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. Infectious Diseases Society of America annual meeting. Boston, October 20-23, 2011.
83. Reinert R, Jacobs MR, Kaplan SL. Pneumococcal disease caused by serotype 19A: review of the literature and implications for future vaccine development. *Vaccine* 2010 Jun 11;28(26):4249-59.
84. Kaplan SL, Barson WJ, Lin PL, Stovall SH, Bradley JS, Tan TQ, et al. Serotype 19A Is the most common serotype causing invasive pneumococcal infections in children. *Pediatrics* 2010 Mar;125(3):429-36.
85. Kaplan SL, Mason EO, Jr., Wald ER, Schutze GE, Bradley JS, Tan TQ, et al. Decrease of invasive pneumococcal infections in children among 8 children's hospitals in the United States after the introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics* 2004 Mar;113(3 Pt 1):443-9.
86. van Gils EJ, Veenhoven RH, Hak E, Rodenburg GD, Keijzers WC, Bogaert D, et al. Pneumococcal conjugate vaccination and nasopharyngeal acquisition of pneumococcal serotype 19A strains. *JAMA* 2010 Sep 8;304(10):1099-106.
87. van Gils EJ, Veenhoven RH, Hak E, Rodenburg GD, Bogaert D, Ijzerman EP, et al. Effect of reduced-dose schedules with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal

- pneumococcal carriage in children: a randomized controlled trial. JAMA 2009 Jul 8;302(2):159-67.
88. Pelton SI, Loughlin AM, Marchant CD. Seven valent pneumococcal conjugate vaccine immunization in two Boston communities: changes in serotypes and antimicrobial susceptibility among *Streptococcus pneumoniae* isolates. Pediatr Infect Dis J 2004 Nov;23(11):1015-22.
 89. Hicks LA, Chien YW, Taylor TH, Jr., Haber M, Klugman KP. Outpatient antibiotic prescribing and nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 1996-2003. Clin Infect Dis 2011 Oct;53(7):631-9.
 90. Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, Riahi F, Beekmann SE, Doern GV. Changing epidemiology of antimicrobial-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 2004-2005. Clin Infect Dis 2009 Feb 1;48(3):e23-33.
 91. Tyrrell GJ, Lovgren M, Chui N, Minion J, Garg S, Kellner JD, et al. Serotypes and antimicrobial susceptibilities of invasive *Streptococcus pneumoniae* pre- and post-seven valent pneumococcal conjugate vaccine introduction in Alberta, Canada, 2000-2006. Vaccine 2009 Jun 2;27(27):3553-60.
 92. Vila-Corcoles A, Bejarano-Romero F, Salsench E, Ochoa-Gondar O, de Diego C, Gomez-Bertomeu F, et al. Drug-resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolates among Spanish middle aged and older adults with community-acquired pneumonia. BMC Infect Dis 2009;9:36.
 93. Siira L, Rantala M, Jalava J, Hakanen AJ, Huovinen P, Kaijalainen T, et al. Temporal trends of antimicrobial resistance and clonality of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in Finland, 2002 to 2006. Antimicrob Agents Chemother 2009 May;53(5):2066-73.
 94. Werno AM, Murdoch DR. Medical microbiology: laboratory diagnosis of invasive pneumococcal disease. Clin Infect Dis 2008 Mar 15;46(6):926-32.
 95. Ubukata K, Asahi Y, Yamane A, Konno M. Combinational detection of autolysin and penicillin-binding protein 2B genes of *Streptococcus pneumoniae* by PCR. J Clin Microbiol 1996 Mar;34(3):592-6.
 96. Carvalho Mda G, Tondella ML, McCaustland K, Weidlich L, McGee L, Mayer LW, et al. Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA. J Clin Microbiol 2007 Aug;45(8):2460-6.
 97. Rello J, Lisboa T, Lujan M, Gallego M, Kee C, Kay I, et al. Severity of pneumococcal pneumonia associated with genomic bacterial load. Chest 2009 Sep;136(3):832-40.
 98. Resti M, Micheli A, Moriondo M, Becciolini L, Cortimiglia M, Canessa C, et al. Comparison of the effect of antibiotic treatment on the possibility of diagnosing invasive pneumococcal disease by culture or molecular methods: a prospective, observational study

- of children and adolescents with proven pneumococcal infection. Clin Ther 2009 Jun;31(6):1266-73.
99. Blaschke AJ, Heyrend C, Byington CL, Obando I, Vazquez-Barba I, Doby EH, et al. Molecular analysis improves pathogen identification and epidemiologic study of pediatric parapneumonic empyema. Pediatr Infect Dis J 2011Apr;30(4):289-94.
 100. Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. Antimicrob Agents Chemother 1996 Nov;40(11):2562-6.
 101. Nagai K, Shibasaki Y, Hasegawa K, Davies TA, Jacobs MR, Ubukata K, et al. Evaluation of PCR primers to screen for *Streptococcus pneumoniae* isolates and beta-lactam resistance, and to detect common macrolide resistance determinants. J Antimicrob Chemother 2001 Dec;48(6):915-8.
 102. Sutcliffe J, Tait-Kamradt A, Wondrack L. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. Antimicrob Agents Chemother 1996 Aug;40(8):1817-24.
 103. Alos JJ, Aracil B, Oteo J, Torres C, Gomez-Garcés JL. High prevalence of erythromycin-resistant, clindamycin/miocomycin-susceptible (M phenotype) *Streptococcus pyogenes*: results of a Spanish multicentre study in 1998. Spanish Group for the Study of Infection in the Primary Health Care Setting. J Antimicrob Chemother 2000 May;45(5):605-9.
 104. Del Grosso M, Scotto d'Abusco A, Iannelli F, Pozzi G, Pantosti A. Tn2009, a Tn916-like element containing *mef(E)* in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2004 Jun;48(6):2037-42.
 105. Asahi Y, Takeuchi Y, Ubukata K. Diversity of substitutions within or adjacent to conserved amino acid motifs of penicillin-binding protein 2X in cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates. Antimicrob Agents Chemother 1999 May;43(5):1252-5.
 106. Asahi Y, Ubukata K. Association of a thr-371 substitution in a conserved amino acid motif of penicillin-binding protein 1A with penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1998 Sep;42(9):2267-73.
 107. Yamane A, Nakano H, Asahi Y, Ubukata K, Konno M. Directly repeated insertion of 9-nucleotide sequence detected in penicillin-binding protein 2B gene of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1996 May;40(5):1257-9.
 108. Dowson CG, Hutchison A, Woodford N, Johnson AP, George RC, Spratt BG. Penicillin-resistant viridans streptococci have obtained altered penicillin-binding protein genes from penicillin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. Proc Natl Acad Sci U S A 1990 Aug;87(15):5858-62.
 109. Pai R, Gertz RE, Beall B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. J Clin Microbiol 2006 Jan;44(1):124-31.

110. McEllistrem MC, Stout JE, Harrison LH. Simplified protocol for pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol 2000 Jan;38(1):351-3.
111. Enright MC, Spratt BG. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. Microbiology 1998 Nov;144 (Pt 11):3049-60.
112. Tarrago D, Fenoll A, Sanchez-Tatay D, Arroyo LA, Munoz-Almagro C, Esteva C, et al. Identification of pneumococcal serotypes from culture-negative clinical specimens by novel real-time PCR. Clin Microbiol Infect 2008 Sep;14(9):828-34.
113. Azzari C, Moriondo M, Indolfi G, Massai C, Becciolini L, de Martino M, et al. Molecular detection methods and serotyping performed directly on clinical samples improve diagnostic sensitivity and reveal increased incidence of invasive disease by *Streptococcus pneumoniae* in Italian children. J Med Microbiol 2008 Oct;57(Pt 10):1205-12.
114. Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή διάγνωση Λοιμώξεων (4^η έκδοση 1994 Α. Αρσένη)
115. Εξετάσεις των υγρών του σώματος /Γενικές εξετάσεις και Καλλιέργειες (2000 Α. Αρσένη)
116. Διαγνωστική Μοριακή Μικροβιολογία , Αικ. Χαρβάλου, Εκδόσεις Πασχαλίδη 1998
117. Εισαγωγή στη Μικροβιολογία, Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case, 9th edition 2009. Γενική επιμέλεια-Πρόλογος ελληνικής έκδοσης Αθανάσιος Τσακρής (Επιμελεια-μετάφραση: Νικόλαος Σπανάκης, Ευαγγελία-Θεοφανώ Πιπεράκη. Συνεργάστηκαν οι: Γεωργία Βρυώνη, Νικόλαος Σιαφάκας, Μαρία Καφετζή)
118. Ιατρική Μικροβιολογία/ Μικροβιακές λοιμώξεις/ Παθογένεια, Ανοσία, Εργαστηριακή διάγνωση και θεραπεία, David Greenwood, Richard Slack, John Peutherer , Mike Barer, 1η ελληνική έκδοση, 17η αγγλική έκδοση, 2010. Γενική επιμέλεια-Πρόλογος Αθανάσιος Τσακρής (Μετάφραση: Νικόλαος Σπανάκης, Ευαγγελία-Θεοφανώ Πιπεράκη)
119. Antimicrobial Drug Resistance Volume 1, Mechanisms of Drug Resistance Edited by Douglas L. Mayers, Section Editors Stephen A. Lerner, Marc Ouellette, Jack D. Sobel. © Humana Press, a part of Springer Science+Business Media, LLC 2009.
120. Sogstad MK, Høiby EA, Caugant DA. Molecular characterization of non-penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae* in Norway. J Clin Microbiol. 2006 Sep;44(9):3225-30.
121. Chiba N, Kobayashi R, Hasegawa K, Morozumi M, Nakayama E, Tajima T, Iwata S, Ubukata K; Acute Respiratory Diseases Study Group. Antibiotic susceptibility according to genotype of penicillin-binding protein and macrolide resistance genes, and serotype of *Streptococcus pneumoniae* isolates from community-acquired pneumonia in children. J Antimicrob Chemother. 2005 Oct;56(4):756-60.

122. Granger D, Boily-Larouche G, Turgeon P, Weiss K, Roger M. Molecular characteristics of pbp1a and pbp2b in clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates in Quebec, Canada. J Antimicrob Chemother. 2006 Jan;57(1):61-70.
123. Carapito R, Chesnel L, Vernet T, Zapun A. Pneumococcal beta-lactam resistance due to a conformational change in penicillin-binding protein 2x. J Biol Chem. 2006 Jan 20;281(3):1771-7.
124. Cafini F, del Campo R, Alou L, Sevillano D, Morosini MI, Baquero F, Prieto J; Spanish Pneumococcal Network (G03/103). Alterations of the penicillin-binding proteins and murM alleles of clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates with high-level resistance to amoxicillin in Spain. J Antimicrob Chemother. 2006 Feb;57(2):224-9.
125. Lovering AL, De Castro L, Lim D, Strynadka NC. Structural analysis of an "open" form of PBP1B from *Streptococcus pneumoniae*. Protein Sci. 2006 Jul;15(7):1701-9.
126. Granger D, Boily-Larouche G, Turgeon P, Weiss K, Roger M. Genetic analysis of pbp2x in clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates in Quebec, Canada. J Antimicrob Chemother. 2005 Jun;55(6):832-9.
127. Trzciński K, MacNeil A, Klugman KP, Lipsitch M. Capsule homology does not increase the frequency of transformation of linked penicillin binding proteins PBP 1a and PBP 2x in *Streptococcus pneumoniae*. Capsule homology does not increase the frequency of transformation of linked penicillin binding proteins PBP 1a and PBP 2x in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2005 Apr;49(4):1591-2.
128. Morand B, Mühlemann K. Heteroresistance to penicillin in *Streptococcus pneumoniae*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Aug 28;104(35):14098-103.
129. Sunakawa K, Farrell DJ. Mechanisms, molecular and sero-epidemiology of antimicrobial resistance in bacterial respiratory pathogens isolated from Japanese children. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2007 Aug 13;6:7.
130. Izdebski R, Rutschmann J, Fiett J, Sadowy E, Gniadkowski M, Hryniewicz W, Hakenbeck R. Highly variable penicillin resistance determinants PBP 2x, PBP 2b, and PBP 1a in isolates of two *Streptococcus pneumoniae* clonal groups, Poland 23F-16 and Poland 6B-20. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Mar;52(3):1021-7.
131. Kosowska K, Jacobs MR, Bajaksouzian S, Koeth L, Appelbaum PC. Alterations of penicillin-binding proteins 1A, 2X, and 2B in *Streptococcus pneumoniae* isolates for which amoxicillin MICs are higher than penicillin MICs. Antimicrob Agents Chemother. 2004 Oct;48(10):4020-2.
132. Noguchi N, Tano J, Nasu Y, Koyama M, Narui K, Kamishima H, Saito T, Tsuyuki K, Sasatsu M. Antimicrobial susceptibilities and distribution of resistance genes for beta-lactams and macrolides in *Streptococcus pneumoniae* isolated between 2002 and 2004 in Tokyo. Int J Antimicrob Agents. 2007 Jan;29(1):26-33.

133. Oishi K, Yoshimine H, Watanabe H, Watanabe K, Tanimura S, Kawakami K, Iwagaki A, Nagai H, Goto H, Kudoh S, Kuriyama T, Fukuchi Y, Matsushima T, Shimada K, Matsumoto K, Nagatake T. Drug-resistant genes and serotypes of pneumococcal strains of community-acquired pneumonia among adults in Japan. *Respirology*. 2006 Jul;11(4):429-36.
134. Soriano F, Cafini F, Aguilar L, Tarragó D, Alou L, Giménez MJ, Gracia M, Ponte MC, Leu D, Pana M, Letowska I, Fenoll A. Breakthrough in penicillin resistance? *Streptococcus pneumoniae* isolates with penicillin/cefotaxime MICs of 16 mg/L and their genotypic and geographical relatedness. *J Antimicrob Chemother*. 2008 Dec;62(6):1234-40.
135. Tait-Kamradt AG, Cronan M, Dougherty TJ. Comparative genome analysis of high-level penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist*. 2009 Jun;15(2):69-75.
136. Sadowy E, Kuch A, Gniadkowski M, Hryniewicz W. Expansion and evolution of the *Streptococcus pneumoniae* Spain9V-ST156 clonal complex in Poland. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 May;54(5):1720-7.
137. Lambertsen L, Brendstrup M, Friis H, Christensen JJ. Molecular characterization of invasive penicillin non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* from Denmark, 2001 to 2005. *Scand J Infect Dis*. 2010 May;42(5):333-40.
138. Van der Poll, **Opal SM**. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. **Lancet** 2009 Oct 31;374(9700):1543-56.
139. Ντάνιελ Χαρτλ και Ελίζαμπεθ Τζόουνς (2005). Γενετική: Ανάλυση γονιδίων και γονιδιωμάτων (Genetics: Analysis of Genes and Genomes), 6η έκδοση. Jones & Bartlett. 854 σελίδες ISBN 0-7637-1511-5.
140. Lorenz MG, Wackernagel W. "Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment". *Microbiol. Rev.* 1994; 58 (3): 563–602/
Downie AW. "Pneumococcal transformation--a backward view. Fourth Griffith Memorial Lecture". *J. Gen. Microbiol.* 1972; 73 (1): 1–11.
141. Chiba N, Morozumi M, Ubukata K. Application of the real-time PCR method for genotypic identification of β -lactam resistance in isolates from invasive pneumococcal diseases. *Microb Drug Resist*. 2012 Apr;18(2):149-56. Epub 2011 Oct 26.
142. Muñoz R, De La Campa AG. ParC subunit of DNA topoisomerase IV of *Streptococcus pneumoniae* is a primary target of fluoroquinolones and cooperates with DNA gyrase A subunit in forming resistance phenotype. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 Oct;40(10):2252-7.
143. Reinert RR, Ringelstein A, Van Der Linden M, Cil MY, Al-Lahham A, Schmitz FJ. Molecular epidemiology of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Europe. *Journal of Clinical Microbiology* 2005, 43(3):1294-1300.

144. Ip M, Chau SS, Chi F, Qi A, Lai RW. Rapid screening of fluoroquinolone resistance determinants in *Streptococcus pneumoniae* by PCR-restriction fragment length polymorphism and single-strand conformational polymorphism. J Clin Microbiol. 2006 Mar;44(3):970-5.
145. Taha N, Araj GF, Wakim RH, S Kanj S, Kanafani ZA, Sabra A, Khairallah M-T, Nassar FJ, Shehab M, Baroud M, Dbaiho G, Matar GM. Genotypes and serotype distribution of macrolide resistant invasive and non- invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Lebanon. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 2012, 11: 2.
146. De la Pedrosa EG, Baquero F, Loza E, Nadal-Serrano JM, Fenoll A, Del Campo R, Cantón R. High clonal diversity in erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* invasive isolates in Madrid, Spain (2000-07). J Antimicrob Chemother. 2009 Dec;64(6):1165-9. Epub 2009 Oct 16.
147. Jenkins SG, Farrell DJ. Increase in pneumococcus macrolide resistance, United States. Emerg Infect Dis. 2009 Aug;15(8):1260-4.
148. Chen J, Liu L, Wang G, Chen Y, Luo Z, Huang Y, Fu Z, Yang Y, Liu E. Correlation between usage of macrolide antibiotic and resistance of *Streptococcus pneumoniae* clinic isolates from Chongqing children's hospital. Pediatr Pulmonol. 2009 Sep;44(9):917-21.
149. Bruinsma N, Kristinsson KG, Bronzwaer S, Schrijnemakers P, Degener J, Tiemersma E, Hryniewicz W, Monen J, Grundmann H; European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). Trends of penicillin and erythromycin resistance among invasive *Streptococcus pneumoniae* in Europe. J Antimicrob Chemother. 2004 Dec;54(6):1045-50. Epub 2004 Nov 5.
150. Tazumi A, Maeda Y, Goldsmith CE, Coulter WA, Mason C, Millar BC, McCalmont M, Rendall J, Elborn JS, Matsuda M, Moore JE. Molecular characterization of macrolide resistance determinants [erm(B) and mef(A)] in *Streptococcus pneumoniae* and viridans group streptococci (VGS) isolated from adult patients with cystic fibrosis (CF). J Antimicrob Chemother. 2009 Sep;64(3):501-6. Epub 2009 Jul 7.
151. Bae S, Lee K. Distribution of capsular serotypes and macrolide resistance mechanisms among macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Korea. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009 Feb;63(2):213-6. Epub 2008 Dec 18.
152. Santagati M, Lupo A, Scillato M, Di Martino A, Stefani S. Conjugal mobilization of the mega element carrying mef(E) from *Streptococcus salivarius* to *Streptococcus pneumoniae*. FEMS Microbiol Lett. 2009 Jan;290(1):79-84. Epub 2008 Nov 14.
153. Yang F, Xu XG, Yang MJ, Zhang YY, Klugman KP, McGee L. Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* isolated from Shanghai, China. Int J Antimicrob Agents. 2008 Nov;32(5):386-91. Epub 2008 Aug 23.

154. Reinert RR, Filimonova OY, Al-Lahham A, Grudinina SA, Ilina EN, Weigel LM, Sidorenko SV. Mechanisms of macrolide resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates from Russia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Jun;52(6):2260-2. Epub 2008 Mar 31.
155. De la Pedrosa EG, Morosini MI, van der Linden M, Ruiz-Garbajosa P, Galán JC, Baquero F, Reinert RR, Cantón R. Polyclonal population structure of *Streptococcus pneumoniae* isolates in Spain carrying *mef* and *mef* plus *erm*(B). *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Jun;52(6):1964-9. Epub 2008 Mar 24.
156. Wierzbowski AK, Nichol K, Laing N, Hisanaga T, Nikulin A, Karlowsky JA, Hoban DJ, Zhanel GG. Macrolide resistance mechanisms among *Streptococcus pneumoniae* isolated over 6 years of Canadian Respiratory Organism Susceptibility Study (CROSS) (1998 2004). *J Antimicrob Chemother*. 2007 Oct;60(4):733-40. Epub 2007 Aug 2.
157. Del Grosso M, Northwood JG, Farrell DJ, Pantosti A. The macrolide resistance genes *erm*(B) and *mef*(E) are carried by Tn2010 in dual-gene *Streptococcus pneumoniae* isolates belonging to clonal complex CC271. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Nov;51(11):4184-6. Epub 2007 Aug 20.
158. Calatayud L, Ardanuy C, Cercenado E, Fenoll A, Bouza E, Pallares R, Martín R, Liñares J. Serotypes, Clones, and Mechanisms of Resistance of Erythromycin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Isolates Collected in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Sep;51(9):3240-6. Epub 2007 Jul 2.
159. Del Grosso M, Camilli R, Iannelli F, Pozzi G, Pantosti A. The *mef*(E)-carrying genetic element (mega) of *Streptococcus pneumoniae*: insertion sites and association with other genetic elements. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Oct;50(10):3361-6.
160. Cochetti I, Tili E, Mingoia M, Varaldo PE, Montanari MP. *erm*(B)-carrying elements in tetracycline-resistant pneumococci and correspondence between Tn1545 and Tn6003. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Apr;52(4):1285-90. Epub 2008 Feb 19.
161. Mera RM, Miller LA, Amrine-Madsen H, Sahm DF. The impact of the pneumococcal conjugate vaccine on antimicrobial resistance in the United States since 1996: evidence for a significant rebound by 2007 in many classes of antibiotics. *Microb Drug Resist*. 2009 Dec;15(4):261-8.
162. Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2008 Mar;32(2):361-85. Epub 2008 Jan 29.
163. Sadowy E, Izdebski R, Skoczynska A, Grzesiowski P, Gniadkowski M, Hryniewicz W. Phenotypic and molecular analysis of penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates in Poland. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Jan;51(1):40-7. Epub 2006 Oct 16.
164. Dias R, Félix D, Caniça M, Trombe MC. The highly conserved serine threonine kinase StkP of *Streptococcus pneumoniae* contributes to penicillin susceptibility independently from genes encoding penicillin-binding proteins. *BMC Microbiol*. 2009 Jun 5;9:121.

165. Contreras-Martel C, Dahout-Gonzalez C, Martins Ados S, Kotnik M, Dessen A. PBP active site flexibility as the key mechanism for beta-lactam resistance in pneumococci. *J Mol Biol.* 2009 Apr 10;387(4):899-909. Epub 2009 Feb 20.
166. Harimaya A, Yokota S, Sato K, Koizumi J, Yamazaki N, Himi T, Fujii N. Alterations of pbp1a, pbp2b, and pbp2x in *Streptococcus pneumoniae* isolates from children with otolaryngological infectious disease in the Sapporo district of Japan. *J Infect Chemother.* 2006 Dec;12(6):366-71. Epub 2007 Jan 18.
167. Stanhope MJ, Lefébure T, Walsh SL, Becker JA, Lang P, Pavinski Bitar PD, Miller LA, Italia MJ, Amrine-Madsen H. Positive selection in penicillin-binding proteins 1a, 2b, and 2x from *Streptococcus pneumoniae* and its correlation with amoxicillin resistance development. *Infect Genet Evol.* 2008 May;8(3):331-9. Epub 2008 Feb 14.
168. Stanhope MJ, Walsh SL, Becker JA, Miller LA, Lefébure T, Lang P, Bitar PD, Amrine-Madsen H. The relative frequency of intraspecific lateral gene transfer of penicillin binding proteins 1a, 2b, and 2x, in amoxicillin resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Genet Evol.* 2007 Jul;7(4):520-34. Epub 2007 Mar 30.
169. Decousser JW, Ovetchkine P, Collignon A, Chaplain C, Estrangin E, Fremaux A, Reinert P, Foucaud P, Ghnassia JC, Cohen R, Gaudelus J, Allouch PY. Multicentre study of the molecular epidemiology, serotypes and antimicrobial susceptibility patterns of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolated from children in the Ile de France area. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004 Jan;23(1):27-33. Epub 2003 Dec 2.
170. Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis.* 2000 Jan;30(1):100-21
171. Pantosti A, D'Ambrosio F, Tarasi A, Recchia S, Orefici G, Mastrantonio P. Antibiotic susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* causing meningitis in Italy, 1997-1999. *Clin Infect Dis.* 2000 Dec;31(6):1373-9. Epub 2000 Nov 29.
172. Serrano I, Ramirez M, Melo-Cristino J; Portuguese Surveillance Group for the Study of Respiratory Pathogens. Invasive *Streptococcus pneumoniae* from Portugal: implications for vaccination and antimicrobial therapy. *Clin Microbiol Infect.* 2004 Jul;10(7):652-6.
173. Maugein J, Guillemot D, Dupont MJ, Fosse T, Laurans G, Roussel-Delvallez M, Thierry J, Vergnaud M, Weber M, Poirier B. Clinical and microbiological epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* bacteremia in eight French counties. *Clin Microbiol Infect.* 2003 Apr;9(4):280-8.
174. Oteo J, Campos J, Cruchaga S, Baquero G, Lázaro E, Madurga M, de Abajo FJ, Baquero F; Spanish EARSS Group. Increase of resistance to macrolides in invasive *Streptococcus pneumoniae* in Spain (2000-2001). *Clin Microbiol Infect.* 2004 Sep;10(9):851-4.

175. Descheemaeker P, Chapelle S, Lammens C, Hauchecorne M, Wijdooghe M, Vandamme P, Ieven M, Goossens H. Macrolide resistance and erythromycin resistance determinants among Belgian *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* isolates. J Antimicrob Chemother. 2000 Feb;45(2):167-73.
176. Pihlajamäki M, Kaijalainen T, Huovinen P, Jalava J; Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance. Rapid increase in macrolide resistance among penicillin non-susceptible pneumococci in Finland, 1996-2000. J Antimicrob Chemother. 2002 May;49(5):785-92.
177. Schmitz FJ, Perdikouli M, Beeck A, Verhoef J, Fluit AC. Molecular surveillance of macrolide, tetracycline and quinolone resistance mechanisms in 1191 clinical European *Streptococcus pneumoniae* isolates. Int J Antimicrob Agents. 2001 Nov;18(5):433-6.
178. Amezaga MR, Carter PE, Cash P, McKenzie H. Molecular epidemiology of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolates from blood and noninvasive sites. J Clin Microbiol. 2002 Sep;40(9):3313-8.
179. Monaco M, Camilli R, D'Ambrosio F, Del Grosso M, Pantosti A. Evolution of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Italy. J Antimicrob Chemother. 2005 Feb;55(2):256-9. Epub 2005 Jan 13.
180. Bley C, van der Linden M, Reinert RR. *mef(A)* is the predominant macrolide resistance determinant in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* in Germany. Int J Antimicrob Agents. 2011 May;37(5):425-31. Epub 2011 Mar 21.
181. Reinert RR, Filimonova OY, Al-Lahham A, Grudinina SA, Ilina EN, Weigel LM, Sidorenko SV. Mechanisms of macrolide resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates from Russia. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Jun;52(6):2260-2. Epub 2008 Mar 31.
182. Sangvik M, Littauer P, Simonsen GS, Sundsfjord A, Dahl KH. *mef(A)*, *mef(E)* and a new *mef* allele in macrolide-resistant *Streptococcus* spp. isolates from Norway. Antimicrob Chemother. 2005 Nov;56(5):841-6. Epub 2005 Sep 19.
183. Del Grosso M, Iannelli F, Messina C, Santagati M, Petrosillo N, Stefani S, Pozzi G, Pantosti A. Macrolide efflux genes *mef(A)* and *mef(E)* are carried by different genetic elements in *Streptococcus pneumoniae*. Clin Microbiol. 2002 Mar;40(3):774-8.
184. Corso A, Faccone D, Galletti P, Pace J, Regueira M, Pace J; Argentinean Sireva Working Group. Prevalence of *mef* and *ermB* genes in invasive pediatric erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Argentina. Rev Argent Microbiol. 2009 Jan-Mar;41(1):29-33. Erratum in Rev Argent Microbiol. 2009 Apr-Jun;41(2):119.
185. Daikos GL, Koutsolioutsou A, Tsiodras S, Theodoridou M, Koutouzis EI, Charissiadou A, Pangalis A, Michos AG, Chaidopoulou F, Braoudaki M, Syriopoulou VP. Evolution of macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates in the prevaccine era. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008 Apr;60(4):393-8. Epub 2008 Feb 20.

186. Ardanuy C, Tubau F, Liñares J, Domínguez MA, Pallarés R, Martín R; Spanish Pneumococcal Infection Study Network (G03/103). Distribution of subclasses *mefA* and *mefE* of the *mefA* gene among clinical isolates of macrolide-resistant (M-phenotype) *Streptococcus pneumoniae*, viridans group streptococci, and *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Feb;49(2):827-9
187. Izdebski R, Sadowy E, Fiett J, Grzesiowski P, Gniadkowski M, Hryniewicz W. Clonal diversity and resistance mechanisms in tetracycline-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates in Poland. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Apr;51(4):1155-63. Epub 2007 Jan 8.
188. Dzierzanowska-Fangrat K, Semczuk K, Górská P, Giedrys-Kalemba S, Kochman M, Samet A, Tyski S, Dzierzanowska D, Trzciński K. Evidence for tetracycline resistance determinant *tet(M)* allele replacement in a *Streptococcus pneumoniae* population of limited geographical origin. *Int J Antimicrob Agents*. 2006 Feb;27(2):159-64. Epub 2006 Jan 19.
189. Montanari MP, Cochetti I, Mingoia M, Varaldo PE. Phenotypic and molecular characterization of tetracycline- and erythromycin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Jul;47(7):2236-41.
190. Latini L, Ronchetti MP, Merolla R, Merolla R, Guglielmi F, Bajaksouzian S, Villa MP, Jacobs MR, Ronchetti R. *Prevalence of mefE, erm and tet(M) genes in Streptococcus pneumoniae strains from Central Italy*. *Int J Antimicrob Agents*. 1999 Sep;13(1):29-33.
191. Bogaert D, Hermans PW, Grivea IN, Katopodis GS, Mitchell TJ, Sluijter M, De Groot R, Beratis NG, Syrogiannopoulos GA. Molecular epidemiology of penicillin-susceptible non-beta-lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Greek children. *J Clin Microbiol*. 2003 Dec;41(12):5633-9.
192. Luna VA, Roberts MC. The presence of the *tetO* gene in a variety of tetracycline-resistant *Streptococcus pneumoniae* serotypes from Washington State. *J Antimicrob Chemother*. 1998 Nov;42(5):613-9.
193. Cerdá Zolezzi P, Laplana LM, Calvo CR, Cepero PG, Erazo MC, Gómez-Lus R. Molecular basis of resistance to macrolides and other antibiotics in commensal viridans group streptococci and *Gemella* spp. and transfer of resistance genes to *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Sep;48(9):3462-7.
194. Seral C, Castillo FJ, Rubio-Calvo MC, García C, Gómez-Lus R. Association between MLS antibiotic and tetracycline resistance genes in *Streptococcus pneumoniae*. *Rev Esp Quimioter*. 2001 Mar;14(1):55-62.
195. Dowson CG, Johnson AP, Cercenado E et al. Genetics of oxacillin resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* that are oxacillin resistant and penicillin susceptible. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 49–53.

196. Munoz R, Dowson CG, Daniels M et al. Genetics of resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol 1992; 6:2461–5.
197. Reichmann P, Konig A, Marton A et al. Penicillin-binding proteins as resistance determinants in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Microb Drug Resist 1996;2: 177–81.
198. Coffey TJ, Daniels M, McDougal LK et al. Genetic analysis of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with high-level resistance to expanded-spectrum cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 1306–13.
199. Barcus, V. A., K. Ghanekar, M. Yeo, T. J. Coffey, and C. G. Dowson. Genetics of high level penicillin resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. FEMS Microbiol. Lett. 1995; 126:299-303.
200. Hakenbeck, R. . β -Lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology and evolutionary mechanism. Chemotherapy 1999; 45:83-94.
201. Laible, G., B. G. Spratt, and R. Hakenbeck. . Interspecies recombinational events during the evolution of altered PBP2X genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Mol. Microbiol. 1991; 5:1993-2002.
202. Smith, A. M., and K. P. Klugman. . Alterations in penicillin-binding protein 2B from penicillin-resistant wild-type strains of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 1995; 39:859-867.
203. Smith, A. M., and K. P. Klugman. . Alterations in PBP1A essential for high-level penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 1998; 42:1329-1333.
204. Mikamo H, Suematsu H, Tanaka K, Watanabe K, Matsubara S, Sawamura H, Matsukawa Y, Ishigo S, Miyasato M, Ichikawa E; Gifu Working Group of Forum on Microbial Resistance. Jpn J Antibiot. 2004 Apr;57(2):172-86.
205. Dowson, C. G., A. P. Johnson, E. Cercenado, and R. C. George. Genetics of oxacillin resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* that are oxacillin resistant and penicillin susceptible. Antimicrob. Agents Chemother. 1994; 38:49-53.
206. Grebe, T., and R. Hakenbeck. Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of β -lactam antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. 1996; 40:829-834.
207. Sakai F, Chiba N, Ono A, Yamagata Murayama S, Ubukata K, Sunakawa K, Takahashi T. Molecular epidemiologic characteristics of *Streptococcus pneumoniae* isolates from children with meningitis in Japan from 2007 through 2009. J Infect Chemother. 2011 Jun;17(3):334-40. Epub 2010 Dec 15.

208. Davies TA, He W, Bush K, Flamm RK. Affinity of ceftobiprole for penicillin-binding protein 2b in *Streptococcus pneumoniae* strains with various susceptibilities to penicillin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Oct;54(10):4510-2. Epub 2010 Aug 9.
209. Sogstad MK, Høiby EA, Caugant DA. Molecular characterization of non-penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae* in Norway. *J Clin Microbiol*. 2006 Sep;44(9):3225-30.
210. Nagai K, Davies TA, Jacobs MR, Appelbaum PC. Effects of amino acid alterations in penicillin-binding proteins (PBPs) 1a, 2b, and 2x on PBP affinities of penicillin, ampicillin, amoxicillin, cefditoren, cefuroxime, cefprozil, and cefaclor in 18 clinical isolates of penicillin-susceptible, -intermediate, and -resistant pneumococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 May;46(5):1273-80.
211. Hakenbeck, R., A. König, I. Kern, M. van der Linden, W. Keck, D. Billot-Klein, R. Legrand, B. Schoot, and L. Gutmann. Acquisition of five high- M_r penicillin-binding protein variants during transfer of high-level β -lactam resistance from *Streptococcus mitis* to *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol*. 1998; 180:673-678.
212. Hakenbeck, R., K. Kaminski, A. König, M. van der Linden, and J. R. Paik. Penicillin-binding proteins in beta-lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Drug Resist*. 1999; 5:91-99.
213. Laible, G., R. Hakenbeck, M. A. Sicard, B. Joris, and J. M. Ghuysen. Nucleotide sequences of the pbp2X genes encoding the penicillin-binding proteins 2X from *Streptococcus pneumoniae* R6 and a cefotaxime-resistant mutant, C506. *Mol. Microbiol*. 1989; 3:1337-1348.
214. Hakenbeck, R., T. Grebe, D. Zähler, and J. B. Stock. β -Lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins. *Mol. Microbiol*. 1999; 33:673-678.
215. Krauss, J., and R. Hakenbeck. . A mutation in the d,d-carboxypeptidase penicillin-binding protein 3 of *Streptococcus pneumoniae* contributes to cefotaxime resistance of the laboratory mutant C604. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1997; 41:936-942.
216. Smith, A. M., and K. P. Klugman. Alterations in MurM, a cell wall mucopeptide branching enzyme, increase high-level penicillin and cephalosporin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2001; 45:2393-2396.
217. Seppälä H, Nissinen A, Yu Q, Huovinen P. Three different phenotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Finland. *J Antimicrob Chemother*. 1993 Dec;32(6):885-91.
218. Volonakis K, Souli M, Kapaskelis A, Baziaka F, Grammelis V, Ziakas PD, Giamarellou H. Evolution of resistance patterns and identification of risk factors for *Streptococcus*

- pneumoniae* colonisation in daycare centre attendees in Athens, Greece. Int J Antimicrob Agents. 2006 Oct;28(4):297-301. Epub 2006 Sep 7.
219. Souli M, Volonakis K, Kapaskelis A, Galani I, Grammelis V, Vorou R, Tsivra M, Chrysouli Z, Katsala D, Giamarellou H. Characterisation of macrolide-non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* colonising children attending day-care centres in Athens, Greece during 2000 and 2003. Clin Microbiol Infect. 2007 Jan;13(1):70-7.
 220. Katsarolis I, Poulakou G, Analitis A, Matthaiopoulou I, Roilides E, Antachopoulos C, Kafetzis DA, Daikos GL, Vorou R, Koubaniou C, Pneumatikos I, Samonis G, Syriopoulou V, Giamarellou H, Kanellakopoulou K. Risk factors for nasopharyngeal carriage of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*: data from a nation-wide surveillance study in Greece. MC Infect Dis. 2009 Jul 29;9:120. doi: 10.1186/1471-2334-9-120.
 221. Schito GC, Felmingham D. Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin, azithromycin and telithromycin (PROTEKT 1999-2003). Int J Antimicrob Agents. 2005 Dec;26(6):479-85. Epub 2005 Nov 9.
 222. McGee L, Wang H, Wasas A, Huebner R, Chen M, Klugman KP. Prevalence of serotypes and molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from children in Beijing, China: identification of two novel multiply-resistant clones. Microb Drug Resist. 2001 Spring;7(1):55-63.
 223. Liñares J, Ardanuy C, Pallares R, Fenoll A. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. Clin Microbiol Infect. 2010 May;16(5):402-10.
 224. Lauderdale TL, Wagener MM, Lin HM, Huang IF, Lee WY, Hseih KS, Lai JF, Chiou CC. Serotype and antimicrobial resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* isolated from Taiwanese children: comparison of nasopharyngeal and clinical isolates. Diagn Microbiol Infect Dis. 2006 Dec;56(4):421-6. Epub 2006 Jul 28.
 225. Kyaw MH, Lynfield R, Schaffner W, Craig AS, Hadler J, Reingold A, Thomas AR, Harrison LH, Bennett NM, Farley MM, Facklam RR, Jorgensen JH, Besser J, Zell ER, Schuchat A, Whitney CG; Active Bacterial Core Surveillance of the Emerging Infections Program Network. Effect of introduction of the pneumococcal conjugate vaccine on drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. N Engl J Med. 2006 Apr 6;354(14):1455-63. Erratum in: N Engl J Med. 2006 Aug 10;355(6):638.
 226. Pilishvili T, Lexau C, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, Reingold A, Thomas A, Schaffner W, Craig AS, Smith PJ, Beall BW, Whitney CG, Moore MR; Active Bacterial Core Surveillance/Emerging Infections Program Network. Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. J Infect Dis. 2010 Jan 1;201(1):32-41.

227. Pai R, Moore MR, Pilishvili T, Gertz RE, Whitney CG, Beall B; Active Bacterial Core Surveillance Team. Postvaccine genetic structure of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A from children in the United States. J Infect Dis. 2005 Dec 1;192(11):1988-95. Epub 2005 Nov 1.
228. Imöhl M, Reinert RR, Mutscher C, van der Linden M. Macrolide susceptibility and serotype specific macrolide resistance of invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Germany from 1992 to 2008. BMC Microbiol. 2010 Nov 25;10:299. doi: 10.1186/1471-2180-10-299.
229. Jacobs MR, Good CE, Beall B, Bajaksouzian S, Windau AR, Whitney CG. Changes in serotypes and antimicrobial susceptibility of invasive *Streptococcus pneumoniae* strains in Cleveland: a quarter century of experience. J Clin Microbiol. 2008 Mar;46(3):982-90. doi: 10.1128/JCM.02321-07. Epub 2008 Jan 30.
230. Reinert RR, Reinert S, van der Linden M, Cil MY, Al-Lahham A, Appelbaum P. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in eight European countries from 2001 to 2003. Antimicrob Agents Chemother. 2005 Jul;49(7):2903-13.
231. Reinert RR, Al-Lahham A, Lemperle M, Tenholte C, Briefs C, Haupts S, Gerards HH, Lütticken R. Emergence of macrolide and penicillin resistance among invasive pneumococcal isolates in Germany. J Antimicrob Chemother. 2002 Jan;49(1):61-8.
232. Camargos P, Fischer GB, Mocelin H, Dias C, Ruvinsky R. Penicillin resistance and serotyping of *Streptococcus pneumoniae* in Latin America. Paediatr Respir Rev. 2006 Sep;7(3):209-14. Epub 2006 Aug 8.
233. Jefferson T, Ferroni E, Curtale F, Giorgi Rossi P, Borgia P. *Streptococcus pneumoniae* in western Europe: serotype distribution and incidence in children less than 2 years old. Lancet Infect Dis. 2006 Jul;6(7):405-10. Review. Erratum in: Lancet Infect Dis. 2006 Aug;6(8):476.
234. Pinar A, Köseoğlu O, Yenişehirli G, Sener B. Molecular epidemiology of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in a university hospital, Ankara, Turkey. Clin Microbiol Infect. 2004 Aug;10(8):718-23.
235. Memish ZA, Osoba AO, Shibl AM, Mokaddas E, Venkatesh S, Rotimi VO. Emergence and trends of penicillin non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* in Saudi Arabia and Kuwait - perspective and outstanding issues. J Chemother. 2007 Oct;19(5):471-81.
236. Demachy MC, Faibis F, Artigou A, Benoit C, Cambau E, Cecille A, Chachaty E, Chaplain C, Cormier P, Cousinard F, Decotte JC, Demontrond D, Dublanchet A, Dupeyron C, Farges A, Ferre B, Fremaux AP, Galanti MJ, Gallet C, Guiet P, Hacquard B, Hornstein M, Legrand P, Le Manach F, Lucet N, Malbrunot C, Mangeol A, Mathieu D, Otterbein G, Pateyron F, Poilane I, Pollet J, Rabenja T, Spicq C. Epidemiology and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in Ile de France area during 2001]. Med Mal Infect. 2004 Jul;34(7):303-9.

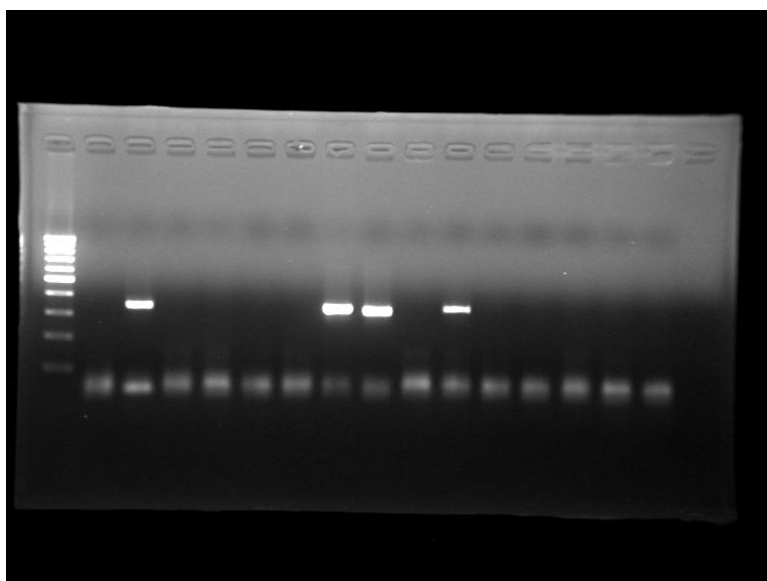
237. Lambertsen LM, Harboe ZB, Konradsen HB, Christensen JJ, Hammerum AM. Non-invasive erythromycin-resistant pneumococcal isolates are more often non-susceptible to more antimicrobial agents than invasive isolates. *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Jan;35(1):72-5.
238. Dobay O. Molecular characterisation, antibiotic sensitivity and serotyping of hungarian *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2008 Dec;55(4):395-407.
239. Nowosiad M, Giedrys-Kalemba S. Resistance, serotype and genetic diversity of *Streptococcus pneumoniae*-resistant strains isolated in the West Pomerania region of Poland in the years 2001-2005. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008 Sep;27(9):769-77.
240. Vestrheim DF, Høiby EA, Aaberge IS, Caugant DA. Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* strains colonizing children attending day-care centers in Norway. *J Clin Microbiol*. 2008 Aug;46(8):2508-18.
241. Mehr S, Wood N. *Streptococcus pneumoniae*--a review of carriage, infection, serotype replacement and vaccination. *Paediatr Respir Rev*. 2012 Dec;13(4):258-64.
242. Center KJ. Prevenar vaccination: review of the global data, 2006. *Vaccine* 2007; 25:3085-9.
243. Van der Linden M, Reinert R. Surveillance of IPD in children in Germany 2004-2008, before and after the introduction of the national immunization program for PCV7. Presented at 6th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases (ISPPD) Reykjavick, Iceland, 8-12 June 2008.
244. Aristegui J, Bernaola E, Pocheville I, Garcia C, Arranz L, Duran G , Pérez L, Bastida M, Canduela C, Herranz Aguirre M, Garrote E, Fletcher MA, Pérez C. Reduction in pediatric invasive pneumococcal disease in the Basque Country and Navarre, Spain, after introduction of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007;26:303-10.
245. Vestrheim DF, Høiby EA, Bergsaker MR, Rønning K, Aaberge IS, Caugant DA. Indirect effect of conjugate pneumococcal vaccination in a 2+1 dose schedule. *Vaccine* 2010; 28: 2214–21.
246. Ingels H, Rasmussen J, Andersen PH, Harboe ZB, Glismann S, Konradsen H, Hoffmann S, Valentiner-Branth P, Lambertsen L; Danish Pneumococcal Surveillance Collaboration Group 2009-2010. Impact of pneumococcal vaccination in Denmark during the first 3 years after PCV introduction in the childhood immunization programme. *Vaccine* 2012; 30: 3944–50.
247. Miller E, Andrews NJ, Waight PA, Slack MP, George RC. Herd immunity and serotype replacement 4 years after seven-valent pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 2011; 11: 760–8.
248. Lee GE, Lorch SA, Sheffler-Collins S, Kronman MP, Shah SS.. National hospitalization trends for pediatric pneumonia and associated complications. *Pediatrics* 2010; 126: 204–13.

249. Durando P, Crovari P, Ansaldi F, Sticchi L, Sticchi C, Turello V, Marensi L, Giacchino R, Timitilli A, Carloni R, Azzari C, Icardi G; Collaborative Group for Pneumococcal Vaccination in Liguria. Universal childhood immunisation against *Streptococcus pneumoniae*: the five-year experience of Liguria Region, Italy. *Vaccine* 2009; 27: 3459–62.
250. Stamboulidis K, Chatzaki D, Poulakou G, Ioannidou S, Lebessi E, Katsarolis I, Sypsa V, Tsakanikos M, Kafetzis D, Tsolia MN.. The impact of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine on the epidemiology of acute otitis media complicated by otorrhea. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30: 551–5.
251. Spijkerman J, van Gils EJ, Veenhoven RH, Hak E, Yzerman EP, van der Ende A, Wijmenga-Monsuur AJ, van den Dobbelsteen GP, Sanders EA. Carriage of *Streptococcus pneumoniae* 3 years after start of vaccination program, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 584–91.
252. Syriopoulou V, Menegas D, Georgakopoulou T, Koutouzis E, Charissiadou A, Chrysaki A, Pangalis A, Theodoridou M, Daikos GL. Pneumococcal disease in children: changing serotypes and antimicrobial resistance in a tertiary hospital in Greece (2002-2011). 8th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases (ISPPD), Iguacu Falls, Brazil, 12-15 March 2012. Poster No 195.
253. Syriopoulou V, Syrogiannopoulos GA, Georgakopoulou T, Tsolia M, Menegas D, Koutouzis E, Galanakis E, Kavaliotis J, Tsilimigkaki A, Siamopoulou-Mavridou A, Maraki S, Michailidou E, Christaki M, Stavrou S, Charissiadou A, Roilides E, Daikos GI, Grivea IN, Kafetzis D. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* following introduction of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) in Greece. 30th Annual meeting of the European Society for Pediatric Infectious Diseases (ESPID), Thessaloniki, Greece, 8-12 May 2012.
254. Kaplan SL, Barson W, Lin P, Romero J, Bradley J, Tan T, Hoffman J, Givner L, Hulten K, Mason E,. Early Trends for Invasive Pneumococcal Infections in Children Following the Introduction of the 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine. IDSA 49th Annual Meeting; Oct. 20-23, 2011; Boston.
255. <http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/Pneumococcal/EpidemiologicalDataPneumococcal/CurrentEpidemiologyPneumococcal/InPrevenar13NotInPrevenarPCV7/pneumo08Cummulativeweekly24IN13NOTIN7vacc/>
256. Andrews N, Kaye P, Slack M, George R, Miller E. Effectiveness of the 13 valent pneumococcal conjugate vaccine against IPD in England and Wales. 8th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases (ISPPD), Iguacu Falls, Brazil, 12-15 March 2012. Poster No 148.
257. Van der Linden M, von Kries R, Imöhl M. Effects of three years of immunization with higher valent pneumococcal conjugate vaccines on serotype distributions among reported

IPD cases in German children and adults. 52nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), San Francisco, USA, 9-12 September 2012. Poster, G-863.

258. Georgakopoulou T, Menegas D, Tzanakaki G, Pipa E, Vernardaki A, Mavraganis P, Theodoridou M, Kremastinou J. Epidemiology of Bacterial Meningitis in Greece, in the Era of Conjugate Vaccines: A 7 years review 2005-2011. 52nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), San Francisco, USA, 9-12 September 2012 Poster G3-1543.

Παράρτημα 1: Εικόνες και Γραφήματα



Εικόνα 1. Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης αντιπροσωπευτικών αποτελεσμάτων PCR για το γονίδιο *mef*.

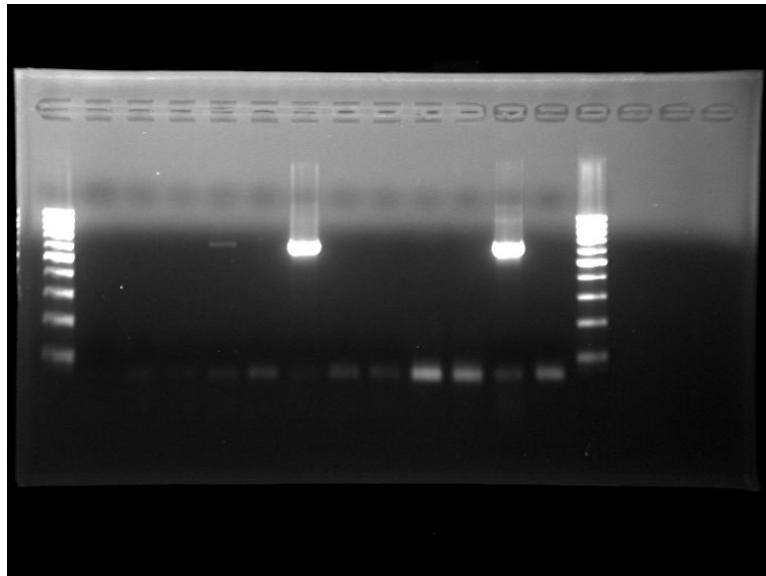
διαδρομή 1: ladder 100 bp

διαδρομή 2: αρνητικός μάρτυρας

διαδρομή 3: θετικός μάρτυρας

διαδρομές 4, 5, 6, 7, 10, 12, 13, 14, 15 και 16: αρνητικά αποτελέσματα

διαδρομές 8, 9 και 11: θετικά αποτελέσματα.



Εικόνα 2: Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης αντιπροσωπευτικών αποτελεσμάτων PCR για το γονίδιο *ermB*.

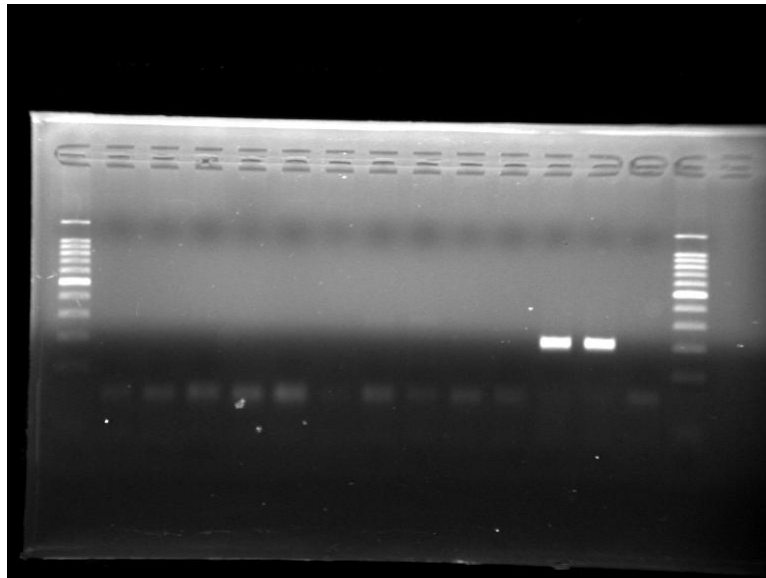
διαδρομή 1 και 14 : ladder 100 bp

διαδρομές 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11: αρνητικά αποτελέσματα

διαδρομές 5 και 7 : θετικά αποτελέσματα

διαδρομή 12 : θετικός μάρτυρας

διαδρομή 13 : αρνητικός μάρτυρας.



Εικόνα 3: Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης αντιπροσωπευτικών αποτελεσμάτων PCR για το γονίδιο *ermTR*.

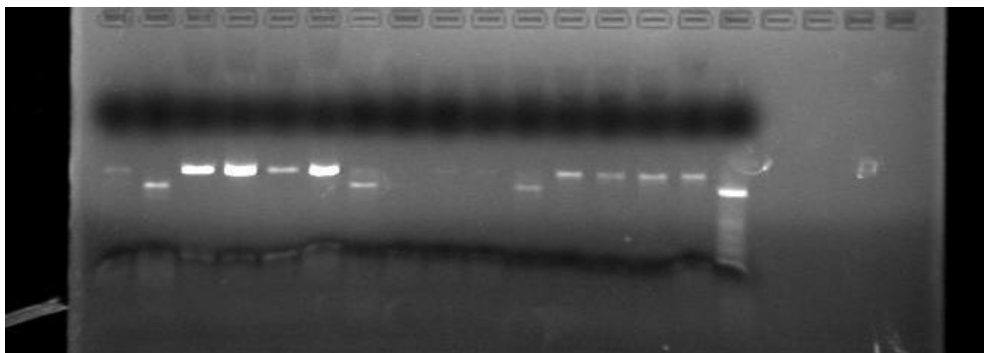
διαδρομή 1 και 15 : ladder 100 bp

διαδρομές 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11: αρνητικά αποτελέσματα

διαδρομή 12 : θετικό αποτέλεσμα

διαδρομή 13 : θετικός μάρτυρας

διαδρομή 14 : αρνητικός μάρτυρας.



Εικόνα 4: Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης αντιπροσωπευτικών αποτελεσμάτων PCR-RFLP για υποτύπους των γονιδίων *mefA/E*.

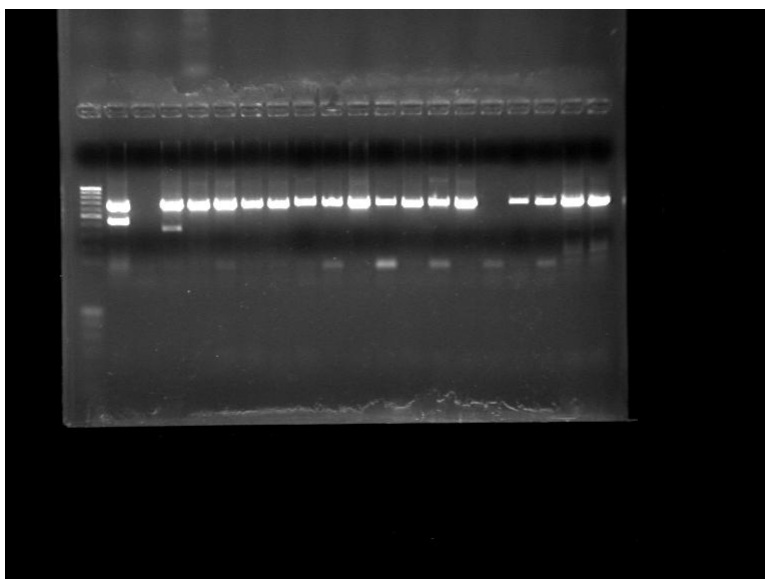
διαδρομές 1, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 12, 13, 14 : θετικά αποτελέσματα - γονίδιο *mefE*

διαδρομές 2, 7, 11: θετικά αποτελέσματα – γονίδιο *mefA*

διαδρομή 8 : αρνητικός μάρτυρας

διαδρομή 15 : θετικός μάρτυρας

διαδρομή 16 : ladder 100 bp.



Εικόνα 5: Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης αντιπροσωπευτικών αποτελεσμάτων multiplex PCR για τα γονίδια *tetM*- *tetO*.

διαδρομή 1 : ladder 100 bp

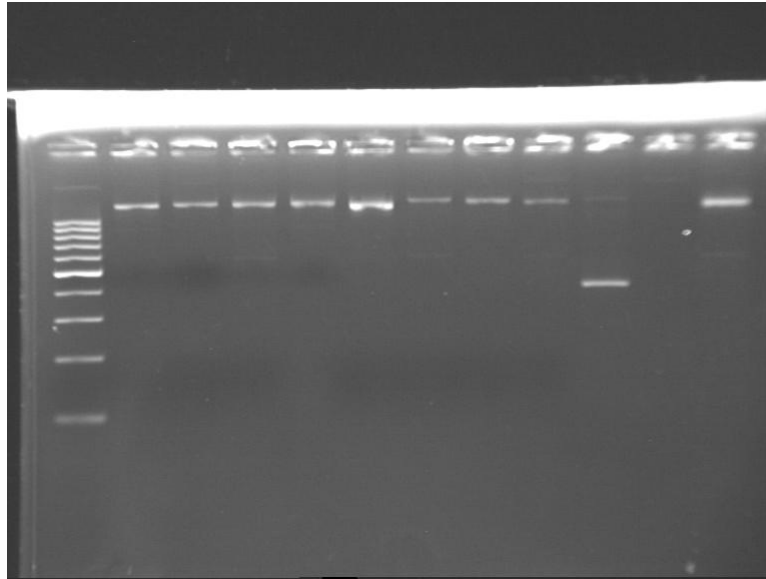
διαδρομή 2 : θετικός μάρτυρας (γονίδια *tetM*+*tetO*)

διαδρομή 3 : αρνητικός μάρτυρας

διαδρομές 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19 και 20 : θετικά αποτελέσματα – γονίδιο *tetM*

διαδρομή 4 : θετικό αποτέλεσμα – γονίδια *tetM*+*tetO*

διαδρομή 16 : αρνητικό αποτέλεσμα.



Εικόνα 6: Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης αντιπροσωπευτικών αποτελεσμάτων PCR για το γονίδιο *pbp1A*.

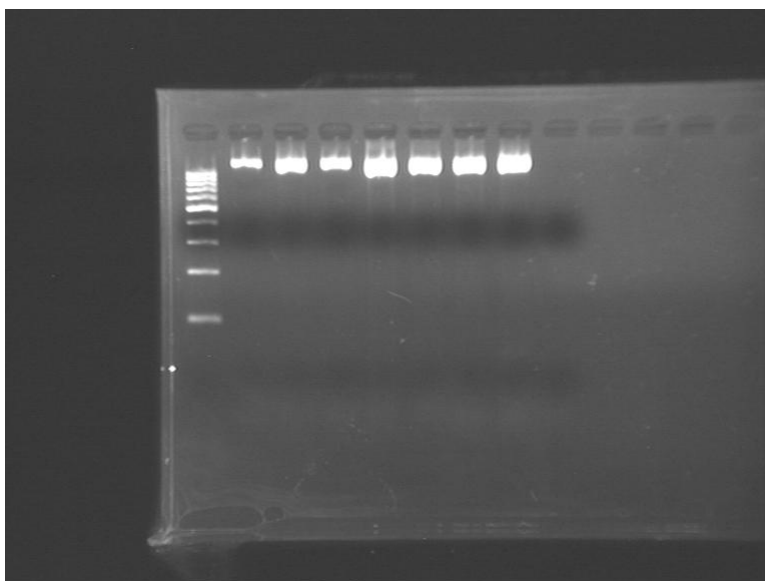
διαδρομή 1 : ladder 100 bp

διαδρομές 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 και 9: θετικά αποτελέσματα

διαδρομή 10 : αρνητικό αποτέλεσμα

διαδρομή 11 : αρνητικός μάρτυρας

διαδρομή 12 : θετικός μάρτυρας.



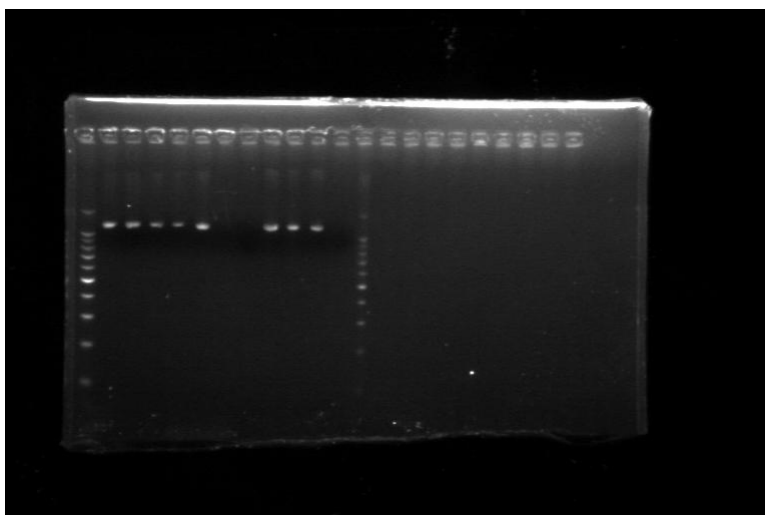
Εικόνα 7: Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης αντιπροσωπευτικών αποτελεσμάτων PCR για το γονίδιο *pbp2B*.

διαδρομή 1 : ladder 100 bp

διαδρομές 2, 3, 4, 5, 6 και 7 : θετικά αποτελέσματα

διαδρομή 8 : θετικός μάρτυρας

διαδρομή 9 : αρνητικός μάρτυρας.



Εικόνα 8: Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης αντιπροσωπευτικών αποτελεσμάτων PCR για το γονίδιο *pbp2X*.

διαδρομή 1 και 13 : ladder 100 bp

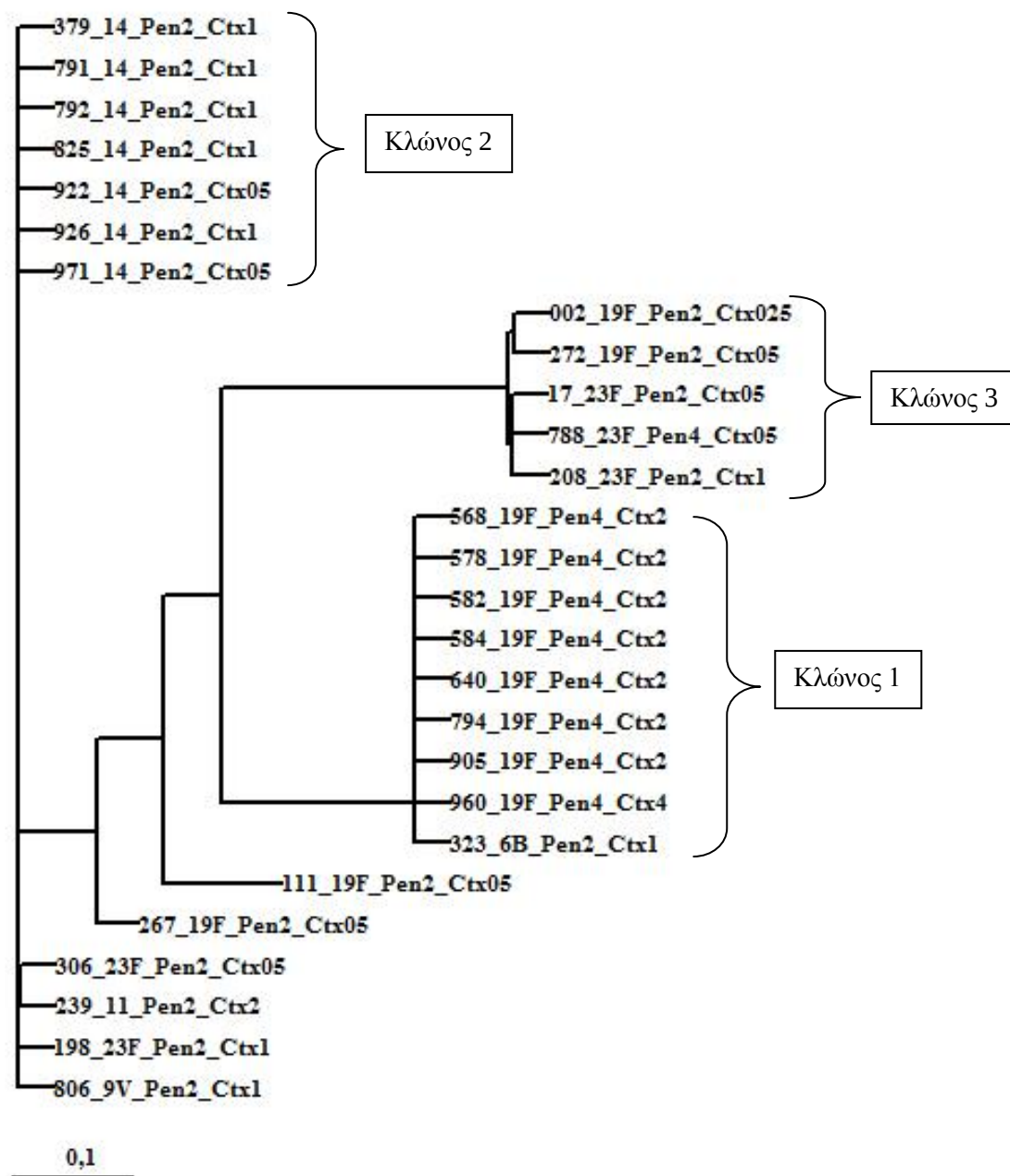
διαδρομές 2, 3, 4, 5, 6, 9 και 10: θετικά αποτελέσματα

διαδρομές 7 και 8 : αρνητικά αποτελέσματα

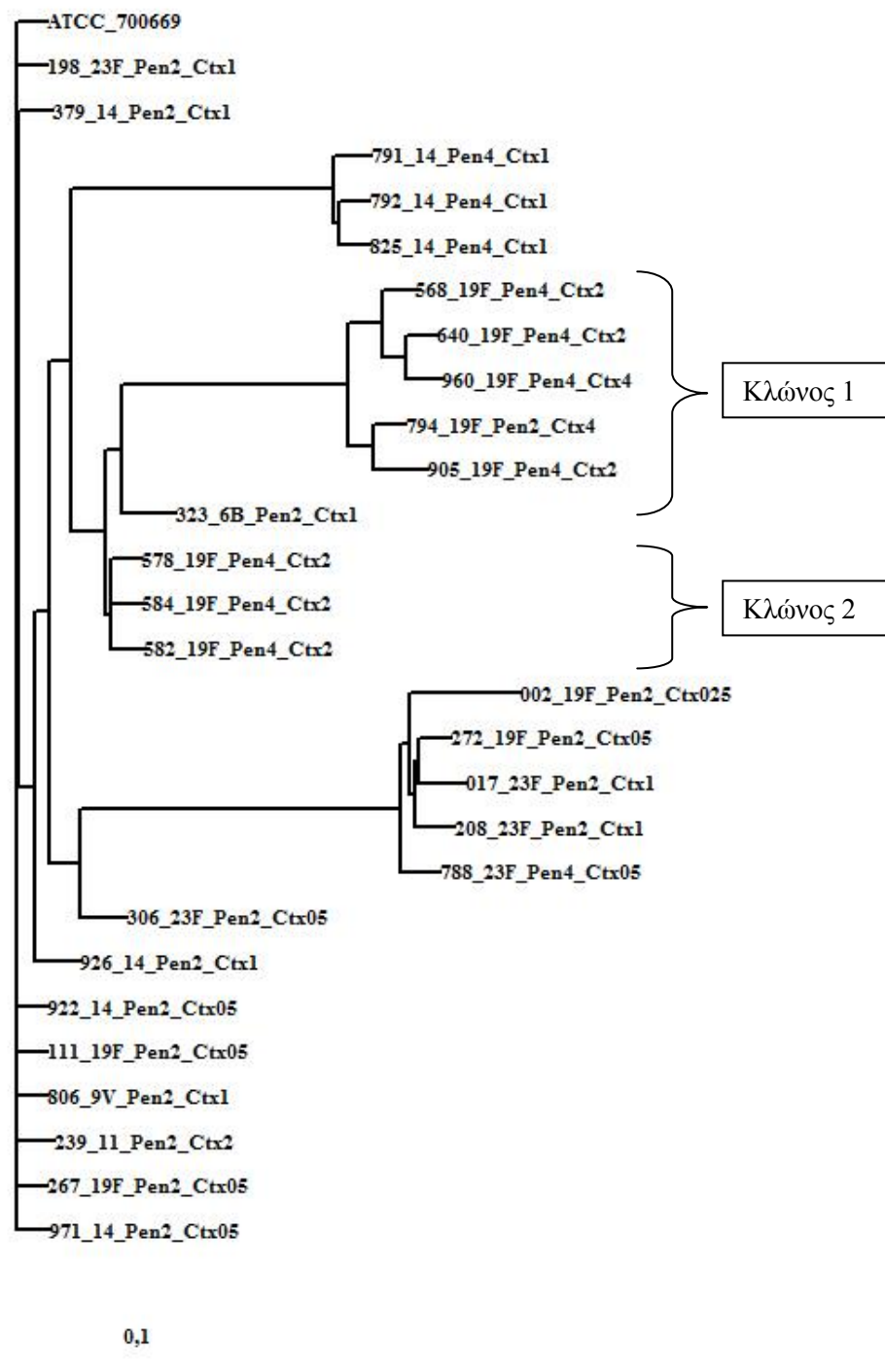
διαδρομή 11 : θετικός μάρτυρας

διαδρομή 12 : αρνητικός μάρτυρας.

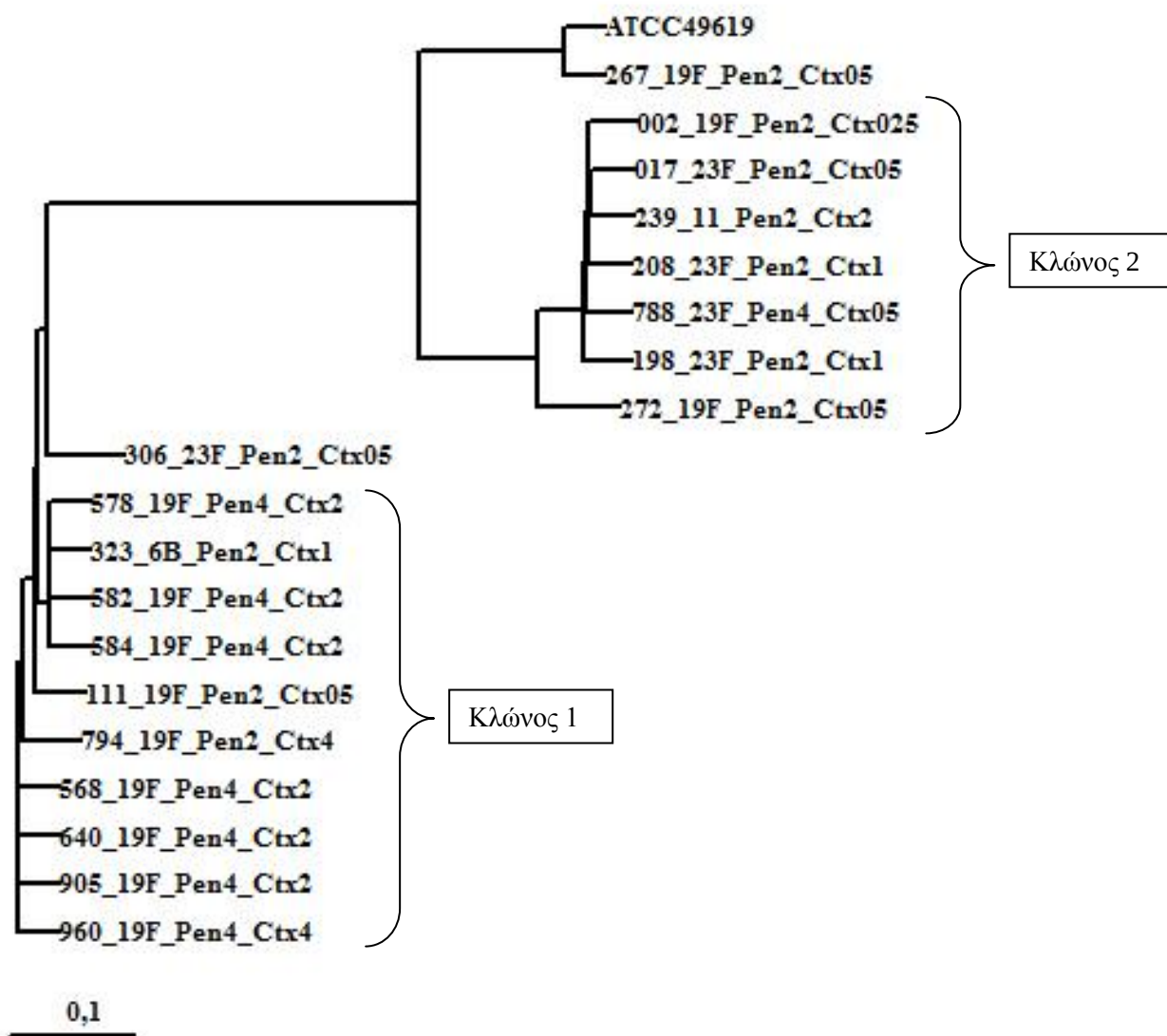
Εικόνα 9: Δενδρόγραμμα με βάση την νουκλεοτιδική αλληλουχία της PBP1A. Σε κάθε στέλεχος αναφέρεται ο κωδικός, ο ορότυπος και η τιμή ΕΑΠ της πενικιλίνης (Pen) και της κεφοταξίμης (Ctx). Για παράδειγμα, το 379_14_Pen2_Ctx1 σημαίνει το στέλεχος Νο 379, οροτύπου 14 με ΕΑΠ στην πενικιλίνη = 2 mg/L και ΕΑΠ στην κεφοταξίμη = 1 mg/L.



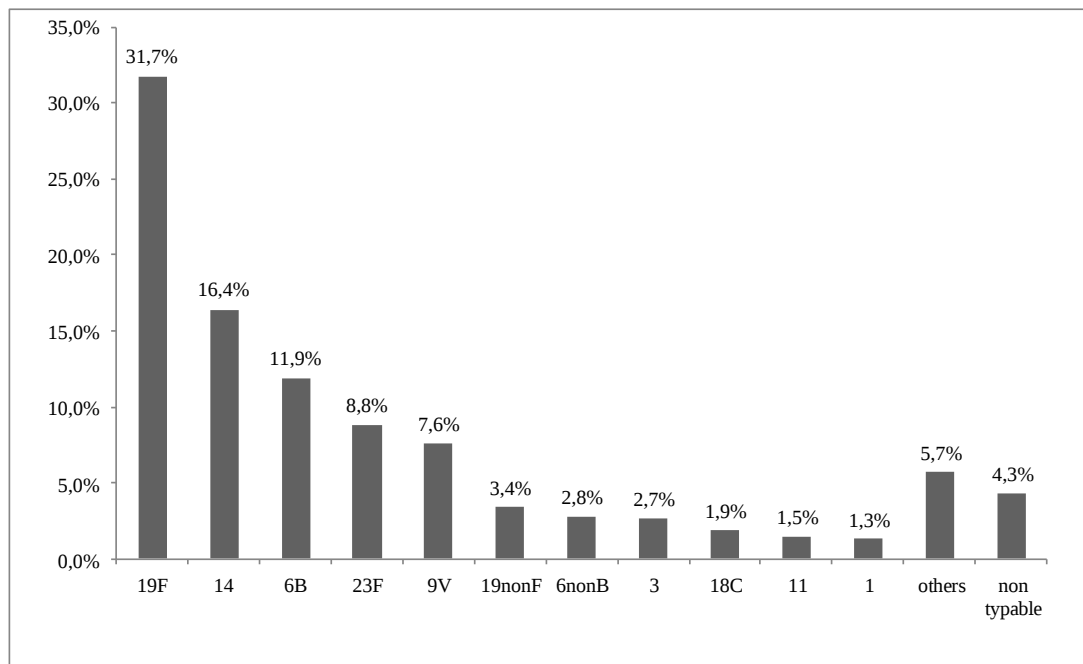
Εικόνα 10: Δενδρόγραμμα με βάση την νουκλεοτιδική αλληλουχία της PBP2B. Σε κάθε στέλεχος αναφέρεται ο κωδικός, ο ορότυπος και η τιμή ΕΑΠ της πενικιλίνης (Pen) και της κεφοταξίμης (Ctx). Για παράδειγμα, το 198_23F_Pen2_Ctx1 σημαίνει το στέλεχος Νο 198, οροτύπου 23F με ΕΑΠ στην πενικιλίνη = 2 mg/L και ΕΑΠ στην κεφοταξίμη = 1 mg/L.



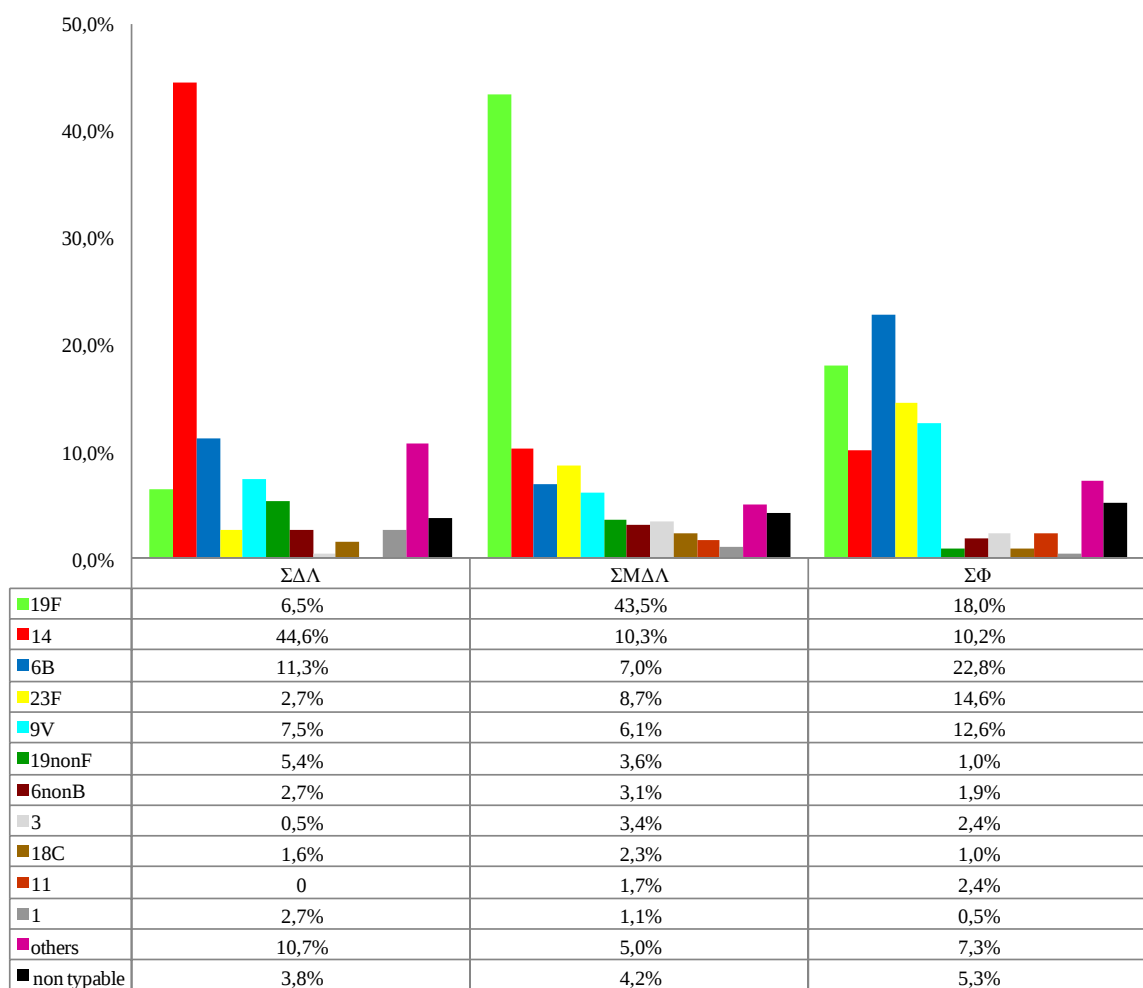
Εικόνα 11: Δενδρόγραμμα με βάση την νουκλεοτιδική αλληλουχία της PBP2X. Σε κάθε στέλεχος αναφέρεται ο κωδικός, ο ορότυπος και η τιμή ΕΑΠ της πενικιλίνης (Pen) και της κεφοταξίμης (Ctx). Για παράδειγμα, το 267_19F_Pen2_Ctx05 σημαίνει το στέλεχος Νο 267, ορότυπου 19F με ΕΑΠ στην πενικιλίνη = 2 mg/L και ΕΑΠ στην κεφοταξίμη = 0,5 mg/L.



Γράφημα 1. Ποσοστιαία κατανομή των οροομάδων – οροτύπων των στελεχών πνευμονιοκόκκων της συλλογής.



Γράφημα 2. Κατανομή των οροομάδων – οροτύπων σε συνάρτηση με τις ομάδες των κλινικών δειγμάτων.



Παράρτημα 2: Πίνακες Αποτελεσμάτων

Πίνακας 1: Ποσοστά αντοχής σε πενικιλίνη και κεφοταξίμη στο σύνολο των στελεχών.

Κατηγορία	Αντοχή σε Πενικιλίνη		Αντοχή σε Κεφοταξίμη	
	No	%	No	%
Διεισδυτικές λοιμώξεις	32	17,2	2	1,1
Μη διεισδυτικές λοιμώξεις	340	53	9	1,9
Ρινοφαρυγγική φορεία	89	43,2	1	0,5

Πίνακας 2: Πλήρης και Ενδιάμεση αντοχή των στελεχών πνευμονιοκόκκου στην πενικιλίνη και επιμέρους αντοχή ανάλογα με τα κλινικά δείγματα.

	Πλήρης		Ενδιάμεση	
	No	%	No	%
Σύνολο των στελεχών	133	12,9	328	31,8
ΣΔΛ	1	0,5	31	16,6
ΣΜΔΛ	106	16,5	234	36,5
ΣΦ	26	12,6	63	30,6

Πίνακας 3: Πλήρης και Ενδιάμεση αντοχή των στελεχών πνευμονιοκόκκου στην κεφοταξίμη και επιμέρους αντοχή ανάλογα με τα κλινικά δείγματα.

	Πλήρης		Ενδιάμεση	
	No	%	No	%
Σύνολο των στελεχών	2	0,2	10	1,0
ΣΔΛ	0	0	2	1,1
ΣΜΔΛ	1	0,2	8	1,2
ΣΦ	1	0,5	0	0

Πίνακας 4: Συνολική αντοχή των στελεχών πνευμονιοκόκκου στην ερυθρομυκίνη και επιμέρους αντοχή ανάλογα με τα κλινικά δείγματα.

	No	%
Σύνολο των στελεχών	450	43,6
ΣΔΛ	56	30,1
ΣΜΔΛ	319	49,8
ΣΦ	75	36,4

Πίνακας 5: Συνολική αντοχή των στελεχών πνευμονιοκόκκου στην κλινδαμυκίνη και επιμέρους αντοχή ανάλογα με τα κλινικά δείγματα.

	No	%
Σύνολο των στελεχών	128	12,4
ΣΔΛ	6	3,2
ΣΜΔΛ	87	13,6
ΣΦ	35	17,0

Πίνακας 6: Συνολικά ποσοστά φαινοτύπων MLS_B αντοχής των στελεχών και επιμέρους αντοχή ανάλογα με τα κλινικά δείγματα.

	M		CR		IR	
	No	%	No	%	No	%
Σύνολο των στελεχών	306	29,6	128	12,4	16	1,5
ΣΔΛ	48	25,8	6	3,2	2	1,1
ΣΜΔΛ	225	35,1	87	13,6	7	1,1
ΣΦ	33	16,0	35	17,0	7	3,4

Πίνακας 7: Κατανομή των ανθεκτικών στελεχών στη πενικιλίνη στους κυριότερους ορότυπους.

Ορότυποι	Αντοχή σε Πενικιλίνη	
	No	%
19F	226	49
14	41	8,9
23F	20	4,3
6B	18	3,9
9V	7	1,5

Πίνακας 8: Κατανομή των ανθεκτικών στελεχών στην ερυθρομυκίνη στους κυριότερους ορότυπους.

Ορότυποι	Αντοχή σε Ερυθρομυκίνη	
	No	%
19F	248	75,6
14	104	61,2
6B	40	32,5
23F	24	26,4
9V	8	10,1
19nonF	8	22,9
6nonB	4	13,8
3	3	10,8

Πίνακας 9: Κατανομή των ανθεκτικών στελεχών στην τετρακυκλίνη στους κυριότερους ορότυπους.

Ορότυποι	Αντοχή σε Τετρακυκλίνη	
	No	%
19F	241	73,5
14	26	15,3
6B	36	29,3
23F	35	38,5
9V	4	5,1
19nonF	3	8,6
6nonB	3	10,3
3	2	5,3

Πίνακας 10: Συνολικά ποσοστά φαινοτύπων MLS_B αντοχής επικρατέστερων και λιγότερο συχνών οροτύπων. Ποσοστά επί των στελεχών των επιμέρους οροτύπων.

Ορότυποι	MLS _B Φαινότυποι Αντοχής					
	M		CR		IR	
	No	%	No	%	No	%
19F	201	81,0	40	16,1	7	2,9
14	67	64,4	32	30,8	5	4,8
6B	11	27,5	26	65,0	3	7,5
23F	8	33,3	16	66,7	0	–
9V	5	62,5	2	25,0	1	12,5
19nonF	6	75,0	2	25,0	0	–
6nonB	2	50,0	2	50,0	0	–
3	1	33,3	2	66,7	0	–

Πίνακας 11: Αποτελέσματα ελέγχου γονιδιακής αντοχής MLS_B των ανθεκτικών στελεχών.

Ορότυποι	Γονίδια							
	<i>mefA/E</i>		<i>ermB</i>		<i>ermTR</i>		αρνητικά	
	No	%	No	%	No	%	No	%
19F	108	68,8	19	12,1	1	0,6	29	18,5
14	25	39,1	15	23,4	0	—	24	37,5
6B	6	18,2	19	57,6	0	—	8	24,2
23F	2	16,7	2	16,7	0	—	8	66,6
9V	0	—	1	100	0	—	0	—
19nonF	0	—	1	33,3	0	—	2	66,7
6nonB	1	50	1	50	0	—	0	—
3	0	—	0	—	0	—	1	100

Πίνακας 12: Αποτελέσματα ελέγχου υποτύπων των γονιδίων *mefA/E* ανά ορότυπο, μέσω τεχνητής PCR- RFLP.

Ορότυποι	Υπότυπος <i>mefE</i>		Υπότυπος <i>mefA</i>	
	No	%	No	%
19F	111	97,3	3	2,7
14	9	34,6	17	65,4
6B	3	75	1	25
23F	1	100	0	—
11	1	100	0	—
15	1	100	0	—

Πίνακας 13: Αποτελέσματα ελέγχου γονιδιακής αντοχής στην τετρακυκλίνη των επικρατέστερων και λιγότερο συχνών οροτύπων που εξετάστηκαν.

Ορότυποι	Γονίδια							
	<i>tetM</i>		<i>tetO</i> *		<i>tetM</i> - <i>tetO</i>		αρνητικά	
	No	%	No	%	No	%	No	%
19F	127	84,1	0	–	3	2,0	21	13,9
14	0	–	0	–	2	18,2	9	81,8
6B	24	85,7	0	–	1	3,6	3	10,7
23F	10	90,9	0	–	1	9,1	0	–
19nonF	3	100	0	–	0	–	0	–
9V	1	100	0	–	0	–	0	–
6nonB	1	100	0	–	0	–	0	–
3	1	100	0	–	0	–	0	–

*Σε κανένα από τα στελέχη που εξετάστηκαν το γονίδιο *tetO* δεν ανιχνεύθηκε μόνο του, παρά μόνο συνοδευόμενο από το γονίδιο *tetM*.

Παράρτημα 3: Δεδομένα νουκλεοτιδικών αλληλουχιών

Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες της PBP1A

>379_14_Pen2_Ctx1 1208 bases

CATACGTCTCTTACCCTGACGATGATTTGCAAGTCGCATCTACGGTCGTAGATGTTTCAA
ATGGTAAAGTCATCGCCCAACTTGGAGCTCGTCACCAAGCAAGTAACGTTTCATTTGGTA
CCAACCAAGCTGTGGAAACCAATCGTGACTGGGGTTCTGCTATGAAACCAATCACCGATT
ATGCACCTGCCATAGAATACGGTGTTTATGATTCCACTGCAACTATGGTTAATGATATTC
CTTATAACTATCCGGGAACAAGCACACCTGTCTACAACCTGGGATAGAGCATATTTTCGGTA
ATATTACTCTGCAATATGCTCTTCAACAATCACGAAATGTCACAGCCGTTGAGACTTTGA
ATAAGGTCGGTCTAGATAGAGCTAAAACCTTCCTTAATGGTCTTGGTATCGACTATCCAA
GCATGCATTATGCAAACGCCATTTCAAGTAATACAACAGAATCTAATAAACAATACGGAG
CAAGTAGTGAAAAAATGGCTGCTGCTTATGCTGCCTTTGCAAAATGGTGGCACTTACTATA
AACCAATGTATATCCATAAAGTCGTCTTCAGTGATGGAAGTAAAAAAGAGTTCTCTAATG
TCGGAACCTCGTGCCATGAAGGAAACGACAGCCTATATGATGACCGACATGATGAAAACAG
TCTTGACTTATGGAACCTGGGCGTGGAGCCTATCTTCCTTGGCTTCCTCAAGCTGGTAAAA
CAGGAACCTCTAACTATACAGATGAGGAAGTTGAAAACCATCAAGAACACTGGCTATG
TAGCTCCAGATGAAATGTTTGTGGTTATACTCGTAAGTATTCTATGGCTGTATGGACAG
GTTATTCGAATCGTTTAACTCCTATCGTTGGAGATGGTTTCCTAGTTGCAGCTAAAGTTT
ATCGCTCAATGATAACGTATCTATCAGAAGATACTCATCCAGAAGACTGGACGATGCCAG
ACGGACTTTTCAGAAACGGGGAATTTGTATTCAAAAATGGAGCTCGCCCAATATGGACTG
AACCCTCTACTCAACAATCCTCAACAGCTGAAAGTTCAAGCTCATCATCAGATAGTTCAA
CTTCACAGTCTAGCTCAACCACTCCAAGCACAAATAATAGTACGACTACCAATCCTAACA
ATAATACGCAACAATCAAATACAACCCCTGATCAACAAAATCAGAATCCTCTACCGAAAA
AAAGAACA

>791_14_Pen2_Ctx1 1208 bases

CATACGTCTCTTACCCTGACGATGATTTGCAAGTCGCATCTACGGTCGTAGATGTTTCAA
ATGGTAAAGTCATCGCCCAACTTGGAGCTCGTCACCAAGCAAGTAACGTTTCATTTGGTA
CCAACCAAGCTGTGGAAACCAATCGTGACTGGGGTTCTGCTATGAAACCAATCACCGATT
ATGCACCTGCCATAGAATACGGTGTTTATGATTCCACTGCAACTATGGTTAATGATATTC
CTTATAACTATCCGGGAACAAGCACACCTGTCTACAACCTGGGATAGAGCATATTTTCGGTA
ATATTACTCTGCAATATGCTCTTCAACAATCACGAAATGTCACAGCCGTTGAGACTTTGA
ATAAGGTCGGTCTAGATAGAGCTAAAACCTTCCTTAATGGTCTTGGTATCGACTATCCAA
GCATGCATTATGCAAACGCCATTTCAAGTAATACAACAGAATCTAATAAACAATACGGAG
CAAGTAGTGAAAAAATGGCTGCTGCTTATGCTGCCTTTGCAAAATGGTGGCACTTACTATA
AACCAATGTATATCCATAAAGTCGTCTTCAGTGATGGAAGTAAAAAAGAGTTCTCTAATG
TCGGAACCTCGTGCCATGAAGGAAACGACAGCCTATATGATGACCGACATGATGAAAACAG
TCTTGACTTATGGAACCTGGGCGTGGAGCCTATCTTCCTTGGCTTCCTCAAGCTGGTAAAA
CAGGAACCTCTAACTATACAGATGAGGAAGTTGAAAACCATCAAGAACACTGGCTATG
TAGCTCCAGATGAAATGTTTGTGGTTATACTCGTAAGTATTCTATGGCTGTATGGACAG
GTTATTCGAATCGTTTAACTCCTATCGTTGGAGATGGTTTCCTAGTTGCAGCTAAAGTTT
ATCGCTCAATGATAACGTATCTATCAGAAGATACTCATCCAGAAGACTGGACGATGCCAG
ACGGACTTTTCAGAAACGGGGAATTTGTATTCAAAAATGGAGCTCGCCCAATATGGACTG
AACCCTCTACTCAACAATCCTCAACAGCTGAAAGTTCAAGCTCATCATCAGATAGTTCAA
CTTCACAGTCTAGCTCAACCACTCCAAGCACAAATAATAGTACGACTACCAATCCTAACA
ATAATACGCAACAATCAAATACAACCCCTGATCAACAAAATCAGAATCCTCTACCGAAAA
AAAGAACA

>792_14_Pen2_Ctx1 1208 bases

CATACGTCTCTTACCCTGACGATGATTTGCAAGTCGCATCTACGGTCGTAGATGTTTCAA
ATGGTAAAGTCATCGCCCAACTTGGAGCTCGTCACCAAGCAAGTAACGTTTCATTTGGTA
CCAACCAAGCTGTGGAAACCAATCGTGACTGGGGTTCTGCTATGAAACCAATCACCGATT
ATGCACCTGCCATAGAATACGGTGTTTATGATTCCACTGCAACTATGGTTAATGATATTC
CTTATAACTATCCGGGAACAAGCACACCTGTCTACAACCTGGGATAGAGCATATTTTCGGTA
ATATTACTCTGCAATATGCTCTTCAACAATCACGAAATGTCACAGCCGTTGAGACTTTGA

ATAAGGTCGGTCTAGATAGAGCTAAAACCTTCCTTAATGGTCTTGGTATCGACTATCCAA
GCATGCATTATGCAAACGCCATTTCAAGTAATACAACAGAATCTAATAAACAATACGGAG
CAAGTAGTGAAAAAATGGCTGCTGCTTATGCTGCCTTTGCAAATGGTGGCACTTACTATA
AACCAATGTATATCCATAAAGTCGTCTTCAGTGATGGAAGTAAAAAAGAGTTCTCTAATG
TCGGAACCTCGTGCCATGAAGGAAACGACAGCCTATATGATGACCGACATGATGAAAACAG
TCTTGACTTATGGAACCTGGGCGTGGAGCCTATCTTCCTTGGCTTCCTCAAGCTGGTAAAA
CAGGAACCTCTAACTATACAGATGAGGAAGTTGAAAACCACATCAAGAACACTGGCTATG
TAGCTCCAGATGAAATGTTTGTTGGTTATACTCGTAAGTATTCTATGGCTGTATGGACAG
GTTATTCTGAATCGTTTAACTCCTATCGTTGGAGATGGTTTCCTAGTTGCAGCTAAAGTTT
ATCGCTCAATGATAACGTATCTATCAGAAGATACTCATCCAGAAGACTGGACGATGCCAG
ACGGACTTTTCAGAAACGGGGAATTTGTATTCAAAAATGGAGCTCGCCCAATATGGACTG
AACCCTCTACTCAACAATCCTCAACAGCTGAAAGTTCAAGCTCATCATCAGATAGTTCAA
CTTCACAGTCTAGCTCAACCACTCCAAGCACAAATAATAGTACGACTACCAATCCTAACA
ATAATACGCAACAATCAAATACAACCCCTGATCAACAAAATCAGAATCCTCTACCGAAAA
AAAGAACA

>825_14_Pen2_Ctx1 1208 bases

CATACGTCTCTTACCCTGACGATGATTTGCAAGTCGCATCTACGGTCGTAGATGTTTCAA
ATGGTAAAGTCATCGCCCAACTTGGAGCTCGTCACCAAGCAAGTAACGTTTCATTTGGTA
CCAACCAAGCTGTGGAAACCAATCGTGACTGGGGTTCTGCTATGAAACCAATCACCGATT
ATGCACCTGCCATAGAATACGGTGTTTATGATTCCACTGCAACTATGGTTAATGATATTC
CTTATAACTATCCGGGAACAAGCACACCTGTCTACAACCTGGGATAGAGCATATTTTCGGTA
ATATTACTCTGCAATATGCTCTTCAACAATCACGAAATGTCACAGCCGTTGAGACTTTGA
ATAAGGTCGGTCTAGATAGAGCTAAAACCTTCCTTAATGGTCTTGGTATCGACTATCCAA
GCATGCATTATGCAAACGCCATTTCAAGTAATACAACAGAATCTAATAAACAATACGGAG
CAAGTAGTGAAAAAATGGCTGCTGCTTATGCTGCCTTTGCAAATGGTGGCACTTACTATA
AACCAATGTATATCCATAAAGTCGTCTTCAGTGATGGAAGTAAAAAAGAGTTCTCTAATG
TCGGAACCTCGTGCCATGAAGGAAACGACAGCCTATATGATGACCGACATGATGAAAACAG
TCTTGACTTATGGAACCTGGGCGTGGAGCCTATCTTCCTTGGCTTCCTCAAGCTGGTAAAA
CAGGAACCTCTAACTATACAGATGAGGAAGTTGAAAACCACATCAAGAACACTGGCTATG
TAGCTCCAGATGAAATGTTTGTTGGTTATACTCGTAAGTATTCTATGGCTGTATGGACAG
GTTATTCTGAATCGTTTAACTCCTATCGTTGGAGATGGTTTCCTAGTTGCAGCTAAAGTTT
ATCGCTCAATGATAACGTATCTATCAGAAGATACTCATCCAGAAGACTGGACGATGCCAG
ACGGACTTTTCAGAAACGGGGAATTTGTATTCAAAAATGGAGCTCGCCCAATATGGACTG
AACCCTCTACTCAACAATCCTCAACAGCTGAAAGTTCAAGCTCATCATCAGATAGTTCAA
CTTCACAGTCTAGCTCAACCACTCCAAGCACAAATAATAGTACGACTACCAATCCTAACA
ATAATACGCAACAATCAAATACAACCCCTGATCAACAAAATCAGAATCCTCTACCGAAAA
AAAGAACA

>922_14_Pen2_Ctx05 1208 bases

CATACGTCTCTTACCCTGACGATGATTTGCAAGTCGCATCTACGGTCGTAGATGTTTCAA
ATGGTAAAGTCATCGCCCAACTTGGAGCTCGTCACCAAGCAAGTAACGTTTCATTTGGTA
CCAACCAAGCTGTGGAAACCAATCGTGACTGGGGTTCTGCTATGAAACCAATCACCGATT
ATGCACCTGCCATAGAATACGGTGTTTATGATTCCACTGCAACTATGGTTAATGATATTC
CTTATAACTATCCGGGAACAAGCACACCTGTCTACAACCTGGGATAGAGCATATTTTCGGTA
ATATTACTCTGCAATATGCTCTTCAACAATCACGAAATGTCACAGCCGTTGAGACTTTGA
ATAAGGTCGGTCTAGATAGAGCTAAAACCTTCCTTAATGGTCTTGGTATCGACTATCCAA
GCATGCATTATGCAAACGCCATTTCAAGTAATACAACAGAATCTAATAAACAATACGGAG
CAAGTAGTGAAAAAATGGCTGCTGCTTATGCTGCCTTTGCAAATGGTGGCACTTACTATA
AACCAATGTATATCCATAAAGTCGTCTTCAGTGATGGAAGTAAAAAAGAGTTCTCTAATG
TCGGAACCTCGTGCCATGAAGGAAACGACAGCCTATATGATGACCGACATGATGAAAACAG
TCTTGACTTATGGAACCTGGGCGTGGAGCCTATCTTCCTTGGCTTCCTCAAGCTGGTAAAA
CAGGAACCTCTAACTATACAGATGAGGAAGTTGAAAACCACATCAAGAACACTGGCTATG
TAGCTCCAGATGAAATGTTTGTTGGTTATACTCGTAAGTATTCTATGGCTGTATGGACAG
GTTATTCTGAATCGTTTAACTCCTATCGTTGGAGATGGTTTCCTAGTTGCAGCTAAAGTTT
ATCGCTCAATGATAACGTATCTATCAGAAGATACTCATCCAGAAGACTGGACGATGCCAG
ACGGACTTTTCAGAAACGGGGAATTTGTATTCAAAAATGGAGCTCGCCCAATATGGACTG
AACCCTCTACTCAACAATCCTCAACAGCTGAAAGTTCAAGCTCATCATCAGATAGTTCAA
CTTCACAGTCTAGCTCAACCACTCCAAGCACAAATAATAGTACGACTACCAATCCTAACA
ATAATACGCAACAATCAAATACAACCCCTGATCAACAAAATCAGAATCCTCTACCGAAAA

AAAGAACA
>926_14_Pen2_Ctx1 1208 bases
CATACTCTCTTACCCTGACGATGATTTGCAAGTCGCATCTACGGTCGTAGATGTTTCAA
ATGGTAAAGTCATCGCCCAACTTGGAGCTCGTCACCAAGCAAGTAACGTTTCATTTGGTA
CCAACCAAGCTGTGGAAACCAATCGTGACTGGGGTTCTGCTATGAAACCAATCACCGATT
ATGCACCTGCCATAGAATACGGTGTTTATGATTCCACTGCAACTATGGTTAATGATATTC
CTTATAACTATCCGGGAACAAGCACACCTGTCTACAACCTGGGATAGAGCATATTTTCGGTA
ATATTACTCTGCAATATGCTCTTCAACAATCACGAAATGTCACAGCCGTTGAGACTTTGA
ATAAGGTCGGTCTAGATAGAGCTAAAACCTTCCTTAATGGTCTTGGTATCGACTATCCAA
GCATGCATTATGCAAACGCCATTTCAAGTAATACAACAGAATCTAATAAACAATACGGAG
CAAGTAGTGAAAAAATGGCTGCTGCTTATGCTGCCTTTGCAAATGGTGGCACTTACTATA
AACCAATGTATATCCATAAAGTCGTCTTCAGTGATGGAAGTAAAAAAGAGTTCTCTAATG
TCGGAACCTCGTGCCATGAAGGAAACGACAGCCTATATGATGACCGACATGATGAAAACAG
TCTTGACTTATGGAACCTGGGCGTGGAGCCTATCTTCCTTGGCTTCCTCAAGCTGGTAAAA
CAGGAACCTCTAACTATACAGATGAGGAAGTTGAAAACACATCAAGAACACTGGCTATG
TAGCTCCAGATGAAATGTTTGTGGTTATACTCGTAAGTATTCTATGGCTGTATGGACAG
GTTATTCTGAATCGTTTAACTCCTATCGTTGGAGATGGTTTCCTAGTTGCAGCTAAAGTTT
ATCGCTCAATGATAACGTATCTATCAGAAGATACTCATCCAGAAGACTGGACGATGCCAG
ACGGACTTTTCAGAAACGGGGAATTTGTATTCAAAAATGGAGCTCGCCCAATATGGACTG
AACCCTCTACTCAACAATCCTCAACAGCTGAAAGTTCAAGCTCATCATCAGATAGTTCAA
CTTCACAGTCTAGCTCAACCACTCCAAGCACAAATAATAGTACGACTACCAATCCTAACA
ATAATACGCAACAATCAAATACAACCCCTGATCAACAAAATCAGAATCCTCTACCGAAAA
AAAGAACA

>971_14_Pen2_Ctx05 1208 bases
CATACTCTCTTACCCTGACGATGATTTGCAAGTCGCATCTACGGTCGTAGATGTTTCAA
ATGGTAAAGTCATCGCCCAACTTGGAGCTCGTCACCAAGCAAGTAACGTTTCATTTGGTA
CCAACCAAGCTGTGGAAACCAATCGTGACTGGGGTTCTGCTATGAAACCAATCACCGATT
ATGCACCTGCCATAGAATACGGTGTTTATGATTCCACTGCAACTATGGTTAATGATATTC
CTTATAACTATCCGGGAACAAGCACACCTGTCTACAACCTGGGATAGAGCATATTTTCGGTA
ATATTACTCTGCAATATGCTCTTCAACAATCACGAAATGTCACAGCCGTTGAGACTTTGA
ATAAGGTCGGTCTAGATAGAGCTAAAACCTTCCTTAATGGTCTTGGTATCGACTATCCAA
GCATGCATTATGCAAACGCCATTTCAAGTAATACAACAGAATCTAATAAACAATACGGAG
CAAGTAGTGAAAAAATGGCTGCTGCTTATGCTGCCTTTGCAAATGGTGGCACTTACTATA
AACCAATGTATATCCATAAAGTCGTCTTCAGTGATGGAAGTAAAAAAGAGTTCTCTAATG
TCGGAACCTCGTGCCATGAAGGAAACGACAGCCTATATGATGACCGACATGATGAAAACAG
TCTTGACTTATGGAACCTGGGCGTGGAGCCTATCTTCCTTGGCTTCCTCAAGCTGGTAAAA
CAGGAACCTCTAACTATACAGATGAGGAAGTTGAAAACACATCAAGAACACTGGCTATG
TAGCTCCAGATGAAATGTTTGTGGTTATACTCGTAAGTATTCTATGGCTGTATGGACAG
GTTATTCTGAATCGTTTAACTCCTATCGTTGGAGATGGTTTCCTAGTTGCAGCTAAAGTTT
ATCGCTCAATGATAACGTATCTATCAGAAGATACTCATCCAGAAGACTGGACGATGCCAG
ACGGACTTTTCAGAAACGGGGAATTTGTATTCAAAAATGGAGCTCGCCCAATATGGACTG
AACCCTCTACTCAACAATCCTCAACAGCTGAAAGTTCAAGCTCATCATCAGATAGTTCAA
CTTCACAGTCTAGCTCAACCACTCCAAGCACAAATAATAGTACGACTACCAATCCTAACA
ATAATACGCAACAATCAAATACAACCCCTGATCAACAAAATCAGAATCCTCTACCGAAAA
AAAGAACA

>002_19F_Pen2_Ctx025 1208 bases
CATACTCTCTTACCCTGACGATGATTTGCAAGTCGCTTCTACCATTGTTGATGTTTCTA
ACGGTAAAGTCATTGCCAGCTAGGAGCACGCCATCAGTCAAGTAATGTTTCCTTCGGAA
TTAACCAAGCAGTAGAAACAAACCGCGACTGGGGATCAACTATGAAACCGATCACAGACT
ATGCTCCTGCCTTGGAGTACGGTGCTACGATTCAACTGCTACTATCGTTCACGATGAGC
CCTATAACTACCTGGGACAAATACTCCTGTTTATAACTGGGATAGGGGCTACTTTGGCA
ACATCACCTTGCAATACGCCCTGCAACAATCGCGAAACGTCCCAGCCGTGGAAACTCTAA
ACAAGGTCGGACTCAACCGCGCCAAGACTTTCCTAAATGGTCTCGGAATCGACTACCCAA
GTATTCATACTCAATGCCATTTCAAGTAACACAACCGAATCAGACAAAAAATATGGAG
CAAGTAGTGAAAAGATGGCTGCTGCTTACGCTGCCTTTGCAAATGGTGGAACTTACTATA
AACCAATGTATATCCATAAAGTCGTCTTTAGTGATGGGAGTGAAAAGAGTTCTCTAATG
TCGGAACCTCGTGCCATGAAGGAAACGACAGCCTATATGATGACCGACATGATGAAAACAG
TCTTGACTTATGGAACCTGGACGAAATGCCTATCTTGCTTGGCTCCCTCAGGCTGGTAAAA

CAGGAACCTCTAACTATACAGACGAGGAAATTGAAAACCACATCAAGACCTCTCAATTTG
TAGCACCTGACGAACTATTTGCTGGCTATACGCGTAAATATTCAATGGCTGTATGGACAG
GCTATTCTAACCGTCTGACACCACTTGTAGGCAATGGCCTTACGGTCGCTGCCAAAGTTT
ACCGCTCAATGATGACCTACCTGTCTGAAGGAAGCAATCCAGAGGATTGGAATATACCAG
AGGGGCTCTACAGAAATGGAGAATTCGTATTTAAAAATGGTGCTCGTTCTACGTGGAAC
CACCTGCTCCACAACAACCCCCATCAACTGAAAGTTCAAGCTCATCATCAGATAGTTCAA
CTTCACAGTCTAGCTCAACCACTCCAAGCACAAATAATAGTACGACTACCAATCCTAACA
ATAATACGCAACAATCAAATACAACCCCTGATCAACAAAATCAGAATCCTCATCCGAAAA
CCAGCACA

>111_19F_Pen2_Ctx05 1208 bases

CATACGTCTCTTACCCTGACGATGATTTGCAAGTCGCATCTACGGTCGTAGATGTTTCAA
ATGGTAAAGTCATCGCCCAACTTGGAGCTCGTCACCAAGCAAGTAACGTTTCATTTGGTA
CCAACCAAGCTGTGGAAACCAATCGTGACTGGGGTTCTGCTATGAAACCAATCACCGATT
ATGCACCTGCCATAGAATACGGTGTTTATGATTCCACTGCAACTATGGTTAATGATATTC
CTTATAACTATCCGGGAACAAGCACACCTGTCTACAACCTGGGATAGAGCATATTTTCGGTA
ATATTACTCTGCAATATGCTCTTCAACAATCACGAAATGTCACAGCCGTTGAGACTTTGA
ATAAGGTCGGTCTAGATAGAGCTAAAACCTTCCTTAATGGTCTTGGTATCGACTATCCAA
GCATGCATTATGCAAACGCCATTTCAAGTAATACAACAGAATCTAATAAACAATACGGAG
CAAGTAGTGAAAAAATGGCTGCTGCTTATGCTGCCTTTGCCAACGGTGGAATTTACCACA
AACCCATGTATATCAATAAGGTCGTCTTCAGTGACGGTAGTAAAAAAGAATTTTCAGATG
TAGGTACACGAGCTATGAAAGAAAACACTGCTTACATGATGACCGAAATGATGAAAACCTG
TCTTGGCATACGGAACCTGGTCGTGGAGCCTATCTCCCATGGTTAGCGCAAGCTGGTAAGA
CAGGTACTTCTAACTACACAGATGATGAAATTGAAAAACACATCAAGAACACTGGCTATG
TAGCTCCAGATGAAATGTTTGTGGTTATACTCGTAAGTATTCTATGGCTGTATGGACAG
GTTATTCGAATCGTTTAACTCCTATCGTTGGAGATGGTTTCCTAGTTGCAGCTAAAGTTT
ACCGCTCAATGATAACCTACCTGTCTGAAGGAAGCAATCCAGAGGATTGGAATATACCAG
AGGGGCTCTACAGAAATGGAGAATTCGTATTTAAAAATGGTGCTCGTTCTACGTGGAAC
CACCTGCTCCACAACAACCCCCATCAACTGAAAGTTCAAGCTCATCATCAGATAGTTCAA
CTTCACAGTCTAACTCAACCACTCCAAGCACAAATAATAGTACGACTACCAATCCTAACA
ATAATACGCAACAATCAAATACAACCCCTGATCAACAAAATCAGAATCCTCATCCGAAAA
CCAGCACA

>267_19F_Pen2_Ctx05 1208 bases

CATACGTCTCTTACCCTGACGATGATTTGCAAGTCGCATCTACGGTCGTAGATGTTTCAA
ATGGTAAAGTCATCGCCCAACTTGGAGCTCGTCACCAAGCAAGTAACGTTTCATTTGGTA
CCAACCAAGCTGTGGAAACCAATCGTGACTGGGGTTCTGCTATGAAACCAATCACCGATT
ATGCACCTGCCATAGAATACGGTGTTTATGATTCCACTGCAACTATGGTTAATGATATTC
CTTATAACTATCCGGGAACAAGCACACCTGTCTACAACCTGGGATAGAGCATATTTTCGGTA
ATATTACTCTGCAATATGCTCTTCAACAATCACGAAATGTCACAGCCGTTGAGACTTTGA
ATAAGGTCGGTCTAGATAGAGCTAAAACCTTCCTTAATGGTCTTGGTATCGACTATCCAA
GCATGCATTATGCAAACGCCATTTCAAGTAATACAACAGAATCTAATAAACAATACGGAG
CAAGTAGTGAAAAAATGGCTGCTGCTTATGCTGCCTTTGCAAAATGGTGGAACCTACTATA
AACCAATGTATATCCATAAAGTCGTCTTCAGTGATGGAAGTAAAAAAGAGTTCTCTAATG
TCGGAACCTCGTGCCATGAAGGAAACGACAGCCTATATGATGACCGACATGATGAAAACAG
TCTTGAACCTATGGAACCTGGGCGTGGAGCCTATCTTCCTTGGCTTCCTCAAGCTGGTAAAA
CAGGAACCTCTAACTATACAGATGAGGAAGTTGAAAACCACATCAAGAACACTGGCTATG
TAGCTCCAGATGAAATGTTTGTGGTTATACTCGTAAGTATTCTATGGCTGTATGGACAG
GTTATTCGAATCGTTTAACTCCTATCGTTGGAGATGGTTTCCTAGTTGCAGCTAAAGTTT
ACCGCTCAATGATAACCTACCTGTCTGAAGATACTCATCCAGAGGATTGGACGATACCAG
AGGGGCTCTACAGAAATGGAGAATTCGTATTTAAAAATGGTGCTCGCCCAACATGGAAC
CACCTGCTCCACAACAACCCCCATCAACTGAAAGTTCAAGCTCATCATCAGATAGTTCAA
CTTCACAGTCTAGCTCAACCACTCCAAGCACAAATAATAGTACGACTACCAATCCTAACA
ATAATACGCAACAATCAAATACAACCCCTGATCAACAAAATCAGAATCCTCAACCGAAAA
CCAGAACA

>272_19F_Pen2_Ctx05 1208 bases

CATACGTCTCTTACCCTGACGATGATTTGCAAGTCGCTTCTACCATTGTTGATGTTTCTA
ACGGTAAAGTCATTGCCAGCTAGGAGCACGCCATCAGTCAAGTAATGTTTCCTTCGGAA
TTAACCAAGCAGTAGAAACAAACCGCGACTGGGGATCAACTATGAAACCGATCACAGACT
ATGCTCCTGCCTTGGAGTACGGTGCTACGATTCAACTGCTACTATCGTTCACGATGAGC

CCTATAACTACCCTGGGACAAATACTCCTGTTTATAACTGGGATAGGGGCTACTTTGGCA
ACATCACCTTGCAATACGCCCTGCAACAATCGCGAAACGTCCCAGCCGTGGAAACTCTAA
ACAAGGTCGGACTCAACCGCGCCAAGACTTTCTAAATGGTCTCGGAATCGACTACCCAA
GTATTCACTACTCAAATGCCATTTCAAGTAACACAACCGAATCAGACAAAAAATATGGAG
CAAGTAGTGAAAAGATGGCTGCTGCTTACGCTGCCTTTGCAAATGGTGGAACCTACTATA
AACCAATGTATATCCATAAAGTCGTCTTTAGTGATGGGAGTGAAAAAGAGTTCTCTAATG
TCGGAACCTCGTGCCATGAAGGAAACGACAGCCTATATGATGACCGACATGATGAAAACAG
TCTTGACTTATGGAACCTGGACGAAATGCCTATCTTGCTTGGCTCCCTCAGGCTGGTAAAA
CAGGAACCTCTAACTATACAGACGAGGAAATTGAAAACCACATCAAGACCTCTCAATTTG
TAGCACCTGACGAACTATTTGCTGGCTATACGCGTAAATATTCAATGGCTGTATGGACAG
GCTATTCTAACCGTCTGACACCACTTGTAGGCAATGGCCTTACGGTCGCTGCCAAAGTTT
ACCGCTCAATGATGACCTACCTGTCTGAAGGAAGCAATCCAGAGGATTGGAATATACCAG
AGGGGCTCTACAGAAATGGAGAATTCGTATTTAAAAATGGTGCTCGTTCTACGTGGAAC
CACCTGCTCCACAACAACCCCCATCAACTGAAAGTTCAAGCTCATCATCAGATAGTTCAA
CTTCACAGTCTAGCTCAACCACTCCAAGCACAAATAATAGTACGACTACCAATCCTAACA
ATAATACGCAACAATCAAATACAACCCCTGATCAACAAAATCAGAATCCTCATCCGAAAA
CCAGCACA

>568_19F_Pen4_Ctx2 1208 bases

CATACGTCTCTTACCCTGACGATGATTTGCAAGTCGCATCTACGGTCGTAGATGTTTCAA
ATGGTAAAGTCATCGCACAACTTGGTGCTCGTCATCAAGCAAGTAATGTTTCATTTCGGTA
CCAACCAGGCCGTAGAAACCAATCGTGACTGGGGATCATCAATGAAACCAATCACTGACT
ATGCTCCCGCTTTAGAATATGGAGTCTATGACTCTACTGCTTCTATTGTACATGATGTCC
CTTATAACTATCCTGGCACTGATACTCCACTCTACAACCTGGGATCATGTCTACTTTGGAA
ACATTACAATCCAGTATGCTCTTCAACAATCACGAAATGTCACAGCCGTTGAGACTTTGA
ATAAGGTCGGTCTAGATAGAGCTAAAACCTTCCTTAATGGTCTTGGTATCGACTATCCAA
GCATGCATTATGCAAACGCCATTTCAAGTAACACAACCTGAATCCAACAAAAAATATGGTG
CAAGTAGTGAAAAAATGGCTGCTGCCTACGCTGCTTTTGCTAATGGTGGTATTTATCACA
AACCAATGTATATCAATAAAAATCGTCTTTAGTGATGGTAGCGAAAAAGAATTTTCTGATG
CTGGTACACGAGCTATGAAAGAGACTACTGCCTATATGATGACTGAAATGATGAAAACCTG
TTTTAACTTACGGAACAGGACGTGGAGCCTACCTACCATGGCTTCCACAAGCAGGTAAGA
CAGGTACTTCTAACTATACTGACGAAGAAATTGAAAAGTATATCAAGAACACTGGCTACG
TAGCTCCAGATGAAATGTTTGTGGGTTATACTCGTAAGTATTCTATGGCTGTATGGACAG
GTTATTTCGAATCGTTTAACTCCTATCGTTGGAGATGGTTTCCTAGTTGCAGCTAAAGTTT
ATCGCTCTATGATGACCTACCTGTCTGAAGGAAGCAATCCAGAGGATTGGAATATACCAG
AGGGGCTCTACAGAAATGGAGAATTCGTATTTAAAAATGGTGCTCGTTCTACGTGGAGCT
CACCTGCTCCACAACAACCCCCATCAACTGAAAGTTCAAGCTCATCATCAGATAGTTCAA
CTTCACAGTCTAGCTCAACCACTCCAAGCACAAATAATAGTACGACTACCAATCCTAACA
ATAATACGCAACAATCAAATACAACCCCTGATCAACAAAATCAGAATCCTCATCCGAACC
CCAGCACA

>578_19F_Pen4_Ctx2 1208 bases

CATACGTCTCTTACCCTGACGATGATTTGCAAGTCGCATCTACGGTCGTAGATGTTTCAA
ATGGTAAAGTCATCGCACAACTTGGTGCTCGTCATCAAGCAAGTAATGTTTCATTTCGGTA
CCAACCAGGCCGTAGAAACCAATCGTGACTGGGGATCATCAATGAAACCAATCACTGACT
ATGCTCCCGCTTTAGAATATGGAGTCTATGACTCTACTGCTTCTATTGTACATGATGTCC
CTTATAACTATCCTGGCACTGATACTCCACTCTACAACCTGGGATCATGTCTACTTTGGAA
ACATTACAATCCAGTATGCTCTTCAACAATCACGAAATGTCACAGCCGTTGAGACTTTGA
ATAAGGTCGGTCTAGATAGAGCTAAAACCTTCCTTAATGGTCTTGGTATCGACTATCCAA
GCATGCATTATGCAAACGCCATTTCAAGTAACACAACCTGAATCCAACAAAAAATATGGTG
CAAGTAGTGAAAAAATGGCTGCTGCCTACGCTGCTTTTGCTAATGGTGGTATTTATCACA
AACCAATGTATATCAATAAAAATCGTCTTTAGTGATGGTAGCGAAAAAGAATTTTCTGATG
CTGGTACACGAGCTATGAAAGAGACTACTGCCTATATGATGACTGAAATGATGAAAACCTG
TTTTAACTTACGGAACAGGACGTGGAGCCTACCTACCATGGCTTCCACAAGCAGGTAAGA
CAGGTACTTCTAACTATACTGACGAAGAAATTGAAAAGTATATCAAGAACACTGGCTACG
TAGCTCCAGATGAAATGTTTGTGGGTTATACTCGTAAGTATTCTATGGCTGTATGGACAG
GTTATTTCGAATCGTTTAACTCCTATCGTTGGAGATGGTTTCCTAGTTGCAGCTAAAGTTT
ATCGCTCTATGATGACCTACCTGTCTGAAGGAAGCAATCCAGAGGATTGGAATATACCAG
AGGGGCTCTACAGAAATGGAGAATTCGTATTTAAAAATGGTGCTCGTTCTACGTGGAGCT
CACCTGCTCCACAACAACCCCCATCAACTGAAAGTTCAAGCTCATCATCAGATAGTTCAA

CTTCACAGTCTAGCTCAACCACTCCAAGCACAAATAATAGTACGACTACCAATCCTAACA
ATAATACGCAACAATCAAATACAACCCCTGATCAACAAAATCAGAATCCTCATCCGAACC
CCAGCACA

>582_19F_Pen4_Ctx2 1208 bases

CATACGTCTCTTACCCTGACGATGATTTGCAAGTCGCATCTACGGTCGTAGATGTTTCAA
ATGGTAAAGTCATCGCACAACTTGGTGCTCGTCATCAAGCAAGTAATGTTTCATTTCGGTA
CCAACCAGGCCGTAGAAACCAATCGTGACTGGGGATCATCAATGAAACCAATCACTGACT
ATGCTCCCGCTTTAGAATATGGAGTCTATGACTCTACTGCTTCTATTGTACATGATGTCC
CTTATAACTATCCTGGCACTGATACTCCACTCTACAACCTGGGATCATGTCTACTTTGGAA
ACATTACAATCCAGTATGCTCTTCAACAATCACGAAATGTCACAGCCGTTGAGACTTTGA
ATAAGGTCGGTCTAGATAGAGCTAAAACCTTCCTTAATGGTCTTGGTATCGACTATCCAA
GCATGCATTATGCAAACGCCATTTCAAGTAACACAACCTGAATCCAACAAAAAATATGGTG
CAAGTAGTGAAAAAATGGCTGCTGCCTACGCTGCTTTTGCTAATGGTGGTATTTATCACA
AACCAATGTATATCAATAAAAATCGTCTTTAGTGATGGTAGCGAAAAAGAATTTTCTGATG
CTGGTACACGAGCTATGAAAGAGACTACTGCCTATATGATGACTGAAATGATGAAAACCTG
TTTTAACTTACGGAACAGGACGTGGAGCCTACCTACCATGGCTTCCACAAGCAGGTAAGA
CAGGTACTTCTAACTATACTGACGAAGAAATTGAAAAGTATATCAAGAACACTGGCTACG
TAGCTCCAGATGAAATGTTTGTGGGTATATACTCGTAAGTATTCTATGGCTGTATGGACAG
GTTATTTCGAATCGTTTAACTCCTATCGTTGGAGATGGTTTCCTAGTTGCAGCTAAAGTTT
ATCGCTCTATGATGACCTACCTGTCTGAAGGAAGCAATCCAGAGGATTGGAATATACCAG
AGGGGCTCTACAGAAATGGAGAATTCGTATTTAAAAATGGTGCTCGTTCTACGTGGAGCT
CACCTGCTCCACAACAACCCCATCAACTGAAAGTTCAAGCTCATCATCAGATAGTTCAA
CTTCACAGTCTAGCTCAACCACTCCAAGCACAAATAATAGTACGACTACCAATCCTAACA
ATAATACGCAACAATCAAATACAACCCCTGATCAACAAAATCAGAATCCTCATCCGAACC
CCAGCACA

>584_19F_Pen4_Ctx2 1208 bases

CATACGTCTCTTACCCTGACGATGATTTGCAAGTCGCATCTACGGTCGTAGATGTTTCAA
ATGGTAAAGTCATCGCACAACTTGGTGCTCGTCATCAAGCAAGTAATGTTTCATTTCGGTA
CCAACCAGGCCGTAGAAACCAATCGTGACTGGGGATCATCAATGAAACCAATCACTGACT
ATGCTCCCGCTTTAGAATATGGAGTCTATGACTCTACTGCTTCTATTGTACATGATGTCC
CTTATAACTATCCTGGCACTGATACTCCACTCTACAACCTGGGATCATGTCTACTTTGGAA
ACATTACAATCCAGTATGCTCTTCAACAATCACGAAATGTCACAGCCGTTGAGACTTTGA
ATAAGGTCGGTCTAGATAGAGCTAAAACCTTCCTTAATGGTCTTGGTATCGACTATCCAA
GCATGCATTATGCAAACGCCATTTCAAGTAACACAACCTGAATCCAACAAAAAATATGGTG
CAAGTAGTGAAAAAATGGCTGCTGCCTACGCTGCTTTTGCTAATGGTGGTATTTATCACA
AACCAATGTATATCAATAAAAATCGTCTTTAGTGATGGTAGCGAAAAAGAATTTTCTGATG
CTGGTACACGAGCTATGAAAGAGACTACTGCCTATATGATGACTGAAATGATGAAAACCTG
TTTTAACTTACGGAACAGGACGTGGAGCCTACCTACCATGGCTTCCACAAGCAGGTAAGA
CAGGTACTTCTAACTATACTGACGAAGAAATTGAAAAGTATATCAAGAACACTGGCTACG
TAGCTCCAGATGAAATGTTTGTGGGTATATACTCGTAAGTATTCTATGGCTGTATGGACAG
GTTATTTCGAATCGTTTAACTCCTATCGTTGGAGATGGTTTCCTAGTTGCAGCTAAAGTTT
ATCGCTCTATGATGACCTACCTGTCTGAAGGAAGCAATCCAGAGGATTGGAATATACCAG
AGGGGCTCTACAGAAATGGAGAATTCGTATTTAAAAATGGTGCTCGTTCTACGTGGAGCT
CACCTGCTCCACAACAACCCCATCAACTGAAAGTTCAAGCTCATCATCAGATAGTTCAA
CTTCACAGTCTAGCTCAACCACTCCAAGCACAAATAATAGTACGACTACCAATCCTAACA
ATAATACGCAACAATCAAATACAACCCCTGATCAACAAAATCAGAATCCTCATCCGAACC
CCAGCACA

>640_19F_Pen4_Ctx2 1208 bases

CATACGTCTCTTACCCTGACGATGATTTGCAAGTCGCATCTACGGTCGTAGATGTTTCAA
ATGGTAAAGTCATCGCACAACTTGGTGCTCGTCATCAAGCAAGTAATGTTTCATTTCGGTA
CCAACCAGGCCGTAGAAACCAATCGTGACTGGGGATCATCAATGAAACCAATCACTGACT
ATGCTCCCGCTTTAGAATATGGAGTCTATGACTCTACTGCTTCTATTGTACATGATGTCC
CTTATAACTATCCTGGCACTGATACTCCACTCTACAACCTGGGATCATGTCTACTTTGGAA
ACATTACAATCCAGTATGCTCTTCAACAATCACGAAATGTCACAGCCGTTGAGACTTTGA
ATAAGGTCGGTCTAGATAGAGCTAAAACCTTCCTTAATGGTCTTGGTATCGACTATCCAA
GCATGCATTATGCAAACGCCATTTCAAGTAACACAACCTGAATCCAACAAAAAATATGGTG
CAAGTAGTGAAAAAATGGCTGCTGCCTACGCTGCTTTTGCTAATGGTGGTATTTATCACA
AACCAATGTATATCAATAAAAATCGTCTTTAGTGATGGTAGCGAAAAAGAATTTTCTGATG

CTGGTACACGAGCTATGAAAGAGACTACTGCCTATATGATGACTGAAATGATGAAAACTG
TTTTAACTTACGGAACAGGACGTGGAGCCTACCTACCATGGCTTCCACAAGCAGGTAAGA
CAGGTACTTCTAACTATACTGACGAAGAAATTGAAAAGTATATCAAGAACACTGGCTACG
TAGCTCCAGATGAAATGTTTGTGGGTTATACTCGTAAGTATTCTATGGCTGTATGGACAG
GTTATTTCGAATCGTTTAACTCCTATCGTTGGAGATGGTTTCCTAGTTGCAGCTAAAGTTT
ATCGCTCTATGATGACCTACCTGTCTGAAGGAAGCAATCCAGAGGATTGGAATATACCAG
AGGGGCTCTACAGAAATGGAGAATTCGTATTTAAAAATGGTGCTCGTTCTACGTGGAGCT
CACCTGCTCCACAACAACCCCCATCAACTGAAAGTTCAAGCTCATCATCAGATAGTTCAA
CTTCACAGTCTAGCTCAACCACTCCAAGCACAAATAATAGTACGACTACCAATCCTAACA
ATAATACGCAACAATCAAATACAACCCCTGATCAACAAAATCAGAATCCTCATCCGAACC
CCAGCACA

>794_19F_Pen4_Ctx2 1208 bases

CATACGTCTCTTACCCTGACGATGATTTGCAAGTCGCATCTACGGTCGTAGATGTTTCAA
ATGGTAAAGTCATCGCACAACTTGGTGCTCGTCATCAAGCAAGTAATGTTTCATTTCGGTA
CCAACCAGGCCGTAGAAACCAATCGTGACTGGGGATCATCAATGAAACCAATCACTGACT
ATGCTCCCGCTTTAGAATATGGAGTCTATGACTCTACTGCTTCTATTGTACATGATGTCC
CTTATAACTATCCTGGCACTGATACTCCACTCTACAACCTGGGATCATGTCTACTTTGGAA
ACATTACAATCCAGTATGCTCTTCAACAATCACGAAATGTCACAGCCGTTGAGACTTTGA
ATAAGGTCGGTCTAGATAGAGCTAAAACCTTCCTTAATGGTCTTGGTATCGACTATCCAA
GCATGCATTATGCAAACGCCATTTCAAGTAACACAACCTGAATCCAACAAAAAATATGGTG
CAAGTAGTGAAAAAATGGCTGCTGCCTACGCTGCTTTTGCTAATGGTGGTATTTATCACA
AACCAATGTATATCAATAAAAATCGTCTTTAGTGATGGTAGCGAAAAAGAATTTTCTGATG
CTGGTACACGAGCTATGAAAGAGACTACTGCCTATATGATGACTGAAATGATGAAAACTG
TTTTAACTTACGGAACAGGACGTGGAGCCTACCTACCATGGCTTCCACAAGCAGGTAAGA
CAGGTACTTCTAACTATACTGACGAAGAAATTGAAAAGTATATCAAGAACACTGGCTACG
TAGCTCCAGATGAAATGTTTGTGGGTTATACTCGTAAGTATTCTATGGCTGTATGGACAG
GTTATTTCGAATCGTTTAACTCCTATCGTTGGAGATGGTTTCCTAGTTGCAGCTAAAGTTT
ATCGCTCTATGATGACCTACCTGTCTGAAGGAAGCAATCCAGAGGATTGGAATATACCAG
AGGGGCTCTACAGAAATGGAGAATTCGTATTTAAAAATGGTGCTCGTTCTACGTGGAGCT
CACCTGCTCCACAACAACCCCCATCAACTGAAAGTTCAAGCTCATCATCAGATAGTTCAA
CTTCACAGTCTAGCTCAACCACTCCAAGCACAAATAATAGTACGACTACCAATCCTAACA
ATAATACGCAACAATCAAATACAACCCCTGATCAACAAAATCAGAATCCTCATCCGAACC
CCAGCACA

>905_19F_Pen4_Ctx2 1208 bases

CATACGTCTCTTACCCTGACGATGATTTGCAAGTCGCATCTACGGTCGTAGATGTTTCAA
ATGGTAAAGTCATCGCACAACTTGGTGCTCGTCATCAAGCAAGTAATGTTTCATTTCGGTA
CCAACCAGGCCGTAGAAACCAATCGTGACTGGGGATCATCAATGAAACCAATCACTGACT
ATGCTCCCGCTTTAGAATATGGAGTCTATGACTCTACTGCTTCTATTGTACATGATGTCC
CTTATAACTATCCTGGCACTGATACTCCACTCTACAACCTGGGATCATGTCTACTTTGGAA
ACATTACAATCCAGTATGCTCTTCAACAATCACGAAATGTCACAGCCGTTGAGACTTTGA
ATAAGGTCGGTCTAGATAGAGCTAAAACCTTCCTTAATGGTCTTGGTATCGACTATCCAA
GCATGCATTATGCAAACGCCATTTCAAGTAACACAACCTGAATCCAACAAAAAATATGGTG
CAAGTAGTGAAAAAATGGCTGCTGCCTACGCTGCTTTTGCTAATGGTGGTATTTATCACA
AACCAATGTATATCAATAAAAATCGTCTTTAGTGATGGTAGCGAAAAAGAATTTTCTGATG
CTGGTACACGAGCTATGAAAGAGACTACTGCCTATATGATGACTGAAATGATGAAAACTG
TTTTAACTTACGGAACAGGACGTGGAGCCTACCTACCATGGCTTCCACAAGCAGGTAAGA
CAGGTACTTCTAACTATACTGACGAAGAAATTGAAAAGTATATCAAGAACACTGGCTACG
TAGCTCCAGATGAAATGTTTGTGGGTTATACTCGTAAGTATTCTATGGCTGTATGGACAG
GTTATTTCGAATCGTTTAACTCCTATCGTTGGAGATGGTTTCCTAGTTGCAGCTAAAGTTT
ATCGCTCTATGATGACCTACCTGTCTGAAGGAAGCAATCCAGAGGATTGGAATATACCAG
AGGGGCTCTACAGAAATGGAGAATTCGTATTTAAAAATGGTGCTCGTTCTACGTGGAGCT
CACCTGCTCCACAACAACCCCCATCAACTGAAAGTTCAAGCTCATCATCAGATAGTTCAA
CTTCACAGTCTAGCTCAACCACTCCAAGCACAAATAATAGTACGACTACCAATCCTAACA
ATAATACGCAACAATCAAATACAACCCCTGATCAACAAAATCAGAATCCTCATCCGAACC
CCAGCACA

>960_19F_Pen4_Ctx4 1208 bases

CATACGTCTCTTACCCTGACGATGATTTGCAAGTCGCATCTACGGTCGTAGATGTTTCAA
ATGGTAAAGTCATCGCACAACTTGGTGCTCGTCATCAAGCAAGTAATGTTTCATTTCGGTA

CCAACCAGGCCGTAGAAACCAATCGTGACTGGGGATCATCAATGAAACCAATCACTGACT
 ATGCTCCCGCTTTAGAATATGGAGTCTATGACTCTACTGCTTCTATTGTACATGATGTCC
 CTTATAACTATCCTGGCACTGATACTCCACTCTACAACCTGGGATCATGTCTACTTTGGAA
 ACATTACAATCCAGTATGCTCTTCAACAATCACGAAATGTCACAGCCGTTGAGACTTTGA
 ATAAGGTCGGTCTAGATAGAGCTAAAACCTTCCTTAATGGTCTTGGTATCGACTATCCAA
 GCATGCATTATGCAAACGCCATTTCAAGTAACACAACCTGAATCCAACAAAAAATATGGTG
 CAAGTAGTGAAAAAATGGCTGCTGCCTACGCTGCTTTTGCTAATGGTGGTATTTATCACA
 AACCAATGTATATCAATAAAAATCGTCTTTAGTGATGGTAGCGAAAAAGAATTTTCTGATG
 CTGGTACACGAGCTATGAAAGAGACTACTGCCTATATGATGACTGAAATGATGAAAACTG
 TTTTAACCTTACGGAACAGGACGTGGAGCCTACCTACCATGGCTTCCACAAGCAGGTAAGA
 CAGGTACTTCTAACTATACTGACGAAGAAATTGAAAAGTATATCAAGAACACTGGCTACG
 TAGCTCCAGATGAAATGTTTGTGGGTATATACTCGTAAGTATTCTATGGCTGTATGGACAG
 GTTATTTCGAATCGTTTAACTCCTATCGTTGGAGATGGTTTCCTAGTTGCAGCTAAAGTTT
 ATCGCTCTATGATGACCTACCTGTCTGAAGGAAGCAATCCAGAGGATTGGAATATACCAG
 AGGGGCTCTACAGAAATGGAGAATTCGTATTTAAAAATGGTGCTCGTTCTACGTGGAGCT
 CACCTGCTCCACAACAACCCCATCAACTGAAAGTTCAAGCTCATCATCAGATAGTTCAA
 CTTACAGTCTAGCTCAACCACTCCAAGCACAAATAATAGTACGACTACCAATCCTAACA
 ATAATACGCAACAATCAAATACAACCCCTGATCAACAAAATCAGAATCCTCATCCGAACC
 CCAGCACA

>17_23F_Pen2_Ctx05 1208 bases

CATACGTCTCTTACCCTGACGATGATTTGCAAGTCGCTTCTACCATTGTTGATGTTTCTA
 ACGGTAAAGTCATTGCCAGCTAGGAGCACGCCATCAGTCAAGTAATGTTTCCTTCGGAA
 TTAACCAAGCAGTAGAAACAAACCGCGACTGGGGATCAACTATGAAACCGATCACAGACT
 ATGCTCCTGCCTTGGAGTACGGTGTCTACGATTCAACTGCTACTATCGTTTCACGATGAGC
 CCTATAACTACCCTGGGACAAAATACTCCTGTTTATAACTGGGATAGGGGCTACTTTGGCA
 ACATCACCTTGCAATACGCCCTGCAACAATCGCGAAACGTCCCAGCCGTGGAAACTCTAA
 ACAAGGTCGGACTCAACCGCGCCAAGACTTTTCCTAAATGGTCTCGGAATCGACTACCCAA
 GTATTCACTACTCAAATGCCATTTCAAGTAACACAACCGAATCAGACAAAAAATATGGAG
 CAAGTAGTGAAAAGATGGCTGCTGCTTACGCTGCCTTTGCAAATGGTGGAACTTACTATA
 AACCAATGTATATCCATAAAGTCGTCTTTAGTGATGGGAGTGAAAAAGAGTTCTCTAATG
 TCGGAACTCGTGCCATGAAGGAAACGACAGCCTATATGATGACCGACATGATGAAAAACAG
 TCTTGACTTATGGAAGTGGACGAAATGCCTATCTTGCTTGGCTCCCTCAGGCTGGTAAAA
 CAGGAACCTCTAACTATAACAGACGAGGAAATTGAAAACCATCAAGACCTCTCAATTTG
 TAGCACCTGATGAACTATTTGCTGGCTATACGCGTAAATATTCATGGCTGTATGGACAG
 GCTATTCTAACCGTCTGACACCACTTGTAGGCAATGGCCTTACGGTCGCTGCCAAAGTTT
 ACCGCTCTATGATGACCTACCTGTCTGAAGGAAGCAATCCAGAGGATTGGAATATACCAG
 AGGGGCTCTACAGAAATGGAGAATTCGTATTTAAAAATGGTGCTCGTTCTACGTGGAAC
 CACCTGCTCCACAACAACCCCATCAACTGAAAGTTCAAGCTCATCATCAGATAGTTCAA
 CTTACAGTCTAGCTCAACCACTCCAAGCACAAATAATAGTACGACTACCAATCCTAACA
 ACAATACGCAACAATCAAATACAACCCCTGATCAACAAAATCAGAATCCTCTATCGAAAA
 CCAGCACA

>198_23F_Pen2_Ctx1 1208 bases

CATACGTCTCTTACCCTGACGATGATTTGCAAGTCGCATCTACGGTCGTAGATGTTTCAA
 ATGGTAAAGTCATCGCCCAACTTGGAGCTCGTCACCAAGCAAGTAACGTTTCATTTGGTA
 CCAACCAAGCTGTGGAAACCAATCGTGACTGGGGTTCTGCTATGAAACCAATCACCGATT
 ATGCACCTGCCATAGAATACGGTGTTTATGATTCCACTGCAACTATGGTTAATGATATTC
 CTTATAACTATCCGGGAACAAGCACACCTGTCTACAACCTGGGATAGAGCATATTTCCGTA
 ATATTACTCTGCAATATGCTCTTCAACAATCACGAAATGTCACAGCCGTTGAGACTTTGA
 ATAAGGTCGGTCTAGATAGAGCTAAAACCTTCCTTAATGGTCTTGGTATCGACTATCCAA
 GCATGCATTATGCAAACGCCATTTCAAGTAATACAACAGAATCTAATAAACAATACGGAG
 CAAGTAGTGAAAAAATGGCTGCTGCTTATGCTGCCTTTGCAAATGGTGGCACTTACTATA
 AACCAATGTATATCCATAAAGTCGTCTTCAGTGATGGAAGTAAAAAAGAGTTCTCTAATG
 TCGGAACTCGTGCCATGAAGGAAACGACAGCCTATATGATGACCGACATGATGAAAAACAG
 TCTTGACTTATGGAAGTGGGCGTGGAGCCTATCTTCCTTGGCTTCCCTCAAGCTGGTAAAA
 CAGGAACCTCTAACTATAACAGATGAGGAAGTTGAAAACCATCAAGAACACTGGCTATG
 TAGCTCCAGATGAAATGTTTGTGGTTATACTCGTAAGTATTCTATGGCTGTATGGACAG
 GTTATTTCGAATCGTTTAACTCCTATCGTTGGAGATGGTTTCCTAGTTGCAGCTAAAGTTT
 ATCGCTCAATGATAACGTATCTATCAGAAGATACTCATCCAGAAGACTGGACGATGCCAG

ACGGACTTTTCAGAAACGGGGAATTTGTATTCAAAAATGGAGCTCGCCCAATATGGACTG
AACCCCTCTACTCAACAATCCTCAACAGCTGAAAGTTCAAGCTCATCATCAGATAGTTCAA
CTTCACAGTCTAGCTCAACCACTCCAAGCACAAATAATAGTACGACTACCAATCCTAACA
ATAATACGCAACAATCAAATACAACCCCTGATCAACAAAATCAGAATCCTCTACCGAAAA
AAAGAACA

>208_23F_Pen2_Ctx1 1208 bases

CATACGTCTCTTACCCTGACGATGATTTGCAAGTCGCTTCTACCATTGTTGATGTTTCTA
ACGGTAAAGTCATTGCCCAGCTAGGAGCACGCCATCAGTCAAGTAATGTTTCCTTCGGAA
TTAACCAAGCAGTAGAAACAAACCGCGACTGGGGATCAACTATGAAACCGATCACAGACT
ATGCTCCTGCCTTGGAGTACGGTGTCTACGATTCAACTGCTACTATCGTTCACGATGAGC
CCTATAACTACCCTGGGACAAATACTCCTGTTTATAACTGGGATAGGGGCTACTTTGGCA
ACATCACCTTGCAATACGCCCTGCAACAATCGCGAAACGTCCCAGCCGTGGAAACTCTAA
ACAAGGTCGGACTCAACCGCGCCAAGACTTTTCTAAATGGTCTCGGAATCGACTACCCAA
GTATTCACTACTCAAATGCCATTTCAAGTAACACAACCGAATCAGACAAAAAATATGGAG
CAAGTAGTGAAAAGATGGCTGCTGCTTACGCTGCCTTTGCAAATGGTGGAACCTTACTATA
AACCAATGTATATCCATAAAGTCGTCTTTAGTGATGGGAGTGAAAAGAGTTCTCTAATG
TCGGAACCTCGTGCCATGAAGGAAACGACAGCCTATATGATGACCGACATGATGAAAACAG
TCTTGACTTATGGAACCTGGACGAAATGCCTATCTTGCTTGGCTCCCTCAGGCTGGTAAAA
CAGGAACCTCTAACTATACAGACGAGGAAATTGAAAACCACATCAAGACCTCTCAATTTG
TAGCACCTGACGAACTATTTGCTGGCTATACGCGTAAATATTCATGGCTGTATGGACAG
GCTATTCTAACCGTCTGACACCACTTGTAGGCAATGGCCTTACGGTCGCTGCCAAAGTTT
ACCGCTCTATGATGACCTACCTGTCTGAAGGAAGCAATCCAGAGGATTGGAATATACCAG
AGGGGCTCTACAGAAATGGAGAATTTCGTATTTAAAAATGGTGCTCGTTCTACGTGGAACT
CACCTGCTCCACAACAACCCCCATCAACTGAAAGTTCAAGCTCATCATCAGATAGTTCAA
CTTCACAGTCTAGCTCAACCACTCCAAGCACAAATAATAGTACGACTACCAATCCTAACA
ACAATACGCAACAATCAAATACAACCCCTGATCAACAAAATCAGAATCCTCTATCGAAAA
CCAGCACA

>306_23F_Pen2_Ctx05 1208 bases

CATACGTCTCTTACCCTGACGATGATTTGCAAGTCGCTTCTACGGTCGTAGATGTTTCAA
ATGGTAAAGTCATCGCCCAACTTGGAGCTCGTCACCAAGCAAGTAACGTTTCATTTGGTA
CCAACCAAGCTGTGGAAACCAATCGTGACTGGGGTTCTGCTATGAAACCAATCACCGATT
ATGCACCTGCCATAGAATACGGTGTTTATGATTCCACTGCAACTATGGTTAATGATATTC
CTTATAACTATCCGGGAACAAGCACACCTGTCTACAACCTGGGATAGAGCATATTTCCGTA
ATATTACTCTGCAATATGCTCTTCAACAATCACGAAATGTCACAGCCGTTGAGACTTTGA
ATAAGGTCGGTCTAGATAGAGCTAAAACCTTCCTTAATGGTCTTGGTATCGACTATCCAA
GCATGCATTATGCAAACGCCATTTCAAGTAATACAACAGAATCTAATAAACAATACGGAG
CAAGTAGTGAAAAAATGGCTGCTGCTTATGCTGCCTTTGCAAATGGTGGAACCTTACTATA
AACCAATGTATATCCATAAAGTCGTCTTCAGTGATGGAAGTAAAAAAGAGTTCTCTAATG
TCGGAACCTCGTGCCATGAAGGAAACGACAGCCTATATGATGACCGACATGATGAAAACAG
TCTTGACTTATGGAACCTGGGCGTGGAGCCTATCTTCCTTGGCTTCCTCAAGCTGGTAAAA
CAGGAACCTCTAACTATACAGATGAGGAAGTTGAAAACCACATCAAGAACCTGGCTATG
TAGCTCCAGATGAAATGTTTGTGGTTATACTCGTAAGTATTCTATGGCTGTATGGACAG
GTTATTCGAATCGTTTAACTCCTATCGTTGGAGATGGTTTCCTAGTTGCAGCTAAAGTTT
ATCGCTCAATGATAACGTATCTATCAGAAGATACTCATCCAGAAGACTGGACGATGCCAG
ACGGACTTTTCAGAAACGGGGAATTTGTATTCAAAAATGGAGCTCGCCCAATATGGACTG
AACCCCTCTACTCAACAATCCTCAACAGCTGAAAGTTCAAGCTCATCATCAGATAGTTCAA
CTTCACAGTCTAGCTCAACCACTCCAAGCACAAATAATAGTACGACTACCAATCCTAACA
ATAATACGCAACAATCAAATACAACCCCTGATCAACAAAATCAGAATCCTCTACCGAAAA
AAAGAACA

>788_23F_Pen4_Ctx05 1208 bases

CATACGTCTCTTACCCTGACGATGATTTGCAAGTCGCTTCTACCATTGTTGATGTTTCTA
ACGGTAAAGTCATTGCCCAGCTAGGAGCACGCCATCAGTCAAGTAATGTTTCCTTCGGAA
TTAACCAAGCAGTAGAAACAAACCGCGACTGGGGATCAACTATGAAACCGATCACAGACT
ATGCTCCTGCCTTGGAGTACGGTGTCTACGATTCAACTGCTACTATCGTTCACGATGAGC
CCTATAACTACCCTGGGACAAATACTCCTGTTTATAACTGGGATAGGGGCTACTTTGGCA
ACATCACCTTGCAATACGCCCTGCAACAATCGCGAAACGTCCCAGCCGTGGAAACTCTAA
ACAAGGTCGGACTCAACCGCGCCAAGACTTTTCTAAATGGTCTCGGAATCGACTACCCAA
GTATTCACTACTCAAATGCCATTTCAAGTAACACAACCGAATCAGACAAAAAATATGGAG

CAAGTAGTGAAAAGATGGCTGCTGCTTACGCTGCCTTTGCAAATGGTGGAACCTTACTATA
AACCAATGTATATCCATAAAGTCGTCTTTAGTGATGGGAGTGAAAAAGAGTTCTCTAATG
TCGGAACCTCGTGCCATGAAGGAAACGACAGCCTATATGATGACCGACATGATGAAAACAG
TCTTGACTTATGGAACCTGGACGAAATGCCTATCTTGCTTGGCTCCCTCAGGCTGGTAAAA
CAGGAACCTCTAACTATACAGACGAGGAAATTGAAAACCACATCAAGACCTCTCAATTTG
TAGCACCTGATGAACTATTTGCTGGCTATACGCGTAAATATTCAATGGCTGTATGGACAG
GCTATTCTAACCCTGCTGACACCACTTGTAGGCAATGGCCTTACGGTCGCTGCCAAAGTTT
ACCGCTCTATGATGACCTACCTGTCTGAAGGAAGCAATCCAGAGGATTGGAATATACCAG
AGGGGCTCTACAGAAATGGAGAATTCGTATTTAAAAATGGTGCTCGTTCTACGTGGAACCT
CACCTGCTCCACAACAACCCCCATCAACTGAAAGTTCAAGCTCATCATCAGATAGTTCAA
CTTCACAGTCTAGCTCAACCACTCCAAGCACAAATAATAGTACGACTACCAATCCTAACA
ACAATACGCAACAATCAAATACAACCCCTGATCAACAAAATCAGAATCCTCTATCGAAAA
CCAGCACA

>239_11_Pen2_Ctx2 1208 bases

CATACGTCTCTTACCCTGACGATGATTTGCAAGTCGCTTCTACGGTCGTAGATGTTTCAA
ATGGTAAAGTCATCGCCCAACTTGGAGCTCGTCACCAAGCAAGTAACGTTTCATTTGGTA
CCAACCAAGCTGTGGAACCAATCGTGACTGGGGTTCTGCTATGAAACCAATCACCGATT
ATGCACCTGCCATAGAATACGGTGTTTATGATTCCACTGCAACTATGGTTAATGATATTC
CTTATAACTATCCGGGAACAAGCACACCTGTCTACAACCTGGGATAGAGCATATTTTCGGTA
ATATTACTCTGCAATATGCTCTTCAACAATCACGAAATGTCACAGCCGTTGAGACTTTGA
ATAAGGTCGGTCTAGATAGAGCTAAAACCTTCCTTAATGGTCTTGGTATCGACTATCCAA
GCATGCATTATGCAAACGCCATTTCAAGTAATACAACAGAATCTAATAAACAATACGGAG
CAAGTAGTGAAAAAATGGCTGCTGCTTATGCTGCCTTTGCAAATGGTGGAACCTTACTATA
AACCAATGTATATCCATAAAGTCGTCTTTCAGTGATGGAAGTAAAAAAGAGTTCTCTAATG
TCGGAACCTCGTGCCATGAAGGAAACGACAGCCTATATGATGACCGACATGATGAAAACAG
TCTTGACTTATGGAACCTGGGCGTGGAGCCTATCTTCCTTGGCTTCCTCAAGCTGGTAAAA
CAGGAACCTCTAACTATACAGATGAGGAAGTTGAAAACCACATCAAGAACACTGGCTATG
TAGCTCCAGATGAAATGTTTGTGGTTATACTCGTAAGTATTCTATGGCTGTATGGACAG
GTTATTTCGAATCGTTTAACTCCTATCGTTGGAGATGGTTTCCTAGTTGCAGCTAAAAGTTT
ATCGCTCAATGATAACGTATCTATCAGAAGATACTCATCCAGAAGACTGGACGATGCCAG
ACGGACTTTTCAGAAACGGGGAATTTGTATTCAAAAATGGAGCTCGCCCAATATGGACTG
AACCCTCTACTCAACAATCCTCAACAGCTGAAAGTTCAAGCTCATCATCAGATAGTTCAA
CTTCACAGTCTAGCTCAACCACTCCAAGCACAAATAATAGTACGACTACCAATCCTAACA
ATAATACGCAACAATCAAATACAACCCCTGATCAACAAAATCAGAATCCTCTACCGAAAA
AAAGAACAA

>323_6B_Pen2_Ctx1

CATACGTCTCTTACCCTGACGATGATTTGCAAGTCGCATCTACGGTCGTAGATGTTTCAA
ATGGTAAAGTCATCGCACAACTTGGTGCTCGTCATCAAGCAAGTAATGTTTCATTCGGTA
CCAACCAGGCCGTAGAAACCAATCGTGACTGGGGATCATCAATGAAACCAATCACTGACT
ATGCTCCCGCTTTAGAATATGGAGTCTATGACTCTACTGCTTCTATTGTACATGATGTCC
CTTATAACTATCCTGGCACTGATACTCCACTCTACAACCTGGGATCATGTCTACTTTGGAA
ACATTACAATCCAGTATGCTCTTCAACAATCACGAAATGTCACAGCCGTTGAGACTTTGA
ATAAGGTCGGTCTAGATAGAGCTAAAACCTTCCTTAATGGTCTTGGTATCGACTATCCAA
GCATGCATTATGCAAACGCCATTTCAAGTAACACAACCTGAATCCAACAAAAAATATGGTG
CAAGTAGTGAAAAAATGGCTGCTGCCTACGCTGCTTTTGCTAATGGTGGAATTTTATCACA
AACCAATGTATATCAATAAAATCGTCTTTAGTGATGGTAGCGAAAAAGAATTTTCTGATG
CTGGTACACGAGCTATGAAAGAGACTACTGCCTATATGATGACTGAAATGATGAAAACCTG
TTTTAACTTACGGAACAGGACGTGGAGCCTACCTACCATGGCTTCCACAAGCAGGTAAGA
CAGGTACTTCTAACTATACTGACGAAGAAATTGAAAAGTATATCAAGAACACTGGCTACG
TAGCTCCAGATGAAATGTTTGTGGGTTATACTCGTAAGTATTCTATGGCTGTATGGACAG
GTTATTTCGAATCGTTTAACTCCTATCGTTGGAGATGGTTTCCTAGTTGCAGCTAAAAGTTT
ATCGCTCTATGATGACCTACCTGTCTGAAGGAAGCAATCCAGAGGATTGGAATATACCAG
AGGGGCTCTACAGAAATGGAGAATTCGTATTTAAAAATGGTGCTCGTTCTACGTGGAGCT
CACCTGCTCCACAACAACCCCCATCAACTGAAAGTTCAAGCTCATCATCAGATAGTTCAA
CTTCACAGTCTAGCTCAACCACTCCAAGCACAAATAATAGTACGACTACCAATCCTAACA
ATAATACGCAACAATCAAATACAACCCCTGATCAACAAAATCAGAATCCTCTACCGAACCC
CCAGCACA

>806_9V_Pen2_Ctx1 1208 bases

CATACGTCTCTTACCCTGACGATGATTTGCAAGTCGCATCTACGGTCGTAGATGTTTCAA
ATGGTAAAGTCATCGCCCAACTTGGAGCTCGTCACCAAGCAAGTAACGTTTCATTTGGTA
CCAACCAAGCTGTGGAAACCAATCGTGACTGGGGTTCTGCTATGAAACCAATCACCGATT
ATGCACCTGCCATAGAATACGGTGTTTATGATTCCACTGCAACTATGGTTAATGATATTC
CTTATAACTATCCGGGAACAAGCACACCTGTCTACAACCTGGGATAGAGCATATTTGCGTA
ATATTACTCTGCAATATGCTCTTCAACAATCACGAAATGTCACAGCCGTTGAGACTTTGA
ATAAGGTCGGTCTAGATAGAGCTAAAACCTTCCTTAATGGTCTTGGTATCGACTATCCAA
GCATGCATTATGCAAACGCCATTTCAAGTAATACAACAGAATCTAATAAACAATACGGAG
CAAGTAGTGAAAAAATGGCTGCTGCTTATGCTGCCTTTGCAAATGGTGGCACTTACTATA
AACCAATGTATATCCATAAAGTCGTCTTCAGTGATGGAAGTAAAAAAGAGTTCTCTAATG
TCGGAACCTCGTGCCATGAAGGAAACGACAGCCTATATGATGACCGACATGATGAAAACAG
TCTTGACTTATGGAACCTGGGCGTGGAGCCTATCTTCCTTGGCTTCCTCAAGCTGGTAAAA
CAGGAACCTCTAACTATACAGATGAGGAAGTTGAAAACCACATCAAGAACACTGGCTATG
TAGCTCCAGATGAAATGTTTGTTGGTTATACTCGTAAGTATTCTATGGCTGTATGGACAG
GTTATTCTGAATCGTTTAACTCCTATCGTTGGAGATGGTTTCCTAGTTGCAGCTAAAGTTT
ATCGCTCAATGATAACGTATCTATCAGAAGATACTCATCCAGAAGACTGGACGATGCCAG
ACGGACTTTTCAGAAACGGGGAATTTGTATTCAAAAATGGAGCTCGCCCAATATGGACTG
AACCCTCTACTCAACAATCCTCAACAGCTGAAAGTTCAAGCTCATCATCAGATAGTTCAA
CTTCACAGTCTAGCTCAACCACTCCAAGCACAAATAATAGTACGACTACCAATCCTAACA
ATAATACGCAACAATCAAATACAACCCCTGATCAACAAAATCAGAATCCTCTACCGAAAA
AAAGAACA

Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες της PBP2B

```
>ATCC_700669 1310 bases
GUAAUUUUUGAUACAGAUUGAUAAUGUCACGCGCAAUGGAAGGUCCUACACCAUUUGUUAG
AUUGGUAAUUAUGAGGAAAGACCACUGCGCAGCGAUUUUGGGGAUUAUCAGAUUGGGGCAUA
GGCCACCGCAUUGGUAAUUGGUUGCUUGCUGACCAUCUGCCACAUAGCUUUCGGCUGUACC
UGUUUUUCCGCUAAUGGAUACCAAGG-CACCAUUUGAAAAGGCACGUCCAGUUGUCAUUC
CACUAGUACCAUGGGCAACC-UGAUAAAAACCUUGGUGCAAGAUGCUCUAUUCGGAGUCG
GAUAUAUUGACCUUAUUAUCUCUGUCGGUUGCAGUUGCUGAAUCAAGUCACCCAGUCCU
CCCUUAUCAUUAUUAUACCAUAAAUGCCUUAACAAUACGAGGAGCCACACGAACACCAUUA
UUUGCAAUAGUUGCUACAUAUCUGAGCCAACUGCAUGGGCGUAUAGUUAUCAAACUGCCCA
AAGGAAUUGGUGAUGUAAUUAAGCAAAGCUAUACUCUUUGGGAACAAAUCCAGUAGAUUCA
UCUGGUAGGUCAAUUCGGUCGCAGCCCCCAAGCCAUAUUCGCCAAAGGUCGCACGAAGU
UUUCCCAUAGCUGUUUCCAAAUUGCUGGUUCCAACAAACAUAUUUGGUUGAUAGGUCUGG
CCCAUGAUUCCAAGAGCGGUUUUAACCAUGUAAGCAUUGGAUGAAUACUCCAAGGCUUCC
ACAGCUGUAAUAGGAAAAGAUAUCCAUUAGCCAAUUAUACCAAGAAUAAAUUGGAGCUGAA
CCUUGGAAAACAUAAGGCUGAUCUGUUAAGGUUUGGUUUCCUGAUAAAACACCAUUUUC
CAACCUGAGCUGAUGGUCGCAGCCUUGACAACCGAACCUGGGACAAAGACAUUGGUUACC
GUUCCCAAGGAUUCAGGAGUCAACUCUCCCGUUUUCAGGUCAUGUUUGAUCCUGACAUG
GAUAAAACAGCACCUGUUUUUGGUUAAGGGCGACUGCAUAGACACCU-UCAGAAUAUUU
AGCUCCACCAUUUCCUAGCUCGGAAUUGAAUAACUUUUCAGCAAAGCAUCCACGCUAUC
UUGG-AAGGCCAAAUCAAUGGUCAGUUUGAUUAUUGUUUCCCUUACUACCUUCCUCAAUUG
UGUCCACGCUUUCCAUAUUGCCAUAUUUAUCCAGAUGGAUUUCUUUUACCGAGCGUUUUC
CUUGUAAGGUCUCUUAUAUUGCUUUUCCAAUAGG-AGGUUCCAACACGGUCAUUUAGA
GAAUAGCCUUUUUAAGAUAGGAUUCUGCUUCUCCCGCUGGGAGACCAGC
>379_14_Pen2_Ctx1 1310 bases
AAGGUCCUACACCAUUUGUUAG
AUUGGUAAUUAUGAGGAAAGACCACUGCAACAGCGAUUUUGGGGAUUAUCAGAUUGGGGCAUA
GGCCACCGCAUUGGUAAUUGGUUGCUUGCUGACCAUCUGCCACAUAGCUUUCGGCUGUACC
UGUUUUUCCGCUAAUGGAUACCAAGG-CACCAUUUGAAAAGGCACGUCCAGUUGUCAUUC
CACUAGUACCAUGGGCAACC-UGAUAAAAACCUUGGUGCAAGAUGCUCUAUUCGGAGUCG
GAUAUAUUGACCUUAUUAUCUCUGUCGGUUGCAGUUGCUGAAUCAAGUCACCCAGUCCU
CCCUUAUCAUUAUUAUACCAUAAAUGCCUUAACAAUACGAGGAGCCACACGAACACCAUUA
UUUGCAAUAGUUGCUACAUAUCUGAGCCAACUGCAUGGGCGUAUAGUUAUCAAACUGCCCA
AAGGAAUUGGUGAUGUAAUUAAGCAAAGCUAUACUCUUUGGGAACAAAUCCAGUAGAUUCA
UCUGGUAGGUCAAUUCGGUCGCAGCCCCCAAGCCAUAUUCGCCAAAGGUCGCACGAAGU
UUUCCCAUAGCUGUUUCCAAAUUGCUGGUUCCAACAAACAUAUUUGGUUGAUAGGUCUGG
CCCAUGAUUCCAAGAGCGGUUUUAACCAUGUAAGCAUUGGAUGAAUACUCCAAGGCUUCC
ACAGCUGUAAUAGGAAAAGAUAUCCAUUAGCCAAUUAUACCAAGAAUAAAUUGGAGCUGAA
CCUUGGAAAACAUAAGGCUGAUCUGUUAAGGUUUGGUUUCCUGAUAAAACACCAUUUUC
CAACCUGAGCUGAUGGUCGCAGCCUUGACAACCGAACCUGGGACAAAGACAUUGGUUACC
GUUCCCAAGGAUUCAGGAGUCAACUCUCCCGUUUUCAGGUCAUGUUUGAUCCUGACAUG
GAUAAAACAGCACCUGUUUUUGGUUAAGGGCGACUGCAUAGACACCU-UCAGAAUAUUU
AGCUCCACCAUUUCCUAGCUCGGAAUUGAAUAACUUUUCAGCAAAGCAUCCACGCUAUC
UUGG-AAGGCCAAAUCAAUGGUCAGUUUGAUUAUUGUUUCCCUUACUACCUUCCUCAAUUG
UGUCCACGCUUUCCAUAUUGCCAUAUUUAUCCAGAUGGAUUUCUUUUACCGAGCGUUUUC
CUUGUAAGGUCUCUUAUAUUGCUUUUCCAAUAGG-AGGUUCCAACACGGUCAUUUAGA
GAAUAGCCUUUU
>791_14_Pen4_Ctx1 1310 bases
AAGGUCCUACACCAUUUGUUAG
AUUGGUAAUUAUGAGGAAAGACCACUGCAACAGCGAUUUUGGAGAUUAUCAGAUUGGGGCAUA
GGCUACCGCAUUGGUAAUUGGUUGCUUCCUGACCAUCUGCCACAUAGCUUUCGGCUGUACC
CGUUUUUCCGCUAAUAGAUACCAA-GGCACCAUUUGAAAAGGCACGUCCAGUUGUCAUUC
CACUAGUCCCAUGAGCAA-CCUGAUAAAAACCUUGGUGCAAGACACUCAUAUCGGAGUCG
GAUAUAUUGACCUUAUUAUCUCUGUCGGUUGCAGUUGCUGAAUCAAGUCACCCAGUCCU
CCCUUAUCAUUAUUAUACCAUAAAUGCCUUAACAAUACGAGGAGCCACACGAACACCAUCA
UUUGCAAUAGUUGCUACAUAUCUGAGCCAACUGCAUGGGCGUAUAGUUAUCAAACUGCCCA
AAUGCAUUAAGUAAUGUAAUUAAGCAAAGCUAUACUCUUUGGGAACAAAUCCAGUAGAUUCA
```

UCUGGUAGGUCAAUUCGGUCGCAGCCCCCAAGCCAUAUUCGCCAAAGGUCGCACGAAGU
UUUCCCAUAGCUGUUUCCAAAUUGCUGGUUCCAACAAACAUAUUUGGUUGAUAGGUCUGG
CCCAUGAUUCCAAGAGCGGUUUGAACCAUGUAAGCAUUAGAUGAAUACUCCAAGGCUUCC
ACAGCUGUAAUAGGAAAAGAUAUCCAUUGCCAAUUUAUACCAAGAAUAAAUUGGAGCUGAA
CCUUGGAAAACAAUAGGCUGAUCUGUUAAGGUUUGGUUUCUGAUAAAACACCAUUUUC
CAACCUGAGCUGAUGGUAGCGGCCUUAACAACCGAACCAGGUAACAAAGACAUUGGUCACA
GUUCCCAAGGAAUCCUGUGUUAACUCUCCCGUGUUCAGGUCAUGUUUAAUCCUGACAUG
GAUAACACAGCACCUGUUUUUGGAUUAAGGGCGACUGCAUAGACACCU-UCAGAAUACUU
GGCUCCACCAUUUCCUAGCUCGGAAUUAUAAUACUUUUCAGCAAAGCAUCCACGCUAUC
UUGG-AAGGCCAAAUCAAUGGUCAGUUUAUUAUUGUUCUUUGGUACCAGCUUCAUAU
UUUCGACACUUUCCAUGUUACCGUACUUGUCUAGGUGAACUUCUUUCACCGAGCGUUUUC
CUUGCAAGGUCUCUUAUAUUGCUUUUCCAAAUACG-AGGUUCCAACACGGUCAUUUAGA
GAAUAGCCUUUU

>792_14_Pen4_Ctx1 1310 bases

AAGGUCCUACACCAUUUGUUAG
AUUGGUAAUUAUGAGGAAAGACCACUGCAACAGCGAUUUGGGGAUUAUCAGAUUGGGGCAUA
GGCUACCGCAUUGGUAAUUGGUUGCUUCCUGACCAUCUGCCACAUAGCUUUCGGCUGUACC
CGUUUUUCCGCUAAUAGAUACCAA-GGCACCAUUUGAAAAGGCACGUCCAGUUGUCAUUC
CACUAGUCCCAUGAGCAA-CCUGAUAAAACCUUGGUGCAAGACACUCAUAUCGGAGUCG
GAUAUAUUGACCUUAUUAUCUCUGUCGGUUGCAGUUGCUGAAUCAAGUCACCCAGUCCU
CCCUUAUCAUUAUUAACCAUAAAUGCCUUAACAAUACGAGGAGCCACACGAACACCAUCA
UUUGCAAUAGUUGCUACAUAUCUGAGCCAACUGCAUGGGCGUAUAGUUAUCAAACUGCCCA
AAUGCAUUAAGUAAUGUAAUUAAGCAAAGCUAUACUCUUUGGGAACAAUCCAGUAGAUUCA
UCUGGUAGGUCAAUUCGGUCGCAGCCCCCAAGCCAUAUUCGCCAAAGGUCGCACGAAGU
UUUCCCAUAGCUGUUUCCAAAUUGCUGGUUCCAACAAACAUAUUUGGUUGAUAGGUCUGG
CCCAUGAUUCCAAGAGCGGUUUGAACCAUGUAAGCAUUAGAUGAAUACUCCAAGGCUUCC
ACAGCUGUAAUAGGAAAAGAUAUCCAUUGCCAAUUUAUACCAAGAAUAAAUUGGAGCUGAA
CCUUGGAAAACAAUAGGCUGAUCUGUUAAGGUUUGGUUUCUGAUAAAACACCAUUUUC
CAACCUGAGCUGAUGGUAGCGGCCUUAACAACCGAACCAGGUAACAAAGACAUUGGUCACA
GUUCCCAAGGAAUCCUGUGUUAACUCUCCCGUGUUCAGGUCAUGUUUAAUCCUGACAUG
GAUAACACAGCACCUGUUUUUGGAUUAAGGGCGACUGCAUAGACACCU-UCAGAAUACUU
GGCUCCACCAUUUCCUAGCUCGGAAUUAUAAUACUUUUCAGCAAAGCAUCCACGCUAUC
UUGG-AAGGCCAAAUCAAUGGUCAGUUUAUUAUUGUUCUUUGGUACCAGCUUCGAUAU
UUUCGACACUUUCCAUGUUACCGUACUUGUCUAGGUGAACUUCUUUCACCGAGCGUUUUC
CUUGCAAGGUCUCUUAUAUUGCUUUUCCAAAUACG-AGGUUCCAACACGGUCAUUUAGA
GAAUAGCCUUUU

>825_14_Pen4_Ctx1 1310 bases

AAGGUCCUACACCAUUUGUUAG
AUUGGUAAUUAUGAGGAAAGACCACUGCAACAGCGAUUUGGGGAUUAUCAGAUUGGGGCAUA
GGCUACCGCAUUGGUAAUUGGUUGCUUCCUGACCAUCUGCCACAUAGCUUUCGGCUGUACC
CGUUUUUCCGCUAAUAGAUACCAA-GGCACCAUUUGAAAAGGCACGUCCAGUUGUCAUUC
CACUAGUCCCAUGAGCAA-CCUGAUAAAACCUUGGUGCAAGACACUCAUAUCGGAGUCG
GAUAUAUUGACCUUAUUAUCUCUGUCGGUUGCAGUUGCUGAAUCAAGUCACCCAGUCCU
CCCUUAUCAUUAUUAACCAUAAAUGCCUUAACAAUACGAGGAGCCACACGAACACCAUCA
UUUGCAAUAGUUGCUACAUAUCUGAGCCAACUGCAUGGGCGUAUAGUUAUCAAACUGCCCA
AAUGCAUUAAGUAAUGUAAUUAAGCAAAGCUAUACUCUUUGGGAACAAUCCAGUAGAUUCA
UCUGGUAGGUCAAUUCGGUCGCAGCCCCCAAGCCAUAUUCGCCAAAGGUCGCACGAAGU
UUUCCCAUAGCUGUUUCCAAAUUGCUGGUUCCAACAAACAUAUUUGGUUGAUAGGUCUGG
CCCAUGAUUCCAAGAGCGGUUUGAACCAUGUAAGCAUUAGAUGAAUACUCCAAGGCUUCC
ACAGCUGUAAUAGGAAAAGAUAUCCAUUGCCAAUUUAUACCAAGAAUAAAUUGGAGCUGAA
CCUUGGAAAACAAUAGGCUGAUCUGUUAAGGUUUGGUUUCUGAUAAAACACCAUUUUC
CAACCUGAGCUGAUGGUAGCGGCCUUAACAACCGAACCAGGUAACAAAGACAUUGGUCACA
GUUCCCAAGGAAUCCUGUGUUAACUCUCCCGUGUUCAGGUCAUGUUUAAUCCUGACAUG
GAUAACACAGCACCUGUUUUUGGAUUAAGGGCGACUGCAUAGACACCU-UCAGAAUACUU
GGCUCCACCAUUUCCUAGCUCGGAAUUAUAAUACUUUUCAGCAAAGCAUCCACGCUAUC
UUGG-AAGGCCAAAUCAAUGGUCAGUUUAUUAUUGUUCUUUGGUACCAGCUUCGAUAU
UUUCGACACUUUCCAUGUUACCGUACUUGUCUAGGUGAACUUCUUUCACCGAGCGUUUUC
CUUGCAAGGUCUCUUAUAUUGCUUUUCCAAAUACG-AGGUUCCAACACGGUCAUUUAGA
GAAUAGCCUUUU

GAAUAGCCUUUU
>922_14_Pen2_Ctx05 1310 bases
AAGGUCCUACACCAUUUGUUAG
AUUGGUUAUUAUGAGGAAAGACCACUGCGACAGCGAUUUGGGGAUUAUCAGAUUGGGGCAUA
GGCCACCGCAUUGGUUAUUGGUUGCUUGCUGACCAUCUGCCACAUAGCUUUCGGCUGUACC
UGUUUUUCCGCUAAUGGAUACCAAGG-CACCAUUUGAAAAGGCACGUCCAGUUGUCAUUC
CACUAGUACCAUGGGCAACC-UGAUAAAAACCUUGGUGCAAGAUGCUCUAUUCGGAGUCG
GAUUAUUAUGACCUUAUUAUCUCUGUCGGUUGCAGUUGCUGAAUCAAGUCACCCAGUCCU
CCCUUAUCAUUAUUACCAUAAAUGCCUUAACAAUACGAGGAGCCACACGAACACCAUUA
UUUGCAAUAGUUGCUACAUAUCUGAGCCAACUGCAUGGGCGUAUAGUUAUCAAAACUGCCCA
AAGGAAUUGGUGAUGUAAUUAAGCAAAGCUAUACUCUUUGGGAACAAUCCAGUAGAUUCA
UCUGGUAGGUCAAUUCGGUCGCAGCCCCCAAGCCAUAUUCGCCAAAGGUCGCACGAAGU
UUUCCCAUAGCUGUUUCCAAUUGCUGGUUCCAACAAACAUAUUUGGUUGAUAGGUCUGG
CCCAUGAUUCCAAGAGCGGUUUGAACCAUGUAAGCAUUGGAUGAAUACUCCAAGGCUUCC
ACAGCUGUAAUAGGAAAAGAUCCAUAUGCCAAUUUAUACCAAGAAUAAAUUGGAGCUGAA
CCUUGGAAAACAAUAGGCUGAUCUGUUAAGGUUUGGUUUCUGAUAAAACACCAUUUUC
CAACCUGAGCUGAUGGUCGCAGCCUUGACAACCGAACCUGGGACAAAGACAUUGGUUACC
GUUCCCAAGGAUUCAGGAGUCAACUCUCCCGUUUUCAGGUCAUGUUUGAUCCUGACAUG
GAUAAAACAGCACCUGUUUUUGGGUUAAGGGCGACUGCAUAGACACCU-UCAGAAUAUUU
AGCUCCACCAUUUCCUAGCUCGGAAUUGAAUAACUUUUCAGCAAAGCAUCCACGCUAUC
UUGG-AAGGCCAAAUCAAUGGUCAGUUUGAUUUGUUUCCCUUACUACCUUCCUCAAUUG
UGUCCACGCUUCCAUAUUGCCAUAUUUAUCCAGAUUGGAUUUCUUUUACCGAGCGUUUUC
CUUGUAAGGUCUCUUAUAUUGCUUUUCCAAUAGG-AGGUUCCAACACGGUCAUUUAGA
GAAUAGCCUUUU

>926_14_Pen2_Ctx1 1310 bases
GUUUUUUGAUACAGAUUGAUAAUGUCACGCGCAAUGGAAGGUCCUACACCAUUUGUUAG
AUUGGUUAUUAUGAGGAAAGACCACUGCGACAGCGAUUUGGGGAUUAUCAGAUUGGGGCAUA
GGCCACCGCAUUGGUUAUUGGUUGCUUGCUGACCAUCUGCCACAUAGCUUUCGGCUGUACC
UGUUUUUCCGCUAAUGGAUACCAAGG-CACCAUUUGAAAAGGCACGUCCAGUUGUCAUUC
CACUAGUACCAUGGGCAACC-UGAUAAAAACCUUGGUGCAAGAUGCUCUAUUCGGAGUCG
GAUUAUUAUGACCUUAUUAUCUCUGUCGGUUGCAGUUGCUGAAUCAAGUCACCCAAUCCU
CCCUUAUCAUUAUUACCAUAAAUGCCUUAACAAUACGAGGAGCCACACGAACACCAUUA
UUUGCAAUAGUUGCUACAUAUCUGAGCCAACUGCAUCGGCGUAUAGUUAUCAAAACUGCCCA
AAGGCAUUAUGUAAUUGUAAUUAAGCAAAGCUAUACUCUUUGGGAACAAUCCAGUAGAUUCA
UCUGGUAGGUCAAUUCGGUCGCAGCCCCCAAGCCAUAUUCGCCAAAGGUCGCACGAAGU
UUUCCCAUAGCUGUUUCCAAUUGCUGGUUCCAACAAACAUAUUUGGUUGAUAGGUCUGG
CCCAUGAUUCCAAGAGCGGUUUGAACCAUGUAAGCAUUGGAUGAAUACUCCAAGGCUUCC
ACAGCUGUAAUAGGAAAAGAUCCAUAUGCCAAUUUAUACCAAGAAUAAAUUGGAGCUGAA
CCUUGGAAAACAAUAGGCUGAUCUGUUAAGGUUUGGUUUCUGAUAAAACACCAUUUUC
CAACCUGAGCUGAUGGUCGCAGCCUUGACAACCGAACCUGGGACAAAGACAUUGGUUACC
GUUCCCAAGGAUUCAGGAGUCAACUCUCCCGUUUUCAGGUCAUGUUUGAUCCUGACAUG
GAUAAAACAGCACCUGUUUUUGGGUUAAGGGCGACUGCAUAGACACCU-UCAGAAUAUUU
AGCUCCACCAUUUCCUAGCUCGGAAUUGAAUAACUUUUCAGCAAAGCAUCCACGCUAUC
UUGG-AAGGCCAAAUCAAUGGUCAGUUUGAUUUGUUUCCCUUACUACCUUCCUCAAUUG
UGUCCACGCUUCCAUAUUGCCAUAUUUAUCCAGAUUGGAUUUCUUUUACCGAGCGUUUUC
CUUGUAAGGUCUCUUAUAUUGCUUUUCCAAUAGG-AGGUUCCAACACGGUCAUUUAGA
GAAUAGCCUUUU

>971_14_Pen2_Ctx05 1310 bases
AAGGUCCUACACCAUUUGUUAG
AUUGGUUAUUAUGAGGAAAGACCACUGCGACAGCGAUUUGGGGAUUAUCAGAUUGGGGCAUA
GGCCACCGCAUUGGUUAUUGGUUGCUUGCUGACCAUCUGCCACAUAGCUUUCGGCUGUACC
UGUUUUUCCGCUAAUGGAUACCAAGG-CACCAUUUGAAAAGGCACGUCCAGUUGUCAUUC
CACUAGUACCAUGGGCAACC-UGAUAAAAACCUUGGUGCAAGAUGCUCUAUUCGGAGUCG
GAUUAUUAUGACCUUAUUAUCUCUGUCGGUUGCAGUUGCUGAAUCAAGUCACCCAGUCCU
CCCUUAUCAUUAUUACCAUAAAUGCCUUAACAAUACGAGGAGCCACACGAACACCAUUA
UUUGCAAUAGUUGCUACAUAUCUGAGCCAACUGCAUCGGCGUAUAGUUAUCAAAACUGCCCA
AAGGCAUUAUGUAAUUGUAAUUAAGCAAAGCUAUACUCUUUGGGAACAAUCCAGUAGAUUCA
UCUGGUAGGUCAAUUCGGUCGCAGCCCCCAAGCCAUAUUCGCCAAAGGUCGCACGAAGU
UUUCCCAUAGCUGUUUCCAAUUGCUGGUUCCAACAAACAUAUUUGGUUGAUAGGUCUGG
CCCAUGAUUCCAAGAGCGGUUUGAACCAUGUAAGCAUUGGAUGAAUACUCCAAGGCUUCC
ACAGCUGUAAUAGGAAAAGAUCCAUAUGCCAAUUUAUACCAAGAAUAAAUUGGAGCUGAA
CCUUGGAAAACAAUAGGCUGAUCUGUUAAGGUUUGGUUUCUGAUAAAACACCAUUUUC
CAACCUGAGCUGAUGGUCGCAGCCUUGACAACCGAACCUGGGACAAAGACAUUGGUUACC
GUUCCCAAGGAUUCAGGAGUCAACUCUCCCGUUUUCAGGUCAUGUUUGAUCCUGACAUG
GAUAAAACAGCACCUGUUUUUGGGUUAAGGGCGACUGCAUAGACACCU-UCAGAAUAUUU
AGCUCCACCAUUUCCUAGCUCGGAAUUGAAUAACUUUUCAGCAAAGCAUCCACGCUAUC
UUGG-AAGGCCAAAUCAAUGGUCAGUUUGAUUUGUUUCCCUUACUACCUUCCUCAAUUG
UGUCCACGCUUCCAUAUUGCCAUAUUUAUCCAGAUUGGAUUUCUUUUACCGAGCGUUUUC
CUUGUAAGGUCUCUUAUAUUGCUUUUCCAAUAGG-AGGUUCCAACACGGUCAUUUAGA
GAAUAGCCUUUU

UUUCCCAUAGCUGUUUCCAAAUUGCUGGUUCCAACAAACAUAUUUGGUUGAUAGGUCUGG
CCCAUGAUUCCAAGAGCGGUUUGAACCAUGUAAGCAUUGGAUGAAUACUCCAAGGCUUCC
ACAGCUGUAAUAGGAAAAGAUCCAUAUGCCAAUUAUACCAAGAAUAAAUUGGAGCUGAA
CCUUGGAAAACAAUAGGCUGAUCUGUUAAGGUUUGGUUUCUGAUAAAACACCAUUUUC
CAACCUGAGCUGAUGGUCGCAGCCUUGACAACCGAACCUGGGACAAAGACAUUGGUUACC
GUUCCCAAGGAAUCAGGAGUCAACUCUCCCGUUUUCAGGUCAUGUUUGAUCCUGACAUG
GAUAAAACAGCACCUGUUUUUGGGUUAAGGGCGACUGCAUAGACACCU-UCAGAAUAUUU
AGCUCCACCAUUUCCUAGCUCGGAAUUGAAUAACUUUUCAGCAA-GCAUCCACGCUAUC
UUGG-AAGGCCAAAUCAAUGGUCAGUUUGAUUAUUGUUUCCCUUACUACCUUCCUCAAUUG
UGUCCACGCUUUCCAUAUUGCCAUAUUUAUCCAGAUGGAUUUCUUUUACCGAGCGUUUUC
CUUGUAAGGUCUCUUCAUAUUGCUUUUCCAAUAGG-AGGUUCCAACACGGUCAUUUAGA
GAAUAGCCUUUU

>002_19F_Pen2_Ctx025 1310 bases

AAGGUCCUACACCAUUUGUUAG

AUUGGUUAUUUAGAGGAAAUAGGACAGGGACAGCGAUUUGGGGAUUUUCGGAUGGGGCAUG
GGCGGCCCCCUGGUUAUGGGUUGCUUGCUGACCUUCUGCCACAUAGCUUUCGGCUGUACC
UGUUUUUCCGCUAAUGGAUACCAA-GGCACCAUUGGAAAAGGCACGUCCAGUUGUCAUUC
CACUAGUACCAUGGGCAA-CCUGAUAAAACCUUGGUGCAAGAUGCUCUAUUCGGAGUCG
GAUUAUUGACCUUAUUAUCUCUGUCGGUUGCAGUUGCUGAAUCAAGUCACCCAGUCCU
CCCUUAUCAUUUUACCAUAAAUGCCUUAACAAUACGAGGAGCCACACGAACACCAUUA
UUUGCAAUAGUUGCUACAUAUCUGAGCCAACUGCAUCGGCGUAUAGUUAUCAAACUGCCCA
AAGGCAUUAGUAAUGUAAUUAGCAAAGCUAUACUCUUUGGGAACAAUCCAGUAGAUUCA
UCUGGUAGGUCAAUUCUGUCGCAGUACCCAAGCCAUAUUCGCCAAAGGUUGAACGCAGU
UUCUCCAUAGCAGACUCUAGAUGCUGGUGCCGACAAACAUAUUGGGUUGAUAGGUUUGC
CCCAUAAAGACCUAAGGCUGUUUUGGACCAUAUAGGUAAUUUGAUGAAUACUCCAGAGCUUGG
ACCGCUGUGAUAGGGAAUGAACCGUAAGCCUGAGUAUACCAAGAAUUGAUGGGAGCUGAA
CCUUGGAAGACAAUGGACUGGUCUGUCAAGGUCUGGUUUCUGACAAGACUCCAUUUUC
CAACCUGAGCUGAUGGUCGCCGCCUUGACAACCGAACCUGGAACAAAGACAUUGGUUACC
GUUCCCAAGGAAUCAGGCGUCAACUCUCCCGUUUUCAGUCAUGUUUAAUCCUGACAUA
GACAAAACCGCACCUGUUUUUGGGUUAAGGGCGACUGCAUAGACACCU-UCAGAAUACUU
GGCUCCACCAUUUUCUAGCUCGGAAUUGAAUAACUUUUCAGUAAAGCAUCCACGCUAUC
UUGG-AAGGCCAAAUCAAUGGUCAGUUUGAUUAUUGUUUCCCUUACUACCUUCCUCAAUUG
UAUCCACGCUUUCCAUAUUGCCAUAUUUAUCCAGAUGGAUUUCUUUUACCGAGCGUUUUC
CUUGUAAGGUCUCUUCAUAUUGCUUUUCCAAUAGG-AGGUUCCUACACGAUCAUUUAGA
GAAUAGCCUUUU

>111_19F_Pen2_Ctx05 1310 bases

AAGGUCCUACACCAUUUGUUAG

AUUGGUUAUUUAGAGGAAAGACCACUGCGACAGCGAUUUGGGGAUUUUCAGAUUGGGGCAUA
GGCCACCGCAUUGGUUAUUGGUUGCUUGCUGACCAUCUGCCACAUAGCUUUCGGCUGUACC
UGUUUUUCCGCUAAUGGAUACCAAGG-CACCAUUUGAAAAGGCACGUCCAGUUGUCAUUC
CACUAGUACCAUGGGCAACC-UGAUAAAACCUUGGUGCAAGAUGCUCUAUUCGGAGUCG
GAUUAUUGACCUUAUUAUCUCUGUCGGUUGCAGUUGCUGAAUCAAGUCACCCAGUCCU
CCCUUAUCAUUUUACCAUAAAUGCCUUAACAAUACGAGGAGCCACACGAACACCAUUA
UUUGCAAUAGUUGCUACAUAUCUGAGCCAACUGCAUGGGCGUAUAGUUAUCAAACUGCCCA
AAGGAAUUGGUGAUGUAAUUAGCAAAGCUAUACUCUUUGGGAACAAUCCAGUAGAUUCA
UCUGGUAGGUCAAUUCGGUCGCAGCCCCCAAGCCAUAUUCGCCAAAGGUCGCACGAAGU
UUUCCCAUAGCUGUUUCCAAUUGCUGGUUCCAACAAACAUAUUUGGUUGAUAGGUCUGG
CCCAUGAUUCCAAGAGCGGUUUGAACCAUGUAAGCAUUGGAUGAAUACUCCAAGGCUUCC
ACAGCUGUAAUAGGAAAAGAUCCAUAUGCCAAUUAUACCAAGAAUAAAUUGGAGCUGAA
CCUUGGAAAACAAUAGGCUGAUCUGUUAAGGUUUGGUUUCUGAUAAAACACCAUUUUC
CAACCUGAGCUGAUGGUCGCAGCCUUGACAACCGAACCUGGGACAAAGACAUUGGUUACC
GUUCCCAAGGAAUCAGGAGUCAACUCUCCCGUUUUCAGGUCAUGUUUGAUCCUGACAUG
GAUAAAACAGCACCUGUUUUUGGGUUAAGGGCGACUGCAUAGACACCU-UCAGAAUAUUU
AGCUCCACCAUUUCCUAGCUCGGAAUUGAAUAACUUUUCAGCAAAGCAUCCACGCUAUC
UUGG-AAGGCCAAAUCAAUGGUCAGUUUGAUUAUUGUUUCCCUUACUACCUUCCUCAAUUG
UGUCCACGCUUUCCAUAUUGCCAUAUUUAUCCAGAUGGAUUUCUUUUACCGAGCGUUUUC
CUUGUAAGGUCUCUUCAUAUUGCUUUUCCAAUAGG-AGGUUCCAACACGGUCAUUUAGA
GAAUAGCCUUUU

>267_19F_Pen2_Ctx05 1310 bases

AAGGUCCUACACCAUUUGUUAG
AUUGGUUAUUAUGAGGAAAGACCACUGCGACAGCGAUUUUGGGGAUUAUCAGAUUGGGGCAUA
GGCCACCGCAUUGGUUAUUGGUUGCUUGCUGACCAUCUGCCACAUAGCUUUCGGCUGUACC
UGUUUUUCCGCUAAUGGAUACCAAGG-CACCAUUUGAAAAGGCACGUCCAGUUGUCAUUC
CACUAGUACCAUGGGCAACC-UGAUAAAAACCUUGGUGCAAGAUGCUCUAUACGGAGUCG
GAUAUAUUGACCUUAUUAUCUCUGUCGGUUGCAGUUGCUGAAUCAAGUCACCCAGUCCU
CCCUUAUCAUUAUUACCAUAAAUGCCUUAACAAUACGAGGAGCCACACGAACACCAUUA
UUUGCAAUAGUUGCUACAUAUCUGAGCCAACUGCAUGGGCGUAUAGUUAUCAAACUGCCCA
AAGGAAUUGGUGAUGUAAUUAGCAAAGCUAUACUCUUUGGGAACAAUCCAGUAGAUUCA
UCUGGUAGGUCAAUUCGGUCGCAGCCCCCAAGCCAUAUUCGCCAAAGGUCGCACGAAGU
UUUCCCAUAGCUGUUUCCAAAUUGCUGGUUCCAACAAACAUAUUUGGUUGAUAGGUCUGG
CCCAUGAUUCCAAGAGCGGUUUUAACCAUGUAAGCAUUGGAUGAAUACUCCAAGGCUUCC
ACAGCUGUAAUAGGAAAAGAUAUAGCCAAUUUAUACCAAGAAUAAAUUGGAGCUGAA
CCUUGGAAAACAUAUAGGCUGAUCUGUUAAGGUUUUGGUUUCCUGAUAAAACACCAUUUUC
CAACCUGAGCUGAUGGUCGCAGCCUUGACAACCGAACCUGGGACAAAGACAUUGGUUACC
GUUCCCAAGGAUACAGGAGUCAACUCUCCCGUUUUCAGGUCAUGUUUGAUCCUGACAUG
GAUAAAACAGCACCUGUUUUUGGUUAAGGGCGACUGCAUAGACACCU-UCAGAAUAUUU
AGCUCCACCAUUUCCUAGCUCGGAAUUGAAUAACUUUUCAGCAAAGCAUCCACGCUAUC
UUGG-AAGGCCAAAUCAAUGGUCAGUUUGAUUAUUGUUUCCCUUACUACCUUCCUCAAUUG
UGUCCACGCUUCCAUAUUGCCAUAUUUAUCCAGAUUGGAUUUCUUUUACCGAGCGUUUUC
CUUGUAAGGUCUCUUAUAUUGCUUUUCCAAUAGG-AGGUUCCAACACGGUCAUUUAGA
GAAUAGCCUUUU

>272_19F_Pen2_Ctx05 1310 bases

AAGGUCCUACACCAUUUGUUAG
AUUGGUUAUUAUGAGGAAAGACCACUGCGACAGCGAUUUUGGGGAUUAUCAGAUUGGGGCAUA
GGCCACCGCAUUGGUUAUUGGUUGCUUGCUGACCAUCUGCCACAUAGCUUUCGGCUGUACC
UGUUUUUCCGCUAAUGGAUACCAA-GGCACCAUUUGAAAAGGCACGUCCAGUUGUCAUUC
CACUAGUACCAUGGGCAA-CCUGAUAAAAACCUUGGUGCAAGAUGCUCUAUACGGAGUCG
GAUAUAUUGACCUUAUUAUCUCUGUCGGUUGCAGUUGCUGAAUCAAGUCACCCAGUCCU
CCCUUAUCAUUAUUACCAUAAAUGCCUUAACAAUACGAGGAGCCACACGAACACCAUUA
UUUGCAAUAGUUGCUACAUAUCUGAGCCAACUGCAUCGGCGUAUAGUUAUCAAACUGCCCA
AAGGCAUUAUGUAAUUGUAAUUAGCAAAGCUAUACUCUUUGGGAACAAUCCAGUAGAUUCA
UCUGGUAGGUCAAUUCUGUCGCAGUACCCAAGCCAUAUUCGCCAAAGGUUGAACGCAGU
UUCUCCAUAGCAGACUCUAGAUUGCUGGUGCCGACAAACAUAUUGGGUUGAUAGGUUUGC
CCCAUAAGACCUAAGGCUGUUUGGACCAUAUAGGUUAUUUGAUGAUAUACUCCAGAGCUUGG
ACCGCUGUGAUAGGGAAUGAACCGUAAGCCUGAGUAUACCAAGAAUUGAUGGGAGCUGAA
CCUUGGAAGACAAUGGACUGGUCUGUCAAGGUCUGGUUCCUGACAAGACUCCAUUUUC
CAACCUGAGCUGAUGGUCGCCGCCUUGACAACCGAACCUGGAACAAAGACAUUGGUUACC
GUUCCCAAGGAUACAGGCGUCAACUCUCCCGUUUUAAGUCAUGUUUAAUCCUGACAUA
GACAAAACCGCACCUGUUUUUGGUUAAGGGCGACUGCAUAGACACCU-UCAGAAUACUU
GGCUCCACCAUUUUCUAGCUCAGAAUUGAAUAACUUUUCAGUAAAGCAUCCACGCUAUC
UUGG-AAGGCCAAAUCAAUGGUCAGUUUGAUUAUUGUUUCCCUUACUACCUUCCUCAAUUG
UAUCCACGCUUCCAUAUUGCCAUAUUUAUCCAGAUUGGAUUUCUUUUACCGAGCGUUUUC
CUUGUAAGGUCUCUUAUAUUGCUUUUCCAAUAGG-AGGUUCCUACACGGUCAUUUAGA
GAAUAGCCUUUU

>568_19F_Pen4_Ctx2 1310 bases

AAGGUCCUACACCAUUUGUUAG
AUUGGUUAUUAUGAGGAAAGACCACUGCAACUGCAAUUUGAGGAUUUUCUGUUGGAGCAUA
GGCCACGGCAUUGGUUAUUAUAGCUUCUUGACCACCAGCUACAUAAGCUUUCACCUGUACC
GGUCUUACCACUGAUAGAAAC-AGUGGCGCCAUCUGAAAACGCCCUGUCGUAAGGG
GACUAGUUCCAUGCGAUA-CUUGGUAAAAUCCUUGGUGCAAGAUACUCAUAUCGGAGUCG
GAUAUAUUGACCUUAUUAUCUCUGUCGGUUGCAGUUGCUGAAUCAAGUCACCCAGUCCU
CCCUUAUCAUUAUUACCAUAAAUGCCUUAACAAUACGAGGAGCCACACGAACACCAUCA
UUUGCAAUAGUUGCUACAUAUCUGAGCCAACUGCAUGGGCGUAUAGUUAUCAAACUGCCCA
AAGGCAUUGGUGAUGUAAUUAGCAAAGCUAUACUCUUUGGGAACAAUCCAGUAGAUUCA
UCUGGUAGGUCAAUUCGGUCGCAGCCCCCAAGCCAUAUUCGCCAAAGGUCGCACGAAGU
UUUCCCAUAGCUGUUUCCAAAUUGCUGGUUCCAACAAACAUAUUUGGUUGAUAGGUCUGG

CCCAUGAUUCCAAGAGCGGUUUGAACCAUGUAAGCAUUGGAUGAAUACUCCAAGGCUUCC
ACAGCUGUAAUAGGAAAAGAUAUCCAUUUGCCAAUUUAUACCAAGAAUAAAUUGGAGCUGAA
CCUUGGAAAACAAUAGGCUGAUCUGUUAAGGUUUGGUUUCUGAUAAAACACCAUUUUC
CAGCCAGAGCUGAUGGUCGACGCCUUGACAACCGAACCUGGGACAAAGACAUUGGUUACC
GUUCCCAAGGAUUCAGGAGUCAACUCUCCCGUUUUCAGGUCAUGUUUGAGUCCUGACAUA
GACAAAACAGCACCUGUUUUGGGGUUAAGGGCGACUGCAUACACACCC-UCAGAAUACUU
GGCUCCACCAUUUCCUAGCUCGGAAUUGAAUAACUUUUCAGCAAAGCAUCCACGCUAUC
UUGG-AAGGCCAAAUCAUUGGUCAGCUUGAUUUGUUUCCUUUACUACCUUCCUCAUUG
UAUCCACACUUUCCAUGUUGCCAUAUUUGUCCAGAUGGAUUUCUUUUACCGAGCGUUUUC
CUUGUAAGGUCUCUUCAUAUUGCUUUUCCAAUAGG-AGGUUCCAACACGGUCAUUUAGA
GAAUAGCCUUUU

>578_19F_Pen4_Ctx2 1310 bases

AAGGUCCUACACCAUUUGUUAG

AUUGGUUAUUUAGAGGAAAGACCACUGCAACAGCGAUUUGGGGAUUUUCAGAUUGGGGCAUA
GGCCACCGCAUUGGUUAUUGGUUGCUUGCUGACCAUCUGCCACAUAGCUUUCGGCUGUACC
UGUUUUUCCGCUAAUGGAUACCAA-GGCGCCAUUUGAAAAGGCACGUCCAGUUGUCAUUC
CACUAGUACCAUGGGCAA-CCUGAUAAAACCUUGGUGCAAGAUGCUCUAUUCGGAGUCG
GAUAUAUUGACCUUAUUAUCUCUGUCGGUUGCAGUUGCUGAAUCAAGUCACCCAGUCCU
CCCUUAUCAUUUUAUACCAUAAAUGCCUUAACAAUACGAGGAGCCACACGAACACCAUCA
UUUGCAAUAGUUGCUACAUAUCUGAGCCAACUGCAUGGGCGUAUAGUUUAUCAAACUGCCCA
AAGGCAUUGGUGAUGUAAUUAAGCAAAGCUAUACUCUUUGGGAACAAUCCAGUAGAUUCA
UCUGGUAGGUCAAUUCGGUCGCGAGCCCCAAGCCAUUUCGCCAAAGGUCGCACGAAGU
UUUCCCAUAGCUGUUUCCAAUUGCUGGUUCCAACAAACAUAUUUGGUUGAUAGGUCUGG
CCCAUGAUUCCAAGAGCGGUUUGAACCAUGUAAGCAUUGGAUGAAUACUCCAAGGCUUCC
ACAGCUGUAAUAGGAAAAGAUAUCCAUUUGCCAAUUUAUACCAAGAAUAAAUUGGAGCUGAA
CCUUGGAAAACAAUAGGCUGAUCUGUUAAGGUUUGGUUUCUGAUAAAACACCAUUUUC
CAACCUGAGCUGAUGGUAGCGGCCUUAACAACCGAACCUGGGACAAAGACAUUGGUUACC
GUUCCCAAGGAUUCAGGAGUCAACUCUCCCGUUUUCAGGUCAUGUUUGAGUCCUGACAUA
GACAAAACAGCACCUGUUUUGGGGUUAAGGGCGACUGCAUACACACCC-UCAGAAUACUU
GGCUCCACCAUUUCCUAGCUCGGAAUUGAAUAACUUUUCAGCAAAGCAUCCACGCUAUC
UUGG-AAGGCCAAAUCAUUGGUCAGUUUGAUUUGUUUCCUUUACUACCUUCCUCAUUG
UGUCCACGCUUUCCAUAUUGCCAUAUUUAUCCAGAUGGAUUUCUUUUACCGAGCGUUUUC
CUUGUAAGGUCUCUUCAUAUUGCUUUUCCAAUAGG-AGGUUCCAACACGGUCAUUUAGA
GAAUAGCCUUUU

>582_19F_Pen4_Ctx2 1310 bases

AAGGUCCUACACCAUUUGUUAG

AUUGGUUAUUUAGAGGAAAGACCACUGCAACAGCGAUUUGGGGAUUUUCAGAUUGGGGCAUA
GGCCACCGCAUUGGUUAUUGGUUGCUUGCUGACCAUCUGCCACAUAGCUUUCGGCUGUACC
UGUUUUUCCGCUAAUGGAUACCAA-GGCGCCAUUUGAAAAGGCACGUCCAGUUGUCAUUC
CACUAGUACCAUGGGCAA-CCUGAUAAAACCUUGGUGCAAGAUGCUCUAUUCGGAGUCG
GAUAUAUUGACCUUAUUAUCUCUGUCGGUUGCAGUUGCUGAAUCAAGUCACCCAGUCCU
CCCUUAUCAUUUUAUACCAUAAAUGCCUUAACAAUACGAGGAGCCACACGAACACCAUCA
UUUGCAAUAGUUGCUACAUAUCUGAGCCAACUGCAUGGGCGUAUAGUUUAUCAAACUGCCCA
AAGGCAUUGGUGAUGUAAUUAAGCAAAGCUAUACUCUUUGGGAACAAUCCAGUAGAUUCA
UCUGGUAGGUCAAUUCGGUCGCGAGCCCCAAGCCAUUUCGCCAAAGGUCGCACGAAGU
UUUCCCAUAGCUGUUUCCAAUUGCUGGUUCCAACAAACAUAUUUGGUUGAUAGGUCUGG
CCCAUGAUUCCAAGAGCGGUUUGAACCAUGUAAGCAUUGGAUGAAUACUCCAAGGCUUCC
ACAGCUGUAAUAGGAAAAGAUAUCCAUUUGCCAAUUUAUACCAAGAAUAAAUUGGAGCUGAA
CCUUGGAAAACAAUAGGCUGAUCUGUUAAGGUUUGGUUUCUGAUAAAACACCAUUUUC
CAACCUGAGCUGAUGGUAGCGGCCUUAACAACCGAACCUGGGACAAAGACAUUGGUUACC
GUUCCCAAGGAUUCAGGAGUCAACUCUCCCGUUUUCAGGUCAUGUUUGAGUCCUGACAUA
GACAAAACAGCACCUGUUUUGGGGUUAAGGGCGACUGCAUACACACCC-UCAGAAUACUU
GGCUCCACCAUUUCCUAGCUCGGAAUUGAAUAACUUUUCAGCAA-GCAUCCACGCUAUC
UUGG-AAGGCCAAAUCAUUGGUCAGUUUGAUUUGUUUCCUUUACUACCUUCCUCAUUG
UGUCCACGCUUUCCAUAUUGCCAUAUUUAUCCAGAUGGAUUUCUUUUACCGAGCGUUUUC
CUUGUAAGGUCUCUUCAUAUUGCUUUUCCAAUAGG-AGGUUCCAACACGGUCAUUUAGA
GAAUAGCCUUUU

>584_19F_Pen4_Ctx2 1310 bases

AAGGUCCUACACCAUUUGUUAG
AUUGGUUUUAUGAGGAAAGACCACUGCAACAGCGAUUUUGGGGAUUUAUCAGAUGGGGCAUA
GGCCACCGCAUUGGUUUUUGCUUGCUGACCAUCUGCCACAUAGCUUUCGGCUGUACC
UGUUUUUCCGCUAAUGGAUACCAA-GGCGCCAUUUUGAAAAGGCACGUCCAGUUGUCAAUC
CACUAGUACCAUGGGCAA-CCUGAUAAAAACCUUGGUGCAAGAUGCUCUAUACGGAGUCG
GAUUAUUGACCUUAUUAUCUCUGUCGGUUGCAGUUGCUGAAUCAAGUCACCCAGUCCU
CCCUAUUAUUAUUACCAUAAAUGCCUUAACAAUACGAGGAGCCACACGAACACCAUCA
UUUGCAAUAGUUGCUACAUAUCUGAGCCAACUGCAUGGGCGUAUAGUUUAUCAAACUGCCCA
AAGGCAUUGGUGAUGUAAUUAGCAAAGCUAUACUCUUUGGGAACAAAUCCAGUAGAUUCA
UCUGGUAGGUCAAUUCGGUCGCAGCCCCCAAGCCAUAUUCGCCAAAGGUCGCACGAAGU
UUUCCCAUAGCUGUUUCCAAAUUGCUGGUUCCAACAAACAUAUUUGGUUGAUAGGUCUGG
CCCAUGAUUCCAAGAGCGGUUUUAACCAUGUAAGCAUUGGAUGAAUACUCCAAGGCUUCC
ACAGCUGUAAUAGGAAAAGAUCCAUAUGCCAAUUUAUACCAAGAAUAAAUUGGAGCUGAA
CCUUGGAAAACAUAAGGCUGAUCUGUUAAGGUUUUGGUUUCCUGAUAAAACACCAUUUUC
CAACCUGAGCUGAUGGUAGCGGCCUUAACAACCGAACCUGGGACAAAGACAUUGGUUACC
GUUCCCAAGGAUACAGGAGUCAACUCUCCCGUUUUCAGGUCAUGUUUGAGUCCUGACAUA
GACAAAACAGCACCUGUUUUUGGGGUUAAGGGCGACUGCAUACACACCC-UCAGAAUACUU
GGCUCCACCAUUUCCUAGCUCGGAAUUGAAUAACUUUUCAGCAAAGCAUCCACGCUAUC
UUGG-AAGGCCAAAUCAAUGGUCAGUUUGAUUUGUUUCCCUUACUACCUUCCUCAAUUG
UGUCCACGCUUCCAUAUUGCCAUAUUUAUCCAGAUUGGAUUUCUUUUACCGAGCGUUUUC
CUUGUAAGGUCUCUUAUAUUGCUUUUCCAAUAGG-AGGUUCCAACACGGUCAUUUAGA
GAAUAGCCUUUU

>640_19F_Pen4_Ctx2 1310 bases

AAGGUCCUACAUUUUUGGUUAA
AUUGGUUUUAUGAGGAAAGACUACUGCAACUGCAAUUUGAGGAUUUUCUGUUGGAGCAUA
GGCCACGGCAUUGGUUUUAUUAAGCUUCUUGACCACCAGCUACAUAAGCUUUCACCUGUACC
GGUCUUACCACUGAUAGAAAC-AGUGGCGCCAUCUGAAAAACGCCCGUCCUGUCGUAAGGG
GACUAGUUCCAUGCGAUA-CUUGGUAAAAUCCUUGGUGCAAGAUACUCAUAUCGGAGUCG
GAUUAUUGACCUUAUUAUCUCUGUCGGUUGCAGUUGCUGAAUCAAGUCACCCAGUCCU
CCCUAUUAUUAUUACCAUAAAUGCCUUAACAAUACGAGGAGCCACACGAACACCAUCA
UUUGCAAUAGUUGCUACAUAUCUGAGCCAACUGCAUGGGCGUAUAGUUUAUCAAACUGCCCA
AAGGCAUUGGUGAUGUAAUUAGCAAAGCUAUACUCUUUGGGAACAAAUCCAGUAGAUUCA
UCUGGUAGGUCAAUUCGGUCGCAGCCCCCAAGCCAUAUUCGCCAAAGGUCGCACGAAGU
UUUCCCAUAGCUGUUUCCAAAUUGCUGGUUCCAACAAACAUAUUUGGUUGAUAGGUCUGG
CCCAUGAUUCCAAGAGCGGUUUUAACCAUGUAAGCAUUGGAUGAAUACUCCAAGGCUUCC
ACAGCUGUAAUAGGAAAAGAUCCAUAUGCCAAUUUAUACCAAGAAUAAAUUGGAGCUGAA
CCUUGGAAAACAUAAGGCUGAUCUGUUAAGGUUUUGGUUUCCUGAUAAAACACCAUUUUC
CAGCCAGAGCUGAUGGUCGCAGCCUUGACAACCGAACCUGGGACAAAGACAUUGGUUACC
GUUCCCAAGGAUACAGGAGUCAACUCUCCCGUUUUCAGGUCAUGUUUGAGUCCUGACAUA
GACAAAACAGCACCUGUUUUUGGGGUUAAGGGCGACUGCAUACACACCC-UCAGAAUACUU
GGCUCCACCAUUUCCUAGCUCGGAAUUGAAUAACUUUUCAGCAAAGCAUCCACGCUAUC
UUGG-AAGGCCAAAUCAAUGGUCAGCUUGAUUUGUUUCCCUUACUACCUUCCUCAAUUG
UAUCCACACUUUCCAUGUUGCCAUAUUUGUCCAGAUUGGAUUUCUUUUACCGAGCGUUUUC
CUUGUAAGGUCUCUUAUAUUGCUUUUCCAAUAGG-AGGUUCCAACACGGUCAUUUAGA
GAAUAGCCUUUU

>794_19F_Pen2_Ctx4 1310 bases

AAGGUCCUACAUUUUUGGUUAA
AUUGGUUUUAUGAGGAAAGACUACUGCAACUGCAAUUUGAGGAUUUUCUGUUGGAGCAUA
GGCCACGGCAUUGGUUUUAUUAAGCUUCUUGACCACCAGCUACAUAAGCUUUCACCUGUACC
GGUCUUACCACUGAUAGAAAC-AGUGGCGCCAUCUGAAAAACGCCCGUCCUGUCGUAAGGG
GACUAGUUCCAUGCGAUA-CUUGGUAAAAUCCUUGGUGCAAGAUACUCAUAUCGGAGUCG
GAUUAUUGACCUUAUUAUCUCUGUCGGUUGCAGUUGCUGAAUCAAGUCACCCAGUCCU
CCCUAUUAUUAUUACCAUAAAUGCCUUAACAAUACGAGGAGCCACACGAACACCAUCA
UUUGCAAUAGUUGCUACAUAUCUGAGCCAACUGCAUGGGCGUAUAGUUUAUCAAACUGCCCA
AAGGCAUUGGUGAUGUAAUUAGCAAAGCUAUACUCUUUGGGAACAAAUCCAGUAGAUUCA
UCUGGUAGGUCAAUUCGGUCGCAGCCCCCAAGCCAUAUUCGCCAAAGGUCGCACGAAGU
UUUCCCAUAGCUGUUUCCAAAUUGCUGGUUCCAACAAACAUAUUUGGUUGAUAGGUCUGG
CCCAUGAUUCCAAGAGCGGUUUUAACCAUGUAAGCAUUGGAUGAAUACUCCAAGGCUUCC

ACAGCUGUAAUAGGAAAAGAUCCAUAUGCCAAUUUAUACCAAGAAUAAAUUGGAGCUGAA
CCUUGGAAAACAAUAGGCUGAUCUGUUAAGGUUUGGUUUCUGAUAAAACACCAUUUUC
CAACCUGAGCUGAUGGUAGCGGCCUUAACAACCGAACCUGGGACAAAGACAUUGGUUACC
GUUCCCAAGGAAUCAGGAGUCAACUCUCCCGUUUUCAGGUCAUGUUUGAGUCCUGACAUA
GACAAAACAGCACCUGUUUUGGGGUUAAGGGCGACUGCAUACACACCC-UCAGAAUACUU
GGCUCACCAUUUCCUAGCUCGGAUUUGAAUAACUUUUCAGCAAAGCAUCCACGCUAUC
UUGG-AAGGCCAAAUCAAUGGUCAGUUUGAUUUGUUUCCCUUACUACCUUCCUCAAUUG
UGUCCACGCUUUCCAUAUUGCCAUAUUUAUCCAGAUGGAUUUCUUUUACCGAGCGUUUUC
CUUGAAAGGUCUCUUAUAUUGCUUUUCCAAUAGG-AGGUUCCAACACGGUCAUUUAGA
GAAUAGCCUUUU

>905_19F_Pen4_Ctx2 1310 bases

AAGGUCCUACAUUUUUGGUUAA
AUUGGUUUUAUGAGGAAAGACUACUGCAACUGCAAUUUGAGGAUUUUCUGUUGGAGCAUA
GGCCACGGCAUUGGUUUUAUAGCUUCUUGACCACCAGCUACAUAGCUUUCACCUGUACC
GGUCUUACCACUGAUAGAAAC-AGUGGCGCCAUCUGAAAACGCCCUGCCUGUCGUAAGGG
GACUAGUUCCAUGCGAUA-CUUGGUAAAUAUCCUUGGUGCAAGAUACUCAUAUCGGAGUCG
GAUAUAUUGACCUUAUUAUCUCUGUCGGUUGCAGUUGCUGAAUCAAGUCACCCAGUCCU
CCCUUAUCAUUUUACCAUAAAUGCCUUAACAAUACGAGGAGCCACACGAACACCAUCA
UUUGCAAUAGUUGCUACAUAUCUGAGCCAACUGCAUGGGCGUAUAGUUAUCAAACUGCCCA
AAGGCAUUGGUGAUGUAAUUAGCAAAGCUAUACUCUUUGGGAACAAUCCAGUAGAUUCA
UCUGGUAGGUCAAUUCGCGCAGCCCCAAGCCAUAUUCGCCAAAGGUCGCACGAAGU
UUUCCCAUAGCUGUUUCCAAAUUGCUGGUUCCAACAAACAUAUUUGGUUGAUAGGUCUGG
CCCAUGAUUCCAAGAGCGGUUUUGAACCAUGUAAGCAUUGGAUGAAUACUCCAAGGCUUCC
ACAGCUGUAAUAGGAAAAGAUCCAUAUGCCAAUUUAUACCAAGAAUAAAUUGGAGCUGAA
CCUUGGAAAACAAUAGGCUGAUCUGUUAAGGUUUGGUUUCUGAUAAAACACCAUUUUC
CAACCUGAGCUGAUGGUAGCGGCCUUAACAACCGAACCUGGGACAAAGACAUUGGUUACC
GUUCCCAAGGAAUCAGGAGUCAACUCUCCCGUUUUCAGGUCAUGUUUGAGUCCUGACAUA
GACAAAACAGCACCUGUUUUGGGGUUAAGGGCGACUGCAUACACACCC-UCAGAAUACUU
GGCUCACCAUUUCCUAGCUCGGAUUUGAAUAACUUUUCAGCAAAGCAUCCACACUAUC
UUGG-AAGGCCAAAUCAAUGGUCAGCUUGAUUUGUUUCCCUUACUACCUUCCUCAAUUG
UAUCCACGCUUUCCAUAUUGCCAUAUUUAUCCAGAUGGAUUUCUUUUACCGAGCGUUUUC
CUUGAAAGGUCUCUUAUAUUGCUUUUCCAAUACG-AGGUUCCAACACGGUCAUUUAGA
GAAUAGCCUUUU

>960_19F_Pen4_Ctx4 1310 bases

AAGGUCCUACAUUUUUGGUUAA
AUUGGUUUUAUGAGGAAAGACUACUGCAACUGCAAUUUGAGGAUUUUCUGUUGGAGCAUA
GGCCACGGCAUUGGUUUUAUAGCUUCUUGACCACCAGCUACAUAGCUUUCACCUGUACC
GGUCUUACCACUGAUAGAAAC-AGUGGCGCCAUCUGAAAACGCCCUGCCUGUCGUAAGGG
GACUAGUUCCAUGCGAUA-CUUGGUAAAUAUCCUUGGUGCAAGAUACUCAUAUCGGAGUCG
GAUAUAUUGACCUUAUUAUCUCUGUCGGUUGCAGUUGCUGAAUCAAGUCACCCAGUCCU
CCCUUAUCAUUUUACCAUAAAUGCCUUAACAAUACGAGGAGCCACACGAACACCAUCA
UUUGCAAUAGUUGCUACAUAUCUGAGCCAACUGCAUGGGCGUAUAGUUAUCAAACUGCCCA
AAGGCAUUGGUGAUGUAAUUAGCAAAGCUAUACUCUUUGGGAACAAUCCAGUAGAUUCA
UCUGGUAGGUCAAUUCGCGCAGCCCCAAGCCAUAUUCGCCAAAGGUCGCACGAAGU
UUUCCCAUAGCUGUUUCCAAAUUGCUGGUUCCAACAAACAUAUUUGGUUGAUAGGUCUGG
CCCAUGAUUCCAAGAGCGGUUUUGAACCAUGUAAGCAUUGGAUGAAUACUCCAAGGCUUCC
ACAGCUGUAAUAGGAAAAGAUCCAUAUGCCAAUUUAUACCAAGAAUAAAUUGGAGCUGAA
CCUUGGAAAACAAUAGGCUGAUCUGUUAAGGUUUGGUUUCUGAUAAAACACCAUUUUC
CAGCCAGAGCUGAUGGUUCGACGCCUUGACAACCGAACCUGGGACAAAGACAUUGGUUACC
GUUCCCAAGGAAUCAGGAGUCAACUCUCCCGUUUUCAGGUCAUGUUUGAGUCCUGACAUA
GACAAAACAGCACCUGUUUUGGGGUUAAGGGCGACUGCAUACACACCC-UCAGAAUACUU
GGCUCACCAUUUCCUAGCUCGGAUUUGAAUAACUUUUCAGCAAAGCAUCCACGCUAUC
UUGG-AAGGCCAAAUCAAUGGUCAGCUUGAUUUGUUUCCCUUACUACCUUCCUCAAUUG
UAUCCACACUUUCCAUGUUGCCAUAUUUGUCCAGAUGGAUUUCUUUUACCGAGCGUUUUC
CUUGAAAGGUCUCUUAUAUUGCUUUUCCAAUACG-AGGUUCCAACACGGUCAUUUAGA
GAAUAGCCUUUU

>017_23F_Pen2_Ctx1 1310 bases

AAGGUCCUAAACCAUUUGUUAG

AUUGGUAUUAUGAGGAAAGACCACUGCGACAGCGAUUUGGGGAUUAUCAGAUUGGGGCAUA
GGCCACCGCAUUGGUAUUGGUUGCUUGCUGACCAUCUGCCACAUAGCUUUCGGCUGUACC
UGUUUUUCCGCUAAUGGAUACCAA-GGCACCAUUGAAAAGGCACGUCCAGUUGUCAUUC
CACUAGUACCAUGGGCAA-CCUGAUAAAAACCUUGGUGCAAGAUGCUCUAUUCGGAGUCG
GAUUAUUGACCUUAUUAUCUCUGUCGGUUGCAGUUGCUGAAUCAAGUCACCCAGUCCU
CCCUUAUCAUUAUUAACCAUAAAUGCCUUAACAAUACGAGGAGCCACACGAACACCAUUA
UUUGCAAUAGUUGCUACAUAUCUGAGCCAACUGCAUCGGCGUAUAGUUAUCAAACUGCCCA
AAGGCAUUAAGUAAUGUAAUAGCAAAGCUAUACUCUUUGGGAACAAAUCCAGUAGAUUCA
UCUGGUAGGUCAAUUCUGUCGCAGUACCCAAGCCAUAUUCGCCAAAGGUUGAACGCAGU
UUCUCCAUAAGCAGACUCUAGAUUGCUGGUGCCGACAAACAUAUUGGGUUGAUAGGUUUGC
CCCAUAAGACCUAAGGCUGUUUGGACCAUAUAGGUUAUUUGAUGAAUACUCCAGAGCUUGG
ACCGCUGUGAUAGGGAAUGAACCGUAAGCCUGAGUAUACCAAGAAUUGAUGGGAGCUGAA
CCUUGGAAGACAAUGGACUGGUCUGUCAAGGUCUGGUUUCUGACAAGACUCCAUUUUC
CAACCUGAGCUGAUGGUCGCCGCCUUGACAACCGAACCUGGAACAAAGACAUUGGUUACC
GUUCCCAAGGAUACAGGCGUCAACUCUCCCGUUUUAAGUCAUGUUUAUCCUGACAUA
GACAAAACCGCACCUGUUUUUGGGUUAAGGGCGACUGCAUAGACACCU-UCAGAAUACUU
GGCUCCACCAUUUUCUAGCUCAGAAUUGAAUAACUUUUCAGUAAAGCAUCCACGCUAUC
UUGG-AAAGCCAAAUCAAUGGUCAGUUUGAUUUGUUUCCCUUACUACCUUCCUCAAUUG
UAUCCACGCUUCCAUAUUGCCAUAUUUAUCCAGAUUGGAUUUCUUUUACCGAGCGUUUUC
CUUGUAAGGUCUCUUAUAUUGCUUUUCCAAUAGA-AGGUUCCUACACGGUCAUUUAGA
GAAUAGCCUUUU

>198_23F_Pen2_Ctx1 1310 bases

GUUUUUUGAUACAGAUUGAUAAUGUCACGCGCAAUGGAAGGUCCUACACCAUUUGUAG
AUUGGUAUUAUGAGGAAAGACCACUGCGACAGCGAUUUGGGGAUUAUCAGAUUGGGGCAUA
GGCCACCGCAUUGGUAUUGGUUGCUUGCUGACCAUCUGCCACAUAGCUUUCGGCUGUACC
UGUUUUUCCGCUAAUGGAUACCAAAGG-CACCAUUGAAAAGGCACGUCCAGUUGUCAUUC
CACUAGUACCAUGGGCAAACC-UGAUAAAAACCUUGGUGCAAGAUGCUCUAUUCGGAGUCG
GAUUAUUGACCUUAUUAUCUCUGUCGGUUGCAGUUGCUGAAUCAAGUCACCCAGUCCU
CCCUUAUCAUUAUUAACCAUAAAUGCCUUAACAAUACGAGGAGCCACACGAACACCAUUA
UUUGCAAUAGUUGCUACAUAUCUGAGCCAACUGCAUGGGCGUAUAGUUAUCAAACUGCCCA
AAGGAAUUGGUGAUGUAAUAGCAAAGCUAUACUCUUUGGGAACAAAUCCAGUAGAUUCA
UCUGGUAGGUCAAUUCGGUCGCAGCCCCCAAGCCAUAUUCGCCAAAGGUCGCACGAAGU
UUUCCCAUAGCUGUUUCCAAAUUGCUGGUUCCAACAAACAUAUUGGUUGAUAGGUCUGG
CCCAUGAUUCCAAGAGCGGUUUGAACCAUGUAAGCAUUGGAUGAAUACUCCAAGGCUUCC
ACAGCUGUAAUAGGAAAAGAUCCAUAUGCCAAUUAUACCAAGAAUAAAUUGGAGCUGAA
CCUUGGAAAACAAUAGGCUGAUCUGUUAAGGUUUGGUUUCUGAUAAAACACCAUUUUC
CAACCUGAGCUGAUGGUCGCAGCCUUGACAACCGAACCUGGGACAAAGACAUUGGUUACC
GUUCCCAAGGAUACAGGAGUCAACUCUCCCGUUUUCAGGUCAUGUUUGAUCCUGACAUG
GAUAAAACAGCACCUGUUUUUGGGUUAAGGGCGACUGCAUAGACACCU-UCAGAAUUAUU
AGCUCCACCAUUUCCUAGCUCGGAAUUGAAUAACUUUUCAGCAAAGCAUCCACGCUAUC
UUGG-AAGGCCAAAUCAAUGGUCAGUUUGAUUUGUUUCCCUUACUACCUUCCUCAAUUG
UGUCCACGCUUCCAUAUUGCCAUAUUUAUCCAGAUUGGAUUUCUUUUACCGAGCGUUUUC
CUUGUAAGGUCUCUUAUAUUGCUUUUCCAAUAGG-AGGUUCCAACACGGUCAUUUAGA
GAAUAGCCUUUU

>208_23F_Pen2_Ctx1 1310 bases

AAGGUCCUAACCAUUUGUAG
AUUGGUAUUAUGAGGAAAGACCACUGCGACAGCGAUUUGGGGAUUAUCAGAUUGGGGCAUA
GGCCACCGCAUUGGUAUUGGUUGCUUGCUGACCAUCUGCCACAUAGCUUUCGGCUGUACC
UGUUUUUCCGCUAAUGGAUACCAA-GGCACCAUUGAAAAGGCACGUCCAGUUGUCAUUC
CACUAGUACCAUGGGCAA-CCUGAUAAAAACCUUGGUGCAAGAUGCUCUAUUCGGAGUCG
GAUUAUUGACCUUAUUAUCUCUGUCGGUUGCAGUUGCUGAAUCAAGUCACCCAGUCCU
CCCUUAUCAUUAUUAACCAUAAAUGCCUUAACAAUACGAGGAGCCACACGAACACCAUUA
UUUGCAAUAGUUGCUACAUAUCUGAGCCAACUGCAUCGGCGUAUAGUUAUCAAACUGCCCA
AAGGCAUUAAGUAAUGUAAUAGCAAAGCUAUACUCUUUGGGAACAAAUCCAGUAGAUUCA
UCUGGUAGGUCAAUUCUGUCGCAGUACCCAAGCCAUAUUCGCCAAAGGUUGAACGCAGU
UUCUCCAUAAGCAGACUCUAGAUUGCUGGUGCCGACAAACAUAUUGGGUUGAUAGGUUUGC
CCCAUAAGACCUAAGGCUGUUUGGACCAUAUAGGUUAUUUGAUGAAUACUCCAGAGCUUGG
ACCGCUGUGAUAGGGAAUGAACCGUAAGCCUGAGUAUACCAAGAAUUGAUGGGAGCUGAA

CCUUGGAAGACAAUGGACUGGUCUGUCAAGGUCUGGUUUCUGACAAGACUCCAUUUUCC
CAACCUGAGCUGAUGGUCGCCGCCUUGACAACCGAACCUGGAACAAAGACAUUGGUUACC
GUUCCCAAGGAAUCAGGCGUCAACUCUCCCGUUUUAAGUCAUGUUUAAUCCUGACAUA
GACAAAACCGCACCUGUUUUUGGGUUAAGGGCGACUGCAUAGACACCU-UCAGAAUACUU
GGCUCACCAUUUUUCUAGCUCGGAUUGAAUAACUUUUCAGUAAAGCAUCCACGCUAUC
UUGG-AAGGCCAAAUCAAUGGUCAGUUUGAUUUGUUUCCCUUACUACCUUCCUCAAUUG
UAUCCACGCUUUCCAUAUUGCCAUAUUUAUCCAGAUGGAUUUCUUUUACCGAGCGUUUUC
CUUGUAAGGUCUCUUCAUAUUGCUUUUCCAAUAGG-AGGUUCCUACACGAUCAUUUAGA
GAAUAGCCUUUU

>306_23F_Pen2_Ctx05 1310 bases

AAGGUCCUACACCAUUUGUUAG
AUUGGUUUUAUGAGGAAAGACCACUGCAACAGCGAUUUGGGGAUUUAUCAGAUGGGGCAUA
GGCCACCGCAUUGGUUAUUGGUUUGCUUGCUGACCAUCUGCCACAUAGCUUUCGGCUGUACC
UGUUUUUCCGCUAAUGGAUACCAA-GGCGCCAUUUGAAAAGGCACGUCCAGUUGUCAUUC
CACUAGUACCAUGGGCAA-CCUGAUAAAAACCUUGGUGCAAGAUGCUCUAUUCGGAGUCG
GAUAUAUUGACCUUAUUAUCUCUGUCGGUUGCAGUUGCUGAAUCAAGUCACCCAGUCCU
CCCUUAUCAUUUUACCAUAAAUGCCUUAACAAUACGAGGAGCCACACGAACACCAUUA
UUUGCAAUAGUUGCUACAUAUCUGAGCCAACUGCAUCGGCGUAUAGUUUAUCAAACUGCCCA
AAGGCAUUAGUAAUGUAAUAGCAAAGCUAUACUCUUUGGGAACAAUCCAGUAGAUUCA
UCUGGUAGGUCAAUUCUGUCGCAGUACCCAAGCCAUAUUCGCCAAAGGUUGAACGCAGU
UUCUCCAUAGCUGUUUCCAAUUGCUUGGUUCCAACAAACAUUUUGGUUGAUAGGUCUGG
CCCAUGAUUCCAAGAGCGGUUUGAACCAUGUAAGCAUUGGAUGAAUACUCCAAGGCUUCC
ACAGCUGUAAUAGGAAAAGAUCCAUAUGCCAAUUUAUACCAAGAAUAAAUUGGAGCUGAA
CCUUGGAAAACAAUAGGCUGAUCUGUUAAGGUUUGGUUUCUGAUAAAACACCAUUUUCC
CAACCUGAGCUGAUGGUCGCAGCCUUGACAACCGAACCUGGGACAAAGACAUUGGUUACC
GUUCCCAAGGAAUCAGGAGUCAACUCUCCCGUUUUCAGGUCAUGUUUGAUCCUGACAUG
GAUAAAACAGCACCUGUUUUUGGGUUAAGGGCGACUGCAUAGACACCU-UCAGAAUAAUU
AGCUCACCAUUUCCUAGCUCGGAUUGAAUAACUUUUCAGCAAAGCAUCCACGCUAUC
UUGG-AAGGCCAAAUCAAUGGUCAGUUUGAUUUGUUUCCCUUACUACCUUCCUCAAUUG
UGUCCACGCUUUCCAUAUUGCCAUAUUUAUCCAGAUGGAUUUCUUUUACCGAGCGUUUUC
CUUGUAAGGUCUCUUCAUAUUGCUUUUCCAAUAGG-AGGUUCCAACACGGUCAUUUAGA
GAAUAGCCUUUU

>788_23F_Pen4_Ctx05 1310 bases

AAGGUCCUACACCAUUUGUUAG
AUUGGUUUUAUGAGGAAAGACCACUGCGACAGCGAUUUGGGGAUUUAUCAGAUGGGGCAUA
GGCCACCGCAUUGGUUAUUGGUUUGCUUGCUGACCAUCUGCCACAUAGCUUUCGGCUGUACC
UGUUUUUCCGCUAAUGGAUACCAA-GGCACCAUUUGAAAAGGCACGUCCAGUUGUCAUUC
CACUAGUACCAUGGGCAA-CCUGAUAAAAACCUUGGUGCAAGAUGCUCUAUUCGGAGUCG
GAUAUAUUGACCUUAUUAUCUCUGUCGGUUGCAGUUGCUGAAUCAAGUCACCCAGUCCU
CCCUUAUCAUUUUACCAUAAAUGCCUUAACAAUACGAGGAGCCACACGAACACCAUUA
UUUGCAAUAGUUGCUACAUAUCUGAGCCAACUGCAUCGGCGUAUAGUUUAUCAAACUGCCCA
AAGGCAUUAGUAAUGUAAUAGCAAAGCUAUACUCUUUGGGAACAAUCCAGUAGAUUCA
UCUGGUAGGUCAAUUCUGUCGCAGUACCCAAGCCAUAUUCGCCAAAGGUUGAACGCAGU
UUCUCCAUAGCAGACUCUAGAUUGCUGGUGCCGACAAACAUUUGGGUUGAUAGGUUUGC
CCCAUAAAGACCUAAGGCUGUUUGGACCAUAUAGGUUAUAGAUGAAUACUCCAGAGCUUGG
ACCGCUGUGAUAGGGAAUGAACCGUAAGCCUGAGUAUACCAAGAAUUGAUGGGAGCUGAA
CCUUGGAAGACAAUGGACUGGUCUGUCAAGGUCUGGUUUCUGACAAGACUCCAUUUUCC
CAACCUGAGCUGAUGGUCGCCGCCUUGACAACCGAACCUGGAACAAAGACAUUGGUUACC
GUUCCCAAGGAAUCAGGCGUCAACUCUCCCGUUUUAAGUCAUGUUUAAUCCUGACAUA
GACAAAACCGCACCUGUUUUUGGGUUAAGGGCGACUGCAUAGACACCU-UCAGAAUACUU
GGCUCACCAUUUUUCUAGCUCAGAAUUGAAUAACUUUUCAGCAAAGCAUCCACGCUAUC
UUGG-AAGGCCAAAUCAAUGGUCAGUUUGAUUUGUUUCCCUUACUACCUUCCUCAAUUG
UAUCCACGCUUUCCAUAUUGCCAUAUUUAUCCAGAUGGAUUUCUUUUACCGAGCGUUUUC
CUUGUAAGGUCUCUUCAUAUUGCUUUUCCAAUAGG-AGGUUCCUACACGGUCAUUUAGA
GAAUAGCCUUUU

>323_6B_Pen2_Ctx1 1310 bases

AAGGUCCUACACCAUUUGUUAG
AUUGGUUUUAUGAGGAAAGACCACUGCAACAGCGAUUUGGGGAUUUUCAGAUGGGGCAUA

GGCCCCGGCAUUGGUAUUGGUUGCUUGCUGACCAUCUGCCACAUAAGCUUUCGGCUGUACC
 UGUUUUUUCCCCUAAUGGAUACCAAAGGCGCCAUUUGAAAAGGCACGUCCCAUUGUCAUUC
 CACUAGUACCAUGGGGCAACCUGAUAAAAACCUUGGUGCAAGAUGCUCUAUUCGGAGUCG
 GAUAUAUUGACCUUAUUAUCUCUGUCGGUUGCAGUUGCUGAAUCAAGUCACCCAGUCCU
 CCCUUAUCAUUAUUACCAUAAAUGCCUUAACAAUACGAGGAGCCACACGAACACCAUCA
 UUUGCAAUAGUUGCUACAUAUCUGAGCCAACUGCAUGGGCGUAUAGUUAUCAAACUGCCCA
 AAGGCAUUGGUGAUGUAAUUAGCAAAGCUAUACUCUUUGGGAACAAAUCCAGUAGAUUCA
 UCUGGUAGGUCAAUUCGGUCGCAGCCCCCAAGCCAUAUUCGCCAAAGGUCGCACGAAGU
 UUUCCCAUAGCUGUUUCCAAAUUGCUGGUUCCAACAAACAUAUUUGGUUGAUAGGUCUGG
 CCCAUGAUUCCAAGAGCGGUUUUAACCAUGUAAGCAUUGGAUGAAUACUCCAAGGCUUCC
 ACAGCUGUAAUAGGAAAAGAUCCAUAUGCCAAUUUAUACCAAGAAUAAAUUGGAGCUGAA
 CCUUGGAAAACAAUAGGCUGAUCUGUUAAGGUUUGGUUUCCUGAUAAAACACCAUUUUCC
 CAACCUGAGCUGAUGGUAGCGGCCUUAACAACCGAACCUGGGACAAAGACAUUGGUUACC
 GUUCCCAAGGAUUCAGGAGUCAACUCUCCCGUUUUCAGGUCAUGUUUGAGUCCUGACAUA
 GACAAAACAGCACCUGUUUUUGGGGUUAAGGGCGACUGCAUACACACCCUCAGAAUACUU
 GGCUCCACCAUUUCCUAGCUCGGAAUUGAAUAACUUUUCAGCAAAGCAUCCACGCUAUC
 UUGGGAAGGCCAAAUCAAUGGUCAGUUUGAUUAUUGUUUCCCUUACUACCUUCCUCAUUG
 UGUCCACGCUUCCAUUUGCCAUAUUUAUCCAGAUUGGAUUUCUUUUACCGAGCGUUUUC
 CUUGUAAGGUCUCUUAUAUUGCUUUUCCAAUAGGGAGGUCCAACACGGUCAUUUAGA
 GAAUAGCCUUUU

>806_9V_Pen2_Ctx1 1310 bases

AAGGUCCUACACCAUUUGUUAG
 AUUGGUUAUUAUGAGGAAAGACCACUGCGACAGCGAUUUGGGGAUUAUCAGAUUGGGGCAUA
 GGCCACCGCAUUGGUAUUGGUUGCUUGCUGACCAUCUGCCACAUAAGCUUUCGGCUGUACC
 UGUUUUUUCCGCUAAUGGAUACCAAAGG-CACCAUUUGAAAAGGCACGUCCAGUUGUCAUUC
 CACUAGUACCAUGGGCAACC-UGAUAAAAACCUUGGUGCAAGAUGCUCUAUUCGGAGUCG
 GAUAUAUUGACCUUAUUAUCUCUGUCGGUUGCAGUUGCUGAAUCAAGUCACCCAGUCCU
 CCCUUAUCAUUAUUACCAUAAAUGCCUUAACAAUACGAGGAGCCACACGAACACCAUUA
 UUUGCAAUAGUUGCUACAUAUCUGAGCCAACUGCAUGGGCGUAUAGUUAUCAAACUGCCCA
 AAGGAAUUGGUGAUGUAAUUAGCAAAGCUAUACUCUUUGGGAACAAAUCCAGUAGAUUCA
 UCUGGUAGGUCAAUUCGGUCGCAGCCCCCAAGCCAUAUUCGCCAAAGGUCGCACGAAGU
 UUUCCCAUAGCUGUUUCCAAAUUGCUGGUUCCAACAAACAUAUUUGGUUGAUAGGUCUGG
 CCCAUGAUUCCAAGAGCGGUUUUAACCAUGUAAGCAUUGGAUGAAUACUCCAAGGCUUCC
 ACAGCUGUAAUAGGAAAAGAUCCAUAUGCCAAUUUAUACCAAGAAUAAAUUGGAGCUGAA
 CCUUGGAAAACAAUAGGCUGAUCUGUUAAGGUUUGGUUUCCUGAUAAAACACCAUUUUCC
 CAACCUGAGCUGAUGGUUCGCAGCCUUGACAACCGAACCUGGGACAAAGACAUUGGUUACC
 GUUCCCAAGGAUUCAGGAGUCAACUCUCCCGUUUUCAGGUCAUGUUUGAUCCUGACAUG
 GAUAAAACAGCACCUGUUUUUGGGUUAAGGGCGACUGCAUAGACACCU-UCAGAAUAUUU
 AGCUCCACCAUUUCCUAGCUCGGAAUUGAAUAACUUUUCAGCAAAGCAUCCACGCUAUC
 UUGG-AAGGCCAAAUCAAUGGUCAGUUUGAUUAUUGUUUCCCUUACUACCUUCCUCAUUG
 UGUCCACGCUUCCAUUUGCCAUAUUUAUCCAGAUUGGAUUUCUUUUACCGAGCGUUUUC
 CUUGUAAGGUCUCUUAUAUUGCUUUUCCAAUAGG-AGGUUCCAACACGGUCAUUUAGA
 GAAUAGCCUUUU

>239_11_Pen2_Ctx2 1310 bases

AAGGUCCUACACCAUUUGUUAG
 AUUGGUUAUUAUGAGGAAAGACCACUGCGACAGCGAUUUGGGGAUUAUCAGAUUGGGGCAUA
 GGCCACCGCAUUGGUAUUGGUUGCUUGCUGACCAUCUGCCACAUAAGCUUUCGGCUGUACC
 UGUUUUUUCCGCUAAUGGAUACCAAAGGCAACCAUUUGAAAAGGCACGUCCAGUUGUCAUUC
 CACUAGUACCAUGGGCAACCCUGAUAAAAACCUUGGUGCAAGAUGCUCUAUUCGGAGUCG
 GAUAUAUUGACCUUAUUAUCUCUGUCGGUUGCAGUUGCUGAAUCAAGUCACCCAGUCCU
 CCCUUAUCAUUAUUACCAUAAAUGCCUUAACAAUACGAGGAGCCACACGAACACCAUUA
 UUUGCAAUAGUUGCUACAUAUCUGAGCCAACUGCAUGGGCGUAUAGUUAUCAAACUGCCCA
 AAGGAAUUGGUGAUGUAAUUAGCAAAGCUAUACUCUUUGGGAACAAAUCCAGUAGAUUCA
 UCUGGUAGGUCAAUUCGGUCGCAGCCCCCAAGCCAUAUUCGCCAAAGGUCGCACGAAGU
 UUUCCCAUAGCUGUUUCCAAAUUGCUGGUUCCAACAAACAUAUUUGGUUGAUAGGUCUGG
 CCCAUGAUUCCAAGAGCGGUUUUAACCAUGUAAGCAUUGGAUGAAUACUCCAAGGCUUCC
 ACAGCUGUAAUAGGAAAAGAUCCAUAUGCCAAUUUAUACCAAGAAUAAAUUGGAGCUGAA
 CCUUGGAAAACAAUAGGCUGAUCUGUUAAGGUUUGGUUUCCUGAUAAAACACCAUUUUCC
 CAACCUGAGCUGAUGGUUCGCAGCCUUGACAACCGAACCUGGGACAAAGACAUUGGUUACC
 GUUCCCAAGGAUUCAGGAGUCAACUCUCCCGUUUUCAGGUCAUGUUUGAUCCUGACAUG
 GAUAAAACAGCACCUGUUUUUGGGUUAAGGGCGACUGCAUAGACACCU-UCAGAAUAUUU
 AGCUCCACCAUUUCCUAGCUCGGAAUUGAAUAACUUUUCAGCAAAGCAUCCACGCUAUC
 UUGG-AAGGCCAAAUCAAUGGUCAGUUUGAUUAUUGUUUCCCUUACUACCUUCCUCAUUG
 UGUCCACGCUUCCAUUUGCCAUAUUUAUCCAGAUUGGAUUUCUUUUACCGAGCGUUUUC
 CUUGUAAGGUCUCUUAUAUUGCUUUUCCAAUAGG-AGGUUCCAACACGGUCAUUUAGA
 GAAUAGCCUUUU

CAACCUGAGCUGAUGGUCGCAGCCUUGACAACCGAACCUGGGACAAAGACAUUGGUUACC
GUUCCCAAGGAAUCAGGAGUCAACUCUCCCGUUUCAGGUCAUGUUUGAUCCCUGACAUG
GAUAAAACAGCACCUGUUUUUGGGUUAAGGGCGACUGCAUAGACACCU-UCAGAAUAUUU
AGCUCCACCAUUUCCUAGCUCGGAAUUGAAAUAACUUUUCAGCAAAGCAUCCACGCUAUC
UUGG-AAGGCCAAAUCAAUGGUCAGUUUGAUUUGUUUCCCUUACUACCUUCCUCAAUUG
UGUCCACGCUUCCAUUUGCCAUAUUUAUCCAGAUGGAUUUCUUUUACCGAGCGUUUUC
CUUGUAAGGUCUCUUCAUAUUGCUUUUCCAAUAGGGAGGUUCCAACACGGUCAUUUAGA
GAAUAGCCUUUU

Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες της PBP2X

>ATCC49619 998 bases

UUACACAACCAUUCAGCCCCUCCAGUCCUUUAUGGAAACCCAGAUGGAUGCUUUUCA
AGAGAAGGUAAAAGGAAAGUACAUGACAGCGACUUUGGUCAGUGCUAAAACAGGGGAAAU
UCUGGCAACGACGCAACGACCGACCUUUGAUGCAGAUACAAAAGAAGGCAUUACAGAGGA
CUUUGUUUGGCGUGAUAUCCUUUACCAAAGUAACUAUGAGCCAGGUUCCGCUAUGAAAGU
GAUGAUGUUUGGCGUGCUGCUAUUGAUAAUAAUACCUUUCAGGAGGAGAAGUCUUCAAUAG
UAGUGAGUUAAAAUUGCAGAUUGUACUAUCCGAGAUUGGGACGUCAAUGAAGGAUUGAC
UGGUGGCAGAAUGAUGACCUUUUCUCAAGGUUUUGCACACUCAAGUAACGUUGGGAUGAC
CCUCCUUGAGCAAAAGAUGGGGAGAUGCUACCUGGCUUGAUUAUCUUAUUCGUUUUAAAUU
UGGGGUUCCAACUCGUUUUGGUUUUGACAGAUGAAUAUGCAGGCCAACUCCAGCUGACAA
UAUUGUUAAUUAUUGCUCAGAGUUCAUUUGGACAAGGGAUUUCAGUAACUCAGACGCAAAU
GAUUCGUGCCUUUACAGCCAUUGCCAUAUGGCGUCAUGCUAGAGCCUAAAUUUAUAC
GGCCUUGUAUGAUCCAAAUAUCAAACCGUUCGUAGAUCUAAAAAGAAAUUGUAGGGAA
UCCAGUUUCGAAAGAUGCGGCUGGCCAAACUCGGACUCACAUGGUCUUGGUAGGAACGGA
UCCUAGAUAUGGAACUAUGUAUAAUCAUAGUACAGGAAAAGCAACUGUCAAUUGUCCAGG
UCAAAAUGUAGCCCUCAAGUCUGGUACAGCCGAAAUCGCUGACGAGAAAAAUGGAGGCUA
CUUGGUUGGUUCUACCAACAACAUAUUUCUCAGUUGUGGCUAUGAACCCUGCCGAAAAUCC
UGAUUUUAUCUUGUAUGUAACGGUUCAACAGCCUGAGC

>002_19F_Pen2_Ctx025 998 bases

UUACACAACCAUUCAGCCCCUCCAGUCCUUUAUGGAAACCCAGAUGGAUGCUUUUCA
AGAGAAGGUAAAAGGAAAGUACAUGACAGCGACUUUGGUCAGUGCUAAAACAGGGGAAAU
UCUGGCAACAACGCAACGACCGACCUUUGAUGCAGAUACAAAAGAAGGCAUUACAGAGGA
CUUUGUUUGGCGUGAUAUCCUUUACCAAAGUAACUAUGAGCCAGGUUCCACUAUGAAAGU
GAUGAUGUUUGGCGUGCUGCUAUUGAUAAUAAUACCUUUCAGGAGGAGAAGUCUUAAUAG
UAGUGAGUUAAAAUUGCAGAUUGCCACGAUUCGAGAUUGGGACGUUAAUGAAGGAUUGAC
UGGUGGCAGAAUGAUGACUUUUUCUCAAGGUUUUGCACACUCAAGUAACGUUGGGAUGAC
CCUCCUUGAGCAAAAGAUGGGGAGAUGCUACCUGGCUUGAUUAUCUUAUUCGUUUUAAAUU
UGGAGUUCGACCCGUUUCGGUUUGACGGAUGAGUAUGCUGGUCAGCUUCCUGCGGAUAA
UAUUGUCAACAUUGCGCAAAGCUCAUUUGGACAAGGGAUUUCAGUGACCCAGACGCAAAU
GAUUCGUGCCUUUACAGCUAUUGCUAAUGACGGUGUCAUGCUGGAGCCUAAAUUUAUAG
UGCCAUUUAUGAUCCAAAUGAUCAAACUGCUCGGAAAUCUAAAAAGAAAUUGUGGGAAA
UCCUGUUUCUAAAGAUGCAGCUAGUCUAACUCGGACUAACAUGGUUUUGGUAGGGACGGA
UCCGGUUUAUGGAACCAUGUAUAACCACAGCACAGGCAAGCCAACUGUAACUGUCCUGG
GCAAAAUGUAGCCCUCAAGUCUGGUACGGCUCAGAUUUGCUGACGAGAAAAAUGGUGGUUA
UCUAGUCGGGGUAACCGACUAUAUUUUCUGGCUGUAUGCAUGAGUCCGGCUGAAAAUCC
UGAUUUUAUCUUGUAUGUGACGGUCCAACAACCCUGAGC

>111_19F_Pen2_Ctx05 998 bases

UUACACAACCAUUCAGCCCCUCCAGUCCUUUAUGGAAACUCAGAUGGAUGCCUUUCU
AGAAAAAGUAAAAGGUAAGUAUAUGACCGCGACCUUGGUCAGUGCAAAGACCGGUGAAAU
CCUCGCUACCACCCAACGACCUACCUUUAUUGCAGAUACUAAAGAAGGAUACACUGAGGA
CUUUGUUUGGCGUGAUAUUCUUUAUCAAAGUAACUAUGAACCAGGAUCAGCCAUGAAGGU
UAUGACGUUAGCUUCUUCUAUUGAUAAUAAUACCUUCCCAAGUGGAGAAUACUUCAAUAG
CAGUGAAUUCAAAUAAGCGGAUGCGACGACUCGAGAUUGGGAUGUUAUUGAUGGUUUUGAC
UACUGGUGGGAUGAUGACUUUCUACAAGGUUUCGCUCACUCCAGUAAUGUUGGAAUGAG
UCUACUUGAACAAAAAUGGGGAGAUGCUACUUGGUUGGAUUAUCUAAAACGCUUUAAAUU
UGGGGUUCCAACUCGCUUUGGCUUUGACAGAUGAAUACGCUGGUC AACUCCAGCUGAUAA
UAUUGUUAGUAUUGCUCAAAGCUCAUUUGGGCAAGGAUUUCAGUGACACAAACACAAAU
GCUUCGUGCCUUUACAGCUAUUGCUAAUGAUGGAGUUAUGCUGGAGCCAAAAUUUAUAG
UGCUAUUUAUGAUACUAACAAUCAGUCUGUACGUAAGUCACAAAAAGAAAUAGUAGGAAA
UCCUGUUUCCAAGAGGCAGCAAGCACACUCGAAAUCACAUGAUCUUAAGUUGGGACGGA
CCCUCUAUAUGGAACUAUGUAUAAUACUACACAGGAAAGCCAAUUAUAACAGUCCUGG
ACAAAUGUAGCAGUUAUAAUCCGGUACGGCUCAAAUCGCUGAUGAGAAAAAUGGAGGAUA
CUUGGUUGGUUCUACCAAUUAUAUUUUCUCAGUUGUGACUAUGAAUCCUGCUGAAAAUCC
UGAUUUUAUCUUGUAUGUAACGGUUCAACAGCCUGAGC

>267_19F_Pen2_Ctx05 998 bases

UUACACAACCAUUCAGCCCCUCCAGUCCUUUAUGGAAACCCAGAUGGAUGCUUUUCA

AGAGAAGGUAAAAGGAAAGUACAUGACAGCGACUUUGGUCAGUGCUAAAACAGGGGAAAU
UCUGGCAACGACGCAACGACCGACCUUUGAUGCAGAUACAAAAGAAGGCAUUACAGAGGA
CUUUGUUUGGCGUGAUAUCCUUUACCAAAGUAACUAUGAGCCAGGUUCCGCUAUGAAAAGU
GAUGAUGUUGGCUGCUGCUAUUGAUAAUAAUACCUUUCAGGAGGAGAAGUCUUCAAUAG
UAGUGAGUUAAAAAUUGCAGAUUUACUAUCCGAGAUUGGGACGUCAAUGAAGGAUUGAC
UGGUGGCAGAAUGAUGACCUUUUCUCAAGGUUUUGCACACUCAAGUAACGUUGGGAUGAC
CCUCCUUGAGCAAAAGAUUGGAGAUAGCUACCUGGCUUGAUUAUCUUAUUCGUUUUAAAU
UGGGGUUCCAACUCGUUUUGGUUUUGACAGAUGAAUAUGCAGGCCAACUCCAGCUGACAA
UAUUGUUAUUAUUGCUCAGAGUUCAUUUGGACAAGGGAUUUCAGUAACUCAGACGCAAAU
GAUUCGUGCCUUUACAGCCAUUGCCAUGAUGGCGUCAUGCUAGAGCCUAAAUUUAUAC
GGCCUUGUAUGAUCCAAAUAUCAAACCGUUCGUAGAUCUAAAAAGAAAUUGUAGGGAA
UCCAGUUUCGAAAGAUAGCGGCUGGCCAAACUCGGACUCACAUGGUCUUGGUAGGAACGGA
UCCUAGAUAUGGAACUAUGUAUAAUCAUAGUACAGGAAAAGCAACUGUCAAUUGUCCAGG
UCAAAAUGUAGCCCUCAGUCUGGUACAGCCGAAAUCGCUGACGAGAAAAAUGGAGGCUA
CUUGGUUGGUUCUACCAACAACAUAUUUCUCAGUUGUGGCUAUGAACCCUGCCGAAAAUCC
UGAUUUUAUCUUGUAUGUAACGGUUAACAGCCUGAGC

>272_19F_Pen2_Ctx05 998 bases

UUUAUACAACCAUUUCCAGCCCCUCCAGUCCUUUAUGGAAACCCAGAUGGAUGCUUUUCA
AGAGAAGGUAAAAGGAAAGUACAUGACAGCGACUUUGGUCAGUGCUAAAACAGGGGAAAU
UCUGGCAACAACGCAACGACCAACCUUUGAUGCAGAUACAAAAGAAGGAAUUACAAAGGA
CUUUGUUUGGCGUGAUUAUACUUUACCAAAGUAACUAUGAGCCAGGUUCUACUAUGAAAAGU
GAUGAUGUUGGCUGCUGCUAUUGAUAAUAAUACCUUUCAGGAGGAGAAGUCUUUAAUAG
UAGUGAGUUAAAAAUUGCAGAUGCCACGAUUCGAGAUUGGGACGUUAAUGAAGGAUUAAC
UGGUGGAAGAAUGAUGACUUUUUCUCAAGGUUUUGCACACUCAAGUAACGUUGGGAUGAC
CCUUCUUGAGCAAAAGAUUGGAGAUAGCUACAUGGCUUGAUUAUCUAAAUCGUUUUAAAU
UGGAGUUCGACUCGUUUUGGUUUUGACGGAUGAAUAUGCAGGUCAACUCCAGCUGAUAA
UAUUGUAAAUAUUGCUCAAAGUUCAUUUGGACAAGGGAUUUCAGUGACCCAGACGCAAAU
GAUUCGUGCCUUUACAGCUAUUGCUAAUGACGGUGUCAUGCUGGAACCUAAAUUUAUAG
UGCCAUUUAUGAUCCAAAUGAUCAAACUGCUCGGAAAUCUAAAAAGAAAUUGUGGGAAA
UCCUGUUUCUAAAAGAUAGCUAGUCUAAUCUGGACUACAUGGUUUUGGUAGGGACGGA
UCCGGUUUAUGGAACCAUGUAUAACCACAGCACAGGCAAGCCAACUGUAACUGUCCUGG
GCAAAAUGUAGCCCUCAGUCUGGUACGGCUCAGAUUGCUGACGAGAAAAAUGGUGGUUA
UCUAGUCGGGUUAACCGACUAUAUUUUCUGGUUGUAUCGAUGAGUCCGGCUGAAAAUCC
UGAUUUUAUCUUGUAUGUGACGGUCCAACAACCUGAGC

>568_19F_Pen4_Ctx2 998 bases

UUUAUACGACUAAUUCUAGCACCCUCCAGUCCUUCAUGGAAACUCAGAUGGAUGCCUUUCU
AGAAAAAGUAAAAGGUAAGUAUAUGACCGCGACCUUGGUCAGUGCAAAGACCGGUGAAAU
CCUCGCUACCACCCAACGACCUACCUUUAUUGCAGAUACUAAAGAAGGAAUCACUGAGGA
CUUUGUUUGGCGUGAUAUUCUUUAUCAAAGUAACUAUGAACCAGGAUCAGCCAUGAAGGU
UAUGACGUUAGCUUCUUCUAUUGAUAAUAAUACCUUCCCAAGUGGAGAAUACUUCAAUAG
CAGUGAAUUCAAAUAAGCGGAUGCGACGACUCGAGAUUGGGAUGUUAUAGAGGGUUUGAC
UACUGGUGGGAUGAUGACUUUCUACAAGGUUUCGCUCACUCCAGUAAUGUUGGAAUGAG
UCUACUUGAACAAAAAUGGGGAGAUAGCUACUUGGUUGGAUUAUCUAAAACGCUUUAAAU
UGGGGUUCCAACUCGCUUUGGCUUGACAGAUGAAUACGCUGGUCAACUCCAGCUGAUAA
UAUUGUUAUGAUUGCUCAAAGCUCAUUUGGGCAAGGAAUUUCAGUGACACAAACACAAU
GCUUCGUGCCUUUACAGCUAUUGCUAAUGAUGGAGUUAUGCUGGAGCCAAAAUUUAUAG
UGCUAUUUAUGAUACUAACAAUCAGUCUGUACGUAAGUCACAAAAGAAAUAGUAGGAAA
UCCUGUUUCCAAAGAGGCAGCAAGCACACUCGAAAUCACAUGAUCUUAGUUGGGACGGA
CCCUCUAUAUGGAACUAUGUAUAAUCACUACACAGGAAAGCCAAUUAUAACAGUCCUGG
ACAAAUGUAGCAGUUAUAAUCCGGUACGGCUCAAAUCGCUGAUGAGAAAAAUGGAGGAUA
CUUGGUUGGUUCUACCAAUUAUAUUUUCUCAGCUGUGACUAUGAAUCCUGCUGAAAAUCC
UGAUUUUAUCUUGUAUGUAACGGUUAACAGCCUGAGC

>578_19F_Pen4_Ctx2 998 bases

UUUAUACAACAUUGUCUAGUCCGCUCCAUCUUUCAUGGAAACUCAGAUGGAUGCCUUUCU
AGAAAAAGUAAAAGGUAAGUAUAUGACCGCGACCUUGGUCAGUGCAAAGACCGGUGAAAU
CCUCGCUACCACCCAACGACCUACCUUUAUUGCAGAUACUAAAGAAGGAAUCACUGAGGA
CUUUGUUUGGCGUGAUAUUCUUUAUCAAAGUAACUAUGAACCAGGAUCAGCCAUGAAGGU
UAUGACGUUAGCUUCUUCUAUUGAUAAUAAUACCUUCCCAAGUGGAGAAUACUUCAAUAG

CAGUGAAUUCAAAAUAGCGGAUGCGACGACUCGAGAUUGGGAUGUUAUGAUGGUUUGAC
UACUGGUGGGAUGAUGACUUUCUACAAGGUUUCGCUCACUCCAGUAAUGUUGGAAUGAG
UCUACUUGAACAAAAAUGGGGAGAUGCUACUUGGUUGGAUUAUCUAAAACGCUUUAAAAU
UGGGGUUCCAACUCGCUUUGGCUUGACAGAUGAAUACGCUGGUCAACUCCAGCUGAUAA
UAUUGUUGUAUUGUCUCAAAGCUCAUUUGGGCAAGGAAUUCAGUGACACAAACACAAAU
GCUUCGUGCCUUUACAGCUAUUGCUAAUGAUGGAGUUAUGCUGGAGCCAAAAUUUAUAG
UGCUAUUUAUGAUACUAACAAUCAGUCUGUACGUAAGUCACAAAAAGAAAUAGUAGGAAA
UCCUGUUUCCAAGAGGCAGCAAGCACAACUCGAAAUCACAUGAUCUUAGUUGGGACGGA
CCCUCUAUAUGGAACUAUGUAUAAUCACUACACAGGAAAGCCAAUUAUACAGUUCCUGG
ACAAAAUGUAGCAGUUAUAAUCCGGUACGGCUCAAAUCGCUGAUGAGAAAAAUGGAGGAUA
CUUGGUUGGUUCUACCAAUUAUUAUUUCUCAGUUGUGACUAUGAAUCCUGCUGAAAAUCC
UGAUUUUAUCUUGUAUGUAACGGUUCAACAGCCUGAGC

>582_19F_Pen4_Ctx2 998 bases

UUUAUACAACAUUGUCUAGUCCGCUCCAUCUUUCAUGGAAACUCAGAUGGAUGCCUUUCU
AGAAAAAGUAAAAGGUAAGUAUAUGACCGCGACCUUGGUCAGUGCAAAGACCGGUGAAAU
CCUCGCUACCACCCAACGACCUACCUUUAUUGCAGAUACUAAAGAAGGAAUCACUGAGGA
CUUUGUUUGGCGUGAUUUCUUUAUCAAAGUAACUAUGAACCAGGAUCAGCCAUGAAGGU
UAUGACGUUAGCUUCUUCUAUUGAUAAUAAUACCUUCCCAAGUGGAGAAUACUUCAAUAG
CAGUGAAUUCAAAAUAGCGGAUGCGACGACUCGAGAUUGGGAUGUUAUGAUGGUUUGAC
UACUGGUGGGAUGAUGACUUUCUACAAGGUUUCGCUCACUCCAGUAAUGUUGGAAUGAG
UCUACUUGAACAAAAAUGGGGAGAUGCUACUUGGUUGGAUUAUCUAAAACGCUUUAAAAU
UGGGGUUCCAACUCGCUUUGGCUUGACAGAUGAAUACGCUGGUCAACUCCAGCUGAUAA
UAUUGUUGUAUUGUCUCAAAGCUCAUUUGGGCAAGGAAUUCAGUGACACAAACACAAAU
GCUUCGUGCCUUUACAGCUAUUGCUAAUGAUGGAGUUAUGCUGGAGCCAAAAUUUAUAG
UGCUAUUUAUGAUACUAACAAUCAGUCUGUACGUAAGUCACAAAAAGAAAUAGUAGGAAA
UCCUGUUUCCAAGAGGCAGCAAGCACAACUCGAAAUCACAUGAUCUUAGUUGGGACGGA
CCCUCUAUAUGGAACUAUGUAUAAUCACUACACAGGAAAGCCAAUUAUACAGUUCCUGG
ACAAAAUGUAGCAGUUAUAAUCCGGUACGGCUCAAAUCGCUGAUGAGAAAAAUGGAGGAUA
CUUGGUUGGUUCUACCAAUUAUUAUUUCUCAGUUGUGACUAUGAAUCCUGCUGAAAAUCC
UGAUUUUAUCUUGUAUGUAACGGUUCAACAGCCUGAGC

>584_19F_Pen4_Ctx2 998 bases

UUUAUACAACAUUGUCUAGUCCGCUCCAUCUUUCAUGGAAACUCAGAUGGAUGCCUUUCU
AGAAAAAGUAAAAGGUAAGUAUAUGACCGCGACCUUGGUCAGUGCAAAGACCGGUGAAAU
CCUCGCUACCACCCAACGACCUACCUUUAUUGCAGAUACUAAAGAAGGAAUCACUGAGGA
CUUUGUUUGGCGUGAUUUCUUUAUCAAAGUAACUAUGAACCAGGAUCAGCCAUGAAGGU
UAUGACGUUAGCUUCUUCUAUUGAUAAUAAUACCUUCCCAAGUGGAGAAUACUUCAAUAG
CAGUGAAUUCAAAAUAGCGGAUGCGACGACUCGAGAUUGGGAUGUUAUGAUGGUUUGAC
UACUGGUGGGAUGAUGACUUUCUACAAGGUUUCGCUCACUCCAGUAAUGUUGGAAUGAG
UCUACUUGAACAAAAAUGGGGAGAUGCUACUUGGUUGGAUUAUCUAAAACGCUUUAAAAU
UGGGGUUCCAACUCGCUUUGGCUUGACAGAUGAAUACGCUGGUCAACUCCAGCUGAUAA
UAUUGUUGUAUUGUCUCAAAGCUCAUUUGGGCAAGGAAUUCAGUGACACAAACACAAAU
GCUUCGUGCCUUUACAGCUAUUGCUAAUGAUGGAGUUAUGCUGGAGCCAAAAUUUAUAG
UGCUAUUUAUGAUACUAACAAUCAGUCUGUACGUAAGUCACAAAAAGAAAUAGUAGGAAA
UCCUGUUUCCAAGAGGCAGCAAGCACAACUCGAAAUCACAUGAUCUUAGUUGGGACGGA
CCCUCUAUAUGGAACUAUGUAUAAUCACUACACAGGAAAGCCAAUUAUACAGUUCCUGG
ACAAAAUGUAGCAGUUAUAAUCCGGUACGGCUCAAAUCGCUGAUGAGAAAAAUGGAGGAUA
CUUGGUUGGUUCUACCAAUUAUUAUUUCUCAGUUGUGACUAUGAAUCCUGCUGAAAAUCC
UGAUUUUAUCUUGUAUGUAACGGUUCAACAGCCUGAGC

>640_19F_Pen4_Ctx2 998 bases

UUUAUACGACUAUUUCUAGCACCCUCCAGUCCUUCAUGGAAACUCAGAUGGAUGCCUUUCU
AGAAAAAGUAAAAGGUAAGUAUAUGACCGCGACCUUGGUCAGUGCAAAGACCGGUGAAAU
CCUCGCUACCACCCAACGACCUACCUUUAUUGCAGAUACUAAAGAAGGAAUCACUGAGGA
CUUUGUUUGGCGUGAUUUCUUUAUCAAAGUAACUAUGAACCAGGAUCAGCCAUGAAGGU
UAUGACGUUAGCUUCUUCUAUUGAUAAUAAUACCUUCCCAAGUGGAGAAUACUUCAAUAG
CAGUGAAUUCAAAAUAGCGGAUGCGACGACUCGAGAUUGGGAUGUUAUGAGGGGUUUGAC
UACUGGUGGGAUGAUGACUUUCUACAAGGUUUCGCUCACUCCAGUAAUGUUGGAAUGAG
UCUACUUGAACAAAAAUGGGGAGAUGCUACUUGGUUGGAUUAUCUAAAACGCUUUAAAAU
UGGGGUUCCAACUCGCUUUGGCUUGACAGAUGAAUACGCUGGUCAACUCCAGCUGAUAA

UAUUGUUAGUAUUGCUCAAAGCUCAUUUGGGCAAGGAAUUUCAGUGACACAAACACAAAU
 GCUUCGUGCCUUUACAGCUAUUUGCUAAUGAUGGAGUUAUGCUGGAGCCAAAAUUUAUAAG
 UGCUAUUUUAUGAUACUAACAAUCAGUCUGUACGUAAGUCACAAAAAGAAAUAGUAGGAAA
 UCCUGUUUCCAAAGAGGCAGCAAGCACACUCGAAAUCACAUGAUCUUAGUUGGGACGGA
 CCCUCUAUAUGGAACUAUGUAUAAUCACUACACAGGAAAGCCAAUUAUAACAGUUCCUGG
 ACAAAAUUGUAGCAGUUAUAAUCCGGUACGGCUCAAAUCGCUGAUGAGAAAAAUGGAGGAUA
 CUUGGUUGGUUCUACCAAUUUAUUAUUUCUCAGCUGUGACUAUGAAUCCUGCUGAAAAUCC
 UGAUUUUUAUCUUGUAUGUAACGGUUCAACAGCCUGAGC
 >794_19F_Pen2_Ctx4 998 bases
 UUUAUACGACUAUUUCUAGCACCCUCCAGUCCUUAUGGAAACUCAAUGGAUGCCUUCU
 AGAAAAAGUAAAAGGUAAGUAUAUGACCGCGACCUUGGUCAGUGCAAAGACCGGUGAAAU
 CCUCGCUACCACCCAACGACCUACCUUUAAUGCAGAUACUAAAGAAGGAAUCACUGAGGA
 CUUUGUUUGGCGUGAUUUCUUUAUCAAGUAACUAUGAACCAGGAUCAGGCAUGAAGGU
 UAUGACGUUAGCUUCUUCUAUUGAUAAUAAUACCUUCCCAAGUGGAGAAUACUUCAAUAG
 CAGUGAAUUCAAAAUAGCGGAUGCGACGACUCGAGAUUGGGAUGUUAUAGAGGGUUUGAC
 UACUGGUGGGAUGAUGACUUUCUACAAGGUUUCGCUCACUCCAGUAAUGUUGGAAUGAG
 UCUACUUGAACAAAAAUGGGGAGAUGCUACUUGGUUGGAUUAUCUAAAACGCUUUAAAAU
 UGGGGUCCAACUCGCUUUGGCUUGACAGAUGAAUACGCUGGUCAACUCCAGCUGAUAA
 UAUUGUUAGUAUUUCUCAAAGCUCAUUUGGGCAAGGAAUUUCAGUGACACAAACACAAAU
 GCUUCGUGCCUUUACAGCUAUUUGCUAAUGAUGGAGUUAUGCUGGAGCCAAAAUUUAUAAG
 UGCUAUUUUAUGAUACUAACAAUCAGUCUGUACGUAAGUCACAAAAAGAAAUAGUAGGAAA
 UCCUGUUUCCAAAGAGGCAGCAAGCACACUCGAAAUCACAUGAUCUUAGUUGGGACGGA
 CCCUCUAUAUGGAACUAUGUAUAAUCACUACACAGGAAAGCCAAUUAUAACAGUUCCUGG
 ACAAAAUUGUAGCAGUUAUAAUCCGGUACGGCUCAAAUCGCUGAUGAGAAAAAUGGAGGAUA
 CUUGGUUGGUUCUACCAAUUUAUUAUUUCUCAGUUGUGACUAUGAAUCCUGCUGAAAAUCC
 UGAUUUUUAUCUUGUAUGUAACGGUUCAACAGCCUGAGC
 >905_19F_Pen4_Ctx2 998 bases
 UUUAUACGACUAUUUCUAGCACCCUCCAGUCCUUAUGGAAACUCAGAUGGAUGCCUUCU
 AGAAAAAGUAAAAGGUAAGUAUAUGACCGCGACCUUGGUCAGUGCAAAGACCGGUGAAAU
 CCUCGCUACCACCCAACGACCUACCUUUAAUGCAGAUACUAAAGAAGGAAUCACUGAGGA
 CUUUGUUUGGCGUGAUUUCUUUAUCAAGUAACUAUGAACCAGGAUCAGCCAUGAAGGU
 UAUGACGUUAGCUUCUUCUAUUGAUAAUAAUACCUUCCCAAGUGGAGAAUACUUCAAUAG
 CAGUGAAUUCAAAAUAGCGGAUGCGACGACUCGAGAUUGGGAUGUUAUAGAGGGUUUGAC
 UACUGGUGGGAUGAUGACUUUCUACAAGGUUUCGCUCACUCCAGUAAUGUUGGAAUGAG
 UCUACUUGAACAAAAAUGGGGAGAUGCUACUUGGUUGGAUUAUCUAAAACGCUUUAAAAU
 UGGGGUCCAACUCGCUUUGGCUUGACAGAUGAAUACGCUGGUCAACUCCAGCUGAUAA
 UAUUGUUAGUAUUGCUCAAAGCUCAUUUGGGCAAGGAAUUUCAGUGACACAAACACAAAU
 GCUUCGUGCCUUUACAGCUAUUUGCUAAUGAUGGAGUUAUGCUGGAGCCAAAAUUUAUAAG
 UGCUAUUUUAUGAUACUAACAAUCAGUCUGUACGUAAGUCACAAAAAGAAAUAGUAGGAAA
 UCCUGUUUCCAAAGAGGCAGCAAGCACACUCGAAAUCACAUGAUCUUAGUUGGGACGGA
 CCCUCUAUAUGGAACUAUGUAUAAUCACUACACAGGAAAGCCAAUUAUAACAGUUCCUGG
 ACAAAAUUGUAGCAGUUAUAAUCCGGUACGGCUCAAAUCGCUGAUGAGAAAAAUGGAGGAUA
 CUUGGUUGGUUCUACCAAUUUAUUAUUUCUCAGUUGUGACUAUGAAUCCUGCUGAAAAUCC
 UGAUUUUUAUCUUGUAUGUAACGGUUCAACAGCCUGAGC
 >960_19F_Pen4_Ctx4 998 bases
 UUUAUACGACUAUUUCUAGCACCCUCCAGUCCUUAUGGAAACUCAGAUGGAUGCCUUCU
 AGAAAAAGUAAAAGGUAAGUAUAUGACCGCGACCUUGGUCAGUGCAAAGACCGGUGAAAU
 CCUCGCUACCACCCAACGACCUACCUUUAAUGCAGAUACUAAAGAAGGAAUCACUGAGGA
 CUUUGUUUGGCGUGAUUUCUUUAUCAAGUAACUAUGAACCAGGAUCAGCCAUGAAGGU
 UAUGACGUUAGCUUCUUCUAUUGAUAAUAAUACCUUCCCAAGUGGAGAAUACUUCAAUAG
 CAGUGAAUUCAAAAUAGCGGAUGCGACGACUCGAGAUUGGGAUGUUAUAGAGGGUUUGAC
 UACUGGUGGGAUGAUGACUUUCUACAAGGUUUCGCUCACUCCAGUAAUGUUGGAAUGAG
 UCUACUUGAACAAAAAUGGGGAGAUGCUACUUGGUUGGAUUAUCUAAAACGCUUUAAAAU
 UGGGGUCCAACUCGCUUUGGCUUGACAGAUGAAUACGCUGGUCAACUCCAGCUGAUAA
 UAUUGUUAGUAUUGCUCAAAGCUCAUUUGGGCAAGGAAUUUCAGUGACACAAACACAAAU
 GCUUCGUGCCUUUACAGCUAUUUGCUAAUGAUGGAGUUAUGCUGGAGCCAAAAUUUAUAAG
 UGCUAUUUUAUGAUACUAACAAUCAGUCUGUACGUAAGUCACAAAAAGAAAUAGUAGGAAA
 UCCUGUUUCCAAAGAGGCAGCAAGCACACUCGAAAUCACAUGAUCUUAGUUGGGACGGA
 CCCUCUAUAUGGAACUAUGUAUAAUCACUACACAGGAAAGCCAAUUAUAACAGUUCCUGG
 ACAAAAUUGUAGCAGUUAUAAUCCGGUACGGCUCAAAUCGCUGAUGAGAAAAAUGGAGGAUA
 CUUGGUUGGUUCUACCAAUUUAUUAUUUCUCAGUUGUGACUAUGAAUCCUGCUGAAAAUCC
 UGAUUUUUAUCUUGUAUGUAACGGUUCAACAGCCUGAGC

```

CCCUCUAUAUGGAACUAUGUAUAAUCACUACACAGGAAAGCCAAUUAUAAACAGUUCCUGG
ACAAAAUGUAGCAGUUAUAAUCCGGUACGGCUCAAAUCGCUGAUGAGAAAAAUGGAGGAUA
CUUGGUUGGUUCUACCAAUUAUUAUUUCUCAGCUGUGACUAUGAAUCCUGCUGAAAAUCC
UGAUUUUAUCUUGUAUGUAACGGUUCAACAGCCUGAGC
>017_23F_Pen2_Ctx05 998 bases
UUUAUACAACCAUUAUCCAGCCCCUCCAGUCCUUUAUGGAAACCCAGAUGGAUGCUUUUUA
AGAGAAGGUAAAAGGAAAGUACAUGACAGCGACUUUGGUCAGUGCUGUAAAACAGGGGAAAU
UCUGGCAACAACGCAACGACCGACCUUUGAUGCAGAUACAAAAGAAGGCAUUAACAGAGGA
CUUUGUUUGGCGUGAUAUCCUUUACCAAAGUAACUAUGAGCCAGGUUCCACUAUGAAAGU
GAUGAUGUUGGCUGCUGCUAUUGAUAAUAAUACC UUCCAGGAGGAGAAGUCUUUAAUAG
UAGUGAGUUAAAAAUUGCAGAUGCCACGAUUCGAGAUUGGGACGUUAAUGAAGGAUUGAC
UGGUGGCAGAACGAUGACUUUUUCUCAAGGUUUUGCACACUCAAGUAACGUUGGGAUGAC
CCUCCUUGAGCAAAAGAUGGGGAGAUGCUACCUGGCUGAUUAUCUUAUUCGUUUUAAAAU
UGGAGUUCGACCCGUUUCGGUUUGACGGAUGAGUAUGCUGGUCAGCUUCCUGCGGAUAA
UAUUGUCAACAUUGCGCAAAGCUCAUUUGGACAAGGGAUUUCAGUGACCCAGACGCAAAU
GAUUCGUGCCUUUACAGCUAUUGCUAAUGACGGUGUCAUGCUGGAGCCUAAAAUUUAUAG
UGCCAUUUAUGAUCCAAAUGAUCAAACUGCUCGGAAAUCUAAAAAGAAAUGUGGGGAAA
UCCUGUUUCUAAAAGAUGCAGCUAGUCUAACUCGGACUAACAUGGUUUUGGUAGGGACGGA
UCCGGUUUAUGGAACCAUGUAUAACCACAGCACAGGCAAGCCAACUGUAACUGUCCUGG
GCAAAAUGUAGCCCUCAAGUCUGGUACGGCUCAGAUUUGCUGACGAGAAAAAUGGUGGUUA
UCUAGUCGGGUUAACCGACUAUAUUUUCUCGGCUGUAUCGAUGAGUCCGGCUGAAAAUCC
UGAUUUUAUCUUGUAUGUGACGGUCCAACAACCUGAGC
>198_23F_Pen2_Ctx1 998 bases
UUUAUACAACCAUUAUCCAGCCCCUCCAGUCCUUUAUGGAAACCCAGAUGGAUGCUUUUUA
AGAGAAGGUAAAAGGAAAGUACAUGACAGCGACUUUGGUCAGUGCUGUAAAACAGGGGAAAU
UCUGGCAACAACGCAACGACCGACCUUUGAUGCAGAUACAAAAGAAGGCAUUAACAGAGGA
CUUUGUUUGGCGUGAUAUCCUUUACCAAAGUAACUAUGAGCCAGGUUCCACUAUGAAAGU
GAUGACGUUGGCUGCUGCUAUUGAUAAUAAUACC UUCCAGGAGGAGAAGUCUUUAAUAG
UAGUGAGUUAAAAAUUGCAGAUGCCACGAUUCGAGAUUGGGACGUUAAUGAAGGAUUGAC
UGGUGGCAGAAUGAUGACUUUUUCUCAAGGUUUUGCACACUCAAGUAACGUUGGGAUGAC
CCUCCUUGAGCAAAAGAUGGGGAGAUGCUACCUGGCUGAUUAUCUUAUUCGUUUUAAAGUU
UGGAGUUCGACCCGUUUCGGUUUGACGGAUGAGUAUGCUGGUCAGCUUCCUGCGGAUAA
UAUUGUCAACAUUGCGCAAAGCUCAUUUGGACAAGGGAUUUCAGUGACCCAGACACAAAU
GAUUCGUGCCUUUACAGCUAUUGCUAAUGACGGUGUCAUGCUGGAGCCUAAAAUUUAUAG
UGCCAUUUAUGAUCCAAAUGAUCAAACUGCUCGGAAAUCUAAAAAGAAAUGUGGGGAAA
UCCUGUUUCUAAAAGAUGCAGCUAGUCUAACUCGGACUAACAUGGUUUUGGUAGGGACGGA
UCCGGUUUAUGGAACCAUGUAUAACCACAGCACAGGCAAGCCAACUGUAACUGUCCUGG
GCAAAAUGUAGCCCUCAAGUCUGGUACGGCUCAGAUUUGCUGACGAGAAAAAUGGUGGUUA
UCUAGUCGGGUUAACCGACUAUAUUUUCUCGGCUGUAUCGAUGAGUCCGGCUGAAAAUCC
UGAUUUUAUCUUGUAUGUGACGGUCCAACAACCUGAGC
>208_23F_Pen2_Ctx1 998 bases
UUUAUACAACCAUUAUCCAGCCCCUCCAGUCCUUUAUGGAAACCCAGAUGGAUGCUUUUUA
AGAGAAGGUAAAAGGAAAGUACAUGACAGCGACUUUGGUCAGUGCUGUAAAACAGGGGAAAU
UCUGGCAACAACGCAACGACCGACCUUUGAUGCAGAUACAAAAGAAGGCAUUAACAGAGGA
CUUUGUUUGGCGUGAUAUCCUUUACCAAAGUAACUAUGAGCCAGGUUCCACUAUGAAAGU
GAUGAUGUUGGCUGCUGCUAUUGAUAAUAAUACC UUCCAGGAGGAGAAGUCUUUAAUAG
UAGUGAGUUAAAAAUUGCAGAUGCCACGAUUCGAGAUUGGGACGUUAAUGAAGGAUUGAC
UGGUGGCAGAAUGAUGACUUUUUCUCAAGGUUUUGCACACUCAAGUAACGUUGGGAUGAC
UCUCCUUGAGCAAAAGAUGGGGAGAUGCUACCUGGCUGAUUAUCUUAUUCGUUUUAAAAU
UGGAGUUCGACCCGUUUCGGUUUGACGGAUGAGUAUGCUGGUCAGCUUCCUGCGGAUAA
UAUUGUCAACAUUGCGCAAAGCUCAUUUGGACAAGGGAUUUCAGUGACCCAGACGCAAAU
GAUUCGUGCCUUUACAGCUAUUGCUAAUGACGGUGUCAUGCUGGAGCCUAAAAUUUAUAG
UGCCAUUUAUGAUCCAAAUGAUCAAACUGCUCGGAAAUCUAAAAAGAAAUGUGGGGAAA
UCCUGUUUCUAAAAGAUGCAGCUAGUCUAACUCGGACUAACAUGGUUUUGGUAGGGACGGA
UCCGGUUUAUGGAACCAUGUAUAACCACAGCACAGGCAAGCCAACUGUAACUGUCCUGG
GCAAAAUGUAGCCCUCAAGUCUGGUACGGCUCAGAUUUGCUGACGAGAAAAAUGGUGGUUA
UCUAGUCGGGUUAACCGACUAUAUUUUCUCGGCUGUAUCGAUGAGUCCGGCUGAAAAUCC
UGAUUUUAUCUUGUAUGUGACGGUCCAACAACCUGAGC

```

>306_23F_Pen2_Ctx05 998 bases
 UUUAUACAACAUUGUCUAGUCCGCUACAAUCUUUCAUGGAAACUCAAAUGGAUGCCUCCA
 AGAAAAACUAAAAGGUAAGUAUAUGACCGCGACCUUGGUCAGUGCAAAGACCGGUGAAAU
 CCUCGCUACCACCCAACGACCUACCUUUAAUGCAGAUACUAAAGAAGGAAUCACUGAGGA
 CUUUGUUUGGCGUGAUAUCCUCUAUCAAGUAACUAUGAACCAAGGAGGAGGAGGAAAGGU
 UAUGACGUUAGCUUCUUCUAUUGAUAAUAAUACCUUCCCAAGUGGAGAAUACUCAAUAG
 CAGUGAAUUCAAAAUAGCGGAUGCGACGACUCGAGAUUGGGAUGUUAUGAAGGUUUGAC
 UACUGGUGGGAUGAUGACUUUCUACAAGGUUUCGCUCACUCCAGUAAUGUUGGAAUGAG
 UCUACUUGAACAAAAAUGGGGAGAUGCUACUUGGUUGGAUUAUCUAAAACGCUUUAAAAU
 UGGGGUCCAACUCGCUUUGGCUUGACAGAUGAAUACGCUGGUCAACUCCAGCUGAUAA
 UAUUGUUAUGAUUUGCUAAAGCUCAUUUGGACAAGGAAUUCAGUGACACAAACACAAAU
 GCUUCGUGCCUUUACAGCUAUUGCUAAUGAUGGAGUUAUGCUGGAGCCAAAAUAAAAAG
 UGCUAUUUUAUGAUACUAACAAUCAGUCUGUACGUAAGUCACAAAAGAAAUAUGAGGAAA
 UCCUGUUUCCAAGAGGCAGCAAGCACACUCGAAAUCACAUGAUCUUAGUUGGGACGGA
 CCCUCUAUAUGGAACUAUGUAUAAUCACUACACAGGAAAGCCAAUUAUACAGUCCUGG
 AAAAAUGUAGCAGUUAUAAUCCGGUACGGCUCAAAUCGCUGAUGAGAAAAAUGGAGGAUA
 UCUAGUUGGUUCUACCAAUUAUUAUUUCUCAGUUGUGACUAUGAAUCCUGCUGAAAAUCC
 UGAUUUUUAUCUUGUAUGUAACGGUUCAACAGCCUGAGC

>788_23F_Pen4_Ctx05 998 bases
 UUUAUACAACCAUUCAGCCCCUCCAGUCCUUUAUGGAACCCCAAGGAUGGCUUUUCA
 AGAGAAGGUAAAAGGAAAGUACAUGACAGCGACUUUGGUCAGUGCUAAAACAGGGGAAAU
 UCUGGCAACAACGCAACGACCGACCUUUGAUGCAGAUACAAAAGAAGGCAUUAACAGAGGA
 CUUUGUUUGGCGUGAUAUCCUUUACCAAAGUAACUAUGAGCCAGGUUCCACUAUGAAAAGU
 GAUGAUGUUGGCUGCUGCUAUUGAUAAUAAUACCUUCCAGGAGGAGAAGUCUUUAAUAG
 UAGUGAGUUAAAAAUUGCAGAUGCCACGAUUCGAGAUUGGGACGUUAAUGAAGGAUUGAC
 UGGUGGCAGAAUGAUGACUUUUUCUCAAAGGUUUUGCACACUCAAGUAACGUUGGGAUGAC
 UCUCUUGAGCAAAAGAUGGGGAGAUGCUACCUGGCUUGAUUAUCUUAUUCGUUUUAAAAU
 UGGAGUUCGACCCGUUUCGGUUUGACGGAUGAGUAUGCUGGUCAGCUUCCUGCGGAUAA
 UAUUGUCAACAUUGCGCAAAGCUCAUUUGGACAAGGGAUUCAGUGACCCAGACACAAAU
 GAUUCGUGCCUUUACAGCUAUUGCUAAUGACGGUGUCAUGCUGGAGCCUAAAAUUUAUAG
 UGCCAUUUUAUGAUCCAAAUGAUCAAACUGCUCGGAAAUCUAAAAAGAAAUUGUGGGAAA
 UCCUGUUUCUAAAGAUGCAGCUAGUCUAACUCGGACUAACAUGGUUUUGGUAGGGACGGA
 UCCGGUUUAUGGAACCAUGUAUAACCACAGCACAGGCAAGCCAACUGUAACUGUCCUGG
 GCAAAUUGUAGCCCUCAAGUCUGGUACGGCUCAGAUUGCUGACGAGAAAAAUGGUGGUUA
 UCUAGUCGGGUUAACCGACUAUAUUUUCUGGCUGUAUCGAUGAGUCCGGCUGAAAAUCC
 UGAUUUUUAUCUUGUAUGUGACGGUCCAACAACCUGAGC

>239_11_Pen2_Ctx2 998 bases
 UUUAUACAACCAUUCAGCCCCUCCAGUCCUUUAUGGAAACCCAGAUGGAUGCUUUUCA
 AGAGAAGGUAAAAGGAAAGUACAUGACAGCGACUUUGGUCAGUGCUAAAACAGGGGAAAU
 UCUGGCAACAACGCAACGACCGACCUUUGAUGCAGAUACAAAAGAAGGCAUUAACAGAGGA
 CUUUGUUUGGCGUGAUAUCCUUUACCAAAGUAACUAUGAGCCAGGUUCCACUAUGAAAAGU
 GAUGAUGUUGGCUGCUGCUAUUGAUAAUAAUACCUUCCAGGAGGAGAAGUCUUUAAUAG
 UAGUGAGUUAAAAAUUGCAGAUGCCACGAUUCGAGAUUGGGACGUUAAUGAAGGAUUGAC
 UGGUGGCAGAACGAUGACUUUUUCUCAAAGGUUUUGCACACUCAAGUAACGUUGGGAUGAC
 CCUCCUUGAGCAAAAGAUGGGGAGAUGCUACCUGGCUUGAUUAUCUUAUUCGUUUUAAAAU
 UGGAGUUCGACCCGUUUCGGUUUGACGGAUGAGUAUGCUGGUCAGCUUCCUGCGGAUAA
 UAUUGUCAACAUUGCGCAAAGCUCAUUUGGACAAGGGAUUCAGUGACCCAGACGCAAAU
 GAUUCGUGCCUUUACAGCUAUUGCUAAUGACGGUGUCAUGCUGGAGCCUAAAAUUUAUAG
 UGCCAUUUUAUGAUCCAAAUGAUCAAACUGCUCGGAAAUCUAAAAAGAAAUUGUGGGAAA
 UCCUGUUUCUAAAGAUGCAGCUAGUCUAACUCGGACUAACAUGGUUUUGGUAGGGACGGA
 UCCGGUUUAUGGAACCAUGUAUAACCACAGCACAGGCAAGCCAACUGUAACUGUCCUGG
 GCAAAUUGUAGCCCUCAAGUCUGGUACGGCUCAGAUUGCUGACGAGAAAAAUGGUGGUUA
 UCUAGUCGGGUUAACCGACUAUAUUUUCUGGUUGUAUCGAUGAGUCCGGCUGAAAAUCC
 UGAUUUUUAUCUUGUAUGUGACGGUCCAACAACCUGAGC

>323_6B_Pen2_Ctx1 998 bases
 UUUAUACAACAUUGUCUAGUCCGCUCCAUCUUUCAUGGAAACUCAGAUGGAUGCCUUCU
 AGAAAAAGUAAAAGGUAAGUAUAUGACCGCGACCUUGGUCAGUGCAAAGACCGGUGAAAU
 CCUCGCUACCACCCAACGACCUACCUUUAAUGCAGAUACUAAAGAAGGAAUCACUGAGGA

CUUUGUUUGGCGUGAUUUCUUUAUCAAGUAACUAUGAACCAAGGAUCAGCCAUGAAGGU
UAUGACGUUAGCUUCUUCUAUUGAUAAUAAUACCUUCCCAAGUGGAGAAUACUUCAAUAG
CAGUGAAUUCAAAAUAGCGGAUGCGACGACUCGAGAUUGGGAUGUUAUGAUGGUUUGAC
UACUGGUGGGAUGAUGACUUUCUUACAAGGUUUCGCUCACUCCAGUAAUGUUGGAAUGAG
UCUACUUGAACAAAAAUGGGGAGAUGCUACUUGGUUGGAUUAUCUAAAACGCUUUAAAAU
UGGGGUUCCAACUCGCUUUGGCUUGACAGAUGAAUACGCUGGUCAACUCCAGCUGAUAA
UAUUGUUAGUAUUGCUCAAAGCUCAUUUGGGCAAGGAAUUCAGUGACACAAACACAAU
GCUUCGUGCCUUUACAGCUAUUGCUAAUGAUGGAGUUAUGCUGGAGCCAAAAUUUAUAG
UGCUAUUUAUGAUACUAACAAUCAGUCUGUACGUAAGUCACAAAAAGAAAUAGUAGGAAA
UCCUGUUUCCAAGAGGCAGCAAGCACAACUCGAAAUCACAUGAUCUUAGUUGGGACGGA
CCCUCUAUAUGGAACUAUGUAUAAUCACUACACAGGAAAGCCAAUUAUACAGUUCCUGG
ACAAAAUGUAGCAGUUAUAAUCCGGUACGGCUCAAUUCGCUGAUGAGAAAAAUGGAGGAUA
CUUGGUUGGUUCUACCAAUUAUUAUUUCUAGUUGUGACUAUGAAUCCUGCUGAAAAUCC
UGAUUUUAUCUUGUAUGUAACGGUUCAACAGCCUGAGC

Περίληψη

Σκοπός: Προσδιορισμός και διερεύνηση των επικρατέστερων μηχανισμών MLS_B αντοχής και αντοχής στην τετρακυκλίνη μεταξύ στελεχών *Streptococcus pneumoniae*, καθώς και των μηχανισμών αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά σε στελέχη *Streptococcus pneumoniae* που απομονώθηκαν στην Ελλάδα την περίοδο 2001-2004.

Μεθοδολογία: Συνολικά 1.033 στελέχη *S. pneumoniae* απομονώθηκαν από ασθενείς των τριών παιδιατρικών νοσοκομείων της Αθήνας. Η οροτυπία έγινε με εμπορικά διαθέσιμους αντιορούς (αντίδραση Quellung). Ο προσδιορισμός της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά ερυθρομυκίνη και κλινδαμυκίνη, τετρακυκλίνη έγινε με την μέθοδο διάχυσης δισκίων κατά Kirby-Bauer, ενώ οι φαινότυποι αντοχής MLS_B και TetR, προσδιορίστηκαν με την δοκιμασία επαγωγής διπλού δισκίου. Η ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (ΕΑΠ) της πενικιλίνης (Pen) και κεφοταξίμης (Ctx) προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ταινιών διαβαθμισμένης συγκέντρωσης (E-test, bioMerieux) σε τρυβλία Mueller-Hinton άγαρ εμπλουτισμένο με 5% ερυθρά προβάτου. Η ανίχνευση των MLS_B και TetR μηχανισμών αντοχής έγινε με πολλαπλασιασμό τμήματος των γονιδίων *mefA/E*, *ermB*, *ermTR*, *tetO* και *tetM* με την τεχνική της PCR. Προσδιορισμός των υποτύπων του γονιδίου *mefA/E* έγινε μέσω PCR-RFLP και της *BamH1* περιοριστικής ενδονουκλεάσης. Η διερεύνηση των μηχανισμών αντοχής στα β-λακταμικά, στα στελέχη που ήταν ανθεκτικά στην πενικιλίνη ή/και την κεφοταξίμη έγινε με πολλαπλασιασμό τμήματος 1150 ζευγών βάσεων των γονιδίων των πρωτεϊνών PBP1A, 2B και 2X και επακόλουθο προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό DAMBE και την χρήση του αλγορίθμου ClustalW. Η σύγκριση έγινε με αλληλουχίες προτύπων στελεχών, ευαίσθητων στα β-λακταμικά αντιβιοτικά.

Αποτελέσματα: Μεταξύ των 1.033 στελεχών *S. pneumoniae*, 186, 641 και 206 απομονώθηκαν από διεισδυτικές λοιμώξεις (βακτηραιμίες και μηνιγγίτιδες), μη διεισδυτικές λοιμώξεις (οξεία μέση ωτίτιδα, οφθαλμικές και λοιμώξεις κατώτερου αναπνευστικού) και από ρινο-φαρυγγική φορεία, αντίστοιχα. Συνολικά, 450 από τα 1.033 (43.6%) στελέχη ήταν ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη (EryR). Ο M φαινότυπος επικρατούσε (306/450, 68%), ενώ ο CR (128/450, 28%) και ο IR (16/450, 3.6%) ακολουθούσαν. Οι τέσσερις συχνότεροι ορότυποι (19F, 14, 6B και 23F), αντιπροσώπευαν το 75% του συνόλου των στελεχών και περιελάμβαναν το 92% όλων των EryR στελεχών. Ο M φαινότυπος κυριαρχούσε μεταξύ των οροτύπων 19F και 14 (81% και 64% των EryR στελεχών από κάθε ορότυπο, αντίστοιχα), ενώ ο CR φαινότυπος κυριαρχούσε μεταξύ των οροτύπων 6B και 23F (65% και 67% των EryR στελεχών από κάθε ορότυπο, αντίστοιχα). Συνολικά, αντοχή στην τετρακυκλίνη (TetR) ανιχνεύθηκε σε 358 (35%) από όλα τα στελέχη. Οι τέσσερις συχνότεροι ορότυποι (19F, 14, 6B, και 23F) περιελάμβαναν το 94% όλων των TetR στελεχών, ενώ τα ποσοστά ανά ορότυπο ήταν 74%, 15%, 29% και 39%, αντιστοίχως.

Ο μοριακός έλεγχος των μηχανισμών αντοχής πραγματοποιήθηκε σε 273 από τα 450 EryR και σε 207 από τα 358 TetR στελέχη, τα οποία κατανέμονταν ομοιόμορφα μεταξύ των οροτύπων.

Η φαινοτυπική αντοχή τύπου M, CR και IR αποδόθηκε στην παρουσία των *mef*, *ermB* και *ermTR*, αντίστοιχα, γονιδίων, σε 201 EryR στελέχη, ενώ σε 72 στελέχη (48 με M, 21 με CR και 3 με IR φαινότυπο) δεν ανιχνεύθηκε κανένα γονίδιο. Επιπλέον, σε 3 στελέχη με φαινότυπο CR βρέθηκαν αμφότερα τα γονίδια *mefE* και *ermB*, ενώ σε ένα στέλεχος με φαινότυπο IR, βρέθηκαν αμφότερα τα γονίδια *mefE* και *ermTR*. Όσον αφορά στον προσδιορισμό του *mef* υποτύπου, επικρατούσε ο *mefE* (86% των *mef*-θετικών στελεχών), αλλά ο *mefA* υπερείχε μεταξύ στελεχών του οροτύπου 14, ενώ μεταξύ των στελεχών όλων των άλλων οροτύπων ο επικρατών υπότυπος ήταν ο *mefE*. Μεταξύ των 207 TetR στελεχών, 167 παρουσίασαν μόνο το *tetM* γονίδιο, σε 7 στελέχη βρέθηκαν και τα δύο γονίδια *tetM* και *tetO*, ενώ σε 33 από τα στελέχη κανένα γονίδιο δεν ανιχνεύθηκε.

Πλήρης αντοχή ή ενδιάμεση ευαισθησία στην πενικιλίνη ανιχνεύθηκε στο 12,9% και 31,8%, αντίστοιχα, ενώ το 1,2% των στελεχών ήταν ανθεκτικά στην κεφοταξίμη. Τα ανθεκτικά στελέχη κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο ομάδες, ανάλογα με τις τιμές ΕΑΠ, ως εξής: ομάδα Α (14 στελέχη) με ΕΑΠ Pen ≥ 2 και ΕΑΠ Ctx ≥ 2 , και ομάδα Β (116 στελέχη) με ΕΑΠ Pen ≥ 2 και ΕΑΠ Ctx ≤ 1 . Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των PBP_s 1A,2B και 2X, σε συνολικά εννέα στελέχη της ομάδας Α και 18 στελέχη της ομάδας Β, που επιλέχθηκαν τυχαία, έδειξε ότι με βάση τις αλληλουχίες των τριών PBP_s, τα πολυανθεκτικά στελέχη οροτύπου 19F της ομάδας Α κατηγοριοποιούνται μαζί, ενώ τα λοιπά στελέχη της ομάδας Β κατηγοριοποιούνται σε διαφορετικούς κλώνους.

Συμπεράσματα: Μεταξύ των στελεχών *S. pneumoniae* που απομονώθηκαν στην Ελλάδα, η αντοχή στην ερυθρομυκίνη ανιχνεύεται σε συγκεκριμένους οροτύπους και αποδίδεται στον μηχανισμό αντλίας εκροής (*mef* γονίδιο) μεταξύ των οροτύπων 19F και 14 και στον μηχανισμό μεθυλίωσης ριβοσώματος (*ermB* γονίδιο) μεταξύ των οροτύπων 6B και 23F. Η αντοχή στην τετρακυκλίνη επίσης ανιχνεύεται σε συγκεκριμένους οροτύπους και αποδίδεται σε μηχανισμό προστασίας ριβοσώματος (*tetM* γονίδιο). Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα αποτελέσματα και των τριών PBP_s, μια ομάδα ανθεκτικών και στα δύο β-λακταμικά αντιβιοτικά στελεχών οροτύπου 19F, μαζί με ένα στέλεχος οροτύπου 6B ομαδοποιούνται μαζί υποδηλώνοντας κοινή καταγωγή των συγκεκριμένων γονιδίων. Αντίθετα, η ομαδοποίηση των λοιπών στελεχών, διαφόρων οροτύπων, με αντοχή στην πενικιλίνη και ευαισθησία στην κεφοταξίμη δεν είναι σταθερή στις τρεις PBP_s. Η συνεχιζόμενη επιτήρηση των επικρατούντων μηχανισμών αντοχής στα αντιβιοτικά, είναι απαραίτητη για την διαρκή προσαρμογή των στρατηγικών πρόληψης στις πνευμονιοκοκκικές λοιμώξεις.

Summary

Objectives: Determination and characterization of the prevalent mechanisms of MLS_B, tetracycline and beta-lactam resistance among *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from pediatric infections in Greece during the period 2001-2004.

Methods: A total of 1,033 *S. pneumoniae* strains were isolated in the Departments of the three major Pediatric Hospitals in Athens, Greece. Serotyping was performed by the Quellung reaction. Susceptibility testing to erythromycin, clindamycin and tetracycline was performed using the disk-diffusion method. MLS_B resistant phenotypes were detected using the double disk test. Detection of the corresponding resistant mechanisms was performed by PCR amplification of *mef*, *ermB*, *ermTR*, *tetM*, and *tetO* genes. Assignment of the *mefA/E* subtype was performed using PCR-RFLP and the *Bam*H1 restriction endonuclease. The minimal inhibitory concentration (MIC) of penicillin (Pen) and cefotaxime (Ctx) was defined by the antibiotic concentration gradient strips method (E-test, bioMerieux) in Mueller- Hinton agar plates, supplemented with 5% sheep blood. The characterization of resistance mechanisms to β -lactam antibiotics, in the resistant strains to penicillin and/or cefotaxime, was performed by amplification of a 1150 base pairs segment of the PBP1A, 2B and 2X genes with subsequent DNA sequencing. The analysis of the results was performed by the DAMBE software and the use of the ClustalW algorithm.

Results: Among the 1,033 *S. pneumoniae* strains, 186, 641, and 206 were isolated from invasive diseases (bacteremias and meningitis), non-invasive diseases (acute otitis media, eye, and lower respiratory tract) and nasopharyngeal carriage, respectively. Overall, 450 of the 1,033 (43.6%) strains were resistant to erythromycin (EryR). M-phenotype dominated (306/450; 68%), over CR (128/450; 28%) and IR (16/450; 3.6%). The four most frequent serotypes (19F, 14, 6B and 23F), represented 75% of all strains, and included 92% of all EryR strains. M-phenotype prevailed among serotypes 19F and 14 (81% and 64% of EryR strains, respectively), whereas CR-phenotype prevailed among serotypes 6B and 23F (65% and 67% of EryR strains, respectively). Overall tetracycline resistance (TetR) was detected in 358 (35%) of all isolates. The four dominant serotypes (19F, 14, 6B, and 23F) included 94% of all TetR strains, while serotype-specific rates were 74%, 15%, 29%, and 39%, respectively.

The mechanisms of resistance were characterized in 273 out of 450 EryR and 207 out of 358 TetR isolates, evenly distributed among serotypes. M, CR and IR-type resistance was attributed to the presence of *mef*, *ermB* and *ermTR* genes in 201 EryR isolates, whereas in 72 isolates (48 M-, 21 CR-, and 3 IR-phenotype) no gene was detected. In addition, 3 CR-phenotype isolates harboured both *mefE* and *ermB* gene, whereas a single IR-phenotype isolate harboured both *mefE* and *ermTR*. Regarding *mef* subtype distribution, *mefE* dominated (86% of *mef*-positive isolates), but *mefA* prevailed among serotype 14, whereas among all other serotypes the dominant subtype was *mefE*. Regarding the 207 TetR isolates, 167 harboured the *tetM* gene only, 7 harboured both *tetM* and *tetO* genes, whereas no gene was detected in 33 isolates.

Total resistance or intermediate susceptibility to penicillin was detected in 12.9% and 31.8% respectively, whereas 1.2% of the strains were resistant to cefotaxime. The resistant strains were categorized in two groups, according to MIC levels, as follows: group A (14 strains) with MIC Pen $\geq$ 2 and MIC Ctx $\geq$ 2, and group B (116 strains) with MIC Pen $\geq$ 2 and MIC Ctx $\leq$ 1. The analysis of the nucleotide sequence was performed in nine strains of group A and 18 strains of group B, which were randomly chosen. All 19F multiresistant isolates were grouped together, showing very high similarities of all three PBPs, whereas the cefotaxime susceptible isolates showed differences in the nucleotide sequences and were categorized in different groups.

Conclusions: Erythromycin resistance among *S. pneumoniae* in Greece is detected in specific serotypes, and is attributed to efflux mediated mechanism (*mef* gene) among serotypes 19F and 14, and methylation mediated mechanism (*ermB* gene) among serotypes 6B and 23F. Tetracycline resistance is also detected in specific serotypes and attributed to ribosomal protection (*tetM* gene). The 19F multiresistant strains showed highly similar PBP nucleotide sequences and were grouped together, whereas the cefotaxime susceptible-penicillin resistant isolates showed significant differences and were categorized in different groups. Continuous surveillance of the prevalent antibiotic resistance mechanisms is necessary for updating prevention strategies of pneumococcal infections.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, αρχικά με Διευθυντή τον Καθηγητή Μικροβιολογίας κ. Νικόλαο Λεγάκη, ακολούθως την Αν. Καθηγήτρια κα Α. Τσελένη-Κωτσοβίλη και τέλος, με τον Καθηγητή Μικροβιολογίας κ. Αθανάσιο Τσακρή. Η εκπόνηση της διατριβής έγινε υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Μικροβιολογίας κ. Λεωνίδα Τζουβελέκη.

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Νικόλαο Λεγάκη για την ανάθεση του θέματος της διδακτορικής μου διατριβής και για την καθοδήγησή του καθ' όλο το διάστημα της επιστημονικής ενασχόλησής μου με τις εργασίες του Εργαστηρίου Μοριακής Διάγνωσης Βακτηριακών Λοιμώξεων και τις εργασίες της διδακτορικής μου διατριβής.

Ευχαριστώ ιδιαίτερος τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Λεωνίδα Τζουβελέκη για την καθοδήγηση, τις συμβουλές του και κάθε δημιουργική παρατήρηση και ουσιαστική βοήθεια που μου παρείχε ως επιβλέπωντας της διδακτορικής μου διατριβής.

Επίσης, ευχαριστώ τον Καθηγητή Μικροβιολογίας κ. Αθανάσιο Τσακρή για τις συμβουλές του ως μετέπειτα Διευθυντή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ευχαριστώ θερμά τη τεχνόλογο και φίλη κ. Αναστασία Μαγεροπούλου, τον επίσης τεχνόλογο και φίλο κ. Αθανάσιο Πρίφτη και την χημικό και φίλη κ. Δήμητρα Χούχουλα, για τη βοήθειά τους στην εκμάθηση και εφαρμογή των μοριακών και λοιπών τεχνικών που χρησιμοποίησα στην πραγματοποίηση της διατριβής μου, αλλά και για την συνεχή στήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια των εργασιών και των προσπαθειών μου.

Ευχαριστώ ιδιαίτερος, όλη την ομάδα, υπεύθυνη για τη συλλογή και εφαρμογή των κλασσικών μικροβιολογικών μεθοδων των στελεχών *S. pneumoniae*: τις κες Ε. Παρασκάκη, Μ. Παπαδάτου και Ε. Μποζαβούτογλου από το Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Παιδιατρικού Νοσοκομείου Αθηνών «Π. και Α. Κυριακού», τις κες Ε. Κυρίκου, Α. Χαρισιάδου και Α. Πάγκαλη - Διευθύντρια του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου - από το Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Παιδιατρικού Νοσοκομείου Αθηνών «Η Αγία Σοφία» και τη κα Ε. Παπαβασιλείου από το Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Παιδιατρικού Νοσοκομείου Πεντέλης «Παίδων Πεντέλης».

Επίσης, ευχαριστώ θερμά, τον συνάδελφο και εξαιρετικό φίλο κο Χρήστο Κοσμίδη για τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις του στη συγγραφή της παρούσας διατριβής, όπως και για τον χρόνο που διέθεσε, καθώς και τη Βιολόγο κα Αγγελική Στάθη από το Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Παιδιατρικού Νοσοκομείου Αθηνών «Η Αγία Σοφία», για την συμβολή της στα πρώτα πειράματα της διατριβής μου.

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και την εκτίμησή μου στον Επίκουρο Καθηγητή Μικροβιολογίας κ. Ιωσήφ Παπαπαρασκευά για την ανεκτίμητη και καθοριστική βοήθειά του στην πραγματοποίηση αυτής της διδακτορικής διατριβής ως μέλος της τριμμελούς μου επιτροπής. Τον

ευχαριστώ ιδιαιτέρως για τις γνώσεις που μου μετέδωσε και την συνεχή καθοδήγησή του στα ερευνητικά ζητήματα της διατριβής, τις πολύτιμες συμβουλές, τη συμπαράστασή του καθ' όλο το διάστημα της εκπόνησής της και για τον απεριόριστο χρόνο που διέθεσε για την αρτιότερη παρουσίασή της.

Η πραγματοποίηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής καθώς και η ολοκλήρωσή της δεν θα ήταν δυνατή χωρίς την αμέριστη συμπαράσταση, την φροντίδα και τη συνεχή στήριξη των γονιών μου, Σωτήριο και Παρασκευή Φλούντζη, στους οποίους αφιερώνω το παρόν σύγγραμμα, όπως και στην κορούλα μου Βίβιαν και την ατέλειωτη υπομονή και κατανόηση του συζύγου μου Αναστασίου Καντεμνίδη. Τους ευχαριστώ ιδιαιτέρως για την ενθάρρυνση και την εμπιστοσύνη τους, παρά τις δυσκολίες και τις αντιξοότητες που προέκυψαν, καθ' όλο το διάστημα της εκπόνησής της.