ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

ΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΙΣ ΚΑΡΒΑΠΕΝΕΜΕΣ ΑΖΥΜΩΤΙΚΑ GRAM ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ Χ. ΛΙΑΚΟΠΟΥΛΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
Επιβλέπουσα
Αμαλία Δ. Καραγκούνη-Κύρτσου
Καθηγήτρια

Αθήνα, 2013

Επιτροπή Αξιολόγησης

Αμαλία Δ. Καραγκούνη-Κύρτσου
Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Γεώργιος Διαλλινάς
Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Δημήτριος Χατζηνικολάου
Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιακής Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Στην αδελφή μου
Ελένη . . .

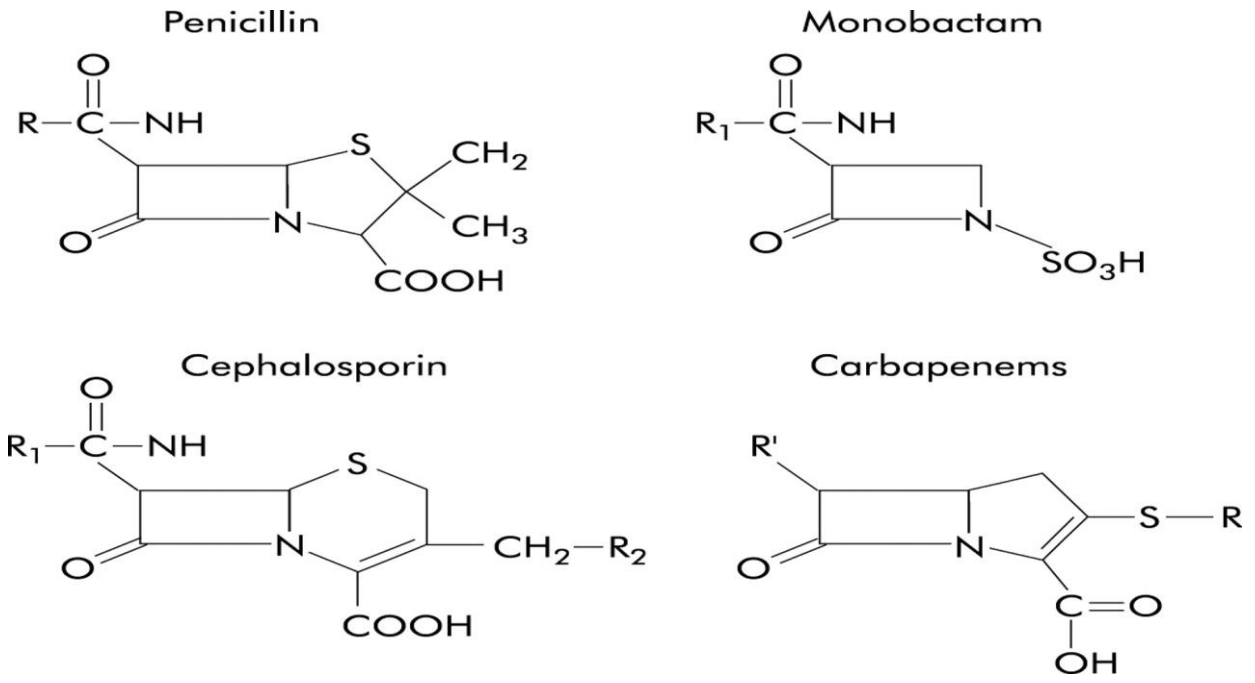
Εισαγωγή

1.1 β-λακταμικά αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά β-λακτάμης διαθέτουν ένα τετραμελή β-λακταμικό δακτύλιο που περιέχει άζωτο και παρεμβαίνουν στη σύνθεση του βακτηριακού τοιχώματος, αναστέλλοντας κυρίως τις σταυρο-συνδέσεις των πλάγιων πεπτιδικών αλυσίδων του κυτταρικού τοιχώματος. Οι β-λακτάμες είναι κυρίως βακτηριοκτόνες με χρονοεξαρτώμενη δράση και οι περισσότερες εξ' αυτών αποβάλλονται αναλλοίωτες στα ούρα, γεγονός που τις καθιστά κατάλληλες για τη θεραπεία ουρολοιμώξεων.

Οι β-λακτάμες έχουν μεγάλο θεραπευτικό δείκτη, με κύρια ανεπιθύμητη ενέργεια τις αλλεργικές αντιδράσεις, η πιο συχνή από τις οποίες είναι το ερυθηματώδες κηλιδοβλατιδώδες εξάνθημα με κνησμό. Ωστόσο σπάνια προκαλούν αναφυλαξία και θεωρούνται ασφαλείς για χρήση κατά την εγκυμοσύνη.

Οι β-λακτάμες περιλαμβάνουν τέσσερις υποκατηγορίες (Εικόνα 1.1): i) τις πενικιλλίνες, ii) τις κεφαλοσπορίνες, iii) τις καρβαπενέμες και iv) τις μονοβακτάμες (Page *et al*, 2005).



Εικόνα 1.1. Βασική χημική δομή των τεσσάρων κύριων κατηγοριών αντιβιοτικών β-λακτάμης. Τα R, R', R1 και R2 δείχνουν τα σημεία όπου μπορούν να γίνουν χημικές υποκαταστάσεις για τη δημιουργία των διαφόρων φαρμάκων(Parmar & Nasser, 2005).

1.1.1 Πενικιλλίνες

Η πενικιλλίνη ανακαλύφθηκε από τον Alexander Fleming το 1928, σαν παραπροϊόν του *Penicillum notatum*, από το οποίο προκύπτει το όνομα της. Οι πενικιλλίνες αποτελούνται από ένα β-λακταμικό δακτύλιο, συμπυκνωμένο με ένα πενταμελή θειαζολιδινικό δακτύλιο. Η τροποποίηση της πλευρικής αλυσίδας στη θέση 6 του β-λακταμικού δακτυλίου καταλήγει σε φάρμακα με διαφορετικές αντιβακτηριακές και φαρμακολογικές ιδιότητες. Υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες πενικιλλινών (Πίνακας 1.1): i) οι φυσικές πενικιλλίνες (πενικιλλίνη G, πενικιλλίνη V, κ.α), ii) οι αντισταφυλοκοκκικές πενικιλλίνες (μεθικιλλίνη, ναφκιλλίνη, οξακιλλίνη, κλοξακιλλίνη, κ.α) που είναι ανθεκτικές στη σταφυλοκοκκική β-λακταμάση, iii) οι αμινοπενικιλλίνες (αμπικιλλίνη και αμοξικιλλίνη) που διαθέτουν αυξημένη δραστικότητα έναντι των Gram αρνητικών αερόβιων βακτηρίων και iv) οι αντιψευδομοναδικές πενικιλλίνες (καρβοξυπενικιλλίνες: καρβενικιλλίνη, τικαρκιλλίνη και ουρεϊδοπενικιλλίνες: πιπερακιλλίνη, αζλοκιλλίνη) που είναι ευρέως φάσματος αμινοπενικιλλίνες (Page *et al*, 2005).

1.1.2 Κεφαλοσπορίνες

Η πρώτη κεφαλοσπορίνη απομονώθηκε από το μύκητα *Cephalosporium acremonium*, από τον Giuseppe Brotzu το 1945. Οι κεφαλοσπορίνες αποτελούνται από ένα β-λακταμικό δακτύλιο συμπυκνωμένο με ένα εξαμελή διυδροθειαζινικό δακτύλιο. Οι διάφορες κεφαλοσπορίνες προκύπτουν από υποκαταστάσεις των πλευρικών αλυσίδων στη θέση 7 του β-λακταμικού δακτυλίου και στη θέση 3 του διυδροθειαζινικού δακτυλίου.

Οι κεφαλοσπορίνες διαιρούνται σε πρώτης (κεφαζολίνη, κεφαλοθίνη, κ.α), δεύτερης (κεφακλόρη, κεφουροξίμη, κεφοτετάνη, κεφοξιτίνη, κ.α) και τρίτης (κεφοταξίμη, κεφτριαξόνη, κεφταζιδίμη, κεφεπίμη, κ.α) γενιάς, με βάση το φάσμα τους έναντι των Gram αρνητικών αερόβιων βακτηρίων, το οποίο αυξάνεται από την πρώτη στη τρίτη γενιά (Πίνακας 1.1). Επίσης η αντισταφυλοκοκκική δράση μειώνεται από την πρώτη στην τρίτη γενιά, ενώ δεν υπάρχει απώλεια στην αντιστρεπτοκοκκική δράση. Όλες σχεδόν οι κεφαλοσπορίνες είναι ανθεκτικές στη σταφυλοκοκκική β-λακταμάση και όλες έχουν αυξημένη δράση κατά των Gram αρνητικών αερόβιων βακτηρίων, σε σχέση με τις αμινοπενικιλλίνες. Σε αντίθεση με τις πενικιλλίνες, οι κεφαλοσπορίνες δεν είναι δραστικές κατά των εντεροκόκκων και της *Listeria monocytogenes*,

αλλά είναι αδρανείς κατά των ανθεκτικών στη μεθικιλλίνη σταφυλοκόκκων όπως και οι αντισταφυλοκοκκικές πενικιλλίνες.

Αν και οι κεφαλοσπορίνες ομοιάζουν χημικά με τις πενικιλλίνες, διασταυρούμενη αλλεργία παρατηρείται μόνο στο 10% περίπου μεταξύ των δυο αυτών κατηγοριών. Με βάση αυτό, οι κεφαλοσπορίνες μπορούν συχνά να χρησιμοποιηθούν με ασφάλεια σε άτομα με αλλεργία στις πενικιλλίνες (Page *et al*, 2005).

1.1.3 Καρβαπενέμες

Οι καρβαπενέμες αποτελούνται από ένα β-λακταμικό δακτύλιο συμπυκνωμένο με ένα πενταμελή πενεμικό δακτύλιο. Οι καρβαπενέμες που κυκλοφορούν σήμερα είναι η ερταπενέμη, η ιμιπενέμη, η μεροπενέμη και η δοριπενέμη (Πίνακας 1.1).

Οι καρβαπενέμες είναι ανθεκτικές στις περισσότερες β-λακταμάσες και έχουν το ευρύτερο αντιμικροβιακό φάσμα από όλα τα διαθέσιμα μέχρι σήμερα αντιβιοτικά. Αναλυτικότερα, είναι δραστικές έναντι των στρεπτόκοκκων, των σταφυλοκόκκων, των εντεροβακηριοειδών, των αζυμωτικών Gram αρνητικών (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, κ.α), των ειδών του γένους *Haemophilus* και των αναερόβιων βακτηρίων συμπεριλαμβανομένου του *Bacteroides fragilis*. Οι καρβαπενέμες είναι δραστικές έναντι πολλών στελεχών του *Enterococcus faecalis* αλλά όχι έναντι των άλλων ειδών του γένους *Enterococcus*. Όπως και οι κεφαλοσπορίνες είναι αδρανείς έναντι της *L. monocytogenes* και των ανθεκτικών στη μεθικιλλίνη σταφυλοκόκκων (MRSA).

Η ιμιπενέμη διασπάται στους νεφρούς από μια ανθρώπινη β-λακταμάση, τη δεϋδροπεπτιδάση-1 σε ένα νεφροτοξικό μεταβολίτη. Για αυτό χρησιμοποιείται πάντα μαζί με το φάρμακο σιλαστατίνη, η οποία είναι εκλεκτικός αναστολέας της νεφρικής β-λακταμάσης. Το εμπορικό σκεύασμα περιέχει καθορισμένη αναλόγια ιμιπενέμης: σιλαστατίνης. Η μεροπενέμη, αντιθέτως, δε διασπάται από τη νεφρική δεϋδροπεπτιδάση και δεν απαιτεί τη συγχορήγηση σιλαστατίνης. Η ιμιπενέμη δύναται να προκαλέσει επιληπτικές κρίσεις σε επιληπτικούς ασθενείς, ειδικά αν συνυπάρχει νεφρική ανεπάρκεια.

Οι καρβαπενέμες χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία των λοιμώξεων από βακτήρια ανθεκτικά σε άλλα αντιβιοτικά. Επίσης, εξαιτίας του ευρέως αντιμικροβιακού φάσματος τους, χορηγούνται

σε πολυμικροβιακές λοιμώξεις, αντί να χρησιμοποιηθούν δυο ή περισσότερα διαφορετικά αντιβιοτικά (Page *et al*, 2005).

1.1.4 Μονοβακτάμες

Το όνομα μονοβακτάμη είναι σύντμηση της ‘‘μονοκυκλικής β-λακτάμης’’. Οι μονοβακτάμες από ένα β-λακταμικό δακτύλιο ενωμένο με μια σουλφονική ομάδα. Η μονή διαθέσιμη μονοβακτάμη είναι η αζτρεονάμη, η οποία είναι δραστική κατά των Gram αρνητικών αερόβιων βακτηρίων (Πίνακας 1.1). Αντίθετα από τις υπόλοιπες β-λακτάμες είναι αδρανής έναντι των Gram θετικών βακτηρίων, άλλα και έναντι των αναερόβιων βακτηρίων.

Το εν λόγω αντιβιοτικό διατίθεται μόνο για παρεντερική χορήγηση, ενώ δεν είναι αλλεργιογόνος με αποτέλεσμα να δύναται να χρησιμοποιηθεί σε ασθενείς με αλλεργία στις πενικιλλίνες και στις κεφαλοσπορίνες (Page *et al*, 2005).

1.1.5 Αναστολείς β-λακταμασών

Σήμερα διαθέσιμοι για κλινική χρήση υπάρχουν αρκετοί εκλεκτικοί αναστολείς των β-λακταμασών και ειδικά τα φάρμακα κλαβουλανικό οξύ, σουλβακτάμη και ταζοβακτάμη (Πίνακας 1.1). Τα εν λόγω φάρμακα περιέχουν ένα β-λακταμικό δακτύλιο ωστόσο κανένα δεν έχει αφ’ εαυτού κλινικά σημαντική αντιβακτηριακή δραστικότητα. Οι αναστολείς των β-λακταμασών δρουν δεσμευόμενοι ομοιοπολικά τις β-λακταμάσες, επιτρέποντας έτσι στα β-λακταμικά αντιβιοτικά, τα οποία κανονικά θα υδρολύονταν από τις β-λακταμάσες, να ασκήσουν την αντιβακτηριακή τους δράση. Κανένας αναστολέας των β-λακταμασών δε διατίθεται για χρήση μόνος του άλλα σε συνδυασμό με πενικιλλίνες καθορισμένης δοσολογίας.

Οι αναστολείς των β-λακταμασών, δρουν έναντι των πιο σημαντικών βακτηριακών β-λακταμασών, συμπεριλαμβανομένων αυτών που παράγονται από τους σταφυλοκόκκους, τους γονοκόκκους, τον *H. influenzae*, το *B. fragilis* και κάποια εντεροβακτηριοειδή, με εξαίρεση την επαγόμενη κεφαλοσπορινάση που υδρολύει ακόμα και τις κεφαλοσπορίνες της τρίτης γενιάς.

Οι συνδυασμοί πενικιλλινών με αναστολείς β-λακταμασών είναι χρήσιμοι σε πολυμικροβιακές λοιμώξεις, όπου η χρήση ενός μόνο εμπορικού σκευάσματος (που περιέχει δυο φάρμακα) μπορεί να παρακάμψει την ανάγκη για συγχορήγηση δυο ή περισσότερων διαφορετικών φαρμάκων.

Στην πράξη χρησιμοποιούνται περισσότερο στη θεραπεία ενδοκοιλιακών λοιμώξεων και επιμολυνθέντων δερματικών ελκών (Page *et al*, 2005).

Πίνακας 1.1. Κατηγορίες β-λακταμικών φαρμάκων.

β-λακταμικά φάρμακα			
β-λακταμικά αντιβιοτικά	Πενικιλλίνες	Φυσικές Πενικιλλίνες	Κρυσταλλική πενικιλλίνη G, Πενικιλλίνη V, Υδατική προκαϊνουχος πενικιλλίνη G, Βενζαθινική πενικιλλίνη G
		Αντισταφυλοκοκκικές Πενικιλλίνες	Μεθικιλλίνη, Ναφκιλλίνη, Οξακιλλίνη, Κλοξακιλλίνη, Δικλοξακιλλίνη, Φλουκλοξακιλλίνη
		Αμινοπενικιλλίνες	Αμπικιλλίνη, Αμοξυκιλλίνη
		Αντιψευδομοναδικές Πενικιλλίνες	Καρβενικιλλίνη, Τικαρκιλλίνη, Πιπερακιλλίνη, Αζλοκιλλίνη, Μεζλοκιλλίνη
	Κεφαλοσπορίνες	Πρώτης Γενιάς	Κεφαδροξίλη, Κεφαζολίνη, Κεφαλεξίνη, Κεφαλοθίνη, Κεφαπυρίνη, Κεφραδίνη
		Δεύτερης Γενιάς (έναντι του *H. influenzae*)	Κεφακλόρη, Κεφαμανδόλη, Κεφονισίδη, Κεφορανίδη, Κεφπροζίλη, Κεφουροξίμη
		Δεύτερης Γενιάς (έναντι του *B. fragilis*)	Κεμφεταζόλη, Κεφοτετάνη, Κεφοξιτίνη
		Τρίτης Γενιάς	Κεφοταξίμη, Κεφτριαξόνη, Κεφτριζοξίμη, Κεφοπεραζόνη, Μοξαλακτάμη
		Τρίτης Γενιάς έναντι της *P. aeruginosa*	Κεφταζιδίμη, Κεφεπίμη
		Ευρέως φάσματος από το στόμα	Κεφιξίμη
	Καρβαπενέμες	Ερταπενέμη, Ιμιπενέμη, Μεροπενέμη, Δοριπενέμη	
	Μονοβακτάμες	Αζτρεονάμη	
Αναστολείς β-λακταμασών	Κλαβουλανικό οξύ (με αμοξυκιλλίνη ή τικαρκιλλίνη)		
	Σουλβακτάμη (με αμπικιλλίνη)		
	Ταζοβακτάμη (με πιπερακιλλίνη)		

1.2 Καρβαπενεμάσες: οι πολύπλευρες β-λακταμάσες

Οι καρβαπενεμάσες (carbapenemases) αντιπροσωπεύουν την πιο πολύπλευρη οικογένεια των β-λακταμασών, με εύρος φάσματος ασυναγώνιστο από τα υπόλοιπα ενζυμα που υδρολύουν β-λακταμικά αντιβιοτικά. Αν και τα εν λόγω ενζυμα είναι γνωστά ως "καρβαπενεμάσες", πολλά από αυτά υδρολύουν σχεδόν όλες τις β-λακτάμες ενώ η δράση των περισσότερων εξ' αυτών δεν αναστέλλεται από όλους τους εμπορικά διαθέσιμους αναστολείς των β-λακταμασών (Livermore & Woodford, 2006, Walther-Rasmussen & Hoiby, 2006).

Οι καρβαπενεμάσες ανήκουν σε δύο κύριες οικογένειες, βάσει του υδρολυτικού μηχανισμού του ενεργού κέντρου τους. Οι πρώτες καρβαπενεμάσες που περιγράφηκαν, προέρχονταν από Gram θετικούς βακίλους. Σε αντίθεση με τις γνώστες μέχρι εκείνη τη στιγμή β-λακταμάσες, τα ένζυμα αυτά αναστέλλονταν από το EDTA και χαρακτηρίστηκαν ως μέταλλο-β-λακταμάσες. Από μελέτες που ακλούθησαν αποδείχτηκε ότι όλα τα εν λόγω ενζυμα περιείχαν τουλάχιστον ένα άτομο ψευδαργύρου στο ενεργό τους κέντρο, το οποίο διευκολύνει την υδρόλυση του δικυκλικού δακτυλίου της β-λακτάμης (Frere *et al*, 2005). Στα μέσα με τέλη της δεκαετίας του 1980, μια άλλη οικογένεια ενζύμων που υδρολύουν καρβαπενέμες ανακαλύφθηκε μεταξύ των μελών της οικογένειας των *Enterobacteriaceae* (Medeiros & Hare,1986) των οποίων η δράση δεν αναστέλλονταν από το EDTA (Rasmussen *et al*, 1996). Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι αυτά τα ένζυμα έφεραν σερίνη στο ενεργό τους κέντρο και αναστέλλονταν από αναστολείς των β-λακταμασών, όπως το κλαβουλανικό οξύ και η ταζομπακτάμη (Rasmussen *et al*, 1996, Yang *et al*, 1990).

Μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 1990, όλες οι καρβαπενεμάσες θεωρούνταν ως ένζυμα κωδικοποιούμενα από το χρωμόσωμα με ένα σαφώς καθορισμένο σύνολο χαρακτηριστικών το καθένα και συγκεκριμένα για τα διάφορα βακτηριακά είδη. Ωστόσο, η ανακάλυψη της IMP-1, μιας μέταλλο-β-λακταμάσης κωδικοποιούμενης από πλασμίδιο στην *Pseudomonas aeruginosa* (Watanabe *et al*, 1991), της OXA-23 (ARI-1) μιας καρβαπενεμάσης D τάξης στο *Acinetobacter baumannii* (Paton *et al*, 1993) και της KPC-1, μιας καρβαπενεμάσης A τάξης στη *Klebsiella pneumoniae* (Yigit *et al*, 2001) άλλαξε την επικρατούσα θεώρηση. Αυτό που κάποτε θεωρούνταν ένα πρόβλημα της εξάπλωσης των βακτηριακών κλώνων έχει γίνει πλέον ένα παγκόσμιο πρόβλημα διασποράς των καρβαπενεμασών μεταξύ των διαφορετικών βακτηριακών ειδών. Λόγω, λοιπόν, της εξάπλωσης και νέων μελών των δυο προαναφερθέντων οικογενειών

των καρβαπενεμασών είναι ακόμη πιο σημαντικό να προσπαθήσουμε να κατανοήσουμε τις ιδιότητες αυτών των ενζύμων, με όλα τα πλεονεκτήματα και τους περιορισμούς τους.

1.2.1 Ταξινόμηση Καρβαπενεμασών

Η ταξινόμηση των καρβαπενεμασών δύναται να πραγματοποιηθεί είτε λειτουργικά είτε μοριακά. Στις πρώιμες μελέτες των β-λακταμασών, πρώτου την καθιέρωση της κλωνοποίησης και της αλληλούχισης γονιδίων, τα νέα μέλη των εν λόγω ενζύμων χαρακτηρίζονταν βιοχημικά με την απομόνωση των ίδιων των ενζύμων, τον καθορισμό του ισοηλεκτρικού σημείου τους καθώς και ενζυμικές μελέτες για να εξακριβωθεί η υδρόλυση του υποστρώματος τους και τα χαρακτηριστικά της αναστολής τους (Sykes & Matthew, 1976). Έτσι, τα σχετικά ποσοστά υδρόλυση για ένα ευρύ φάσμα β-λακταμικών υποστρωμάτων και το προφίλ της αναστολής επέτρεπαν την ταξινόμηση των νέων β-λακταμασών. Αυτή η λειτουργική ταξινόμηση εξελίχθηκε εν μέσω των χρόνων σε ένα ευρέως πλέον αποδεκτό ταξινομικό σχήμα, βάσει του οποίου οι β-λακταμάσες εν γένει διακρίνονται σε τέσσερις βασικές λειτουργικές ομάδες (ομάδες 1 έως 4), με την ομάδα 2 να περιλαμβάνει αρκετές υποομάδες (Bush *et al*, 1995). Στο εν λόγω σύστημα, οι καρβαπενεμάσες ανήκουν κυρίως στις ομάδες 2f και 3.

Η ταξινόμηση των β-λακταμασών με βάση την ομολογία αμινοξέων οδήγησε στην διάκριση τεσσάρων κύριων τάξεων (Ambler, 1980), οι οποίες ταυτίζονται με τις ομάδες της λειτουργικής ταξινόμησης, ωστόσο στερούνται τις λεπτομέρειες σχετικά με την ενζυμική δράση του ενζύμου. Αναλυτικότερα, οι τάξεις A, C και D περιλαμβάνουν τις β-λακταμάσες που φέρουν σερίνη στο ενεργό τους κέντρο, ενώ η τάξη B περιλαμβάνει τις β-λακταμάσες που φέρουν ψευδάργυρο. Οι καρβαπενεμάσες, δηλαδή η β-λακταμάσες με ικανότητα να υδρολύουν καρβαπενέμες με αποτέλεσμα αυξημένες MIC σε αυτές, περιλαμβάνουν ενζυμα των τάξεων A, B και D.

Τα συστήματα λειτουργικής ταξινόμησης που περιλαμβάνουν καρβαπενεμάσες προτάθηκαν για πρώτη φορά από τον Bush το 1988 (Bush, 1988). Αρκετά συστήματα υποδιαίρεσης για τις μέταλλο-β-λακταμάσες προτάθηκαν εκ των υστέρων κατά τη διάρκεια των τελευταίων 10 ετών. Οι Rasmussen και Bush το 1997 πρότειναν ότι η λειτουργική ομάδα 3 των μέταλλο-β-λακταμασών θα μπορούσε να χωριστεί σε τρεις λειτουργικές υποομάδες, βασισμένοι κυρίως στις ιδιαιτερότητες των υποστρωμάτων τους (Rasmussen & Bush, 1997), ενώ κι ο Frere και οι συνεργάτες του έχουν προτείνει μοριακή υποταξινόμηση αυτών (Galleni *et al*, 2001, Garau *et al*,

2004). Έτσι, λοιπόν, οι μέταλλο-β-λακταμάσες διακρίνονται σε τρεις υποκατηγορίες με βάση ένα συνδυασμό δομικών χαρακτηριστικών, συγγένειες του ψευδάργυρου για τις δύο θέσεις πρόσδεσης και τα χαρακτηριστικά της υδρόλυσης. Αναλυτικότερα, οι υποτάξεις B1 και B3 απαιτούν την πρόσδεση δύο ατόμων ψευδαργύρου για τη βέλτιστη υδρόλυση, ενώ οι μέταλλο-β-λακταμάσες της υποτάξης B2 αναστέλλονται με την πρόσδεση του δεύτερου ατόμου ψευδαργύρου. Η υποτάξη B2 διαφέρει, επίσης, και στο φάσμα υδρόλυσης, καθώς υδρολύει κατά προτίμηση τις καρβαπενέμες, σε αντίθεση με το ευρύ φάσμα υδρόλυσης που παρατηρείται για τα ένζυμα των B1 και B3 υποτάξεων (Frere *et al*, 2005).

1.2.2 Καρβαπενεμάσες Τάξης Α

Η τάξη Α των β-λακταμασών φαίνεται να είναι η πλέον ποικιλόμορφη και ευρέως διαδεδομένη τάξη των β-λακταμασών καθώς τα γονίδια που κωδικοποιούν τα εν λόγω ενζυμα έχουν βρεθεί σε διάφορα βακτηριακά φύλα, όπως αυτά των Actinobacteria, των Bacteroidetes, των Cyanobacteria, των Firmicutes και των Proteobacteria, συμπεριλαμβανομένων και των τάξεων α, β και γ αυτών, ωστόσο τα γονίδια αυτά δεν απαντώνται σε όλα τα γένη των προαναφερθέντων φύλων.

Μια πολλαπλή ομοπαράθεση των αλληλουχιών των ενζύμων που ανήκουν στη τάξη Α των β-λακταμασών απέδειξε ότι τα ένζυμα αυτά έχουν τρία πολύ συντηρημένα μοτίβα. Το πρώτο συντηρημένο μοτίβο είναι η τετράδα, Ser^{70}-X-X-Lys, όπου το X αντιπροσωπεύει μεταβλητά αμινοξικά κατάλοιπα, που περιλαμβάνει την δραστική σερίνη του ενεργού κέντρου (Ambler *et al*, 1991). Το δεύτερο μοτίβο, Ser^{130}-Asp-Asn, είναι ισοδύναμο με τα μοτίβα Ser-X-Val/Ile και Tyr-Ala/Ser-Asn των β-λακταμασών των τάξεων D και C αντίστοιχα, ενώ το μοτίβο Lys^{234}-Thr/Ser-Gly είναι κοινό στην πλειοψηφία των β-λακταμασών που περιέχουν κατάλοιπα σερίνης στο ενεργό τους κέντρο. Ένα, επίσης, συντηρημένο αμινοξύ μεταξύ των β-λακταμασών της Α τάξης είναι αυτό της Glu^{166} που δρα ως βάση κατά το στάδιο της ακυλίωσης (Hermann *et al*, 2003).

Πολλά από τα μέλη της τάξης αυτής υδρολύουν αποτελεσματικά τη βενζυλπενικιλλίνη και την αμπικιλλίνη, κι ως εκ τούτου έχουν χαρακτηρισθεί κυρίως ως πενικιλλινάσες. Σύμφωνα με τις λειτουργικές τους ιδιότητες, οι β-λακταμάσες διακρίνονται σε διαφορετικές ομάδες, με τις β-λακταμάσες της τάξης Α να ανήκουν στην ομάδα 2 που υποδιαιρείται σε αρκετές υποομάδες

(Bush *et al*, 1995). Τα μέλη της ομάδας 2 εν γένει υδρολύουν αποτελεσματικά πενικιλλίνες και κεφαλοσπορίνες, ενώ αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ (Bush *et al*, 1995).

Η φυλογενετική ανάλυση της τάξης Α των καρβαπενεμασών μαζί με άλλες β-λακταμάσες της ίδιας τάξης από βακτήρια διαφορετικών φύλων απέδειξε ότι οι καρβαπενεμάσες σχηματίζουν έξι διακριτά κλαδιά (Εικόνα 2) τα μέλη των οποίων εμφανίζουν αμινοξική ομοιότητα που κυμαίνεται από 32% έως και 70%, γεγονός που υποδεικνύει ότι μπορεί να έχουν προέλθει από διαφορετικούς προγόνους (Walther-Rasmussen & Høiby, 2007).

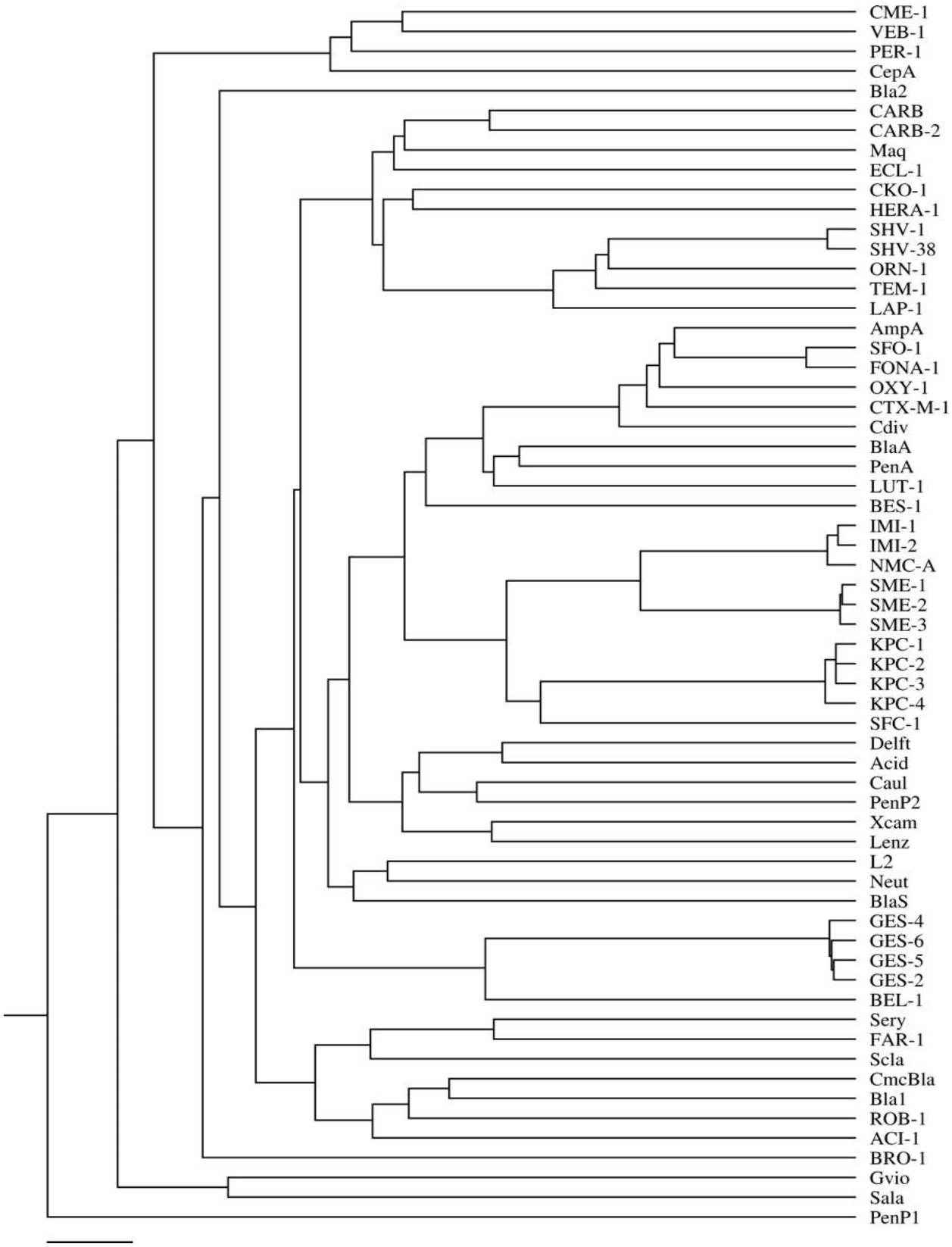
1.2.2.1 Καρβαπενεμάσες Τύπου GES

Το 1998 ανακτήθηκε ένα στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* σε ένα γαλλικό νοσοκομείο από ένα βρέφος που προηγουμένως είχαν νοσηλευτεί στη γαλλική Guiana (Poirel *et al*, 2000). Η β-λακταμάση που χαρακτηρίστηκε από το εν λόγω κλινικό στέλεχος ονομάστηκε GES-1 (Guiana extended-spectrum) και ως σήμερα η οικογένεια των ενζύμων GES περιλαμβάνει εννέα διαφορετικά μέλη, εκ των οποίων μόνο τέσσερα, τα GES-1, -2, -4 και -5, παρουσιάζουν υδρολυτική δραστηριότητα κατά των καρβαπενέμων. Τα ένζυμα της οικογένειας GES διαφέρουν μεταξύ τους κατά ένα έως τέσσερα αμινοξέα, ενώ η πλησιέστερη φυλογενετικά σε αυτά β-λακταμάση είναι η BEL-1 που απαντάται στη *P. aeruginosa* με ομοιότητες από 50% έως 51% (Poirel *et al*, 2005).

Τα ένζυμα της οικογένειας GES απαντώνται κυρίως σε στελέχη *P. aeruginosa*, ωστόσο ένζυμα αυτής απαντώνται, επίσης, και στα μέλη της οικογένειας των *Enterobacteriaceae*. Στελέχη, που παράγουν ένζυμα GES με ικανότητα υδρόλυσης καρβαπενέμων, έχουν απομονωθεί κυρίως στη Ευρώπη, στη Νότια Αφρική και στην Άπω Ανατολή.

Τον Μάρτιο του 2000, ξέσπασε μια επιδημία κλωνικά συνδεδεμένων στελεχών *P. aeruginosa* που παρήγαγαν GES-2 καρβαπενεμάση στη Δημοκρατία της Νότιας Αφρικής (Poirel *et al*, 2002), ενώ το 2004 ξέσπασε μια επιδημία ενδημικών στελεχών *K. pneumoniae* που παρήγαγαν GES-5 καρβαπενεμάση (Jeong *et al*, 2005).

Εκτός από το γονίδιο GES-7 που απομονώθηκε σε ένα στέλεχος *Escherichia coli*, τα υπόλοιπα γονίδια των β-λακταμασών τύπου GES έχει βρεθεί ότι αποτελούν μέρος ιντεγκρονίων. Συγκριμένα, αν και δεν έχουν δημοσιευθεί έρευνες για το ακριβές γενετικό περιβάλλον του γονίδιου GES-7, ωστόσο είναι το μοναδικό γονίδιο που κωδικοποιεί ένζυμο της οικογένειας



Εικόνα 1.2. Φυλογενετικό δέντρο 62 αντιπροσωπευτικών μελών της τάξης Α των β-λακταμασών συμπεριλαμβανομένων και των καρβαπενεμασών της τάξης αυτής (Walther-Rasmussen & Høiby, 2007).

GES και το οποίο δεν περιλαμβάνεται στην αλληλουχία γονιδίων που απαντώνται σε ιντεγκρόνια (Galani *et al*, 2006).

Από ορισμένα κλινικά απομονωθέντα στελέχη, ο σχετιζόμενος με την παραγωγή ενζύμων GES ανθεκτικός φαινότυπος είναι μεταβιβάσιμος μέσω σύζευξης (Jeong *et al*, 2005, Poirel *et al*, 2001), ενώ σε άλλα στελέχη δεν κατέστη δυνατή η μεταβίβαση του εν λόγω χαρακτηριστικού τουλάχιστον υπό τις διενεργούμενες πειραματικές συνθήκες (Pasteran *et al*, 2005). Το γεγονός ότι τα γονίδια GES δύναται να μεταβιβαστούν μέσω σύζευξης ίσως υποδεικνύει την ύπαρξη τους σε μεταφερόμενα πλασμίδια, ωστόσο έχει καταγράφει η μεταφορά του σχετιζόμενου με την παραγωγή ενζύμων GES ανθεκτικού φαινοτύπου μέσω ηλεκτροπόρωσης αλλά όχι μέσω σύζευξης υποδεικνύοντας την δυνατοτητα τα γονίδια GES να εδράζονται και σε μη μεταφερόμενα πλασμίδια (Poirel *et al*, 2000). Τέλος, ορισμένα στελέχη φαίνεται να φέρουν τα γονίδια GES ενσωματωμένα στο χρωμόσωμα τους (Galani *et al*, 2006).

Μετά από *in silico* ανάλυση των γονιδιακών συστοιχιών των ιντεγκρονίων που περιλαμβάνουν γονίδια GES από στελέχη απομονωμένα τόσο από την Ευρώπη όσο και από την Νότια Αφρική, φάνηκε ότι οι εν λόγω συστοιχίες διαφέρουν μόνο στα δομικά γονίδια. Οι συστοιχίες αυτές έχουν μήκος 1020 bp, σε αντίθεση με τις συστοιχίες που απομονώθηκαν από στελέχη της Νότιας Αμερικής και έχουν μήκος 929 bp (Poirel *et al*, 2000). Όσον αφορά την συστοιχία του ιντεγκρονίου που περιλαμβάνει το γονίδιο GES-1 στελεχών *P. aeruginosa* απομονωμένων από την Αργεντινή δεν έχουν δημοσιευθεί σχετικά στοιχειά (Pasteran *et al*, 2005). Τέλος, εξαιρουμένων των διαφορών εντός των γονιδίων GES-3 και GES-4, οι συστοιχίες των εν λόγω γονιδίων που περιγράφηκαν από στελέχη *K. pneumoniae* απομονωθέντα στην Ιαπωνία είναι πανομοιότυπες (Wachino *et al*, 2004α).

Λόγω των διαφορών, που προαναφέρθηκαν, μεταξύ των συστοιχιών των ιντεγκρονίων που περιλαμβάνουν τα γονίδια GES θεωρείται πιθανό τα γονίδια αυτά να έχουν κινητοποιηθεί από τον προγονικό τους μικροοργανισμό τουλάχιστον σε δύο διαφορετικές περιπτώσεις σε διαφορετικές γεωγραφικές τοποθεσίες.

1.2.2.2 Καρβαπενεμάσες Τύπου KPC

Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τα ένζυμα KPC (ακρωνύμιο από το *K. pneumoniae* carbapenemase). Τα τέσσερα μέχρι τώρα περιγραφέντα αλληλόμορφα φέρουν δραστικότητα

καρβαπενεμάσης και διαφέρουν μεταξύ τους κατά ένα έως και τρία αμινοξέα. Το πλησιέστερα φυλογενετικά συγγενές ένζυμο στις καρβαπενεμάσες τύπου KPC είναι το ένζυμο SFC-1 με ομοιότητα περίπου 61% (Εικόνα 1.2), το οποίο αποτελεί μια καρβαπενεμάση τάξης A απομονωμένη από τη *Serratia fonticola* (Fonseca F *et al*, 2007).

Παρά το γεγονός ότι το ακρωνύμιο KPC αφορά το είδος στο οποίο αρχικά εντοπίστηκε το ένζυμο KPC-1, τα μέλη αυτής της ομάδας των ενζύμων (KPC-1, -2, -3 και -4) έχουν, επίσης, απομονωθεί από αρκετά άλλα μέλη της οικογένειας των *Enterobacteriaceae* και από τη P. *aeruginosa* (Villegas *et al*, 2007, Bratu *et al*, 2005α, Yigit *et al*, 2003, Miriagou *et al*, 2003).

Σε μια έρευνα που διενεργήθηκε σε εθνικό επίπεδο στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής μεταξύ των ετών 1998 έως 2001 δεν αναφέρθηκε η απομόνωση στελεχών *K. pneumoniae* ανθεκτικών στις καρβαπενέμες (Karlowsky *et al*, 2003), ωστόσο οι μελέτες που ακλούθησαν σε πολιτειακό αλλά και σε εθνικό επίπεδο υπέδειξαν τη σταδιακή αύξηση στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν ενζυμα τύπου KPC και συγκεκριμένα τα απομονωθέντα στελέχη κάθε μιας εξ' αυτών των μελετών άνηκαν στον ίδιο ριβότυπο (Moland *et al*, 2003).

Μετά από έρευνα κατά τους μήνες Σεπτέμβριο έως Οκτώβριο του 2004, που διενεργήθηκε σε τέσσερα νοσοκομεία της Νέας Υόρκης, αποδείχτηκε ότι κανένα από τα στελέχη *E. coli* ή *Enterobacter spp* δεν έφεραν το γονίδιο KPC ενώ το 24% των στελεχών *K. pneumoniae* διέθετε είτε το αλληλόμορφο KPC-2 είτε το αλληλόμορφο KPC-3 και η πλειοψηφία αυτών (88%) άνηκαν στον ίδιο ριβότυπο (Bratu *et al*, 2005α). Σήμερα, μέλη της οικογένειας των *Enterobacteriaceae* που παράγουν καρβαπενεμάση τύπου KPC απαντώνται στη Βόρεια Καρολίνα, στο Νιού Τζέρσεϊ, στο Μέρυλαντ, στη Πενσυλβανία, στη Μασαχουσέτη στο Ντέλαγουερ, στο Αρκάνσας, στο Οχάιο, στη Βιρτζίνια και στη Νέα Υόρκη.

Από τα προαναφερθέντα προκύπτει ότι τα γονίδια των καρβαπενεμασών τύπου KPC έχουν τη δυνατότητα να διασπείρονται τάχιστα μεταξύ των ανθρώπινων παθογόνων. Η ανάδυση της ανθεκτικότητας έναντι των καρβαπενέμων στα μέλη της οικογένειας των *Enterobacteriaceae* είναι ανησυχητική, διότι ανθεκτικότητα αυτή συχνά σχετίζεται με την ανθεκτικότητα σα πολλά β-λακταμικά και μη αντιβιοτικά, περιορίζοντας τελικά τις αποτελεσματικές θεραπευτικές επιλογές.

Η επικράτηση στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες τύπου KPC είναι πιθανό να υποδιαγιγνώσκεται διότι διάφοροι παράγοντες δύναται να περιπλέξουν την ανίχνευσή τους. Ορισμένες φορές, οι καρβαπενεμάσες τύπου KPC μπορεί να μην προσδίδουν ανθεκτικότητα στις

καρβαπενέμες, αλλά μειωμένη ευαισθησία σε αυτές (Moland *et al*, 2003, Bratu *et al*, 2005β) ή ορισμένες φαινοτυπικές δοκιμασίες αδυνατούν να διακρίνουν μεταξύ στελεχών που παράγουν KPC καρβαπενεμάσες και ευρέως φάσματος β-λακαταμάσες (ESBL) (Moland *et al*, 2003). Επίσης, η ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες δύναται να υποτιμηθεί κατά την χρήση αυτοματοποιημένων συστημάτων όταν χρησιμοποιείται σε αυτά αραιό εναιώρημα του υπό εξέταση μικροοργανισμού (Tenover *et al*, 2006). Συμπερασματικά, η πιθανότητα για ανακριβή προσδιορισμό των στελεχών *K. pneumoniae* που παράγουν καρβαπενεμάσες τύπου KPC είναι υπαρκτή και επιφέρει μοιραίες συνέπειες.

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις KPC καρβαπενεμάσες εδράζονται σε πλασμίδια με εξαίρεση το γονίδιο KPC-2 σε στελέχη *P. aeruginosa* (Villegas *et al*, 2007). Παρότι, κανένα από τα γονίδια KPC δεν εντοπίζεται εντός των γονιδιακών συστοιχιών ιντεγκρονίων, εντούτοις τα εν λόγω γονίδια σχετίζονται με μεταθετά στοιχεία. Ανοδικά των γονιδίων KPC-2 τόσο σε στελέχη *K. pneumoniae* όσο και σε στελέχη *Salmonella enterica* έχουν βρεθεί πανομοιότυπες αλληλουχίες που κωδικοποιούν μια πιθανή πρωτεΐνη δέσμευσης ATP τύπου IS-1 (Miriagou *et al*, 2003). Εξαιρουμένης μιας έλλειψης έξι νουκλεοτιδίων με αποτέλεσμα την απώλεια δύο αμινοξέων, η ίδια αλληλουχία έχει βρεθεί κι ανοδικά του γονιδίου KPC-2 στην *Klebsiella oxytoca* (Yigit *et al*, 2003). Καθοδικά των γονιδίων KPC-1 και KPC-2 τόσο σε στελέχη *K. pneumoniae* όσο και σε στελέχη *S. enterica* έχει βρεθεί το 3΄ακρο του γονιδίου tnp (Miriagou *et al*, 2003).

Μετά από *in silico* ανάλυση των γενετικών περιοχών εκατέρωθεν των γονιδίων που κωδικοποιούν KPC καρβαπενεμάσες βρέθηκε ότι η μη κωδική περιοχή καθοδικά των γονιδίων αυτών διακρίνεται σε δυο τύπους και συγκεκριμένα μια αλληλουχία 249 bp παρούσα αποκλειστικά σε στελέχη *K. pneumoniae* και μια αλληλουχία 248 bp, ελαφρώς διαφορετική από την πρώτη, παρούσα αποκλειστικά σε στελέχη *K. oxytoca* και *S. enterica* που φέρουν γονίδια KPC-1 και KPC-2 αντίστοιχα (Walther-Rasmussen & Høiby, 2007).

1.2.2.3 Καρβαπενεμάσες Τύπου SME

Τα ένζυμα τύπου SME έχουν βρεθεί αποκλειστικά στη *Serratia marcescens* (ακρωνύμιο από το *Serratia marcescens enzymes*) και τα τρία μέχρι στιγμής γνωστά αλληλόμορφα διαφέρουν μεταξύ τους κατά ένα ή δυο αμινοξέα (Queenan *et al*, 2000, Queenan *et al*, 2006). Στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάσες τύπου SME έχουν απομονωθεί κατά βάση στον Ηνωμένο Βασίλειο

και σπάνια και σποραδικά στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (Yang *et al*, 1990, Queenan *et al*, 2000).

Τα γονίδια των εν λόγω καρβαπενεμασών δεν βρίθουν στα στελέχη *S. marcescens*, αντιθέτως είναι παρόντα σε έναν υποπληθυσμό του συγκεκριμένου είδους. Τα γονίδια αυτά θεωρούνται χρωμοσωμικά και μη κινητά, ωστόσο δεν υπάρχουν στοιχεία που να τεκμηριώνουν αυτή την υπόθεση.

Μεταξύ των στελεχών *S. marcescens* που παράγουν καρβαπενεμάσες τύπου SME, το γονίδιο SME-1 αποτελεί μέχρι στιγμής το μοναδικό εξ' αυτών που σχετίζεται με ένα ρυθμιστικό γονίδιο τύπου LysR (Naas *et al*, 1995). Η αλληλουχία (123 bp) ανοδικά του γονιδίου SME-3 είναι 100% πανομοιότυπη με την αντίστοιχη αλληλουχία του γονιδίου SME-1, υποδηλώνοντας ότι το γονίδιο SME-3 πιθανώς διαθέτει ανοδικότερα ένα ρυθμιστικό γονίδιο τύπου LysR (Queenan *et al*, 2006). Ωστόσο, το γενετικό περιβάλλον των γονιδίων SME δεν έχει διερευνηθεί και ως εκ τούτου παραμένει άγνωστο αν τα γονίδια εδράζονται σε μεταθετά στοιχεία.

Μέχρι στιγμής μόνο το στέλεχος *S. marcescens* S6 έχει μελετηθεί για την πιθανότητα επαγωγής της καρβαπενεμάσης SME-1. Κατά την εν λόγω μελέτη φάνηκε ότι η επαγωγή με ιμιπενέμη είχε ως αποτέλεσμα την οριακή μόνο αύξηση της δραστικότητας της καρβαπενεμάσης SME-1 έναντι της ιμιπενέμης, γεγονός που υποδεικνύει την ιδιοσύστατη παραγωγή της συγκεκριμένης καρβαπενεμάσης σε υψηλά επίπεδα (Naas *et al*, 1995). Η υποτιθέμενη ιδιοσύστατη σε υψηλά επίπεδα παραγωγή της καρβαπενεμάσης SME-1 δύναται να διαμεσολαβείται από τον ρυθμιστικό παράγοντα SmeR, ο οποίος απουσία β-λακταμικών επαγωγέων δρα ως επαγωγέας ενώ κατά την παρουσία αυτών δρα ακόμα ισχυρότερα (Naas *et al*, 1995).

1.2.2.4 Καρβαπενεμάσες Τύπου IMI/NMC-A

Η τέταρτη κατηγορία των καρβαπενεμασών τάξης Α απαρτίζεται από τις καρβαπενεμάσες IMI/ NMC-A (ακρωνύμιο από το imipenemase/non-metallocarbapenemase-A) με δύο υποκατηγορίες αυτές των IMI και NMC-A αντίστοιχα. Η καρβαπενεμάση της υποκατηγορίας NMC-A διαφέρει κατά έξι αμινοξικά κατάλοιπα από τα δύο μέχρι στιγμής γνωστά ένζυμα της υποκατηγορίας IMI, ενώ τα τελευταία μεταξύ τους κατά δύο αμινοξικά κατάλοιπα. Τα εν λόγω ένζυμα απαντώνται σποραδικά τόσο σε κλινικά απομονωθέντα στελέχη όσο και σε

περιβαλλοντικά απομονωθέντα στελέχη από ποταμούς στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (Rasmussen *et al*, 1996, Yu *et al*, 2006, Aubron *et al*, 2005α).

Όλα τα κλινικά στελέχη που φέρουν το χρωμοσωμικό γονίδιο της καρβαπενεμάσης NMC-A φέρουν παρακείμενα και το ρυθμιστικό γονίδιο nmc-R, του οποίου το προϊόν αποτελεί ένα μεταγραφικό παράγοντα που ρυθμίζει το γονίδιο της καρβαπενεμάσης NMC-A όμοια με τον προαναφερθέντα ρυθμιστικό παράγοντα SmeR (Naas & Nordmann, 1994).

Το γονίδιο της καρβαπενεμάσης IMI-1 και το συνδεόμενο imi-R γονίδιο με αυτό που κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα τύπου LysR εδράζονται στο χρωμόσωμα, σε αντίθεση με το γονίδιο της καρβαπενεμάσης IMI-2 και το γονίδιο imi-R του μεταγραφικού του παράγοντα που εδράζονται σε πλασμίδια (Rasmussen *et al*, 1996, Yu *et al*, 2006, Aubron *et al*, 2005α). Παρότι οι αλληλουχίες εκατέρωθεν του συμπλέγματος των γονιδίων IMI-R–IMI-1 δεν έχουν ερευνηθεί εντούτοις πιθανολογείται ότι αποτελεί μέρος ενός σύνθετου τρανσποζονίου. Το σύμπλεγμα των γονιδίων IMI-R-IMI-2 σε στελέχη *Enterobacter cloacae* και *Enterobacter asburiae* έχει βρεθεί ότι αποτελεί μέρος μεταθετών στοιχείων. Μάλιστα τα εν λόγω γονίδια σε στελέχη *E. asburiae* περιβάλλονται ανοδικά από τμήματα αλληλουχιών που ομοιάζουν με IS και καθοδικά από το γονίδιο της τρανσποζάσης tnpA του τρανσποζονίου Tn2501 ενώ σε στελέχη *E. cloacae* περιβάλλονται εκατέρωθεν από αλληλουχίες σχετικές με το γονίδιο της τρανσποζάσης tnpA του τρανσποζονίου Tn903 και περαιτέρω ανοδικά από τμήματα αλληλουχιών που ομοιάζουν με IS (Aubron *et al*, 2005α, Yu *et al*, 2006). Αρχικά, αυτά τα μεταθετά στοιχεία μπορεί να ενεπλάκησαν στην κινητοποίηση των γονιδίων IMI στο χρωμόσωμα και στα πλασμίδια, αλλά δεν είναι γνωστό αν εξακολουθούν να είναι μεταθετά. Εάν τα μεταθετά αυτά στοιχεία έγινε ανενεργά κάποια στιγμή μετά την κινητοποίηση των γονιδίων IMI, θα μπορούσε να αιτιολογηθεί η σπάνια εμφάνιση των συγκεκριμένων καρβαπενεμασών στα διάφορα είδη.

Τέλος, μετά από πειράματα επαγωγής στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες τύπου IMI με ιμιπενέμη παρατηρήθηκε ουσιαστική αύξηση της δραστικότητας των εν λόγω καρβαπενεμασών έναντι της ιμιπενέμη (Rasmussen *et al*, 1996, Aubron *et al*, 2005α).

1.2.2.5 Καρβαπενεμάσες SFC-1 και SHV-38

Κάθε μία από τις δύο τελευταίες ομάδες περιέχει ένα μοναδικό, χρωμοσωμικά κωδικοποιούμενο ένζυμο, γνωστά ως SFC-1 και SHV-38, απομονωμένα από τα στελέχη *S. fonticola* και *K. pneumoniae* αντίστοιχα. Το περιβαλλοντικό στέλεχος *S. fonticola* που παρήγαγε

την καρβαπενεμάση SFC-1 απομονώθηκε στην Πορτογαλία, ενώ το στέλεχος *K. pneumoniae* που παρήγαγε την καρβαπενεμάση SHV-38 στην Γαλλία (Henriques *et al*, 2004, Poirel *et al*, 2003). Η καρβαπενεμάση SFC-1 δεν βρίθει μεταξύ των στελεχών *S. fonticola* και έχει αναφερθεί μόνο στο προαναφερθέν περιβαλλοντικό στέλεχος. Τέλος, η καρβαπενεμάση SHV-38 διαφέρει κατά ένα αμινοξύ από την ευρέως φάσματος β-λακταμάση SHV-1.

1.2.2.6 Προέλευση Καρβαπενεμασών Τάξης Α

Ο μικροοργανισμός του εδάφους *Streptomyces cattleya*, είναι ένας φυσικός παραγωγός της ουσίας θιεναμυκίνη, Ν-φορμιμιδοϋλο-παράγωγο της οποίας είναι η ιμιπενέμη (Núñez *et al*, 2003). Συνεπώς, στελέχη της εδαφικής μικροχλωρίδας που φέρουν γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα υδρόλυσης για τις καρβαπενέμες διαθέτουν ένα εξελικτικό πλεονέκτημα στο εν λόγω περιβάλλον.

Το πρώτο απομονωθέν στέλεχος που παρήγαγε καρβαπενεμάση τάξης Α είναι ένα στέλεχος *S. marcescens* που παρήγαγε SME-1 καρβαπενεμάση στο Λονδίνο το 1982, πριν από την έγκριση της ιμιπενέμης για γενική χρήση (Yang *et al*, 1990). Ομοίως, το 1984 στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής απομονώθηκε ένα στέλεχος *E. cloacae* που παρήγαγε IMI-1 καρβαπενεμάση (Rasmussen *et al*, 1996). Επίσης, η OXA-23 μια καρβαπενεμάση τάξης D, βρέθηκε σε ένα στέλεχος *A. baumannii* απομονωμένο το 1985 στο Ηνωμένο Βασίλειο, πριν από την έναρξη της ιμιπενέμη στη κλινική θεραπευτική (Paton *et al*, 1993).

Η εμφάνιση του ανθεκτικού στην ιμιπενέμη φαινοτύπου στις προαναφερθείσες περιπτώσεις προηγήθηκε της κλινικής χρήσης της ιμιπενέμη, καθώς το εν λόγω αντιβιοτικό εγκρίθηκε για κλινική χρήση το 1985 στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (Medeiros, 1997). Το εύρημα αυτό υποδεικνύει ότι η κλινική χρήση της ιμιπενέμη δεν φέρει την ευθύνη για την εξέλιξη των καρβαπενεμασών των τάξεων Α και D.

Από το δενδρόγραμμα της εικόνας 1.2 φαίνεται ότι οι καρβαπενεμάσες των τύπων IMI/ NMC-A, SME, KPC και SFC-1 διαθέτουν ένα κοινό ένζυμο πρόγονο ο οποίος είναι αρκετά διαφορετικός από αυτών των ενζύμων GES και SHV-38. Η SHV-38 καρβαπενεμάση είναι η μόνη καρβαπενεμάση τάξης Α της οποίας το προγονικό ένζυμο είναι προσδιορισμένο (Hæggman *et al*, 2004). Η εγγενής δραστικότητα έναντι των καρβαπενέμων όλων των μελών των τύπων IMI/ NMC-A, SME, KPC και SFC-1 υποδεικνύει ότι το προγονικό ή τα προγονικά

ένζυμα αυτών διέθεταν δραστικότητα έναντι των καρβαπενέμων. Είναι, επίσης, αξιοσημείωτο ότι οι μόνες ομάδες καρβαπενεμασών τάξης Α των οποίων τα γονίδια συνδέονται με το ρυθμιστικό γονίδιο LysR είναι αυτές που φαίνεται ότι προέρχονται από ένα κοινό ενζυμικό πρόγονο (Εικόνα 1.2). Ωστόσο τα εν λόγω γονίδια δεν βρίθουν στα βακτηριακά είδη που απαντώνται κατά βάση.

Η ομάδα των τύπου GES καρβαπενεμασών περιλαμβάνει επίσης και ευρέως φάσματος β-λακταμάσες (ESBL). Η ικανότητα τους να υδρολύουν καρβαπενέμες δεν είναι προφανώς μια έμφυτη ιδιότητα όλων των ενζύμων τύπου GES, αντιθέτως σε μερικά από αυτά τα ένζυμα ενδεχομένως η δραστικότητα έναντι των καρβαπενέμων να εξελίχτηκε μέσω αμινοξικών υποκαταστάσεων. Συνεπώς, δεν δύναται να αποκλειστεί ότι το προγονικό ένζυμο τύπου GES δεν διέθετε δραστικότητα έναντι των καρβαπενέμων.

1.2.2.7 Βιοχημικές Ιδιότητες Καρβαπενεμασών Τάξης Α

Η τάξη Α των καρβαπενεμασών περιλαμβάνει μονομερή ένζυμα αποτελούμενα από 265 έως και 269 αμινοξέα, ενώ τα μοριακά βάρη τους έχει προσδιοριστεί πειραματικά ότι κυμαίνονται από 25 έως 32 kDa. Τα εν λόγω ένζυμα χαρακτηρίζονται από ισοηλεκτρικά σημεία που ποικίλλουν από 5,8 έως 9,7.

Όλες η β-λακταμάσες που φέρουν σερίνη στο ενεργό τους κέντρο, συμπεριλαμβανομένων των καρβαπενεμασών της τάξης Α δρουν μέσω ενός απλού μηχανισμού τριών σταδίων που περιλαμβάνει ακετυλίωση και απακετυλίωση (Lamotte-Brasseur *et al*, 1994).

Η τάξη Α των καρβαπενεμασών δύναται να διακριθεί φαινοτυπικά σε διάφορες υποομάδες της ομάδας 2 των β-λακταμασών βάσει του συστήματος ταξινόμησης των Bush–Jacoby–Medeiros (Bush *et al*, 1995). Οι β-λακταμάσες GES-1, GES-2 και SHV-38 υδρολύουν τις ευρέως φάσματος β-λακτάμες, κεφοταξίμη ή κεφταζιδίμη, σε ποσοστό μεγαλύτερο ή ίσο του 10% από ότι τη βενζυλοπενικιλίνη και συνεπώς τα συγκεκριμένα ένζυμα ταξινομούνται στην υποομάδα 2be που περιλαμβάνει τις ευρέως φάσματος β-λακταμάσες (ESBL). Οι β-λακταμάσες SME, IMI και NMC-A, ταξινομούνται στην υποομάδα 2f, η οποία περιλαμβάνει ένζυμα που υδρολύουν την ιμιπενέμη σε ποσοστό ≥200% από ότι τη βενζυλπενικιλλίνη (Bush *et al*, 1995).

Τα κινητικά δεδομένα του πίνακα 2, υποδεικνύουν ότι οι β-λακταμάσες GES-4 και KPC είναι δραστικότερες κεφαλοσπορινάσες παρά πενικιλλινάσες, ενώ οι ικανότητα υδρόλυσης των εν

λόγω ενζύμων για τις ευρέως φάσματος β-λακτάμες είναι ασθενέστερη από αυτή των πενικιλλινών. Οι β-λακταμάσες τύπου KPC αρχικά ταξινομήθηκαν στην υποομάδα 2f, τα ενζυμα της οποίας χαρακτηρίζονται από σχετικές ταχύτητες υδρόλυσης της ιμιπενέμης μεγαλύτερες ή ίσες του 200% από αυτές της βενζυλπενικιλλίνης, ενώ οι αντίστοιχες ταχύτητες υδρόλυσης της ιμιπενέμης για την υποομάδα 2e είναι πολύ μικρότερες του 50% από αυτές της κεφαλοριδίνης (Bush *et al*, 1995). Ωστόσο, εφόσον οι β-λακταμάσες GES-4 και KPC χαρακτηρίζονται από ταχύτητες υδρόλυσης της ιμιπενέμης πολύ μικρότερες του 50% από αυτές της κεφαλοριδίνης και πολύ μεγαλύτερες του 200% από αυτές της βενζυλπενικιλλίνης τότε τα συγκεκριμένα ένζυμα ταξινομούνται στην υποομάδα 2e αντί της υποομάδα 2f. Η ταξινόμηση στην συγκεκριμένη υποομάδα ενισχύεται αφενός από το ότι τα ποσοστά υδρόλυση των άλλων β-λακτάμων αντιστοιχούν σε εκείνα της υποομάδας 2e και αφετέρου από το γεγονός ότι τα ένζυμα αυτά δεν έχουν υψηλή συγγένεια για την αζτρεονάμη (Πίνακας 1.2) και αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ, αν και μόνο ασθενώς σε σύγκριση με τις β-λακταμάσες της υποομάδα 2f. Ο πίνακας 2 δείχνει, επίσης, ότι ο σχετικός ρυθμός υδρόλυσης της ιμιπενέμης από την β-λακταμάση GES-5 είναι μεγαλύτερος του 50% από ότι αυτός για την κεφαλοριδίνη και μεγαλύτερος του 200% από ότι αυτός για την βενζυλοπενικιλλίνη, και εκτός αυτού, η GES-5 φαίνεται να υδρολύει τη πενικιλλίνη σε υψηλότερο ποσοστό από τις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες. Συνεπώς, η β-λακταμάση GES-5 ταξινομείται στην υποομάδα 2br, η οποία περιλαμβάνει τις ευρέως φάσματος πενικιλλινάσες που αναστέλλεται από το κλαβουλανικό οξύ (Bush *et al*, 1995).

Ομοίως, με τις καρβαπενεμάσες τόσο του τύπου OXA όσο και τις εξαρτώμενες από ψευδάργυρο, οι καρβαπενεμάσες τάξης A υδρολύουν τη μεροπενέμη σε πολύ χαμηλότερο ποσοστό από την ιμιπενέμη, ενώ η συγγένεια τους για τη μεροπενέμη είναι πολύ υψηλότερη (χαμηλή K_m) από αυτή για την ιμιπενέμη (Πίνακας 1.2).

Μετά από πολλαπλή ομοπαράθεση των αλληλουχιών των ενζύμων τύπου GES φάνηκε ότι τα ένζυμα του εν λόγω τύπου που εμφανίζουν δραστικότητα έναντι των καρβαπενέμων (GES-2, -4, -5 και -6) φέρουν ένα κατάλοιπο σερίνης ή ασπαραγγίνης στη θέση 170 κατά την αρίθμηση του Ambler ενώ όλα τα υπόλοιπα ένζυμα τύπου GES έχουν στη θέση αυτή ένα κατάλοιπο γλυκίνης (Ambler *et al*, 1991). Η θέση 170 κατά Ambler βρίσκεται στο Ω-βρόχο, ο οποίος αποτελεί τμήμα του ενεργού κέντρου των β-λακταμασών τύπου GES (Wachino *et al*, 2004).

Πίνακας 1.2. Κινητικές παράμετροι σταθερής κατάστασης, K_{cat} (S^{-1}), K_m (μM) και K_{cat}/K_m ($mM^{-1}s^{-1}$) για την in vitro υδρόλυση διαφορων β-λακταμικών αντιβιοτικων απο τις καρβαπενεμάσες ταξης Α.

Ένζυμο	PEN	AMP	LOR	CEF	CTX	CAZ	FOX	IPM	MEM	ATZ	
GES-1											
K_{cat}	2,8	13	53	179	68	380	0,9	0,003	Μ.Δ	Μ.Υ	
K_m	40	200	2000	3400	4600	2000	30	45	Μ.Δ	Μ.Υ	(Poirel *et al*, 2000)
K_{cat}/K_m	70	65	26	52	15	188	33	0,07	Μ.Δ	Μ.Υ	
GES-2											
K_{cat}	0,4	0,7	0,5	0,3	2,2	Μ.Κ	Μ.Υ	0,004	Μ.Υ	Μ.Υ	
K_m	4	25,8	7,7	3	890	>3000	Μ.Υ	0,45	Μ.Υ	Μ.Υ	(Poirel *et al*, 2001)
K_{cat}/K_m	96	26	65	112	2,5	Μ.Κ	Μ.Υ	9	Μ.Υ	Μ.Υ	
GES-4											
K_{cat}	130	19	490	Μ.Δ	17	2,5	85	0,38	Μ.Δ	Μ.Υ	
K_m	160	62	2200	Μ.Δ	700	1500	810	4,7	Μ.Δ	Μ.Υ	(Wachino *et al*, 2004)
K_{cat}/K_m	810	310	230	Μ.Δ	24	1,7	110	81	Μ.Δ	Μ.Υ	
GES-5											
K_{cat}	317	Μ.Δ	190	50	2,9	0,3	9,6	1,2	Μ.Δ	Μ.Δ	
K_m	370	Μ.Δ	506	577	341	394	650	4,2	Μ.Δ	Μ.Δ	(Bae *et al*, 2007)
K_{cat}/K_m	860	Μ.Δ	380	87	8,5	0,8	15	286	Μ.Δ	Μ.Δ	
KPC-1											
K_{cat}	32	110	340	75	14	0,1	0,3	12	3	20	
K_m	23	130	560	53	160	94	120	81	12	310	(Yigit *et al*, 2001)
K_{cat}/K_m	1400	850	610	1400	880	1,1	2,5	150	250	65	
KPC-2											
K_{cat}	51	210	530	69	22	≤0,12	0,31	15	4	30	
K_m	27	230	500	82	220	Μ.Κ	180	51	15	360	(Yigit *et al*, 2003)
K_{cat}/K_m	1900	910	1050	840	100	Μ.Κ	1,7	295	265	85	
KPC-3											
K_{cat}	Μ.Δ	77	364	153	52	3	0,05	45	6	Μ.Δ	
K_m	Μ.Δ	65	261	44	95	88	970	23	4	Μ.Δ	(Alba *et al*, 2005)
K_{cat}/K_m	Μ.Δ	1200	1400	3500	550	34	0,05	1950	1500	Μ.Δ	
SME-1											
K_{cat}	1,93	181	980	Μ.Δ	<0,98	0,07	<0,15	104	8,9	108	
K_m	16,7	488	770	Μ.Δ	Μ.Υ	Μ.Υ	Μ.Υ	202	13,4	259	(Queenan *et al*, 2000)
K_{cat}/K_m	1150	370	1250	Μ.Δ	Μ.Υ	Μ.Υ	Μ.Υ	515	660	420	

(Συνέχεια Πίνακα 1.2)											
SME-2											
K_{cat}	21,3	204	1081	Μ.Δ	<1,0	<0,09	<0,17	136	7,3	140	(Queenan *et al*, 2000)
K_m	17,7	609	859	Μ.Δ	Μ.Υ	Μ.Υ	Μ.Υ	313	9,6	277	
K_{cat}/K_m	1200	335	1250	Μ.Δ	Μ.Υ	Μ.Υ	Μ.Υ	435	760	505	
SME-3											
K_{cat}	6,27	539	1370	Μ.Δ	1,48	0,14	0,30	322	3,22	148	(Queenan *et al*, 2003)
K_m	2,2	420	401	Μ.Δ	140	169	620	154	5,8	769	
K_{cat}/K_m	2850	1280	3410	Μ.Δ	11	0,8	0,5	2090	960	190	
IMI-1											
K_{cat}	36	190	2000	120	3,4	0,0068	0,3	89	10	51	(Rasmussen *et al*, 1996)
K_m	64	780	1070	130	190	270	45	170	26	26	
K_{cat}/K_m	560	240	1900	920	18	0,024	6,7	520	380	380	
NMC-A											
K_{cat}	260	816	Μ.Δ	2820	286	4,7	5,0	1040	12	707	(Lamotte-Brasseur *et al*, 1994)
K_m	28	90	Μ.Δ	185	956	90	93	92	4,35	125	
K_{cat}/K_m	9300	9060	Μ.Δ	15200	300	52	62	11300	2750	5600	
SHV-38											
K_{cat}	100	1800	40	5	1	110	Μ.Δ	0,01	Μ.Δ	3	(Poirel *et al*, 2003)
K_m	13	35	150	100	800	3800	Μ.Δ	24	Μ.Δ	5500	
K_{cat}/K_m	7700	51000	270	50	1	30	Μ.Δ	0,5	Μ.Δ	0,5	

PEN: Βενζυλπενικιλίνη, AMP: αμπικιλλίνη, LOR: κεφαλοριδίνη, CEF: κεφαλοθίνη, CTX: κεφοταξίμη, CAZ: κεφταζιδίμη, FOX: κεφοξιτίνη, IPM: ιμιπενέμη, MEM: μεροπενέμη, ATZ: αζτρεονάμη, Μ.Δ: μη διαθέσιμο, Μ.Υ: μη υπολογισμένη εξαιτίας της πολύ χαμηλής αρχικής ταχύτητας υδρόλυσης και Μ.Κ: μη καθορισμένη εξαιτίας της πολύ υψηλής τιμής της K_m.

Έχει παρατηρηθεί ότι η β-λακταμάση GES-6 παρέχει μειωμένη ευαισθησία έναντι των καρβαπενέμων σε ένα μετασχηματισμένο στέλεχος *E. coli*, ωστόσο δεν έχουν καθοριστεί οι in vitro κινητικές παράμετροι τις συγκεκριμένης β-λακταμάσης (Vourli *et al*, 2004). Παρόλα αυτά η δοκιμασία διάχυσης δίσκων απέδειξε ότι η GES-6 διαθέτει δραστικότητα έναντι των καρβαπενέμων, όπως η GES-5 (Vourli *et al*, 2004). Εξαιτίας, επίσης, του γεγονότος ότι η GES-6 φέρει στη θέση 170 κατά Ambler ένα κατάλοιπο σερίνης, όπως η GES-5, ενισχύεται η υπόθεση ότι και η συγκεκριμένη β-λακταμάση διαθέτει δραστικότητα έναντι των καρβαπενέμων.

Η β-λακταμάση GES-4,η οποία διαφέρει από τη GES-3 μόνο ως προς το κατάλοιπο σερίνης που φέρει στη θέση 170 (αρίθμηση κατά Ambler), δεν διαθέτει δραστικότητα μόνο έναντι των

καρβαπενέμων αλλά και έναντι της κεφαλοσπορίνης, κεφοξιτίνη (Πίνακας 1.2), σε αντίθεση με την GES-3 που δεν υδρολύει ούτε τις καρβαπενέμες ούτε την κεφοξιτίνη (Wachino *et al,* 2004). Η β-λακταμάση GES-5 που φέρει, επίσης, κατάλοιπο σερίνης στη θέση 170 διαθέτει, επίσης, δραστικότητα έναντι της κεφοξιτίνης (Πίνακας 1.2). Όσον αφορά την GES-6, αυτή υδρολύει τις καρβαπενέμες, αλλά η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση της κεφοξιτίνης δεν έχει καθοριστεί σε στελέχη που παράγουν τη συγκεκριμένη β-λακταμάση (Vourli *et al,* 2004).

Τα ένζυμα του τύπου GES κατέχουν μια ασυνήθιστη φαινοτυπική πλαστικότητα, όπως αυτά των τύπων TEM και SHV, επειδή διαθέτουν δραστικότητα κατά των καρβαπενέμων, των ευρέως φάσματος β-λακτάμων, των κεφαλοσπορινών ή των μονοβακτάμων.

Η διαφορά μεταξύ τις ευρέως φάσματος πενικιλλινάσης, SHV-1 με την SHV-38 είναι μια αντικατάσταση τις αλανίνης στη θέση 146 με μια βαλίνη (αρίθμηση κατά Ambler). Μεταξύ των 78 μέχρι στιγμής διαθέσιμων β-λακταμασών τύπου SHV στη βάση δεδομένων GenBank, μόνο η β-λακταμάση SHV-38 φέρει την εν λόγω αντικατάσταση στη θέση 146 και είναι το μονό ενζυμο αυτού του τύπου με δραστικότητα έναντι των καρβαπενέμων. Ωστόσο η SHV-38 δεν υδρολύει την μεροπενέμη σε μετρήσιμο ποσοστό (Poirel *et al,* 2003).

1.2.2.8 Σχέση Δομής και Λειτουργιάς Καρβαπενεμασών Τάξης Α

Οι β-λακταμάσες τάξης Α αναδιπλώνονται σε δυο σφαιρικές επικράτειες, η μια αποτελούμενη από μια α-έλικα και η άλλη αποτελούμενη από πέντε β-πτυχωτά φύλλα περιβαλλόμενα από μια α-έλικα (Fonze *et al,* 2002). Το καταλυτικό κέντρο των εν λόγω ενζύμων καθώς και η καταλυτική σερίνη βρίσκονται μεταξύ των δύο προαναφερθέντων επικρατειών. Το φύλλο B3 (κατάλοιπα 230-238) αποτελεί το ένα τμήμα της κοιλότητας του ενεργού κέντρου, ενώ το κάτω μέρος αυτής της κοιλότητας αποτελείται από τα κατάλοιπα 160-180 του Ω-βρόγχου (Fonze *et al,* 2002). Άλλα σημαντικά κατάλοιπα που εμπλέκονται στο σχηματισμό του ενεργού κέντρου τα αμινοξέα των μοτίβων S_{130}DN και K_{234}TG, μαζί με την γλουταμίνη στη θέση 166 που λειτουργεί ως γενική βάση.

Παρά τη μέτρια ταυτότητα που φέρουν η αμινοξικές αλληλουχίες μεταξύ των καρβαπενεμασών της τάξης Α, τα εν λόγω ένζυμα διαθέτουν παρόμοια πρωτεϊνική αναδίπλωση γεγονός που τους επιτρέπει να υδρολύουν καρβαπενέμες. Εκτός από την καρβαπενεμάση SHV-38, οι υπόλοιπες καρβαπενεμάσες τάξης Α φέρουν ένα δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των

κυστεϊνών στις θέσεις 69 και 238, ο οποίος σταθεροποιεί τη δομή των συγκεκριμένων ενζύμων (Sougakoff *et al*, 2002). Ο δισουλφιδικός αυτός δεσμός φαίνεται να είναι κρίσιμος για τη βιολογική δράση της καρβαπενεμάσης SME-1, εφόσον μεταλλαγμένα ένζυμα στα οποία απουσιάζει ο δεσμός αυτός δεν προσδίδουν ανθεκτικότητα έναντι β-λακταμικών αντιβιοτικών (Sougakoff *et al*, 2002).

Ωστόσο, πιθανώς ο εν λόγω δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ των δυο προαναφερθέντων αμινοξικών καταλοίπων στις β-λακταμάσες τάξης Α δεν αποτελεί προϋπόθεση για την υδρόλυση των καρβαπενέμων, καθώς η ύπαρξη του δεσμού αυτού στην ευρέως φάσματος β-λακταμάση Toho-1 οδηγεί σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα υδρόλυσης της ιμιπενέμης (Shimizu-Ibuka *et al*, 2004). Ως εκ τούτου, είναι λογικό να υποθέσουμε ότι άλλα δομικά χαρακτηριστικά των ενζύμων αυτών σχετίζονται με την υδρόλυση των καρβαπενέμων. Η θεώρηση αυτή είναι σύμφωνη και με τα ευρήματα της μελέτης των Majiduddin και Palzkill, η οποία υποδεικνύει ότι πολλαπλά αμινοξικά κατάλοιπα δύναται να επηρεάσουν τη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου των καρβαπενεμασών (Majiduddin & Palzkill, 2005).

Από τον προσδιορισμό των κρυσταλλικών δομών των ενζύμων SME-1, NMC-A και SHV-38 φάνηκε ότι οι β-λακταμάσες τάξης Α διαθέτουν παρόμοια κρυσταλλική δομή (Swarén *et al*, 1998, Kuzin *et al*, 1999, Sougakoff *et al*, 2002).

Σε αντίθεση με τις άλλες β-λακταμάσες τάξης Α, η SME-1 δεν διαθέτει στο ενεργό της κέντρο το μόριο νερού, το οποίο συνήθως φέρουν οι β-λακταμάσες τάξης Α πλησίον της θέσης σύνδεσης του υποστρώματος μεταξύ της Ser^{70} και της Glu^{166} (Sougakoff *et al*, 2002). Το εν λόγω μόριο νερού λειτουργεί συνήθως σαν παράγοντας απακετυλίωσης, ωστόσο τη συγκεκριμένη λειτουργία στην SME-1 πιστεύεται ότι επιτελεί ένα άλλο μόριο νερού που βρίσκεται στην οξυανιονική οπή του συγκεκριμένου ενζύμου (Sougakoff *et al*, 2002).

Στην καρβαπενεμάση SME-1, το αμινοξύ His^{105} βρίσκεται εντός του ενεργού κέντρου και σχετίζεται με την πρόσδεση των β-λακταμικών αντιβιοτικών στο εν λόγω ένζυμο (Sougakoff *et al*, 2002). Το συγκεκριμένο αμινοξικό κατάλοιπο στην καρβαπενεμάση SME-3 έχει αντικατασταθεί με μια τυροσίνη, με αποτέλεσμα μέτριες μεταβολές σε ορισμένες in vitro κινητικές παραμέτρους του ενζύμου αυτού, ειδικά όσον αφορά την ιμιπενέμη.

Το αμινοξικό κατάλοιπο Ser^{237} στην καρβαπενεμάση SME-1 συμμετέχει σημαντικά στην καταλυτική δράση του ενζύμου αυτού, καθώς σταθεροποιεί τη δομή του ενζύμου σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου με την Arg^{220} (Sougakoff *et al*, 1999, Sougakoff *et al*, 2002). Η

αντικατάσταση της Ser^{237} με μια αλανίνη, της οποίας η πλευρική αλυσίδα αδυνατεί να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου, έχει σαν αποτέλεσμα την πενταπλάσια μείωση της k_{cat} για την ιμιπενέμη (Sougakoff *et al*, 1999).

Από την κρυσταλλική δομή της καρβαπενεμάσης NMC-A διαπιστώθηκε ότι η απόσταση μεταξύ των καταλοίπων Ser^{237} και Glu^{166} είναι μεγαλύτερη από αυτή στην καρβαπενεμάση SME -1 γεγονός που επιτρέπει την πρόσδεση του μορίου νερού στο καταλυτικό κέντρο του εν λόγω ενζύμου (Sougakoff *et al*, 2002). Σε σχέση με άλλες β-λακταμάσες τάξης A άνευ δραστικότητας έναντι των καρβαπενέμων, η καρβαπενεμάση NMC-A φέρει μια μετατόπιση στην Asn^{132} του συντηρημένου μοτίβου SDN των β-λακαταμασών καθώς και στα αμινοξικά κατάλοιπα των θέσεων 237 έως 240 που βρίσκονται πλησίον του συντηρημένου μοτίβου KTG των β-λακαταμασών (Swarén *et al*, 1998).

Μεταξύ των ενζύμων τύπου GES, η αντικατάσταση της Gly^{170} σε σερίνη φαίνεται να είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη δραστικότητας έναντι των καρβαπενέμων, ωστόσο δεν είναι γνωστό πως η αντικατάσταση αυτή επηρεάζει τον καταλυτικό μηχανισμό των εν λόγω ενζύμων. Είναι πιθανό η πλευρική αλυσίδα του καταλοίπου σερίνης να δημιουργεί νέους δεσμούς υδρογόνου εντός του ενεργού κέντρου των ενζύμων αυτών, με αποτέλεσμα την ικανότητα υδρόλυσης των καρβοπενέμων. Ωστόσο, η άποψη αυτή μένει να επιβεβαιωθεί από τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής των καρβαπενεμασών τύπου GES που αναμένεται σύντομα (Bae *et al*, 2007).

Το ένζυμο SHV-38 διαφέρει από την στενού φάσματος πενικιλινάση SHV-1 μέσω της αντικατάστασης της Ala^{146} σε βαλίνη (Kuzin *et al*, 1999). Εξαιτίας του μεγάλου μεγέθους αλλά και του πιο υδρόφοβου χαρακτήρα της πλευρικής αλυσίδας της βαλίνης, η αντικατάσταση αυτή πιθανώς επάγει δομικές αλλαγές στην καρβαπενεμάση SHV-38, με αποτέλεσμα την ικανότητα εισόδου και υδρόλυσης των καρβαπενέμων στο ενεργό κέντρο του εν λόγω ενζύμου.

Εκτός από τον προαναφερθέντα δυσουλφιδικό δεσμό, δεν έχουν καταγραφεί μεγάλες δομικές διαφορές μεταξύ των καρβαπενεμασών τάξης A και των υπολοίπων β-λακταμασών της τάξης αυτής. Ως εκ τούτου, είναι πιθανών ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ συγκεκριμένων αμινοξικών καταλοίπων που ευθυγραμμίζουν το ενεργό κέντρο των ενζύμων αυτών, επιφέρουν τη χωρική και μηχανιστική βάση για την υδρόλυση των καρβαπενέμων.

1.2.3 Καρβαπενεμάσες Τάξης Β

Ο όρος καρβαπενεμάσες τάξης Β κατά Ambler αφορά τις μέταλλο-β-λακταμάσες (MBLs), οι οποίες είναι β-λακταμάσες με ικανότητα υδρόλυσης των καρβαπενέμων, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Οι μέταλλο-β-λακταμάσες, όπως όλες οι β-λακταμάσες, διακρίνονται στις χρωμοσωμικά κωδικοποιούμενες και σε εκείνες που κωδικοποιούνται από μεταβιβάσιμα γονίδια. Οι πρώτες μελέτες σχετικά με τις χρωμοσωμικά κωδικοποιούμενες μέταλλο-β-λακταμάσες επικεντρώθηκαν στον *Bacillus cereus* (BC II) και στη *Stenotrophomonas maltophilia* (L1) (Lim *et al*, 1988, Walsh *et al*, 1994). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια εξαιτίας της ανάπτυξης της τεχνολογίας της πλήρους χαρτογράφησης των γονιδιωμάτων, ανακαλύπτονται ολοένα και περισσότερες χρωμοσωμικά κωδικοποιούμενες μέταλλο-β-λακταμάσες, οι περισσότερες εκ των οποίων βρίσκονται σε βακτήρια μη κλινικού ενδιαφέροντος (Naas *et al*, 2003, Simm *et al*, 2001).

Την τελευταία εικοσαετία, δημοσιεύτηκαν αρκετά άρθρα σχετικά με την παρουσία μέταλλο-β-λακταμασών στους βακτηριακούς πληθυσμούς (Payne, 1993, Walsh *et al*, 2005). Στην εν λόγω περίοδο, ανακαλύφθηκαν και μελετήθηκαν νέες μέταλλο-β-λακταμάσες κωδικοποιούμενες από μεταβιβάσιμα γονίδια, οι οποίες εμφανίζονται να είναι ταχέως διασπειρόμενες μεταξύ των βακτηριακών πληθυσμών. Σε αρκετές χώρες, η *P. aeruginosa* αποτελεί το 20% όλων των νοσοκομειακών στελεχών που παράγουν μέταλλο-β-λακταμάσες, ενώ σε άλλες το ποσοστό αυτό είναι ακόμη συγκριτικά χαμηλό (Lee *et al*, 2003, Gales *et al*, 2003). Τελευταία παρατηρείται διασπορά γονιδίων των μέταλλο-β-λακταμασών από τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό σε άλλα βακτηριακά είδη κυρίως της οικογένειας των *Enterobacteriaceae* και αυτό αποτελεί μείζον πρόβλημα στη κλινική θεραπευτική πράξη. Τέλος, εξαιτίας του γεγονότος ότι οι μέταλλο-β-λακταμάσες δύναται να υδρολύουν όλες τις β-λακτάμες και ότι είμαστε ακόμη αρκετά χρόνια μακριά από την εύρεση και την εφαρμογή ενός θεραπευτικού αναστολέα των εν λόγω ενζύμων, η συνεχιζόμενη σε παγκόσμια κλίμακα διασπορά τους θα μπορούσε να θεωρηθεί ακραίως απειλητική.

1.2.3.1 Ταξινόμηση Καρβαπενεμασών Τάξης Β

Οι μεταλλο-β-λακταμάσες αρχικώς ταξινομήθηκαν επίσημα στην κατηγορία των σερινο-β-λακταμασών το 1980, βάση του ταξινομικού συστήματος που πρότεινε ο Ambler (Ambler,

1980). Μέχρι εκείνη τη στιγμή, ελάχιστες μεταλλο-β-λακταμάσες είχαν μελετηθεί επαρκώς, εκ των οποίων η L1 από τη *S. maltophilia* και η BCII από τον *B.cereus*. Το 1989 ο Bush ταξινόμησε τις μεταλλο-β-λακταμάσες σε μια ξεχωριστή ομάδα (ομάδα 3) σύμφωνα με τις λειτουργικές ιδιότητές τους και πρότεινε ένα γενικό σύστημα ταξινόμησης των β-λακταμασών (Bush, 1989). Το εν λόγω σχήμα βασίζονταν κυρίως στο προφίλ των υποστρωμάτων των συγκεκριμένων ενζύμων (κυρίως στην υδρόλυση της ιμιπενέμης), στην ευαισθησία των ενζύμων αυτών στο EDTA και στην έλλειψη αναστολής από τους συνήθεις αναστολείς των σερινο-β-λακταμασών. Το σχήμα αυτό αναθεωρήθηκε το 1995 και τροποποιήθηκε περεταίρω το 1997 και να συμπεριλάβει τον αυξανόμενο αριθμό των ενζύμων της ομάδας 3 που ανακαλύπτονταν (Bush *et al*, 1995, Rasmussen & Bush, 1997). Εκείνη την περίοδο, δύο μόνο τύποι επίκτητων μεταλλο-β-λακταμασών είχαν ανακαλυφθεί και μελετηθεί, η CcrA από το *B. fragilis* και η IMP-1 από την *P.aeruginosa*.

Όλες οι μεταλλο-β-λακταμάσες υδρολύουν την ιμιπενέμη αλλά τόσο η υδρολυτική τους ικανότητά όσο και η ταχύτητα υδρόλυσης τους ποικίλουν, με αποτέλεσμα η ανθεκτικότητα των βακτηρίων που τις φέρουν έναντι των καρβαπενέμων να ποικίλει αντίστοιχα (Massidda *et al*, 1991). Συνεπώς, βάση αυτού του χαρακτηριστικού, τα ένζυμα αυτά δύναται να ταξινομηθούν περεταίρω σε υποομάδες (Rasmussen & Bush, 1997). Ουσιαστικά, η ομάδα 3a διαθέτει ένα ευρύ φάσμα δραστικότητας, η ομάδα 3b διαθέτει μια μεγαλύτερη συγγένεια για τις καρβαπενέμες και η ομάδα 3c υδρολύει τις καρβαπενέμες ανεπαρκώς σε σύγκριση με τα άλλα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Ωστόσο, τα ένζυμα αυτά διαθέτουν ένα κοινό χαρακτηριστικό, δηλαδή αναστέλλονται καθολικά από το EDTA καθώς και από άλλους χηλικούς παράγοντες δισθενών κατιόντων γεγονός που σχετίζεται με τη μηχανιστική λειτουργία των μεταλλο-β-λακταμασών (Rasmussen & Bush, 1997).

Σε μοριακό επίπεδο, οι μεταλλο-β-λακταμάσες αποτελούν μια ανομοιόμορφη ομάδα πρωτεϊνών, γεγονός που καθιστά την ταξινόμησή τους σχεδόν αδύνατη. Παρ' όλα αυτά, έχουν γίνει προσπάθειες υποταξινόμησης των ενζύμων της τάξης B, βάση της ομοιότητας στην νουκλεοτιδική αλληλουχία αλλά και των δομικών χαρακτηριστικών τους (Rasmussen & Bush, 1997). Το φυλογενετικό δέντρο που παρατίθεται παρακάτω (Εικόνα 1.3) απεικονίζει τη συγγένεια των ενζύμων αυτών βάση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τους. Η υποτάξη B1 περιλαμβάνει ένζυμα που φέρουν 3 κατάλοιπα ιστιδίνης και ένα κατάλοιπο κυστεΐνης που αλληλεπιδρούν με τα ιόντα ψευδαργύρου και φιλοξενεί τις μεταβιβάσιμες μεταλλο-β-

λακταμάσες IMP, VIM, GIM και SPM-1. Η υποτάξη B2 περιλαμβάνει τα ένζυμα εκείνα που διαθέτουν ένα κατάλοιπο ασπαραγγίνης αντί ιστιδίνης στην πρώτη θέση του κύριου μοτίβου πρόσδεσης του ψευδαργύρου, NXHXD, και προέρχονται από την β-λακταμάση SFH-1 που απαντάται στην *S. fonticola* και στα είδη του γένους *Aeromonas*. Τέλος, η μεταλλο-β-λακταμάση L1 είναι το μοναδικό ένζυμο της υποτάξης B3, καθώς είναι το μοναδικό ένζυμο μεταξύ όλων των β-λακταμασών, το οποίο δρα ως τετραμερές (Quiroga *et al*, 2000).

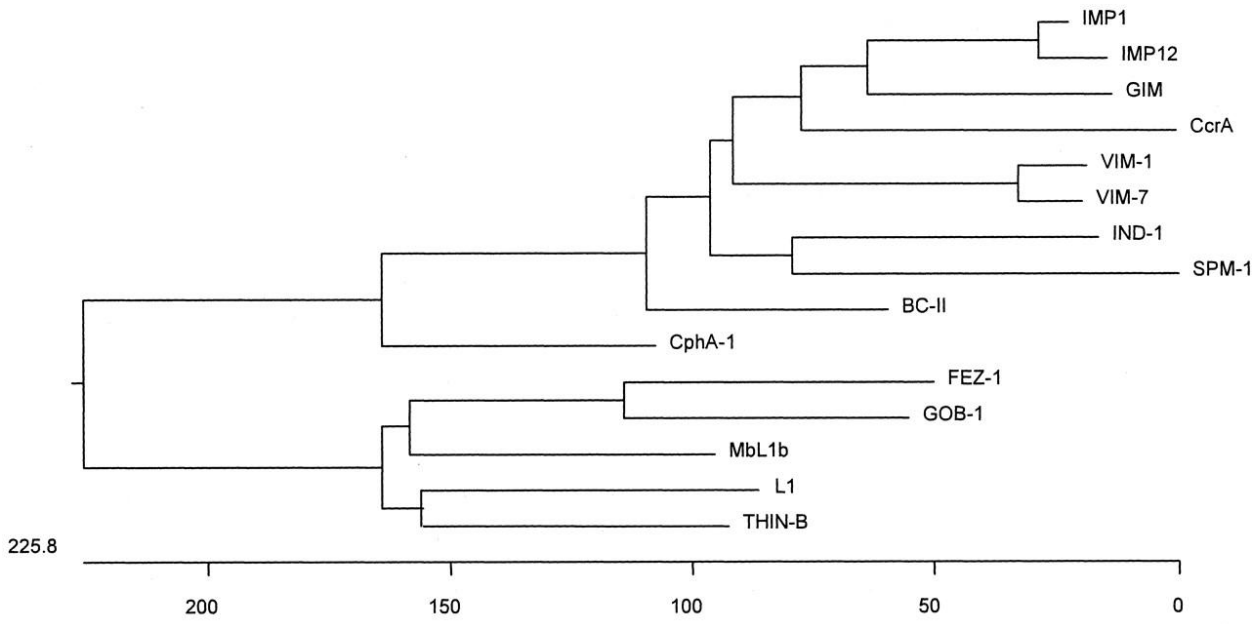
Η ταξινόμηση των μεταλλο-β-λακταμασών προτάθηκε βάση του αριθμητικού συστήματος ταξινόμησης των β-λακταμασών της τάξης A, ωστόσο, τα ένζυμα της τάξης B χαρακτηρίζονται από μεγάλη ετερογένεια εξ αιτίας της μεταβλητότητας κυρίως στον αριθμό των αμινοξέων τους (Galleni *et al*, 2001). Έτσι, το εν λόγω αριθμητικό σύστημα ταξινόμησης βασίζεται κυρίως στα κατάλοιπα που αποτελούν το σημείο σύνδεσης με τον ψευδάργυρο και αναθεωρήθηκε σχετικά πρόσφατα ώστε να φιλοξενήσει τις νεοανακαλυφθέντες μεταλλο-β-λακταμάσες (Toleman *et al*, 2002, Garau *et al*, 2004).

1.2.3.2 Χρωμοσωμικές Καρβαπενεμάσες Τάξης B

Αρκετά βακτήρια, από περιβαλλοντικά ενδιαιτήματα, φέρουν μέταλλο-β-λακταμάσες αν και δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως ο λόγος ύπαρξης τους στα συγκεκριμένα βακτήρια. Πιστεύεται ότι για ένα σημαντικό χρονικό διάστημα, τα εν λόγω βακτήρια εκτέθηκαν σε β-λακτάμες ή ενώσεις που προσομοιάζουν δομικά με β-λακτάμες με αποτέλεσμα να αποκτήσουν και να διατηρήσουν τα γονίδια αυτά καθώς και τα προϊόντα που κωδικοποιούν. Άλλοι ερευνητές πιστεύουν ότι αυτά τα ένζυμα αυτά εμπλέκονται σε μια φυσιολογική κυτταρική λειτουργία, που όμως δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Ανεξάρτητα από την ισχύουσα θεωρία για την ύπαρξη τους, ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων μέταλλο-β-λακταμασών είναι επαγώγιμα και η πλειοψηφία των βακτηρίων που τα φέρουν είναι ή δύναται να γίνουν εξαιρετικά ανθεκτικά στις β-λακτάμες.

Ευτυχώς, αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι ευκαιριακά παθογόνα και εξαιρουμένων της *S. maltophilia* και του *Bacillus anthracis*, σπάνια προκαλούν σοβαρές λοιμώξεις. Βακτήρια, επί παραδείγματι, που φέρουν χρωμοσωμικά κωδικοποιούμενες μέταλλο-β-λακταμάσες είναι το *B. cereus* (BCII), το *Bacillus anthracis* (Bla2), η *S. maltophilia* (L1), η *Aeromonas hydrophilia* (CphA), το *Chryseobactenium meningosepticum* (BlaB ή GOB-1), το *Chryseobacterium indologenes* (IND-1), η *Legionella gormannii* (FEZ-1), το *Caulobacter crescentus* (Mbl1B), το

Janthinobacterium lividium (THIN-B), το *Flavobacterium johnsoniae* (JOHN-1), η *S. fonticola* (SFH-1) και κάποια είδη του γένους Myroides (TUS-1, MUS-1) (Walsh *et al*, 2005).



Εικόνα 1.3. Φυλογενετικό δέντρο χρωμοσωμικά κωδικοποιούμενων μέταλλο-β-λακταμασών με τη μέθοδο neighbor joining (Τα αλληλόμορφφα των μη χρωμοσωμικά κωδικοποιούμενων μέταλλο-β-λακταμασών τύπου IMP και VIM προστέθηκαν επίσης για σύγκριση) (Walsh *et al*, 2005).

Γενικά, οι χρωμοσωμικές μέταλλο-β-λακταμάσες από στελέχη ενός συγκεκριμένου είδους ή γένους διαφέρουν ελάχιστα μεταξύ των στελεχών αυτών. Η πιο αξιοσημείωτη εξαίρεση σε αυτό είναι οι μέταλλο-β-λακταμάσες από στελέχη του είδους *C. meningosepticum*, όπου τα ένζυμα GOB και BlaB διαφέρουν σημαντικά (11% ταυτότητα) και κατά συνέπεια έχουν διαιρεθεί σε διακριτές υποκατηγορίες (Rossolini *et al*, 1999). Οι χρωμοσωμικές μέταλλο-β-λακταμάσες συχνά συνεκφράζονται με σερινο-β-λακταμάσες (ένζυμα τάξης A). Η *A. hydrophilia* και η *Aeromonas veronii*, για παράδειγμα, παράγουν τρεις β-λακταμάσες, μια πενικιλλινάση, μια κεφαλοσπορινάση και μια μέταλλο-β-λακταμάση, οι οποίες υπερεκφράζονται όταν γίνει επιλογή στελεχών με μεταλλάξεις που κωδικοποιούν υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα στα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και στη *S. maltophilia* όπου η υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητα στους β-λακταμικούς παράγοντες οφείλεται κυρίως σε υπερέκφραση της L1 χρωμοσωμικής μέταλλο-β-λακταμάση και του χρωμοσωμικού ενζύμου L2 της τάξης A (Walsh *et al*, 1997). Η εν λόγω υπερπαραγωγή συνήθως συμβαίνει σε συχνότητα 1 στα 10^5 έως 10^7 και μπορεί να συμβεί in vivo κατά τη διάρκεια της θεραπείας με β-λακταμικά (Walsh *et al*, 1997).

1.2.3.3 Επίκτητες Καρβαπενεμάσες Τάξης Β

Σε αντίθεση με τις χρωμοσωμικές μέταλλο-β-λακταμάσες υπάρχει μια δραματική αύξηση στην ανίχνευση και στη γεωγραφική διασπορά των επίκτητων και μεταβιβάσιμων μέταλλο-β-λακταμασών. Οι πιο κοινές οικογένειες των εν λόγω καρβαπενεμασών περιλαμβάνουν τις καρβαπενεμάσες των τύπων IMP, VIM, SPM και GIM των οποίων τα γονίδια εντοπίζονται επί ιντεγκρονίων ως στοιχειά πολυγονιδιακών κασετών (Walsh *et al,* 2005).

Μεταξύ των β-λακταμασών που προκαλούν αντοχή στους β-λακταμικούς παράγοντες, οι μέταλλο-β-λακταμάσες είναι οι πλέον απειλητικές διότι υδρολύουν όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά (πενικιλλίνες, κεφαλοσπορίνες, κεφαμυκίνες, καρβαπενέμες) εκτός από την αζτρεονάμη. Τα ένζυμα αυτά δεν αναστέλλονται από τους αναστολείς των β-λακταμασών (κλαβουλανικό, σουλμπακτάμη, ταζομπακτάμη), αναστέλλονται όμως από τη χηλική ουσία EDTA η οποία δεσμεύει τα δισθενή ιόντα Zn^{2+} και άλλα δισθενή κατιόντα. Ενώ οι καρβαπενεμάσες κλάσης A αναστέλλονται από τους αναστολείς των β-λακταμασών και οι καρβαπενεμάσες κλάσης D εμφανίζουν ποικίλη αναστολή, καμία από τις παραπάνω δεν αναστέλλεται από το EDTA (Walsh *et al,* 1997).

Η κλινική χρησιμότητα των καρβαπενεμών απειλείται από την εμφάνιση των επίκτητων μεταλλο-β-λακταμασών. Η διασπορά των εν λόγω β-λακταμασών αποτελεί μια από τις μεγαλύτερες απειλές για τη δημόσια υγεία, καθώς οι καρβαπενέμες αποτελούν εφεδρεία για τη θεραπεία σοβαρών λοιμώξεων από Gram αρνητικά βακτήρια, και ιδιαίτερα των προκαλούμενων από τα είδη *P. aeruginosa, A. baumannii* και *K. pneumoniae* (Payne, 1993).

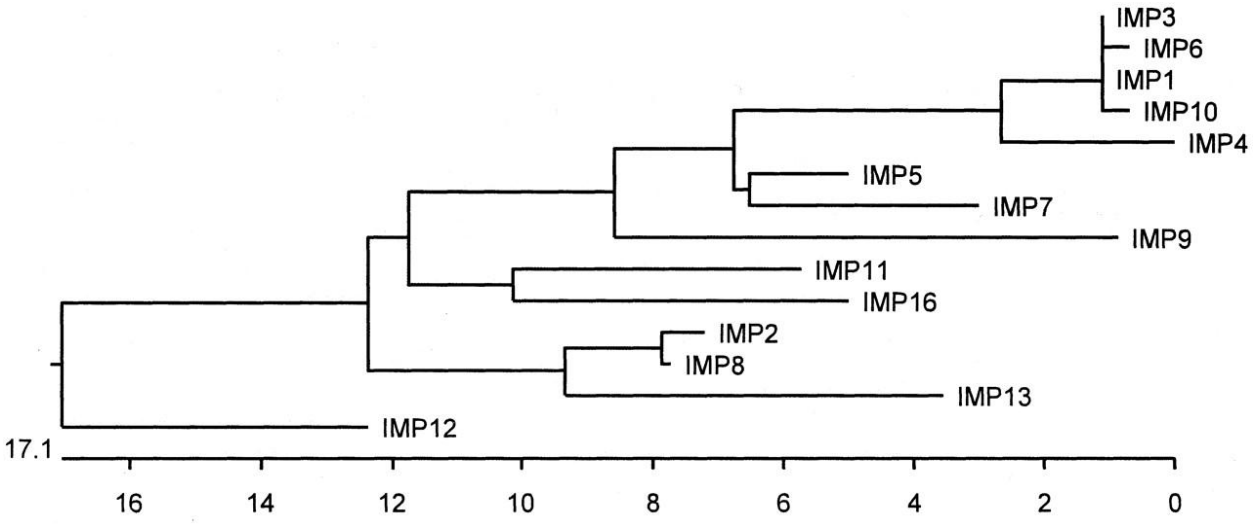
1.2.3.3.1 Καρβαπενεμάσες Τύπου IMP

Η πρώτη ένδειξη για την ύπαρξη επίκτητων μέταλλο-β-λακταμασών ήρθε με την απομόνωση τους στελέχους *P. aeruginosa* GN17203 στην Ιαπωνία το 1988 (Watanabe *et al,* 1991). Το εν λόγω στέλεχος χαρακτηρίζονταν από ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) στην ιμιπενέμη ίση με 50 μg/ml, καθώς και από ανθεκτικότητα έναντι των ευρέος φάσματος κεφαλοσπορινών (MIC>400 μg/ml). Το υπεύθυνο για την ανθεκτικότητα γονίδιο, γνωστό πλέον ως IMP-1, βρέθηκε να εδράζεται επί ενός μεταφερόμενου πλασμιδίου. Τρία χρόνια αργότερα, το γονίδιο IMP-1 βρέθηκε στο στέλεχος *S. marcescens* Tn9106 που απομονώθηκε στο νοσοκομείο

Aichi στο Οκαζάκι της Ιαπωνίας από ασθενή με ουρολοίμωξη (Osano *et al,* 1994). Δυο χρόνια αργότερα, το γονίδιο IMP-1 βρέθηκε να εδράζεται επί ενός πλασμιδίου 120 kb εντός ενός ιντεγκρονίου τάξης 3 σε ένα στέλεχος *S. marcescens* που απομονώθηκε σε διπλανή από το Οκαζάκι πόλη (Arakawa *et al,* 1995).

Σε μια άλλη μελέτη από επτά γενικά νοσοκομεία της Ιαπωνίας που διενεργήθηκε το 1993 απομονώθηκαν τέσσερα στελέχη *S. marcescens* που έφεραν το γονίδιο IMP-1 (Ito *et al,* 1995). Σε μια περαιτέρω παν-ιαπωνική μελέτη απομονώθηκαν 3.700 στελέχη *P. aeruginosa* που συλλεχθέντα μεταξύ των ετών 1992 και 1994 από 17 γενικά νοσοκομεία, εκ των δεκαπέντε στελέχη από πέντε νοσοκομεία από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές βρέθηκαν θετικά για το εν λόγω γονίδιο (Senda *et al,* 1996). Σε μεταγενέστερη μελέτη 54 στελεχών ανθεκτικών στη κεφταζιδίμη (MIC> 128 mg/l) από 18 νοσοκομεία της Ιαπωνίας, ανιχνεύθηκαν 22 επιπλέον IMP-1 θετικά στελέχη με PCR (Senda *et al,* 1996). Αυτά τα θετικά στελέχη περιελάμβαναν εννέα στελέχη *S. marcescens*, δύο στελέχη *Achromobacter xylosoxidans,* ένα στέλεχος *Pseudomonas putida* και ένα στέλεχος *K. pneumoniae*. Η ανίχνευση με PCR του γονιδίου intI3 στα 33 από τα 42 (78,5%) IMP-θετικά στελέχη, υποδεικνύει τη πιθανή συμμετοχή των ιντεγκρονίων τάξης 3 στη διασπορά του γονιδίου IMP-1. Τέλος, από Ιαπωνικές μελέτες έχει βρεθεί η μεγάλη διασπορά γονιδίων μέταλλο-β-λακταμασών κυρίως εδραζόμενα επί ιντεγκρονίων τάξης 3 σε 16 διαφορετικά είδη Gram αρνητικών βακτηρίων (Shibata *et al,* 2003).

Κατά τη διάρκεια μιας μελέτης σε κλινικά στελέχη *Shigella flexneri, S. marcescens, P. aeruginosa* και *Alcaligenes spp*. για την παρουσία μέταλλο-β-λακταμασών, βρέθηκαν τρία αλληλόμορφα του γονιδίου IMP-1, τα οποία είναι πλέον γνωστά ως IMP-3, IMP-6 και IMP-10 (Iyobe *et al,* 2000, Yano *et al,* 2001, Iyobe *et al,* 2002). Το γονίδιο IMP-3 φέρει δύο αμινοξικές μεταλλαγές σε σχέση με το IMP-1 και βρέθηκε σε ένα στέλεχος *S. flexneri*. Γενετικές και κινητικές μελέτες του γονίδιου IMP-3 απέδειξαν ότι η αντικατάσταση στη θέση 196 από γλυκίνη σε σερίνη είχε ως αποτέλεσμα την μειωμένη υδρολυτική ικανότητα του εν λόγω ενζύμου έναντι των πενικιλινών (Iyobe *et al,* 2000). Αυτή η ίδια αμινοξική μεταλλαγή παρατηρείται και στο γονίδιο IMP-6, η οποία εκτός από μειωμένη υδρολυτική ικανότητα έναντι της πενικιλλίνης G και της πιπερακιλλίνης επιφέρει, επίσης, υψηλότερο επίπεδο υδρόλυσης της μεροπενέμης σε σχέση με την ιμιπενέμη, σε αντίθεση με τη καρβαπενεμάση IMP-1 (Yano *et al,* 2001).



Εικόνα 1.4. Φυλογενετικό δέντρο των κυριότερων μέταλλο-β-λακταμασών τύπου IMP με τη μέθοδο neighbor joining (Walsh *et al*, 2005).

Η καρβαπενεμάση IMP-10 ανακαλύφθηκε κατά τη διάρκεια μιας μελέτης στελεχών *P. aeruginosa* και *Alcaligenes spp*. που παρήγαγαν IMP μεταλλο-β-λακταμάσες απομονωθέντα από το 1995 έως 2001 (Iyobe *et al*, 2002). Η θέση της νουκλεοτιδικής μεταλλαγής που βρέθηκε τόσο στην IMP-3 όσο και στην IMP-6 αντιστοιχεί στο ίδιο αμινοξύ (γλυκίνη), όπως και σε άλλες χρωμοσωμικές μεταλλο-β-λακταμάσες (π.χ BCII), καταδεικνύοντας ότι η IMP-3 πιθανώς να είναι η προγονική μεταλλο-β-λακταμάση τύπου IMP και όχι μια απλή παραλλαγή της IMP-1 (Iyobe *et al*, 2000). Το γονίδιο της IMP-10 βρέθηκε να εδράζεται επί ενός πλασμιδίου σε ένα στέλεχος *P. aeruginosa*, αλλά επίσης και επί του χρωμοσώματος σε ένα στέλεχος *P. aeruginosa* και σε ένα στέλεχος *Achromobacter xylosoxidans*. Το γονίδιο της IMP-10 διαφέρει από αυτό της IMP-1 σε μια νουκλεοτιδική βάση, η οποία είναι υπεύθυνη για την αλλαγή από τη φαινυλαλανίνη σε βαλίνη στη θέση 49. Η εν λόγω μεταλλαγή έχει σαν αποτέλεσμα την αξιοσημείωτη μείωση της υδρολυτικής ικανότητας της IMP-10 έναντι των πενικιλλινών αλλά δεν επιφέρει μεταβολή της υδρολυτικής ικανότητας έναντι των καρβαπενέμων (Iyobe *et al*, 2000).

Η πεποίθηση ότι τα μεταβιβάσιμα γονίδια των μεταλλο-β-λακταμασών ήταν μόνο ένα μακρινό ιαπωνικό πρόβλημα αναιρέθηκε με την έλευση του γονιδίου IMP-2 το 1997 και του γονιδίου IMP-5 το 1998 στην Ιταλία και την Πορτογαλία, αντίστοιχα (Crowder *et al*, 1996, Cornaglia *et al*, 1999). Μεταγενέστερες μελέτες σχετικά με τα γονίδια τύπου IMP περιγράφουν λεπτομερώς τη χρωμοσωμική τους εντόπιση καθώς και τις λεπτομέρειες του γενετικού περιβάλλον τους

(Riccio *et al*, 2000). Οι καρβαπενεμάσες IMP-2 και IMP-5 φέρουν μεταλλαγές σε 36 και 17 αμινοξέα αντίστοιχα σε σχέση με την IMP-1 και διαφέρουν επίσης όσο αναφορά στο γενετικό περιβάλλον εκατέρωθεν των γονιδίων αυτών (Riccio *et al*, 2000).

Έπειτα από τις προαναφερθείσες μελέτες, δύο άλλες παραλλαγές μεταλλο-β-λακταμασών τύπου IMP περιγράφηκαν από την Ιταλία. Η IMP-12 βρέθηκε το 2000 επί ενός μη μεταφερόμενου πλασμιδίου (50 kb) από ένα κλινικό στέλεχος *P. putida* (Docquier *et al*, 2003). Η μεταλλο-β-λακταμάση IMP-12 είναι εξαιρετικά αποκλίνουσα από την IMP-1, φέροντας μεταλλαγές σε 36 αμινοξέα και εμφανίζοντας χαμηλή υδρολυτική ικανότητα έναντι των πενικιλλινών. Η IMP-13 βρέθηκε επί του χρωμοσώματος ενός κλινικού στελέχους *P. aeruginosa* και διέφερε σε 19 αμινοξέα σε σχέση με την IMP-1 (Toleman *et al*, 2003). Το γονίδιο της IMP-13 βρέθηκε έπειτα επί ενός πλασμιδίου και σχετίστηκε με μια μικρή επιδημία σε νοσοκομείο της Νότιας Ιταλίας (Migliavacca *et al*, 2004).

Οι διαφορές μεταξύ των ευρωπαϊκών μεταλλο-β-λακταμασών τύπου IMP και εκείνων από τη Νοτιοανατολική Ασία δεν επιτρέπουν να θεωρηθεί πιθανή η παγκόσμια διάδοση των γονιδίων IMP από την Ιαπωνία, αλλά καταδεικνύουν την τοπική εμφάνιση των γονιδίων αυτών. Ωστόσο, η IMP-1, πρόσφατα, απομονώθηκε από στελέχη *Acinetobacter junii* και *A. baumannii* στην Αγγλία (Towner *et al*, 2002, Tysall *et al*, 2002). Η μεταλλο-β-λακταμάση IMP-1 του στελέχους *A. junii* παρ' ότι δεν εμφανίζει αμινοξικές μεταλλαγές σε σχέση με την IMP-1 από τα ιαπωνικά στελέχη, εμφανίζει σιωπηλές μεταλλαγές σε νουκλεοτιδικό επίπεδο (Tysall *et al*, 2002). Το στέλεχος *A. baumannii* απομονώθηκε από μια γυναίκα που είχε βρεθεί πρόσφατα για διακοπές στην Ισπανία και νοσηλεύτηκε για 4 εβδομάδες σε νοσοκομείο εκεί, προτού μεταφερθεί στη Βρετανία, με αποτέλεσμα η καταγωγή του ανθεκτικού αυτού στελέχους και γενετικές του λεπτομέρειες δεν εξακριβώθηκαν πλήρως (Towner *et al*, 2002).

Αναδρομικές μελέτες για ανθεκτικά στελέχη που είχαν ήδη συλλεχθεί από το 1994 στο Χονγκ Κονγκ και από το 1995 στον Καναδά, κατέδειξαν ότι η ανθεκτικότητα έναντι των καρβαπενέμων οφείλονταν στην παρουσία της IMP-7 (*P. aeruginosa*) στον Καναδά και της IMP-4 (*Acinetobacter spp*.) στο Χονγκ Κονγκ (Chu *et al*, 2001, Gibb *et al*, 2002). Συγκεκριμένα, η μεταλλο-β-λακταμάση IMP-4 ανιχνεύθηκε στο 66% των ιμιπενέμη ανθεκτικών στελεχών μεταξύ των ετών 1994 έως 1998 στο νοσοκομείο Prince of Wales στο Χονγκ Κονγκ (Chu *et al*, 2001). Η εν λόγω μεταλλο-β-λακταμάση έφερε μεταλλαγές σε 10 και 37 αμινοξέα σε σχέση με τις IMP-1 και IMP-2, αντίστοιχα. Το γονίδιο της IMP-4 βρέθηκε εντός ενός

ιντεγκρονίου κωδικοποιούμενο μαζί με άλλα τρία γονίδια ανθεκτικότητας (qacG2, aacA4 και catB3), το οποίο εδράζονταν επί ενός πλασμιδίου (Houang *et al*, 2003). Στελέχη του γένους Acinetobacter που έφεραν την IMP-4 απομονώνονταν από το 1997 έως και το 1998 σε ποσοστό 14% επί του συνόλου των στελεχών του γένους Acinetobacter, ωστόσο από το 1999 αυτά τα στελέχη εξαφανίστηκαν αλλά οι λόγοι για αυτό δεν είναι σαφής (Houang *et al*, 2003). Έπειτα, η μεταλλο-β-λακταμάση IMP-4 βρέθηκε σε στελέχη *Citrobacter youngae* και *P. aeruginosa* απομονωθέντα από το Guangzhou στην ηπειρωτική Κίνα. Το Guangzhou βρίσκεται πλησίον του Χονγκ Κονγκ, γεγονός που υποδηλώνει την τοπική εξάπλωση του γονιδίου της IMP-4 (Hawkey *et al*, 2001). Σήμερα, η IMP-4 ανιχνεύεται σε στελέχη *E. coli, K. pneumoniae* και *P. aeruginosa* απομονωθέντα από την Αυστραλία, που ενδεχομένως εισήχθηκαν από την Νοτιοανατολική Ασία (Poirel *et al*, 2004).

Η μεταλλο-β-λακταμάση IMP-7 σχετίστηκε με μία επιδημία στελεχών *P. aeruginosa* σε δυο νοσοκομεία του Καναδά (Gibb *et al*, 2002). Το γονίδιο της IMP-7 βρέθηκε στην τρίτη θέση της γονιδιακής συστοιχίας ενός ιντεγκρονίου που κωδικοποιούσε επίσης και γονίδια ανθεκτικότητας έναντι των αμινογλυκοσίδων (ORF1, aacC4 και aacC1) (Gibb *et al*, 2002). Εν συνεχεία, η εν λόγω μεταλλο-β-λακταμάση ανιχνεύθηκε το 1999 σε ένα ανθεκτικό στις καρβαπενέμες στέλεχος *P. aeruginosa* που απομονώθηκε στη Μαλαισία (Ho *et al*, 2002). Περαιτέρω μελέτες σε θετικά για μεταλλο-β-λακταμάσες στελέχη απομονωθέντα από την Ιαπωνία κατέδειξαν ότι υπάρχουν πολύ λίγα στοιχεία σχετικά με την εξάπλωση αυτών των γονιδίων ανθεκτικότητας από την Ιαπωνία. Στην Ταϊβάν, βρέθηκε η μεταλλο-β-λακταμάση IMP-8 σε ένα και μόνο νοσοκομείο, με το γονίδιο της εν λόγω καρβαπενεμάσης να εδράζεται επί ενός ιντεγκρονίου μετά από το γονίδιο aacA4 σε ένα στέλεχος *K. pneumonia*e που απομονώθηκε το 1998 (Yan *et al*, 2001). Η IMP-8 είναι συγγενικά κοντύτερα με την IMP-2 (2 αμινοξικές μεταλλαγές) από ότι με την IMP-1, γεγονός που υποδεικνύει ότι δεν υπάρχει σαφής σύνδεση των στελεχών αυτών με τα ιαπωνικά στελέχη που φέρουν την IMP-1. Επιπροσθέτως, μελέτες υβριδισμού με ειδικούς ανιχνευτές για το γονίδιο της IMP-8 απέδειξαν την παρουσία του συγκεκριμένου γονιδίου στο 28,5% των ανθεκτικών στην κεφταζιδίμη στελεχών *K. pneumoniae* που απομονώθηκαν από το 1999 έως το 2000 (Yan *et al*, 2001).

Επίσης, ανιχνευτές για το γονίδιο της IMP-8 χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη 9.082 στελεχών της οικογένειας των Enterobacteriaceae, όπου βρέθηκε ότι 36 από τα 1.261 στελέχη *Enterobacter cloacae* ήταν θετικά (Yan *et al*, 2002). Σχετικά πρόσφατα μεταλλο-β-λακταμάσες

τύπου IMP αναφέρθηκαν από τη Σιγκαπούρη και την Κορέα. Συγκεκριμένα, στελέχη *K. pneumoniae* που παρήγαγαν IMP-1 αναφέρθηκαν σε μεγάλο τριτοβάθμιο νοσοκομείο στη Σιγκαπούρη το 2001 (Koh *et al,* 2001). Έκτοτε, η IMP-1 ανιχνεύθηκε μόνο σε ένα στέλεχος *Pseudomonas fluorescens* (Koh *et al,* 2004). Ωστόσο, γενετικές αναλύσεις κατέδειξαν ότι το εν λόγω γονίδιο της IMP-1 ήταν περισσότερο όμοιο με το αντίστοιχο γονίδιο της IMP-3 σε νουκλεοτιδικό επίπεδο.

Στην Κορέα, δύο μελέτες έχουν αναδείξει ότι η συγκεκριμένη χώρα αντιμετωπίζει ένα σημαντικό πρόβλημα με τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη εξαιτίας των μεταλλο-β-λακταμασών. Από την πρώτη μελέτη πρόεκυψε η παρουσία γονιδίων μεταλλο-β-λακταμασών τύπου IMP στο 35% από 130 στελέχη ανθεκτικά στις καρβαπενέμες (συμπεριλαμβανομένων δύο στελεχών *P. aeruginosa*) (Oh *et al*, 2003). Στη δεύτερη μελέτη εξετάστηκαν στελέχη από 28 νοσοκομεία που βρίσκονται σε έξι πόλεις και επαρχίες της Κορέας απομονωμένα από το 2000 έως το 2001 και πρόεκυψε ότι γονίδια μεταλλο-β-λακταμασών ήταν παρόντα στο 60% του συνόλου των στελεχών όλων των νοσοκομείων που συμμετείχαν, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τις μεταλλο-β-λακταμάσες τύπου IMP άγγιζε το 41,7% με επικρατούντα στελέχη αυτά του γένους Acinetobacter (Lee *et al*, 2003). Είναι χαρακτηριστικό ότι στην Κορέα η ανθεκτικότητα του συνόλου των στελεχών από το 1996 στο 2001 αυξήθηκε από το 6% στο 19%. Δυστυχώς, όμως, η έλλειψη γενετικών δεδομένων για τα εν λόγω στελέχη δεν μας δίνει τις απαραίτητες πληροφορίες για να διαπιστώσουμε αν τα συγκεκριμένα γονίδια των μεταλλο-β-λακταμασών τύπου IMP προέρχονται από την Ιαπωνία.

Οι μόνες πληροφορίες στην επιστημονική βιβλιογραφία σχετικά με τις μεταλλο-β-λακταμάσες τύπου IMP στην Αμερική, αρχικά, προήλθαν από τη Βραζιλία, όπου υπάρχει σοβαρό πρόβλημα από την παρουσία πολυανθεκτικών στελεχών Acinetobacter spp. Η αλληλούχιση ενός προϊόντος PCR με τη χρήση ειδικών για τα γονίδια IMP εκκινητών έδωσε 100% ταυτότητα με το γονίδιο IMP-6, ωστόσο, το εν λόγω προϊόν της PCR αντιπροσώπευε μόνο μερική ακολουθία (Gales *et al,* 2003β). Από πρόσφατες μελέτες στελεχών που συλλέχθηκαν μέσω του παγκοσμίου προγράμματος αντιμικροβιακής επιτήρησης (SENTRY) εντοπίστηκαν πέντε ακόμη στελέχη από τη Βραζιλία που έφεραν την μεταλλο-β-λακταμάσης IMP-1 καθώς και ένα νέο αλληλόμορφο, το IMP-16 (Mendes *et al,* 2004). Τέλος, το πιο πρόσφατο αλληλόμορφο γονιδίου μεταλλο-β-λακταμάσης τύπου IMP (IMP-18) βρέθηκε σε ένα στέλεχος *P. aeruginosa* που απομονώθηκε στο Las Cruces, στο Νέο Μεξικό (Hanson *et al,* 2004).

1.2.3.3.2 Καρβαπενεμάσες Τύπου VIM

Η δεύτερη επικρατούσα οικογένεια επίκτητων μεταλλο-β-λακταμάσων αποτελείται από τα ένζυμα τύπου VIM (Veronese imipenemase, Εικόνα 1.5). Μέχρι στιγμής, η μεταλλο-β-λακταμάσες τύπου VIM κατηγοριοποιούνται σε τρεις ομάδες, κάθε μία από τις οποίες αντιπροσωπεύεται από τα ένζυμα VIM-1, VIM-2 και VIM-7 αντίστοιχα (Walsh *et al*, 2005). Η ομάδα VIM-1 αποτελείται από τις μεταλλο-β-λακταμάσες VIM-4, VIM-5 και VIM-11a. Έξι μεταλλο-β-λακταμάσες (VIM-3, VIM-6, VIM-8, VIM-9, VIM-10 και VIM11b) θεωρούνται παράγωγα της VIM-2, η οποία παρουσιάζει 90% γενετική ομοιότητα με την VIM-1. Τέλος, η VIM-7 διακρίνεται από τις υπόλοιπες μεταλλο-β-λακταμάσες τύπου VIM (Walsh *et al*, 2005).

Η μεταλλο-β-λακταμάση VIM-1 απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1997 από ένα στέλεχος *P. aeruginosa*, στη Βερόνα της Ιταλίας (Lauretti *et al*, 1999). Το κλινικό αυτό στέλεχος χαρακτηρίζονταν από ανθεκτικότητα έναντι μιας σειράς β-λακταμικών αντιβιοτικών, περιλαμβάνοντας τη πιπερακιλλίνη, τη κεφταζιδίμη, την ιμιπενέμη και την αζτρεονάμη, με MIC συγκεκριμένα για την ιμιπενέμη >128 μg/ml (Lauretti *et al*, 1999). Το ακατέργαστο εκχύλισμα της καλλιέργειας αυτού του στελέχους, διέθετε αποκάλυψε υδρολυτική δράση έναντι των καρβαπενέμων, η οποία αναστελλόταν από τη παρουσία EDTA και αποκαθιστόνταν με την προσθήκη ιόντων Zn^{2+}. Οι εν λόγω παρατηρήσεις υποδήλωναν την παραγωγή μιας μεταλλο-β-λακταμάσης. Το γονίδιο της πιθανολογούμενης μεταλλο-β-λακταμάσης κλωνοποιήθηκε και καθορίστηκε η αμινοξική αλληλουχία του εν λόγω ενζύμου, αποκαλύπτοντας μια πρωτεΐνη 266 αμινοξέων με pI ίσο με 5,3. Η μεταλλο-β-λακταμάση VIM-1 απέχει φυλογενετικά από τις υπόλοιπες μεταλλο-β-λακταμάσες, συγγενεύοντας στενότερα με τη BCII από το *B. cereus*, με την οποία φέρει αμινοξική ταυτότητα σε ποσοστό 39% (Lauretti *et al*, 1999). Μετά την ανάλυση του υδρολυτικού προφίλ της VIM-1 από ένα ανασυνδυασμένο στέλεχος *E. coli* που εκφράζει το συγκεκριμένο ένζυμο διαπιστώθηκε ότι το υδρολυτικό προφίλ αυτής είναι το χαρακτηριστικό των καρβαπενεμασών τάξης B με ικανότητα υδρόλυσης των περισσότερων β-λακτάμων εκτός από την αζτρεονάμη. Η ανθεκτικότητα στην αζτρεονάμη του αρχικού στελέχους *P. aeruginosa* από όπου απομονώθηκε η VIM 1, αποδόθηκε σε άλλους συνυπάρχοντες μηχανισμούς ανθεκτικότητας, όπως η ενεργητική εκροή και υπερπαραγωγή κεφαλοσπορινάσης. Ομοίως με τα γονίδια των μεταλλο-β-λακταμασών τύπου IMP, το γονίδιο της VIM-1 βρέθηκε να εδράζεται

εντός μιας γονιδιακής κασέτας επί ενός χρωμοσωμικής εντόπισης ιντεγκρονίου τάξης I. Το εν λόγω ιντεγκρόνιο έφερε ένα γονίδιο ιντεγκράσης τυπικό αυτών της τάξης I και το γονίδιο aacA4 που ευθύνεται για ανθεκτικότητα έναντι των αμινογλυκοσιδών, πέραν του γονιδίου της VIM-1.

Αργότερα, το γονίδιο VIM-1 βρέθηκε σε ένα στέλεχος *Achromobacter xylosoxidans* στο ίδιο νοσοκομείο στη Βερόνα (Riccio *et al*, 2001). Το συγκεκριμένο στέλεχος παρουσίαζε ανθεκτικότητα σε όλες τις β-λακτάμες, συμπεριλαμβανομένων των καρβαπενεμών και έφερε ένα μη συζευκτικό πλασμίδιο 30 kb, στο οποίο εδράζονταν ένα ιντεγκρόνιο τάξης I. Αυτό το ιντεγκρόνιο, γνωστό πλέον ως In70, έφερε τρία διαφορετικά γονίδια ανθεκτικότητας στις αμινογλυκοσίδες (aacA4, aphA15, και aadA1) καθοδικά του γονιδίου VIM-1. Το ιντεγκρόνιο In70 πλαισιωνόταν από ανεστραμμένες επαναλήψεις, ενώ στο 3΄ακρο του ανιχνεύθηκε ένα κολοβωμένο γονίδιο tni, υποδεικνύοντας ότι πιθανώς αποτελεί μέλος της ομάδας των ιντεγκρονίων τάξης I που σχετίζονται με ελαττωματικές δομές τρανσποζονίων τύπου Tn402.

Εν συνεχεία, η μεταλλο-β-λακταμάση VIM-1 εντοπίστηκε σε 3 στελέχη *P. putida* απομονωθέντα από νοσοκομειακές λοιμώξεις στην Ιταλία, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα περιβαλλοντικά στελέχη αποτελούν πηγή ή τουλάχιστον φορείς γονιδίων μεταλλο-β-λακταμασών (Lombardi *et al*, 2002). Οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MICs) των εν λόγω στελεχών για την ιμιπενέμη και τη μεροπενέμη ήταν >32 μg/ml ενώ για την αζτρεονάμη 32 μg/ml. Τα αυτά στελέχη βρέθηκε ότι έφεραν το γονίδιο της VIM-1 επί ενός πλασμιδίου 52 kb (Lombardi *et al*, 2002).

Έπειτα, η μεταλλο-β-λακταμάση VIM-1 ανιχνεύτηκε σε στελέχη *E. coli* και *K. pneumoniae* απομονωθέντα στην Ελλάδα (Giakkoupi *et al*, 2003, Scoulica *et al*, 2004). Ωστόσο, ενδιαφέρον εύρημα αποτέλεσε ότι το επίπεδο ανθεκτικότητας έναντι των καρβαπενέμων ποικίλει σε στελέχη της οικογένειας των *Enterobacteriaceae*. Συγκεκριμένα από τη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τη Scoulica και τους συνεργάτες της διαπιστώθηκε ότι οι MICs για την ιμιπενέμη και τη μεροπενέμη σε κλινικά στελέχη E. coli ήταν χαμηλότερες σε σχέση με το προτεινόμενο όριο ανθεκτικότητας (Scoulica *et al*, 2004).

Το γονίδιο VIM-2 εντοπίστηκε για πρώτη φορά στη νότια Γαλλία σε ένα στέλεχος *P. aeruginosa* που είχε απομονωθεί από καλλιέργεια αίματος ενός ουδετεροπενικού ασθενή το 1996 (Poirel *et al*, 2000β). Το συγκεκριμένο στέλεχος εμφάνιζε ανθεκτικότητα έναντι των περισσότερων β-λακτάμων, συμπεριλαμβανομένων της κεφταζιδίμης, της κεφεπίμης και της ιμιπενέμης, αλλά παρέμενε ευαίσθητο στην αζτρεονάμη. Η μεταλλο-β-λακταμάση VIM-2 είναι

στενά συγγενική με τη VIM-1 (90% αμινοξική ταυτότητα) και βρέθηκε να εδράζεται ως το μοναδικό γονίδιο ανθεκτικότητας εντός ενός ιντεγκρονίου τάξης I επί ενός μη συζευκτικού πλασμιδίου μεγέθους 45 kb στο εν λόγω στελέχους. Οι μεταλλο-β-λακταμάσες VIM-1 και VIM-2 εμφανίζουν πανομοιότυπες αμινοξικές περιοχές που ίσως να εμπλέκονται στη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου αυτών των ενζύμων, αλλά και ετερογένεια στις αλληλουχίες των αμινοτελικών και των καρβοξυτελικών περιοχών τους (Docquier *et al*, 2003β).

Ακολούθως, δύο ακόμα στελέχη *P. aeruginosa* εντοπίστηκαν στο Παρίσι που έφεραν το γονίδιο VIM-2 και χαρακτηρίζονταν από υψηλό επίπεδο ανθεκτικότητας σε όλες τις β-λακτάμες εκτός από την αζτροενάμη (Poirel *et al*, 2001β). Στα εν λόγω στελέχη το γονίδιο VIM-2 εδράζονταν εντός διαφορετικών ιντεγκρονίων τάξης I (In58 και In59), τα οποία έφεραν μια ποικιλία γονιδίων ανθεκτικότητας έναντι των αμινογλυκοσίδων επιπλέον του γονίδιου ανθεκτικότητας έναντι της σουλφοναμίδης που βρίσκεται στο συντηρημένο 3΄ άκρο της ιντεγκρονιακής δομής. Επιπλέον μια επιδημιολογική μελέτη ανασκόπησης σε νοσοκομείο στη Μασσαλία, όπου είχε απομονωθεί το πρώτο στέλεχος *P aeruginosa* που παρήγαγε τη μεταλλο-β-λακταμάση VIM-2, αποκάλυψε ότι από το 1995 έως το 1999, εντοπίστηκαν άλλα 16 στελέχη *P aeruginosa* που παρήγαγαν την VIM-2 σε ασθενείς που νοσηλεύονταν σε διαφορετικές μονάδες (Aubron *et al*, 2005β).

Ομοίως, στελέχη *P. aeruginosa* που παρήγαγαν τη μεταλλο-β-λακταμάση VIM-2 βρέθηκαν να είναι η πηγή επιδημικών εξάρσεων σε δύο πανεπιστημιακά νοσοκομεία στην Ιταλία και την Ελλάδα την ίδια περίοδο (Pournaras *et al*, 2003, Lagatolla *et al*, 2004). Στελέχη *P. aeruginosa* που παράγουν μεταλλο-β-λακταμάση VIM-2 έχουν, επίσης, αναφερθεί και σε άλλες χώρες, όπως η Ιαπωνία, η Νότια Κορέα, η Πορτογαλία, η Ισπανία, η Πολωνία, η Κροατία, η Χιλή, η Βενεζουέλα, η Αργεντινή, το Βέλγιο και πιο πρόσφατα οι Ηνωμένες Πολιτείες (Walsh *et al*, 2005). Επιπλέον, η μεταλλο-β-λακταμάση VIM-2 έχει ανιχνευθεί σε ένα στέλεχος *Citrobacter freundii* στην Ταϊβάν, σε στελέχη *S. marcescens* και στελέχη *Enterbacter cloacae* στη Νότια Κορέα (Yan *et al*, 2002, Yum *et al*, 2002, Jeong *et al*, 2003).

Σχετικά πρόσφατα, η μεταλλο-β-λακταμάση VIM-2 και μια νέα μεταλλο-β-λακταμάση τύπου VIM, η VIM-3, έχουν εντοπιστεί και απομονωθεί από στελέχη *P. aeruginosa* στην Ταϊβάν (Yan *et al*, 2001β). Η αλληλουχία αμινοξέων της μεταλλο-β-λακταμάσης VIM-3 διαφέρει από εκείνη της VIM-2 κατά δύο αμινοξικές υποκαταστάσεις. Το ακριβές γενετικό περιβάλλον του γονιδίου

της VIM-3 παραμένει άγνωστο, αν και έχει διαπιστωθεί η χρωμοσωμική του εντόπιση (Yan *et al*, 2001β).

Η μεταλλο-β-λακταμάση VIM-4 απομονώθηκε πρώτη φορά από ένα στέλεχος *P. aeruginosa* στη Λάρισα της Ελλάδας το 2001 από έναν ασθενή στον οποίο είχε χορηγηθεί ιμιπενέμη. Το εν λόγω στέλεχος ήταν ανθεκτικό σε όλες τις β-λακτάμες, αλλά διατηρούσε κάποια σχετική ευαισθησία στην αζτρεονάμη (MIC =16 μg/ml) (Pournaras *et al*, 2002). Η μεταλλο-β-λακταμάση VIM-4 διαφέρει από τη VIM-1 κατά μία απλή αμινοξική μεταβολή ($Ser^{175}Arg$). Ένα ανθεκτικό στις καρβαπενέμες στέλεχος *P. aeruginosa* που παράγει μεταλλο-β-λακταμάση VIM-4, εντοπίστηκε και απομονώθηκε στη Σουηδία, από έναν ασθενή που είχε προηγουμένως νοσηλευτεί στην Ελλάδα (Giske *et al*, 2003). Σχετικά πρόσφατα, ο Luzzaro και οι συνεργάτες του ανίχνευσαν το γονίδιο VIM-4 σε ένα στέλεχος *K. pneumoniae* και σε ένα στέλεχος *E. cloacae* που απομονώθηκαν από έναν ασθενή το Μάιο του 2002 σε νοσοκομείο στη Βαρέζε της Ιταλίας (Luzzaro *et al*, 2004). Ο συγκεκριμένος ασθενής είχε λάβει θεραπεία με καρβαπενέμες που πιθανώς να συνέβαλλαν στην επιλογή των εν λόγω στελεχών. Οι MICs για την ιμιπενέμη και τη μεροπενέμη για το στέλεχος *K. pneumoniae* ήταν 2 και 0,5 μg/ml, αντίστοιχα, ενώ οι MICs για το στέλεχος *E. cloacae* ήταν 0,25 και 0,12 μg/ml, αντίστοιχα, οι οποίες αποτελούν ασυνήθιστα χαμηλές MICs για τις καρβαπενέμες. Δεδομένου ότι το γονίδιο VIM-4 αποδείχθηκε ότι κωδικοποιείται από το ίδιο πλασμίδιο στα δύο απομονωμένα στελέχη, είναι ενδιαφέρον ότι τα επίπεδα των MICs έναντι των καρβαπενέμων δύναται να ποικίλουν σημαντικά μεταξύ των μελών της οικογένειας των *Enterobacteriaceae* παρά του κοινού μηχανισμού ανθεκτικότητας (Luzzaro *et al*, 2004).

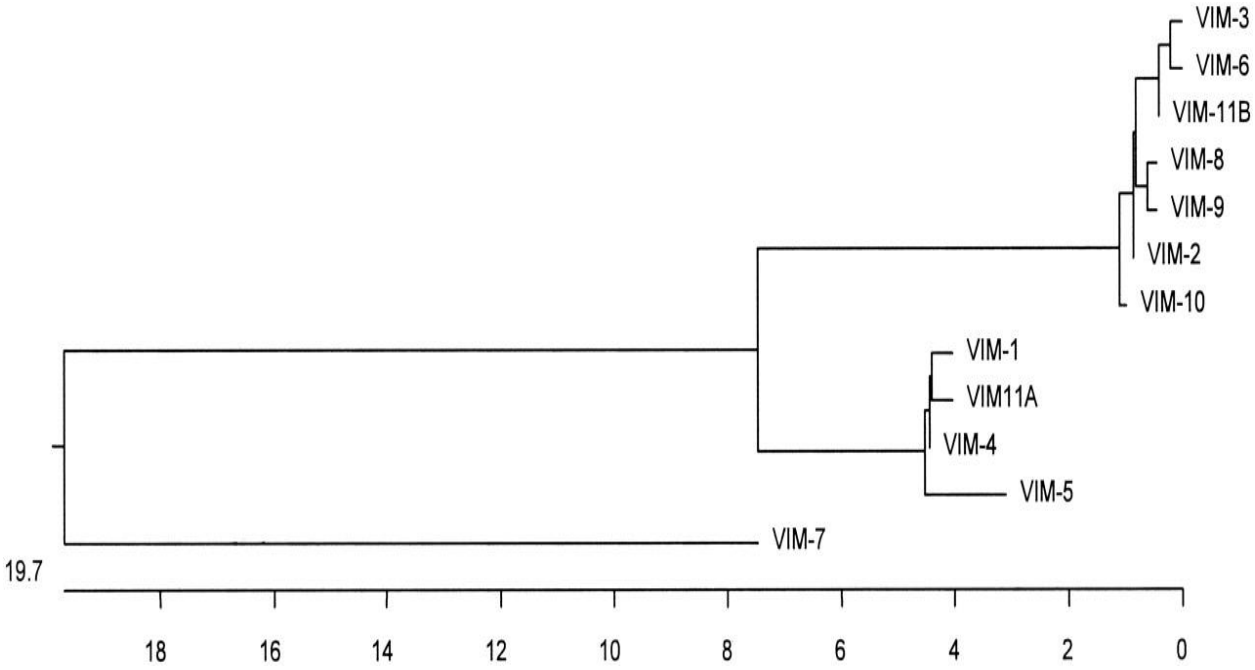
Μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *P. aeruginosa* που απομονώθηκαν από παιδιά στην Πολωνία και παρήγαγαν τη μεταλλο-β-λακταμάση VIM-4, απέδειξε ότι τα εν λόγω στελέχη άνηκαν σε διαφορετικούς κλώνους και ένας εξ' αυτών θεωρείται πλέον ενδημικός (Patzer *et al*, 2004). Ωστόσο, όλα αυτά τα στελέχη έφεραν ένα πανομοιότυπο ιντεγκρόνιο τάξης I που περιελάμβανε στην πρώτη θέση το γονίδιο aacA4 που παρέχει ανθεκτικότητα έναντι των αμινογλυκοσιδών και το γονίδιο VIM-4 στη δεύτερη και τελευταία θέση αυτού (Patzer *et al*, 2004).

Η μεταλλο-β-λακταμάση VIM-5 που διαφέρει από τη VIM-1 κατά 5 αμινοξικές αντικατάστασης, έχει βρεθεί σε στελέχη *K. pneumoniae* και *P. aeruginosa* στην Άγκυρα της Τουρκίας (Bahar *et al*, 2004). Το στέλεχος *P. aeruginosa* όπου απομονώθηκε το γονίδιο VIM-5,

ήταν ανθεκτικό σε όλες τις β-λακτάμες συμπεριλαμβανομένης και της αζτρεονάμης. Η μεταλλο-β-λακταμάση VIM-6 που διαφέρει από τη VIM-2 κατά 2 αμινοξικές αντικατάστασης και από τη VIM-3 κατά 1 αμινοξική αντικατάσταση, έχει βρεθεί σε δύο στελέχη *P. putida* στη Σιγκαπούρη (Koh *et al*, 2004) Τα εν λόγω στελέχη ιδιαίτερα ανθεκτικά στις β-λακτάμες, με MICs >32 μg/ml για την ιμιπενέμη και τη μεροπενέμη, >256 μg/ml για τη κεφταζιδίμη και 128 μg/ml για την αζτρεονάμη.

Η μεταλλο-β-λακταμάση VIM-7, που έχει βρεθεί σε ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *P. aeruginosa* απομονωθέντα στο Χιούστον του Τέξας, εμφανίζει ταυτότητα 77% και 74% με τη VIM-1 και τη VIM-2, αντίστοιχα (Toleman *et al*, 2004). Το γονίδιο VIM-7 εντοπίστηκε σε πλασμίδιο μεγέθους 24 kb και πιθανότατα εδράζεται σε ιντεγκρόνιο. Η εν λόγω μεταλλο-β-λακταμάση ανιχνεύτηκε σε ένα κλινικό στέλεχος ανθεκτικό σε όλες τις β-λακτάμες συμπεριλαμβανομένης της αζτρεονάμης καθώς και σε όλα τα άλλα διαθέσιμα αντιβιοτικά εκτός από τη πολυμυξίνη Β.

Η μεταλλο-β-λακταμάση VIM-8 ανιχνεύτηκε σε στέλεχος *P. aeruginosa* στη Κολομβία, ενώ δύο άλλα μέλη των καρβαπενεμασών τύπου VIM, τα VIM-9 και VIM-10 ανιχνευτήκαν στο Ηνωμένο Βασίλειο και διαφέρουν μόνο κατά δύο αμινοξέα (Mendes *et al*, 2004β). Έκτοτε, τα γνωστά μέλη των καρβαπενεμασών τύπου VIM αυξάνονται με την κατηγορία αυτών των ενζύμων να αριθμεί ήδη 37 μέλη.



Εικόνα 1.5. Φυλογενετικό δέντρο των κυριότερων μέταλλο-β-λακταμασών τύπου VIM με τη μέθοδο neighbor joining (Walsh *et al*, 2005).

1.2.3.3.3 Καρβαπενεμάσες Τύπου SPM

Ένα στέλεχος *P. aeruginosa*, που απομονώθηκε κατά τη διάρκεια του παγκόσμιου προγράμματος αντιμικροβιακής επιτήρησης (SENTRY) το 1997 στο Σαο Πάολο της Βραζιλίας, βρέθηκε ότι φέρει ένα νέο γονίδιο μεταλλο-β-λακταμάσης, που είναι γνωστό ως SPM-1 (Sao Paolo MBL) (Toleman *et al,* 2002). Το εν λόγω στέλεχος (48-1997A), το οποίο απομονώθηκε από δείγμα αίματος ενός τετράχρονου κοριτσιού που έπασχε από λευχαιμία και τελικά υπέκυψε στη λοίμωξη, ήταν ιδιαίτερα ανθεκτικό σε όλους τους συνήθεις αντιμικροβιακούς παράγοντες έναντι των Gram αρνητικών βακτηρίων, εκτός από την κολιστίνη (Gales *et al,* 2003).

Όταν η αλληλουχία του γονιδίου της SPM-1 συγκρίθηκε με τις αλληλουχίες των γνωστών μεταλλο-β-λακταμσών παρατηρήθηκε ότι το εν λόγω γονίδιο έφερε ομοιότητα με τα αντίστοιχα γονίδια των IMP-1 (35,5%), ImiS (32,2%), CphA (32,1%), BCII (30,0%), και CcrA (27,0%) (Toleman *et al,* 2002). Ωστοσο, η αλληλουχία της SPM-1 διέφερε σημαντικά από εκείνες των γονιδίων IMP και VIM, κυρίως εξ αιτίας της παρουσίας μιας ένθεσης 24 αμινοξέων αμέσως μετά την ενεργό θέση HFHLD. Αυτή η ένθεση έχει αποδειχθεί ότι είναι αρκετά ευέλικτη και δρα ως βρόγχος, πιθανώς αυξάνοντας την πρόσδεση και την υδρόλυση των β-λακταμικών αντιβιοτικών (Toleman *et al,* 2002). Το γενετικό περιβάλλον του εν λόγω γονιδίου είναι μοναδικό καθώς δεν εδράζεται επί τρανσποζονίων ή ιντεγκρονίων (Poirel *et al,* 2004β).

Η υδρολυτική ικανότητα της μεταλλο-β-λακταμάσης SPM-1 έναντι διαφόρων β-λακταμών φαίνεται στον πίνακα 3. Όπως φαίνεται από τις τιμές για τη σταθερά k_{cat} τα προτιμώμενα υποστρώματα της SPM-1 είναι η πενικιλλίνη, η αμπικιλλίνη, η πιπερακιλλίνη, η καρβενικιλλίνη, η αζλοκιλλίνη και η κεφαλοθίνη (Payne, 1993, Koh *et al,* 2001, Docquier *et al,* 2003, Giakkoupi *et al,* 2003). Γενικά, η μεταλλο-β-λακταμάση SPM-1 δεσμεύει ισχυρότερα τις κεφαλοσπορίνες από τις πενικιλλίνες, το οποίο αντικατοπτρίζεται στις σχετικά υψηλές τιμές της σταθεράς K_m (38 έως 814 μM). Ομοίως με την IMP-1 και τη VIM-1, η SPM-1 δεν υδρολύει το κλαβουλανικό οξύ ή την αζτρεονάμη ιδιαίτερα αποτελεσματικά, τα οποία δύναται να δράσουν ως ανταγωνιστικοί παρεμποδιστές (K_m >0.1 και <0.3, αντίστοιχα) (Murphy *et al,* 2003).

1.2.3.3.4 Καρβαπενεμάσες Τύπου GIM

Το 2002, πέντε στελέχη *P. aeruginosa* απομονώθηκαν από διαφορετικούς ασθενείς σε νοσοκομείο του Ντίσελντορφ της Γερμανίας και φάνηκε να φέρουν μια νέα μεταλλο-β

λακταμάση, που είναι γνωστή σήμερα ως GIM-1 (German imipenemase) (Castanheira *et al*, 2004). Ομοίως με τα περισσότερα στελέχη P. aeruginosa που φέρουν μεταλλο-β-λακταμάσες, τα πέντε αυτά στελέχη ήταν ευαίσθητα μόνο στην πολυμυξίνη Β και μετά από ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο αποδείχθηκε ότι ήταν πανομοιότυπα. Συγκρινόμενα τα εν λόγω στελέχη με έξι στελέχη ευαίσθητα στις καρβαπενέμες που απομονώθηκαν από το ίδιο νοσοκομείο διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ αυτών (Castanheira *et al*, 2004).

Η αμινοξική αλληλουχία της μεταλλο-β-λακταμάσης GIM-1 εμφανίζει περισσότερη ομοιότητα με τις IMP-6, IMP-1 και IMP-4 (43,5%, 43,1% και 43,1% αντίστοιχα) αλλά και με τις VIM-7 (31,2%), VIM-1 (28,8%), VIM-4 (28,8%), VIM-5 (28,8%) καθώς και με την SPM-1 (28%). Η μεταλλο-β-λακταμάση GIM-1 φέρει τα κύρια δομικά χαρακτηριστικά των μεταλλο-β-λακταμασών της υποτάξης B1, όπως για παράδειγμα το μοτίβο σύνδεσης ψευδαργύρου (HXHXD) και φέρει δυο ιόντα ψευδαργύρου εντός της καταλυτικής περιοχής (Rasmussen & Bush, 1997). Παρ' ότι η GIM-1 επιδεικνύει υδρολυτικό προφίλ παρόμοιο με αυτό της IMP-1, είναι αναμφισβήτητα ασθενέστερο ένζυμο όπως υποδηλώνεται από τις χαμηλότερες τιμές για τη σταθερά kcat και τις υψηλότερες τιμές για τη σταθερά k_m (Castanheira *et al*, 2004).

Ομοίως με την πλειοψηφία των γονιδίων των μεταλλο-β-λακταμασών, η GIM-1 βρέθηκε να εδράζεται εντός ενός ιντεγκρονίου της τάξης 1 επί ενός σχετικά μικρού πλασμιδίου (45 kb). Το εν λόγω ιντεργκρόνιο έφερε επιπλέον δυο γονίδια ανθεκτικότητας έναντι των αμινογλυκοσίδων (aacA4 και aadA1) και ένα γονίδιο ανθεκτικότητας έναντι των β-λακταμών (OXA-2) (Castanheira *et al*, 2004). Μέχρι σήμερα, το ένζυμο GIM-1 δεν έχει ανιχνευτεί σε άλλο μέρος στον κόσμο.

1.2.3.3.5 Καρβαπενεμάσες Τύπου SIM

Σχετικά πρόσφατα αναφέρθηκε και μια άλλη οικογένεια επίκτητων μεταλλο-β-λακταμασών στην Κορέα (Lee *et al*, 2005). Το πρώτο μέλος της οικογένειας, το ένζυμο SIM-1 (Seoul imipenemase) έχει την πλησιέστερη ταυτότητα αμινοξέων με τα μέλη της οικογένειας IMP και ανιχνεύθηκε εδραζόμενο επί ιντεγκρονίων τάξης 1 σε στελέχη *A. baumannii* (Lee *et al*, 2005). Οι μεταλλο-β-λακταμάσες τύπου SPM, GIM και SIM δεν έχουν διασπαρεί πέραν των γεωγραφικών περιοχών από τις οποίες πρωτοανιχνεύτηκαν, ενώ οι μεταλλο-β-λακταμάσες τύπου

VIM και IMP εξακολουθούν να ανιχνεύονται σε παγκόσμιο επίπεδο και να διασπείρονται πέρα από το είδος *P. aeruginosa* και στα άλλα Εντεροβακτηριακά.

1.2.3.3.6 Νεότερες Καρβαπενεμάσες Τάξης B

Τα τελευταία χρονιά αρκετές νέες μεταλλο-β-λακταμάσες απομονώθηκαν σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές, όπως η NDM (New Delhi Metallo-b-lactamase), η DIM (Dutch imipenemase), η KHM (Kyorin Health Science Metallo-b-lactamase), η AIM (Adelaide Imipenmase) και η TMB (Tripoli Metallo-b-lactamase) (Yong *et al,* 2009, Poirel *et al,* 2010, Sekiguchi *et al,* 2008, Yong *et al,* 2012, El Salabi *et al,* 2012).

Ειδικότερα, η μεταλλο-β-λακταμάση NDM-1 περιλαμβάνεται στις νέες αφίξεις των μεταλλο-β-λακταμασών που βάσει επιδημιολογικών δεδομένων είχε εμφανιστεί στην Ινδία και ιδιαίτερα στο Νέο Δελχί, ήδη από το 2006. Η πρώτη περιγραφή του ενζύμου NDM-1 έγινε το 2008, σε περιστατικό ουρολοίμωξης από το στέλεχος *K. pneumoniae* ST14, ενός ασθενούς με καταγωγή από την Ινδία και προηγούμενη νοσηλεία στο Νέο Δελχί (Yong *et al,* 2009). Σε μία επιδημιολογική μελέτη που έγινε στο Ηνωμένο Βασίλειο, που αφορούσε νοσηλευόμενους ασθενείς κατά το χρονικό διάστημα 2008 έως 2009, βρέθηκαν 22 μικροβιακά στελέχη να εκφράζουν το ένζυμο NDM-1 και συγκεκριμένα στελέχη των ειδών *K. pneumoniae* (14), *E. coli* (4), *Citrobacter freundii* (2), *Enterobacter cloacae* (1) και *Morganella morganii* (1). Στις περισσότερες περιπτώσεις είχε προηγηθεί νοσηλεία στην Ινδία ή το Πακιστάν (Deshpande *et al,* 2010).

Η μεταλλο-β-λακταμάση NDM-1 εδράζεται επί ιντεγκρονίων τάξης 1 και παρουσιάζει ελάχιστη ομοιότητα με τις άλλες μεταλλο-β-λακταμάσες, ενδεικτικά παρουσιάζει μόνο 32,4% με τις VIM-1/VIM-2. Η εν λόγω μεταλλο-β-λακταμάση χαρακτηρίζεται από ξεχωριστή αλληλουχία βάσεων κοντά στο ενεργό κέντρο, σε σύγκριση με τις άλλες μέταλλο-β-λακταμάσες, έχοντας μια επιπρόσθετη περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 162 έως 166. Η μεταλλο-β-λακταμάση NDM-1 έχει υδρολυτικό φάσμα που περιλαμβάνει όλες τις β-λακτάμες, εκτός της αζτρεονάμης (Kim *et al,* 2011).

Η μεταλλο-β-λακταμάση DIM-1 ανιχνεύτηκε σε ένα στέλεχος *Pseudomonas stutzeri* από έναν ασθενή με χρόνια οστεομυελίτιδα της κνήμης, στην Ολλανδία. Το στέλεχος ήταν ανθεκτικό στη τικαρκιλλίνη, στη πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη, την ιμιπενέμη και τη μεροπενέμη, ενώ

εμφάνιζε ενδιάμεση ευαισθησία στη κεφταζιδίμη και στη κεφεπίμη και πλήρη ευαισθησία στην αζτρεονάμη (Poirel *et al,* 2010). Από τη μελέτη της αλληλουχίας του εν λόγου ενζύμου πρόεκυψε ότι αποτελούσε μια νέα τάξης Β κατά Amber μεταλλο-β-λακταμάση, η οποία χαρακτηρίζεται από περιορισμένη ομοιότητα με τις μέχρι τώρα γνώστες μεταλλο-β-λακταμάσες. Συγκεκριμένα, η DIM-1 φέρει 52% ομοιότητα αμινοξέων με τη GIM-1 και μόλις 45% και 30% με τις IMP και VIM αντίστοιχα, ενώ υδρολύει ικανοποιητικά την ιμιπενέμη, την μεροπενέμη και τις ευρέως φάσματος κεφαλοσπορίνες, εκτός της αζτρεονάμης (Poirel *et al,* 2010). Το γονίδιο DIM-1 βρέθηκε να αποτελεί τη πρώτη γονιδιακή κασέτα ενός ιντεγκρονίου τάξης 1, ακολουθούμενη από το γονίδιο aadB που κωδικοποιεί μια αμινογλυκοσιδική αδενυλοτρανφεράση. Τέλος, η τρίτη και τελευταία γονιδιακή κασέτα του ιντεγκρονίου απαρτίζονταν από το γονίδιο qacH που ευθύνεται για την εμφάνιση ανθεκτικότητας έναντι των αντισηπτικών (Poirel *et al,* 2010).

Το στέλεχος *Citrobacter freundii* KHM243 που απομονώθηκε το 1997 στο Τόκιο της Ιαπωνίας, σε έναν ασθενή με ουρολοίμωξη από καθετήρα κύστεως, βρέθηκε να εκφράζει μια νέα μεταλλο-β-λακταμάση γνωστή πλέον ως KHM-1 (Sekiguchi *et al,* 2008). Το μικροβιακό στέλεχος ήταν ανθεκτικό στις περισσότερες β-λακτάμες και παρουσίαζε μειωμένη ευαισθησία στις καρβαπενέμες. Παρόλα αυτά το εν λόγω στέλεχος, ήταν ευαίσθητο στις μονοβακτάμες (Sekiguchi *et al,* 2008). Η νέα μεταλλο-β-λακταμάση KHM-1 εμφάνιζε περιορισμένη ομοιότητα σε σχέση με τις VIM-1 (38%), GIM-1 (50%) και SPM-1 (46%), ενώ το γονίδιο της δεν βρέθηκε να εδράζεται επί κάποιου ιντεγκρονίου (Sekiguchi *et al,* 2008).

Τέλος, άλλες μεταλλο-β-λακταμάσες που βρέθηκαν πρόσφατα είναι η AIM-1 που απομονώθηκε από ένα στέλεχος *P. aeruginosa* στην Αυστραλία και η TMB-1 που εκπροσωπεί μια νέα υποτάξη της ομάδας B1 των μεταλλο-β-λακταμασών και απομονώθηκε σε κλινικά και μη στελέχη κατά Gram αρνητικών βακτηρίων από τη Λιβύη της Αφρικής (Yong *et al,* 2012, El Salabi *et al,* 2012).

1.2.3.3.7 Γενετικό Περιβάλλον Γονιδίων των Καρβαπενεμασών Τάξης Β

Η διασπορά των γονιδίων των μεταλλο-β-λακταμασών πιστεύεται ότι υποβοηθείται από την κατανάλωση εκτεταμένου φάσματος κεφαλοσπορίνων ή καρβαπενέμων (Lee *et al,* 2003, Lombardi *et al,* 2002). Τα περισσότερα γονίδια, αν όχι όλα, που κωδικοποιούν τις IMP, VIM και

GIM-1, απαντώνται εντός γονιδιακών κασετών ιντεγκρονίων τάξης I, παρά το γεγονός ότι τα γονίδια των IMP μεταλλο-β-λακταμασών απαντώνται, επίσης, εντός ιντεγκρονίων τάξης 3 (Arakawa *et al*, 1995, Castanheira *et al*, 2004, Lauretti *et al*, 1999, Poirel *et al*, 2001β, Senda *et al*, 1996, Yan *et al*, 2001β).

Τα ιντεγκρόνια είναι ικανά να ενσωματώνουν γονιδιακές κασέτες, μέσω ανασυνδυασμού και αποτελούνται από τρεις περιοχές: τις 5΄ και 3΄ συντηρημένες περιοχές και μια μεταβλητή περιοχή. Η 5΄ συντηρημένη περιοχή περιλαμβάνει το γονίδιο της ιντεγκράσης (intl), την αλληλουχία της ειδικής θέσης του ανασυνδυασμού (attI) και έναν προαγωγέα, που διαμεσολαβεί την έκφραση των γονιδιακών κασετών της μεταβλητής περιοχής. Η 3΄ συντηρημένη περιοχή συχνά αποτελείται από το μερικώς διαγραφόμενο γονίδιο qac (qacEΔ1) συγχωνευμένο με το γονίδιο sul, τα οποία προσδίδουν ανθεκτικότητα έναντι των αντισηπτικών και των σουλφοναμίδων, αντίστοιχα (Mazel, 2006).

Οι γονιδιακές κασέτες είναι μικρά τμήματα κυκλικού DNA μεγέθους περίπου 1 kb, τα οποία περιλαμβάνουν ένα μόνο γονίδιο και μια αλληλουχία 59 ζευγών βάσεων (Bennett, 1999). Τα γονίδια των VIM από μερικές ευρωπαϊκές χώρες έχουν βρεθεί με κατατετμημένη την αλληλουχία των 59 ζευγών βάσεων γεγονός που καταδεικνύει την δημιουργία των εν λόγω γονιδιακών κασετών μετά από συγχώνευση (Walsh *et al*, 2003). Στην πλειονότητα αυτών των περιπτώσεων, η γονιδιακή κασέτα περιλαμβάνει ένα γονίδιο μεταλλο-β-λακταμασών και το γονίδιο aacA4 που προσδίδει ανθεκτικότητα στη καναμυκίνη, στη νεομυκίνη, στην αμικασίνη και στη στρεπτομυκίνη. Ως εκ τούτου, η χρήση είτε των αμινογλυκοσίδων είτε των β-λακταμών οδηγεί στην επιλογή των στελεχών που φέρουν αυτή τη συνθέτη γονιδιακή κασέτα (Walsh *et al*, 2003).

Ενώ οι γονιδιακές κασέτες που φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας στις αμινογλυκοσίδες και τις β-λακτάμες, μπορούν ελεύθερα να μετακινηθούν από ένα ιντεγκρόνιο σε ένα άλλο, εντούτοις δεν έχουν την ικανότητα μόνες τους να μεταφερθούν από ένα οργανισμό σε άλλο καθώς για το σκοπό αυτό απαιτείται η συμβολή άλλων γενετικών στοιχείων, όπως τα πλασμίδια και τα τρανσποζόνια (Bennett, 1999). Η πλειοψηφία των γονιδίων των μεταλλο-β-λακταμασών εδράζονται συνήθως επί πλασμιδίων μεγέθους 120 εως180 kb, αν και μερικά γονίδια, όπως το VIM-7 που ανιχνεύτηκε στις ΗΠΑ, εδράζονταν σε ένα συζευκτικό πλασμίδιο μεγέθους 24 kb (Toleman *et al*, 2004). Η in vivo μεταφορά μεγάλων πλασμιδίων που φέρουν γονίδια μεταλλο-β-λακταμασών πιθανώς εξαρτάται τόσο από το μέγεθος του εν λόγω πλασμιδίου όσο και τα

γονίδια εκτός των μεταλλο-β-λακταμασών που εδράζονται επί αυτού. Μέχρι στιγμής υπάρχουν πολύ λίγες πληροφορίες σχετικά με τη φύση των υπολοίπων γονίδιων που εδράζονται επί αυτών των πλασμιδίων καθώς κι αν οι λειτουργίες αυτών ενισχύουν ή παρεμποδίζουν τα βακτήρια ξενιστές τους.

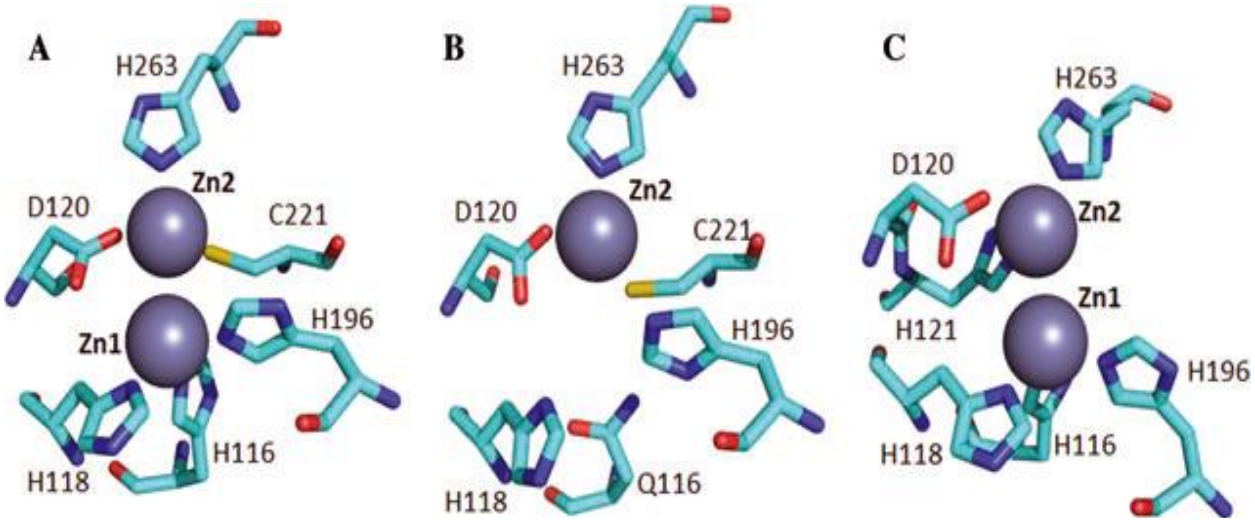
Το ποικίλο γενετικό περιβάλλον των γονιδίων των μεταλλο-β-λακταμασών αφενός αντιπροσωπεύει το βαθμό της πλαστικότητάς τους και αφετέρου παρέχει την εξήγηση για τη παγκόσμια εξάπλωση τους. Το 2003, για πρώτη φορά ένα γονίδιο μεταλλο-β-λακταμάσης (IMP-13) και το ιντεγκρόνιο αυτού βρέθηκαν να εδράζονται επί ενός τρανσποζονίου τύπου Tn5051 σε στέλεχος *P. aeruginosa* στην Ιταλία (Toleman *et al,* 2003). Η ενσωμάτωση των γονιδίων IMP-13 και VIM-2 παρατηρήθηκε, επίσης, στην ίδια θέση όμοιων γενετικών στοιχείων σε στελέχη *P. aeruginosa* απομονωθέντα από την Πολώνια. Επιπλέον, τα γονίδια tnpR από τα τρανσποζόνια και από τις δυο περιοχές ήταν πανομοιότυπα, γεγονός που υποδηλώνει ότι το εν λόγω τρανσποζόνιο είναι υπεύθυνο για τη διασπορά του ιντεγκρονίου τάξης I που φέρει τα διάφορα γονίδια μεταλλο-β-λακταμασών (Toleman *et al,* 2003). Αυτά τα δεδομένα ενισχύονται από το γεγονός ότι τα εν λόγω στελέχη *P. aeruginosa* χαρακτηρίζονται από διαφορετικά πρότυπα ζώνωσης κατά την ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο καθώς και από το γεγονός ότι σε αυτά δεν παρατηρήθηκε πλασμιδιακή μεταφορά. Τέλος, μερικά από τα ιντεγκρόνια που έφεραν το γονίδιο VIM-2 σε στελέχη απομονωθέντα στην Ιαπωνία βρέθηκε να εδράζονται, επίσης, σε τρανσποζόνια (Yatsuyanagi *et al,* 2004).

Ωστόσο, δεν συνδέονται όλα τα γονίδια των μεταλλο-β-λακταμασών με ιντεγκρόνια ή τρανσποζόνια. Το γενετικό περιβάλλον του γονιδίου SPM-1 φαίνεται να είναι μοναδικό, με τα παρακείμενα σε αυτό γονίδια να σχετίζονται στενά με τον ορότυπο Typhimurium του είδους *Salmonella enterica* και όχι με κάποιο ιντεγκρόνιο ή τρανσποζόνιο (Toleman *et al,* 2002). Συγκεκριμένα, το γονίδιο SPM-1 και τα γονίδια που το περιβάλλουν αποτελούν μέρος μιας κινητής γονιδιωματικής νησίδας παθογονικότητας εδραζόμενη επί ενός πλασμιδίου περίπου 180 kb. Οι νησίδες παθογονικότητας του γένους Salmonella σχετίζονται με κοινές κινητές περιοχές, οι οποίες σχετίζονται, επίσης, και με άλλα κινητά στοιχεία που ονομάζονται περιοχές SXT. Αυτές οι περιοχές μπορούν να κινητοποιηθούν κάτω από βακτηριακό στρες, όπως παρατηρήθηκε σχετικά πρόσφατα λόγου χάριν όταν βακτηριακά στελέχη εκτέθηκαν σε φθουοροκινολόνες (Beaber *et al,* 2004).

Περαιτέρω ανάλυση των απομονωμένων στελεχών *P. aeruginosa* από τη Βραζιλία απέδειξε την παρουσία κοινών περιοχών ή στοιχείων ISCR, συγκεκριμένα του στοιχείου ISCR-4 ανοδικά του γονιδίου SPM-1 (Poirel *et al,* 2004β). Σε σχέση με τα ιντεγκρόνια και τα τρανσποζόνια, πολύ λίγα είναι γνωστά για τα στοιχεία ISCR και ιδιαίτερα πως διαμεσολαβούν τη μετακίνηση των γονιδίων παρά το γεγονός ότι σχετίζονται με γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά (Partridge *et al,* 2003). Το γονίδιο SPM-1 των στελεχών *P. aeruginosa* από το Σάο Πάολο, επίσης, περιέχει κοινές περιοχές, αν και είναι πολύ διαφορετικές από εκείνες που απομονώθηκα από άλλες περιοχές, υποδηλώνοντας διαφορετική γενετική προέλευση αυτών. Προς το παρόν το γενετικό περιβάλλον του γονιδίου SPM-1 δεν έχει συσχετιστεί με τη συνανθεκτικότητα σε άλλα αντιβιοτικά.

1.2.3.4 Βιοχημικές Ιδιότητες Καρβαπενεμασών Τάξης Β

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τόσο οι μέταλλο-β-λακταμάσες όσο και οι σερινο-β-λακταμάσες ευθύνονται για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι των β-λακταμών, διασπώντας τον αμιδικό δεσμό του β-λακταμικού δακτυλίου, εντούτοις ο τρόπος με τον οποίο τα δύο αυτά είδη ενζύμων το επιτυγχάνουν διαφέρει σημαντικά (Frere, 1995). Οι μέταλλο-β-λακταμάσες χαρακτηρίζονται από ένα διαφορετικό πρότυπο αμινοξέων που καθορίζει τη καθοριστική δομή του ενεργού κέντρου που αλληλεπιδρά με τα ιόντα ψευδαργύρου (Εικόνα 1.6). Τα συγκεκριμένα ιόντα με τη σειρά τους αλληλεπιδρούν συνήθως με δύο μόρια ύδατος, τα οποία είναι απαραίτητα για την υδρόλυση από αυτού του τύπου της β-λακταμάσες (Wang *et al,* 1999). Το κυριότερο μοτίβο δέσμευσης του ψευδαργύρου είναι η πεντάδα His-X-His-X-Asp (HXHXD), το οποίο είναι κοινό στις περισσότερες μεταλλο-β-λακταμάσες εκτός από τα ένζυμα υποτάξης B2 (Rasmussen & Bush, 1999). Χωρίς καμία εξαίρεση, το προτιμώμενο μέταλλο είναι ο ψευδάργυρος και ενώ οι περισσότερες μεταλλο-β-λακταμάσες περιέχουν δύο ιόντα αυτού στο ενεργό κέντρο τους, τα ενζυμα της υποτάξης B2 περιέχουν μόνο ένα ιόν ψευδαργύρου. Ο προτεινόμενος μηχανισμός υδρόλυσης των μεταλλο-β-λακταμασών υποστηρίζει ότι στο ενεργό κέντρο ο δεσμός β-λακτάμης προσανατολίζεται και πολώνεται με τρόπο ώστε να διευκολυνθεί η πυρηνόφιλη επίθεση από το σύμπλοκο ψευδαργύρου-ύδατος/υδροξειδίου (Spencer *et al,* 2001).



Εικόνα 1.6. Δομή ενεργού κέντρου μεταλλο-β-λακταμασών των υποτάξεων B1, B2 και B3, αντίστοιχα (Palzkill, 2013).

Ο μηχανισμός υδρόλυσης των μεταλλο-β-λακταμασών είναι πολύπλοκος και διαφέρει μεταξύ των διαφόρων ενζύμων αυτής της τάξης (Spencer *et al,* 2001). Η αποσαφήνιση της κρυσταλλικής δομής των εν λόγω ενζύμων προσέφερε γνώσεις για τον καταλυτικό τους μηχανισμό, καταδεικνύοντας ότι παρά το γεγονός ότι οι μεταλλο-β-λακταμάσες χαρακτηρίζονται από αμινοξική ομοιότητα μικρότερη του 25% μεταξύ τους, εντούτοις όλες μοιράζονται την ίδια αναδίπλωση αββα και οι δομές των ενεργών κέντρων τους είναι πρακτικά συγκρίσιμες. Ενώ υπάρχουν πολλές κρυσταλλικές δομές μεταλλο-β-λακταμασών, το γεγονός ότι μόνο δύο εξ΄ αυτών είναι σε σύμπλοκο με β-λακτάμες, δεν επιτρέπει τη πλήρη κατανόηση των καταλυτικών σταδίων αφήνοντας πολύ χώρο για υποθέσεις (Walsh *et al,* 2005). Από τα εν λόγω κρυσταλλογραφικά δεδομένα φαίνεται ότι οι περισσότερες μεταλλο-β-λακταμάσες διαθέτουν έναν ευέλικτο βρόγχο που πιθανώς διευκολύνει τη δέσμευση και την υδρόλυση των β-λακταμικών υποστρωμάτων.

Σε αντίθεση με τις σερινο-β-λακταμάσες, οι μεταλλο-β- λακταμάσες διαθέτουν ευρύτερη αύλακα του ενεργού κέντρου τους, γεγονός που επιτρέπει τη δέσμευση σε αυτό περισσότερων β-λακταμικών υποστρωμάτων, με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζονται από ευρύτερο φάσμα δραστικότητας. Επίσης, τα εν λόγω ένζυμα δεν αναστέλλονται από τους συνήθεις αναστολείς των σερινο-β-λακταμασών, όπως το κλαβουλανικό οξύ και σουλβακτάμη (Page, 1999). Ενδιαφέρον αποτελεί ότι οι μεταλλο-β-λακταμάσες αδυνατούν να υδρολύσουν την αζτρεονάμη

Πίνακας 1.3. Κινητικές παράμετροι σταθερής κατάστασης, Kcat (S^{-1}), Km (μM) και Kcat/ Km ($mM^{-1}s^{-1}$) για την *in vitro* υδρόλυση διαφόρων β-λακταμικών αντιβιοτικών από τις καρβαπενεμάσες τάξης B.

Ένζυμο	PEN	AMP	TIC	FOX	CAZ	CTX	CEF	IPM	MEM	ATZ	
GIM-1											
K_{cat}	6,6	3,3	2,3	8,3	18	1,1	17	27	2,7	M.Y	(Castanheira *et al*, 2004)
K_m	46	20	57	206	31	4	431	287	25	M.Y	
K_{cat}/K_m	0,14	0,16	0,04	0,04	0,58	0,24	0,04	0,09	0,11	M.Y	
IMP-1											
K_{cat}	320	950	1,1	16	8	1,3	7	46	50	>0,01	(Laraki *et al*, 1999)
K_m	520	200	740	8	44	4	11	39	10	>1000	
K_{cat}/K_m	0,62	4,8	0,0015	2	0,18	0,35	0,66	1,2	0,12	$<10^{-5}$	
VIM-1											
K_{cat}	29	37	452	26	60	169	549	2	13	>0,01	(Docquier *et al*, 2003)
K_m	841	917	1117	131	794	247	145	1,5	48	>1000	
K_{cat}/K_m	0,034	0,04	0,41	0,2	0,076	0,58	3,8	1,3	0,27	$<10^{-5}$	
VIM-2											
K_{cat}	55,8	Μ.Δ	31,7	3	89	27,5	4,7	9,9	1,4	<0,5	(Docquier *et al*, 2003)
K_m	49	Μ.Δ	46	24	98	32	184	10	5	M.Y	
K_{cat}/K_m	1.14	Μ.Δ	0.69	0,12	0,90	0,86	0,03	0,18	0,28	M.Y	
SPM-1											
K_{cat}	108	117	M.Y	8	38	16	18	33	63	M.Y	(Murphy *et al*, 2003)
K_m	38	72	<0,35	2	46	9	18	37	281	<0,3	
K_{cat}/K_m	2,8	1,6	M.Y	4	0,6	1,9	1	1	0,22	M.Y	

PEN: Βενζυλπενικιλίνη, AMP: αμπικιλλίνη, TIC: τικαρκιλλίνη, FOX: κεφοξιτίνη, CAZ: κεφταζιδίμη, CTX: κεφοταξίμη, CEF: κεφαλοθίνη, IPM: ιμιπενέμη, MEM: μεροπενέμη, ATZ: αζτρεονάμη, Μ.Δ: μη διαθέσιμο, M.Y: μη υπολογισμένη εξαιτίας της πολύ χαμηλής αρχικής ταχύτητας υδρόλυσης και M.K: μη καθορισμένη εξαιτίας της πολύ υψηλής τιμής της K_m.

γεγονός που καθιστά αυτήν ως πιθανό θεραπευτικό αναστολέα για την τάξη αυτών των ενζύμων. Ωστόσο, από μελέτες ζώων με πνευμονία οφειλόμενη σε στελέχη *P. aeruginosa* που παρήγαγαν τη μεταλλο-β-λακταμάση VIM-2, αποδειχτεί η αδυναμία εξάλειψης της λοίμωξης με τη χορήγηση αζτρεονάμης, ακόμη και όταν χορηγούνταν υψηλές δόσεις αυτής (Bellais *et al*, 2002).

Από τις τιμές των κινητικών σταθερών Km, kcat και kcat/Km των μεταλλο-β-λακταμασών GIM-1, IMP-1, VIM-1, VIM-2 και SPM-1 (Πίνακας 1.3) καταδεικνύεται ότι ενώ αυτά τα ένζυμα μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά αναδίπλωσης και δομής του ενεργού κέντρου, η ικανότητά

τους να δεσμεύουν και να υδρολύουν β-λακτάμες ποικίλλει σημαντικά. Το πιο αξιοσημείωτο παράδειγμα αυτού του γεγονότος είναι η διαφορά μεταξύ των ενζύμων VIM-1 και VIM-2, τα οποία δομικά είναι παρόμοια, ωστόσο η μεταλλο-β-λακταμάση VIM-2 έχει την τάση να δεσμεύει τις περισσότερες β-λακτάμες ισχυρότερα από τη VIM-1 με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζεται από σημαντικά χαμηλότερες τιμές Km για τη βενζυλοπενικιλλίνη, την αμπικιλλίνη, τη πιπερακιλλίνη, τη μεζοκιλλίνη, τη τικαρκιλλίνη, τη κεφαλοθίνη, τη κεφοξιτίνη, τη κεφοταξίμη, τη κεφταζιδίμη, τη κεφπιρόμη, τη μοξαλακτάμη και τη μεροπενέμη. Την πιο αξιοσημείωτη εξαίρεση αποτελεί η ιμιπενέμη, όπου η VIM-1 και η VIM-2 έχουν τιμές Km 1.5 μM και 10 μM, αντίστοιχα (Docquier *et al,* 2003β).

Ωστόσο, η μεταλλο-β-λακταμάση VIM-1 είναι ικανή να υδρολύει τις περισσότερες β-λακτάμες (πιπερακιλλίνη, αζλοκιλλίνη, τικαρκιλλίνη, κεφαλοριδίνη, κεφαλοθίνη, κεφουροξίμη, κεφοταξίμη, κεφταζιδίμη, κεφπιρόμη και μεροπενέμη) πιο αποτελεσματικά από τη VIM-2. Χαρακτηριστική εξαίρεση και πάλι αποτελεί η ιμιπενέμη, για την οποία τα ένζυμα VIM-1 και VIM-2 διαθέτουν τιμές για τη σταθερά kcat 0,2/s και 34/s, αντίστοιχα. Ο Docquier και οι συνεργάτες του εικάζουν ότι αυτές οι σημαντικές κινητικές διαφορές οφείλονται σε υποκαταστάσεις αμινοξέων κοντά ή εντός του ενεργού τους κέντρου, και συγκεκριμένα στην αντικατάσταση της His^{224} με Tyr και της Ser^{228} με Arg (Docquier *et al,* 2003β).

Από τον σχετικό πίνακα προκύπτει ότι η μεταλλο-β-λακταμάση SPM-1 υδρολύει αποτελεσματικά τις περισσότερες θεραπευτικές β-λακτάμες και εν γένει είναι ένα πιο αποτελεσματικό ένζυμο (υψηλότερες τιμές kcat/Km) από τις μεταλλο-β-λακταμάσες IMP-1 και GIM-1, με εξαιρέσεις για τη IMP-1 την αμπικιλλίνη, την ιμιπενέμη και τη μοξαλακτάμη (Castanheira *et al,* 2004, Laraki *et al,* 1999). Η SPM-1 δεσμεύει, επίσης, τις κεφαλοσπορίνες και ιδίως τη κεφοξιτίνη, πιο ισχυρά (χαμηλότερες τιμές Km) από τις πενικιλλίνες και τις καρβαπενέμες. Ενώ, η GIM-1 δρα κυρίως ως πενικιλλινάση με μέτρια δραστικότητα έναντι των στενού φάσματος κεφαλοσπορινών και των καρβαπενέμων, αν και δεν δεσμεύει ισχυρά τις περισσότερες β-λακτάμες με εξαίρεση την ιμιπενέμη (Km ίση με 287 μM), τη κεφεπίμη (Km ίση με 431 μM) και τη μοξαλακτάμη (Km ίση με 1,035 μM).

Οι τιμές των κινητικών σταθερών για τις μεταλλο-β-λακταμάσες εγείρουν πολλά ερωτηματικά σχετικά με το γιατί εμφανίζουν τέτοια ποικιλία στην ικανότητα δέσμευσης και υδρόλυση, εφόσον τα εν λόγω ένζυμα είναι δομικά παρόμοια. Για την διερεύνηση του παράδοξου αυτού έχουν διενεργηθεί κινητικές μελέτες προσπαθώντας να αποσαφηνίσουν τον ακριβή καταλυτικό

μηχανισμό των μεταλλο-β-λακταμασών στην δέσμευση και υδρόλυση των β-λακταμικών υποστρωμάτων. Ωστόσο, οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει ως υπόστρωμα το χρωμογόνο υπόστρωμα νιτροσεφίνη, το οποίο φάνηκε εκ των υστέρων να μην αποτελεί τυπικό υπόστρωμα για ορισμένα από τα υπό μελέτη ένζυμα (Spencer *et al*, 2001). Τέλος, πολλές από τις εν λόγω μελέτες έχουν επικεντρωθεί κυρίως στις μεταλλο-β-λακταμάσες BCII και CcrA παρά στα πιο κλινικά ενδιαφέροντα ένζυμα, που κωδικοποιούνται από μεταβιβάσιμα γονίδια (Bounaga *et al*, 1998, Melino *et al*, 1998).

1.2.4 Καρβαπενεμάσες Τάξης D

Ιστορικά, οι πρώτες χαρακτηρισμένες β-λακταμάσες της τάξη D ήταν γνωστές, επίσης και ως Οξακιλλινάσες επειδή συνήθως υδρολύουν την ιζοξαζολυ-πενικιλλίνη, οξακιλλίνη, γρηγορότερα από τις κλασικές πενικιλίνες, όπως είναι η βενζυλο-πενικιλλίνη (Bush *et al*, 1995). Συνεπώς, η ονομασία OXA, της εν λόγω τάξης β-λακταμασών αναφέρεται στο προτιμούμενο είδος πενικιλλίνης που χρησιμοποιούν σαν υπόστρωμα. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 121 διαφορετικοί τύποι β-λακταμασών τάξης D σε πρωτεϊνικό επίπεδο και 45 από αυτές έχουν την ικανότητα να υδρολύουν καρβαπενέμες, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τη δράση των άλλων β-λακταμασών της εν λόγω τάξης.

Από πολλαπλή ομοπαράθεση αλληλουχιών των β-λακταμασών τάξης D, φαίνεται ότι τα εν λόγω ένζυμα φέρουν τρεις κοινές υψηλά συντηρημένες περιοχές στο ενεργό κέντρο τους. Η πρώτη είναι η τετράδα Ser^{70}-X-X-Lys, όπου το X αντιπροσωπεύει ένα μεταβλητό κατάλοιπο, η οποία περιλαμβάνει το κατάλοιπο Ser^{70} του ενεργού κέντρου σύμφωνα με την αρίθμηση των β-λακταμασών της τάξης D (Couture *et al*, 1992). Το δεύτερο στοιχείο, Ser^{118}-X-Val/Ile, είναι ισοδύναμο με το σταθερό μοτίβο Ser-Asp-Asn των β-λακταμασών τάξης A και με το Tyr-Ala/Ser-Asn των β-λακταμασών της τάξης C (AmpC), ενώ το τρίτο συντηρημένο μοτίβο Lys^{216}-Thr/Ser-Gly των β-λακταμασών τάξης D είναι κοινό για τη συντριπτική πλειοψηφία των β-λακταμασών με ενεργό κέντρο σερίνης. Άλλα συντηρημένα μοτίβα β-λακταμασών τάξης D αποτελούν η τριάδα Tyr/Phe^{144}-Gly-Asn και η τετράδα Trp^{232}-XX-Gly, για τα οποία δεν απαντώνται ανάλογα μοτίβα στις β-λακατμάσες των τάξεων A ή C.

1.2.4.1 Ταξινόμηση Καρβαπενεμασών Τάξης D

Τα ένζυμα τύπου OXA που υδρολύουν καρβαπενέμες υποδιαιρούνται σε 8 διαφορετικούς κλάδους ή υποομάδες (Εικόνα 1.7). Οι ομοιότητες των αλληλουχιών μεταξύ των μελών του κάθε κλάδου είναι ≥92,5%, ενώ οι ομοιότητες μεταξύ των ενζύμων που ανήκουν σε διαφορετικούς κλάδους κυμαίνεται από 40 έως 70%. Οι εν λόγω 8 κλάδοι σχετίζονται ελάχιστα με τις Οξακιλλινάσες της τάξης D που δεν διαθέτουν υδρολυτική ικανότητα έναντι των καρβαπενεμών.

Τέσσερις από τους 8 κλάδους έχουν βρεθεί σε στελέχη *A. baumannii* απομονωθέντα στην Ευρώπη, τη Νότια Αμερική, την Ασία και τη Γαλλική Πολυνησία. Ο πρώτος κλάδος αποτελείται από το ένζυμο OXA-23 (γνωστό και ως ARI-1), μαζί με τα OXA-27 και OXA-49 (Donald *et al*, 2000, Afzal-Shah *et al*, 2001). Τα συγκεκριμένα ένζυμα διαφέρουν μεταξύ τους σε δυο με πέντε αμινοξικές υποκαταστάσεις. Ο δεύτερος κλάδος περιλαμβάνει τις β-λακταμάσες OXA-24, -25, -26, -40 και -72 (Bou *et al*, 2000, Afzal-Shah *et al*, 2001, Héritier *et al*, 2003). Οι αποκλίσεις των αλληλουχιών μεταξύ των ενζύμων αυτών κυμαίνονται από 1 έως 5 αμινοξέα.

Ο τρίτος κλάδος αποτελείται από τα ένζυμα της οικογένειας OXA-51, ενώ μόνο ένα μέλος, δηλαδή το OXA-58 αντιπροσωπεύει το τέταρτο κλάδο (Brown *et al*, 2005, Poirel *et al*, 2005β, Brown & Amyes, 2005, Héritier *et al*, 2005). Τα σχετικά πρόσφατα χαρακτηρισμένα ένζυμα της οικογένειας OXA-51 περιλαμβάνουν τις καρβαπενεμάσες OXA-64 έως 66, τις OXA-68 έως 71 και τις OXA-75 έως 78. Τα μέλη αυτής της οικογένειας αποκλίνουν κατά 1 έως 15 αμινοξικές υποκαταστάσεις και εντοπίζονται σε στελέχη *A. baumannii* (Brown & Amyes, 2005, Héritier *et al*, 2005).

Ο πέμπτος κλάδος αντιπροσωπεύεται από τα ένζυμα OXA-55 και OXA-SHE που διαφέρουν κατά πέντε υποκαταστάσεις αμινοξέων και τα γονίδια των οποίων έχουν εντοπιστεί επί του χρωμοσώματος στελεχών *Shewanella algae* (Héritier *et al*, 2004). Το γονίδιο OXA-48, το οποίο έχει βρεθεί εδραζόμενο επί πλασμιδίων σε στελέχη *Klebsiella pneumoniae*, ομαδοποιείται με το OXA-54, που έχει βρεθεί εδραζόμενο επί του χρωμοσώματος της *Shewanella oneidensis*, και σχηματίζουν τον έκτο κλάδο και με τα εν λόγω ένζυμα να διαφέρουν κατά 20 υποκαταστάσεις (Poirel *et al*, 2004γ, Poirel *et al*, 2004δ).

Κατά την πλήρη αλληλούχιση και την in silico ανάλυση του γονιδιώματος του περιβαλλοντικού βακτηριακού στελέχους *Shewanella* SAR-2, που συλλέχθηκε από τη θάλασσα των Σαργάσσων, εντοπίστηκε ένα πιθανό γονίδιο OXA και καθοδικά αυτού ένα lysR (Venter *et*

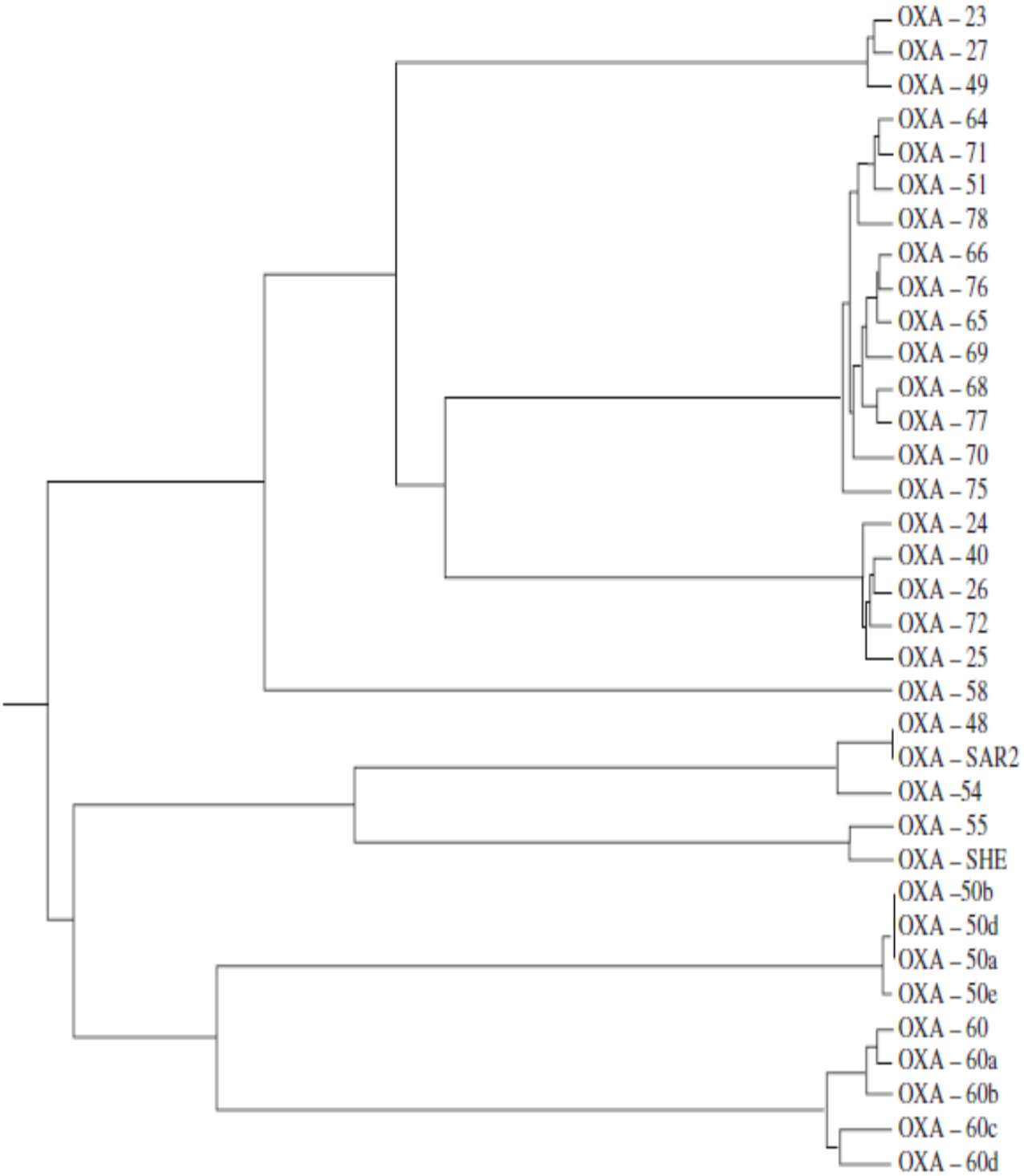
al, 2004). Το ένζυμο OXA-SAR2 διαφέρει από το OXA-48 κατά ένα μόνο αμινοξύ στο αμινοτελικό άκρο αυτού, γεγονός που υποδεικνύει ότι το OXA-SAR2 δύναται να φέρει δράση καρβαπενεμάσης. Με σύγκριση ανάμεσα στα γονίδια OXA-48 και lysR μαζί με τις εκατέρωθεν τους νουκλεοτιδικές αλληλουχίες στην *K. pneumoniae* και στις αντίστοιχες αλληλουχίες στην Shewanella SAR-2 πρόεκυψε ότι οι εν λόγω αλληλουχίες εμφανίζουν ομοιότητα 99,2% (Poirel *et al*, 2004δ). Η υψηλή ομοιότητα πιθανώς υποδεικνύει ότι το γονίδιο OXA-48 προέρχεται από μια OXA β-λακταμάση του γένους Shewanella.

Η υπόθεση αυτή ισχυροποιείται από το γεγονός ότι το γονίδιο OXA-54 έχει περιγραφεί στο γονιδίωμα στελεχών *S. oneidensis*, ενώ πιθανά γονίδια τύπου OXA έχουν βρεθεί κατά την πλήρη αλληλούχιση των *Shewanella baltica* (AAIO01000124), *Shewanella putrefaciens* (NZ_AALB01000094), *Shewanella sp*. ANA-3 (AALH01000006), *Shewanella sp*. MR-7(AALI01000021) και *Shewanella* SAR-1 (CH004559) και SAR-2 (CH004480) (Heidelberg *et al*, 2002, Poirel *et al*, 2004γ). Ωστόσο, εκτός από το πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου OXA-54, δεν είναι γνωστό ακόμα εάν κάποιο τα πρωτεϊνικά προϊόντα των συγκεκριμένων γονιδίων φέρει δράση καρβαπενεμάσης.

Τέλος, οι κλάδοι 7 και 8 αντιπροσωπεύονται από τα ένζυμα των ομάδων OXA-50 στη *P. aeruginosa* και OXA-60 στη *Ralstonia pickettii*, αντίστοιχα (Girlich *et al*, 2004α, Girlich *et al*, 2004β). Τα μέλη της ομάδας OXA-50 διαφέρουν κατά 1 έως 5 υποκαταστάσεις μεταξύ τους, ενώ αυτά της OXA-60 αποκλίνουν το ένα από το άλλο κατά μια 1 έως 21 αμινοξικές υποκαταστάσεις.

1.2.4.2 Προέλευση Καρβαπενεμασών Τάξης D

Οι περιβαλλοντικοί μικροοργανισμοί είναι δυνατόν να φέρουν χρωμοσωμικά εδραζόμενα γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά ως προστασία ενάντια σε μικροοργανισμούς του εδάφους που παράγουν αντιβιοτικά. Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο μικροοργανισμός του εδάφους *Streptomyces cattleya*, είναι ένας φυσικός παραγωγός της ουσίας θιεναμυκίνη, N-φορμιμιδοϋλο-παράγωγο της οποίας είναι η ιμιπενέμη (Núñez *et al*, 2003). Συνεπώς, στελέχη της εδαφικής μικροχλωρίδας που φέρουν γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα υδρόλυσης για τις καρβαπενέμες διαθέτουν ένα εξελικτικό πλεονέκτημα στο εν λόγω περιβάλλον.



Εικόνα 1.7. Φυλογενετικό δέντρο των κυριότερων καρβαπενεμασών τάξης D με τη μέθοδο neighbor joining (Walther-Rasmussen & Høiby, 2006).

Βάσει των εκτιμήσεων των Barlow και Hall τα γονίδια τύπου OXA μετακινηθήκαν από το χρωμόσωμα των εν λόγω μικροοργανισμών σε μεταβιβάσιμα πλασμίδια εδώ και χιλιάδες χρόνια ενώ πιθανώς τα προγονικά γονίδια του εν λόγω τύπου καρβαπενεμασών έπειτα εξαφανίστηκαν (Barlow & Hall, 2002). Το σενάριο αυτό πρόσφατα περιγράφηκε για τα γονίδια των β-λακταμασών τάξης C, γεγονός που ενισχύει τις προαναφερθείσες εκτιμήσεις (Mammeri *et al*, 2003).

Το πρώτο στέλεχος που εξέφραζε μια καρβαπενεμάση τύπου OXA, και συγκεκριμένα την OXA-23, ήταν ένα στέλεχος *A. baumannii* από τη Σκωτία (Paton *et al*, 1993). Το συγκεκριμένο στέλεχος ανακτήθηκε το 1985 πριν την έγκριση της ιμιπενέμης για γενική χρήση. Ομοίως, οι β-λακταμάσες τάξης A με υδρολυτική δράση καρβαπενεμάσης καταγράφηκαν πριν της αδειοδότησης της ιμιπενέμης για κλινική χρήση. Αυτές ήταν οι IMI-1 και SME-1, οι οποίες χαρακτηρίστηκαν από δείγματα που συλλέχθηκαν το 1982 στο Ηνωμένο Βασίλειο και το 1984 στις ΗΠΑ, αντίστοιχα (Rasmussen *et al*, 1996, Yang *et al*, 1990). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η κλινική χρήση της ιμιπενέμης δεν είναι υπεύθυνη για την εξέλιξη των καρβαπενεμασών τάξης D, αλλά τα ένζυμα πιθανώς ήταν παρόντα στα βακτήρια πολύ πριν από τη χρήση αυτής.

1.2.4.3 Βιοχημικές Ιδιότητες Καρβαπενεμασών Τάξης D

Οι καρβαπενεμάσες τύπου OXA περιέχουν 243 έως 260 αμινοξικά κατάλοιπα με πειραματικά προσδιοριζόμενες μοριακές μάζες που ποικίλλουν μεταξύ 23 και 35,5 kDa. Το ένζυμο OXA-69 είναι η πρώτη καρβαπενεμάση τύπου OXA που έχει αποδειχθεί να σχηματίζει διμερές, όπως πολλές οξακιλλινάσες τάξης D (Héritier *et al*, 2005). Τα ισοηλεκτρικά σημεία (pIs) των εν λόγω ενζύμων κυμαίνονται μεταξύ 5,1 και 9,0.

Το ενεργό κέντρο των β-λακταμασών τύπου σερίνης λειτουργεί με ένα απλό μοντέλο τριών βημάτων που περιλαμβάνει ακυλίωση και απακυλίωση, όπως φαίνεται σχηματικά κάτωθι:

$$\mathrm{S} + \mathrm{E} \underset{k_{+1}}{\overset{k_{-1}}{\leftrightarrows}} \mathrm{ES} \underset{k_{+2}}{\overset{k_{-2}}{\leftrightarrows}} \mathrm{E{-}S^*} \xrightarrow{k_{+3}} \mathrm{E} + \mathrm{P}$$

Στο πρώτο βήμα, η β-λακταμάση (E) και το υπόστρωμα (S) αλληλεπιδρούν σε ένα σύμπλοκο Henri–Michaëlis (ES), το οποίο μπορεί είτε να διαχωριστεί ή να σχηματίσει ένα παροδικό ακυλο-ενζυμικό ενδιάμεσο (E-S*). Το εν λόγω ενδιάμεσο σχηματίζεται ως αποτέλεσμα της πυρηνόφιλης προσβολής στο καρβονυλικό άτομο του άνθρακα του β-λακταμικού δακτυλίου από το γ-O της Ser^{70} και αυτό το ενδιάμεσο στη συνέχεια απακυλιώνεται ταχέως απελευθερώνοντας ένα προϊόν ανοικτού β-λακταμικού δακτυλίου (P) και το ακέραιο ένζυμο. Ο μηχανισμός τριών-βημάτων ακυλίωσης-απακυλίωσης είναι όμοιος σε όλες τις β–λακταμάσες που έχουν στο ενεργό τους κέντρο σερίνη, αλλά το καταλυτικό μονοπάτι των β-λακταμασών τάξης D διαφέρει από εκείνο των β-λακταμασών των τάξεων A και C (Paetzel *et al*, 2000).

Στη παραπάνω εξίσωση οι k_{+1}, k_{-1}, k_{+2}, k_{-2} και k_{+3} είναι σταθερές. Συγκεκριμένα, η ακυλίωση, εκπροσωπούμενη από τη k_{+2} και η απακυλίωση εκπροσωπούμενη από τη k+3 είναι συνήθως ταχεία βήματα έχοντας ως αποτέλεσμα υψηλό ρυθμό μετατροπής [$kcat=(k_{+2}\bullet k_{+3})/(k_{+2}+k_{+3})$] καθώς επίσης και υψηλή καταλυτική αποδοτικότητα [$kcat/Km=(k_{+1}\bullet k_{+2})/(k_{+1}+k_{+2})$] (Matagne *et al*, 1998). Ο ρυθμός ακυλίωσης (σχηματισμός του ενδιάμεσου ακυλο-ενζύμου) αντιπροσωπεύεται από το παράγοντα kcat/Km, ενώ ο αριθμός μετατροπής (turnover), από το παράγοντα kcat και αντιστοιχεί στο ρυθμό απακυλίωσης (Matagne *et al*, 1998).

Οι κινητικές σταθερές kcat και Km έχουν προσδιοριστεί για ένα αριθμό καρβαπενεμασών τύπου OXA (Πίνακας 1.4). Οι πολύ χαμηλές τιμές των εν λόγω σταθερών δύναται να οδηγήσουν σε υψηλή τιμή του λόγου kcat/Km (φαινομενικά υψηλή καταλυτική απόδοση), αλλά σε συνδυασμό οι παράγοντες kcat και kcat/Km αντικατοπτρίζουν την πραγματική καταλυτική αποτελεσματικότητα της β-λακταμάσης έναντι των β-λακταμικών αντιβιοτικών (Matagne *et al*, 1998).

Ακόμη και με μια εξαιρετικά χαμηλή τιμή της σταθεράς kcat για την υδρόλυση κάποιας β-λακτάμης, δύναται η εν λόγω υδρόλυση να είναι αποτελεσματική *in vivo* αφού οι μικροοργανισμοί δύναται να παράγουν εξαιρετικά μεγάλες περιπλασμικές συγκεντρώσεις β-λακταμασών (μέχρι 1 mM) (Galleni *et al*, 1988). Καθώς η μέγιστη εφικτή ταχύτητα για την αποικοδόμηση των β-λακταμικών αντιβιοτικών (Vmax) είναι ίση με το προϊόν της kcat και τη συγκέντρωση του ενζύμου $[E]_0$ ($Vmax=kcat\bullet[E]_0$, η χαμηλή τιμή της Kcat μπορεί να αντισταθμιστεί από την υψηλή τιμή της $[E]_0$ (Galleni *et al*, 1988). Εάν συνυπάρχει η έλλειψη μια συγκεκριμένης πορίνης παρεμποδίζοντας και τη διείσδυση του αντιβιοτικού στα βακτήρια αυτά

στελέχη, ένα μεγάλο μέρος του εισερχόμενου β-λακταμικού αντιβιοτικού δύναται να αποικοδομηθεί με αποτέλεσμα να οδηγήσει σε ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό.

Πίνακας 1.4. Κινητικές παράμετροι σταθερής κατάστασης, Kcat (S^{-1}), Km (μM) και Kcat/ Km ($mM^{-1}s^{-1}$) για την *in vitro* υδρόλυση διαφόρων β-λακταμικών αντιβιοτικών από τις καρβαπενεμάσες τάξης D.

Ένζυμο	PEN	AMP	PIP	TIC	CEF	LOR	OXA	CTX	CAZ	IPM	MEM	
OXA-40												
K_{cat}	5	5	1	1	3	5	2	Μ.Δ	20	0,1	Μ.Δ	(Héritier *et al*, 2003)
K_{cat}/K_m	220	20	50	20	50	5	0,03	Μ.Δ	10	15	Μ.Δ	
OXA-48												
K_{cat}	245	340	75	45	3	2	25	10	4	2	0,1	(Poirel *et al*, 2004δ)
K_{cat}/K_m	6100	65	185	820	150	75	830	58	1	145	0,5	
OXA-50												
K_{cat}	110	<3	<2	<0,1	0,2	<2	<0,2	Μ.Δ	Μ.Δ	0,1	<0,02	(Girlich *et al*, 2004α)
K_{cat}/K_m	140	<3	<2	<0,1	<1	<2	<0,2	Μ.Δ	Μ.Δ	5	<0,02	
OXA-54												
K_{cat}	120	540	20	30	3	1	35	15	Μ.Υ	1	0,1	(Poirel *et al*, 2004γ)
K_{cat}/K_m	2000	125	85	125	15	20	500	10	Μ.Υ	250	1	
OXA-55												
K_{cat}	4	8	3	1	0,6	10	5	Μ.Δ	2	0,1	0,05	(Héritier *et al*, 2004)
K_{cat}/K_m	160	15	30	50	10	15	10	Μ.Δ	0,5	5	0,1	
OXA-58												
K_{cat}	5,5	1	2,5	1	0,1	Μ.Δ	1,5	Μ.Δ	Μ.Δ	0,1	<0,01	(Poirel *et al*, 2005β)
K_{cat}/K_m	110	8	50	4	1	Μ.Δ	2	Μ.Δ	Μ.Δ	13,5	<0,15	
OXA-60												
K_{cat}	420	60	>300	200	Μ.Δ	>0,5	>130	Μ.Δ	2	0,5	Μ.Δ	(Girlich *et al*, 2004β)
K_{cat}/K_m	11350	190	<150	520	Μ.Δ	<0,5	<65	Μ.Δ	2	260	Μ.Δ	
OXA-69												
K_{cat}	0,2	0,06	0,2	0,3	0,004	0,05	0,2	Μ.Δ	Μ.Δ	0,1	0,06	(Héritier *et al*, 2005)
K_{cat}/K_m	0,28	0,25	0,11	0,05	0,02	0,02	0,06	Μ.Δ	Μ.Δ	0,03	0,01	

PEN: Βενζυλπενικιλίνη, AMP: αμπικιλλίνη, PIP: πιπερακιλλίνη, TIC: τικαρκιλλίνη, CEF: κεφαλοθίνη, LOR: κεφαλοριδίνη, OXA: οξακιλλίνη, CTX: κεφοταξίμη, CAZ: κεφταζιδίμη, IPM: ιμιπενέμη, MEM: μεροπενέμη, Μ.Δ: μη διαθέσιμο, Μ.Υ: μη υπολογισμένη εξαιτίας της πολύ χαμηλής αρχικής ταχύτητας υδρόλυσης και Μ.Κ: μη καθορισμένη εξαιτίας της πολύ υψηλής τιμής της Km.

Φαινοτυπικά, πολλές από τις β-λακταμάσες τάξης D ανήκουν στην υποομάδα 2d κατά Bush, η οποία απαρτίζεται από ένζυμα που υδρολύουν την οξακιλλίνη σε ποσοστό >50% από ότι τη βενζυλπενικιλλίνη (Bush *et al*, 1995). Ωστόσο, οι περισσότερες καρβαπενεμάσες τύπου OXA υδρολύουν την οξακιλλίνη με πολύ χαμηλότερο ρυθμό. Μόνο οι OXA-25, OXA-26, OXA-55 και τα ένζυμα που περιγράφηκαν από τους Hornstein, Afzal-Shah και τους συνεργάτες τους υδρολύουν την οξακιλλίνη σε ποσοστό >50% από ότι τη βενζυλπενικιλλίνη και, συνεπώς, πληρούν τη συνθήκη για την κατάταξη τους στην υποομάδας 2d των β λακταμασών (Afzal-Shah *et al*, 2001, Héritier *et al*, 2004, Hornstein *et al*, 1997, Afzal-Shah *et al*, 1999).

Οι ειδικότητες για τα διάφορα β-λακταμικά υποστρώματα των καρβαπενεμασών τύπου OXA ποικίλλουν. Γενικά, τα εν λόγω ένζυμα υδρολύουν τις πενικιλλίνες (βενζυλπενικιλλίννη, αμπικιλλίνη, πιπερακιλλίνη και τικαρκιλλίνη) και τις κεφαλοσπορίνες στενού φάσματος (κεφαλοτίνη και κεφαλοριδίνη), ενώ οι εκτεταμένου φάσματος β-λακτάμες (κεφταζιδίμη και κεφοταξίμη) και η αζτρεονάμη υδρολύονται ελάχιστα ή καθόλου.

Οι περισσότερες καρβαπενεμάσες τύπου OXA έχουν χαμηλή υδρολυτική ικανότητα έναντι της ιμιπενέμης και ιδιαίτερα έναντι της μεροπενέμης, ωστόσο σχεδόν όλες οι καρβαπενεμάσες τύπου OXA παρουσιάζουν υψηλότερη συγγένεια (χαμηλότερη Km) για την ιμιπενέμη από ότι για οποιαδήποτε άλλο β-λακταμικό αντιβιοτικό. Οι OXA-48 και OXA-54 καρβαπενεμάσες υδρολύουν την ιμιπενέμη σε επίπεδα σημαντικά υψηλότερα από εκείνα των άλλων καρβαπενεμασών τύπου OXA (Πίνακας 4). Οι κινητικές παράμετροι αυτών ένζυμων για την ιμιπενέμη είναι παρόμοιες με εκείνες των ψευδαργύρο-εξαρτώμενων καρβαπενεμασών, L1e, VIM-1 και JOHN-1 (Avison *et al*, 2001, Docquier *et al*, 2003β, Naas *et al*, 2003).

Σε γενικές γραμμές, οι β-λακταμάσες τάξης D αναστέλλονται λιγότερο αποτελεσματικά από το κλαβουλανικό οξύ σε σχέση με την πλειοψηφία β-λακταμασών της ομάδας 2 στην οποία ανήκουν τα ένζυμα τάξης D, ωστόσο τα εν λόγω ενζυμα αναστέλλονται πιο αποτελεσματικά από την ταζοβακτάμη. Ένα κλασικό χαρακτηριστικό των περισσότερων β-λακταμασών της τάξης D είναι η αναστολή από το NaCl, η οποία αποδίδεται στην παρουσία ενός καταλοίπου Tyr στο μοτίβο Tyr^{144}-Gly-Asn (Héritier *et al*, 2003). Αντιθέτως, οι OXA β-λακταμάσες που φέρουν το μοτίβο Phe-Gly-Asn (OXA-23, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-40, OXA-49 και OXA-72) αναστέλλονται ασθενώς ή καθόλου από το NaCl. Παραδόξως, η OXA-24 φέρει το μοτίβο Phe-Gly-Asn αλλά αναστέλλεται από το NaCl (Bou *et al*, 2000).

1.2.4.4 Σχέση Δομής και Λειτουργιάς Καρβαπενεμασών Τάξης D

Οι κρυσταλλικές δομές των πρωτότυπων β-λακταμασών τάξης D, OXA-1, OXA-2 και OXA-10 έχουν αποσαφηνιστεί (Paetzel *et al*, 2000, Sun *et al*, 2003). Παρά τις μεγάλες εξελικτικές αποστάσεις μεταξύ των τριών εν λόγω ενζύμων (ομοιότητες μεταξύ 23,3 και 33,7%), οι τρισδιάστατες δομές τους είναι παρόμοιες (Sun *et al*, 2003). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι οι δομές των καρβαπενεμασών τύπου OXA μοιάζουν πολύ με την δομή των οξακιλλινασών της τάξης D.

Η κρυσταλλική δομή της οξακιλλινάσης OXA-13 συνδεδεμένη με μεροπενέμη έχει ήδη αναφερθεί, αποδεικνύοντας ότι η σύνδεση της μεροπενέμης στο αποενζύμο οδηγεί σε μετατόπιση κάποιων καταλοίπων και βρόγχων του ενζύμου και ειδικά της απαραίτητης για τη κατάλυση Ser^{118} (Pernot *et al*, 2001). Ωστόσο, η OXA-13 αδυνατεί να υδρολύσει τη μεροπενέμη, εξαιτίας της μεγάλης απόσταση μεταξύ του καταλυτικού μορίου ύδατος του ενζύμου και του ακυλοκαρβονυλίου της μεροπενέμης (Pernot *et al*, 2001).

Επί του παρόντος, δεν είναι γνωστό ποια αμινοξικά κατάλοιπα διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο για τη δράση καρβαπενεμάσης στις καρβαπενεμάσες τύπου OXA. Πολλαπλές ομοπαραθέσεις των αλληλουχιών β-λακταμασών τάξης D αποκάλυψε ότι μερικά κατάλοιπα κοινά για όλες τις καρβαπενεμάσες τύπου OXA ήταν, επίσης, παρόν στην ίδια θέση σε μερικές οξακιλλινάσες της τάξης D, οι οποίες δεν παρουσιάζουν δράση καρβαπενεμάσης. Κατά συνέπεια, φαίνεται ότι τα εν λόγω κατάλοιπα δεν είναι αποκλειστικά υπεύθυνα για δράση καρβαπενεμάσης των καρβαπενεμασών τύπου OXA. Μάλλον, φαίνεται πιθανότερο ότι συγκεκριμένα κατάλοιπα στα ένζυμα δύναται να αλληλεπιδρούν με τρόπο που προκαλεί μια συγκεκριμένη τοπική διαμόρφωση του ενεργού κέντρου οδηγώντας σε μια σωστή τοποθέτηση του καταλυτικού μορίου νερού και, κατά συνέπεια, στην υδρόλυση των καρβαπενεμών από τις καρβαπενεμάσες τύπου OXA.

1.2.4.5 Γενετικό Περιβάλλον Γονιδίων των Καρβαπενεμασών Τάξης D

Στα κλινικά στελέχη, τα γονίδια που κωδικοποιούν τις καρβαπενεμάσες της τάξης D συνήθως εδράζονται επί πλασμιδίων ενσωματωμένα σε γονιδιακές κασέτες ιντεγκρονίων (Fluit & Schmitz, 2004). Μεταξύ των γονιδίων που κωδικοποιούν καρβαπενεμάσες τύπου OXA, μόνο τα γονίδια των OXA-23, OXA-40 και OXA-58 σε στελέχη *A. baumannii* και το γονίδιο OXA-48 σε

στελέχη *K. pneumoniae* εδράζονται επί πλασμιδίων. Ωστόσο κανένα από τα εν λόγω γονίδια δεν έχει βρεθεί να πλαισιώνεται από τα χαρακτηριστικά στοιχειά των 59 βάσεων και κατ' επέκταση να αποτελεί μέρος γονιδιακής κασέτας ιντεγκρονίων. Αντιθέτως, τα γονίδια OXA-23, OXA-48, OXA-58 και OXA-27 έχουν συσχετιστεί συχνά με αλληλουχίες ένθεσης (IS).

Συγκεκριμένα, ανοδικά του γονιδίου OXA-48 έχει εντοπιστεί η αλληλουχία ένθεσης IS1999, ενώ δύο ελαφρώς διαφορετικά αντίγραφα της αλληλουχία ένθεσης ISAba3 έχουν βρεθεί εκατέρωθεν του γονιδίου OXA-58 σχηματίζοντας ένα σύνθετο τρανσποζόνιο (Poirel *et al*, 2004δ, Poirel *et al*, 2005β). Ωστόσο, το πλασμιδιακά μεταφερόμενο γονίδιο OXA-40 δεν βρέθηκε να συσχετίζεται με μεταθετά στοιχεία. Η συσχέτιση των γονιδίων αυτών με μεταθετά στοιχειά δύναται να προκαλέσει την αύξηση της έκφρασης τους, όπως αποδείχτηκε για το γονιδίου VEB-1 ενός στελέχους *P. aeruginosa* πλαισιωμένο από αντίθετου προσανατολισμού IS1999 αλληλουχίες ένθεσης (Aubert *et al*, 2003).

Το γενετικό περιβάλλον του γονιδίου OXA-23 χαρακτηρίστηκε από το Donald και τους συνεργάτες του διενεργώντας *in silico* ανάλυση στις εκατέρωθεν του γονιδίου αλληλουχίες και αποδεικνύοντας ότι η αλληλουχία ανοδικά του γονιδίου OXA-23 χαρακτηρίζονταν από 99,3% ομοιότητα με την αλληλουχία, ένθεσης ISAba1, η οποία είχε περιγραφεί (Donald *et al*, 2000, Segal *et al*, 2005). Η συγκεκριμένη ισομορφή του ISAba1 διέφερε ελαφρώς στο γονίδιο tnp και στις αριστερές ανάστροφες επαναλήψεις (IR-L) και έτσι η παραλλαγή αυτή ονομάστηκε ISAba1-B. Συγκεκριμένα, η νουκλεοτιδική αλληλουχία του ISAba1-B περιελάμβανε μια απαλοιφή στο 5΄ άκρο του γονιδίου tnp και πέντε νουκλεοτιδικές αλλαγές σε σύγκριση με το ISAba1, με αποτέλεσμα την πρόωρη καταστολή της μετάφρασης του γονιδίου OXA-23. Καθώς ο προσανατολισμός του ISAba1-B είναι αντίστροφος σε σύγκριση με αυτόν του γονίδιου OXA-23, το IR-L είναι στην ίδια κατεύθυνση με το 5΄ άκρο του εν λόγω γονιδίου. Το IR-L του ISAba1-B έχει αναγνωριστεί ανοδικά των γονιδίων OXA-23 και OXA-27. Το ISAba1 σχετίζεται με την ετερογενή οικογένεια αλληλουχιών ένθεσης IS4.

Οι αλληλουχίες, συμπεριλαμβανομένων των IR-L και ISAba1-B, ανοδικά των γονιδίων OXA-23 και OXA-27 που απομονώθηκαν από την Ασία είναι πανομοιότυπες (Afzal-Shah *et al*, 2001). Στις αντίστοιχες αλληλουχίες που απομονώθηκαν από το Ηνωμένο Βασίλειο, παρατηρήθηκε μια έλλειψη επτά νουκλεοτιδίων στο εξωτερικό όριο του IR-L, εντούτοις εκτός από αυτή την έλλειψη η υπόλοιπη αλληλουχία στην περιοχή μεταξύ του IR-L και του γονιδίου OXA-23 είναι πανομοιότυπη (Donald *et al*, 2000). Τα πρώτα 75 νουκλεοτίδια καθοδικά των γονιδίων OXA-23

και OXA-27 είναι τελείως όμοιες, γεγονός που ίσως υποδηλώνει ότι τα γονίδια από την Ασία και το Ηνωμένο Βασίλειο έχουν μετακινηθεί από τον ίδιο άγνωστο πρόγονο.

Τα περισσότερα γονίδια καρβαπενεμασών τύπου OXA στο *A. baumannii* αν και είναι χρωμοσωμικά εντούτοις δεν φαίνεται να αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι του γενετικού υποβάθρου στο εν λόγω είδος. Το ποσοστό σε G+C των γονιδίων της οικογένειας OXA-51 ποικίλει από 39 έως 40%, ποσοστό που εμπίπτει εντός του εύρους του ποσοστού G+C των γονίδιων στελεχών *A. baumannii* (Bergogne-Bérézin & Towner, 1996). Η συγκεκριμένη οικογένεια γονιδίων φαίνεται να απουσιάζει από κάποια στελέχη *A. baumannii* και ίσως αυτό δείχνει ότι τα γονίδια δεν είναι πάντοτε παρόντα στο εν λόγω είδος, αλλά βρίσκονται μάλλον σε κάποιους υποπληθυσμούς αυτού. Εκτός από την οικογένεια γονιδίων OXA-51, τα ποσοστά σε G+C των άλλων γονιδίων τύπου OXA στο *A.baumannii* ποικίλει μεταξύ 34 και 38% υποδεικνύοντας ότι τα γονίδια αυτά έχουν εξελιχθεί σε άλλα είδη και εν συνεχεία ενσωματώθηκαν στο χρωμόσωμα στελεχών *A. baumannii*. Ωστόσο, κάποια από αυτά τα γονίδια δεν έχει βρεθεί να σχετίζονται με ιντεγκρόνια ή αλληλουχίες ένθεσης (Bou *et al*, 2000, Héritier *et al*, 2003).

Πειράματα επαγωγής με ιμιπενέμη για την παραγωγής της OXA-60 σε στελέχη *R. piccketti* απέδειξαν την αύξηση της βιοσύνθεσης του εν λόγω ενζύμου παρουσία ιμιπενέμης (Girlich *et al*, 2004β). Ωστόσο, η επαγωγή της OXA-50 σε στελέχη *P. aeruginosa* και της OXA-69 σε στελέχη *A. baumannii* απέτυχε παρουσία είτε ιμιπενέμης είτε κεφοξιτίνης (Girlich *et al*, 2004α, Héritier *et al*, 2005). Συγκεκριμένα, την αποτυχία της επαγωγή της OXA50 στη *P. aeruginosa* αιτιολογούν τα ευρήματα του Kong και των συνεργατών του αποδεικνύοντας ότι σύνθεση της OXA-50 καταστέλλεται από τον AmpR, έναν επαγωγέα της AmpC β-λακταμάσης τύπου LysR (Kong *et al*, 2005, Hanson & Sanders, 1999). Παρουσία, λοιπόν, β-λακταμικών αντιβιοτικών η έκφραση του OXA50 ενζύμου είναι μειωμένη σε σχέση με αυτή απουσία β-λακταμικών αντιβιοτικών (Kong *et al*, 2005). Ο παράγοντας AmpR ρυθμίζει, επίσης, την έκφραση και άλλων γονιδίων τα οποία δεν σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στα β-λακταμικά αντιβιοτικά (Kong *et al*, 2005). Ωστόσο, δεν μπορεί να αποκλειστεί εντελώς η πιθανότητα ότι η παραγωγή των καρβαπενεμασών τύπου OXA σε στελέχη *A. baumannii* και *S. oneidensis* δύναται να ρυθμίζεται από άλλους LysR παράγοντες. Εναλλακτικά, η επαγωγή ίσως διαμεσολαβείτε από μη β-λακταμικά αντιβιοτικά όπως διενεργείται με την επαγωγή άλλων β-λακταμασών (Cullmann *et al*, 1984, Dalhoff & Cullmann, 1984).

Σε στελέχη των ειδών *S. oneidensis* και *S. algae*, τα γονίδια των OXA-54, OXA-55 και OXA-SHE φέρουν καθοδικά μεταγραφόμενα γονίδια που κωδικοποιούν πιθανούς μεταγραφικούς παράγοντες τύπου LysR, εντούτοις δεν υπάρχουν πειράματα επαγωγής όπου αποδεικνύουν την εμπλοκή μεταγραφικών παραγόντων στην έκφραση των γονιδίων τύπου OXA (Poirel *et al*, 2004γ). Αν και η απόπειρα επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης του γονιδίου OXA-54 παρουσία είτε ιμιπενέμης είτε κεφοξιτίνης απέτυχε, όπως έχει ήδη αναφερθεί (Poirel *et al*, 2004γ, Héritier *et al*, 2004).

Δεν δύναται να αποκλειστεί ότι τα γονιδιακά προϊόντα των γονιδίων LysR που βρίσκονται καθοδικά από τα γονίδια τύπου OXA στα είδη *S. oneidensis* και *S. algae* δρουν με παρόμοιο τρόπο όπως το AmpR στο είδος *P. aeruginosa*. Ωστόσο στα είδη *A. baumannii* και *R. pickettii*, δεν έχει βρεθεί κανένα ρυθμιστικό γονίδιο καθοδικά των γονίδιων τύπου OXA.

1.3 Μοριακές Μέθοδοι Τυποποίησης

Ο προσδιορισμός των διαφόρων τύπων ενός οργανισμού εντός ενός συγκεκριμένου είδους ονομάζεται τυποποίηση. Τα παραδοσιακά συστήματα τυποποίησης που βασίζονται στο φαινότυπο, όπως η οροτυπία, η βιοτυπία και η φαγοτυπία, ή στο αντιβιόγραμμα χρησιμοποιήθηκαν για πολλά χρόνια, ωστόσο, οι μέθοδοι που εξετάζουν τη συγγένεια διαφόρων στελεχών σε μοριακό επίπεδο προσφέρουν πλέον την ικανότητά να διακρίνουμε εύκολα τους βακτηριακούς τύπους (ή υποτύπους). Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου (ή μεθόδων) μοριακής τυποποίησης εξαρτάται σημαντικά από το προς επίλυση πρόβλημα, το επιδημιολογικό πλαίσιο στο οποίο η μέθοδος πρόκειται να χρησιμοποιηθεί, καθώς και από το χρόνο και τη γεωγραφική κλίμακα όπου θα χρησιμοποιηθεί η εν λόγω μέθοδος. Τα ανθρώπινα παθογόνα ενός συγκεκριμένου είδους μπορεί να περιλαμβάνει πολύ διαφορετικούς οργανισμούς, ως εκ τούτου οι τυποποιητικές τεχνικές θα πρέπει να έχουν άριστη ικανότητα τυποποίησης ώστε να είναι σε θέση να διακρίνει όλα τα υπό μελέτη στελέχη (Struelens, 1996). Σε μελέτες επιδημιών, η τυποποιητική μέθοδος πρέπει να έχει τη διακριτική ικανότητα που απαιτείται για να διακρίνει όλα τα επιδημιολογικώς μη σχετιζόμενα στελέχη. Ιδανικά, μια τέτοια μέθοδος μπορεί να διακρίνει πολύ στενά σχετιζόμενα στελέχη ώστε να διερευνηθεί η μετάδοση στελέχους από πρόσωπο σε πρόσωπο, το οποίο είναι σημαντικό ώστε να αναπτυχθούν στρατηγικές για την πρόληψη της περαιτέρω εξάπλωσης. Εν τω παραλλήλω, πρέπει να είναι ταχεία, φθηνή,

ιδιαιτέρως αναπαραγώγιμη και εύκολη στην εκτέλεση και την ερμηνεία (Struelens, 1996, van Belkum *et al*, 2007). Μέχρι σήμερα, έχουν αναπτυχθεί πολλές διαφορετικές μοριακές μέθοδοι για την επιδημιολογική τυποποίηση των βακτηριακών στελεχών και οι σημαντικότερες αναλύονται παρακάτω.

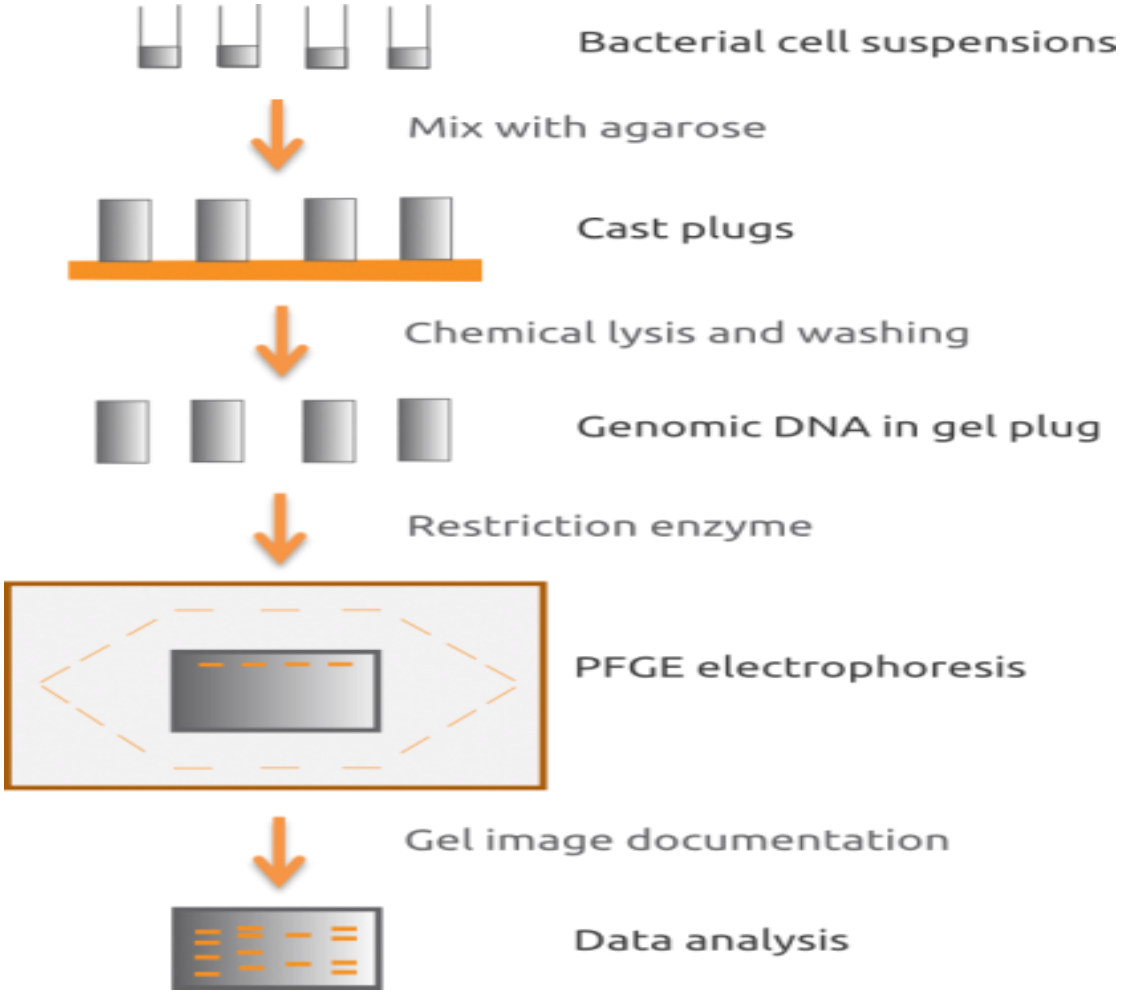
1.3.1 Ηλεκτροφόρηση Παλλόμενου Ηλεκτρικού Πεδίου (PFGE)

Η ηλεκτροφόρηση σε γέλη υπό την επίδραση παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου (PFGE) έχει θεωρηθεί ως το «χρυσό πρότυπο» μεταξύ των μοριακών μεθόδων τυποποίησης για μία πλειάδα κλινικά σημαντικών βακτηριακών ειδών (Εικόνα 1.8). Για τα περισσότερα βακτηριακά είδη, η εν λόγω τεχνική υιοθετήθηκε ως εργαλείο επιδημιολογικής επιτήρησης στη δεκαετία του 1990 (Arbeit *et al*, 1999, Prévost *et al*, 1991, Gordillo *et al*, 1993, Tenover *et al*, 1995). Σήμερα, εξακολουθεί να είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη προσέγγιση για την διερεύνηση βακτηριακών στελεχών σε επιδημίες (Tosh *et al*, 2011, Yu *et al*, 2012). Για πολλά χρόνια, η PFGE υπήρξε το πρωταρχικό εργαλείο τυποποίησης για την διερεύνηση της μετάδοσης από νοσοκομείο σε νοσοκομείο παθογόνων στελεχών, ενώ έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε μεγάλης κλίμακας επιδημιολογικές μελέτες (McDougal *et al*, 2003).

Η PFGE είναι μια σχετικά φθηνή προσέγγιση με την επιτυχία της να οφείλεται στην εξαιρετική διακριτική της ικανότητα και στην ενδοεργαστηριακή της επαναληψιμότητα. Κατά την τελευταία δεκαετία, τα πρωτόκολλα για την PFGE έχουν προτυποποιηθεί ενώ κατέστησαν δυνατές και οι διεργαστηριακές συγκρίσεις μέσω πρωτοβουλιών, όπως το PulseNet ή το Harmony (Swaminathan *et al*, 2001, Murchan *et al*, 2003). Επίσης κατεστεί δυνατό να δημιουργηθούν διεθνείς βάσεις αποτυπωμάτων, γεγονός που επέτρεψε τον γρήγορο εντοπισμό νεοεμφανιζόμενων κλώνων και την παρακολούθηση της εξάπλωσης των παθογόνων βακτηριακών στελεχών σε διαφορετικές περιοχές ή χώρες.

Για τη διενέργεια της PFGE, ένα εξαιρετικά καθαρισμένο γενωμικό δείγμα DNA διασπάται με μία ενδονουκλεάση περιορισμού που αναγνωρίζει σπάνια εμφανιζόμενες θέσεις περιορισμού στο γονιδίωμα των αντίστοιχων βακτηριακών ειδών. Τα προκύπτοντα θραύσματα περιορισμού, τα οποία κατά βάση είναι μεγάλα, μπορούν να διακριθούν σε ένα πήκτωμα αγαρόζης με ηλεκτροφόρηση υπό παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίου, κατά την οποία ο προσανατολισμός του ηλεκτρικού πεδίου κατά μήκος του πηκτώματος μεταβάλλεται περιοδικά. Τα διαχωρισμένα θραύσματα DNA μπορούν να απεικονιστούν στο πήκτωμα ως ζωνώσεις, οι οποίες σχηματίζουν

ένα συγκεκριμένο ηλεκτροφορητικό μοτίβο επί της γέλης, το PFGE μοτίβο. Για τια περισσότερα βακτηριακά είδη η PFGE δύναται να παράγει θραύσματα με μεγέθη που κυμαίνονται από περίπου 30 kb έως πάνω από 1 Mb (Goering, 2010). Τα εν λόγω θραύσματα περιορισμού έτσι διαχωρίζονται με ένα μεγεθοεξαρτώμενο τρόπο και η μέθοδος αποδίδει σχετικά λίγες ζώνες στη γέλη, πράγμα που καθιστά την ανάλυση των αποτελεσμάτων ευκολότερη.



Εικόνα 1.8. Σχηματική αναπαράσταση ηλεκτροφόρησης σε γέλη υπό την επίδραση παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου (PFGE).

Ένα σαφές πλεονέκτημα της PFGE είναι ότι λαμβάνει υπόψη ένα μεγάλο τμήμα του γονιδιώματος (>90%). Συνεπώς, οι ενθέσεις ή οι ελλείψεις κινητών γενετικών στοιχείων, καθώς και τα μεγάλα γεγονότα ανασυνδυασμού εντός του γονιδιωματικού DNA οδηγούν σε αλλαγές στα ηλεκτροφορητικά μοτίβα της PFGE. Συνήθως, το πλασμιδιακό DNA δεν παρεμβαίνει στα ηλεκτροφορητικά προφίλ του χρωμοσωμικού DNA, καθώς τα θραύσματα που δημιουργούνται

με την κατάτμηση του πλασμιδίου DNA είναι πολύ μικρές για να επηρεάσουν το ηλεκτροφορητικό προφίλ.

Ωστόσο, σε ορισμένα βακτηριακά στελέχη, η παρουσία μεγάλων πλασμιδίων (πάνω από 50 kb) επιφέρει μία ζώνωση διαφορά μεταξύ των αντιστοίχων ηλεκτροφορητικών προφίλ της PFGE (Goering, 2010). Δυστυχώς, αν και η PFGE χρησιμοποιείται ευρέως, χαρακτηρίζεται από αρκετούς περιορισμούς. Η μέθοδος είναι τεχνικά απαιτητική, εργώδης και χρονοβόρα, ενώ αδυνατεί να διακρίνει ζωνώσεις σχεδόν ταυτόσημου μεγέθους (δηλαδή θραύσματα που διαφέρουν μεταξύ τους στο μέγεθος κατά λιγότερο από 5%). Τέλος, η ανάλυση των αποτελεσμάτων της PFGE είναι επιρρεπής σε κάποια υποκειμενικότητα, ενώ ο συνεχής έλεγχος της ποιότητας και η διασπορά των δεδομένων είναι περιορισμένα σε σύγκριση με τις μεθόδους που βασίζονται στην αλληλουχία.

1.3.2 Πολυμορφισμός Μήκους Ενισχυόμενων Τμημάτων DNA (AFLP)

Στη μέθοδο πολυμορφισμού μήκους των ενισχυόμενων τμημάτων (AFLP), το γονιδιωματικό DNA κατατμείται με δύο ένζυμα περιορισμού και διπλής έλικας προσαρμογείς συνδέονται ειδικά σε ένα από τα κολλώδη άκρα των θραυσμάτων περιορισμού (Vos *et al*, 1995). Στη συνέχεια, τα θραύσματα περιορισμού που τελειώνει με τον προσαρμογέα ενισχύονται επιλεκτικά με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας εκκινητές συμπληρωματικούς ως προς την αλληλουχία του προσαρμογέα, την αλληλουχία της θέσης περιορισμού και έναν αριθμό πρόσθετων νουκλεοτιδίων (συνήθως 1-3 νουκλεοτίδια) από το άκρο του αγνώστου πρότυπου DNA. Κατά την έναρξη της ενίσχυσης, χρησιμοποιούνται πολύ αυστηρές συνθήκες για να εξασφαλιστεί η αποτελεσματική σύνδεση των εκκινητών σε πλήρως συμπληρωματικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων του προτύπου.

Η AFLP επιτρέπει την ειδική συνενίσχυση υψηλού αριθμού (τυπικά μεταξύ 50 και 100) θραυσμάτων περιορισμού και συχνά διενεργείται με σημασμένους με φθορίζουσα χρωστική εκκινητές. Αυτό επιτρέπει την ανίχνευση των θραυσμάτων αφού έχουν διαχωριστεί κατά μέγεθος σε μια αυτοματοποιημένη συσκευή αλληλούχησης DNA. Σχετικά πρόσφατα, έχει προταθεί μία υποβοηθούμενη από υπολογιστή σύγκριση των μοτίβων των φθοριζόντων θραυσμάτων που παράγονται κατά τη διάρκεια της AFLP που επιτρέπει τον ακριβέστερο

προσδιορισμό της γενετικής συγγένειας μεταξύ των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών (Mortimer & Arnold, 2001).

Η AFLP χαρακτηρίζεται από παρόμοια διακριτική ικανότητα με αυτή της PFGE (Zhao *et al*, 2000). Επιπλέον, η AFLP αποτελεί μια αναπαραγώγιμη μέθοδο και όπως άλλες μέθοδοι που βασίζονται στην αλληλουχία δύναται να αυτοματοποιηθεί, παρέχοντας ευκόλως μεταβιβάσιμα αποτελέσματα (Duim *et al*, 1999). Οι κύριοι περιορισμοί της AFLP περιλαμβάνουν το γεγονός ότι είναι χρονοβόρα (μια τυπική ανάλυση διαρκεί περίπου τρεις ημέρες) αλλά και το ότι τα εμπορικά κιτ για την εκχύλιση του DNA, τα χρησιμοποιούμενα ένζυμα, τα συστήματα ανίχνευσης φθορισμού και οι προσαρμογείς είναι ακριβά.

1.3.3 Τεχνική Τυχαία Ενισχυμένων Πολυμορφικών Τμημάτων DNA (RAPD)

Η τεχνική τυχαία ενισχυμένων πολυμορφικών τμημάτων DNA (RAPD) βασίζεται στην παράλληλη ενίσχυση μιας ομάδας τμημάτων DNA με τη χρήση τυχαίων εκκινητών (συνήθως 10 βάσεων) που στοχεύουν σε διάφορες γενωμικές αλληλουχίες. Η ενίσχυση διεξάγεται σε χαμηλή θερμοκρασία υβριδοποίησης, η οποία επιτρέπει τη μη αυστηρή βάση του κανόνα της συμπληρωματικότητας υβριδοποίηση των χρησιμοποιούμενων εκκινητών. Όταν η απόσταση μεταξύ δύο θέσεων δέσμευσης των εκκινητών στις δύο αλυσίδες του DNA είναι μεταξύ 0,1 έως 3 kb, παράγεται ένα αμπλικόνιο που καλύπτει την αλληλουχία μεταξύ των δύο αυτών θέσεων δέσμευσης. Έτσι, ο αριθμός και οι θέσεις δέσμευσης των εκκινητών είναι μοναδικές για ένα συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος. Τα παραχθέντα αμπλικόνια της RAPD δύναται να αναλυθούν είτε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είτε με αλληλούχιση του DNA, ανάλογα με την σήμανση των εκκινητικών μορίων με κατάλληλες φθορίζουσες ουσίες.

Ωστόσο, αν και η RAPD χαρακτηρίζεται από μικρότερη διακριτική ικανότητα σε σχέση με την PFGE, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την τυποποίηση των βακτηριακών στελεχών σε περιπτώσεις επιδημικών εξάρσεων, επειδή είναι απλή, φθηνή, ταχεία και εύκολη στη χρήση της μέθοδος (Chang *et al*, 2009, Lanini *et al*, 2011). Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου RAPD είναι η χαμηλή ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα της, δεδομένου ότι χρησιμοποιούνται πολύ χαμηλές θερμοκρασίες υβριδοποίησης. Τέλος, η RAPD στερείται διεργαστηριακής επαναληψιμότητας, δεδομένου ότι είναι ευαίσθητη ακόμα και σε λεπτές διαφορές στα αντιδραστήρια, τα πρωτόκολλα και τα χρησιμοποιούμενα μηχανήματα.

1.3.4 PCR Τυχαίων Εκκινητών (AP-PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης τυχαίων εκκινητών (AP-PCR) αποτελεί μια παραλλαγή της αρχικής μεθόδου RAPD, και ως εκ τούτου συχνά ταυτίζεται με αύτη (Li *et al*, 2009). Ωστόσο, οι διαφορές μεταξύ των AP-PCR και RAPD περιλαμβάνουν πολλές τεχνικές λεπτομέρειες. Συγκεκριμένα, στην AP-PCR: i) η ενίσχυση διεξάγεται σε τρία στάδια, το καθένα με συγκεκριμένες και αυστηρές συγκεντρώσεις συστατικών, ii) χρησιμοποιούνται υψηλές συγκεντρώσεις εκκινητών στους πρώτους κύκλους της PCR και iii) χρησιμοποιούνται εκκινητές μεταβλητού μήκους. Παρόλα αυτά, τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της AP-PCR είναι ταυτόσημα με εκείνα της RAPD, όπως επισημαίνεται ανωτέρω.

1.3.5 PCR Επαναλαμβανόμενων Στοιχείων (rep-PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επαναλαμβανόμενων στοιχείων (rep-PCR) βασίζεται στα ηλεκτροφορητικά μοτίβα μετά την ενίσχυση συγκεκριμένων γονιδιωματικών αλληλουχιών ώστε να τυποποίηση τα υπό μελέτη βακτηριακά στελέχη. Συγκεκριμένα, στις rep-PCR μεθόδους χρησιμοποιούνται εκκινητές που υβριδοποιούνται με μη κωδικεύουσες διαγονιδιακές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, οι οποίες βρίσκονται διάσπαρτες σε ολόκληρο το γονιδίωμα των βακτηρίων. Έτσι, ενισχύονται, χρησιμοποιώντας την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, οι περιοχές του γονιδιώματος μεταξύ αυτών των γειτονικών επαναλαμβανόμενων στοιχείων με αποτέλεσμα την παραγωγή πολλαπλών αμπλικονιών, ανάλογα με την κατανομή των εν λόγω επαναλαμβανόμενων στοιχείων σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Τα μεγέθη αυτών των αμπλικονίων στη συνέχεια χαρακτηρίζονται ηλεκτροφορητικά και τα ηλεκτροφορητικά μοτίβα μεταξύ των βακτηριακών στελεχών συγκρίνονται για να προσδιοριστεί η γενετική συγγένεια των συγκεκριμένων στελεχών.

Πολλές οικογένειες επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του βακτηριακού γονιδιώματος έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την τυποποίηση με rep-PCR, όπως για παράδειγμα οι συντηρημένες επαναλαμβανόμενες διαγονιδιακές αλληλουχίες της οικογένειας των Enterobacteriaceae (enterobacterial repetitive intergenic consensus, ERIC-PCR), οι επαναλαμβανόμενες εξωγονιδιακές παλίνδρομες αλληλουχίες (repetitive extragenic palindromic, REP-PCR) και τις αλληλουχίες BOX (BOX-PCR) (Versalovic *et al*, 1994).

Καθώς η εν λόγω προσέγγιση τυποποίησης βασίζεται στην ενίσχυση με PCR και την επακόλουθη ηλεκτροφόρηση, τα αποτελέσματα των μεθόδων rep-PCR δύναται να ληφθούν σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα. Αυτός είναι, επίσης, ο λόγος για τον οποίο η συγκεκριμένη προσέγγιση είναι πολύ φθηνή. Η μέθοδος της rep-PCR χαρακτηρίζεται από πολύ υψηλή διακριτική ικανότητα μεταξύ στελεχών αρκετών βακτηριακών ειδών, ωστόσο δεν διαθέτει επαρκή επαναληψιμότητα, εξαιτίας της μεταβλητότητας στα αντιδραστήρια και συστήματα ηλεκτροφόρησης (Wilson *et al*, 2009).

Το σύστημα DiversiLab (bioMerieux) είναι μια ημιαυτόματη μέθοδος που χρησιμοποιεί την προσέγγιση της rep-PCR και χρησιμοποιείται πλέον από μια σειρά νοσοκομείων σε ολόκληρο τον κόσμο για την επιδημιολογική επιτήρηση τοπικών επιδημικών εξάρσεων. Η εν λόγω μέθοδος είναι εφαρμόσιμη πλέον για αρκετούς κλινικά σημαντικούς μικροοργανισμούς (Healy *et al*, 2005).

Μετά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, οι ενισχυμένες περιοχές του γονιδιώματος μεταξύ των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση υψηλής ανάλυσης σε τριχοειδές σύστημα, με αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της αναλυτικής ικανότητας και της επαναληψιμότητα της μεθόδου, σε σχέση με την παραδοσιακή ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Τα προκύπτοντα δεδομένα συλλέγονται αυτόματα, κανονικοποιούνται και αναλύονται με το λογισμικό DiversiLab.

Μια σειρά από μελέτες έχουν εκτιμήσει τη χρησιμότητα της DiversiLab συγκρίνοντας την με τις συνήθεις χρησιμοποιούμενες μεθόδους τυποποίησης χρησιμοποιώντας συλλογές επιδημιολογικά σχετιζόμενων και μη βακτηριακών στελεχών (Sabat *et al*, 2013). Οι εν λόγω μελέτες κατέληξαν το σύστημα DiversiLab είναι απλό, εύκολα εφαρμόσιμο, ταχύ, επαναλήψιμο και διαθέτει ικανότητα τυποποίησης σε ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών. Το συνολικό κόστος όλων των αναλώσιμων υλικών και των αντιδραστηρίων για το σύστημα DiversiLab είναι συγκρίσιμο με εκείνο της PFGE και ανέρχεται περίπου σε 20 ευρώ ανά στέλεχος. Συνεπώς, υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρήση του συστήματος DiversiLab ως εργαλείο τυποποίησης.

Ωστόσο, δεδομένου ότι η διεργαστηριακή επαναληψιμότητα της rep-PCR είναι γενικά περιορισμένη, μεγάλης κλίμακας ενδοεργαστηριακές και διεργαστηριακές μελέτες θα πρέπει να διενεργηθούν για την περαιτέρω αξιολόγηση της χρησιμότητας του συστήματος DiversiLab για την περιφερειακή και τελικά την εθνική επιδημιολογική επιτήρηση βακτηριακών στελεχών.

Τέλος, μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το ότι η βάση δεδομένων για το σύστημα DiversiLab στεγάζεται σε ένα ιδιωτικό διακομιστή, γεγονός που εγείρει ανησυχία σχετικά με θέματα ασφαλείας σε κάποιους από τους δυνητικούς χρήστες του εν λόγω συστήματος.

1.3.6 Τεχνική Μεταβλητού Αριθμού Διαδοχικών Επαναλήψεων (VNTR)

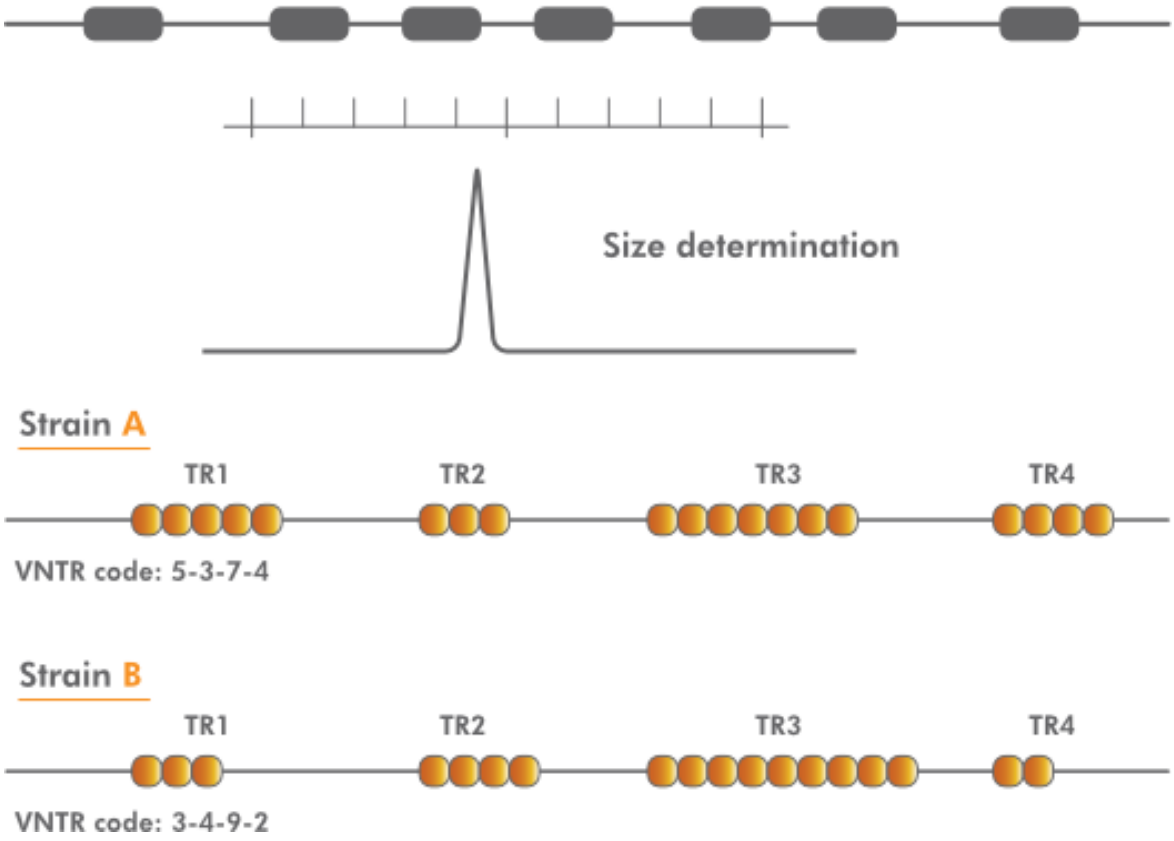
Τα βακτηριακά γονιδιώματα φέρουν πολλές περιοχές με νουκλεοτιδικές επαναλήψεις στην κωδική αλλά και στη μη κωδική αλυσίδα του DNA. Όταν οι εν λόγω επαναλήψεις είναι διαδοχικές μεταξύ τους και ο αριθμός τους στον ίδιο γενετικό τόπο ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων στελεχών, οι αντίστοιχες περιοχές του γονιδιώματος ονομάζεται μεταβλητού αριθμού διαδοχικών επαναλήψεων γενετικοί τόποι (VNTR). Οι επαναλήψεις αυτές στον ίδιο γενετικό τόπο μπορεί να είναι πανομοιότυπες ή ελαφρώς διαφορετικές.

Η πολυτοπική ανάλυση γενετικών τόπων με μεταβλητό αριθμό διαδοχικών επαναλήψεων (MLVA) είναι μια μέθοδος η οποία προσδιορίζει τον αριθμό των επαναλαμβανόμενων διαδοχικών επαναλήψεων σε διαφορετικές θέσεις στο βακτηριακό γονιδίωμα (Εικόνα 1.9). Στη πιο απλή προσέγγιση της μεθόδου αυτής, ένας αριθμός από καλά επιλεγμένες θέσεις VNTR ενισχύεται με πολλαπλή PCR (multiplex PCR) και η ανάλυση των αμπλικονίων διεξάγεται στα συνήθη πηκτώματα αγαρόζης (Sabat *et al*, 2003). Ένα πλεονέκτημα αυτής της απλής αλλά, επίσης, φθηνής, γρήγορης και εύκολης στη χρήση μεθόδου είναι η δυνατοτητα να διεξαχθεί σε εργαστήρια χωρίς περίπλοκο εξοπλισμό ηλεκτροφόρησης.

Όταν η MLVA δεν επιτρέπει τον άνετο και σαφή υπολογισμό του αριθμού των διαφορετικών επαναλήψεων ανά θέση, ορισμένοι ερευνητές την αποκαλούν πολυτοπικό αποτύπωμα του αριθμού επαναλαμβανόμενων διαδοχικών επαναλήψεων (MLVF) (Cavanagh *et al*, 2012). Ένα μειονέκτημα της MLVF είναι ότι τα δεδομένα που προκύπτουν δεν μπορούν να συγκριθούν άμεσα μεταξύ των διαφορετικών εργαστηρίων, γεγονός που οφείλεται στο ότι τα παραχθέντα αμπλικόνια παρακολουθούνται ως ηλεκτροφορητικά μοτίβα με συμβατική ηλεκτροφόρηση σε χαμηλής ανάλυσης πηκτώματα αγαρόζης. Συνεπώς, δεν δύναται ούτε να διακριθεί ο ακριβής αριθμός επαναλήψεων στα παραχθέντα αμπλικόνια αλλά ούτε να καθοριστεί ποια ζώνωση του ηλεκτροφορητικού μοτίβου αντιστοιχεί σε έκαστο γενετικό τόπο. Μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα επιτυγχάνεται πλέον με την ηλεκτροφόρηση υψηλής ανάλυσης σε τριχοειδές σύστημα (Francois *et al*, 2005). Έτσι, υπάρχει ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών που καταδεικνύουν το σαφές πλεονέκτημα της ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδές σύστημα σε σχέση με τα συνήθως

χρησιμοποιούμενα πηκτώματα αγαρόζης για την τυποποίηση βάση των μεθόδων MLVA και MLVF, όσον αφορά την διακριτική ικανότητα, την επαναλιψημότητα, την ταχύτητα και την αυτοματοποιημένη ανάλυση δεδομένων (Fillo *et al*, 2011, Sabat *et al*, 2012).

Για διεργαστηριακή σύγκριση, πρέπει να προσδιορίζεται ο ακριβής αριθμός των διαφορετικών επαναλήψεων ανά γενετικό τόπο της MLVA. Ο αριθμός των εν λόγω επαναλαμβανόμενων μονάδων σε κάθε γενετικό τόπο δύναται να υπολογιστεί από το μέγεθος ενός συγκεκριμένου προϊόντος PCR και του γνωστού μήκους μίας και μόνον επαναλαμβανόμενης μονάδας. Η χρήση της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης σε αυτόματο σύστημα αλληλούχισης DNA και της σήμανσης



Εικόνα 1.9. Σχηματική αναπαράσταση πολυτοπικής ανάλυσης γενετικών τόπων με μεταβλητό αριθμό διαδοχικών επαναλήψεων (MLVA).

των εκκινητών με διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές επιτρέπει στα αμπλικόνια της MLVA να αναλυθούν ταυτόχρονα (Schouls *et al*, 2009, Elberse *et al*, 2011). Συγκεκριμένα, οι διάφορες ενσωματωμένες στα αμπλικόνια φθορίζουσες χρωστικές διεγείρονται από μια ακτίνα λέιζερ και αποδιεγειρόμενες εκπέμπουν φως διαφορετικού μήκους κύματος, το οποίο στη συνέχεια

προσδιορίζεται από τον ανιχνευτή του αυτόματου συστήματος αλληλούχισης DNA. Με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού υπολογίζεται αυτόματα ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων μονάδων σε κάθε γενετικό τόπο της MLVA. Έτσι, ο προσδιορισμός του μεγέθους των αμπλικονίων διεξάγεται με πολύ μεγαλύτερη ακρίβεια σε σχέση με την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Έπειτα, λοιπόν, από τον προσδιορισμό του αριθμού των επαναλήψεων σε έκαστο γενετικό τόπο για κάθε βακτηριακό στέλεχος, προκύπτει μια διατεταγμένη σειρά αριθμών που αντιστοιχούν με τον αριθμό των επαναλαμβανόμενων μονάδων σε κάθε γενετικό τόπο της MLVA με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός αλληλικού προφίλ (π.χ. 7-12-3 -3-22-11-6-1). Το εν λόγω προφίλ δύναται να συγκριθεί εύκολα μέσω του διαδικτύου με τα αλληλικά προφίλ που βρίσκονται κατατιθέμενα στις αντίστοιχες βάσεις δεδομένων, με αποτέλεσμα την τυποποίηση του υπό μελέτη στελέχους.

Ωστόσο, η MLVA χαρακτηρίζεται από εγγενείς περιορισμούς καθώς δεν είναι μια καθολική μέθοδος, πράγμα που σημαίνει ότι πρέπει να σχεδιάζονται εκκινητές ειδικά για κάθε βακτηριακό είδος. Αυτός είναι κι ο κύριος λόγος για τον οποίο δεν μπορεί να αντικαταστήσει την PFGE σε επιδημιολογικές έρευνες. Επιπλέον, η MLVA δεν είναι 100% επαναλήψιμη μέθοδος, ενώ για αύξηση της επαναληψιμότητας της απαιτείται η ενίσχυση με PCR των διαφόρων γενετικών τόπων της VNTR ξεχωριστά αντί της διεξαγωγής των πολλαπλών αντιδράσεων PCR. Όμως, αυτή η προσέγγιση αυξάνει το χρόνο και το κόστος της ανιχνεύσεως. Επίσης, η διάκριση μεταξύ στελεχών με βάση το μέγεθος των αμπλικονίων δεν είναι επαναλήψιμη εξαιτίας της χρήσης διαφορετικών αυτόματων συστημάτων αλληλούχισης, πολυμερών ή φθορίζουσες χρωστικών. Μειονέκτημα, επίσης, της μεθόδου αποτελεί ότι η διαφορά μεγέθους σε ένα γενετικό τόπο μεταξύ στελεχών ενδεχομένως να μην αντανακλά πάντοτε το πραγματικό αριθμό των διαδοχικών επαναλήψεων διότι ενθέσεις, ελλείψεις ή διπλασιασμοί εντός της ενισχυόμενης περιοχής δύναται να προκαλέσουν διακυμάνσεις μεγέθους. Συνεπώς, ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των αμπλικονίων είναι απαραίτητος. Τέλος, η εν λόγω μέθοδος αδυνατεί να χρησιμοποιηθεί από δίκτυα επιδημιολογικής επιτήρησης κλινικά σημαντικών μικροοργανισμών, όπως υπογραμμίζεται από το γεγονός ότι έχουν δημοσιευθεί και χρησιμοποιούντα πολλαπλά πρωτόκολλα από τα διάφορα εργαστήρια για συγκεκριμένους μικροοργανισμούς.

Στρατηγικές για την επιδημιολογική τυποποίηση με βάση την αρχή της VNTR έχουν αναπτυχθεί για την τυποποίηση στελεχών *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, *Vibrio cholerae* και *Legionella pneumophila* (Sabat *et al*, 2013).

1.3.7 Τυποποίηση Μονοτοπικής Αλληλούχισης (SLST)

Η τυποποίηση μέσω της μονοτοπικής αλληλούχισης (SLST) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των επιδημιολογικών σχέσεων μεταξύ βακτηριακών στελεχών με βάση τους πολυμορφισμούς της αλληλουχίας ενός μόνο γονιδιακού στόχου (Εικόνα 1.10). Η ορολογία της SLST έχει δανειστεί από την πιο διαδεδομένη μέθοδο γνωστή ως τυποποίηση μέσω της πολυτοπικής αλληλούχισης (MLST) (βλέπε κάτωθι), στην οποία διενεργείται η αλληλούχιση διάφορων γονίδιων προκειμένου να προσδιοριστεί η γενετική συγγένεια μεταξύ των υπό μελέτη στελεχών.

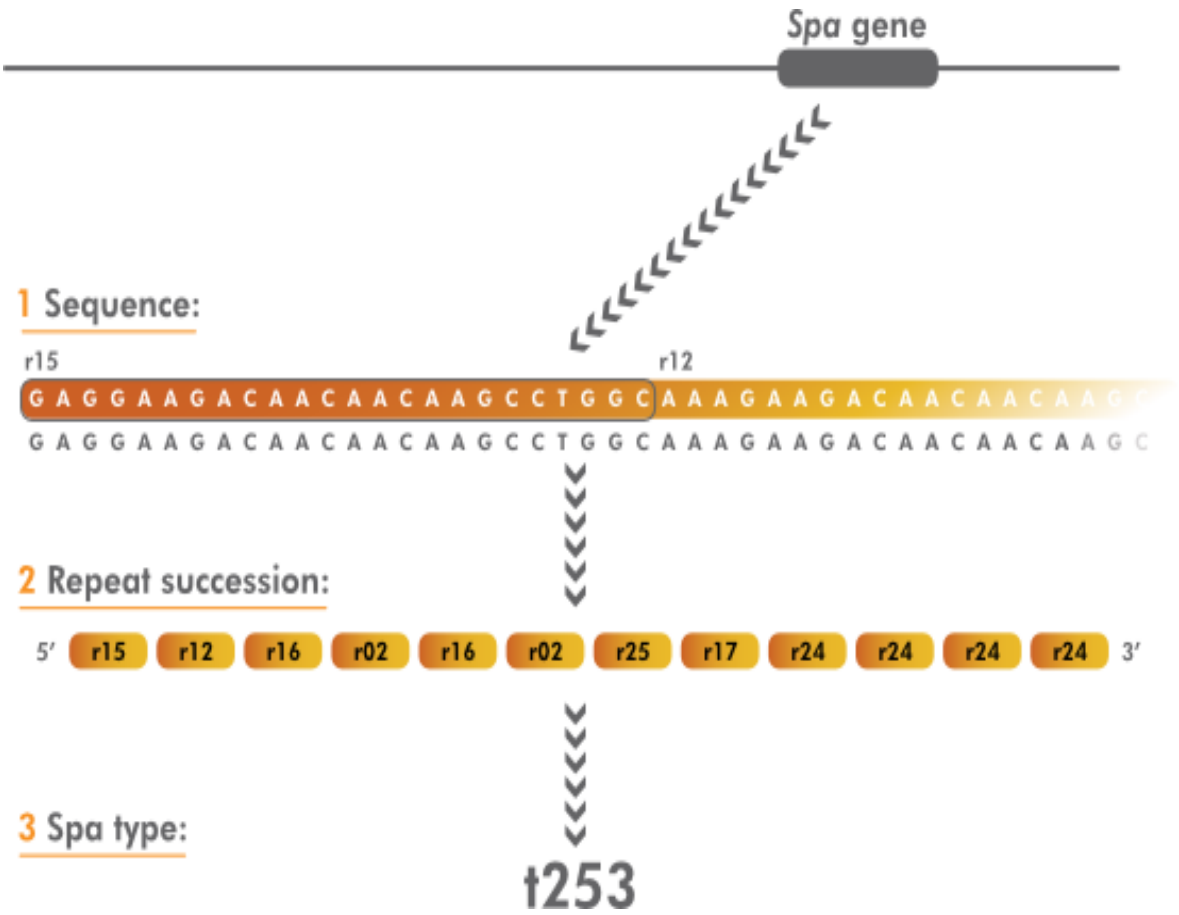
Χαρακτηριστικό παράδειγμα της SLST αποτελεί η τυποποίηση του στρεπτόκοκκου της ομάδος Α (GAS) με βάση την Μ-πρωτεΐνη που φέρει στην επιφάνεια του (Steer *et al*, 2009). Η Μ-πρωτεΐνη, που κωδικοποιείται από το γονίδιο emm, αποτελεί το κύριο παράγοντα τοξικότητας του εν λόγω αποκλειστικά ανθρώπινου παθογόνου βακτηρίου. Ένα άλλο παράδειγμα της SLST αποτελεί ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της βραχέος μεταβλητής περιοχής (SVR) του γονιδίου της μαστιγίνης Β (flaB), η οποία παρέχει επαρκείς πληροφορίες για τη μελέτη της επιδημιολογίας στελεχών του γένους *Campylobacter* (Mellmann *et al*, 2004). Τέλος, η πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική τυποποίησης που ακολουθεί την προσέγγιση της SLST είναι η τυποποίηση στελεχών *S. aureus* μέσω της αλληλούχισης της πολυμορφικής περιοχής Χ του γονιδίου της πρωτεΐνης Α του *S. aureus* (*S. aureus* protein A, spa-typing).

Αν και η τυποποίηση μέσω της SLST διαθέτει χαμηλότερη διακριτική ικανότητα από ό, τι η PFGE, η σχέσης κόστους και αποτελεσματικότητας της, η ευκολία στην εφαρμογή, η ταχύτητα, η εξαιρετική επαναληψιμότητα, κάνει αυτή την εν λόγω μέθοδο χρήσιμο εργαλείο για την τυποποίηση στελεχών ορισμένων ειδών σε τοπικό, εθνικό και διεθνές επίπεδο.

1.3.8 Τυποποίηση Πολυτοπικής Αλληλούχισης (MLST)

Η τυποποίηση πολυτοπικής αλληλούχισης (MLST) επινοήθηκε για να ξεπεραστεί η ελλιπής ή η μερική συγκρισιμότητα των προαναφερθέντων μεθόδων μεταξύ των διαφόρων εργαστηριών (Εικόνα 1.11). Το πρώτο σήμα της MLST αναπτύχθηκε το 1998 για τη *Neisseria meningitidis*, ενώ λίγο αργότερα, η εν λόγω μέθοδος επεκτάθηκε σε άλλα βακτηριακά είδη και με την πάροδο του χρόνου, έχει γίνει ένα πολύ δημοφιλές εργαλείο για παγκόσμιες επιδημιολογικές μελέτες,

καθώς και για μελέτες σχετικά με την μοριακή εξέλιξη των παθογόνων (Maiden *et al*, 1998, Urwin & Maiden, 2003).



Εικόνα 1.10. Σχηματική αναπαράσταση τυποποίησης μέσω της μονοτοπικής αλληλούχισης (SLST-Spa typing).

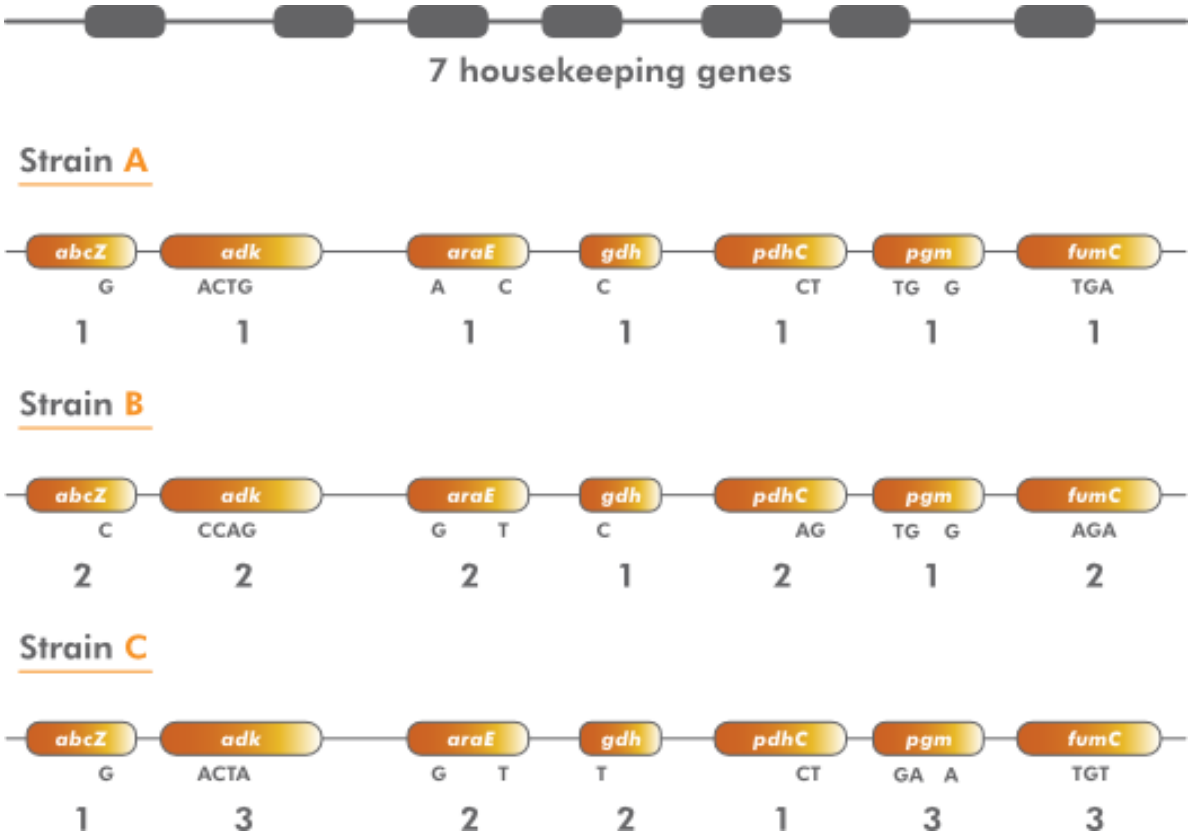
Σύμφωνα με τη MLST, οι εσωτερικές αλληλουχίες (κατά προσέγγιση 300 έως 700 bp) ως επί το πλείστον επτά γονίδιων ‘‘οικιακής οικονομίας’’ για κάθε βακτηριακό είδος ενισχύονται με PCR και εν συνεχεία προσδιορίζεται η αλληλουχία τον εν λόγω προϊόντων ενίσχυσης. Για κάθε γονίδιο, σε έκαστη μοναδική αλληλουχία (αλληλόμορφο) αποδίδεται ένας αριθμός και με βάση το συνδυασμό των αριθμών των επτά γονιδίων (αλληλικό προφίλ), προσδιορίζεται ο τύπος της αλληλουχίας (ST), στον οποίο ανήκει κάθε βακτηριακό στέλεχος.

Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της MLST είναι ότι χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερη επαναληψιμότητα και ότι όλα τα δεδομένα που παράγονται με αυτή τη μέθοδο είναι συγκρίσιμα ενδοεργαστηριακά και διαεργαστηριακά καθώς βασίζονται σε μια διεθνώς καθιερωμένη

ονοματολογία. Επιπλέον, οι αλληλουχίες των αλληλομόρφων και προφίλ των διαφόρων STs είναι διαθέσιμα σε μεγάλες κεντρικές βάσεις δεδομένων (www.pubmlst.org, www.mlst.net και http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/) προσβάσιμες μέσω του διαδικτύου. Αυτές οι βάσεις δεδομένων παρέχουν επίσης on-line λογισμικό (eBURST) για τον προσδιορισμό της γενετικής συγγένειας μεταξύ βακτηριακών στελεχών μέσα σε ένα είδος, καθώς και χάρτες για τον εντοπισμό των στελεχών του κάθε ST που έχουν ανακτηθεί από κάθε χώρα καθώς και τις λεπτομέρειες αυτών των στελεχών.

Το μεγάλο μειονέκτημα της MLST είναι το υψηλό κόστος της. Το συνολικό κόστος όλων των αναλώσιμων υλικών και αντιδραστηρίων για την MLST σε μεγάλο βαθμό εξαρτάται από τον αριθμό των γενετικών τόπων που επιλέγονται να ενισχυθούν καθώς και από τη χώρας στην οποία διενεργείται η τυποποιητική αυτή διαδικασία. Σύμφωνα με εκτιμήσεις, σε κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης, το συνολικό κόστος μιας MLST ανάλυσης, βασιζόμενη σε επτά γενετικούς τόπους, ανέρχεται σε περίπου 50 ευρώ ανά στέλεχος. Σε αντίθεση, το συνολικό κόστος τυποποίησης με τις μεθόδους MLVF, MLVA ή SLST ανέρχεται σε περίπου 2 ευρώ, 8 ευρώ και 8 ευρώ ανά στέλεχος, αντίστοιχα (Sabat *et al*, 2012). Επιπλέον, η MLST είναι εργώδης, χρονοβόρα και για ορισμένα παθογόνα ανεπαρκούς διακριτικής ικανότητας για τη μελέτη επιδημικών εξάρσεων.

Για να αυξηθεί η διακριτική ικανότητα των ‘‘κλασσικών’’ σχημάτων της MLST που βασίζονται σε επτά γονίδια ‘‘οικιακής οικονομίας’’, έχουν γίνει προσπάθειες για την ανάπτυξη σχημάτων MLST που βασίζονται εξ’ ολοκλήρου σε γονίδια παθογονικότητας. Τέτοιες προσεγγίσεις, που ονομάζεται MVLST (multi-virulence-locus sequence typing) έχουν εφαρμοστεί για την τυποποίηση παθογόνων όπως η *L. monocytogenes*, το *V. cholerae*, η *S. enterica* και ο *S. aureus* (Zhang *et al*, 2004, Teh *et al*, 2011, Liu *et al*, 2011, Verghese *et al*, 2012). Συνολικά, τα διαθέσιμα στοιχεία δείχνουν ότι η MVLST χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα σε σχέση με εκείνη της ‘‘κλασικής’’ MLST. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω έλεγχος της συσχέτισης των αποτελεσμάτων της MVLST με τα συμβατικά επιδημιολογικά δεδομένα προκειμένου να επικυρωθεί η εφαρμοσιμότητα της στην επιδημιολογική τυποποίηση.



Εικόνα 1.11. Σχηματική αναπαράσταση τυποποίησης πολυτοπικής αλληλούχισης (MLST) .

1.3.9 Γονιδιωματικός Συγκριτικός Υβριδισμός (CGH)

Για τη τυποποίηση με συγκριτική γονιδιωματική υβριδοποίηση χρησιμοποιείται DNA μικροσυστοιχία που φέρει μια συλλογή DNA ανιχνευτών συνδεδεμένων σε μία στερεή επιφάνεια, οι οποίοι είναι ικανοί να ανιχνεύουν τη παρουσία των συμπληρωματικών νουκλεοτιδικών αλληλουχιών στο υπό εξέταση στέλεχος. Έτσι, οι μικροσυστοιχίες αντιπροσωπεύουν εύχρηστα εργαλεία για την ανίχνευση γονιδίων που χρησιμεύουν ως δείκτες για συγκεκριμένα βακτηριακά στελέχη ή για την ανίχνευση πολυμορφισμών στα αλληλόμορφα ενός γονιδίου που είναι παρόν σε όλα τα στελέχη ενός συγκεκριμένου είδους. Οι ανιχνευτές στη συστοιχία δύναται να είναι αμπλικόνια (> 200 bp) ή ολιγονουκλεοτίδια (< 70 bp), ενώ ανάλογα με τον αριθμό των προσκολλημένων ανιχνευτών στη στερεή επιφάνεια, μπορούμε να διακρίνουμε τις DNA μικροσυστοιχίες σε χαμηλής πυκνότητας (εκατοντάδες ανιχνευτές) και υψηλής πυκνότητας (εκατοντάδες χιλιάδες ανιχνευτές).

Στην συνήθη προσέγγιση, εκχυλίζεται το ολικό DNA από το υπό μελέτη παθογόνο στέλεχος και ακολούθως σημαίνεται είτε χημικά είτε ενζυμικά με σκοπό να υβριδοποιηθεί με τη DNA μικροσυστοιχία. Στη συνέχεια, το μη προσδεμένο DNA στόχος απομακρύνεται κατά τα στάδια πλύσεως και το σήμα υβριδισμού μεταξύ του επισημασμένου DNA στόχου και ενός ακινητοποιημένου ανιχνευτή μετράται αυτόματα από ένα σαρωτή. Τέλος, τα παραχθέντα δεδομένα αναλύονται χρησιμοποιώντας ειδικό λογισμικό παρέχοντας αποτελέσματα για τη βακτηριακή ποικιλότητα. Τα εν λόγω αποτελέσματα είναι ποικίλα και εξαρτώμενα από τη προσαρμοσμένη διάταξη έκαστης μικροσυστοιχίας.

Οι μικροσυστοιχίες σήμερα χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανάλυση γονιδιωματικών πολυμορφισμών, όπως λόγου χάρη πολυμορφισμούς μονού νουκλεοτιδίου (SNPs). Επιπλέον, η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών είναι ένα αποτελεσματικό εργαλείο για την ανίχνευση των έξτρα-γονιδιωματικών στοιχείων, παρέχοντας τη δυνατοτητα του ταυτόχρονου προσδιορισμού της αντιμικροβιακής ανθεκτικότητας και της παθογονικότητας ενός παθογόνου στελέχους (McCarthy *et al*, 2012, McCarthy & Lindsay, 2012).

Η προσέγγιση των DNA μικροσυστοιχιών είναι μια χρήσιμη εναλλακτική λύση για πλήρη αλληλούχιση γονιδιώματος (WGS), καθώς εξοικονομεί χρόνο και έξοδα ενώ παρέχει τη δυνατοτητα μελετών επιδημικών εξάρσεων σε πραγματικό χρόνο (Jackson *et al*, 2012). Ωστόσο, η εφαρμογή της εν λόγω μεθόδου για την τυποποίηση παθογόνων βακτηρίων σε εργαστήρια ρουτίνας σήμερα δυσχεραίνεται από το υψηλό κόστος των υλικών και την απαίτηση για εξειδικευμένο εξοπλισμό.

Η εταιρεία Alere Technologies ανέπτυξε, λοιπόν, μια γρήγορη και οικονομική προσέγγιση με βάση τις DNA μικροσυστοιχίες για διαγνωστικές και επιδημιολογικές μελέτες. Η εν λόγω δοκιμασία αποτελεί μια μικρογραφία ταινίας μικροτιτλοδότησης (ArrayStrips) και επιτρέπει τη ταυτόχρονη δοκιμή οκτώ έως και 96 δειγμάτων. Η Alere StaphyType DNA μικροσυστοιχία αφορά στελέχη *S. aureus* και καλύπτει 334 αλληλουχίες στόχους, συμπεριλαμβανομένων 170 διαφορετικών γονίδιων και αλληλόμορφα αυτών (Monecke *et al*, 2011). Κατά τη συγκεκριμένη δοκιμασία 96 συστοιχίες σαρώνονται από τον ανιχνευτή και η υπαγωγή των υπό μελέτη στελεχών *S. aureus* σε συγκεκριμένα φυλογενετικά κλαδιά γίνεται αυτόματα από το παρεχόμενο λογισμικό με βάση τα προφίλ υβριδισμού. Από την ίδια εταιρεία είναι, επίσης, διαθέσιμες DNA μικροσυστοιχίες για έναν αριθμό των βακτηριακών ειδών.

Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι το συνολικό κόστος της DNA μικροσυστοιχίας της Alere ανά βακτηριακό στέλεχος είναι συγκρίσιμο με εκείνο της PFGE (περίπου 20 έως 30 ευρώ) και πολύ χαμηλότερο από εκείνο της MLST (50 ευρώ), ενώ η όλη διαδικασία τυποποίησης για 96 στελέχη μπορεί να γίνει μέσα σε δύο εργάσιμες ημέρες. Πρόσφατα, η Alere Technologies έχει αναπτύξει δοκιμασιες DNA μικροσυστοιχιών για άλλα είδη βακτηρίων, όπως η *E. coli*, η *P. aeruginosa*, η *L. pneumophila* και τα *Chlamydia trachomatis*.

Συνολικά, τα διαθέσιμα στοιχεία δείχνουν ότι οι DNA μικροσυστοιχίες είναι εξαιρετικά ακριβείς, αν και η επαναληψιμότητα της εν λόγω μεθόδου πρέπει να διερευνηθεί πριν από την ευρεία εφαρμογή αυτής. Ειδικότερα, εάν ο στόχος για την τυποποίηση είναι οι SNPs, τότε η ανάλυση μέσω DNA μικροσυστοιχιών δεν είναι πιθανώς η καλύτερη μέθοδος για να εφαρμόζονται. Τέλος, οι συστοιχίες έχουν το σημαντικό μειονέκτημα ότι δεν επιτρέπουν την ταυτοποίηση αλληλουχιών οι συμπληρωματικές των οποίων δεν περιλαμβάνονται στη συστοιχία.

1.3.10 Πλήρης Αλληλούχιση Γονιδιώματος (WGS)

Η επόμενης γενεάς αλληλούχιση (NGS) έδωσε ώθηση στις γενετικές έρευνες, παρέχοντας έναν οικονομικό και αποδοτικό τρόπο για την ανακάλυψη πολυμορφισμών σε ολόκληρα γονιδιώματα. Οι εν λόγω τεχνολογίες είναι γνωστές και ως ‘‘δεύτερης γενιάς αλληλούχιση’’ ή ‘‘υψηλής απόδοσης αλληλούχιση’’. Οι όροι επόμενης ή δεύτερης γενεάς αλληλούχιση χρησιμοποιούνται για να διακρίνουν αυτές τις προσεγγίσεις από τις πρώτες προσεγγίσεις, οι οποίες βασίζονταν στη μέθοδο Sanger. Το σαφές πλεονέκτημα της NGS έναντι της παραδοσιακής μεθόδου καθορισμού της αλληλουχίας είναι η ικανότητα της πρώτης να παράγει εκατομμύρια ‘‘διαβάσματα’’ (περίπου 35 εως700 bp σε μήκος) σε ένα και μόνο ‘‘τρέξιμο’’ σε συγκριτικά χαμηλό κόστος. Έτσι, για να προσδιοριστεί η πλήρης νουκλεοτιδική αλληλουχία ενός γονιδιώματος, απαιτείται η συναρμολόγηση αυτών των ‘‘διαβασμάτων’’ με βάση επικαλυπτόμενες περιοχές (*de novo* συναρμολόγηση) ή η σύγκριση τους με ένα γονιδίωμα αναφοράς που έχει προηγουμένως αλληλουχηθεί (επαναλληλούχιση).

Η πλήρης αλληλούχιση γονιδιώματος (WGS) αποτελεί πλέον ένα ισχυρό και άκρως ελκυστικό εργαλείο για επιδημιολογικές έρευνες και είναι πολύ πιθανό ότι στο άμεσο μέλλον η συγκεκριμένη τεχνολογία θα εισήχθη στην εργαστηριακή ρουτίνα, επιτρέποντας τον ακριβή

προσδιορισμό και χαρακτηρισμό βακτηριακών στελεχών (Sabat *et al*, 2013). Ωστόσο, η βασική πρόκληση της εν λόγω τεχνολογίας δεν είναι η παράγωγη των δεδομένων, αλλά η γρήγορη επεξεργασία και η ερμηνεία της πληροφορίας που απορρέει από το μεγάλο όγκο των παραχθέντων δεδομένων. Ιδανικά, αυτή η πληροφορία θα πρέπει να επιτρέπει την άμεση σύγκριση με τα αποτελέσματα που λαμβάνονται μέσω των συμβατικών μεθόδων τυποποίησης (π.χ. PFGE και MLST) και θα πρέπει δύναται να αποθηκευτεί σε προσβάσιμες παγκόσμιες βάσεις δεδομένων. Ωστόσο, τα ‘‘διαβάσματα’’ που παράγονται επί του παρόντος μέσω της τεχνολογίας NGS είναι σχετικά μικρά, γεγονός που κάνει τη *de novo* συναρμολόγηση ένα δύσκολο εγχείρημα. Κατά συνέπεια, ο όρος πλήρης αλληλούχιση γονιδιώματος αναφέρεται συχνά σε περίπου το 90% του συνόλου του γονιδιώματος, με τα κενά μεταξύ των συναρμολογούμενων τμημάτων (contigs) να προκύπτουν κυρίως από την παρουσία διάσπαρτων ή διαδοχικών επαναλήψεων.

Το κόστος της πλήρης αλληλούχισης των βακτηριακών γονιδιωμάτων μέσω του NGS συνεχίζει να μειώνονται. Επί του παρόντος, το εν λόγω κόστος έχει φτάσει περίπου στο επίπεδο αυτού της MLST ανάλυσης που πραγματοποιείται μέσω της παραδοσιακής αλληλούχισης κατά Sanger. Συγκεκριμένα, το κόστος αυτό ανέρχεται σε 75 έως 110 ευρώ ανά στέλεχος, συμπεριλαμβανομένης της προετοιμασίας του δείγματος, του ποιοτικού ελέγχου της κατασκευασθείσας βιβλιοθήκης και της αλληλούχισης (Vernet *et al*, 2011, Köser *et al*, 2012). Ως εκ τούτου, υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον αντικατάστασης της παραδοσιακής προσέγγισης με υψηλής απόδοσης τεχνολογίες αλληλούχισης, όπως το 454-Pyrosequencing, το Illumina και το σύστημα ιόντων Torrent.

Οι εν λόγω τεχνολογίες είναι οικονομικά προσβάσιμες σε πολλά, αν όχι όλα, τα εργαστήρια αναφοράς, ωστόσο η διαδικασία εξακολουθεί να είναι χρονοβόρα και η συναρμολόγηση των γονιδιωμάτων πολύ περίπλοκη για την εφαρμογή των τεχνολογιών αυτών στην επιδημιολογική επιτήρηση ρουτίνας, καθώς η επόμενης γενεάς αλληλούχιση απαιτεί περίπλοκα υπολογιστικά προγράμματα και εξιδανικευμένο προσωπικό στη βιοπληροφορική. Από την άλλη πλευρά, λογισμικά πακέτα βασιζόμενα στα Windows (π.χ. το BioNumerics και το Lasergene) που δεν απαιτούν εξειδικευμένες γνώσεις βιοπληροφορικής για τη συναρμολόγηση των γονιδιωμάτων βρίσκονται υπό έκδοση. Βεβαίως, σημαντική προϋπόθεση για την αποτελεσματική εφαρμογή της WGS στην τυποποίηση των μικροοργανισμών είναι η διαθεσιμότητα νέων διαδικτυακά

προσβάσιμων πλατφόρμων βιοπληροφορικής για την ταχεία επεξεργασία και ανάλυση δεδομένων.

Η λύση στο εν λόγω φαίνεται να είναι η ανάπτυξη βιοπληροφορικών λογισμικών σύγκρισης γονιδίου προς γονίδιο σε όλο το εύρος του γονιδιώματος. Για το σκοπό αυτό, δύναται να χρησιμοποιηθεί μια προσέγγιση που θα περιλαμβάνει μια εκτεταμένη MLST (eMLST), η όποια σε αντίθεση με τη παραδοσιακή MLST που βασίζεται σε επτά μόνο γονίδια, θα βασίζεται σε ολόκληρο το γονιδίωμα του υπό μελέτη στελέχους. Ως εκ τούτο, τα αλληλικά προφίλ που θα προκύπτουν από την eMLST θα αποτελούνται από εκατοντάδες έως χιλιάδες διαφορετικά αλληλόμορφα, ανάλογα με το μέγεθος του γονιδιώματος των υπό εξέταση κάθε φορά ειδών. Συνεπώς, η WGS δύναται πιθανώς να αντικαταστήσει την MLST και τις υπόλοιπες μεθόδους τυποποίησης που χρησιμοποιούνται σήμερα. Με την περαιτέρω μείωση του κόστους της WGS, αλλά και με τη επίτευξη της εκτέλεση της αλληλούχισης και της ανάλυσης των παραχθέντων δεδομένων εντός 24 ωρών, η εν λόγω μέθοδος δύναται να καταστεί ιδιαίτερα χρήσιμη την επιδημιολογική επιτήρηση σε πραγματικό χρόνο και κατά πάσα πιθανότητα θα αποτελέσει την πρότυπη μέθοδο για τον σκοπό αυτό. Η γενετική συγγένεια μεταξύ των βακτηριακών στελεχών δύναται, επίσης, να προσδιοριστεί με την WGS. Σε αντίθεση με τις συμβατικές μεθόδους μοριακής τυποποίησης, η WGS έχει τη δυνατότητα να συγκρίνει διαφορετικά γονιδιώματα με ανάλυση ενός μόνο νουκλεοτιδίου, γεγονός που επιτρέπει τον ακριβή χαρακτηρισμό γεγονότων μετάδοσης και διασποράς.

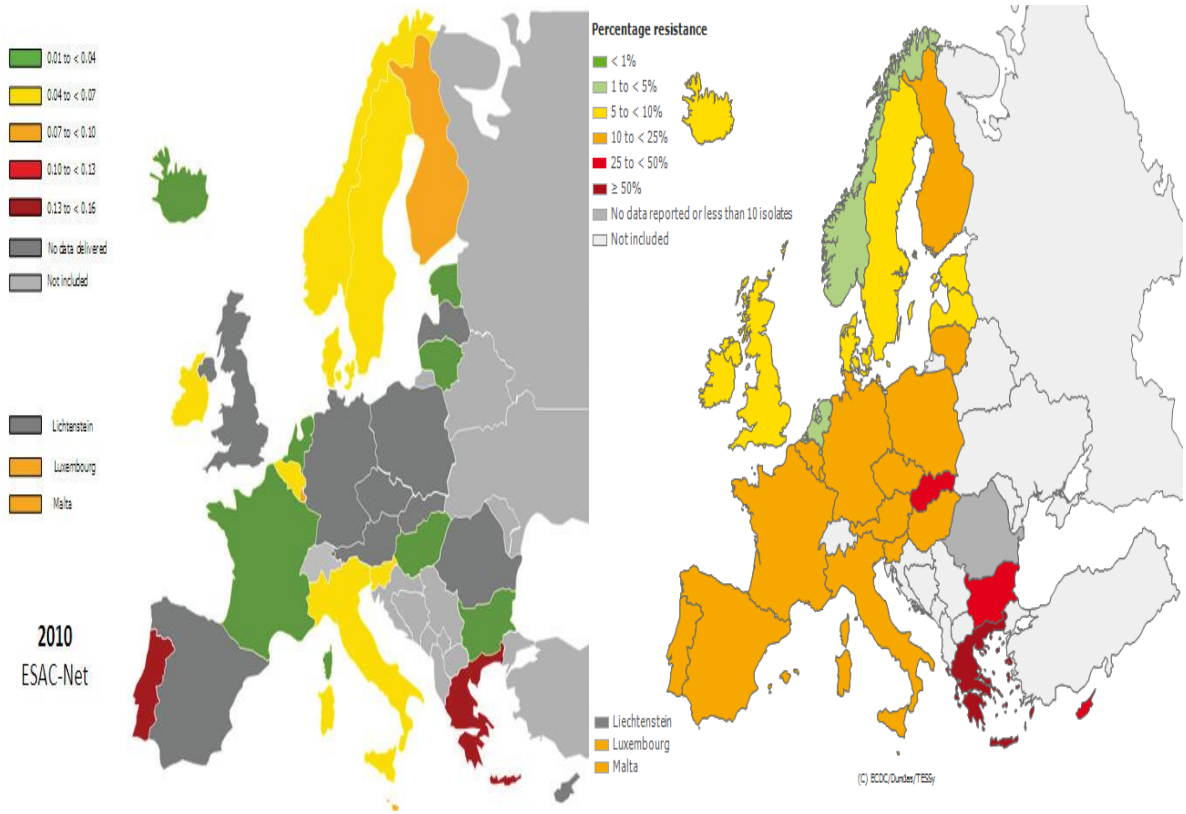
Εκτός από τις παραδοσιακές επιδημιολογικές εφαρμογές, WGS μπορεί επίσης να είναι αποτελεσματική για τον καθορισμό φαινοτυπικών χαρακτηριστικών, όπως η λοιμογόνος ικανότητα ή ανθεκτικότητα έναντι αντιβιοτικών του υπό μελέτη παθογόνου στελέχους (Billal *et al*, 2011). Οι πρώτες απόπειρες να καταγράφει το σύνολο των γονιδίων ανθεκτικότητας έναντι αντιβιοτικών (resistome) και των γονιδίων τοξίνων (toxome) στέφτηκαν ήδη με επιτυχία, με αποτέλεσμα η WGS να μπορεί δυνητικά να χρησιμοποιηθεί για τη πρόβλεψη της φαινοτυπικής λοιμογόνου ικανότητας ή ανθεκτικότητας έναντι αντιβιοτικών ενός στελέχους (Köser *et al,* 2012). Ωστόσο, η WGS δεν επιτρέπει την ακριβή φαινοτυπική πρόβλεψη, καθώς δεν μας παρέχει τη γνώση για την κατά συνθήκη έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων, ούτε το επίπεδο έκφρασής τους. Τέλος η WGS δύναται, επίσης, να χρησιμοποιηθεί για την αναζήτηση γενετικών δεικτών, όπως η παρουσία ή απουσία ενός γονιδίου ή υποκατάσταση ενός αμινοξέος σε μια

πρωτεΐνη, οι οποίοι μπορούν εν συνεχεία να συνδεθούν με την αποκλειστική ή αυξημένη εμφάνιση μιας νόσου ή συνδέονται με τη σοβαρότητα της νόσου αυτής.

1.4 Σκοπός της Εργασίας

Οι νοσοκομειακές λοιμώξεις αποτελούν ένα μείζον πρόβλημα Δημόσιας Υγείας που θέτει σε κίνδυνο την ασφάλεια των ασθενών και εκφράζεται με σημαντική αύξηση των δεικτών της νοσηρότητας, της θνησιμότητας, καθώς επίσης της διάρκειας και του κόστους νοσηλείας (Dixon *et al*, 2011, Schwaber *et al*, 2011). Η σύγχρονη ιατρονοσηλευτική φροντίδα επιβάλλει συχνά τη χρήση παρεμβατικών τεχνικών για την αντιμετώπιση ιδιαίτερα των βαρέως πασχόντων ασθενών, με αποτέλεσμα τον κίνδυνο εμφάνισης λοιμώξεων συνδεόμενες με αυτές, όπως μικροβιαιμία σχετιζόμενη με κεντρικούς αγγειακούς καθετήρες, ουρολοίμωξη σχετιζόμενη με ουροκαθετήρες και πνευμονία σχετιζόμενη με τον αναπνευστήρα (Umscheid *et al*, 2011). Οι συνηθέστερες νοσοκομειακές λοιμώξεις είναι αυτές του ουροποιητικού συστήματος, του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού συστήματος, του χειρουργικού πεδίου, του αίματος (βακτηριαιμίες), του δέρματος και των μαλακών μορίων (Horan *et al*, 2008).

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση υπολογίζεται ότι κάθε χρόνο, περίπου 4.100.000 ασθενείς εμφανίζουν νοσοκομειακή λοίμωξη, με τον εκτιμώμενο αριθμό θανάτων να αγγίζει τις 37.000. Παρόμοιο πρόβλημα αντιμετωπίζουν και τα ελληνικά νοσοκομεία, τα οποία κυρίως κατά την τελευταία δεκαετία, έρχονται αντιμέτωπα με τα ολοένα αυξανόμενα επίπεδα της μικροβιακής ανθεκτικότητας και την εμφάνιση νοσοκομειακών λοιμώξεων από πολυανθεκτικούς Gram αρνητικούς μικροοργανισμούς (Daikos & Markogiannakis, 2011, Daikos *et al*, 2010, Carmeli *et al*, 2010, Souli *et al*, 2010, Giakoupi *et al*, 2009). Η εκτεταμένη διασπορά παθογόνων στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες θέτει στο περιθώριο τον τελευταίο αντιμικροβιακό παράγοντα της θεραπευτικής φαρέτρας, τις καρβαπενέμες. Η αυξημένη επίπτωση των λοιμώξεων που οφείλονται στα εν λόγω παθογόνα στελέχη, συνιστούν ένα δυσεπίλυτο καθημερινό πρόβλημα των κλινικών ιατρών που επιβάλλει την άμεση εφαρμογή μέτρων ελέγχου λοιμώξεων αλλά και ένα διεθνές φαινόμενο που έχει προκαλέσει την άμεση ενεργοποίηση των φορέων Δημόσιας Υγείας που είναι υπεύθυνοι για την ασφάλεια των ασθενών σε χώρους παροχής υπηρεσιών υγείας.



Εικόνα 1.12. Κατανάλωση καρβαπενέμων, εκφρασμένη σε DDD ανά 1000 κατοίκους ανά ημέρα στο νοσοκομειακό τομέα και στην κοινότητα για 19 χώρες το 2010 (αριστερά) και ποσοστό ανθεκτικών στις καρβαπενέμες αζυμωτικών Gram αρνητικών βακτηριών για τις ίδιες χώρες το 2011 (δεξιά).

Περά από το γεγονός ότι η Ελλάδα κατατάσσεται πρώτη στη συνολική κατανάλωση αντιμικροβιακών παραγόντων μεταξύ των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης, σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα του Ευρωπαϊκό συστήματος επιτήρησης της μικροβιακής ανθεκτικότητας (European Antimicrobial Resistance Surveillance System, 2010) η Ελλάδα συγκαταλέγεται στις Ευρωπαϊκές χώρες με τα υψηλότερα επίπεδα μικροβιακής ανθεκτικότητας, με το ποσοστό των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες αζυμωτικών Gram αρνητικών βακτηριών να κυμαίνεται από 25 έως 50% (Εικόνα 1.12). Συγχρόνως, πληθαίνουν οι αναφορές για κρούσματα από ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη προερχόμενα από την Ελλάδα παγκοσμίως (Kassis-Chikhani *et al*, 2006, Cuzon *et al*, 2008, Woodford *et al*, 2008, Leverstein-van Hall *et al*, 2010, Prior *et al*, 2010, Tóth *et al*, 2010, Bogaerts *et al*, 2011, Babouee *et al*, 2011, Hrabák *et al*, 2011,).

Ο σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης, λοιπόν, είναι ο καθορισμός του ποσοστού και των επιπέδων ανθεκτικότητας στις καρβαπενέμες μεταξύ των αζυμωτικών Gram αρνητικών βακτηριών καθώς και ο καθορισμός των φαινοτύπων ανθεκτικότητας που επικρατούν στα

ελληνικά νοσοκομεία. Επίσης, η μελέτη αυτή, έχει σκοπό να συμβάλλει στην κατανόηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας των αζυμωτικών Gram αρνητικών βακτηριών στα εν λόγω αντιβιοτικά, μέσω προσδιορισμού των αντίστοιχων γονιδίων ανθεκτικότητας καθώς και στη συσχέτισή τους με τους φαινοτύπους αυτής. Τέλος, η μελέτη αυτή δύναται να συμβάλλει στη συσχέτιση των γονιδίων ανθεκτικότητας με την επικράτηση συγκεκριμένων βακτηριακών κλώνων, με σκοπό να προσδιοριστεί ο τρόπος εξάπλωσης των ανθεκτικών στελεχών στις καρβαπενέμες. Ως εκ τούτου, μέσω της κατανόησης των μηχανισμών ανθεκτικότητας και του τρόπου διασποράς των εν λόγω ανθεκτικών στελεχών, απώτερος στόχο της παρούσας μελέτης αποτελεί, η συμβολή στη διαμόρφωση και στην εφαρμογή της πολιτικής ελέγχου των λοιμώξεων και χρήσης των αντιβιοτικών στο νοσοκομειακό περιβάλλον, ώστε να περιορισθούν κατά το δυνατόν οι νοσοκομειακές λοιμώξεις από αζυμωτικά Gram αρνητικά βακτήρια ανθεκτικά στις καρβαπενέμες.

Μέθοδοι & Υλικά

2.1 Μικροβιολογικό Υλικό

Το υλικό της παρούσας μελέτης αποτέλεσαν όλες οι θετικές καλλιέργειες από κλινικά δείγματα ασθενών του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (ΠΓΝΛ, δυναμικότητας 643 κλινών) κατά το έτος 2011. Τα εν λόγω παθολογικά κλινικά δείγματα αφορούσαν αίμα, βιολογικά υγρά (εγκεφαλονωτιαία, παροχετεύσεων, πλευριτικά, τραχειοστομίας), εκκρίματα (βρογχικά, κολπικά, ουρηθρικά, οφθαλμικά, ρινικά, φαρυγγικά, ωτικά), καθετήρες (αρτηριακοί, περιτοναϊκοί, φλεβικοί), κόπρανα, ούρα, πτύελα και πύον ασθενών που νοσηλεύονταν στις παθολογικές και χειρουργικές κλινικές, στη μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) ή προσήλθαν στα εξωτερικά ιατρεία του νοσοκομείου.

Για την επιλογή των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες αρνητικών κατά Gram αζυμωτικών βακτηριών από το σύνολο των θετικών καλλιεργειών διενεργήθηκε υπό στείρες συνθήκες λήψη και ενοφθαλμισμός ικανοποιητικής ποσότητας αμιγούς καλλιέργειας σε MacConkey άγαρ No 3 (Mast Group), στο οποίο κατά την παρασκευή του είχε προστεθεί μεροπενέμη (Anfarm) σε τελική συγκέντρωση 8 mgr/ml. Ακολούθως, τα τρυβλία επωάστηκαν ανεστραμμένα στους 36 ^{o}C ± 2 ^{o}C και σε σχετική υγρασία 50% για 18 έως 24 ώρες υπό αερόβιες συνθήκες. Η ανάπτυξη άχρωμων αποικιών θεωρήθηκε δηλωτική της παρουσίας αρνητικών κατά Gram αζυμωτικών βακτηριών εν δυνάμει ανθεκτικών στις καρβαπενέμες.

Τα εν λόγω απομονωθέντα στελέχη ενοφθαλμίστηκαν και συντηρήθηκαν σε δυο ή περισσότερα αντίγραφα εν μέσω θρεπτικού ζωμού Tryptic soy (Mast Group) με περιεκτικότητα γλυκερόλης (Sigma-Aldrich) 10% στους -80 ^{o}C ώστε να χρησιμοποιηθούν για όλες τις καθοδικές διεργασίες της παρούσας μελέτης.

Επιπλέον, συμπεριλήφθησαν τα δυο πρώτα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *A. baumannii* έκαστου μήνα που απομονώθηκαν από νοσοκομεία διαφόρων γεωγραφικών περιοχών (24 στελέχη ανά νοσοκομείο) και συγκεκριμένα από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο ‘‘ΑΤΤΙΚΟΝ’’ (δυναμικότητας 645 κλινών), το Γενικό Νοσοκομείο ‘‘Ασκληπιείο Βούλας’’ (δυναμικότητας 402 κλινών) και το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών (δυναμικότητας 800 κλινών) (Εικόνα 2.1). Τέλος, συμπεριλήφθησαν στη παρούσα μελέτη όλα τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *A. baumannii* (47 στελέχη) που είχαν απομονωθεί με την προαναφερθείσα διαδικασία κατά το δεύτερο εξάμηνο του 2010 στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας.

Εικόνα 2.1. Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο ‘‘ΑΤΤΙΚΟΝ’’, Γενικό Νοσοκομείο ‘‘Ασκληπιείο Βούλας’’.

2.2 Ταυτοποίηση Μικροοργανισμών με Κλασικές Μεθόδους

2.2.1 Χρώση κατά Gram

Η χρώση κατά Gram αποτελεί την πιο σημαντική χρώση στη βακτηριολογία και χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση βακτηρίων με βάση τις φυσιολογικές ιδιότητες του κυτταρικού τους τοιχώματος (Moyes *et al,* 2009). Για τη χρώση κατά Gram των υπό μελέτη στελεχών χρησιμοποιήθηκε το Gram Color Kit σύμφωνα με το εγχειρίδιο της κατασκευάστριας εταιρίας (Liofilchem).

2.2.2 Σύστημα ταυτοποίησης api 20E

Το api 20E (bioMerieux) αποτελεί ένα προτυποποιημένο σύστημα ταυτοποίησης για *Enterobacteriaceae* και άλλα μη απαιτητικά Gram αρνητικά βακτήρια που χρησιμοποιεί 21 βιοχημικές δοκιμασίες σε μικρογραφία και μια βάση δεδομένων (Smith *et al*, 1972). Για την ταυτοποίηση των υπό μελέτη στελεχών χρησιμοποιήθηκε το εν λόγω σύστημα σύμφωνα με το εγχειρίδιο της κατασκευάστριας εταιρίας (bioMerieux).

2.3 Ταυτοποίηση Μικροοργανισμών με Μοριακές Μεθόδους

2.3.1 Εκχύλιση Γενετικού Υλικού

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

Η εκχύλιση του DNA απαιτεί την λύση των κυττάρων, την απενεργοποίηση των ενδοκυτταρικών νουκλεασών και τον διαχωρισμό του από τα κυτταρικά υπολείμματα. Η λύση των κυττάρων, η οποία πραγματοποιείται είτε με μηχανική διάρρηξη είτε με εφαρμογή χημικών ή ενζύμων, πρέπει να είναι αφενός ισχυρή ώστε να τμηματοποιήσει το βακτηριακό κύτταρο και αφετέρου ήπια ώστε να διατηρηθεί ακέραιο το DNA. Η απενεργοποίηση των ενδοκυτταρικών νουκλεασών πραγματοποιείται με τη χρήση ισχυρών χαοτροπικών αλάτων, ενώ η απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμμάτων επιτυγχάνεται με φιλτράρισμα ή κατακρήμνιση.

Η εκχύλιση του DNA διενεργήθηκε με τη χρήση του Quick-gDNA MiniPrep Kit, σύμφωνα με το εγχειρίδιο της κατασκευάστριας εταιρίας (Zymo Research Corp). Συγκεκριμένα, αρχικά προετοιμάζονται 200 μl ομογενούς εναιωρήματος 3 McFarland ($9x10^8$ cfu/ml) έκαστου στελέχους σε WFI, στο οποίο προστίθεται τετραπλάσιος όγκος (800 μl) Genomic Lysis Buffer, το μίγμα αναδεύεται με τη χρήση vortex και εν συνεχεία επωάζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10 λεπτά. Έπειτα, το μίγμα μεταφέρεται σε στήλη (Zymo-Spin^{TM} Column), η οποία έχει τοποθετηθεί σε σωλήνα συλλογής, φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου σε 10.000 g για 1 λεπτό και το διήθημα απορρίπτεται. Ακολούθως, προστίθενται 200 μl DNA Pre-Wash Buffer στη στήλη, η οποία φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου σε 10.000 g για 1

λεπτό και το διήθημα απορρίπτεται. Εν συνεχεία, προστίθενται 500 μl g-DNA Wash Buffer στη στήλη η οποία φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου σε 10.000 g για 1 λεπτό και το διήθημα απορρίπτεται. Η στήλη μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα συλλογής και προστίθενται σε αυτή 50 μl DNA Elution Buffer, επωάζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 λεπτά και φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου στη μέγιστη δυνατή ταχύτητα για 30 sec. Τέλος, για την ανίχνευση της παρουσίας και την ποσοτικοποίηση γενετικού υλικού στο διήθημα (~50 μl) ακλούθησε ηλεκτροφόρηση 5 μl του διηθήματος σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8 % (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE και φωτομέτρηση, όπως περιγράφεται παρακάτω.

2.3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός νουκλεϊκών οξέων με φασματοφωτόμετρο

Η ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων μέσω φωτομέτρησης βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA και RNA απορροφούν εκλεκτικά σε μήκος κύματος 260 nm. Η τιμή οπτικής πυκνότητας ίση με 1 (OD=1), αντιστοιχεί σε συγκέντρωση περίπου 50 μg/ml για δίκλωνο DNA, 40 μg/ml για μονόκλωνο DNA ή RNA και περίπου 20 μg/ml για μονόκλωνα ολιγονουκλεοτίδια. Ο λόγος των τιμών OD στα 260 προς 280 nm παρέχει μια εκτίμηση της καθαρότητας του DNA, δηλαδή κατά πόσο αυτό είναι απαλλαγμένο από πρωτεΐνες. Για καθαρά διαλύματα DNA και RNA ο λόγος OD260/OD280 κυμαίνεται μεταξύ 1,8 έως 2,0 ενώ όταν το διάλυμα περιέχει πρωτεΐνες ή φαινόλη, η τιμή αυτή είναι σημαντικά μικρότερη.

Συγκεκριμένα, μετά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% (w/v) για την ανίχνευση της παρουσίας γενετικού υλικού ακλούθησε αραίωση 5 μl διηθήματος με 995 μl ddH_2O. Τέλος, διενεργήθηκε φωτομέτρηση στα 260 και 280 nm και υπολογισμός της συγκέντρωσης του δίκλωνου DNA από τη τιμή της οπτικής πυκνότητας στα 260 nm.

2.3.3 Ενίσχυση της Αλληλουχίας του16S rDNA

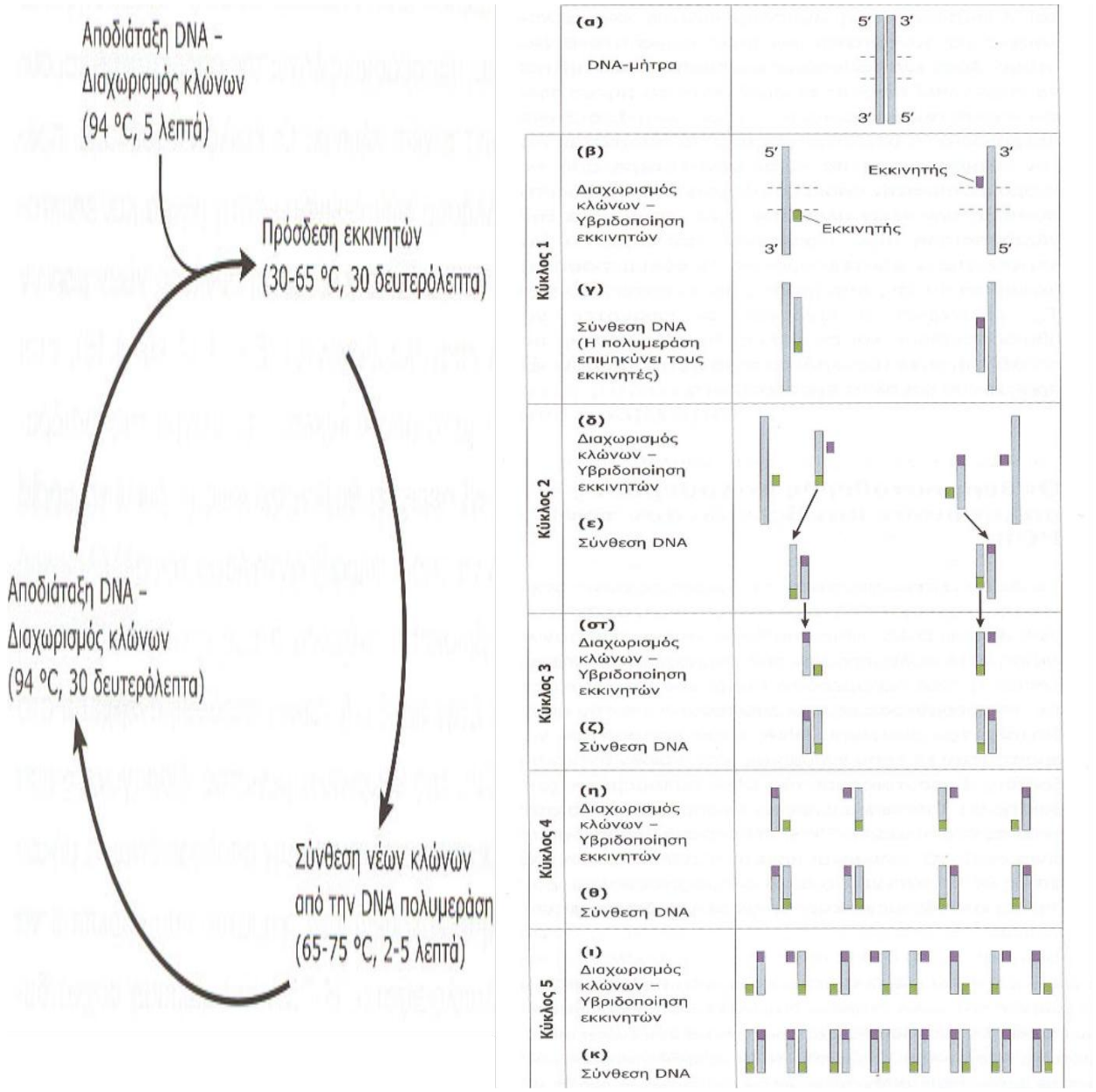
Για την ενίσχυση του 16S rDNA χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), η οποία είναι μια μέθοδος που στηρίζεται στη κινητική επανασύνδεσης θερμικά αποδιαταγμένου δίκλωνου DNA και παρέχει τη δυνατότητα εκλεκτικού in vitro πολλαπλασιασμού μιας αλληλουχίας DNA που ορίζεται από ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers) για το 5΄ και το 3΄ άκρο, με τη δράση μιας ειδικής θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (Taq πολυμεράσης) (Mullis *et al*, 1986; Saiki *et al*, 1988). Στο ρυθμιστικό διάλυμα

για την τέλεση της PCR επιπλέον του DNA–στόχου, του ζεύγους των εκκινητών και της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης απαιτείται η παρουσία ελεύθερων 5΄ τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) για τη σύνθεση των θυγατρικών αλυσίδων καθώς και δισθενών ιόντων μαγνησίου για την βέλτιστη δράση της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης.

Στη στοιχειώδη μορφή της PCR κάθε κύκλος επιτελείται σε τρία στάδια (Εικόνα 2.3). Το πρώτο στάδιο είναι η μετουσίωση του DNA-στόχου (denaturation), κατά την οποία επιτυγχάνεται μετατροπή του δίκλωνου DNA σε μονόκλωνο συνήθως σε θερμοκρασίες 92-95 ^{o}C. Το δεύτερο εν σειρά στάδιο είναι ο υβριδισμός των εκκινητικών μορίων (annealing), όπου σε θερμοκρασία 50-65 ^{o}C (ανάλογα με τη σύσταση σε γουανίνη και κυτοσίνη) επιτυγχάνεται η εναπόθεση τους στις συμπληρωτικές για αυτούς περιοχές του DNA στόχου. Τέλος, το τρίτο στάδιο είναι η επέκταση (extension) των εκκινητών με τη προσθήκη δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο ιχνάριο του DNA (με κατεύθυνση 5΄→3΄) μέσω της ενζυμικής δράσης της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης σε θερμοκρασία 70-78 ^{o}C.

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης συνήθως πραγματοποιείται επί 25 έως 40 κύκλους. Κάθε φορά που συμπληρώνεται ένας κύκλος, η αλληλουχία στόχος θεωρητικά διπλασιάζεται, με αποτέλεσμα αυξάνοντας τον αριθμό των κύκλων να αυξάνεται εκθετικά και ο αριθμός των ανατύπων του διότι οι κλώνοι που σχηματίζονται χρησιμοποιούνται ως πρότυπο στον επόμενο κύκλο (Εικόνα 2.3). Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται μια γεωμετρική συσσώρευση πολλαπλασιασθέντων αλληλουχιών στόχων (2^n όπου n ο αριθμός των κύκλων) αυξάνοντας κατά πολύ την ευαισθησία της τεχνικής αυτής.

Συγκεκριμένα για την ενίσχυση του 16S rDNA χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών με τις αλληλουχίες: $16S_{rRNA}$F: 5'-TGCCAGCAGCCGCGGTAATAC-3' (507-527, εμπρόσθιος) και $16S_{rRNA}$R: 5'-CGCTCGTTGCGGGACTTAACC-3' (1078-1098, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά *E. coli* ATCC 259222, X80724.1), οι οποίοι ενισχύουν ένα τμήμα 593 bp αυτού (Han *et al*, 2002) σε συνδυασμό με θερμοανθεκτική πολυμεράση ικανή να ενισχύει τμήματα έως 5 kb. Η σύσταση του μίγματος για την εν λόγω αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ήταν η εξής: 40 ng γενωμικού DNA, 50 mM KCl, 10 mM Tris–HCl (pH 8,8), 0,08% (v/v) Nonidet P40, 2 Units Taq DNA πολυμεράση (Fermentas), 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM $MgCl_2$ και 1 mM από κάθε εκκινητή.



Εικόνα 2.3. Σχηματική αναπαράσταση ενός κύκλου της PCR και της εκθετική αύξηση των αντιγράφων του DNA κατά την PCR (Watson *et al*, 2007).

Το πρόγραμμα της συγκεκριμένης αντίδρασης ξεκινούσε με ένα αρχικό στάδιο στους 94 ^{o}C για 7 λεπτά και ακολουθούσαν 35 κύκλοι ο καθένας από τους οποίους περιελάμβανε 1 λεπτό σε θερμοκρασία αποδιάταξης (94 ^{o}C), 1 λεπτό σε θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητικών μορίων στο DNA στόχο (60 ^{o}C) και 2 λεπτά σε θερμοκρασία επέκτασης των νεοσυντιθέμενων πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων (72 ^{o}C). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε με ένα τελικό στάδιο στους 72 ^{o}C για 10 λεπτά.

2.3.4 Ηλεκτροφόρηση σε Πήκτωμα Αγαρόζης

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό και την αναγνώριση τμημάτων DNA είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η τεχνική αυτή είναι απλή, γρήγορη και ικανή να διαχωρίζει μίγματα τμημάτων DNA που δεν μπορούν να διαχωριστούν με άλλες τεχνικές.

Σύμφωνα με αυτή την τεχνική, τα τμήματα DNA αναγκάζονται να κινηθούν μέσω των πόρων που σχηματίζονται σε πήκτωμα αγαρόζης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται κυρίως από τέσσερις παραμέτρους: το μέγεθος του DNA, τη συγκέντρωση της αγαρόζης, τη στερεοδιάταξη του DNA και την ένταση του ρεύματος. Η θέση του DNA στο πήκτωμα προσδιορίζεται υπό υπεριώδες φως με τη χρήση μικρής συγκέντρωσης βρωμιούχου αιθιδίου, μιας φθορίζουσας χρωστικής που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις αζωτούχες βάσεις του DNA.

Συγκεκριμένα, η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε οριζόντια συσκευή και η συγκέντρωση του πηκτώματος ήταν 0,8% (w/v) αγαρόζη (Lonza) σε διάλυμα TBE 1X (Lonza). Στο διάλυμα αγαρόζης είχε εξαρχής προστεθεί 0,6% διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (Sigma-Aldrich) συγκέντρωσης 10 mg/ml. Στα δείγματα του DNA έγινε προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης 6X (1:5, Fermentas) και στη συνέχεια φορτώθηκαν στα διαμορφωμένα πηγαδάκια του πηκτώματος. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν στα 80 V για 45 περίπου λεπτά της ώρας. Ακολούθησε παρατήρηση του πηκτώματος σε συσκευή με υπεριώδη ακτινοβολία και φωτογράφησή του.

2.3.5 Καθαρισμός Προϊόντων της PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR ώστε να επακολουθήσει η διαδικασία της αλληλούχισής τους έγινε με το PureLink PCR Purification Kit, σύμφωνα με το εγχειρίδιο της κατασκευάστριας εταιρίας (Invitrogen).

Συγκεκριμένα, αρχικά προσθέτονται 10 ml ισοπροπανόλης 100% και 32 ml αιθανόλης 96-100% στα 15 ml Binding Buffer και στα 8 ml Wash Buffer αντίστοιχα και τα διαλύματα αναδεύονται ελαφρώς ώστε να καταστούν ομοιογενή. Εν συνεχεία, προσθέτεται τετραπλάσιος όγκος ανασυσταμένου με ισοπροπανόλη Binding Buffer από τον όγκο του προϊόντος της PCR σε καθένα από αυτά και αναμειγνύεται καλά. Τοποθετείται έκαστο από τα παραπάνω διαλύματα Binding Buffer-προϊόντος της PCR σε στήλη φυγοκέντρησης (PureLink). Φυγοκεντρείται σε

θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό στα 10.000 g και απορρίπτεται το διήθημα. Έπειτα, προσθέτονται σε έκαστη στήλη 650 μl ανασυσταμένου με αιθανόλη Wash Buffer και φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό στα 10.000 g και απορρίπτεται εκ νέου το διήθημα. Επαναφυγοκεντρείται έκαστη στήλη σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά στη μέγιστη δυνατή ταχύτητα και απορρίπτεται το διήθημα ώστε να απομακρυνθούν τα τυχόν υπολείμματα του Wash Buffer. Έπειτα, απορρίπτονται οι σωλήνες συλλογής και έκαστη στήλη τοποθετείται σε σωλήνα έκλουσης PureLink (1,7 ml), και προσθέτονται 50 μl Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) στο κέντρο κάθε στήλης. Ακολούθως, επωάζονται οι στήλες για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούνται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά στη μέγιστη δυνατή ταχύτητα. Τέλος, 5 μl από το διήθημα (~50 μl) που περιέχει το καθαρισμένο προϊόν της PCR, υποβάλλεται σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

2.3.6 Ανάλυση πρωτοδιάταξης αλληλουχίας DNA (Sequencing)

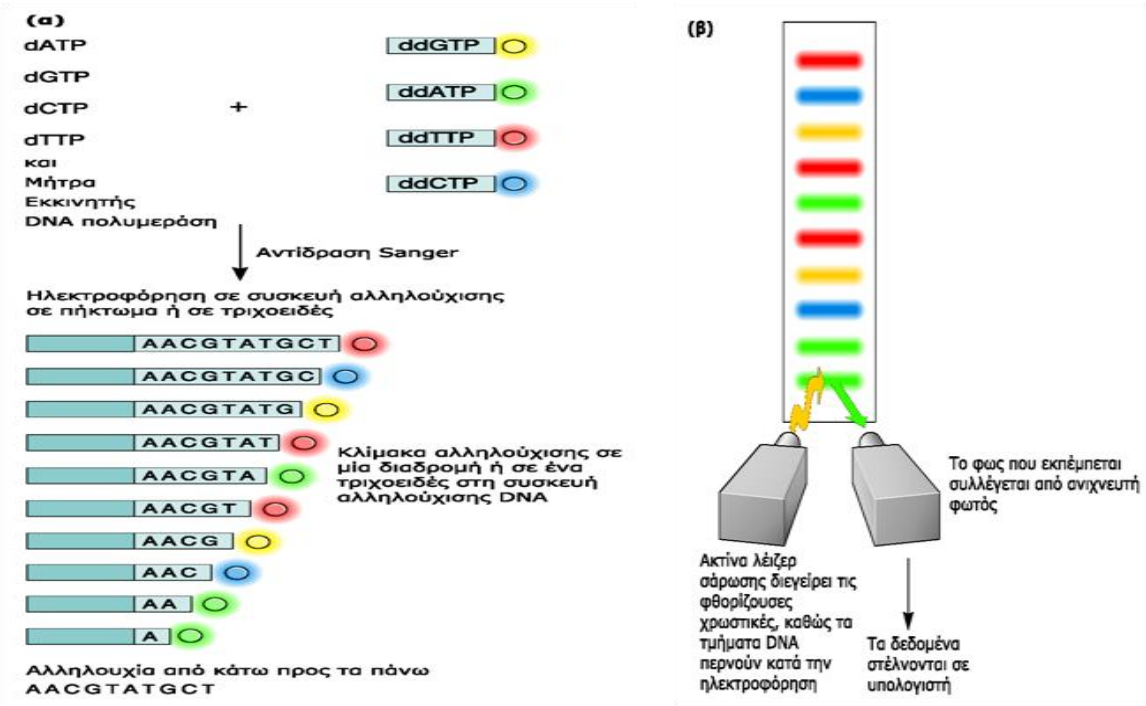
Η ανάλυση της πρωτοδιάταξης της αλληλουχίας του DNA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Sanger, γνωστή και ως διδεόξυ-μέθοδος, που βασίζεται στον βασεο-ειδικό τερματισμό μιας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης επέκτασης εκκινητή.

Σύμφωνα με αυτή, διενεργείται μια αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την εκτέλεση τις οποίας εκτός των τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων χρησιμοποιούνται και τροποποιημένα νουκλεοτίδια (διδεόξυριβονουκλεοτιδια) που δύναται να σταματούν την επέκταση της συμπληρωματικής αλυσίδας.

Το διδεόξυριβονουκλεοτιδιο αυτό μπορεί να ενσωματώνεται στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, όμως δεν μπορεί να σχηματίσει φωσφοδιεστερικό δεσμό με επόμενο νουκλεοτίδιο, γιατί λείπει το υδροξύλιο στην 3΄θέση. Τα διδεοξυριβονουκλεοτίδια αυτά είναι σημασμένα το καθένα με διαφορετική φθορίζουσα χημική ομάδα. Έτσι, σχηματίζεται μείγμα προϊόντων τερματισμού που μπορεί να έχουν οποιαδήποτε από τις τέσσερις βάσεις στο 3΄ άκρο τους. Τα προϊόντα αυτά προκύπτουν από την ενσωμάτωση ενός διδεοξυριβονουκλεοτιδίου σε μία τυχαία θέση κατά τη σύνθεση.

Επειδή οι 4 φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται εκπέμπουν φωτεινή ακτινοβολία σε διαφορετικό μήκος κύματος, η ταυτότητα της βάσης στην οποία τερματίζεται η σύνθεση αντιστοιχεί στο χρώμα του διδεοξυριβονουκλεοτιδίου που έχει ενσωματωθεί στο 3΄ άκρο.

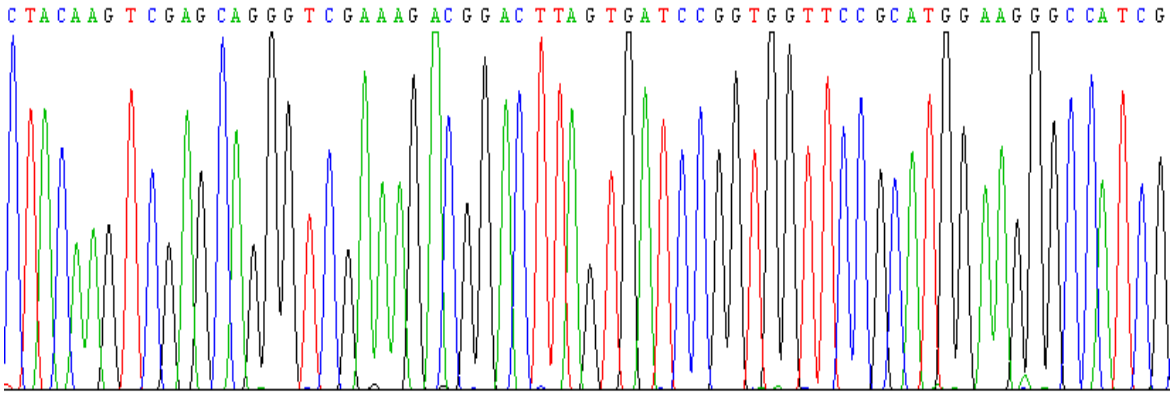
Όταν τα προϊόντα αυτής της αντίδρασης ηλεκτροφορηθούν στη σειρά, η ακολουθία με την οποία τα νουκλεοτίδια προστίθενται στον εκκινητή δύναται να βρεθεί από τα αυξανόμενου μεγέθους διαδοχικά θραύσματα που προκύπτουν στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης της συσκευής αυτόματης αλληλούχισης.



Εικόνα 2.5. Διαδικασία αλληλούχισης βάση της αυτοματοποιημένης μεθόδου Sanger (Watson et al, 2007).

Τα κομμάτια μεταναστεύουν σύμφωνα με το μέγεθός τους και οι φθορίζουσες χρωστικές διακρίνουν πιο νουκλεοτίδιο είναι στο τέλος κάθε κομματιού. Κάθε διαδοχικό τμήμα είναι κατά ένα νουκλεοτίδιο μεγαλύτερο από το προηγούμενο. Οι φθορίζουσες χρωστικές διεγείρονται από την ακτίνα laser ενός ανιχνευτή, καθώς τα τμήματα περνούν κατά την ηλεκτοφόρηση (Εικόνα 2.5). Ο αισθητήρας του ανιχνευτή καταγράφει την ένταση και το μήκος κύματος του φωτός, μετατρέπει το σήμα φθορισμού σε ηλεκτρικό σήμα και το στέλνει σε έναν υπολογιστή. Αυτό το σήμα αναλύεται με αλγορίθμους ειδικούς για αλληλούχιση, οι οποίοι αναγνωρίζουν τη βάση που βρίσκεται στο 3΄ άκρο του τμήματος, δηλαδή από το μικρότερο στο μεγαλύτερο τμήμα.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε ένα ηλεκτροφερόγραμμα (electropherogram), μια σειρά, δηλαδή από κορυφές που αντιστοιχούν σε κάποια βάση ανάλογη με το χρώμα φθορισμού (Εικόνα 2.6). Συγκεκριμένα αναπαριστάται η ένταση των φθοριζόντων σημάτων ως συνάρτηση του χρόνου ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 2.6. Ηλεκτροφερόγραμμα ανάλυσης πρωτοδιάταξης αλληλουχίας DNA.

Η αλληλούχιση και προς τις δυο κατεύθυνσης των τμημάτων ενίσχυσης του 16S rDNA στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας και υποβλήθηκε σε μελέτη με το πρόγραμμα BLAST, όπως αναλύεται παρακάτω.

2.3.7 Σύγκριση Αλληλουχιών DNA

Οι συγκρίσεις με τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες της GeneBank πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των προγραμμάτων της οικογένειας BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al*, 1990), που είναι διαθέσιμα στο δικτυακό τόπο του NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) και συγκεκριμένα του προγράμματος BLASTN.

Το αποτέλεσμα της σύγκρισης με το εν λόγω πρόγραμμα απεικονίζεται από το λογισμικό BLAST με τη μορφή νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (BLAST hits) στοιχισμένων με την αλληλουχία που αποτελεί το ερώτημα (Query) της σύγκρισης. Επιπλέον, αναφέρεται το ποσοστό ταυτότητας μεταξύ του κάθε BLAST hit και της αλληλουχίας Query, καθώς και η τιμή E, η οποία εκφράζει την στατιστική σπουδαιότητα κάθε στοίχισης, δηλαδή την πιθανότητα η στοίχιση να είναι τυχαία.

Για όλες τις συγκρίσεις των αλληλουχιών του 16S rDNA που πρόεκυψαν μετά την αλληλούχιση χρησιμοποιήθηκε εξ' ορισμού ως όριο η τιμή E=0 και οι μικρότερες τιμές από αυτήν θεωρήθηκαν από το πρόγραμμα στατιστικά σημαντικές. Οι αποδεκτές στοιχίσεις είχαν σχεδόν μηδενική τιμή E, ενώ για την επιτυχή ταυτοποίηση έκαστου στελέχους το ελάχιστο ποσοστό ταυτότητας μεταξύ του κάθε BLAST hit και της υπό μελέτης αλληλουχίας ορίστηκε το 98%.

2.4 Αντιβιόγραμμα

Ο έλεγχος της ευαισθησίας όλων των υπό μελέτη στελεχών στα διαθέσιμα στη κλινική θεραπευτική αντιβιοτικά και δη στις καρβαπενέμες έγινε με τη δοκιμασία διάχυσης σε άγαρ κατά Kirby-Bauer και με τη δοκιμασία διαδοχικών αραιώσεων για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης αυτών (Minimum Inhibitory Concentration, MIC), όπως αναφέρεται αναλυτικότερα παρακάτω.

2.4.1 Δοκιμασία Διάχυσης των Δίσκων

Πρόκειται για την πιο διαδεδομένη και απλή μέθοδο που χρησιμοποιείται στα διαγνωστικά εργαστήρια των νοσοκομείων. Στη συγκεκριμένη μέθοδο, κατάλληλο μικροβιακό εναιώρημα ενοφθαλμίζεται στην επιφάνεια κατάλληλου θρεπτικού υλικού. Στην συνέχεια τοποθετείται δίσκος από διηθητικό χαρτί, εμποτισμένος με κατάλληλη συγκέντρωση αντιβιοτικού. Όταν ο χάρτινος δίσκος έρθει σε επαφή με την υγρή επιφάνεια του υλικού, προσροφά νερό και το αντιβιοτικό διαχέεται στο υλικό που τον περιβάλλει.

Η διάχυση του αντιβιοτικού γίνεται με βάση την αρχή ότι το αντιβιοτικό μετακινείται από περιοχές μεγαλύτερης συγκέντρωσης και εξαρτάται από τις φυσικο-χημικές του ιδιότητες. Όσο αυξάνεται η απόσταση από το δίσκο, τόσο μειώνεται (λογαριθμικά) η συγκέντρωση του αντιβιοτικού. Ταυτόχρονα με τη διάχυση του αντιβιοτικού, τα βακτήρια που έχουν τοποθετηθεί στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται. Η ζώνη αναστολής σχηματίζεται όταν η συγκέντρωση του αντιβιοτικού, ίση ή μεγαλύτερη από την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC), επιδρά σε ένα αρκετά μεγάλο βακτηριακό πληθυσμό για να επιτύχει την αναστολή του. Από τη διάμετρο της ζώνης αναστολής, ανατρέχοντας στους

ερμηνευτικούς πινάκες που συντάσσει ετησίως το CLSI, χαρακτηρίζουμε ένα μικροοργανισμό ως ευαίσθητο, μετρίως ευαίσθητο ή ανθεκτικό, συγκρίνοντας τις διαμέτρους με εκείνες που προτείνει το CLSI για κάθε αντιβιοτικό ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού (CLSI, 2009α). Το CLSI έχοντας αναλύσει μεγάλο αριθμό μικροβιακών στελεχών, με παρόμοιο ρυθμό ανάπτυξης, διαφορετική όμως ευαισθησία, έχει στατιστικά συσχετίσει τη διάμετρο ζώνης αναστολής με την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Minimal Inhibitory Concentration, MIC).

Για την εν λόγω μέθοδο, αρχικά, παρασκευάζεται ομογενές βακτηριακό εναιώρημα 0,5 McFarland ($1,5x10^8$ cfu/ml) από μεμονωμένες αποικίες ολονύχτιας καλλιέργειας έκαστου στελέχους. Έπειτα ενοφθαλμίζεται ομοιόμορφα με αυτό η επιφάνεια τρυβλίου με Mueller-Hinton II άγαρ (bioMerieux) και απομακρύνεται η περίσσεια του εναιωρήματος από αυτό. Αφού απορροφηθεί πλήρως η πλεονάζουσα υγρασία, τοποθετούνται τα εμποτισμένα με αντιβιοτικό δισκία (Mast group) στην επιφάνεια του άγαρ και τα τρυβλία επωάζονται ανεστραμμένα σε κλίβανο για 24 ώρες. Τέλος, αξιολογούνται τα αποτελέσματα με βάση τα κριτήρια της CLSI.

Συγκεκριμενα, χρησιμοποιηθηκαν τα κατωθι δισκία αντιβιοτικών συγκεκριμένης φόρτισης της εταιρίας Mast group: Amikacin (30 mg), Ampicillin/Sulbactam (20 mg), Aztreonam (30 mg), Cefepime (30 mg), Ceftazidime (30 mg), Ciprofloxacin (5 mg), Colistin (10 mg), Gentamicin (10 mg), Imipenem (10 mg), Levofloxacin (5 mg), Meropenem (10 mg), Minocycline (30 mg), Netilmicin (30 mg), Piperacillin (100 mg), Piperacillin/Tazobactam (110 mg), Tetracycline (30 mg), Ticarcillin (75 mg), Ticarcillin/Clavulanic Acid (85 mg), Tobramycin (10 mg) Trimethoprim/Sulfamethoxazole (25 mg).

2.4.2 Προσδιορισμός Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης (MIC)

Οι μέθοδοι αραίωσης των αντιβιοτικών σε υγρά ή στερεά θρεπτικά υλικά χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο ευαισθησίας των αερόβιων και δυνητικά αναερόβιων βακτηρίων στα αντιβιοτικά. Πρόκειται για μεθόδους προτυποποιημένες από το Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), χρήσιμες ως μέθοδοι αναφοράς τόσο σε κλινικά όσο και σε ερευνητικά εργαστήρια. Η αρχή στην οποία βασίζονται είναι η έκθεση συγκεκριμένου μικροβιακού εναιωρήματος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικού. Η μικρότερη συγκέντρωση αντιβιοτικού που δεν επιτρέπει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού καλείται ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του (MIC). Η MIC δεν παριστάνει μια απολυτή τιμή, ενώ η ‘‘αληθινή’’ MIC μπορεί να βρίσκεται

μεταξύ της ελάχιστης συγκέντρωσης που αναστέλλει τη μικροβιακή ανάπτυξη και της αμέσως προηγούμενης αραίωσης που επιτρέπει τη μικροβιακή ανάπτυξη.

Για τον πλήρη προσδιορισμό της MIC χρησιμοποιούνται 10 υποδιπλάσιες αραιώσεις κάθε αντιβιοτικού, αντιπροσωπευτικές των αντιστοιχών θεραπευτικών συγκεντρώσεων (π.χ 0,25, 0,5,1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 και 128 μg/ml). Με βάση τις συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών που επιτυγχάνονται στο αίμα και των MIC καθορίζονται 3 κατηγορίες ευαισθησίας οι οποίες ερμηνεύονται ως εξής: i) *ευαίσθητοι* (susceptible, S): μικροοργανισμοί οι οποίοι αναστέλλονται από συγκεντρώσεις αντιβιοτικού, που επιτυγχάνονται στο αίμα κατά τη συνήθη θεραπευτική χορήγηση, ii) *μετρίως ευαίσθητοι* (intermediate, I): μικροοργανισμοί που αναστέλλονται όταν το φάρμακο χορηγείται στη μεγίστη ανεκτή δοσολογία και iii) ανθεκτικοί (resistant, R): μικροοργανισμοί οι οποίοι δεν αναστέλλονται από συγκεντρώσεις που επιτυγχάνεται συνήθως στο αίμα.

Η CLSI καθορίζει ανάλογα με το αντιβιοτικό και το μικροοργανισμό δυο κριτικές συγκεντρώσεις: τη μικρή (c) και τη μεγάλη (C). Αν η MIC του υπό εξέταση μικροοργανισμού είναι μικρότερη ή ίση της c (MIC ≤ c) τότε είναι ευαίσθητος, αν είναι μεγαλύτερη της C (MIC > C) είναι ανθεκτικός και αν είναι μεγαλύτερη της c και μικρότερη ή ίση της C (c < MIC ≤ C) τότε είναι μετρίως ευαίσθητος για το συγκεκριμένο αντιβιοτικό.

Για την εν λόγω μέθοδο, αρχικά, παρασκευάζεται 3 ml ομογενούς βακτηριακού εναιωρήματος 0,5 McFarland ($1,5x10^8$ cfu/ml) από μεμονωμένες αποικίες ολονύχτιας καλλιέργειας έκαστου στελέχους σε θρεπτικό ζωμό Mueller-Hinton II (Mast group). Αφού γίνεται η παρασκευή των διαδοχικών αραιώσεων των υπό εξέταση αντιβιοτικών (2,5, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 και 1280 μg/ml) σε αποστειρωμένα σωληνάρια 13x100 mm με όγκο 300 μl, ενοφθαλμίζονται σε αυτά 300 μl από το παρασκευασθέν βακτηριακό εναιώρημα και προσθέτεται ο κατάλληλος όγκος θρεπτικού ζωμού Mueller-Hinton II (Mast group) μέχρι τελικού όγκου 3 ml (με αντιπροσωπευτικές συγκεντρώσεις αντίστοιχες των θεραπευτικών). Τα σωληνάρια επωάζονται σε κλίβανο για 24 ώρες. Τέλος, αξιολογούνται τα αποτελέσματα με βάση τα κριτήρια της CLSI, θεωρώντας τη μικρότερη συγκέντρωση αντιβιοτικού που αποτρέπει την ανάπτυξη του εν λόγω μικροοργανισμού ως την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση για το συγκεκριμένο αντιβιοτικό (MIC).

Συγκεκριμενα, χρησιμοποιηθηκαν τα κατωθι αντιβιοτικά σε σκόνη της εταιρίας Sigma-Aldrich: Amikacin (5 g), Ampicillin (25 g), Aztreonam (50 mg), Clavulanic Acid (10 g),

Cefepime (100 mg), Ceftazidime (5 g), Ciprofloxacin (25 g), Colistin (100 mg), Gentamicin (50 mg), Imipenem (25 mg), Levofloxacin (10 mg), Meropenem (10 mg), Minocycline (25 mg), Netilmicin (5 mg), Piperacillin (5 mg), Sulbactam (10 mg), Sulfamethoxazole (10 g), Tazobactam (10 mg), Tetracycline (25 g), Ticarcillin (1 g), Tigecycline (25 mg), Tobramycin (100 mg), Trimethoprim (25 mg).

2.5 Φαινοτυπική Διερεύνηση Ανθεκτικότητας έναντι Καρβαπενέμων

2.5.1 Τροποποιημένη Δοκιμασία κατά Hodge

Διάφορες απλές φαινοτυπικές δοκιμές, οι περισσότερες των οποίων στηρίζονται στη μέθοδο διάχυσης δίσκων σε άγαρ έχουν περιγραφεί και καθιερωθεί για την αναζήτηση αζυμωτικών βακτηρίων που παράγουν καρβαπενεμάσες, ωστόσο μόνο η τροποποιημένη δοκιμασία κατά Hodge συστήνεται από τη CLSI για την ανίχνευση των εν λόγω βακτηρίων. Η συγκεκριμένη δοκιμασία περιγράφηκε τη δεκαετία του 1970 και αποτελεί μια αποτελεσματική αλλά μη ειδική δοκιμασία ανίχνευσης της παραγωγής καρβαπενεμασών (Hodge *et al*, 1978). Η τροποποιημένη δοκιμασία κατά Hodge στηρίζεται στη μείωση της δραστικότητας ενός δίσκου καρβαπενέμης έναντι ενός ευαίσθητου στις καρβαπενέμες στελέχους *E. coli* (ATCC 25922), λόγω της παραγωγής καρβαπενεμάσης από το υπό μελέτη στέλεχος. Η συγκεκριμένη δοκιμασία είναι ευαίσθητη για την ανίχνευση ενός ενζυμικού μηχανισμού ανθεκτικότητας έναντι των καρβαπενέμων αλλά δεν δίδει πληροφορίες σχετικά με τον τύπο της καρβαπενεμάσης που παράγει το υπό μελέτη στέλεχος.

Συγκεκριμένα, εναιώρημα πυκνότητας 0,5 McFarland του στελέχους *E. coli* ATCC 25922 ενοφθαλμίζεται σε Mueller-Hinton II άγαρ (MH II agar, bioMerieux) και στο κέντρο του τρυβλίου τοποθετείται δίσκος μεροπενέμης (MEM, 10 μg, Mast group). Από την περιφέρεια του δίσκου προς την περιφέρεια του τρυβλίου γίνεται ακτινωτά αδρός εμβολιασμός με το ύποπτο για παραγωγή καρβαπενεμάσης στέλεχος. Επαναλαμβάνεται η ίδια δοκιμασία με στέλεχος που δεν έχει παράγει καρβαπενεμάση για να χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός μάρτυρας. Μετά από την επώαση για 16 έως 24 ώρες στους 37 ^{o}C, αξιολογούνται τα αποτελέσματα και ως θετικό αποτέλεσμα θεωρείται η παραμόρφωση της ζώνης αναστολής του ευαίσθητου στελέχους, δηλαδή η αναστολή της δράσης της μεροπενέμης γύρω από τον αδρό εμβολιασμό του υπό μελέτη στελέχους.

2.5.2 Δοκιμασία Αναστολής Αντλιών Εκροής

Σε αντίθεση με τις ευκαρυωτικές αντλίες εκροής, οι οποίες απαιτούν την παρουσία ATP, οι βακτηριακές αντλίες εκροής χρησιμοποιούν ως κινητήρια δύναμη την διαφορά της συγκέντρωσης πρωτονίων εκατέρωθεν της πλασματικής βακτηριακής μεμβράνης. Έτσι, λοιπόν, έχει προταθεί μια απλή φαινοτυπική διαδικασία για την ανίχνευση αντλιών εκροής που ενοχοποιούνται για την ανθεκτικότητα έναντι αντιμικροβιακών παραγόντων. Η δοκιμασία αυτή περιλαμβάνει τον έλεγχο της ανάπτυξης του υπό μελέτη στελέχους παρουσία τόσο του εξεταζόμενου αντιβιοτικού όσο και του παράγοντα CCCP (carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone, Sigma-Aldrich), που αποτελεί αναστολέα των βακτηριακών αντλιών εκροής (Pournaras *et al*, 2005).

Συγκεκριμένα, εναιώρημα πυκνότητας 0,5 McFarland του υπό μελέτη στελέχους ενοφθαλμίζεται σε τρυβλίο με Mueller-Hinton II άγαρ (MH II agar, bioMerieux) στο οποίο έχει ενσωματωθεί CCCP με τελική συγκέντρωση 12,5 μM και σε τρυβλίο με Mueller-Hinton II άγαρ (bioMerieux) απουσία του εν λόγω παράγοντα. Στο κέντρο των προαναφερθέντων τρυβλίων τοποθετείται δίσκος μεροπενέμης (MEM, 10 μg, Mast group) και ακολουθεί επώαση για 16 έως 24 ώρες στους 37 ^{o}C. Τέλος, αξιολογούνται τα αποτελέσματα με ενδεικτικό της συμμετοχής αντλιών εκροής στην ανθεκτικότητα έναντι των καρβαπενέμων την μείωση της άλου αναστολής της μεροπενέμης στο τρυβλίο με CCCP σε σχέση με το τρυβλίο χωρίς CCCP.

2.5.3 Δοκιμασία Αναστολής με Συνδυασμό Δίσκων

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το θετικό αποτέλεσμα στη τροποποιημένη δοκιμασία κατά Hodge είναι ενδεικτικό παραγωγής καρβαπενεμάσης, χωρίς όμως, να μπορεί να διακριθεί ο τύπος αυτής. Για το σκοπό αυτό, έχει προταθεί η δοκιμασία αναστολής με το συνδυασμό δίσκων που έχουν διαποτιστεί με φαινυλβορονικό οξύ (PBA) ή/και EDTA, παράγοντες που αναστέλλουν εκλεκτικά τη δράση των καρβαπενεμασών των τάξεων A και B αντίστοιχα (Tsakris *et al*, 2010).

Συγκεκριμένα, εναιώρημα πυκνότητας 0,5 McFarland του ύποπτου για παραγωγή καρβαπενεμάσης στελέχους ενοφθαλμίζεται σε Mueller-Hinton II άγαρ και τοποθετούνται επί αυτού τέσσερις δίσκοι μεροπενέμης (MEM, 10 μg, Mast group) σε απόσταση 30 mm το κέντρο του ενός από το κέντρο του άλλου. Στο ένα δίσκο μεροπενέμης δεν προστίθεται τίποτα, ο ένας

δίσκος διαποτίζεται με 10 μl διαλύματος EDTA 0,1 M (Sigma-Aldrich), ο άλλος δίσκος διαποτίζεται με 20 μl διαλύματος PBA 20 mg/ml (Sigma-Aldrich) σε DMSO (Sigma-Aldrich) ενώ ο τέταρτος δίσκος διαποτίζεται με 10 μl διαλύματος EDTA 0,1M και 20 μl διαλύματος PBA 20 mg/ml σε DMSO.

Μετά από την επώαση για 18 έως 24 ώρες στους 37 ^{o}C αξιολογούνται τα αποτελέσματα της δοκιμασίας. Η μεγαλύτερη ή ίση με 5 mm αύξηση στην άλω αναστολής του δίσκου MEM/EDTA σε σχέση με τον δίσκο MEM είναι ενδεικτική της παραγωγής καρβαπενεμάσης τάξης B, ενώ η μεγαλύτερη ή ίση με 5 mm αύξηση στην άλω αναστολής του δίσκου MEM/PBA σε σχέση με τον δίσκο MEM είναι ενδεικτική της παραγωγής καρβαπενεμάσης τάξης A. Η μεγαλύτερη ή ίση με 5 mm αύξηση στην άλω αναστολής του δίσκου MEM/EDTA/PBA σε σχέση με τον δίσκο MEM είναι ενδεικτική της παραγωγής καρβαπενεμασών τάξης A και B. Τέλος, απουσία αύξησης μεγαλύτερη ή ίση με 5 mm στην άλω αναστολής στους δίσκους MEM/EDTA, MEM/PBA και MEM/EDTA/PBA σε σχέση με τον δίσκο MEM είναι ενδεικτική της παραγωγής καρβαπενεμασών τάξης D.

2.6 Μοριακή Ανίχνευση γονιδίων Καρβαπενεμασών

2.6.1 Ανίχνευση Γονιδίων Καρβαπενεμασών Τάξης Α

Για την ενίσχυση των αλληλομόρφων γονιδίων της καρβαπενεμάσης KPC χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και το ζεύγος εκκινητών με τις αλληλουχίες: *bla*$_{KPC}$F: 5'-TCGCTAAACTCGAACAGG-3' (98-115, εμπρόσθιος) και *bla*$_{KPC}$R: 5'-TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC-3' (859-882, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία EU176011.1), οι οποίοι ενισχύουν ένα τμήμα 780 bp αυτού (Lomaestro *et al*, 2006) σε συνδυασμό με θερμοανθεκτική πολυμεράση ικανή να ενισχύει τμήματα έως 5 kb. Η σύσταση του μίγματος για την εν λόγω αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ήταν η εξής: 40 ng γενωμικού DNA, 50 mM KCl, 10 mM Tris–HCl (pH 8,8), 0,08% (v/v) Nonidet P40, 2 Units Taq DNA πολυμεράση (Fermentas), 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM $MgCl_2$ και 1 mM από κάθε εκκινητή.

Το πρόγραμμα της συγκεκριμένης αντίδρασης ξεκινούσε με ένα αρχικό στάδιο στους 94 ^{o}C για 5 λεπτά και ακολουθούσαν 35 κύκλοι ο καθένας από τους οποίους περιελάμβανε 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία αποδιάταξης (94 ^{o}C), 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητικών μορίων στο DNA στόχο (55 ^{o}C) και 1 λεπτό σε θερμοκρασία

επέκτασης των νεοσυντιθέμενων πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων (72 ^{o}C). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε με ένα τελικό στάδιο στους 72 ^{o}C για 10 λεπτά.

Ακλούθησε ηλεκτροφόρηση σε οριζόντια συσκευή σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (w/v) σε διάλυμα TBE 1X και ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR με το PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen). Η αλληλούχιση και προς τις δυο κατεύθυνσης των τμημάτων ενίσχυσης στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, ενώ για την σύγκριση της προκύπτουσας αλληλουχίας με τις πρότυπες αλληλουχίες των διαφόρων αλληλομόρφων της καρβαπενεμάσης KPC χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MEGA4 (Tamura *et al*, 2007).

2.6.2 Ανίχνευση Γονιδίων Καρβαπενεμασών Τάξης B

Στα απομονωθέντα στελέχη διενεργήθηκε η ανίχνευση των αλληλομόρφων γονιδίων των καρβαπενεμασών GIM, IMP, NDM, SIM, SPM και VIM με τη τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) σε συνδυασμό με θερμοανθεκτική πολυμεράση ικανή να ενισχύει τμήματα έως 5 kb. Για την ανίχνευση των αλληλομόρφων γονιδίων της καρβαπενεμάσης GIM χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών με τις αλληλουχίες: bla_{GIM}F: 5'-AGAACCTTGACCGAACGCAG-3' (837–856, εμπρόσθιος) και bla_{GIM}R: 5'-ACTCATGACTCCTCACGAGG-3' (1584–1565, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία AJ620678.1), οι οποίοι ενισχύουν ένα τμήμα 728 bp αυτού (Castanheira *et al*, 2004). Για την ανίχνευση των αλληλομόρφων γονιδίων της καρβαπενεμάσης IMP σχεδιάστηκε και χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών με τις αλληλουχίες: bla_{IMP}F: 5'-CCGCAGCAGAGTCTTTACC-3' (147-165, εμπρόσθιος) και bla_{IMP}R: 5'-AACAACCAGTTTTGCCTTA-3' (618-636, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία AY055216.1), οι οποίοι ενισχύουν ένα τμήμα 489 bp αυτού, ενώ για την ανίχνευση των αλληλομόρφων γονιδίων της καρβαπενεμάσης NDM σχεδιάστηκε και χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών με τις αλληλουχίες: bla_{NDM}F: 5'-TGGCAGCACACTTCCTATC-3' (279-297, εμπρόσθιος) και bla_{NDM}R: 5'-AGATTGCCGAGCGACTTG-3' (749-766, ανάστροφος), οι οποίοι ενισχύουν ένα τμήμα 487 bp αυτού (αρίθμηση κατά την αλληλουχία KC347597.1). Επιπλέον, για την ανίχνευση των αλληλομόρφων γονιδίων των καρβαπενεμασών SIM και SPM χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών με τις αλληλουχίες: bla_{SIM}F: 5'-GTACAAGGGATTCGGCATCG-3' (126–145, εμπρόσθιος) και bla_{SIM}R: 5'-

TGGCCTGTTCCCATGTGAG-3' (694–676, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία AY887066.1) και *bla*$_{SPM}$F: 5'-CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG-3' (11-31, εμπρόσθιος) και *bla*$_{SPM}$R: 5'-CCTTTTCCGCGACCTTGATC-3' (789-808, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία AJ492820.1), οι οποίοι ενισχύουν τμήματα 550 bp και 797 bp αυτών αντίστοιχα (Mendes *et al*, 2007). Τέλος, για την ανίχνευση των αλληλομόρφων γονιδίων της καρβαπενεμάσης VIM χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών με τις αλληλουχίες: *bla*$_{VIM}$F: 5'-AGTGGTGAGTATCCGACA-3' (1339-1357, εμπρόσθιος) και *bla*$_{VIM}$R: 5'-ATGAAAGTGCGTGGAGAC-3' (1599-1617, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία Y18050.2), οι οποίοι ενισχύουν ένα τμήμα 261 bp αυτού (Tsakris *et al*, 2000).

Η σύσταση του μίγματος για τις εν λόγω αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης ήταν η εξής: 40 ng γενωμικού DNA, 50 mM KCl, 10 mM Tris–HCl (pH 8,8), 0,08% (v/v) Nonidet P40, 2 Units Taq DNA πολυμεράση (Fermentas), 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM $MgCl_2$ και 1 mM από κάθε εκκινητή. Το πρόγραμμα των συγκεκριμένων αντιδράσεων ξεκινούσε με ένα αρχικό στάδιο στους 94 ^{o}C για 5 λεπτά και ακολουθούσαν 35 κύκλοι ο καθένας από τους οποίους περιελάμβανε 1 λεπτό σε θερμοκρασία αποδιάταξης (94 ^{o}C), 1 λεπτό σε θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητικών μορίων στο DNA στόχο (56 ^{o}C) και 1 λεπτό σε θερμοκρασία επέκτασης των νεοσυντιθέμενων πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων (72 ^{o}C). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε με ένα τελικό στάδιο στους 72 ^{o}C για 5 λεπτά.

Ακλούθησε ηλεκτροφόρηση σε οριζόντια συσκευή σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (w/v) σε διάλυμα TBE 1X και ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR με το PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen). Η αλληλούχιση και προς τις δυο κατεύθυνσης των τμημάτων ενίσχυσης στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, ενώ για την σύγκριση της προκύπτουσας αλληλουχίας με τις πρότυπες αλληλουχίες των διαφόρων αλληλομόρφων εκάστης καρβαπενεμάσης χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MEGA4 (Tamura *et al*, 2007).

2.6.3 Ανίχνευση Γονιδίων Καρβαπενεμασών Τάξης D

Στα απομονωθέντα στελέχη διενεργήθηκε η ανίχνευση των γονιδίων των καρβαπενεμασών των ομάδων της OXA-23 (OXA-23, OXA-27 και OXA-49), της OXA-24 (OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40 και OXA-72) και των γονιδίων των καρβαπενεμασών OXA-48, OXA-58 και OXA-143 με τη τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) σε συνδυασμό με

θερμοανθεκτική πολυμεράση ικανή να ενισχύει τμήματα έως 5 kb. Για την ανίχνευση των γονιδίων των καρβαπενεμασών της ομάδας της OXA-23 χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών με τις αλληλουχίες: *bla*$_{OXA-23-like}$F: 5'-AAGCATGATGAGCGCAAAG-3' (785–803, εμπρόσθιος) και *bla*$_{\text{OXA-23-like}}$R: 5'-AAAAGGCCCATTTATCTCAAA-3' (1830–1850, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία AJ132105.1), οι οποίοι ενισχύουν ένα τμήμα 1.066 bp αυτών (Queenan & Bush, 2007). Για την ανίχνευση των γονιδίων των καρβαπενεμασών της ομάδας της OXA-24 χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών με τις αλληλουχίες: *bla*$_{OXA-24-like}$F: 5'-AGTTGAGCGAAAAGGGGATT-3' (81-100, εμπρόσθιος) και *bla*$_{OXA-24-like}$R: 5'-GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA-3' (310-329, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία NC012813.1), οι οποίοι ενισχύουν ένα τμήμα 248 bp αυτών, ενώ για την ανίχνευση του γονιδίου της καρβαπενεμάσης OXA-48 χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών με τις αλληλουχίες: *bla*$_{OXA-48}$F: 5'-TTGGTGGCATCGATTATCGG-3' (31-50, εμπρόσθιος) και *bla*$_{OXA-48}$R: 5'-GAGCACTTCTTTTGTGATGGC-3' (754-774, ανάστροφος), οι οποίοι ενισχύουν ένα τμήμα 744 bp αυτού (αρίθμηση κατά την αλληλουχία AY236073.1) (Queenan & Bush, 2007). Επιπλέον, για την ανίχνευση των γονιδίων των καρβαπενεμασών OXA-58 και OXA-143 χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών με τις αλληλουχίες: *bla*$_{OXA-58}$F: 5'-TTATCAAAATCCAATCGGC-3' (72–90, εμπρόσθιος) και *bla*$_{OXA-58}$R: 5'-TAACCTCAAACTTCTAATTC-3' (986–1005, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία AY570763.1) και *bla*$_{OXA-143}$F: 5'-TGGCACTTTCAGCAGTTCCT-3' (374-393, εμπρόσθιος) και *bla*$_{OXA-143}$R: 5'-TAATCTTGAGGGGGCCAACC-3' (504-523, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία GQ861437.1), οι οποίοι ενισχύουν τμήματα 934 bp και 149 bp αυτών αντίστοιχα (Queenan & Bush, 2007, Higgins *et al*, 2010).

Η σύσταση του μίγματος για τις εν λόγω αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης ήταν η εξής: 40 ng γενωμικού DNA, 50 mM KCl, 10 mM Tris–HCl (pH 8,8), 0,08% (v/v) Nonidet P40, 2 Units Taq DNA πολυμεράση (Fermentas), 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM $MgCl_2$ και 1 mM από κάθε εκκινητή. Το πρόγραμμα των συγκεκριμένων αντιδράσεων ξεκινούσε με ένα αρχικό στάδιο στους 94 ^{o}C για 5 λεπτά και ακολουθούσαν 35 κύκλοι ο καθένας από τους οποίους περιελάμβανε 1 λεπτό σε θερμοκρασία αποδιάταξης (94 ^{o}C), 1 λεπτό σε θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητικών μορίων στο DNA στόχο (56 ^{o}C) και 2 λεπτό σε θερμοκρασία επέκτασης των νεοσυντιθέμενων πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων (72 ^{o}C). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε με ένα τελικό στάδιο στους 72 ^{o}C για 5 λεπτά.

Ακλούθησε ηλεκτροφόρηση σε οριζόντια συσκευή σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (w/v) σε διάλυμα TBE 1X και ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR με το PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen). Η αλληλούχιση και προς τις δυο κατεύθυνσης των τμημάτων ενίσχυσης στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, ενώ για την σύγκριση της προκύπτουσας αλληλουχίας με τις πρότυπες αλληλουχίες των διαφόρων αλληλομόρφων εκάστης καρβαπενεμάσης χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MEGA4 (Tamura *et al*, 2007).

2.7 Μοριακή Τυποποίηση Στελεχών

2.7.1 Τυποποίηση με BOX-PCR

Για την αρχική τυποποίηση των απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών *P. aeruginosa* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος BOX-PCR. Οι BOX αλληλουχίες ανήκουν σε μια από τις τρείς οικογένειες επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών που έχουν περιγραφεί στο πρακαρυωτικό γονιδίωμα (REP, ERIC και BOX αλληλουχίες), οι οποίες περιλαμβάνουν παλίνδρομα τμήματα μεγέθους 35-40 bp. Η εν λόγω μέθοδος, για τη τυποποίηση βακτηριακών στελεχών χρησιμοποιεί μόρια εκκινητές συμπληρωματικά προς υψηλά συντηρημένες επαναλαμβανόμενες DNA αλληλουχίες, που απαντώνται σε πολλαπλά αντίγραφα, σε διακριτές θέσεις επί του γονιδιώματος των περισσότερων αρνητικών και θετικών κατά Gram βακτηρίων.

Μόρια εκκινητές συμπληρωματικά με εξαιρετικά συντηρημένες αλληλουχίες της *boxA* υπομονάδας του στοιχείου BOX, έχουν σχεδιαστεί προκειμένου να ενισχυθούν οι περιοχές του προκαρυωτικού γονιδιώματος μεταξύ των BOX στοιχείων. Τα ενισχυμένα κομμάτια μπορούν να ηλεκτροφορηθούν σε πήκτωμα αγαρόζης και να διαχωριστούν, δίνοντας την εικόνα ενός ραβδωτού κώδικα, μοναδικού για κάθε στέλεχος.

Προκειμένου να ενισχυθούν οι περιοχές του προκαρυωτικού γονιδιώματος μεταξύ των BOX αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε ένα εκκινητικό μόριο, διότι οι BOX αλληλουχίες στο προκαρυωτικό γονιδίωμα απαντώται ως παλίνδρομες επαναλήψεις. Για την τυποποίηση των στελεχών χρησιμοποιήθηκε το εκκινητικό μόριο με την αλληλουχία: *BOXA1R*: 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3' (Versalovic *et al*, 1995).

Η σύσταση του μίγματος για την εν λόγω αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ήταν η εξής: 40 ng γενωμικού DNA, 10 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 0,1% Triton X-100, 1Unit Taq

DNA πολυμεράση (Fermentas), 0,2 mM dNTPs, 3,75 mM $MgCl_2$, 1 mM από κάθε εκκινητή και 4% DMSO. Το πρόγραμμα της συγκεκριμένης αντίδρασης ξεκινούσε με ένα αρχικό στάδιο στους 94 ^oC για 5 λεπτά και ακολουθούσαν 35 κύκλοι ο καθένας από τους οποίους περιελάμβανε 1 λεπτό σε θερμοκρασία αποδιάταξης (94 ^oC), 1 λεπτό σε θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητικών μορίων στο DNA στόχο (51 ^oC) και 3:30 λεπτά σε θερμοκρασία επέκτασης των νεοσυντιθέμενων πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων (72 ^oC). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε με ένα τελικό στάδιο στους 72 ^oC για 16 λεπτά.

Ακλούθησε ηλεκτροφόρηση σε οριζόντια συσκευή σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% (w/v) με διάλυμα TAE 1X (Lonza) και 0,6% διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (Sigma-Aldrich) συγκέντρωσης 10 mg/ml στα 50 V για 5 ώρες. Τέλος, το παραχθέν πρότυπο των ζωνώσεων παρατηρήθηκε και φωτογραφήθηκε υπό υπεριώδες φως.

2.7.2 Τυποποίηση με 3LST

Για την αρχική τυποποίηση των απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών *A. baumannii* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος 3LST (3 Locus Sequence Typing, Turton *et al*, 2007). Η εν λόγω μέθοδος βασίζεται στην ενίσχυση και αλληλούχιση τριών γονιδίων, τα οποία μάλιστα δεν αποτελούν γονίδια ‘‘οικιακής οικονομίας’’ αλλά αντιθέτως βρίσκονται υπό έντονη εξελικτική πίεση, γεγονός που προσδίδει στη μέθοδο αυτή υψηλότερη διακριτική ικανότητα. Στα απομονωθέντα στελέχη διενεργήθηκε η ενίσχυση των γονιδίων ompA (εξωτερική μεμβρανική πρωτεΐνη A), csuE (ινίδιο που συμμετέχει στη δημιουργία βιοϋμενίου) και OXA-51-like (χρωμοσωμική β-λακταμάση) με τη τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) σε συνδυασμό με θερμοανθεκτική πολυμεράση ικανή να ενισχύει τμήματα έως 5 kb.

Για την ενίσχυση του γονιδίου ompA χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών με τις αλληλουχίες: *OmpAF-183*: 5'-CAATTGTTATCTCTGGAG-3' (171-188, εμπρόσθιος) και *OmpAR-1149*: 5'-ACCTTGAGTAGACAAACGA-3' (1104-1122, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία AY485227.1), οι οποίοι ενισχύουν ένα τμήμα 951 bp αυτού (Turton *et al*, 2007). Για την ενίσχυση του γονιδίου csuE χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών με τις αλληλουχίες: *CsuEF*: 5'-ATGCATGTTCTCTGGACTGATGTTGAC-3' (5134-5160, εμπρόσθιος) και *CsuER*: 5'-CGACTTGTACCGTGACCGTATCTTGATAAG-3' (6081-6110, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία AY241696.1), οι οποίοι ενισχύουν ένα τμήμα 976 bp αυτού, ενώ για την ενίσχυση του γονιδίου OXA-51-like χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών με τις αλληλουχίες:

bla$_{OXA\text{-}51\text{-}like\text{-}all}$F: 5'-ATGAACATTAAAGCACTC-3' (1-18, εμπρόσθιος) και *bla*$_{OXA\text{-}51\text{-}like\text{-}all}$R: 5'-CTATAAAATACCTAATTGTTC-3' (805-825, ανάστροφος), οι οποίοι ενισχύουν ένα τμήμα 825 bp αυτού (αρίθμηση κατά την αλληλουχία JX865394.1, Turton *et al*, 2007).

Η σύσταση του μίγματος για τις εν λόγω αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης ήταν η εξής: 40 ng γενωμικού DNA, 50 mM KCl, 10 mM Tris–HCl (pH 8,8), 0,08% (v/v) Nonidet P40, 2 Units Taq DNA πολυμεράση (Fermentas), 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM $MgCl_2$ και 1 mM από κάθε εκκινητή. Το πρόγραμμα των συγκεκριμένων αντιδράσεων ξεκινούσε με ένα αρχικό στάδιο στους 94 ^oC για 5 λεπτά και ακολουθούσαν 35 κύκλοι ο καθένας από τους οποίους περιελάμβανε 1 λεπτό σε θερμοκρασία αποδιάταξης (94 ^oC), 1 λεπτό σε θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητικών μορίων στο DNA στόχο (50 ^oC για το γονίδιο ompA, 52 ^oC για το γονίδιο OXA-51-like και 60 ^oC για το γονίδιο csuE) και 2 λεπτά σε θερμοκρασία επέκτασης των νεοσυντιθέμενων πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων (72 ^oC). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε με ένα τελικό στάδιο στους 72 ^oC για 5 λεπτά.

Ακλούθησε ηλεκτροφόρηση σε οριζόντια συσκευή σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (w/v) σε διάλυμα TBE 1X και ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR με το PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen). Η αλληλούχιση και προς τις δυο κατεύθυνσης των τμημάτων ενίσχυσης στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, ενώ για την σύγκριση της προκύπτουσας αλληλουχίας για έκαστο γονίδιο από τα υπό μελέτη στελέχη και την τυποποίηση των στελεχών αυτών χρησιμοποιήθηκε η διαθέσιμη βάση δεδομένων (http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/AB/home.php).

2.7.3 Τυποποίηση με MLST

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η τυποποίηση πολυτοπικής αλληλούχισης (MLST) αποτελεί μέθοδο χαρακτηρισμού και τυποποίησης των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών σε μοριακό επίπεδο. Συνοπτικά, κάθε σχήμα MLST βασίζεται στην ανάλυση συνήθως επτά γονιδίων που κωδικοποιούν κρίσιμες μεταβολικές πρωτεΐνες για το βακτηριακό κύτταρο. Τα υπό μελέτη στελέχη, ορίζονται από τα αλληλόμορφα που είναι παρόντα σε αυτούς τους επτά γονιδιακούς τόπους και αποτελούν το αλληλικό προφίλ έκαστου στελέχους. Κάθε μοναδικό αλληλικό προφίλ αντιστοιχεί σε ένα συγκεκριμένο τύπο αλληλουχίας (ST), στον οποίο ανήκει κάθε βακτηριακό στέλεχος. Στελέχη με τον ίδιο ST χαρακτηρίζονται από όμοιες γονιδιακές αλληλουχίες για τα υπό εξέταση γονίδια και θεωρείται ότι αποτελούν μελή του ίδιου κλώνου.

Για τη τυποποίηση των απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών *P. aeruginosa* χρησιμοποιήθηκε το διαθέσιμο σχήμα MLST (Curran *et al*, 2004). Στα απομονωθέντα στελέχη διενεργήθηκε η ενίσχυση και αλληλούχιση των γονιδίων acsA (συνθετάση του ακετυλο-συνενζύμου Α), aroE (αφυδρογονάση του σικιμικού οξέος), guaA (συνθάση του GMP), mutL (πρωτεΐνη επιδιόρθωσης του DNA), nuoD (αφυδρογονάση Ι του NADH), ppsA (συνθάση του φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικού οξέος) και trpE (ανθρανυλική συνθάση) με τη τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) σε συνδυασμό με θερμοανθεκτική πολυμεράση ικανή να ενισχύει τμήματα έως 5 kb.

Για την ενίσχυση του γονιδίου acsA χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών με τις αλληλουχίες: *acsA*F: 5'-ACCTGGTGTACGCCTCGCTGAC-3' (970511–970532, εμπρόσθιος) και *acsA*R: 5'-GACATAGATGCCCTGCCCCTTGAT-3' (971329–971352, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία AE004091.2), οι οποίοι ενισχύουν ένα τμήμα 842 bp αυτού (Curran *et al*, 2004). Για την ενίσχυση του γονιδίου aroE χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών με τις αλληλουχίες: *aroE*F: 5'-TGGGGCTATGACTGGAAACC-3' (26558-26577, εμπρόσθιος) και *aroE*R: 5'-TAACCCGGTTTTGTGATTCCTACA-3' (27587-27610, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία AE004091.2), οι οποίοι ενισχύουν ένα τμήμα 1.052 bp αυτού, ενώ για την ενίσχυση του γονιδίου guaA χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών με τις αλληλουχίες: *guaA*F: 5'-CGGCCTCGACGTGTGGATGA-3' (4226814-4226833, εμπρόσθιος) και *guaA*R: 5'-GAACGCCTGGCTGGTCTTGTGGTA-3' (4225894-4225917, ανάστροφος), οι οποίοι ενισχύουν ένα τμήμα 897 bp αυτού (αρίθμηση κατά την αλληλουχία AE004091.2, Curran *et al*, 2004). Επιπλέον, για την ενίσχυση των γονιδίων mutL και nuoD χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών με τις αλληλουχίες: *mutL*F: 5'-CCAGATCGCCGCCGGTGAGGTG-3' (5551613–5551634, εμπρόσθιος) και *mutL*R: 5'-CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC-3' (5550695–5550715, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία AE004091.2) και *nuoD*F: 5'-ACCGCCACCCGTACTG-3' (2984320-2984332, εμπρόσθιος) και *nuoD*R: 5'-TCTCGCCCATCTTGACCA-3' (2985344-2985361, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία AE004091.2), οι οποίοι ενισχύουν τμήματα 898 bp και 1.042 bp αυτών αντίστοιχα (Curran *et al*, 2004). Τέλος, για την ενίσχυση των γονιδίων ppsA και trpE χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών με τις αλληλουχίες: *ppsA*F: 5'-GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG-3' (1914847-1914868, εμπρόσθιος) και *ppsA*R: 5'-GGGTTCTCTTCTTCCGGCTCGTAG-3' (1915812-1915835, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία AE004091.2) και *trpE*F: 5'-

GCGGCCCAGGGTCGTGAG-3' (671604-671621, εμπρόσθιος) και *trpE*R: 5'-CCCGGCGCTTGTTGATGGTT-3' (672395-672414, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία AE004091.2), οι οποίοι ενισχύουν τμήματα 989 bp και 811 bp αυτών αντίστοιχα (Curran *et al*, 2004).

Η σύσταση του μίγματος για τις εν λόγω αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης ήταν η εξής: 40 ng γενωμικού DNA, 50 mM KCl, 10 mM Tris–HCl (pH 8,8), 0,08% (v/v) Nonidet P40, 2 Units Taq DNA πολυμεράση (Fermentas), 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM $MgCl_2$ και 1 mM από κάθε εκκινητή. Το πρόγραμμα των συγκεκριμένων αντιδράσεων ξεκινούσε με ένα αρχικό στάδιο στους 94 ^oC για 5 λεπτά και ακολουθούσαν 35 κύκλοι ο καθένας από τους οποίους περιελάμβανε 1 λεπτό σε θερμοκρασία αποδιάταξης (94 ^oC), 1 λεπτό σε θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητικών μορίων στο DNA στόχο (60 ^oC) και 2:30 λεπτά σε θερμοκρασία επέκτασης των νεοσυντιθέμενων πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων (72 ^oC). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε με ένα τελικό στάδιο στους 72 ^oC για 5 λεπτά.

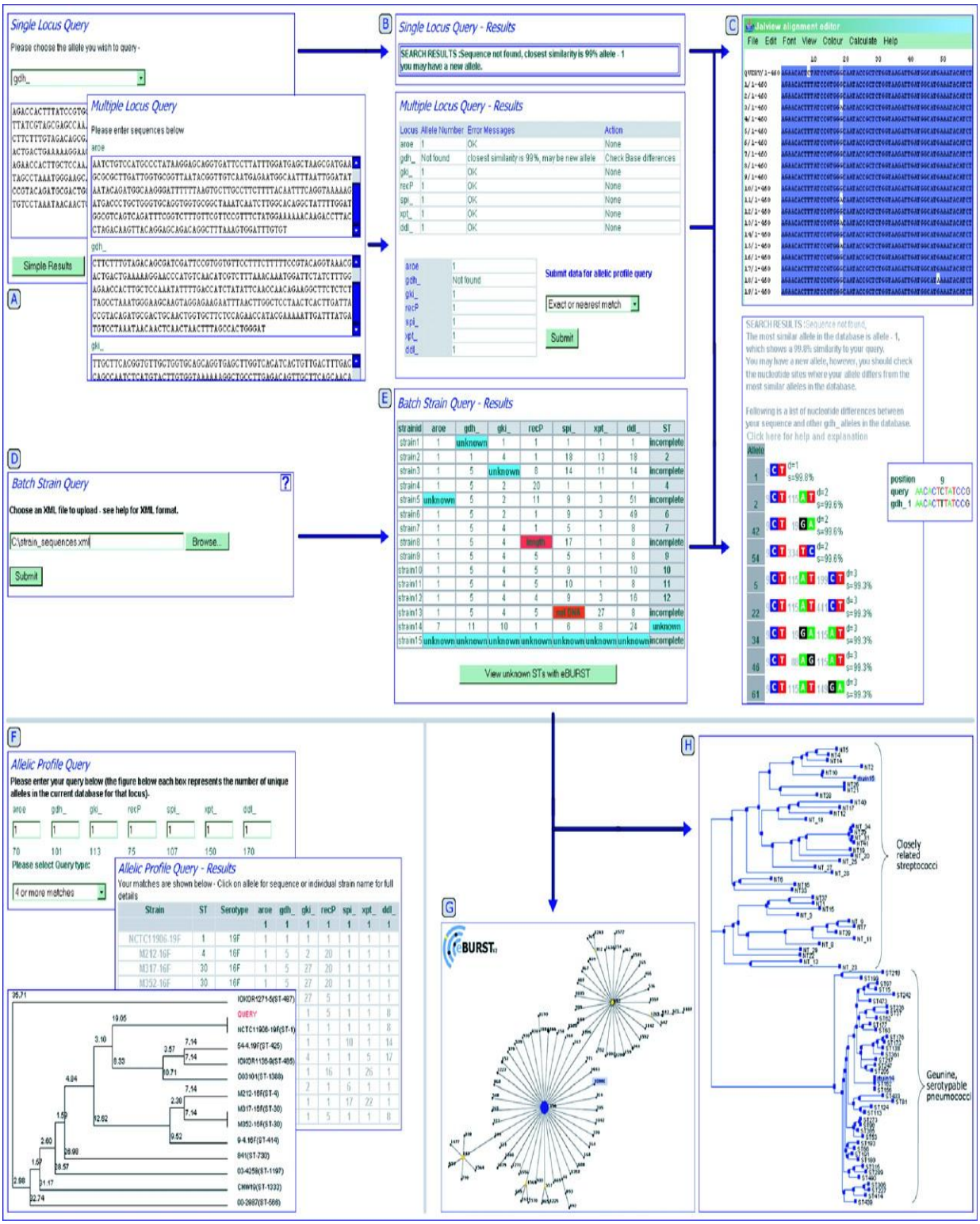
Ακλούθησε ηλεκτροφόρηση σε οριζόντια συσκευή σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (w/v) σε διάλυμα TBE 1X (Lonza) και ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR με το PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen). Η αλληλούχιση και προς τις δυο κατεύθυνσης των τμημάτων ενίσχυσης στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, ενώ για την σύγκριση της προκύπτουσας αλληλουχίας για έκαστο γονίδιο από τα υπό μελέτη στελέχη και την τυποποίηση των στελεχών αυτών χρησιμοποιήθηκε η διαθέσιμη βάση δεδομένων (http://www.pubmlst.org/paeruginosa/).

Για τη τυποποίηση των απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών *A. baumannii* χρησιμοποιήθηκε το διαθέσιμο σχήμα MLST (Diancourt *et al*, 2010). Στα απομονωθέντα στελέχη διενεργήθηκε η ενίσχυση και αλληλούχιση των γονιδίων cpn60 (σαπερονίνη 60 KDa), fusA (παράγοντας επιμήκυνσης EF-G), gltA (συνθάση του κιτρικού οξέος), pyrG (συνθάση του CTP), recA (παράγοντας ομόλογου ανασυνδυασμού), rplB (L2 ριβοσωμική πρωτεΐνη της 50S υπομονάδας) και rpoB (B υπομονάδα της RNA πολυμεράσης) με τη τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) σε συνδυασμό με θερμοανθεκτική πολυμεράση ικανή να ενισχύει τμήματα έως 5 kb.

Για την ενίσχυση του γονιδίου cpn60 χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών με τις αλληλουχίες: *cpn60*F: 5'-ACTGTACTTGCTCAAGC-3' (3089248–3089264, εμπρόσθιος) και *cpn60*R: 5'-TTCAGCGATGATAAGAAGTGG-3' (3089631–3089652, ανάστροφος) (αρίθμηση

κατά την αλληλουχία NC_009085.1), οι οποίοι ενισχύουν ένα τμήμα 405 bp αυτού (Diancourt *et al*, 2010). Για την ενίσχυση του γονιδίου fusA χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών με τις αλληλουχίες: *fusA*F: 5'-ATCGGTATTTCTGCKCACATYGAT-3' (1008107-1008130, εμπρόσθιος) και *fusA*R: 5'-CCAACATACKYTGWACACCTTTGTT-3' (1008715-1008739, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία NC_009085.1), οι οποίοι ενισχύουν ένα τμήμα 633 bp αυτού, ενώ για την ενίσχυση του γονιδίου gltA χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών με τις αλληλουχίες: *gltA*F: 5'-AATTTACAGTGGCACATTAGGTCCC-3' (3143248-3143272, εμπρόσθιος) και *gltA*R: 5'-GCAGAGATACCAGCAGAGATACACG-3' (3143706-3143730, ανάστροφος), οι οποίοι ενισχύουν ένα τμήμα 483 bp αυτού (αρίθμηση κατά την αλληλουχία NC_009085.1, Diancourt *et al*, 2010). Επιπλέον, για την ενίσχυση των γονιδίων pyrG και recA χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών με τις αλληλουχίες: *pyrG*F: 5'-GGTGTTGTTTCATCACTAGGWAAAGG-3' (2201326–2201351, εμπρόσθιος) και *pyrG*R: 5'-ATAAATGGTAAAGAYTCGATRTCACCMA-3' (2201595–2201622, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία NC_009085.1) και *recA*F: 5'-CCTGAATCTTCYGGTAAAAC-3' (2274422-2274441, εμπρόσθιος) και *recA*R: 5'-GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC-3' (2274771-2274793, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία NC_009085.1), οι οποίοι ενισχύουν τμήματα 297 bp και 372 bp αυτών αντίστοιχα (Diancourt *et al*, 2010). Τέλος, για την ενίσχυση των γονιδίων rplB και rpoB χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών με τις αλληλουχίες: *rplB*F: 5'-GTAGAGCGTATTGAATACGATCCTAACC-3' (3557022-3557049, εμπρόσθιος) και *rplB*R: 5'-CACCACCACCRTGYGGGTGATC-3' (3557330-3557351, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία NC_009085.1) και *rpoB*F: 5'-GGCGAAATGGCDGARAACCAC-3' (307298-307318, εμπρόσθιος) και *rpoB*R: 5'-GARTCYTCGAAGTTGTAACC-3' (307734-307753, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία NC_009085.1), οι οποίοι ενισχύουν τμήματα 330 bp και 456 bp αυτών αντίστοιχα (Diancourt *et al*, 2010).

Η σύσταση του μίγματος για τις εν λόγω αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης ήταν η εξής: 40 ng γενωμικού DNA, 50 mM KCl, 10 mM Tris–HCl (pH 8,8), 0,08% (v/v) Nonidet P40, 2 Units Taq DNA πολυμεράση (Fermentas), 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM $MgCl_2$ και 1 mM από κάθε εκκινητή. Το πρόγραμμα των συγκεκριμένων αντιδράσεων ξεκινούσε με ένα αρχικό στάδιο στους 94 ^{o}C για 5 λεπτά και ακολουθούσαν 35 κύκλοι ο καθένας από τους οποίους περιελάμβανε 1 λεπτό σε θερμοκρασία αποδιάταξης (94 ^{o}C), 1 λεπτό σε θερμοκρασία



Εικόνα 2.7. Σχηματική απεικόνιση διαγράμματος ροής για την τυποποίηση βακτηριών με τη μέθοδο MLST.

υβριδισμού των εκκινητικών μορίων στο DNA στόχο (50 ^{o}C για τα γονίδια fusA, gltA, pyrG, recA, rplB, rpoB και 56°C για το γονίδιο cpn60) και 1 λεπτό σε θερμοκρασία επέκτασης των νεοσυντιθέμενων πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων (72 ^{o}C). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε με ένα τελικό στάδιο στους 72 ^{o}C για 5 λεπτά.

Ακλούθησε ηλεκτροφόρηση σε οριζόντια συσκευή σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (w/v) σε διάλυμα TBE 1X (Lonza) και ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR με το PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen). Η αλληλούχιση και προς τις δυο κατεύθυνσης των τμημάτων ενίσχυσης στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, ενώ για την σύγκριση της προκύπτουσας αλληλουχίας για έκαστο γονίδιο από τα υπό μελέτη στελέχη και την τυποποίηση των στελεχών αυτών χρησιμοποιήθηκε η διαθέσιμη βάση δεδομένων (http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Abaumannii.html).

2.8 Κλωνική και Φυλογενετική Συγγένεια Στελεχών

2.8.1 Δημιουργία Διαγραμμάτων Κλωνικών Συμπλεγμάτων eBURST

Σε πολλούς βακτηριακούς πληθυσμούς οι σχέσεις μεταξύ μακρινά συνδεδεμένων γονοτύπων είναι δύσκολο να διακριθούν καθώς η έκταση του ανασυνδυασμού των γονιδίων τους είναι αρκετά υψηλή (Feil & Spratt, 2001). Η εισαγωγή της MLST για τον ακριβή χαρακτηρισμό των στελεχών των βακτηριακών παθογόνων είχε ένα σημαντικό αντίκτυπο τόσο στην καθημερινή επιδημιολογική επιτήρηση όσο και στην βιολογία του μικροβιακού πληθυσμού. Στους δυο αυτούς τομείς, το κλειδί για την εκμετάλλευση αυτής της γνώσης, είναι η ικανότητα να διακρίνουμε την συγγένεια των στελεχών και να δημιουργούμε πρότυπα εξελικτικής καταγωγής ανάμεσα σε στελέχη με παρόμοιο γονότυπο. Οι παραδοσιακές μέθοδοι ομαδοποίησης, όπως τα διαγράμματα διασποράς, τα δένδρα ή τα δενδρογράμματα, παρέχουν μια πολύ φτωχή αναπαράσταση πρόσφατων εξελικτικών γεγονότων, αφού προσπαθούν να ανασκευάσουν συγγενικές, με απουσία όμως ενός ρεαλιστικού μοντέλου στον τρόπο με τον οποίο οι μικροβιακοί κλώνοι εμφανίζονται, διαιρούνται και σχηματίζουν κλινικά συμπλέγματα. Το κενό αυτό ήρθε να καλύψει η επινόηση του αλγορίθμου eBURST, ο οποίος ταξινομεί τα στελέχη σε ομάδες συγγενικών στελεχών και κλωνικών συμπλεγμάτων (Clonal Complex), προβλέποντας τον προγονικό γονότυπο κάθε κλωνικού συμπλέγματος (Feil *et al,* 2004).

Ο αλγόριθμος eBURST (http://eburst.mlst.net/) χρησιμοποιεί ένα απλό αλλά κατάλληλο μοντέλο για την εμφάνιση των κλωνικών συμπλεγμάτων κατά το οποίο ένας προγονικός ή ιδρυτικός γονότυπος αυξάνεται σε συχνότητα στον βακτηριακό πληθυσμό, σαν αποτέλεσμα είτε ενός κατάλληλου πλεονεκτήματος που απέκτησε είτε από μια τυχαία γενετική τάση και σταδιακά γίνεται ο κυρίαρχος κλώνος. Ο εν λόγω κλώνος, εξαιτίας της αυξημένης παρουσίας του, αρχίζει να διαφοροποιείται παράγοντας μια ομάδα στενά συνδεδεμένων γονοτύπων, που απαρτίζουν ένα κλωνικό σύμπλεγμα και όλοι κατάγονται από τον ίδιο ιδρυτικό γονότυπο. Στα πλαίσια της MLST, οι απόγονοι του ιδρυτικού γονότυπου αρχικά παραμένουν αμετάβλητοι ωστόσο με την πάροδο του χρόνου προκύπτουν εξ' αυτών νέοι απόγονοι στους οποίους ένα από τα επτά αλληλόμορφα έχει διαφοροποιηθεί (με σημειακή μετάλλαξη ή με ομόλογο ανασυνδυασμό). Οι εν λόγω απόγονοι που έχουν αλληλικά προφίλ με διαφορά σε ένα αλληλόμορφο από τον ιδρυτικό γονότυπο ονομάζονται παραλλαγές μονού γενετικού τόπου (SLVs) και τελικά διαφοροποιούνται ακόμα περισσότερο δίνοντας απογόνους με διαφορές σε δυο (DLVs), τρεις (TLVs) και ούτω καθεξής (Feil *et al,* 2004).

Συγκεκριμένα ο αλγόριθμος eBURST προσδιορίζει τις ομάδες εξειδικευμένης μετάλλαξης συναφών γονοτύπων στο πληθυσμό και επιχειρεί να προσδιορίσει τον ιδρυτικό γονότυπο κάθε ομάδας. Έπειτα, ο εν λόγω αλγόριθμος προβλέπει την καταγωγή από τον προβλεπόμενο ιδρυτικό γονότυπο των υπολοίπων γονοτύπων της ομάδας, εμφανίζοντας το αποτέλεσμα σαν ένα ακτινικό διάγραμμα, επικεντρωμένο πάνω στον προβλεπόμενο ιδρυτικό γονότυπο (Feil *et al,* 2004).

Η προσέγγιση που χρησιμοποιεί ο eBURST απλοποιεί σε μεγάλο βαθμό το πρόβλημα της απεικόνισης των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των στενά συνδεδεμένων γονότυπων, οι οποίες αντιπροσωπεύονται φτωχά σε ένα φυλογενετικό δέντρο, καθώς ο αλγόριθμος eBURST επικεντρώνεται για κάθε γονότυπο στη σχέση και την απόσταση του από τον προβλεπόμενο ιδρυτικό γονότυπο, παραλείποντας την κατά ζεύγη ομοπαράθεση μεταξύ των γονοτύπων των στελεχών του πληθυσμού. Ωστόσο, ο eBURST δεν εξάγει συμπεράσματα σχετικά με τις φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των πιο απομακρυσμένων φυλογενετικά γονότυπων που ανήκουν σε διαφορετικά κλωνικά συμπλέγματα (Feil *et al,* 2004).

Ο αλγόριθμος eBURST δίνει τη δυνατότητα ανάλυσης και σύγκρισης ακόμα και στελεχών που τα αλληλόμορφα τους και οι STs τους δεν βρίσκονται ακόμη καταγεγραμμένα στις βάσεις δεδομένων της MLST, δίνοντας τους προσωρινούς αριθμούς. Παρά το γεγονός ότι αναπτύχτηκε κυρίως για την ανάλυση και σύγκριση των δεδομένων της MLST, παρέχει και τη δυνατότητα,

χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα κριτήρια, να εφαρμοστεί σε δεδομένα κι άλλων μοριακών μεθόδων τυποποίησης (Feil *et al,* 2004).

Συμπερασματικά, ο αλγόριθμος eBURST δεν φέρει την απόλυτη αλήθεια στις σχέσεις μεταξύ των βακτηριακών πληθυσμών, απλώς παράγει μια υπόθεση γύρω από τον τρόπο που το κάθε κλωνικό σύμπλεγμα εμφανίστηκε και διαφοροποιήθηκε (Feil *et al,* 2004).

Συγκεκριμένα για την παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος eBURST με τις προεπιλεγμένες ρυθμίσεις για τον καθορισμό των κλωνικών συμπλεγμάτων ώστε να μελετηθεί η κλωνική συγγένεια των απομονωθέντων στελεχών.

2.8.2 Δημιουργία Φυλογενετικών Δένδρων κατά Neighbor Joining

Ο αλγόριθμος Neighbor Joining (Saitou & Nei, 1987) αποτελεί έναν εξαιρετικά δημοφιλή αλγόριθμο για την ανασυγκρότηση φυλογενετικών δένδρων. Όπως και ο αλγόριθμος UPGMA, ξεκινά με την ομαδοποίηση του κάθε στελέχους από μόνο του. Οι δύο ομάδες με τη μικρότερη απόσταση, στη συνέχεια ομαδοποιούνται σε ένα ενιαίο σύμπλεγμα. Η απόσταση από αυτή τη νέα ομάδα σε σχέση με τις άλλες είναι ο μέσος όρος της απόστασης των μελών τους. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρις ότου όλα τα μέλη ομαδοποιηθούν, ενώ η σειρά της ομαδοποίησης ορίζει την τοπολογία του δέντρου.

Η κύρια διαφορά, ωστόσο, μεταξύ των δυο προαναφερθέντων αλγορίθμων για να βρεθεί το ποια συμπλέγματα αλληλουχιών θα ομαδοποιηθούν, είναι η τροποποίηση του πίνακα αποστάσεων έτσι ώστε να συνυπολογιστεί η δυνατότητα μεταξύ των διάφορων κλάδων του δέντρου να έχουν διαφορετικούς ρυθμούς εξέλιξης. Επιπλέον, όταν ένα νέο σύμπλεγμα σχηματίζεται, δεν αποδίδεται σε αυτό ηλικία αλλά μια απόσταση από τις δύο ομάδες από τις οποίες προήλθε καθώς και από τις ομάδες που πρόκειται να δημιουργηθούν. Έτσι, ο αλγόριθμος Neighbor Joining θεωρείται ανώτερος του UPGMA, καθώς δεν λαμβάνει υπόψη το μοριακό ρολόι. Ο εν λόγω, είναι αρκετά γρήγορος στην εφαρμογή του και ευρέως διαθέσιμος σε πολλά λογισμικά ανακατασκευής φυλογενετικών δένδρων.

Ο αλγόριθμος Neighbor Joining βασίζεται στην υπόθεση της προσθετικότητας, σύμφωνα με την οποία εάν δύο διαδοχικοί κλάδοι έχουν μήκη A και B, τότε η απόσταση από την αρχή του πρώτου έως το τέλος του δεύτερου είναι A+B, υπόθεση που επιβεβαιώνεται από το μοντέλο του Kimura (Kimura, 1969). Αν η προσθετικότητα ισχύει και υπάρχουν επαρκή στοιχεία για να

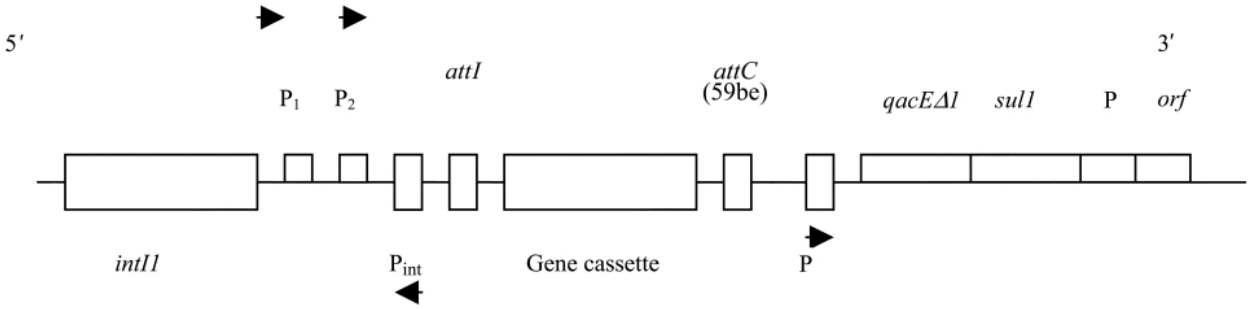
χρησιμοποιηθούν, τότε ο αλγόριθμος Neighbor Joining είναι ο βέλτιστος για την ανακατασκευή του ορθού φυλογενετικού δένδρου.

Συγκεκριμένα στην παρούσα μελέτη, οι αλληλουχίες των επτά γονιδίων που πρόεκυψαν από την MLST για τα στελέχη *P. aeruginosa* και οι αλληλουχίες των επτά γονιδίων που πρόεκυψαν από την MLST σε συνδυασμό με τις αλληλουχίες των τριών γονιδίων που πρόεκυψαν από την 3LST για τα στελέχη *A. baumannii*, συνενώθηκαν διατηρώντας το +1 πλαίσιο ανάγνωσης και ομοπαρατέθηκαν. Τέλος, κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δένδρα με το λογισμικό MEGA4 χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Neighbor Joining (Tamura *et al*, 2007).

2.9 Συνταινικότητα Γονιδίων των Καρβαπενεμασών

2.9.1 Χαρτογράφηση Δομών Ιντεγκρονίου

Η πιθανή συσχέτιση των γονίδιων των καρβαπενεμασών με ιντεγκρονιακές δομές διερευνήθηκε με τον συνδυασμό εκκινητών ειδικών για έκαστο γονίδιο καρβαπενεμασών και εκκινητών ειδικών για τις συντηρημένες περιοχές 5΄-CS και 3΄-CS της δομής των ιντεγκρονίων. Αναλυτικότερα, η χαρτογράφηση των εν λόγω δομών έγινε με δύο αντιδράσεις PCR για κάθε στέλεχος όπου χρησιμοποιήθηκαν ο 5΄-CS εκκινητής με τον αντίστοιχο ανάστροφο εκκινητή του γονιδίου που κωδικοποιεί για την υπό μελέτη καρβαπενεμάση στη μία αντίδραση και ο 3΄-CS εκκινητής με τον αντίστοιχο εμπρόσθιο εκκινητή του γονιδίου που κωδικοποιεί για την υπό μελέτη καρβαπενεμάση στην άλλη (Εικόνα 2.8).



Εικόνα 2.8. Δομή Ιντεγκρονίου Τάξης Ι (*attI*: Θέση ενσωμάτωσης, *attC*: αλληλουχία αναγνώρισης από την ιντεγκράση, P: υποκινητής, P1: υποκινητής για τη γονιδιακή κασέτα, P2: δεύτερος υποκινητής, Pint: υποκινητής για το γονίδιο της ιντεγκράσης, *orf*: ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης, *qacEΔ1*: μερικώς διαγραμμένο γονίδιο υπεύθυνο για την ανθεκτικότητα στις ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου, *Sul1*: γονίδιο ανθεκτικότητας στις σουλφοναμίδες).

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές με τις αλληλουχίες: 5΄-CS: 5'-GGCATCCAAGCAGCAAG-3' (271-287, εμπρόσθιος) και 3΄-CS: 5'-AAGCAGACTTGACCTGA-3' (976-992, ανάστροφος) (αρίθμηση κατά την αλληλουχία EU118149.2) σε συνδυασμό με θερμοανθεκτική πολυμεράση ικανή να ενισχύει τμήματα έως 20 kb. Η σύσταση του μίγματος για τις εν λόγω αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης ήταν η εξής: 40 ng γενωμικού DNA, 60 mM Tris–SO_4 (pH 8,9), 18 mM $(NH4)_2SO_4$, 2 Units Taq DNA πολυμεράση (Invitrogen), 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgSO4 και 1 mM από κάθε εκκινητή.

Το πρόγραμμα των συγκεκριμένων αντιδράσεων ξεκινούσε με ένα αρχικό στάδιο στους 94 ^oC για 5 λεπτά και ακολουθούσαν 35 κύκλοι ο καθένας από τους οποίους περιελάμβανε 1 λεπτό σε θερμοκρασία αποδιάταξης (94 ^oC), 1 λεπτό σε θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητικών μορίων στο DNA στόχο (56 ^oC) και 6 λεπτά σε θερμοκρασία επέκτασης των νεοσυντιθέμενων πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων (72 ^oC). Οι αντιδράσεις ολοκληρώθηκαν με ένα τελικό στάδιο στους 72 ^oC για 10 λεπτά.

Ακλούθησε ηλεκτροφόρηση σε οριζόντια συσκευή σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (w/v) σε διάλυμα TBE 1X (Lonza) και ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR με το PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen). Η αλληλούχιση και προς τις δυο κατεύθυνσης των τμημάτων ενίσχυσης στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, χρησιμοποιώντας και εσωτερικούς εκκινητές όπου απαιτούνταν και για την συναρμολόγηση της πλήρους αλληλουχίας του ιντεγκρονίου χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MEGA4 (Tamura *et al*, 2007).

2.9.2 Χαρτογράφηση Δομών Τρανσποζονίου

Η πιθανή συσχέτιση των γονίδιων των καρβαπενεμασών με δομές τρανσποζονίων διερευνήθηκε με τον συνδυασμό εκκινητών ειδικών για έκαστο γονίδιο καρβαπενεμασών και εκκινητών ειδικών για τις αλληλουχίες ένθεσης των συνήθως απαντούμενων τρανσποζονίων. Αναλυτικότερα, η χαρτογράφηση της σχετικής τους θέσης ως προς τα γονίδια των υπό μελέτη καρβαπενεμασών έγινε με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται παραπάνω, χρησιμοποιώντας τον εμπρόσθιο εκκινητή για τις αλληλουχίες ένθεσης (ISAba1F, ISAba2F, ISAba3F, ISAba4F και IS18F) με τον ανάστροφο εκκινητή για το γονίδιο που κωδικοποιεί για την υπό μελέτη καρβαπενεμάση και τον εμπρόσθιο εκκινητή για το γονίδιο που κωδικοποιεί για τη

καρβαπενεμάση με τον ανάστροφο εκκινητή για τις αλληλουχίες ένθεσης (ISAba1R, ISAba2R, ISAba3R, ISAba4R και IS18R).

Συγκεκριμένα για τις αλληλουχίες ένθεσης, σε συνδυασμό με θερμοανθεκτική πολυμεράση ικανή να ενισχύει τμήματα έως 20 kb χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές με τις αλληλουχίες: ISAba1F: 5'-CACGAATGCAGAAGTTG-3' (777-793, εμπρόσθιος) και ISAba1R: 5'-CGACGAATACTATGACAC-3' (1308-1325, ανάστροφος) για την αλληλουχία ένθεσης ISAba1 (GQ861439.1) και ISAba2F: 5'-AATCCGAGATAGAGCGGTTC-3' (2263-2282, εμπρόσθιος) και ISAba2R: 5'-TGACACATAACCTAGTGCAC-3' (4377-4397, ανάστροφος) για την αλληλουχία ένθεσης ISAba2 (AY665723.1). Για την αλληλουχία ένθεσης ISAba3 (AY665723.1) χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές με τις αλληλουχίες: ISAba3F: 5'-AGCAATATCTCGTATACCGC-3' (4774-4793, εμπρόσθιος) και ISAba3R: 5'-CGTTTACCCCAAACATAAGC-3' (4977-4996, ανάστροφος) ενώ για την αλληλουχία ένθεσης ISAba4 (EF059914.1) χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές με τις αλληλουχίες: ISAba4F: 5'-ATTTGAACCCATCTATTGGC-3' (2310-2329, εμπρόσθιος) και ISAba4R: 5'-ACTCTCATATTTTTTCTTGG-3' (1718-1737, ανάστροφος). Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές με τις αλληλουχίες: IS18F: 5'-CACGAATGCAGAAGTTG-3' (15.388-15.307, εμπρόσθιος) και IS18R: 5'-ACCAGCCATAACTTCACTCG-3' (14.383-14.402, ανάστροφος) για την αλληλουχία ένθεσης IS18 (NC_010481.1). Η σύσταση του μίγματος για τις εν λόγω αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης ήταν η εξής: 40 ng γενωμικού DNA, 60 mM Tris–SO_4 (pH 8,9), 18 mM $(NH4)_2SO_4$, 2 Units Taq DNA πολυμεράση (Invitrogen), 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgSO4 και 1 mM από κάθε εκκινητή.

Το πρόγραμμα των συγκεκριμένων αντιδράσεων ξεκινούσε με ένα αρχικό στάδιο στους 94 ^{o}C για 5 λεπτά και ακολουθούσαν 35 κύκλοι ο καθένας από τους οποίους περιελάμβανε 1 λεπτό σε θερμοκρασία αποδιάταξης (94 ^{o}C), 1 λεπτό σε θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητικών μορίων στο DNA στόχο (56 ^{o}C) και 3:30 λεπτά σε θερμοκρασία επέκτασης των νεοσυντιθέμενων πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων (68 ^{o}C). Οι αντιδράσεις ολοκληρώθηκαν με ένα τελικό στάδιο στους 68 ^{o}C για 10 λεπτά.

Ακλούθησε ηλεκτροφόρηση σε οριζόντια συσκευή σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (w/v) σε διάλυμα TBE 1X (Lonza) και ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR με το PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen). Η αλληλούχιση και προς τις δυο κατεύθυνσης των τμημάτων ενίσχυσης στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο

Λάρισας, χρησιμοποιώντας και εσωτερικούς εκκινητές όπου απαιτούνταν και για την συναρμολόγηση της πλήρους αλληλουχίας του τρανσποζονίου χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MEGA4 (Tamura *et al*, 2007).

2.10 Πλασμιδιακή Εντόπιση γονιδίων Καρβαπενεμασών

Για τον προσδιορισμό της εντόπισης των γονιδίων των καρβαπενεμασών επί πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκε η απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση σε συνδυασμό με την υβριδοποίηση κατά Southern με ειδικούς για έκαστο γονίδιο καρβαπενεμασών σημασμένων ανιχνευτών.

2.10.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση

Η πλήρης και αποτελεσματική απομόνωση ενός λειτουργικού μακρομορίου από βακτηριακά κύτταρα περιλαμβάνει: i) την ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων, ii) τη λύση των κυττάρων και iii) την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, και απαιτεί: i) την αποτελεσματική αποδιάταξη του κυτταρικού τοιχώματος, ii) την τήρηση συνθηκών οι οποίες είτε αναστέλλουν είτε καταστρέφουν τα διάφορα αποικοδομητικά ένζυμα που απελευθερώνονται κατά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων και iii) το διαχωρισμό του πλασμιδιακού DNA από το χρωμοσωμικό DNA και τις πρωτεΐνες.

Η διαδικασία του πρωτόκολλου, που ακολουθήθηκε, συνίσταται στη συλλογή των βακτηριακών κυττάρων και την αποδιάταξη, παρουσία NaOH και SDS, του κυτταρικού τους τοιχώματος, του χρωμοσωμικού DNA και των πρωτεϊνών και το σχηματισμό αδιάλυτου ιζήματος όταν πραγματοποιηθεί εξουδετέρωση με οξικό κάλιο. Η αναδιάλυση των βακτηριακών κυττάρων πραγματοποιείται παρουσία Tris/HCl για τη διατήρηση του pH, EDTA για την αποσταθεροποίηση της κυτταρικής μεμβράνης και την παρεμπόδιση της δράσης νουκλεασών και γλυκόζης για τη διατήρηση της οσμωτικότητας. Το SDS (θειικό δωδεκύλιο) διαλυτοποιεί τα φωσφολιπίδια και τα πρωτεϊνικά συστατικά της μεμβράνης, ενώ το NaOH καταστρέφει τους δεσμούς H^+ και Van der Waals της δίκλωνης δομής του DNA και των πρωτεϊνών. Η υψηλή συγκέντρωση των αλάτων καθιστά το KDS (οξικό κάλιο και SDS) αδιάλυτο και οι μετουσιωμένες πρωτεΐνες, το χρωμοσωμικό DNA και τα υπολείμματα του κυττάρου

κατακρημνίζονται σε σύμπλοκα αλάτων-απορρυπαντικών. Η πλειονότητα του πλασμιδιακού DNA και του βακτηριακού RNA παραμένει διαλυτή και μπορεί να συλλεχθεί ύστερα από φυγοκέντρηση του υπερκειμένου, εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη (Sigma-Aldrich) και κατακρήμνιση με αιθανόλη. Το πλασμιδιακό DNA απαλλάσσεται από το βακτηριακό RNA με αναδιάλυση του ιζήματος σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο περιέχει RNάση A (RNase A).

Συγκεκριμένα, τα βακτηριακά κύτταρα που περιέχουν το πλασμίδιο αναπτύσσονται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB (Mast group) εμπλουτισμένο με μεροπενέμη (Anfarm) σε συγκέντρωση 4 μg/ml. Ποσότητα της βακτηριακής καλλιέργειας (1,5 ml) μεταφέρεται σε σωληνάκι τύπου eppendorf και φυγοκεντρείται σε 3,000 g για 3 λεπτά. Το υπερκείμενο διάλυμα απομακρύνεται και το σωληνάκι τύπου eppendorf αναστρέφεται για 1 λεπτό προκειμένου να απομακρυνθούν και τα τελευταία υπολείμματα θρεπτικού μέσου. Το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων επαναδιαλύεται σε 100 μl παγωμένο Διάλυμα I (50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris/HCl pH=8 και 10 mM EDTA pH=8) με ισχυρή ανάδευση και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Προστίθενται 200 μl πρόσφατα παρασκευασμένου Διαλύματος II (0,2 N NaOH και 1% SDS), ακολουθώντας ήπια ανάδευση και επώαση σε πάγιο για λιγότερο από 5 λεπτά. Έπειτα, προστίθενται 150 μl παγωμένου Διαλύματος III (5 M CH3COOK/CH3COOH) και μετά από ήπια ανάδευση το διάλυμα επωάζεται σε πάγο για 6 έως 8 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 12.000 rpm για 10 λεπτά και συλλογή του υπερκείμενου σε νέο σωληνάκι τύπου eppendorf. Το διάλυμα εκχυλίζεται με φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1, Sigma-Aldrich) και το πλασμιδιακό DNA κατακρημνίζεται με αιθανόλη (Scharlau). Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 100 μl ρυθμιστικό διάλυμα TE (10 mM Tris/HCl pH=8 και 1 mM EDTA pH=8), το οποίο περιέχει RNάση A (RNase A, Fermentas) σε συγκέντρωση 20 μg/ml. Τέλος, το DNA αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4 ^{o}C ή -20 ^{o}C.

2.10.2 Εκχύλιση DNA με φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη

Η διαδικασία πραγματοποιείται για την απομάκρυνση πρωτεϊνών από διαλύματα νουκλεϊκών οξέων, λόγω της ιδιότητας της φαινόλης να αποδιατάσσει και να διαχωρίζει τις πρωτεΐνες μαζί με τα λιπίδια από τα νουκλεϊνικά οξέα. Τα νουκλεϊνικά οξέα συγκεντρώνονται στην υδατική φάση, η οποία, μετά από φυγοκέντρηση, σχηματίζει την άνω φάση λόγω της μικρότερης πυκνότητάς της. Η παρουσία του χλωροφορμίου διευκολύνει το διαχωρισμό των φάσεων λόγω

της μεγάλης πυκνότητας που προσδίδει στην οργανική φάση και απομακρύνει τα τυχόν εναπομείναντα υπολείμματα φαινόλης από το διάλυμα.

Συγκεκριμένα, σε διάλυμα DNA όγκου V προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1, Sigma-Aldrich) και ακολουθεί ανάδευση έως ότου σχηματιστεί ένα ομοιογενές γαλάκτωμα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 14.000 rpm για 5 λεπτά ώστε να διαχωριστούν οι δύο φάσεις, οργανική και υδατική. Η υδατική φάση, στην οποία περιέχονται τα νουκλεϊνικά οξέα, μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι τύπου eppendorf, προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος χλωροφορμίου (1 V, Sigma-Aldrich) και αφού προηγηθεί ανάδευση, φυγοκεντρείται σε 14.000 rpm για 5 λεπτά. Ακολουθεί μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο σωληνάκι τύπου eppendorf και επανάληψη της εκχύλισης με χλωροφόρμιο (Sigma-Aldrich). Τέλος, η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι τύπου eppendorf και το DNA επανακτάται με κατακρήμνιση με αιθανόλη (Scharlau).

2.10.3 Κατακρήμνιση DNA με αιθανόλη

Η κατακρήμνιση με αιθανόλη χρησιμοποιείται συνήθως για συμπύκνωση, αφαλάτωση και επανάκτηση νουκλεϊκών οξέων και πραγματοποιείται παρουσία συγκεκριμένων συγκεντρώσεων μονοσθενών κατιόντων. Η αιθανόλη αφαιρεί το ενυδατωμένο περίβλημα από τα νουκλεϊνικά οξέα και εκθέτει τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες στα μονοσθενή κατιόντα όπως τα Na+, τα οποία συνδέονται σε αυτές. Με τον τρόπο αυτό μειώνονται οι απωθητικές δυνάμεις μεταξύ των πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων σε τέτοιο βαθμό ώστε να σχηματίζεται ίζημα. Η κατακρήμνιση μπορεί να επιτευχθεί μόνο παρουσία επαρκούς ποσότητας κατιόντων ώστε να εξουδετερωθεί το αρνητικό φορτίο των φωσφορικών καταλοίπων. Η διαδικασία μπορεί να ποικίλλει στη θερμοκρασία όπου χρησιμοποιείται για να σχηματιστεί το ίζημα, στον τύπο και τη συγκέντρωση των μονοσθενών κατιόντων που προστίθενται καθώς και στο χρόνο και την ταχύτητα της φυγοκέντρησης.

Για την εν λόγω μέθοδο, σε διάλυμα DNA όγκου V προστίθεται ίσος όγκος (1 V) διαλύματος οξικού νατρίου (CH3COONa, Sigma-Aldrich) τελικής συγκέντρωσης 0,3 M και περίπου διπλάσιος όγκος (2 έως 2,5 V) παγωμένης απόλυτης αιθανόλης (100%, Scharlau). Το μείγμα, ύστερα από ισχυρή ανάδευση, τοποθετείται σε θερμοκρασία -80 ^{o}C για 15 λεπτά και φυγοκεντρείται σε 14.000 rpm για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθεται μισός όγκος αιθανόλης 70% (0,5 V, Scharlau), ώστε να απομακρυνθούν τα άλατα.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 14.000 rpm για 5 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Τέλος, το ίζημα ξηραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιαλύεται σε επιθυμητό διάλυμα.

2.10.4 Υβριδοποίηση κατά Southern

Το φαινόμενο της υβριδοποίησης, δηλαδή της δυνατότητας ενός μονόκλωνου μορίου νουκλεϊκού οξέος να σχηματίζει δίκλωνη έλικα με ένα άλλο μονόκλωνο μόριο, αποτελεί τη βάση για πολλές τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας, μεταξύ αυτών και της υβριδοποίησης κατά Southern. Η υβριδοποίηση κατά Southern χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό συγκεκριμένων αλληλουχιών σε δείγμα DNA (Southern, 1975). Τα βασικά στάδια περιλαμβάνουν i) τη σήμανση του ανιχνευτή, ii) τη μεταφορά του DNA σε νάιλον μεμβράνη, iii) την υβριδοποίηση του DNA της μεμβράνης με τον σημασμένο ανιχνευτή και iv) την ανίχνευση του σήματος.

2.10.4.1 Σήμανση Ανιχνευτών

Οι ανιχνευτές είναι μονόκλωνα μόρια τα οποία έχουν καθορισμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων και είναι σημασμένα ώστε να μπορούν να εντοπίζονται. Η μεγάλη εξειδίκευση της αντίδρασης υβριδοποίησης ανάμεσα στο μόριο ανιχνευτή και τις αναζητούμενες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων επιτρέπει τον εντοπισμό τους ακόμη και αν στο κύτταρο ή το διάλυμα περιέχονται εκατομμύρια διαφορετικών αλληλουχιών DNA ή RNA. Η σήμανση των διάφορων τύπων ανιχνευτών (DNA ή/και RNA ανιχνευτών) πραγματοποιείται με την προσθήκη σημασμένων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) ή ριβονουκλεοτιδίων (NTPs), εάν πρόκειται για DNA ή RNA ανιχνευτές αντίστοιχα, είτε κατά τη διάρκεια παραγωγής των ανιχνευτών (μέθοδος τυχαίων εκκινητών), είτε μετά την παραγωγή τους (σήμανση στο 5΄ ή 3΄ άκρο του ανιχνευτή). Η σήμανση των νουκλεοτιδίων μπορεί να γίνει με ραδιενέργεια (^{32}P, ^{35}S, ^{3}H) ή με μη ραδιενεργούς σημαντές [βιοτίνη (Bio), διγοξιγενίνη (DIG)]. Οι μη ραδιενεργοί σημαντές παρουσιάζουν το πλεονέκτημα ότι είναι λιγότερο επικίνδυνοι για την υγεία και επιπλέον, μπορούν να αποθηκευτούν σε θερμοκρασία -20 ^{o}C και να είναι διαθέσιμοι προς χρήση για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα.

Τα βασικά στάδια της μεθόδου των τυχαίων εκκινητών, που χρησιμοποιήθηκε στην εν λόγω μελέτη, περιλαμβάνουν την αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου τμήματος και την επακόλουθη

βαθμιαία αναδιάταξη κάθε αλυσίδας με τη βοήθεια τυχαίων εκκινητών (random primers) και την πολυμεριστική δράση του ενζυμικού κλάσματος Klenow της DNA πολυμεράσης I. Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι το κομμάτι Klenow (Klenow fragment–μεγάλη υπομονάδα της DNA πολυμεράσης I) δεν έχει την 5΄→3΄ εξωνουκλεοτική δράση του ολοενζύμου, ενώ διατηρεί τη δράση της την 5΄→3΄ πολυμεράσης και της 3΄→5΄ εξωνουκλεάσης.

Συγκεκριμένα, η σήμανση του ανιχνευτή έγινε με τη μέθοδο των τυχαίων εκκινητών με τη χρήση HexaLabel™ DNA Labelling kit σύμφωνα με το εγχειρίδιο της κατασκευάστριας εταιρείας (Fermentas). Αναλυτικότερα, το DNA (100 ng έως 1 μg) που θα σημανθεί τοποθετείται σε σωληνάκι τύπου eppendorf και προστίθενται το ρυθμιστικό διάλυμα της πολυμεράσης που περιέχει τυχαία δεκανουκλεοτίδια ως εκκινητές (1X) και η ποσότητα του ddH_2O που αντιστοιχεί σε αυτή που απαιτείται για να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος της αντίδρασης. Το μείγμα αποδιατάσσεται με θέρμανση σε θερμοκρασία 100 ^oC για 10 λεπτά και αμέσως τοποθετείται στο πάγο. Εν συνεχεία, προστίθενται 0,035 mM Biotin-11-dUTP, μείγμα μη σημασμένων νουκλεοτιδίων (dGTP, dATP, dTCP: 0,1 mM και dTTP: 0,065 mM) και 5 Units DNA Klenow πολυμεράση I. Το μείγμα αναδεύεται ήπια και επωάζεται σε θερμοκρασία 37 ^oC για 16 ώρες. Τέλος, ακολουθεί κατακρήμνιση με αιθανόλη (όπως περιγράφεται άνωθι) και αναδιάλυση του ιζήματος σε ddH_2O (50 μl).

2.10.4.2 Μεταφορά σε Νάιλον Μεμβράνη

Με τον όρο μεταφορά εννοούμε την ακινητοποίηση των νουκλεϊκών οξέων, αφού προηγηθεί η αποδιάταξή τους ώστε να καταστούν μονόκλωνα, σε στερεό υπόστρωμα, το οποίο συνήθως είναι μεμβράνες. Τα ακινητοποιημένα νουκλεϊκά οξέα στη συνέχεια χρησιμοποιούνται ως "στόχοι" σε πειράματα υβριδοποίησης με τη χρήση των κατάλληλων κατά περίσταση ανιχνευτών. Η μεταφορά σε μεμβράνη από πήκτωμα αγαρόζης μπορεί να πραγματοποιηθεί με τρεις διαφορετικές διαδικασίες: i) τριχοειδής μεταφορά (Lichtenstein *et al.*, 1990, Chomczynski, 1992), ii) ηλεκτροφορητική μεταφορά (Stellwag & Dahlberg, 1980, Church & Gilbert, 1984) και iii) μεταφορά με χρήση κενού (Olszewska & Jones, 1988, Trnovsky, 1992) ενώ υπάρχουν και τρία είδη μεμβρανών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν: i) μεμβράνη νιτροκυτταρίνης,ii) νάιλον ουδέτερη μεμβράνη και iii) νάυλον θετικά φορτισμένη μεμβράνη.

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε είναι η τριχοειδής μεταφορά όπου βασίζεται στη μεταφορά ενός ρυθμιστικού διαλύματος από μία περιοχή υψηλού υδατικού δυναμικού σε περιοχή χαμηλού δυναμικού. Το διάλυμα μεταφοράς παρασύρεται μέσα στο πήκτωμα και τη μεμβράνη λόγω των τριχοειδών φαινομένων με αποτέλεσμα να συμπαρασύρει μαζί και το μονόκλωνο DNA. Η μεταφορά πραγματοποιείται σε θετικά φορτισμένη νάυλον μεμβράνη, η οποία διευκολύνει την δέσμευση του DNA λόγω των ιονικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του αρνητικά φορτισμένου DNA και της θετικά φορτισμένης μεμβράνης. Ο ρυθμός μεταφοράς του DNA εξαρτάται από το μέγεθος των τμημάτων DNA, το πάχος του πηκτώματος και τη συγκέντρωση της αγαρόζης του πηκτώματος. Μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί η μονιμοποίηση των νουκλεϊκών οξέων στη μεμβράνη είτε με έκθεση σε UV ακτινοβολία συγκεκριμένης έντασης είτε με ξήρανση σε υψηλή θερμοκρασία.

Συγκεκριμένα, μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα αγαρόζης φωτογραφίζεται, αφού έχει τοποθετηθεί κατά μήκος του χάρακα, ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση του σήματος της μεμβράνης με τη φωτογραφία του πηκτώματος και κατά συνέπεια ο προσδιορισμός του τμήματος που υβριδοποιήθηκε. Το πήκτωμα τοποθετείται σε ειδικό δοχείο και επωάζεται σε διάλυμα HCI 0,2 M υπό ανάδευση για 10 λεπτά. Ακολουθούν δυο αλλεπάλληλες επωάσεις σε διάλυμα αποδιάταξης (0,5 M NaOH και 1,5 M NaCl) σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 15 λεπτά. Εν συνεχεία, το πήκτωμα επωάζεται δις με διάλυμα εξουδετέρωσης (0,5 M Tris/HCl pH=7,5 και 1,5 M NaCl) σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 20 λεπτά. Το πήκτωμα επωάζεται σε διάλυμα SSC 6X σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 5 λεπτά και τοποθετείται σε γέφυρα διηθητικού χαρτιού Whatman 3 MM, του οποίου οι άκρες εμβαπτίζονται σε διάλυμα SSC 6X. Η νάιλον μεμβράνη (Nytran SPC, Whatman) ίσων διαστάσεων με το πήκτωμα διαβρέχεται με ddH_2O και στη συνέχεια με διάλυμα 6X SSC και τοποθετείται πάνω από το πήκτωμα χωρίς να δημιουργηθεί κενό μεταξύ πηκτώματος και μεμβράνης.

Έπειτα, δυο φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatman 3 MM, 5 mm μικρότερα σε κάθε διάσταση από τη μεμβράνη, διαβρέχονται με ddH_2O και τοποθετούνται πάνω στη μεμβράνη, ακολουθούν επιπλέον δυο φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatman 3 MM και τέλος απορροφητικά χαρτιά, μικρότερων διαστάσεων της μεμβράνης κατά 10 mm σε κάθε διάσταση. Στη κορυφή τοποθετείται βάρος περίπου 500 gr για να εξασφαλιστεί η επαφή μεταξύ πηκτώματος και μεμβράνης. Η μεταφορά του DNA ολοκληρώνεται μετά από 16-18 ώρες, οπότε αφαιρούνται τα

απορροφητικά χαρτιά και τα φύλλα Whatman 3 MM και σημαδεύεται η μεμβράνη ώστε να είναι γνωστός ο προσανατολισμός της και η θέση των βοθρίων. Η μεμβράνη ξηραίνεται σε θερμοκρασία 80 ^{o}C για 3 ώρες για να σταθεροποιηθεί το DNA και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου χρησιμοποιηθεί. Για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς του DNA, το πήκτωμα μετά το τέλος της διαδικασίας εξετάζεται κάτω από υπεριώδες φως.

2.10.4.3 Υβριδοποίηση του Σημασμένου Ανιχνευτή

Η διαδικασία υβριδοποίησης των νουκλεϊκών οξέων συνίσταται από τα στάδια της προϋβριδοποίησης και της υβριδοποίησης. Το στάδιο της προϋβριδοποίησης πραγματοποιείται για την μείωση του ‘‘θορύβου’’ με την κάλυψη των ελεύθερων θέσεων της μεμβράνης (θέσεις όπου δεν υπάρχει DNA), οι οποίες θα μπορούσαν να προκαλέσουν μη ειδική δέσμευση του ανιχνευτή. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την παρεμπόδιση της μη ειδικής σύνδεσης του ανιχνευτή στην επιφάνεια της μεμβράνης είναι τα: Denhardt’s (Denhardt’s reagent), το SDS (Sigma-Aldrich) και το DNA από σπέρμα σολωμού (ssDNA, salmon sperm DNA, Sigma-Aldrich). Το αντιδραστήριο Denhardt’s περιέχει 1% φικόλη (ficol, Sigma-Aldrich) και 1% PVP (Sigma-Aldrich), τα οποία είναι μεγάλα μόρια και καταλαμβάνουν χώρο καθώς και 1% BSA (Sigma-Aldrich), η οποία είναι μια μη ειδική πρωτεΐνη.

Κατά το στάδιο της υβριδοποίησης επιτυγχάνεται ο σχηματισμός των υβριδίων μεταξύ των νουκλεοτιδικών αλυσίδων. Το ποσοστό σχηματισμού των υβριδίων καθορίζεται από τις συνθήκες υβριδοποίησης. Η άριστη θερμοκρασία υβριδισμού στη περίπτωση DNA:DNA υβριδοποίησης είναι 25 ^{o}C χαμηλότερη από τη θερμοκρασία Tm (θερμοκρασία τήξης) του υβριδίου. Το σημείο τήξης Tm είναι η θερμοκρασία στην οποία η μισή ποσότητα του ολιγονουκλεοτιδίου βρίσκεται σε μονόκλωνη μορφή. Οι παράμετροι που επηρεάζουν τη Tm είναι η αναλογία των βάσεων (GC), η συγκέντρωση άλατος και το μέγεθος του ανιχνευτή, και συνδέονται μεταξύ τους με τη εξίσωση: $Tm = 81,5\ ^{o}C + 16,6\ \log M + 0,41(\%G+C) - 500/n$ όπου M είναι η συγκέντρωση των ιόντων του άλατος [Na+] και n ο αριθμός των νουκλεοτιδίων που απαρτίζουν το υβρίδιο. Η συγκέντρωση των ιόντων Na πρέπει να είναι υψηλή ώστε να επιτευχθεί υβριδοποίηση. Τα μονοσθενή κατιόντα αντιδρούν με τις φωσφορικές ομάδες των νουκλεϊκών οξέων μειώνοντας τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο κλώνων και σταθεροποιώντας έτι το υβρίδιο. Αντίθετα, με τη συγκέντρωση του άλατος, η υβριδοποίηση

κατά Southern φτάνει τα όρια της ευαισθησίας της όταν χρησιμοποιούνται μικρού μήκους ανιχνευτές. Υπό βέλτιστες συνθήκες, η ευαισθησία της μεθόδου κυμαίνεται περίπου σε 100 fg όταν χρησιμοποιείται βιοτυνιλιωμένος ανιχνευτής.

Η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδικό σωλήνα υβριδοποίησης, ο οποίος περιέχει ποσότητα διαλύματος υβριδοποίησης ανάλογα με το εμβαδό της (εμβαδόν x 0,2 = ml διαλύματος υβριδοποίησης). Επιπλέον, προστίθεται DNA από σπέρμα σολωμού (ssDNA, Sigma-Aldrich) σε συγκέντρωση 100 μg/ml διαλύματος υβριδοποίησης, το οποίο προηγουμένως έχει θερμανθεί σε 100 ^{o}C για 10 λεπτά ώστε να αποδιαταχθεί. Ο σωλήνας τοποθετείται σε θάλαμο υβριδοποίησης και επωάζεται περιστρεφόμενος για 2 ώρες στη θερμοκρασία υβριδοποίησης του ανιχνευτή. Το διάλυμα προϋβριδοποίησης αποχύνεται και προστίθεται νέο διάλυμα προϋβριδοποίησης (10 ml/100 cm^2) και ο ανιχνευτής (100-200 ng/ml διαλύματος), ο οποίος έχει θερμανθεί σε 100 ^{o}C για 10 λεπτά ώστε να αποδιαταχθεί. Τέλος, ο σωλήνας μεταφέρεται σε θάλαμο υβριδοποίησης και η υβριδοποίηση πραγματοποιείται για 16-18 ώρες στην ίδια θερμοκρασία με την προϋβριδοποίηση.

2.10.4.4 Ανίχνευση σήματος

Η διαδικασία συνίσταται στην απομάκρυνση του μη συνδεδεμένου ανιχνευτή, στη πρόσδεση της στρεπταβιδίνης [σύμπλοκο στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης (AP)] στη βιοτίνη και στην ανίχνευση του σήματος. Η απομάκρυνση της περίσσειας του ανιχνευτή, ο οποίος δεν έχει προσδεθεί καθόλου ή έχει ασθενώς υβριδοποιηθεί μη ειδικά, με αλληλουχίες με τις οποίες μπορεί να έχει μια μικρού βαθμού ομολογία επιτυγχάνεται με διαλύματα που περιέχουν άλατα (SSC) σε προοδευτικά μειούμενες συγκεντρώσεις και την κατάλληλη ποσότητα SDS. Η πρόσδεση της στρεπταβιδίνης πραγματοποιείται με την προσθήκη της σε διάλυμα που περιέχει αποβουτυρωμένο γάλα, ώστε να μειωθούν οι μη ειδικές θέσεις σύνδεσης του αντισώματος.

Η ανίχνευση του σήματος βασίζεται στην ικανότητα ισχυρής σύνδεσης ανάμεσα στη βιοτίνη και την στρεπταβιδίνη, η οποία είναι συνδεδεμένη με αλκαλική φωσφατάση, και την ιδιότητά αυτής να καταλύει μία χρωμογόνο αντίδραση με το X-phosphate και το NBT. Το X-phosphate (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phospate, 4-toluidine salt) χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για την αλκαλική φωσφατάση και το 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl που σχηματίζεται αντιδρά αυθόρμητα με το O_2 για να δώσει μία αδιάλυτη ερυθροκυανή χρώση, ενώ το NBT χρησιμοποιείται ως

δέκτης ηλεκτρονίων αντί του O_2. Η ένταση του σήματος είναι ανάλογη της δραστικότητας του ανιχνευτή και αντιστρόφως ανάλογη του μήκους.

Το διάλυμα υβριδοποίησης όπου περιέχει τον ανιχνευτή συλλέγεται σε σωλήνα τύπου falcon και διατηρείται σε θερμοκρασία -20 ^{o}C, έως ότου επαναχρησιμοποιηθεί. Η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδικό δοχείο, το οποίο περιέχει διάλυμα πλύσης I (SSC 2X και 0,1% SDS) και επωάζεται δις σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 5 λεπτά. Ακολουθούν δυο αλλεπάλληλες επωάσεις σε διάλυμα πλύσης II (SSC 0,2X και 0,1% SDS) υπό ανάδευση στη θερμοκρασία όπου πραγματοποιήθηκε η υβριδοποίηση για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, η μεμβράνη εξισορροπείται σε διάλυμα A (100 mM Tris/HCl pH=7,5 και 150 mM NaCl) για 1 λεπτό και στη συνέχεια επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου και διάλυμα B (1% διαλύματος αποβουτυρωμένου γάλακτος σε Διάλυμα A) υπό ανάδευση για τουλάχιστον 30 λεπτά. Το διάλυμα B απορρίπτεται και προστίθεται διάλυμα B, το οποίο περιέχει 5 μl συμπλόκου στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης ανά 10 ml, και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 30 λεπτά. Η μεμβράνη ξεπλένεται δις σε διάλυμα A για 15 λεπτά και η μεμβράνη εξισορροπείται σε διάλυμα C (100 mM Tris/HCl pH=9,5, 100 mM NaCl και 50 mM $MgCl_2$) για 2 λεπτά. Η ανίχνευση του σήματος πραγματοποιείται με κάλυψη της μεμβράνης με πρόσφατα παρασκευασμένου διαλύματος C, το οποίο περιέχει 50 μl NBT (Sigma-Aldrich) και 37,5 μl BCIP (Sigma-Aldrich) ανά 10 ml διαλύματος. Τέλος, η εμφάνιση διακόπτεται με πολλαπλές πλύσεις της μεμβράνης με ddH_2O.

2.11 Δοκιμασία Βακτηριακής Σύζευξης

Ο μηχανισμός της βακτηριακής σύζευξης αναφέρεται στη φυσική επαφή δύο βακτηριακών κυττάρων, του ίδιου ή συγγενούς είδους, και τη μεταφορά γενετικού υλικού (πλασμίδιο και σπανιότερα τμήμα του χρωμοσώματος) από το ένα κύτταρο στο άλλο. Στο εργαστήριο, ο μηχανισμός της βακτηριακής σύζευξης χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση της πιθανής πλασμιδιακής εντόπισης συγκεκριμένων χαρακτήρων του δότη, αλλά και την δυνατοτητα οριζόντιας μεταβίβασης του εν λόγω χαρακτήρων.

Η ικανότητα των στελεχών της μελέτης να μεταβιβάζουν τα γονίδια που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες μελετήθηκε αντιπροσωπευτικά σε ένα στέλεχος από κάθε κλώνο ακολουθώντας τη μέθοδο κοινής επώασης δότη και λήπτη σε επιφάνεια άγαρ (Cross-

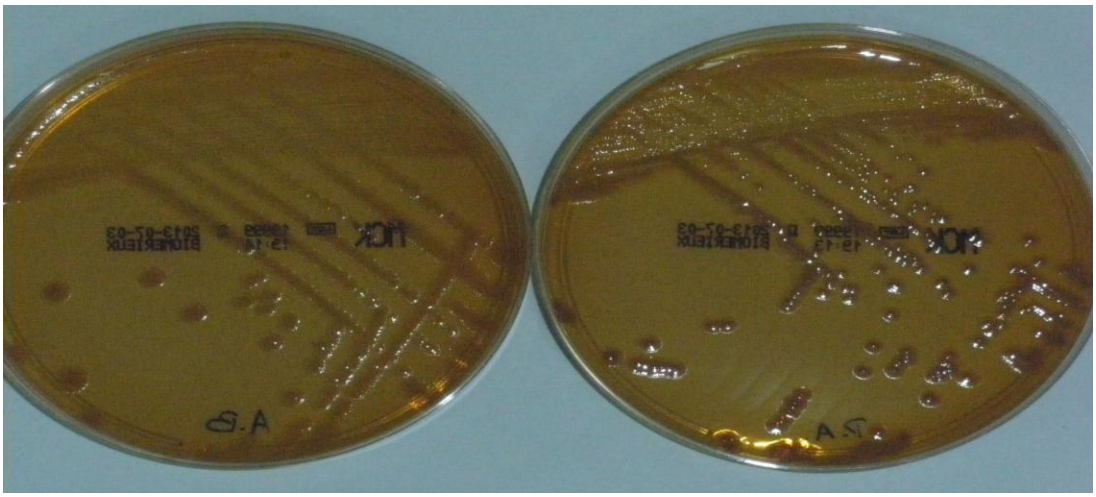
Streak μέθοδος). Ως λήπτης χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο στέλεχος *Escherichia coli* 26R793 (Lac^- Rif^R). Συγκεκριμένα, με βαμβακοφόρο στυλεό συλλέχθηκε ποσότητα από αρχικά εναιωρήματα 0,5 McFarland προερχόμενα από ολονύχτιες υπό ανάδευση καλλιέργειες του δότη και του λήπτη σε θρεπτικό ζωμό Luria Bertani (Mast group). Οι ποσότητες ενοφθαλμίστηκαν σε ευθεία γραμμή κατά μήκος δύο διαμέτρων με γωνία 90° (η γραμμή του δότη κάθετα σε αυτή του λήπτη) σε κοινό τρυβλίο Mueller Hinton (biomerieux) και τα τρυβλία επωάσθηκαν στους 37 ^oC για 18 ώρες. Ολόκληρη η επιφάνεια επαφής της καλλιέργειας του δότη και του λήπτη συλλέχθηκε με κρίκο και εναιωρήθηκε σε 2 ml PBS (Phosphate Buffer Saline 1X: 137 mM NaCl, 10 mM Phosphate 2,7 mM KCI, pH 7,4). Έγινε σειρά υποδεκαπλάσιων αραιώσεων του εναιωρήματος αυτού μέχρι και 10^{-4} και 100 μl από κάθε αραίωση (10^0 έως και 10^{-4}) καλλιεργήθηκαν σε εκλεκτικό υλικό MacConkey (biomerieux) που περιείχε 2 μg/ml ιμιπενέμης (Anfarm), στην οποία είναι ανθεκτικός ο δότης και ευαίσθητος ο λήπτης και 100 μg/ml ριφαμπικίνης (Sanofi Aventis), στην οποία είναι ανθεκτικός ο λήπτης και ευαίσθητος ο δότης. Τα μικροβιακά κύτταρα που θα αναπτύσσονταν σε αυτό το συνδυασμό των αντιβιοτικών αναμένονταν να αντιστοιχούν στους διασυζευκτές. Στο ίδιο εκλεκτικό υλικό καλλιεργήθηκαν επίσης ξεχωριστά ο δότης και ο λήπτης, των οποίων η ανάπτυξη έπρεπε να ανασταλεί πλήρως για να εξακριβωθεί η σωστή σύστασή του. Τέλος, για τον αδρό υπολογισμό του αριθμού των δοτών που περιείχε το αρχικό πυκνό εναιώρημα δότη-λήπτη, ενοφθαλμίσθηκαν 100μl από το εναιώρημα αυτό σε τρυβλίο που περιείχε μόνο 2 μg/ml ιμιπενέμη ώστε να μην επιβιώσει ο λήπτης, αλλά να αναπτυχθεί κυρίως ο δότης και τα λίγα αναμενόμενα κύτταρα των διασυζευκτών και τα τρυβλία επωάσθηκαν στους 37 ^oC για 18 ώρες. Η συχνότητα της μεταβίβασης της ανθεκτικότητας υπολογίστηκε από το λόγο: Αριθμός αποικιών διασυζευκτών προς Αριθμός αποικιών δότη.

Αποτελέσματα

3.1 Επιλογή Μικροβιακών Στελεχών

Κατά το χρονικό διάστημα από τις αρχές έως και το τέλος του 2011 απομονώθηκαν και συλλέχτηκαν 236 βακτηριακά στελέχη που πληρούσαν τα οριζόμενα προκαταρκτικά κριτήρια (ικανότητα ανάπτυξης παρουσία μεροπενέμης συγκέντρωση 8 mg/ml και αρνητική δοκιμασία ζύμωσης λακτόζης, Εικόνα 3.1) από κλινικά δείγματα ασθενών του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.

Τα εν λόγω βακτηριακά στελέχη απομονώθηκαν από μια πλειάδα παθολογικών κλινικών δειγμάτων. Συγκεκριμένα απομονώθηκαν από αίμα, βιολογικά υγρά (εγκεφαλονωτιαία, παροχετεύσεων, πλευριτικά, τραχειοστομίας), εκκρίματα (βρογχικά, κολπικά, ουρηθρικά, οφθαλμικά, ρινικά, φαρυγγικά, ωτικά), καθετήρες (αρτηριακοί, περιτοναϊκοί, φλεβικοί), κόπρανα, ούρα, πτύελα και πύον ασθενών που νοσηλεύονταν στις παθολογικές και χειρουργικές κλινικές, στη μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) ή προσήλθαν στα εξωτερικά ιατρεία του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.



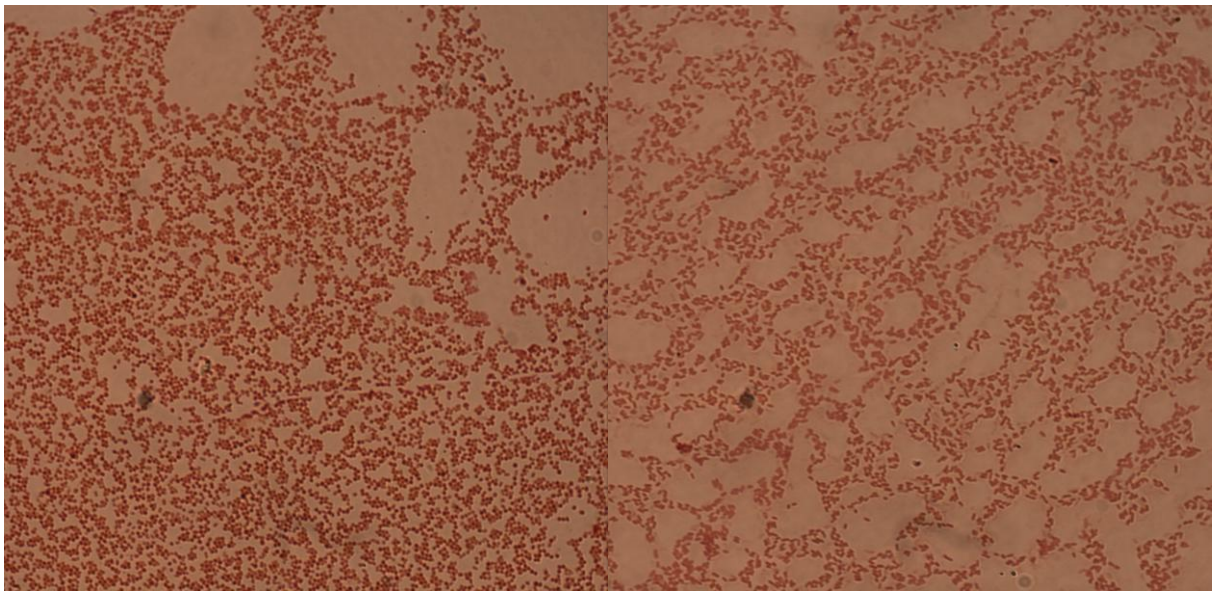
Εικόνα 3.1. Ανάπτυξη *A. baumannii* (αριστερά) και *P. aeruginosa* (δεξιά) σε MacConkey άγαρ No 3 παρουσία μεροπενέμης συγκέντρωση 0,5 mg/ml.

Επιπλέον, όπως έχει ήδη αναφερθεί στη μελέτη συμπεριλήφθησαν συνολικά 72 (2 στελέχη ανά μήνα ανά νοσοκομείο) ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *A. baumannii* που απομονώθηκαν από τα από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο ‘‘ΑΤΤΙΚΟΝ’’, το Γενικό Νοσοκομείο ‘‘Ασκληπιείο Βούλας’’ και το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών. Τέλος, στη

παρούσα μελέτη συμπεριλήφθησαν 47 ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *A. baumannii* που είχαν απομονωθεί κατά το δεύτερο εξάμηνο του 2010 στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας.

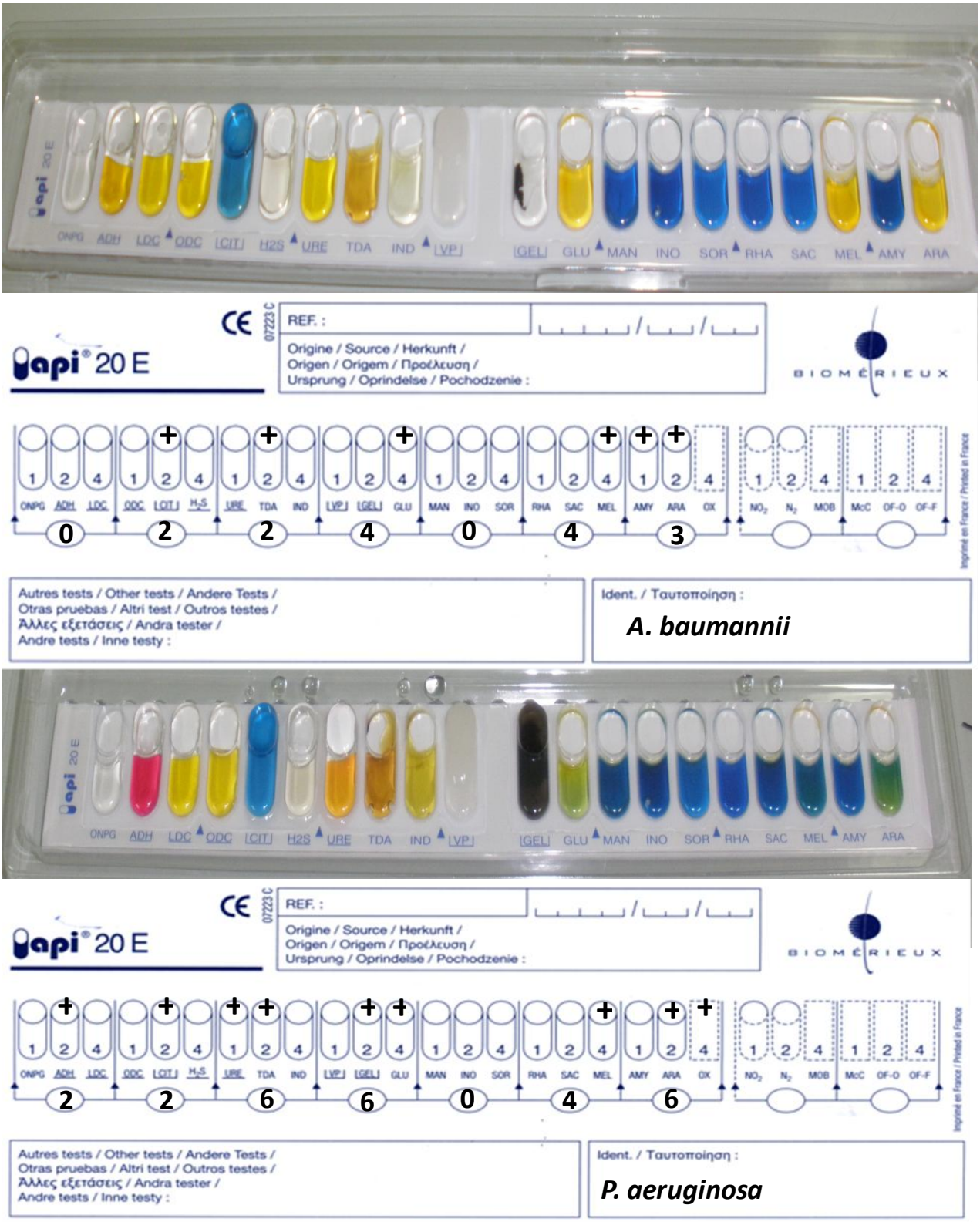
3.2 Ταυτοποίηση Μικροοργανισμών με Κλασικές Μεθόδους

Τα άνωθι αναφερόμενα αζυμωτικά στελέχη με πιθανή ανθεκτικότητα έναντι των καρβαπενεμών ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους με συμβατικές μικροβιολογικές μεθόδους. Αρχικά, κεχρωσμένα παρασκευάσματα (χρώση Gram, Εικόνα 3.2) των συλλεχθέντων στελεχών υποβλήθηκαν σε μικροσκοπική εξέταση, με σκοπό τη διαφοροδιάγνωση όσον αφορά το μέγεθος, τη μορφολογία και το πρότυπο χρώσης τους βάσει της συγκεκριμένης χρωστικής. Εφόσον τα εν λόγω στελέχη ήταν Gram αρνητικά βακτήρια, διενεργήθηκε η ταυτοποίηση τους μέσω του συστήματος api 20E.



Εικόνα 3.2. Κεχρωσμένα παρασκευάσματα (χρώση Gram) στελεχών *A. baumannii* (αριστερά) και *P. aeruginosa* (δεξιά).

Το σύνολο των απομονωθέντων στελεχών ανήκε σε δυο διακριτά προφίλ θετικών βιοχημικών δοκιμασιών. Συγκεκριμένα, 129 βακτηριακά στελέχη άνηκαν στο προφίλ με θετικές τις εξής βιοχημικές δοκιμασίες: κιτρικό τρινάτριο (CIT), L-τρυπτοφάνη (TDA), D-γλυκόζη (GLU), D-μελιβιόζη (MEL), αμυγδαλίνη (AMY) και L-αραβινόζη (ARA) χαρακτηριζόμενα από το επταψήφιο αριθμητικό προφίλ 0224043, το οποίο αντιστοιχεί στο είδος *Acinetobacter baumannii*

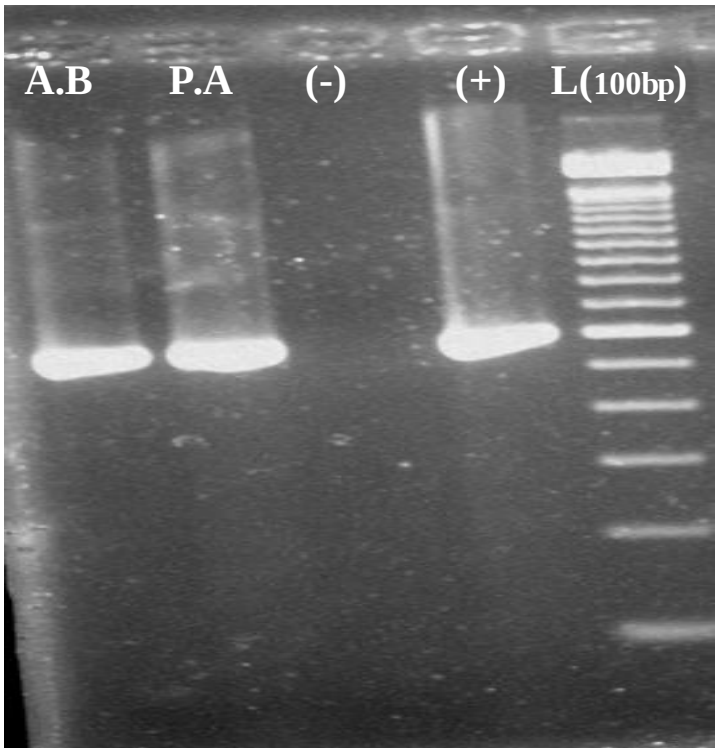


Εικόνα 3.3. Προφίλ θετικών βιοχημικών δοκιμασιών στελεχών *A. baumannii* (πάνω) και *P. aeruginosa* (κάτω) βάσει του συστήματος api 20E.

(Εικόνα 3.3). Ενώ, τα υπόλοιπα 107 βακτηριακά στελέχη άνηκαν στο προφίλ με θετικές τις εξής βιοχημικές δοκιμασίες: L-αργινίνη (ADH), κιτρικό τρινάτριο (CIT), ουρία (URE), L-τρυπτοφάνη (TDA), ζελατίνη (GEL), D-γλυκόζη (GLU), D-μελιβιόζη (MEL), L-αραβινόζη (ARA) και N,N,N,N-τετραμεθυλ-π-φαινυλενοδιαμίνο διυδροχλωρικό οξύ (OX) χαρακτηριζόμενα από το επταψήφιο αριθμητικό προφίλ 2266046, το οποίο αντιστοιχεί στο είδος *Pseudomonas aeruginosa* (Εικόνα 3.3).

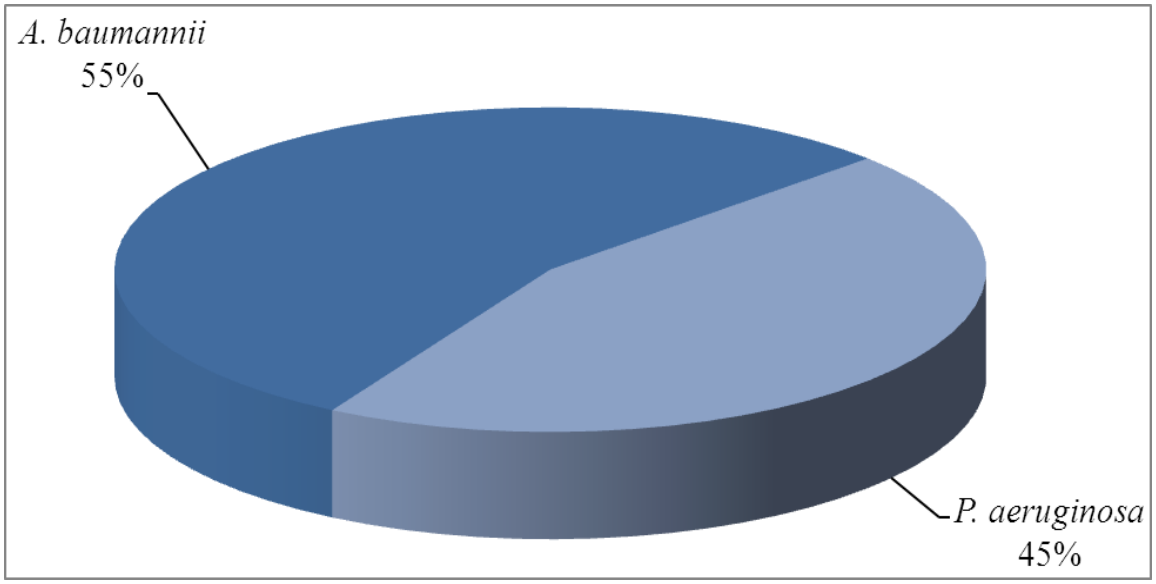
3.3 Ταυτοποίηση Μικροοργανισμών με Μοριακές Μεθόδους

Καθώς η τυποποίηση βακτηριακών στελεχών απαιτεί την ακριβή ταυτοποίηση αυτών σε επίπεδο είδους, η ταυτοποίηση των υπό μελέτη στελεχών επιβεβαιώθηκε με την ενίσχυση και την αλληλούχιση ενός τμήματος 593 bp του 16S rDNA αυτών (Εικόνα 3.4). Οι προκύπτουσες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες συγκρίθηκαν μέσω του προγράμματος BLASTN με τις αντίστοιχες κατατεθειμένες αλληλουχίες της GeneBank. Εφόσον οι στοιχίσεις είχαν σχεδόν μηδενική τιμή E θεωρηθήκαν αποδεκτές, ενώ το BLAST hit που έφερε με την υπό μελέτη αλληλουχία ελάχιστο ποσοστό ταυτότητας 98% θεωρήθηκε ως το αποτέλεσμα της ταυτοποίησης έκαστου στελέχους.



Εικόνα 3.4. Ενίσχυση τμήματος του 16S rDNA στελεχών *A. baumannii* (πρώτο) και *P. aeruginosa* (δεύτερο).

Τα αποτελέσματα που πρόεκυψαν με τη μοριακή ταυτοποίηση των στελεχών ήταν σε απόλυτη συμφωνία με αυτά που είχαν προκύψει με τις συμβατικές μεθόδους ταυτοποίησης επιβεβαιώνοντας την απομόνωση 129 (55%) στελεχών *Acinetobacter baumannii* και 107 (45%) στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* μεταξύ των πιθανών ανθεκτικών έναντι των καρβαπενέμων στελεχών (Εικόνα 3.5).

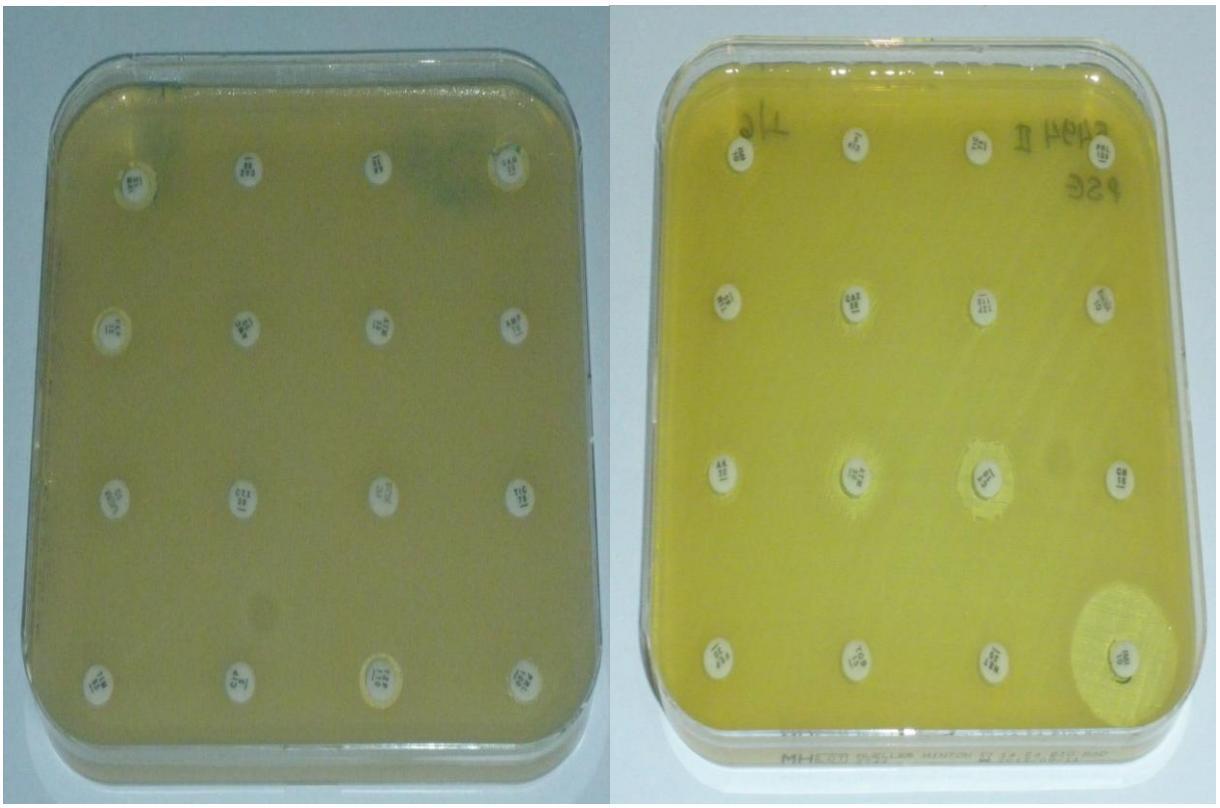


Εικόνα 3.5. Ποσοστό στελεχών *A. baumannii* και *P. aeruginosa* μεταξύ των πιθανών ανθεκτικών έναντι των καρβαπενέμων στελεχών.

3. 4 Ανθεκτικότητα Μικροβιακών Στελεχών

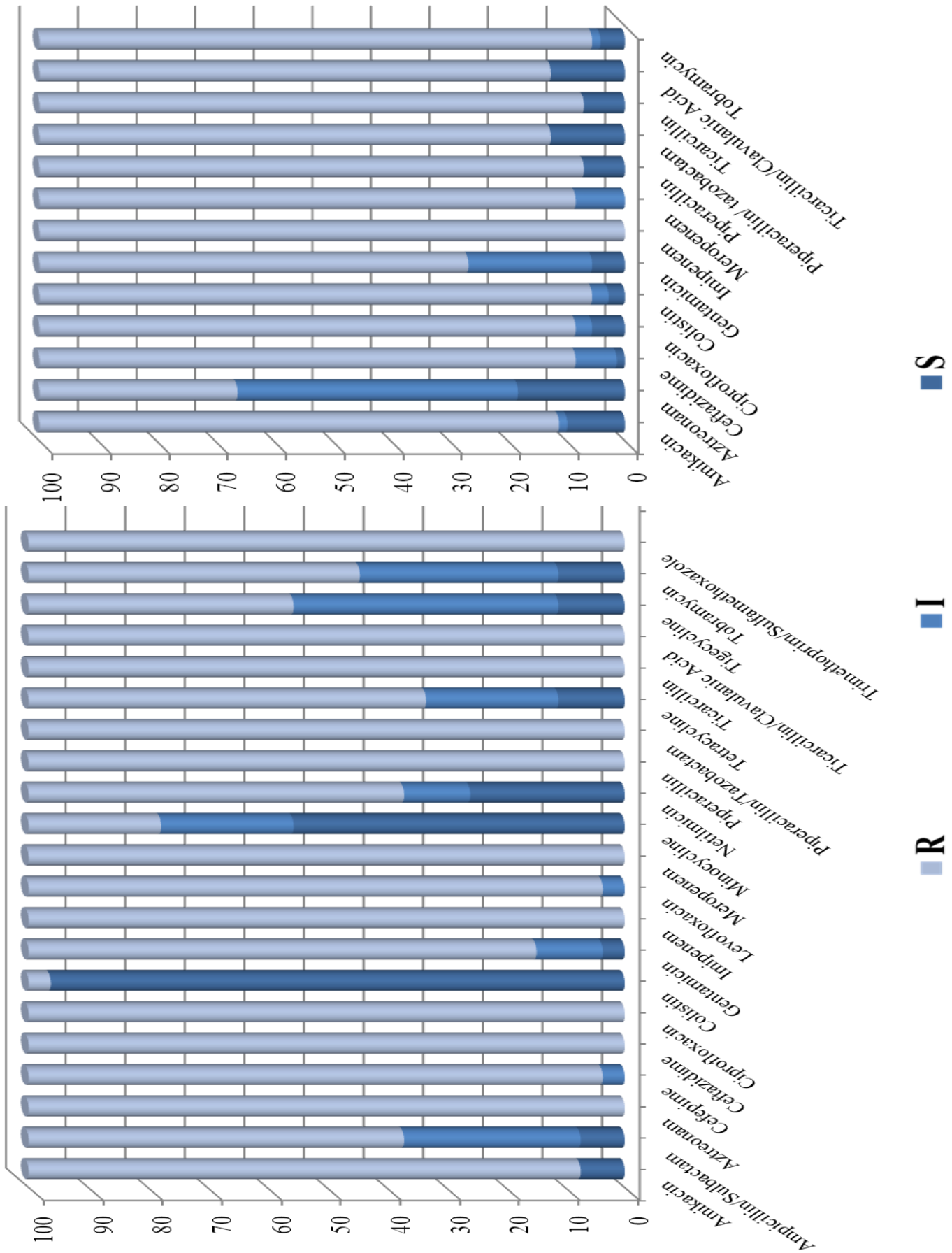
Σύμφωνα με τα κριτήρια της CLSI τα 127 από τα 129 απομονωθέντα στελέχη *A. baumannii* βρέθηκε να είναι ανθεκτικά έναντι των καρβαπενέμων (Εικόνα 3.7). Μεταξύ των εν λόγω στελεχών η πλειοψηφία έφερε ανθεκτικότητα στην αμικασίνη (92,59%), στη αμπικιλλίνη/σουλβακτάμη (62,96%), στην αζτρεονάμη (100%), στη κεφεπίμη (96,30%), στη σιπροφλοξασίνη (100%), στη γενταμυκίνη (85,19%), στη λεβοφλοξασίνη (96,30%), στη νετιλμικίνη (62,96%), στη πιπερακιλλίνη (100%), στη πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη (100%), στη τετρακυκλίνη (66,67%), στη τικαρκιλλίνη (100%), στη τικαρκιλλίνη/κλαβουλανικό οξύ (100%), στη τομπραμυκίνη (55,56%), στη τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη (100%), ενώ υπήρξαν στελέχη που εμφάνισαν ανθεκτικότητα στη κολιστίνη (3,70%), στη μινοκυκλίνη (22,22%) και στη τιγκεκυκλίνη (44,44%).

Μεταξύ των ανθεκτικών έναντι των καρβαπενέμων στελεχών *A. baumannii* υπήρξαν στελέχη που εμφάνισαν ενδιάμεσο φαινότυπο στη αμπικιλλίνη/σουλβακτάμη (29,63%), στη κεφεπίμη (3,70%), στη γενταμυκίνη (11,11%), στη λεβοφλοξασίνη (3,70%), στη μινοκυκλίνη (22,22%), στη νετιλμικίνη (11,11%), στη τετρακυκλίνη (22,22%), στη τιγκεκυκλίνη (44,44%) και στη τομπραμυκίνη (33,33%). Τέλος, η ευαισθησία των στελεχών αυτών για την πλειονότητα των ελεγχθέντων αντιβιοτικών κυμαίνονταν από 0% έως 11,11% με εξαίρεση στη νετιλμικίνη (25.93%), στη μινοκυκλίνη (55,56%) και στη κολιστίνη (96,30%).



Εικόνα 3.6. Δοκιμασία διάχυσης των δίσκων για στελέχη *A. baumannii* (αριστερά) και *P. aeruginosa* (δεξιά).

Σύμφωνα με τα κριτήρια της CLSI τα 80 από τα 107 απομονωθέντα στελέχη *P. aeruginosa* βρέθηκε να είναι ανθεκτικά έναντι των καρβαπενέμων (Εικόνα 3.7). Μεταξύ των εν λόγω στελεχών η πλειοψηφία έφερε ανθεκτικότητα στην αμικασίνη (88,73%), στη κεφταζιδίμη (91,55%), στη σιπροφλοξασίνη (91,55%), στη κολιστίνη (94,37%), στη γενταμυκίνη (73,24%), στη πιπερακιλλίνη (92,96%), στη πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη (87,32%), στη τικαρκιλλίνη (92,96%), στη τικαρκιλλίνη/κλαβουλανικό οξύ (87,32%) και στη τομπραμυκίνη (94,37%), ενώ υπήρξαν στελέχη που εμφάνισαν ανθεκτικότητα στην αζτρεονάμη (33,80%).



Εικόνα 3.7. Κατανομή των φαινοτύπων S, I και R των υπό μελέτη στελεχών για τους συνηθέστερα χρησιμοποιούμενους αντιβιοτικούς παράγοντες έναντι των ειδων *A. baumannii* (αριστερά) και *P. aeruginosa* (δεξιά).

Μεταξύ των ανθεκτικών έναντι των καρβαπενέμων στελεχών *P. aeruginosa* υπήρξαν στελέχη που εμφάνισαν ενδιάμεσο φαινότυπο στην αμικασίνη (1,41%), στην αζτρεονάμη (47,89%), στη κεφταζιδίμη (7,04%), στη σιπροφλοξασίνη (2,82%), στη κολιστίνη (2,82%), στη γενταμυκίνη (21,13%) και στη τομπραμυκίνη (1,41%). Τέλος, υπήρξαν στελέχη που εμφάνισαν ευαίσθητο φαινότυπο στην αμικασίνη (9,86%), στη κεφταζιδίμη (1,41%), στη σιπροφλοξασίνη (5,63%), στη κολιστίνη (2,82%), στη γενταμυκίνη (5,63%), στη πιπερακιλλίνη (7,04%), στη πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη (12,68%), στη τικαρκιλλίνη (7,04%), στη τικαρκιλλίνη/κλαβουλανικό οξύ (12,68%) και στη τομπραμυκίνη (12,68%), ενώ στην αζτρεονάμη (18,31%).

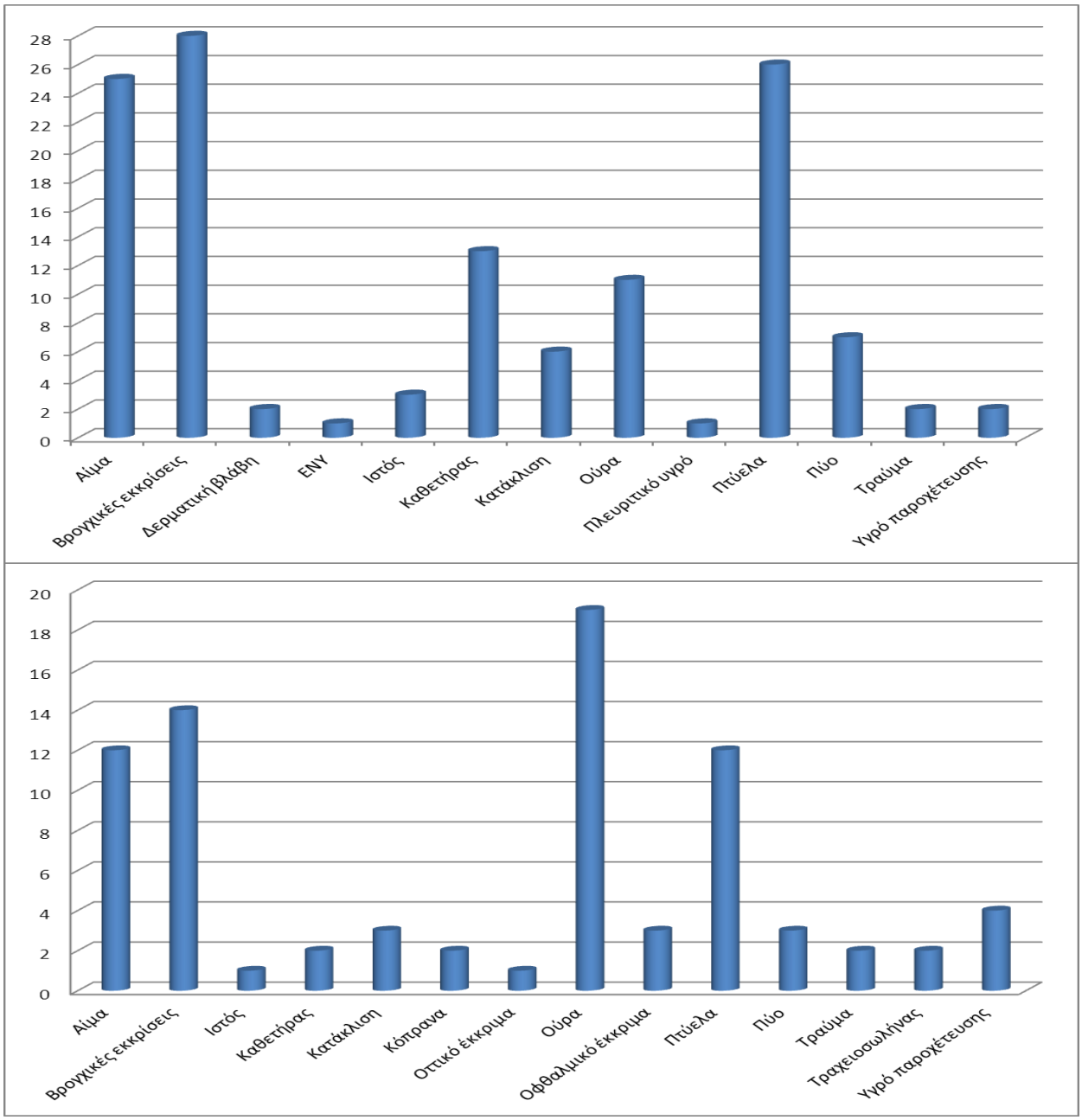
Η πλειοψηφία των MICs των ελεγχθέντων στελεχών *A. baumannii* κυμαίνονταν μεταξύ των ορίων που θέτει η CLSI για τα ανθεκτικά στελέχη για τους περισσότερους αντιμικροβιακούς παράγοντες (Πίνακας 3.1). Οι επικρατούσες τιμές MIC για τα υπό μελέτη στελέχη ήταν: MIC≥64 mg/l στην αμικασίνη (92,59%), MIC≥32 mg/l στη αμπικιλλίνη/σουλβακτάμη (66,67%), MIC≥64 mg/l στην αζτρεονάμη (100%), MIC≥64 mg/l στη κεφεπίμη (96,30%), MIC≥4 mg/l στη σιπροφλοξασίνη (100%), MIC≥16 mg/l στη γενταμυκίνη (85,19%), MIC≥0,5 mg/l στη κολιστίνη (70,37%), MIC≥8 mg/l στη λεβοφλοξασίνη (96,30%), MIC≥1 mg/l στη μινοκυκλίνη (51,58%), MIC≥32 mg/l στη νετιλμικίνη (62,96%), MIC≥128 mg/l στη πιπερακιλλίνη (100%), MIC≥128 mg/l στη πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη (100%), MIC≥16 mg/l στη τετρακυκλίνη (66,67%), MIC≥4 mg/l στη τιγκεκυκλίνη (44,44%), MIC≥128 mg/l στη τικαρκιλλίνη (100%), MIC≥128 mg/l στη τικαρκιλλίνη/κλαβουλανικό οξύ (100%), MIC≥16 mg/l στη τομπραμυκίνη (48,15%), MIC≥128 mg/l στη τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη (100%).

Ομοίως, η πλειοψηφία των MICs των ελεγχθέντων στελεχών *P. aeruginosa* κυμαίνονταν μεταξύ των ορίων που θέτει η CLSI για τα ανθεκτικά στελέχη για τους περισσότερους αντιμικροβιακούς παράγοντες (Πίνακας 3.1). Οι επικρατούσες τιμές MIC για τα υπό μελέτη στελέχη ήταν: MIC≥64 mg/l στην αμικασίνη (88,73%), MIC≥16 mg/l στην αζτρεονάμη (47,89%), MIC≥64 mg/l στη κεφταζιδίμη (59,15%), MIC≥4 mg/l στη σιπροφλοξασίνη (91,55%), MIC≥2 mg/l στη κολιστίνη (90,14%), MIC≥16 mg/l στη γενταμυκίνη (74,65%), MIC≥128 mg/l στη πιπερακιλλίνη (92,96%), MIC≥128 mg/l στη πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη (87,32%), MIC≥128 mg/l στη τικαρκιλλίνη (92,96%), MIC≥128 mg/l στη τικαρκιλλίνη/κλαβουλανικό οξύ (87,32%) και MIC≥16 mg/l στη τομπραμυκίνη (94,37%).

Πίνακας 3.1. Ποσοστά κατανομής στελεχών *A. baumannii* (πάνω) και *P. aeruginosa* (κάτω) σε MIC για τους ελεγχθέντες αντιμικροβιακούς παράγοντες.

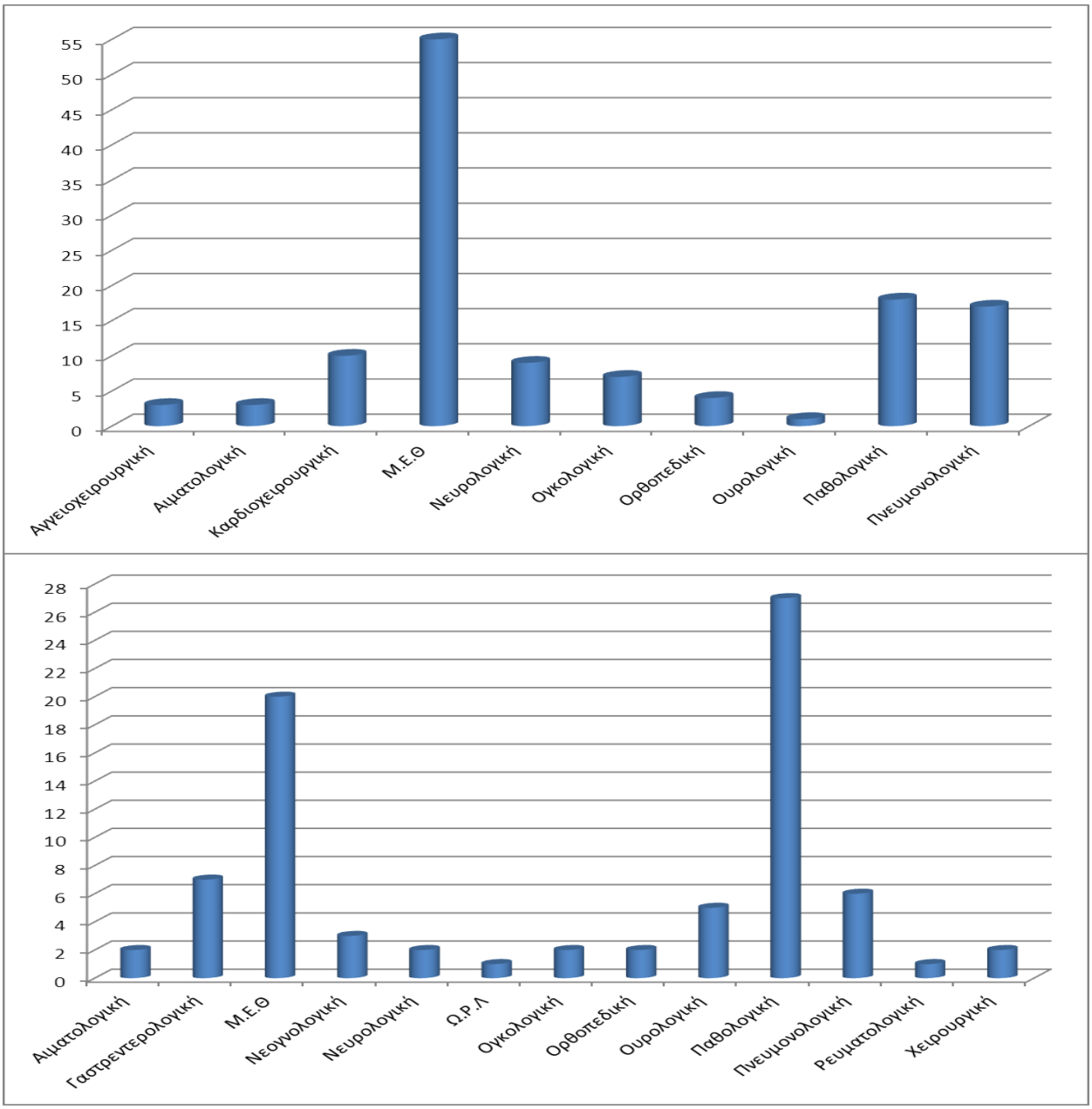
MIC (mg/l)	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
A. baumannii										
Amikacin	0	0	0	7,41	0	0	0	0	92,59	0
Ampicillin/Sulbactam	0	0	0	3,70	0	3,70	22,22	66,67	3,70	0
Aztreonam	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0
Cefepime	0	0	0	0	0	0	3,70	0	96,30	0
Ceftazidime	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0
Ciprofloxacin	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0
Colistin	0	70,37	11,11	14,81	0	0	3,70	0	0	0
Gentamicin	0	0	0	0	3,70	11,11	85,19	0	0	0
Imipenem	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
Levofloxacin	0	0	0	0	3,70	96,30	0	0	0	0
Meropenem	0	0	0	0	3,70	7,41	88,89	0	0	0
Minocycline	0	0	51,85	0	3,70	22,22	22,22	0	0	0
Netilmicin	0	0	0	0	14,81	11,11	11,11	62,96	0	0
Piperacillin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
Piperacillin/Tazobactam	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
Tetracycline	0	0	0	0	11,11	22,22	66,67	0	0	0
Ticarcillin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
Ticarcillin/CA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
Tigecycline	0	0	0	14,81	44,44	40,74	0	0	0	0
Tobramycin	0	0	29,63	7,41	0	11,11	48,15	3,70	0	0
P. aeruginosa										
Amikacin	0	0	0	2,82	1,41	4,23	1,41	1,41	88,73	0
Aztreonam	0	0	0	7,04	0	11,27	47,89	18,31	15,49	0
Ceftazidime	0	0	0	1,41	0	0	7,04	32,39	59,15	0
Ciprofloxacin	4,23	0	1,41	2,82	91,55	0	0	0	0	0
Colistin	0	2,82	1,41	90,14	1,41	1,41	2,82	0	0	0
Gentamicin	0	0	0	0	2,82	19,72	74,65	0	0	0
Imipenem	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
Meropenem	0	0	0	0	0	8,45	91,55	0	0	0
Piperacillin	0	0	0	0	1,41	0	1,41	1,41	2,82	92,96
Piperacillin/ tazobactam	0	0	0	0	1,.41	0	1,41	5,63	4,23	87,32
Ticarcillin	0	0	0	0	1,41	0	1,41	1,41	2,82	92,96
Ticarcillin/CA	0	0	0	0	1,41	0	1,41	5,63	4,23	87,32
Tobramycin	0	0	4,23	0	0	1,41	94,37	0	0	0

Τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *A. baumannii* απομονώθηκαν από διάφορες κλινικές αλλά και ποικίλα κλινικά δείγματα. Οι κλινικές στις οποίες απομονώθηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό τα εν λόγω στελέχη ήταν η Μονάδα Εντατικής Θεραπείας, η Παθολογική και η Πνευμονολογική κλινική με ποσοστά 43,31%, 14,17% και 13,39%, αντίστοιχα (Εικόνα 3.9). Τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *A. baumannii* απομονώθηκαν κυρίως από βρογχικές εκκρίσεις, πτύελα, αίμα και καθετήρες ασθενών σε ποσοστό 22,05%, 20,47%, 19,69% και 10,24% αντίστοιχα (Εικόνα 3.8).



Εικόνα 3.8. Αριθμός απομονωθέντων στελεχών *A. baumannii* (πάνω) και *P. aeruginosa* (κάτω) ανά κλινικό δείγμα.

Ομοίως, τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *P. aeruginosa* απομονώθηκαν από μια πλειάδα κλινικών και κλινικών δειγμάτων. Επικρατούσες κλινικές στην απομόνωση των εν λόγω στελεχών αποτέλεσαν η Παθολογική κλινική, η Μονάδα Εντατικής Θεραπείας καθώς και η Γαστρεντερολογική και η Πνευμονολογική κλινική με ποσοστά που ανέρχονταν στο 33,75%, 25%, 8,75% και 7,50% αντίστοιχα (Εικόνα 3.9). Τα ούρα, οι βρογχικές εκκρίσεις, το αίμα και τα πτύελα αποτέλεσαν τα συνηθέστερα κλινικά δείγματα απομόνωσης ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *P. aeruginosa* με ποσοστά 23,75%, 17,50%, 15% και 15%, αντίστοιχα (Εικόνα 3.8).

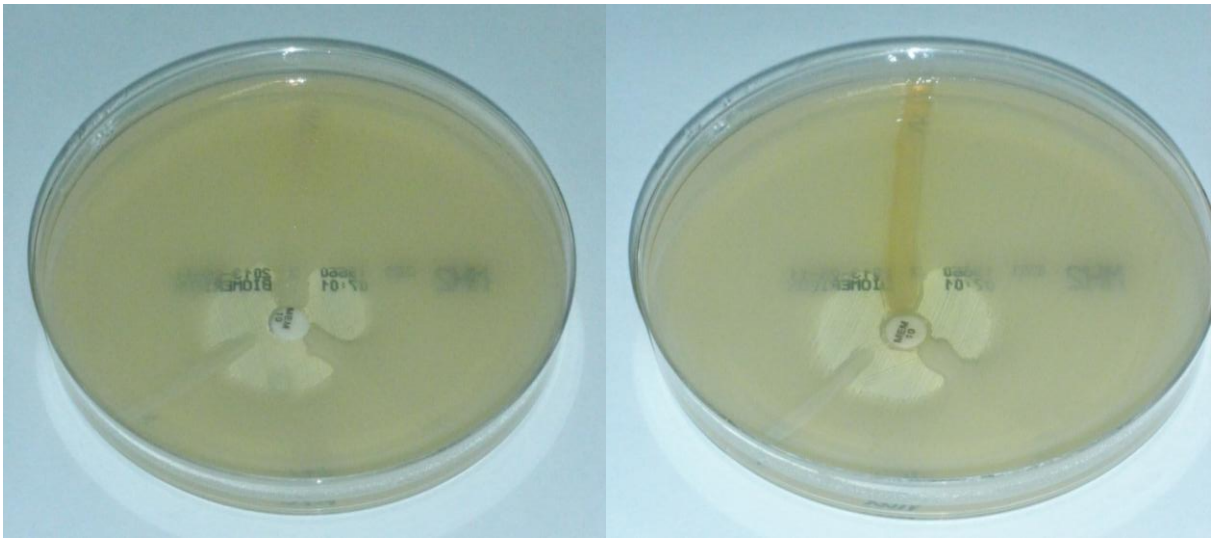


Εικόνα 3.9. Αριθμός απομονωθέντων στελεχών *A. baumannii* (πάνω) και *P. aeruginosa* (κάτω) ανά κλινική.

3.5 Φαινοτυπική Διερεύνηση Ανθεκτικότητας έναντι Καρβαπενέμων

3.5.1 Παρουσία καρβαπενεμασών στα Μικροβιακά Στελέχη

Με σκοπό να διερευνηθεί η παραγωγή καρβαπενεμασών στα 207 απομονωθέντα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες Gram αρνητικά αζυμωτικά βακτήρια (127 *A. baumannii* και 80 *P. aeruginosa*) τα εν λόγω στελέχη υποβλήθηκαν στη τροποποιημένη δοκιμασία κατά Hodge. Εφόσον παρουσία των 207 υπό μελέτη στελεχών παρατηρήθηκε παραμόρφωση της ζώνης αναστολής του ευαίσθητου στελέχους *E. coli* ATCC 25922, δηλαδή αναστολή της δράσης της μεροπενέμης γύρω από τον αδρό εμβολιασμό των υπό μελέτη στελεχών, η δοκιμασία θεωρήθηκε θετική. Η θετική τροποποιημένη δοκιμασία κατά Hodge είναι δηλωτική της παραγωγής καρβαπενεμασών από όλα τα υπό μελέτη στελέχη (Εικόνα 3.10).



Εικόνα 3.10. Τροποποιημένη δοκιμασία κατά Hodge για στελέχη *A. baumannii* (S, αριστερά) και *P. aeruginosa* (S, δεξιά) παρουσία θετικού (+) και αρνητικού (-) μάρτυρα.

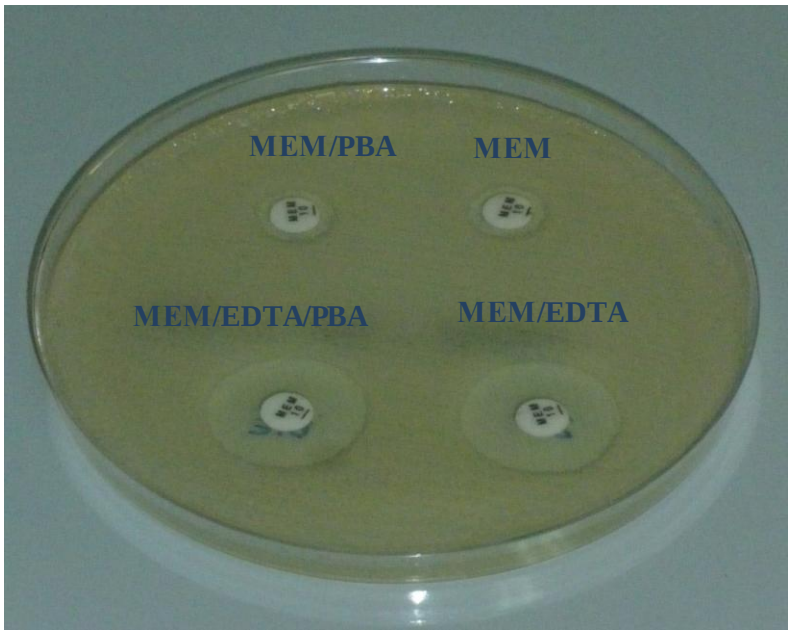
3.5.2 Παρουσία Αντλιών Εκροής στα Μικροβιακά Στελέχη

Για να διερευνηθεί η πιθανή συμβολή αντλιών εκροής στην εμφάνιση του ανθεκτικού στις καρβαπενέμες φαινοτύπου των απομονωθέντων στελεχών χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία αναστολής αντλιών εκροής. Για τα εν λόγω στελέχη ελέγχθηκε η διάμετρος της άλου αναστολής της μεροπενέμης παρουσία και απουσία του αναστολέα βακτηριακών αντλιών εκροής CCCP. Εφόσον δεν παρατηρήθηκε αύξηση της διαμέτρου στην άλο αναστολής της μεροπενέμης

παρουσία του παράγοντα CCCP, η δοκιμασία θεωρήθηκε αρνητική αποκλείοντας τη συμμετοχή αντλιών εκροής στην ανθεκτικότητα έναντι των καρβαπενέμων στα υπό μελέτη στελέχη.

3.5.3 Τύπος καρβαπενεμασών στα Μικροβιακά Στελέχη

Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα υπό μελέτη στελέχη ήταν θετικά για την παραγωγή καρβαπενεμασών βάσει της τροποποιημένης δοκιμασίας κατά Hodge. Ωστόσο, η συγκεκριμένη δοκιμασία είναι ευαίσθητη για την ανίχνευση ενός ενζυμικού μηχανισμού ανθεκτικότητας έναντι των καρβαπενέμων αλλά δεν δίδει πληροφορίες σχετικά με τον τύπο της καρβαπενεμάσης που παράγει το υπό μελέτη στέλεχος. Για να διερευνηθεί, λοιπόν, περαιτέρω η τάξη των καρβαπενεμασών που παρήγαγαν τα απομονωθέντα στελέχη διενεργήθηκε η δοκιμασία αναστολής με το συνδυασμό δίσκων που έχουν διαποτιστεί με φαινυλβορονικό οξύ (PBA) ή/και EDTA, παράγοντες που αναστέλλουν εκλεκτικά τη δράση των καρβαπενεμασών των τάξεων A και B αντίστοιχα (Εικόνα 3.11).



Εικόνα 3.11. Δοκιμασία αναστολής με το συνδυασμό δίσκων για ενδεικτικό στέλεχος που παράγει καρβαπενεμάση των τάξης B.

Μεταξύ των 80 στελεχών *P. aeruginosa* παρατηρήθηκε μεγαλύτερη ή ίση με 5 mm αύξηση στην άλω αναστολής του δίσκου MEM/EDTA σε σχέση με τον δίσκο MEM, γεγονός που υποδείκνυε τη παραγωγή καρβαπενεμάσης τάξης B από τα εν λόγω στελέχη (Πίνακας 3.2). Αντίθετα, μεταξύ των 127 στελεχών *A. baumannii* παρατηρήθηκε απουσία αύξησης μεγαλύτερη

ή ίση με 5 mm στην άλω αναστολής στους δίσκους MEM/EDTA, MEM/PBA και MEM/EDTA/PBA σε σχέση με τον δίσκο MEM, γεγονός που υποδείκνυε τη ενδεχόμενη παραγωγής καρβαπενεμασών τάξης D από τα εν λόγω στελέχη (Πίνακας 3.2).

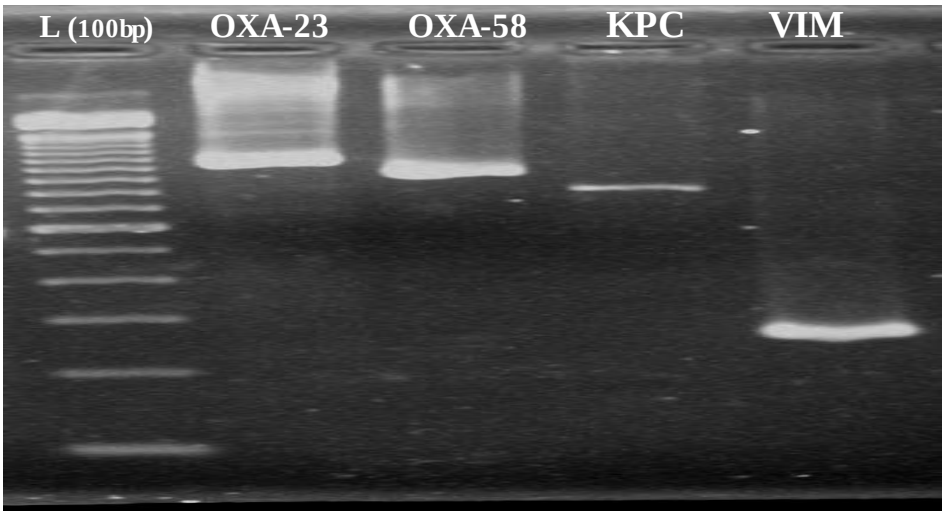
Πίνακας 3.2. Αποτελέσματα φαινοτυπικών δοκιμασιών διερεύνησης ανθεκτικότητας έναντι καρβαπενέμων για τα απομονωθέντα στελέχη.

Ανθεκτικά στις Καρβαπενέμες Στελέχη	Τροποποιημένη Δοκιμασία κατά Hodge	Δοκιμασία Αναστολής Αντλιών Εκροής	Δοκιμασία Αναστολής Συνδυασμού Δίσκων	Αποτέλεσμα
***A. baumannii* (127)**	(+)	(-)	Απουσία Αναστολής	Παραγωγή Καρβαπενεμασών Τάξης D
***P. aeruginosa* (80)**	(+)	(-)	Αναστολής Δίσκου MEM/EDTA	Παραγωγή Καρβαπενεμασών Τάξης B

3.6 Μελέτη Γονιδίων Καρβαπενεμασών

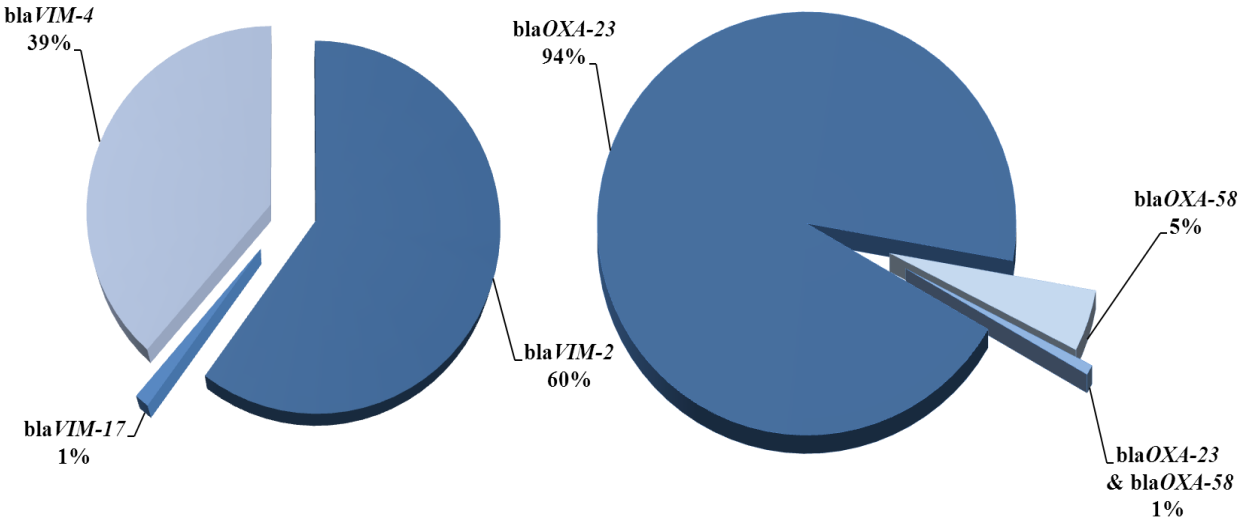
Η εγκυρότητα των φαινοτυπικών δοκιμασιών αλλά και η ανίχνευση των υπεύθυνων για την ανθεκτικότητα γονιδίων καρβαπενεμασών διενεργήθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και την αλληλούχιση των προκυπτόντων προϊόντων (Εικόνα 3.12). Συγκεκριμένα τα υπό μελέτη ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη ελέγχτηκαν για την παρουσία γονιδίων καρβαπενεμασών τάξης A (αλληλόμορφα γονίδια της καρβαπενεμάσης KPC), γονιδίων καρβαπενεμασών τάξης B (αλληλόμορφα γονίδια των καρβαπενεμασών GIM, IMP, NDM, SIM, SPM και VIM) και γονιδίων καρβαπενεμασών τάξης D [γονίδια των καρβαπενεμασών των ομάδων της OXA-23 (OXA-23, OXA-27 και OXA-49), της OXA-24 (OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40 και OXA-72) και των γονιδίων των καρβαπενεμασών OXA-48, OXA-58 και OXA-143].

Μεταξύ των 80 στελεχών *P. aeruginosa* ανιχνεύτηκαν αποκλειστικά αλληλόμορφα γονίδια της καρβαπενεμάσης VIM της τάξης B και συγκεκριμένα σε 48 στελέχη (60%) ανιχνεύτηκε το αλληλόμορφο VIM-2, σε 31 στελέχη (39%) ανιχνεύτηκε το αλληλόμορφο VIM-4 και σε 1 στέλεχος (1%) το αλληλόμορφο VIM-17. Ενώ, μεταξύ των 127 στελεχών *A. baumannii* ανιχνεύτηκαν αποκλειστικά γονίδια καρβαπενεμασών της τάξης D και συγκεκριμένα σε 120 στελέχη (94%) ανιχνεύτηκε το γονίδιο OXA-23, σε 6 στελέχη (5%) ανιχνεύτηκε το γονίδιο OXA-58 και σε 1 στέλεχος (1%) τόσο το γονίδιο OXA-23, όσο και το γονίδιο OXA-58 (Εικόνα 3.13).



Εικόνα 3.12. Ενδεικτική ηλεκτροφόρηση προϊόντων ενίσχυσης των συνηθέστερα απαντούμενων γονιδίων καρβαπενεμασών στην Ελλάδα.

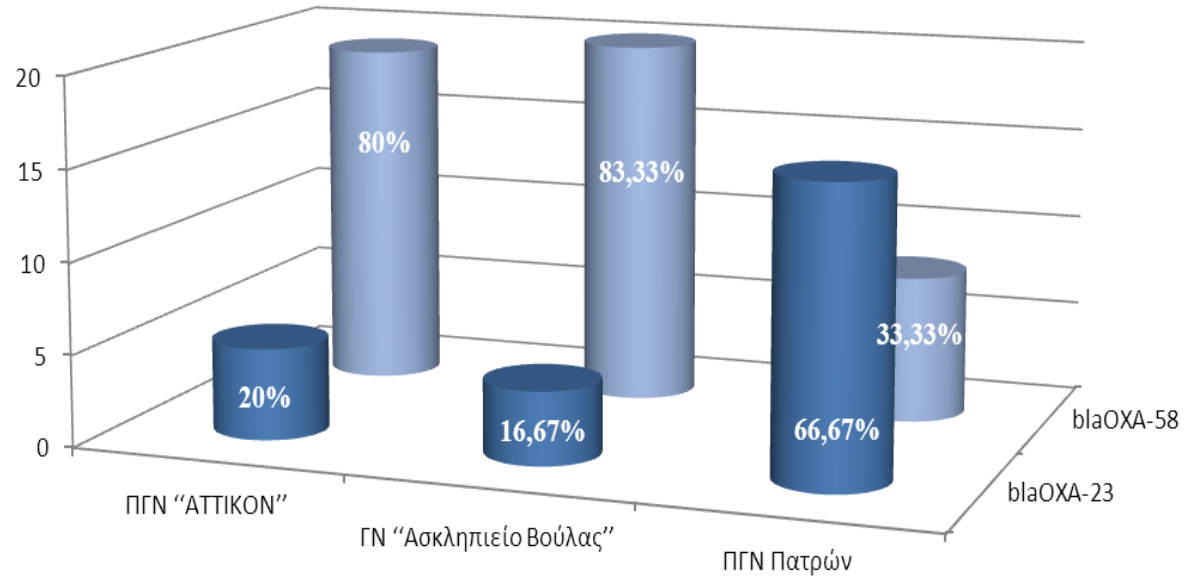
Με σκοπό να διερευνηθεί το φαινόμενο της πρωτοφανούς απομόνωσης στελεχών *A. baumannii* που παράγουν την καρβαπενεμάση OXA-23 στον Ελλαδικό χώρο στη μελέτη συμπεριλήφθησαν 47 ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *A. baumannii* που είχαν απομονωθεί κατά το δεύτερο εξάμηνο του 2010 στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας αλλά και συνολικά 72 ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *A. baumannii* (2 στελέχη ανά μήνα ανά νοσοκομείο) που απομονώθηκαν από τα από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο ‘‘ΑΤΤΙΚΟΝ’’, το Γενικό Νοσοκομείο ‘‘Ασκληπιείο Βούλας’’ και το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών.



Εικόνα 3.13. Ποσοστά ανίχνευσης των καρβαπενεμασών τύπου VIM και OXA σε στελέχη *P. aeruginosa* (αριστερά) και *A. baumannii* (δεξιά) αντίστοιχα.

Στη μελέτη ενταθήκαν 47 ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *A. baumannii* που είχαν απομονωθεί κατά το δεύτερο εξάμηνο του 2010 στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας με σκοπό τον καθορισμό της χρονικής περιόδου όπου στελέχη *A. baumannii* που παράγουν την καρβαπενεμάση OXA-23 πρωτοεμφανίστηκαν στο νοσοκομείο μας. Η αναζήτηση αυτών των στελεχών μεταξύ των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών του δεύτερου εξάμηνου του 2010 κατέδειξε την παρουσία των γονιδίων OXA-58 και OXA-23 σε 42 και 5 στελέχη *A. baumannii*, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, τα δυο πρώτα στελέχη ανθεκτικών στις καρβαπενέμες που παράγουν την καρβαπενεμάση OXA-23 απομονώθηκαν τον Οκτώβριο του 2010 από δυο ασθενείς νοσηλευόμενους στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) του νοσοκομείου μας.

Η ένταξη των 72 ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *A. baumannii* από 3 νοσοκομεία διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών διενεργήθηκε για να διερευνηθεί η διασπορά ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών που παράγουν την καρβαπενεμάση OXA-23 εν γένει στον Ελλαδικό χώρο. Συγκεκριμένα, για το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο ‘‘ΑΤΤΙΚΟΝ’’ πρόεκυψε ότι τα 19 (80%) στελέχη έφεραν το γονίδιο OXA-58 ενώ τα 5 (20%) το γονίδιο OXA-23. Τέλος, για το Γενικό Νοσοκομείο ‘‘Ασκληπιείο Βούλας’’ πρόεκυψε ότι τα 20 (83,33%) στελέχη έφεραν το γονίδιο OXA-58 και τα 4 (16,67%) το γονίδιο OXA-23, ενώ για το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών πρόεκυψε ότι τα 8 (33,33%) στελέχη έφεραν το γονίδιο OXA-58 και τα 16 (66,67%) το γονίδιο OXA-23 (Εικόνα 3.14).

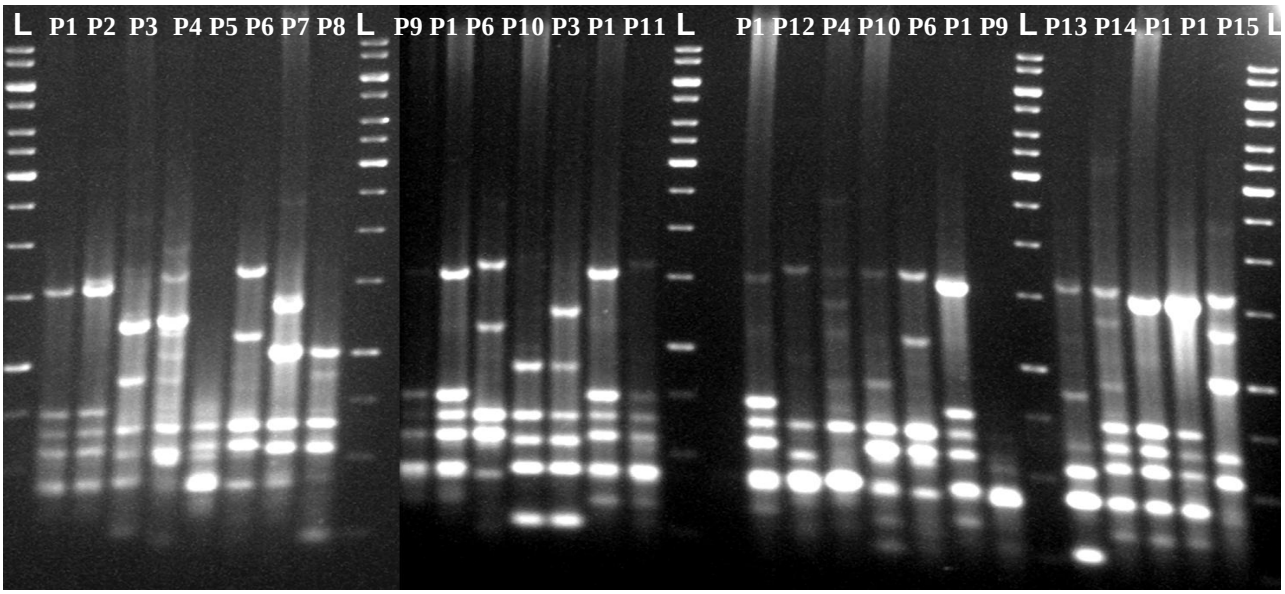


Εικόνα 3.14. Ποσοστά απομόνωσης στελεχών *A. baumannii* που παράγουν τη καρβαπενεμάση OXA-23 και OXA-58 από τα συμμετέχοντα στη μελέτη νοσοκομεία.

3.7 Μοριακή Τυποποίηση Στελεχών

Η αρχική τυποποίηση των 80 απομονωθέντων ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *P. aeruginosa* που φέρουν αλληλόμορφα γονίδια της καρβαπενεμάσης VIM διενεργήθηκε με τη μέθοδο BOX-PCR (Εικόνα 3.15). Τα εν λόγω στελέχη βάσει της μεθόδου αυτής ταξινομήθηκαν σε 20 διαφορετικά ηλεκτροφορητικά προφίλ (P1 έως P20), τα δυο εκ των οποίων περιελάμβαναν 21 (26%) και 16 (20%) στελέχη, αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα 18 ηλεκτροφορητικά προφίλ περιελάμβαναν από 1 έως και 5 ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη.

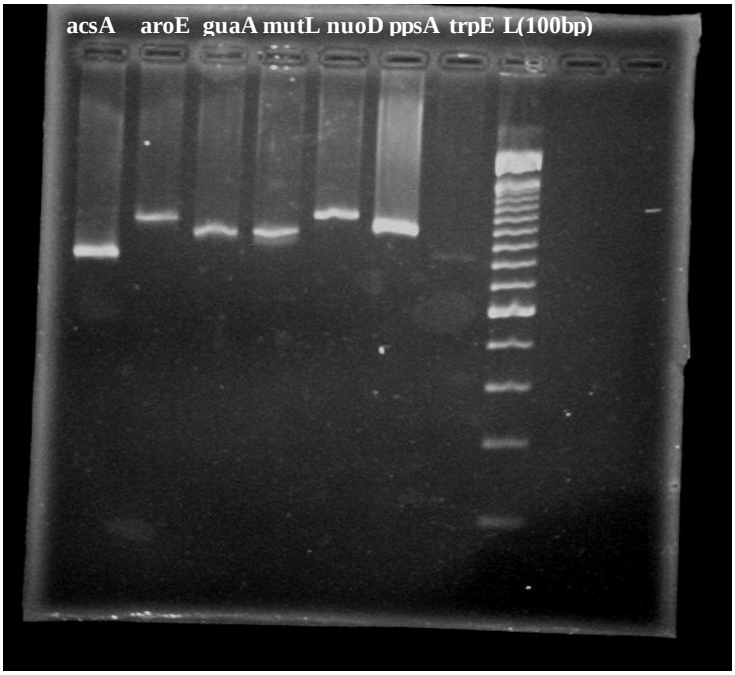
Εν συνεχεία, η τυποποίηση των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *P. aeruginosa* ολοκληρώθηκε με τη διενέργεια της μεθόδου MLST σε όλα τα στελέχη που περιλαμβάνονταν στα 2 κυριότερα ηλεκτροφορητικά προφίλ (P1 και P2) καθώς και σε ένα αντιπροσωπευτικό στέλεχος από έκαστο από τα υπόλοιπα ηλεκτροφορητικά προφίλ (Εικόνα 3.16). Τα απομονωθέντα, λοιπόν, στελέχη *P. aeruginosa* άνηκαν σε 8 διαφορετικούς STs τύπους και συγκεκριμένα στους ST-111, ST-235, ST-244, ST-253, ST-277, ST-395, ST-773 και ST-1457.



Εικόνα 3.15. Ηλεκτροφορητικά προφίλ στελεχών *P. aeruginosa*.

Τα στελέχη που έφεραν το αλληλόμορφο VIM-2 συσχετίστηκαν με τα ηλεκτροφορητικά προφίλ P1 (21 στελέχη), P5 (3 στελέχη), P9 (5 στελέχη), P11 (2 στελέχη), P14 (1 στέλεχος) και P16 (5 στελέχη) που περιελάμβαναν τον ST-111, τα P7 (2 στελέχη) και P15 (1 στέλεχος) που περιελάμβαναν τον ST-244, το P4 (1 στέλεχος) που περιελάμβανε τον ST-253, το P6 (3 στελέχη)

που περιελάμβανε τον ST-277, το P8 (2 στελέχη) που περιελάμβανε τον ST-773, το P12 (2 στελέχη) που περιελάμβανε τον ST-395 και το P13 (1 στέλεχος) που περιελάμβανε τον ST-235.

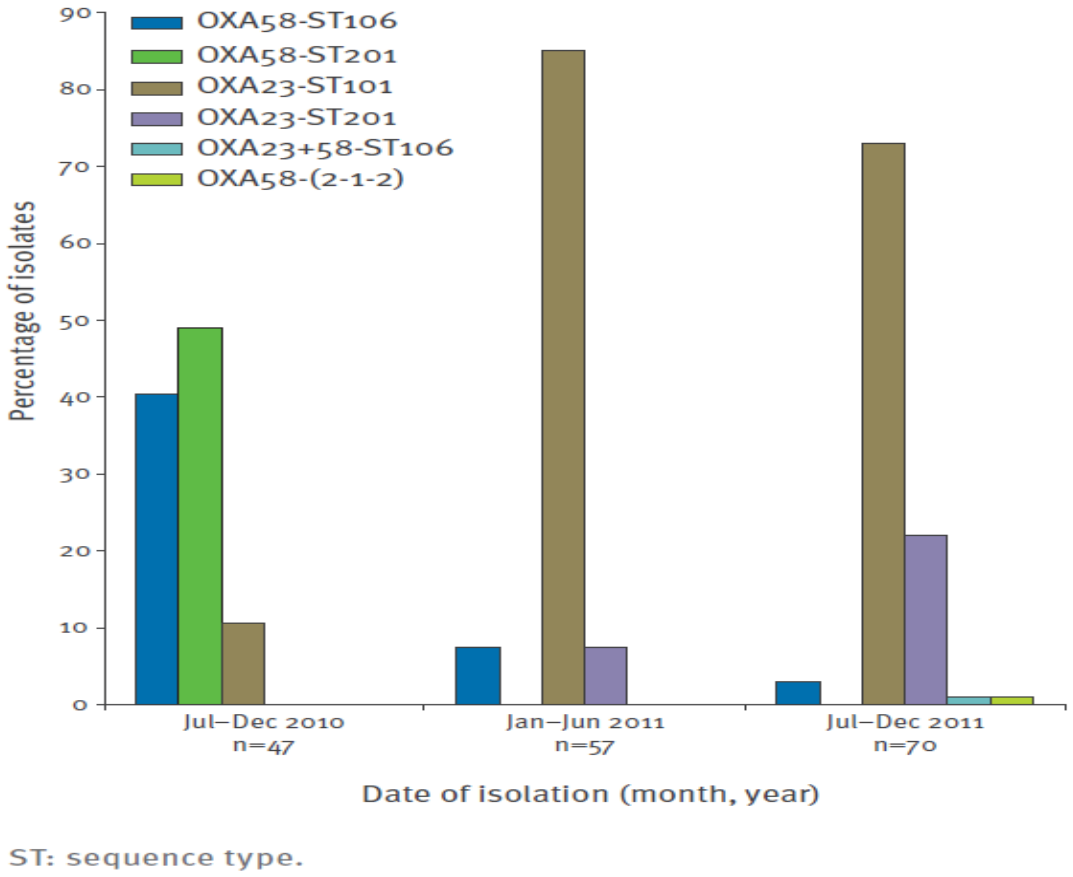


Εικόνα 3.16. Ενδεικτική ηλεκτροφόρηση προϊόντων ενίσχυσης MLST στελεχών *P. aeruginosa*.

Τα στελέχη που έφεραν το αλληλόμορφο VIM-4 συσχετίστηκαν με τα ηλεκτροφορητικά προφίλ P2 (16 στελέχη), P17 (3 στελέχη), P18 (3 στελέχη), P19 (3 στελέχη), P20 (4 στελέχη) και P10 (2 στελέχη) που περιελάμβαναν τον ST-235, ενώ τέλος το στέλεχος που έφερε το αλληλόμορφο VIM-17 συσχετίστηκε με το ηλεκτροφορητικό προφίλ P3 που περιελάμβανε τον ST-235.

Η αρχική τυποποίηση του συνόλου των απομονωθέντων ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *A. baumannii* που έφεραν γονίδια καρβαπενεμασών τύπου OXA διενεργήθηκε με τη μέθοδο 3LST (ST-X^{3LST}). Για το δεύτερο εξάμηνο του έτους 2010 προέκυψε ότι τα 5 στελέχη που παρήγαγαν τη καρβαπενεμάση OXA-23 άνηκαν στον ST-101^{3LST} (10,63%) ενώ από τα 42 εναπομείναντα στελέχη που παρήγαγαν τη καρβαπενεμάση OXA-58, τα 19 άνηκαν στον ST-106^{3LST} (40,43%) και τα 23 στον ST-201^{3LST} (48,94%). Κατά το 2011, απομονώθηκαν 95 στελέχη που παρήγαγαν τη καρβαπενεμάση OXA-23 και άνηκαν στον ST-101^{3LST} (74,80%), 24 στελέχη που παρήγαγαν τη καρβαπενεμάση OXA-23 και άνηκαν στον ST-201^{3LST} (18,90%), 6 στελέχη που παρήγαγαν τη καρβαπενεμάση OXA-58 και άνηκαν στον ST-106^{3LST} (4,70%), 1 στέλεχος που παρήγαγε τη καρβαπενεμάση OXA-58 και άνηκε σε μη χαρακτηριζόμενο ST

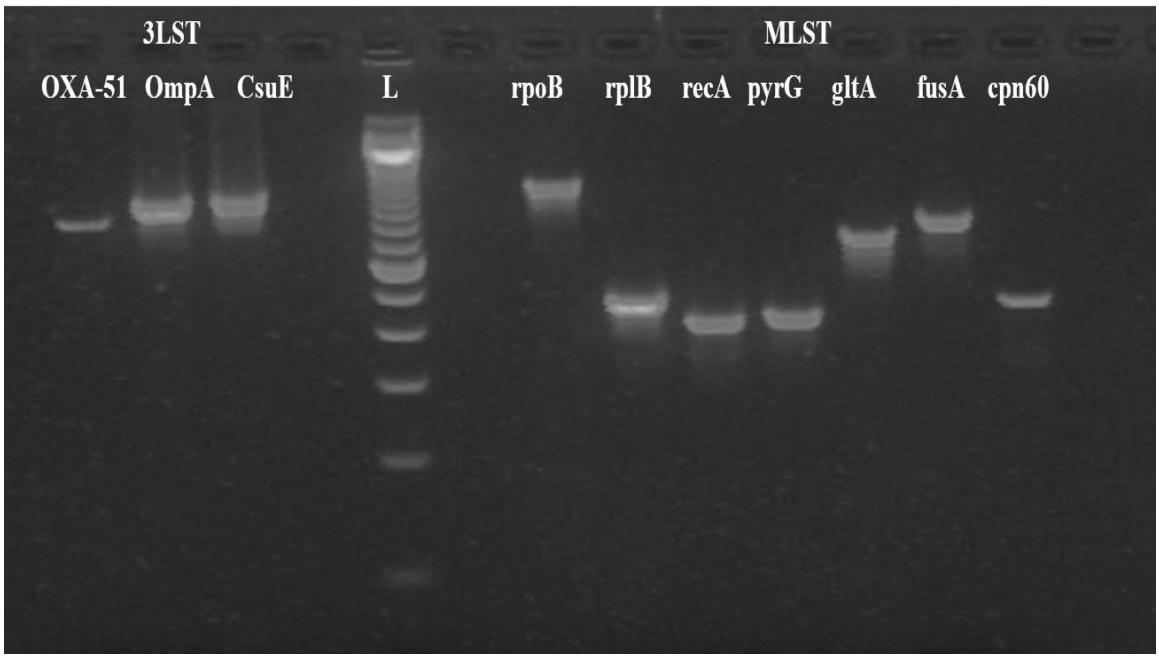
σύμφωνα με το εν λόγω σχήμα τυποποίηση με αλληλικό προφίλ 2-1-2 (NT, 0,80%) και 1 στέλεχος που παρήγαγε τις καρβαπενεμάσες OXA-23 και OXA-58 και άνηκε στον ST-106^{3LST} (0,80%) (Εικόνα 3.17). Τέλος, η τυποποίηση των στελεχών που απομονώθηκαν από τα διαφορετικής γεωγραφικής εντόπισης νοσοκομεία κατέδειξε την επικράτηση των ίδιων STs και σε αυτά τα νοσοκομεία.



Εικόνα 3.17. Συχνότητες απομόνωσης ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *A. baumannii* στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας κατά τη περίοδο Ιούλιος 2010 έως Δεκέμβριος 2011 (Liakopoulos *et al*, 2012).

Η τυποποίηση των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *A. baumannii* ολοκληρώθηκε με τη διενέργεια της μεθόδου MLST στο 50% των στελεχών που περιλαμβάνονται στους 3 κυριότερους STs (ST-101^{3LST}, ST-106^{3LST} και ST-201^{3LST}) καθώς και το στέλεχος που άνηκε στο μη χαρακτηριζόμενο ST (NT) σύμφωνα με το σχήμα τυποποίηση 3LST (Εικόνα 3.18). Τα απομονωθέντα, λοιπόν, στελέχη *A. baumannii* άνηκαν σε 2 διαφορετικούς STs τύπους και

συγκεκριμένα στους ST-1^{MLST} και ST-2^{MLST}, οι οποίοι συσχετίστηκαν με τους ST-201^{3LST}, NT (2-1-2) και ST-101^{3LST}, ST-106^{3LST} αντίστοιχα.



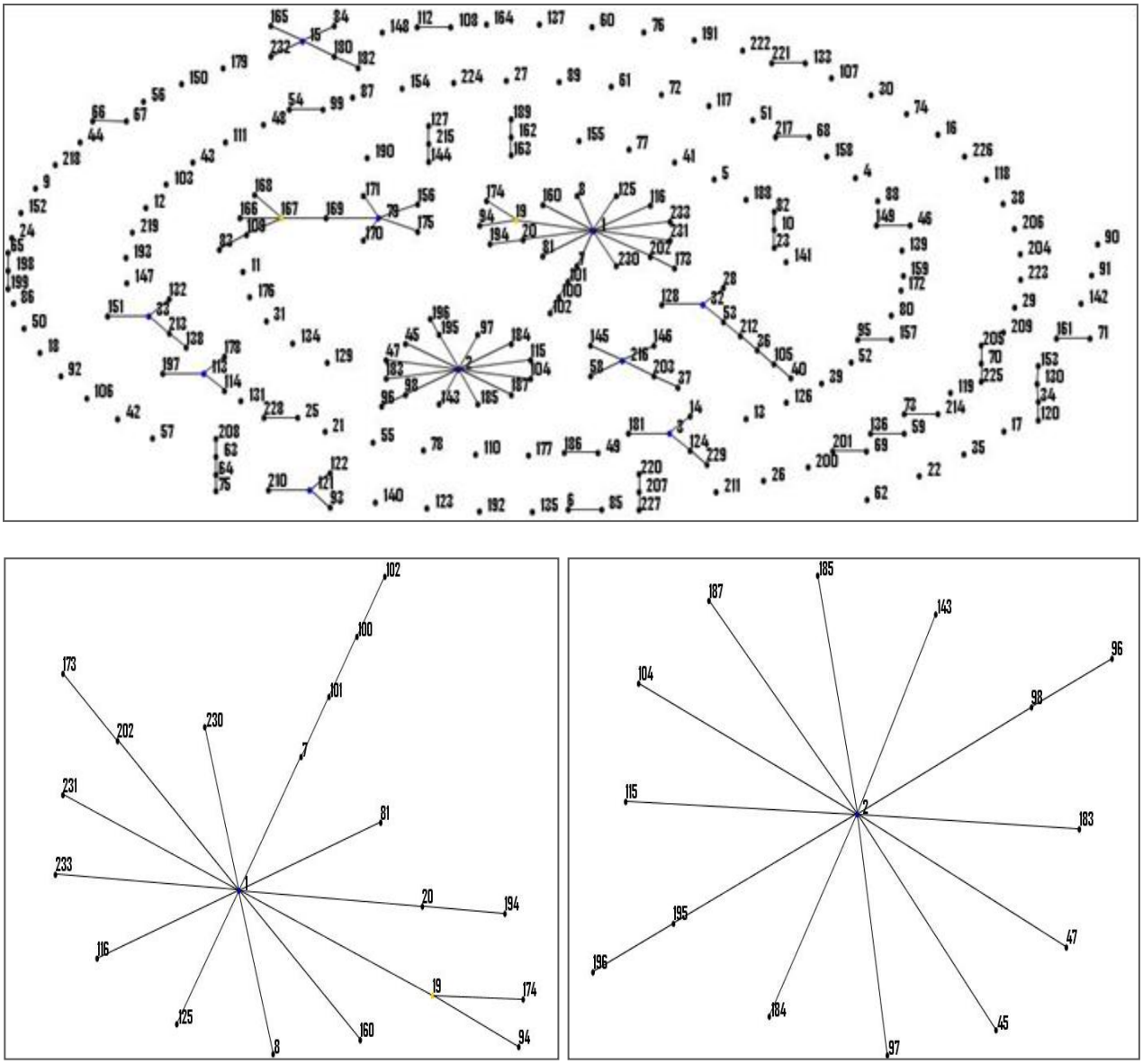
Εικόνα 3.18. Ενδεικτική ηλεκτροφόρηση προϊόντων ενίσχυσης 3LST (αριστερά) και MLST (δεξιά) στελεχών *A. baumannii*.

3. 8 Κλωνική και Φυλογενετική Συγγένεια Στελεχών

3.8.1 Απεικόνιση Κλωνικών Συμπλεγμάτων Στελεχών κατά eBURST

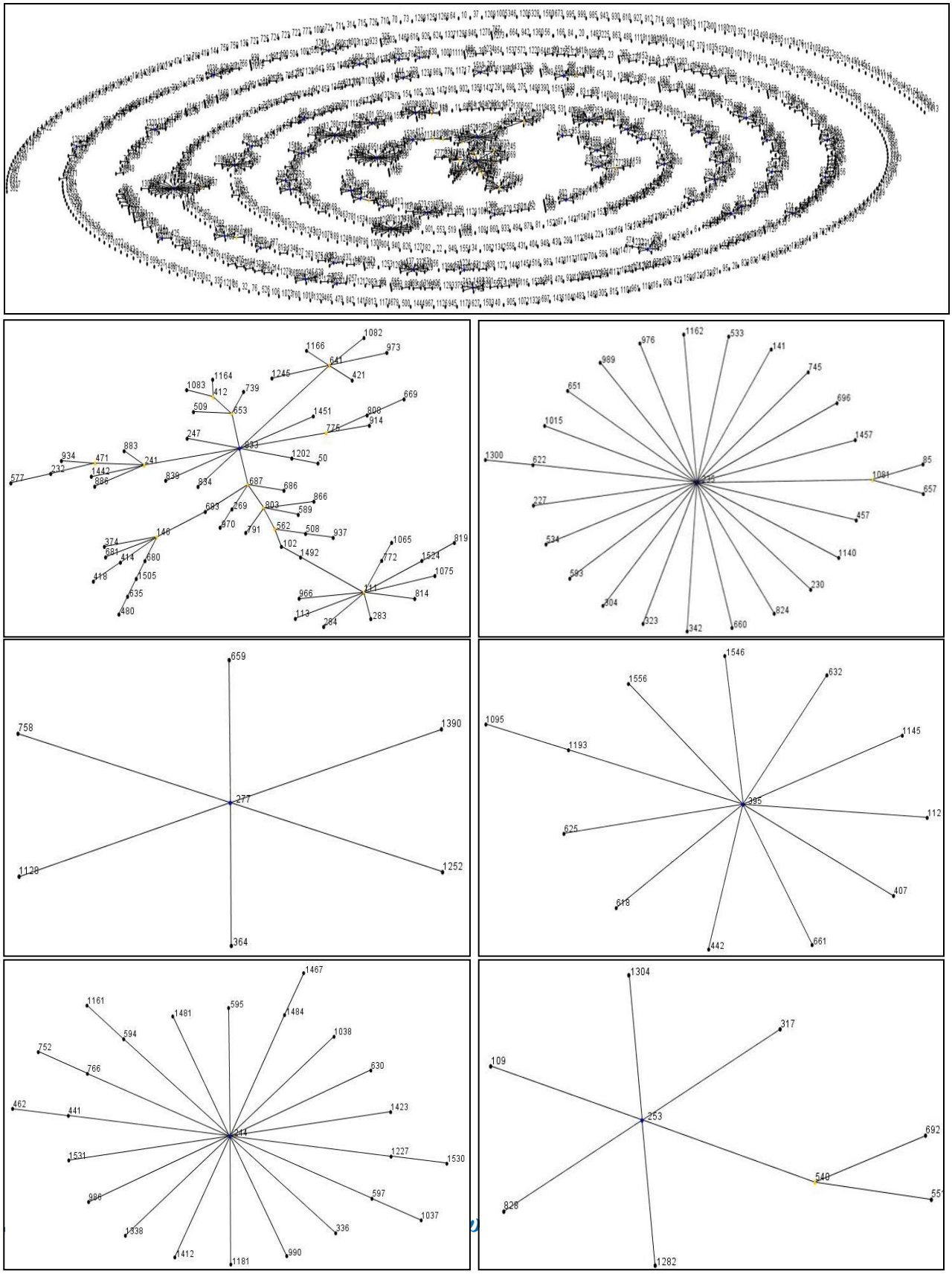
Η μελέτη της κλωνικής συγγένειας των υπό μελέτη στελεχών τόσο του είδους *P. aeruginosa* όσο και του είδους *A. baumannii*, διενεργήθηκε με τον αλγόριθμο eBURST με τις προεπιλεγμένες ρυθμίσεις για τον καθορισμό των κλωνικών συμπλεγμάτων (Clonal Complex).

Από την ανάλυση μέσω του εν λόγω αλγορίθμου για τον πληθυσμό των στελεχών του είδους *A. baumannii* πρόεκυψε ότι αυτός απαρτίζεται από 32 κλωνικά συμπλέγματα και 95 μονήρεις STs που δεν ανήκουν σε κανένα από αυτά τα κλωνικά συμπλέγματα (Εικόνα 3.19). Τα κυριότερα και πολυμελέστερα κλωνικά συμπλέγματα είναι τα CC1 και CC2 με ιδρυτικούς γονότυπους τους ST-1 και ST-2, αντίστοιχα. Συνεπώς, τα υπό μελέτη στελέχη *A. baumannii* δεν ανήκουν στο ίδιο κλωνικό σύμπλεγμα.



Εικόνα 3.19. Απεικόνιση διαγραμμάτων eBURST για το συνολικό πληθυσμό των στελεχών του είδους *A. baumannii* και των κλωνικών συμπλεγμάτων των στελεχών της παρούσας μελέτης.

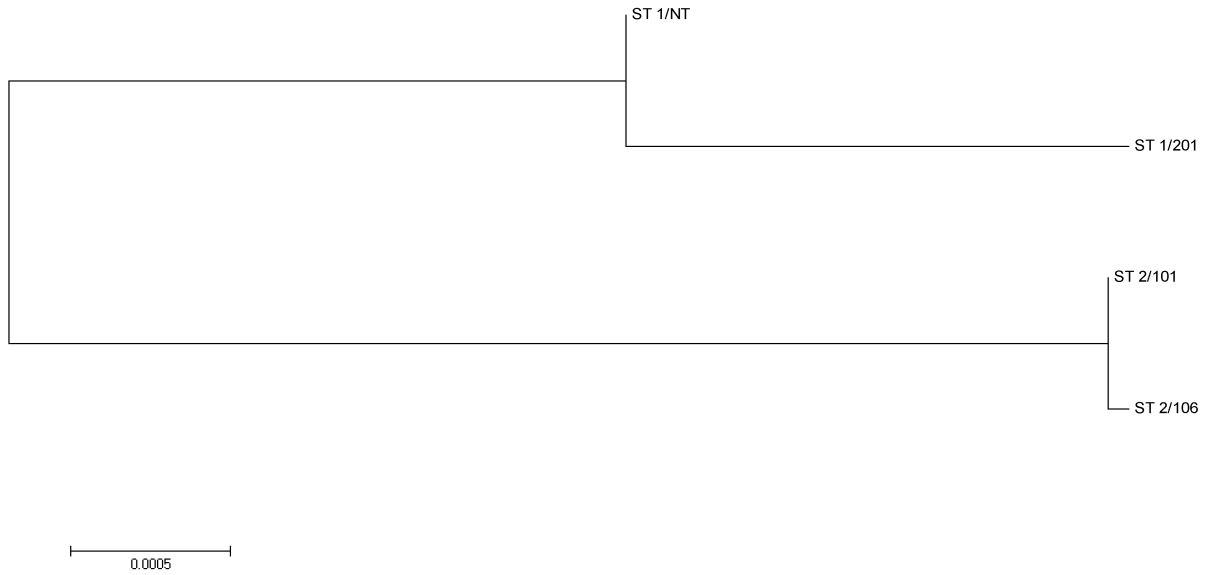
Από την ανάλυση μέσω του αλγορίθμου eBURST για τον πληθυσμό των στελεχών του είδους *P. aeruginosa* πρόεκυψε ότι αυτός απαρτίζεται από 246 κλωνικά συμπλέγματα και 617 μονήρεις STs που δεν ανήκουν σε κανένα από αυτά τα κλωνικά συμπλέγματα (Εικόνα 3.20). Τα υπό μελέτη στελέχη ανήκουν σε 6 κλωνικά συμπλέγματα και 1 μονήρες ST. Συγκεκριμένα, ο ST-111, ο ST-244, ο ST-253, ο ST-277 και ο ST-395 αποτελούν τους ιδρυτικούς γονοτύπους των κλωνικών συμπλεγμάτων CC111, CC244, CC253, CC277 και CC395, αντίστοιχα. Οι ST-235 και ST-1457 ανήκουν στο κλωνικό σύμπλεγμα CC235 με ιδρυτικό γονότυπο τον ίδιο το ST-235, ενώ ο ST-773 είναι μονήρης και δεν ανήκει σε κανένα κλωνικό σύμπλεγμα.



Εικόνα 3.20. Απεικόνιση διαγραμμάτων eBURST για το συνολικό πληθυσμό των στελεχών του είδους *P. aeruginosa* και των κλωνικών συμπλεγμάτων των στελεχών της παρούσας μελέτης.

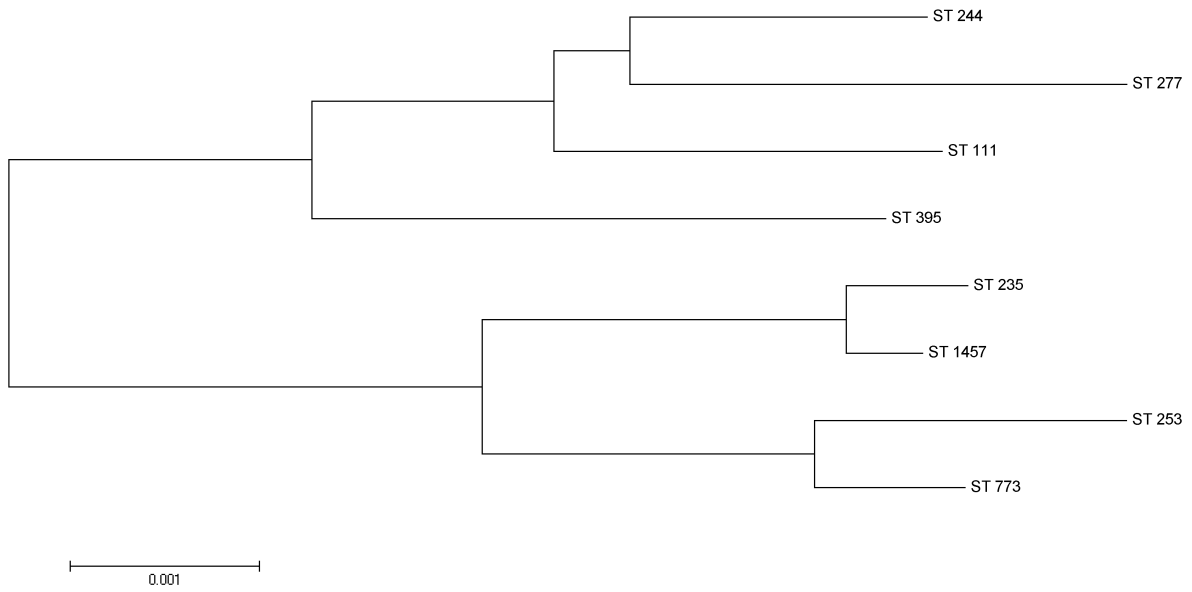
Η μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων των υπό μελέτη στελεχών τόσο του είδους *P. aeruginosa* όσο και του είδους *A. baumannii,* διενεργήθηκε με τη μέθοδο της σύνδεσης γειτόνων (Neighbor Joining.)

Από την ανάλυση με την εν λόγω μέθοδο για τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη του είδους *A. baumannii* μετά την συνένωση των αλληλουχιών των επτά γονιδίων που πρόεκυψαν από την MLST με τις αλληλουχίες των τριών γονιδίων που πρόεκυψαν από την 3LST διατηρώντας το +1 πλαίσιο ανάγνωσης, πρόεκυψε ότι αυτά άνηκαν σε δυο διακριτούς κλάδους. Τον ένα κλάδο απαρτίζουν τα στελέχη που άνηκαν στον ST-1 βάσει του MLST, ενώ το δεύτερο κλάδο τα στελέχη εκείνα που άνηκαν στον ST-2 (Εικόνα 3.21).



Εικόνα 3.21. Φυλογενετικό δένδρο Neighbor Joining για τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη του είδους *A. baumannii*.

Από την ανάλυση με την εν λόγω μέθοδο για τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη του είδους *P. aeruginosa* μετά την συνένωση των αλληλουχιών των επτά γονιδίων που πρόεκυψαν από την MLST διατηρώντας το +1 πλαίσιο ανάγνωσης, πρόεκυψε ότι αυτά άνηκαν σε δυο κύριους κλάδους. Τον ένα κλάδο απαρτίζουν τα στελέχη που άνηκαν στους ST-244, ST-277, ST-111 και ST-395, ενώ το δεύτερο κλάδο τα στελέχη εκείνα που άνηκαν στους ST-235, ST-1457, ST-253 και ST-773 (Εικόνα 3.22).



Εικόνα 3.22. Φυλογενετικό δένδρο Neighbor Joining για τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη του είδους *P. aeruginosa*.

3.9 Μελέτη της Συνταινικότητα Γονιδίων των Καρβαπενεμασών

Από τη διερεύνηση της διάταξης των γονιδίων των καρβαπενεμασών επί του γονιδιωματος (Συνταίνια) στα στελέχη των αζυμωτικών Gram αρνητικών βακτηριών της παρούσας μελέτης πρόεκυψε ότι στο σύνολο τους τα εν λόγω γονίδια εδράζονταν επί συντηρημένων γενετικών στοιχείων όπως τα ιντεγκρόνια τάξης I και τα τρανσποζόνια.

Συγκεκριμένα, στα 151 ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *A. baumannii* που έφεραν το γονίδιο της καρβαπενεμάσης OXA-23 και άνηκαν στους ST-1^{MLST}/ST-201^{3LST}, ST-2^{MLST}/ST-101^{3LST} και ST-2^{MLST}/ST-106^{3LST} διαπιστώθηκε ότι αυτό εδράζονταν επί ενός τρανσποζονίου και συγκεκριμένα του Tn2006 (GQ861439.1), που έφερε εκατέρων του με αντίθετη φόρα την σύνθετη αλληλουχία εισδοχής ISAba1. Στο συγκεκριμένο τρανσποζόνιο εκτός από το γονίδιο OXA-23 εδράζονταν δύο άλλα γονίδια, εκ των οποίων το ένα κωδικοποιεί τμήμα μιας πιθανολογούμενης ATPάσης (83% ταυτότητα αμινοξέων με εκείνη του *Acinetobacter baylyi* ADP-1 [YP_046025], αλλά με μια έλλειψη των 70 πρώτων αμινοτελικών αμινοξέων) και το άλλο τμήμα μιας πιθανολογούμενης DEAD ελικάσης (69% ταυτότητα με εκείνη της *Ralstonia solanacearum* [ZP_00943964], αλλά με έλλειψη του αμινοξέος στη θέση 493του καρβοξυτελικού άκρου της). Όσον αφορά στα 96 ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *A.*

baumannii που έφεραν το γονίδιο της καρβαπενεμάσης OXA-58 και άνηκαν στους ST- ST-1^{MLST}/ST-201^{3LST}, 1^{MLST}/NT^{3LST} και ST-2^{MLST}/ST-106^{3LST}, διαπιστώθηκε ότι το εν λόγω γονίδιο περιβάλλονταν από δυο αντίγραφα αντίθετης φοράς της σύνθετης αλληλουχίας εισδοχής ISAba3 (GU911349.1).

Πίνακας 3.3. Αποτελέσματα χαρτογράφησης του γενετικού περιβάλλοντος των στελεχών *A. baumannii*.

Νοσοκομείο Απομόνωσης	Γονίδιο Καρβαπενεμάσης	Τυποποίηση	Γενετικό Περιβάλλον
ΠΓΝ "ΑΤΤΙΚΟΝ"	OXA-23	ST-1^{MLST}/ST-201^{3LST} ST-2^{MLST}/ST-101^{3LST} ST-2^{MLST}/ST-106^{3LST}	Tn2006 (GQ861439.1)
ΓΝ "Ασκληπιείο Βούλας"			
ΠΓΝ Λάρισας			
ΠΓΝ Πατρών			
ΠΓΝ "ΑΤΤΙΚΟΝ"	OXA-58	ST-1^{MLST}/ST-201^{3LST} ST-1^{MLST}/NT^{3LST} ST-2^{MLST}/ST-106^{3LST}	Αντίρροπες αλληλουχίες εισδοχής ISAba3 (GU911349.1)
ΓΝ "Ασκληπιείο Βούλας"			
ΠΓΝ Λάρισας			
ΠΓΝ Πατρών			

Στα 80 ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *P. aeruginosa* τα αλληλόμορφα της μεταλλο-β-λακταμάσης (VIM-2, VIM-4 και VIM-17) που έφεραν αποτελούσαν μέρος 5 διαφορετικών γονιδιακών κασετών και εδράζονταν επί ιντεγκρονίων τάξης I. Αναλυτικότερα, τα στελέχη που άνηκαν στους ST-111/P1, ST-111/P5, ST-111/P9, ST-111/P11, ST-111/P14, ST-111/P16, ST-244/P7, ST-244/P15, ST-253/P4, ST-277/P6 και ST-773/P8 έφεραν ως τμήμα της γονιδιακής κασέτας το αλληλόμορφο VIM-2 πλαισιωμένο με δυο ομόρροπα αντίγραφα του γονιδίου aacA29 που κωδικοποιεί μια ακετυλοτρανσφεράση παρέχοντας ανθεκτικότητα έναντι των αμινογλυκοσιδών (EU118149.1). Τα στελέχη που άνηκαν στον ST-235/P13 έφεραν ως τμήμα μιας νέας γονιδιακής κασέτας το αλληλόμορφο VIM-2 και καθοδικά αυτού τα γονίδια aacA7 και dfrB που κωδικοποιούν μια ακετυλοτρανσφεράση και μια ρεδουκτάση παρέχοντας ανθεκτικότητα έναντι των αμινογλυκοσιδών και της τριμεθοπρίμης, αντίστοιχα (KC527015.1). Επίσης, τα στελέχη που άνηκαν στον ST-395/P12 έφεραν ως τμήμα μιας νέας γονιδιακής κασέτας το γονίδιο OXA-10 που κωδικοποιεί μια οξακιλλινάση, ακολουθούμενο από το γονίδιο aacA4 που κωδικοποιεί μια ακετυλοτρανσφεράση παρέχοντας ανθεκτικότητα έναντι των

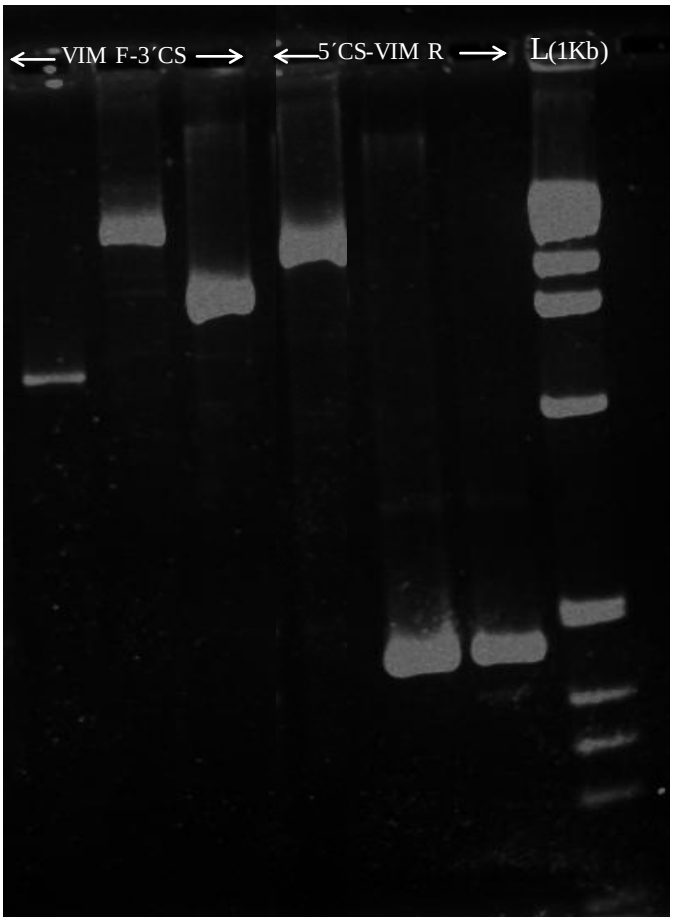
αμινογλυκοσιδών, το αλληλόμορφο VIM-2 και τέλος το γονίδιο smr-2 που κωδικοποιεί μια μικρή διαμεμβρανική πρωτεΐνη παρέχοντας ανθεκτικότητα έναντι διαφόρων αντισηπτικών και κυρίως τον τετρασθενών ιόντων αμμωνίου (KC527014.1).

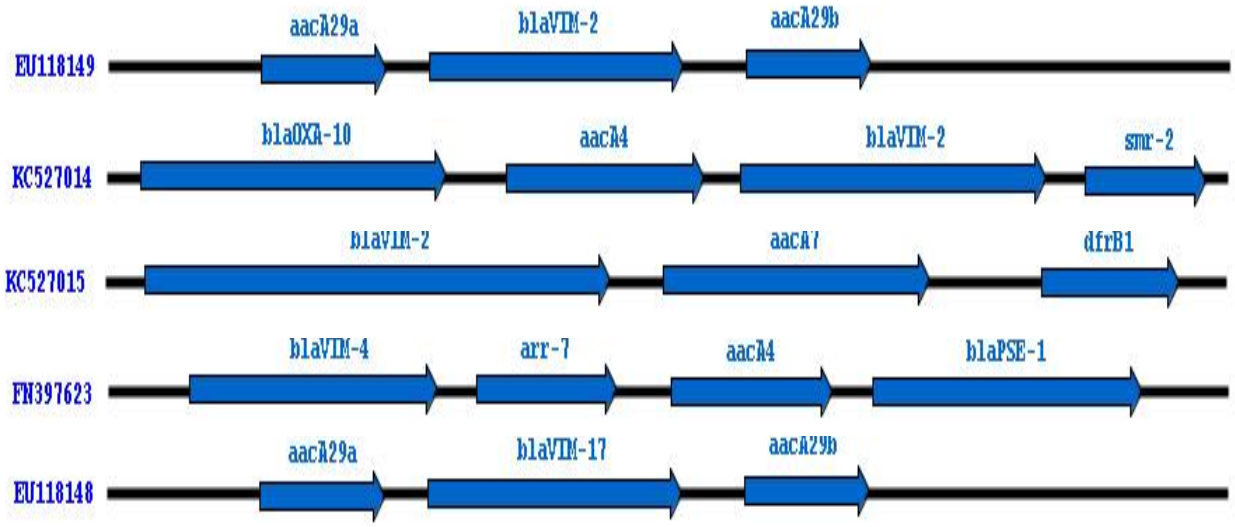
Πίνακας 3.4. Αποτελέσματα χαρτογράφησης του γενετικού περιβάλλοντος των στελεχών *P. aeruginosa*.

Νοσοκομείο Απομόνωσης	Τυποποίηση	Γενετικό Περιβάλλον	Γονίδιο Καρβαπενεμάσης
ΠΓΝ Λάρισας	ST-111/P1 ST-111/P5 ST-111/P9 ST-111/P11 ST-111/P14 ST-111/P16 ST-244/P7 ST-244/P15 ST-253/P4 ST-277/P6 ST-773/P8	*aacA29a*|*bla*$_{\text{VIM-2}}$ |*aacA29b* (EU118149.1)	VIM-2
	ST-395/P12	*bla*$_{\text{OXA-10}}$|*aacA4*|*bla*$_{\text{VIM-2}}$|*smr-2* (KC527014.1)	
	ST-235/P13	*bla*$_{\text{VIM-2}}$| *aacA7*|*dfrB* (KC527015.1)	
	ST-1457/P3	*aacA29a*|*bla*$_{\text{VIM-17}}$|*aacA29b* (EU118148.1)	VIM-17
	ST-235/P2 ST-235/P17 ST-235/P18 ST-235/P19 ST-235/P20 ST-235/P10	*bla*$_{\text{VIM-4}}$|*arr-7*|*aacA4*|*bla*$_{\text{PSE-1}}$ (FN397623.1)	VIM-4

Όσον αφορά στα στελέχη που άνηκαν στο νέο ST-1457/P3 έφεραν ως τμήμα της γονιδιακής κασέτας το αλληλόμορφο VIM-17 πλαισιωμένο με δυο ομόρροπα αντίγραφα του γονιδίου aacA29 που όπως αναφέρθηκε παραπάνω αποτελεί και τη συνηθέστερη γονιδιακή κασέτα και των στελεχών που έφεραν το αλληλόμορφο VIM-2 (EU118148.1). Τέλος, όλα τα στελέχη που άνηκαν στους ST-235/P2, ST-235/P17, ST-235/P18, ST-235/P19, ST-235/P20 και ST-235/P10 έφεραν ως τμήμα της γονιδιακής κασέτας το αλληλόμορφο VIM-4 και καθοδικά αυτού τα

γονίδια arr-7 που κωδικοποιεί μια ADP-ριβοσυλ-τρανσφεράση παρέχοντας ανθεκτικότητα έναντι της ριφαμπικίνης, το γονίδιο aacA4 που κωδικοποιεί μια ακετυλοτρανσφεράση παρέχοντας ανθεκτικότητα έναντι των αμινογλυκοσιδών και το γονίδιο PSE-1 που κωδικοποιεί μια καρβαπενικιλλινάση (FN397623.1).





Εικόνα 3.23. Ενδεικτική ενίσχυση για την χαρτογράφηση (επάνω) και σχηματική αναπαράσταση των μεταβλητών περιοχών των ιντεγκρονίων (κάτω) των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *P. aeruginosa*.

3.10 Πλασμιδιακή Εντόπιση γονιδίων Καρβαπενεμασών

Στελέχη αντιπροσωπευτικά για όλους τους συνδυασμούς καρβαπενεμασών και STs υποβλήθηκαν σε απομόνωση του πλασμιδιακού τους περιεχομένου και εν συνεχεία σε υβριδισμό κατά Southern με ειδικούς ανιχνευτές για τα γονίδια των καρβαπενεμασών OXA-23, OXA-58, VIM-2, VIM-4 και VIM-17 με σκοπό τον καθορισμό της πλασμιδιακής εντόπισης των εν λόγω γονιδίων (Εικόνα 3.24).

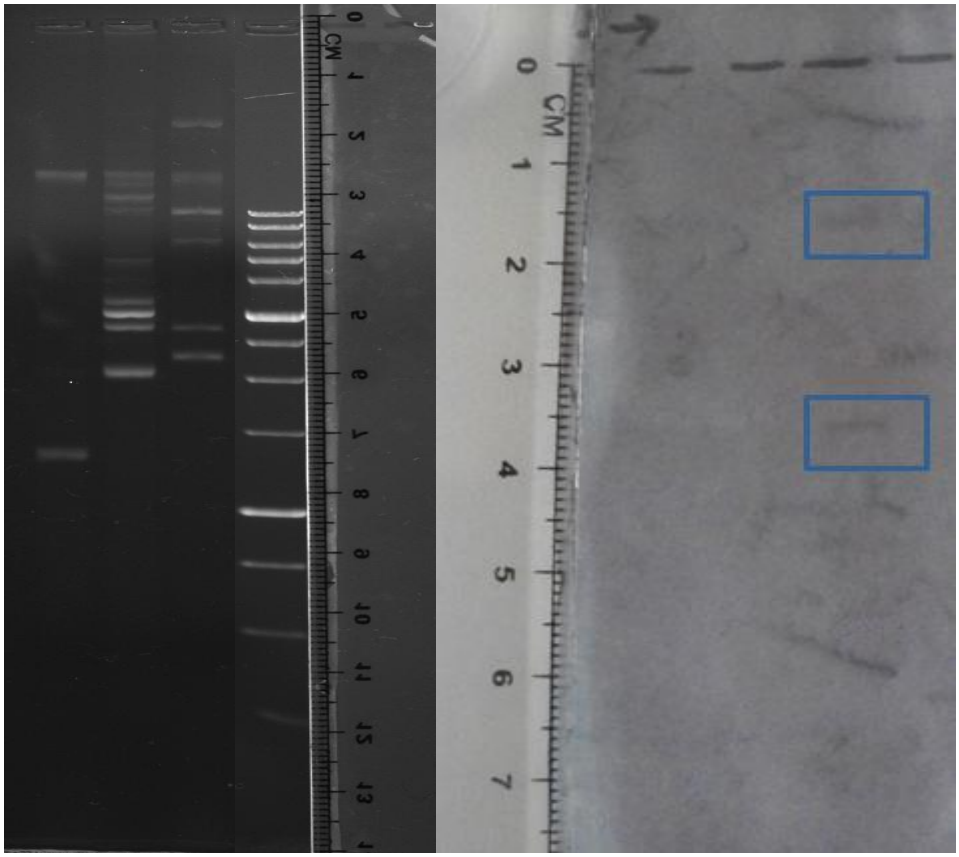
Συγκεκριμένα ελέχθησαν συνολικά 5 στελέχη *A. baumannii*, εκ των οποίων ένα παρήγαγε την καρβαπενεμάση OXA-23 και ανήκε στον ST-1^{MLST}/ST-201^{3LST}, ένα παρήγαγε την καρβαπενεμάση OXA-23 και ανήκε στον ST-2^{MLST}/ST-101^{3LST}, ένα παρήγαγε την καρβαπενεμάση OXA-58 και ανήκε στον ST-1^{MLST}/ST-201^{3LST}, ένα παρήγαγε την

Πίνακας 3.5. Αποτελέσματα εντόπισης γονιδίων καρβαπενεμασών.

Είδος	Καρβαπενεμάση	ST	Εντόπιση
A. baumannii	OXA-23	ST-1^{MLST}/ST-201^{3LST}	Χρωμοσωμική
		ST-2^{MLST}/ST-101^{3LST}	
	OXA-58	ST-1^{MLST}/ST-201^{3LST}	Πλασμιδιακή
		ST-1^{MLST}/NT^{3LST}	
		ST-2^{MLST}/ST-106^{3LST}	
P. aeruginosa	VIM-2	ST-111	Χρωμοσωμική
		ST-235	
		ST-244	
		ST-395	
		ST-253	
		ST-277	
		ST-773	
	VIM-4	ST-235	
	VIM-17	ST-1457	

καρβαπενεμάση OXA-58 και ανήκε στον ST-1^{MLST}/NT^{3LST} και τέλος ένα παρήγαγε την καρβαπενεμάση OXA-58 και ανήκε στον ST-2^{MLST}/ST-106^{3LST}. Στα εν λόγω στελέχη ο ανιχνευτής για την καρβαπενεμάση OXA-23 δεν υβριδοποιήθηκε σε κάποια από τις διακριτές ζώνες του ηλεκτροφορητικού προφίλ του πλασμιδιακού εκχυλίσματος έκαστου στελέχους σε αντίθεση με αυτόν για τη OXA-58 καταδεικνύοντας την πιθανή χρωμοσωμική και πλασμιδιακή εντόπιση των καρβαπενεμασών OXA-23 και OXA-58 στα απομονωθέντα στελέχη, αντίστοιχα.

Όσον αφορά τα στελέχη *P. aeruginosa* ελέχθησαν 9 συνολικά, εκ των οποίων τα 7 παρήγαγαν την καρβαπενεμάση VIM-2 και ανήκαν στους ST-111, ST-235, ST-244, ST-395, ST-253, ST-277 και ST-773, ένα παρήγαγε την καρβαπενεμάση VIM-4 και ανήκε στον ST-235 ενώ ένα παρήγαγε την καρβαπενεμάση VIM-17 και ανήκε στον ST-1457. Ομοιως με τα στελέχη *A. baumannii*, τα συγκεκριμένα στελέχη δεν έδωσαν θετικό σήμα στην υβριδοποίηση κατά Southern για κάποια από τις ζώνες του ηλεκτροφορητικού προφίλ του πλασμιδιακού τους εκχυλίσματος καταδεικνύοντας την πιθανή χρωμοσωμική εντόπιση των καρβαπενεμασών VIM-2, VIM-4 και VIM-17.



Εικόνα 3.24. Ηλεκτροφορητικό προφίλ του πλασμιδιακού εκχυλίσματος ενδεικτικών στελεχών (αριστερά, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* OXA-23 και *A. baumannii* OXA-58) και υβριδισμός κατά Southern με αντίστοιχους ανιχνευτές (δεξιά, VIM, OXA-23 και OXA-58).

3.11 Βακτηριακή Σύζευξη των Μικροβιακών Στελεχών

Η ικανότητα των στελεχών της μελέτης να μεταβιβάζουν τα γονίδια που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες μέσω σύζευξης μελετήθηκε αντιπροσωπευτικά σε ένα στέλεχος από κάθε κλώνο και για κάθε συνδυασμό καρβαπενεμασών (5 στελέχη *A. baumannii* και 9 στελέχη *P. aeruginosa*) ακολουθώντας τη μέθοδο κοινής επώασης δότη και λήπτη σε επιφάνεια άγαρ. Η δοκιμασία διενεργήθηκε εις τριπλούν για έκαστο αντιπροσωπευτικό στέλεχος χρησιμοποιώντας ως λήπτη το πρότυπο στέλεχος *Escherichia coli* 26R793 (Lac^{-} Rif^{R}).

Ωστόσο, κανένα από τα αντιπροσωπευτικά στελέχη δεν έδωσε αποσυζεύκτες με το εν λόγω στέλεχος, ενισχύοντας την υπόθεση ότι τα γονίδια των καρβαπενεμασών OXA-23, VIM-2, VIM-4 και VIM-17 εδράζονται επί του χρωμοσώματος ενώ το OXA-58 επί μη συζευκτικών πλασμιδίων στα υπό μελέτη στελέχη (Πίνακας 3.6).

Πίνακας 3.6. Αποτελέσματα σύζευξης με το πρότυπο στέλεχος *E. coli* 26R793.

Είδος	Καρβαπενεμάση	ST	Σύζευξη με *E. coli* 26R793
A. baumannii	OXA-23	ST-1^{MLST}/ST-201^{3LST}	(-)
		ST-2^{MLST}/ST-101^{3LST}	(-)
	OXA-58	ST-1^{MLST}/ST-201^{3LST}	(-)
		ST-1^{MLST}/NT^{3LST}	(-)
		ST-2^{MLST}/ST-106^{3LST}	(-)
P. aeruginosa	VIM-2	ST-111	(-)
		ST-235	(-)
		ST-244	(-)
		ST-395	(-)
		ST-253	(-)
		ST-277	(-)
		ST-773	(-)
	VIM-4	ST-235	(-)
	VIM-17	ST-1457	(-)

Συζήτηση & Συμπεράσματα

Η ανθεκτικότητα έναντι των αντιβιοτικών αποτελεί μείζον πρόβλημα της σύγχρονης ιατρικής. Η συνεχιζόμενη εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών που προκαλούν νοσοκομειακές λοιμώξεις συμβάλλει ουσιαστικά στη νοσηρότητα και στη θνησιμότητα μεταξύ των νοσηλευόμενων ασθενών. Τα αζυμωτικά Gram αρνητικά νοσοκομειακά παθογόνα, κυρίως των ειδών *Pseudomonas aeruginosa* και *Acinetobacter baumannii* αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες ανησυχίες για τους νοσηλευόμενους ασθενείς ιδίως στις μονάδες εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ), όπου τα εν λόγω παθογόνα είναι ικανά να προκαλέσουν σοβαρές μολύνσεις σε βαρέως πάσχοντες και ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Η αντιμικροβιακή, λοιπόν, ανθεκτικότητα μεταξύ των νοσοκομειακών στελεχών *P. aeruginosa* και *A. baumannii*, περιπλέκει τη θεραπεία των λοιμώξεων και επηρεάζει αρνητικά την κλινική έκβαση και τον κόστος της θεραπείας των ασθενών (Harris *et al*, 1999, Aloush *et al*, 2006).

Η έλευση των καρβαπενεμών τη δεκαετία του 1980 σηματοδότησε μια νέα θεραπευτική επιλογή έναντι των σοβαρών βακτηριακών λοιμώξεων. Ωστόσο η ανθεκτικότητα έναντι αυτών των αντιμικροβιακών παραγόντων έχει συχνά παρατηρηθεί σε Gram αρνητικά βακτήρια όπως στα είδη *P. aeruginosa* και *A. baumannii*. Ο συχνότερα υπεύθυνος μηχανισμός για την εν λόγω ανθεκτικότητα είναι η παραγωγή ενζύμων με ικανότητα υδρόλυσης των καρβαπενέμων από τα συγκεκριμένα είδη, τα οποία συνήθως φέρουν ανθεκτικότητα έναντι και άλλων τάξεων αντιμικροβιακών παραγόντων.

4.1 Ανθεκτικότητα στις Καρβαπενέμες των Στελεχών A baumannii

Προηγούμενες μελέτες που αφορούν τον Ελλαδικό χώρο έχουν καταδείξει τη συνεχιζόμενη αύξηση του ποσοστού των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες κλινικών στελεχών *A. baumannii*, με το εν λόγω ποσοστό να υπερβαίνει το 70% για το 2010, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τις μονάδες εντατικής θεραπείας των ελληνικών νοσοκομείων κατά το ίδιο έτος ανέρχονταν στο 90% (Miyakis *et al*, 2011). Στη παρούσα μελέτη τα απομονωθέντα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *A. baumannii* ανέρχονταν στο 82% του συνόλου των εν λόγω στελεχών που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα ασθενών του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας κατά το έτος 2011. Το υψηλό αυτό ποσοστό καταδεικνύει και την αναγκαιότητα της περαιτέρω μελέτης των συγκεκριμένων στελεχών.

Περάν από την ανθεκτικότητα έναντι των καρβαπενέμων τα απομονωθέντα στελέχη χαρακτηρίζονταν από πολυανθεκτικό φαινότυπο (ανθεκτικότητα σε τουλάχιστον 3 διαφορετικές τάξεις αντιβιοτικών) με τα ποσοστά ανθεκτικότητας για την πλειονότητα των αντιβιοτικών παραγόντων που ελέχθησαν να κυμαίνεται από 69,96% έως και 100% περιορίζοντας τις υπάρχουσες θεραπευτικές επιλογές, όπως έχει ήδη αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες (Andriamanantena *et al,* 2010, Yan *et al,* 2010, Mammina *et al,* 2011, Lee *et al,* 2012). Η κολιστίνη φάνηκε να αποτελεί την πιο υποσχόμενη θεραπευτική επιλογή με ποσοστό ανθεκτικότητας 3,70% αλλά και η μινοκυκλίνη και η τιγκεκυκλίνη με ποσοστά ανθεκτικότητας μεταξύ των υπό μελέτη στελεχών 22,22% και 44%, αντίστοιχα.

Από προηγούμενες μελέτες τόσο για τον Ελλαδικό χώρο μεταξύ των ετών 1999 έως 2009 αλλά και από μελέτες που αφορούν το χώρο της Μεσογείου (Λίβανος, Τουρκία και Ιταλία) είχε αποδειχτεί ότι ο ανθεκτικός στις καρβαπενέμες φαινότυπος οφείλονταν αποκλειστικά στη παρουσία του γονιδίου OXA-58 μεταξύ των στελεχών *A. baumannii* (Gogou *et al.* 2011, Giannouli *et al.* 2009, Kulah *et al.* 2010, Carretto *et al.* 2011, Di Popolo *et al.* 2011). Ωστόσο, στελέχη *A. baumannii* που παράγουν τη καρβαπενεμάση OXA-23 έχουν αναφερθεί από την Ευρώπη, τη Νότια Αμερική και την Ασία (Bogaerts *et al.* 2008, Gur *et al.* 2008, Stoeva *et al.* 2008, Dalla-Costa *et al.* 2003, Merkier *et al.* 2008, Carvalho *et al.* 2009, Jeon *et al.* 2005, Zhou *et al.* 2007, Niumsup *et al.* 2009). Παρόλα αυτά κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης τεκμηριώθηκε η ραγδαία εξάπλωση στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας στελεχών *A. baumannii* που παράγουν τη καρβαπενεμάση OXA-23 για πρώτη φορά στην Ελλάδα, αντικαθιστώντας αυτά που παράγουν την OXA-58, φαινόμενο που παράλληλα παρατηρήθηκε και σε Ιταλικά νοσοκομεία (D'Arezzo *et al.* 2011, Liakopoulos *et al.* 2012).

Η μελέτη ανθεκτικών στελεχών *A. baumannii* από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας απομονωθέντα κατά το δεύτερο εξάμηνο του 2010 κατέδειξε την παρουσία μόνο 5 στελεχών που έφεραν το γονίδιο της καρβαπενεμάσης OXA-23 σε αντίθεση με τη πλειονότητα των απομονωθέντων στελεχών εκείνης της περιόδου που έφεραν το γονίδιο της καρβαπενεμάσης OXA-58, ενισχύοντας την υπόθεση της ραγδαίας εξάπλωσης των πρώτων. Η συλλογή και μελέτη, επίσης, στελεχών που εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας κατέδειξε την ευρεία εν λόγω εξάπλωση αυτών και τη

παρατηρούμενη μεταστροφή ως προς την επικρατούσα καρβαπενεμάση πέραν των ορίων της Περιφέρειας Θεσσαλίας.

Τα πρώτα 5 στελέχη που έφεραν το γονίδιο της καρβαπενεμάσης OXA-23 απομονώθηκαν από ασθενείς νοσηλευόμενους στην μονάδα εντατικής θεραπείας προς το τέλος του 2010, και συγκεκριμένα τα δύο πρώτα εξ' αυτών απομονώθηκαν το Οκτώβριο του εν λόγω έτους. Οι πρώτοι δύο ασθενής, ηλικίας 20 και 70 ετών αντίστοιχα, δεν είχαν στο αναμνηστικό ιατρικό ιστορικό τους υποκείμενες νόσους, όπως διαβήτη, καρκίνο ή ανοσοανεπάρκεια. Οι εν λόγω ασθενείς νοσηλεύονταν τουλάχιστον επί δύο εβδομάδες πριν την απομόνωση των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών τους κι ως εκ τούτου οι λοιμώξεις τους (βακτηριαιμίες) θεωρήθηκαν ως νοσοκομειακά αποκτηθείσες, όπως και των υπόλοιπων τριών ασθενών από τους οποίους απομονώθηκαν αντίστοιχα στελέχη. Καθώς τα ιατρικά αρχεία των πρώτων δύο ασθενών δεν υποδεικνύουν προηγούμενη νοσηλεία ή ταξίδια στο εξωτερικό τους τελευταίους έξι μήνες, είναι πιθανό ότι τα στελέχη *A. baumannii* που έφεραν το γονίδιο της OXA-23 καρβαπενεμάσης κυκλοφορούσαν ήδη στο νοσοκομείο μας.

Από τους μελετητές, που παρατήρησαν την εξάπλωση των στελεχών *A. baumannii* που παράγουν τη καρβαπενεμάση OXA-23 έναντι αυτών που παράγουν την OXA-58 στην Ιταλία, θεωρήθηκε πιθανό ότι οι υψηλότερη ανθεκτικότητα έναντι των καρβαπενέμων των στελεχών που φέρουν την OXA-23 καρβαπενεμάση δύναται να παρέχουν ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα των εν λόγω στελεχών στο νοσοκομειακό περιβάλλον (Héritier *et al.* 2010β, D'Arezzo *et al.* 2011). Ωστόσο, η εξαιρετικά απότομη αλλαγή του πληθυσμού των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *A. baumannii* που τεκμηριώθηκε στη μελέτη μας δεν δύναται να αποδοθεί εξ' ολοκλήρου στην επιλεκτική πίεση της χρήσης των καρβαπενέμων. Ανεξάρτητα από τους λόγους για την αλλαγή στον πληθυσμό των στελεχών *A. baumannii*, η εξάπλωση αυτών που παράγουν την OXA-23 καρβαπενεμάση φαίνεται να αντανακλά μια παγκόσμια τάση επικράτησης των στελεχών που φέρουν την OXA-23 καρβαπενεμάση και ανήκουν στα κλωνικά συμπλέγματα 1 και 2 (Higgins *et al.* 2010β, Mugnier *et al.* 2010).

Το κλωνικό σύμπλεγμα 2 (CC2) στο όποιο ανήκει η πλειονότητα των ανθεκτικών στελεχών της παρούσας μελέτης αποτελεί μακράν το μεγαλύτερο και πιο διαδεδομένο κλωνικό σύμπλεγμα, με μια πολύ ευρεία διεθνή κατανομή που περιλαμβάνει συνολικά 34 χώρες (Ιταλία, Ισπανία, Γερμανία, Ηνωμένο Βασίλειο, Ελλάδα, Ολλανδία, Δανία, Τσεχική Δημοκρατία, Γαλλία, Πολωνία, Τουρκία, Νορβηγία, Σουηδία, Πορτογαλία, Ιρλανδία, Βέλγιο, Ρουμανία,

Ιαπωνία, Κίνα, Κορέα, Ταϋλάνδη, Ινδία, Μαλαισία, Φιλιππίνες, Ταιβάν, Σιγκαπούρη, Βιετνάμ, Λίβανο, Βραζιλία, Νότια Αφρική, Ρεϋνιόν, Ταϊτή, Νέα Καληδονία, Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής και Αυστραλία) (Karah *et al.* 2012). Τα στελέχη του συγκεκριμένου κλωνικού συμπλέγματος έχει βρεθεί να φέρουν γονίδια για διάφορες καρβαπενεμάσες, όπως τη VIM-1 και άλλες των ομάδων OXA-23, OXA-24 και OXA-58. Επιπλέον, ορισμένα στελέχη του κλωνικού αυτού συμπλέγματος έχει βρεθεί ότι παράγουν τη 16S rRNA μεθυλάση ArmA εμφανίζοντας κατ' επέκταση ανθεκτικότητα έναντι των αμινογλυκοσίδων, καθώς και ότι κάποια στελέχη εμφανίζουν ανθεκτικότητα στη κολιστίνη (Park *et al* 2010). Ωστόσο, ανησυχητικό γεγονός αποτελεί η πρόσφατη ανάδυση στην Κορέα στελεχών του CC2 που εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε όλους τους διαθέσιμους μέχρι στιγμής αντιμικροβιακούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων της κολιστίνης, της πολυμυξίνης Β και της τιγεκυκλίνης (Park *et al* 2009). Η ενδοκλωνική αυτή ποικιλία φαινοτυπικών και γονοτυπικών χαρακτηριστικών ανθεκτικότητας μεταξύ των στελεχών του εν λόγω κλωνικού συμπλέγματος πιθανολογείται ότι οφείλεται στην ευρεία κατανομή του σε ολόκληρο τον κόσμο, γεγονός που επιτρέπει στα στελέχη αυτά τη πρόσβασή σε ένα εκτεταμένο φάσμα μεταβιβάσιμων στοιχείων ανθεκτικότητας (Nemec *et al* 2004).

Αρκετά από τα στελέχη της παρούσας μελέτης βρέθηκε ότι άνηκαν στο κλωνικό σύμπλεγμα (CC1), το όποιο αποτελεί το δεύτερο σημαντικό κλωνικό σύμπλεγμα στο πληθυσμό του είδους *A. baumannii*, εμφανίζοντας μια ευρεία διεθνή κατανομή μεταξύ συνολικά 31 χωρών (Γερμανία, Ιταλία, Νορβηγία, Βουλγαρία, Ηνωμένο Βασίλειο, Πολωνία, Σλοβενία, Κροατία, Τσεχία, Ιρλανδία, Βέλγιο, Ελβετία, Ισπανία, Γαλλία, Ελλάδα, Ολλανδία, Ρουμανία, Τουρκία, Ινδία, Κίνα, Ιαπωνία, Κορέα, Νότια Αφρική, Σιγκαπούρη, Λιβύη, Αλγερία, Λίβανο, Ηνωμένα Αραβικά Εμιράτα, Μπαχρέιν, Αργεντινή, Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής και Αυστραλία) (Karah *et al.* 2012). Πρόσφατα, επίσης αναφέρθηκε και η απομόνωση ενός στελέχους του (CC1) από το Ιράκ (Huang *et al* 2012). Ομοίως με τα στελέχη του CC2, αυτά του CC1 έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση πολυανθεκτικού φαινοτύπου καθώς και διάφορες επιδημικές εξάρσεις. Τα στελέχη του συγκεκριμένου κλωνικού συμπλέγματος έχει βρεθεί να φέρουν γονίδια για διάφορες καρβαπενεμάσες, όπως τη VIM-4 και άλλες των ομάδων OXA-23και OXA-58, ενώ στελέχη του εν λόγω συμπλέγματος δεν έχουν συσχετιστεί με την παρουσία καρβαπενεμασών της ομάδας OXA-24 (Karah *et al.* 2012).

Η επικράτηση των στελεχών των CC1 και CC2 στο νοσοκομειακό περιβάλλον και ιδιαίτερα των ιδρυτικών γονοτύπων των εν λόγω συμπλεγμάτων ST-1 και ST-2, αντίστοιχα πιθανώς να

οφείλεται στη μεγαλύτερη αρμοστικότητα των συγκεκριμένων στελεχών για το νοσοκομειακό περιβάλλον. Συγκεκριμένα από πρόσφατες μελέτες πρόεκυψε ότι ενώ τα στελέχη *A. baumannii* επιβιώνουν σε ξηρές επιφάνειες κατά μέσο όρο για 16 μέρες, αυτά που άνηκαν στο ST-1 εμφάνιζαν εξαιρετικά υψηλή αντοχή σε συνθήκες ξηρασίας, με χρόνους επιβίωσης από 75 έως 89 ημέρες, ενώ αυτά που άνηκαν στο ST-2 εμφάνιζαν μετρία αντοχή με χρόνους επιβίωσης από 33 σε 54 ημέρες (Giannouli *et al.* 2013).

Αν και τα στελέχη *A. baumannnii* που άνηκαν στο ST-2 εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη ικανότητα σχηματισμού βιομεμβράνης από αυτά του ST-1, γεγονός που πιθανώς συνέβαλλε στην επικράτηση κυρίως των στελεχών του εν λόγω ST, εντούτοις η ικανότητα παράγωγης βιομεμβράνης εν γένει από το είδος *A. baumannnii* παρέχει στο είδος αυτό ένα εξελικτικό πλεονέκτημα επιβίωσης στο νοσοκομειακό περιβάλλον (de Breij *et al.* 2010). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η έκθεση στελεχών *A. baumannnii* σε μη θανατηφόρες συγκεντρώσεις ιμιπενέμης διεγείρει το σχηματισμό βιομεμβράνης από αυτά (Nucleo *et al.* 2009). Το φαινόμενο αυτό της υπερπαραγωγής βιομεμβράνης παρουσία καρβαπενέμων επιβεβαιώθηκε πολύ πρόσφατα στα στελέχη των CC1 και CC2 και ειδικά στους ιδρυτικούς γονοτύπους αυτών, ST-1 και ST-2, αντίστοιχα, που επικρατούν μεταξύ των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών παγκοσμίως αλλά και στην Ελλάδα (Giannouli *et al.* 2013).

Τέλος, πολύ πρόσφατα μελετήθηκε η ικανότητα προσκόλλησης σε A549 ανθρώπινα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα και η επακόλουθη διείσδυση σε αυτά στελεχών *A. baumannnii* διαφορετικών STs (Giannouli *et al.* 2013). Από τα ευρήματα της εν λόγω μελέτης πρόεκυψε ότι όλα τα στελέχη που άνηκαν στο ST-2 προσκολλώνται στα επιθηλιακά κύτταρα σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα από ότι τα στελέχη άλλων STs, ενώ τόσο αυτά που άνηκαν στο ST-2 όσο και αυτά που άνηκαν στο ST-1 διέθεταν ικανότητα διείσδυσης στα ανθρώπινα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα. Είναι λογικό, λοιπόν, το γεγονός ότι το είδος *A. baumannnii* και δη τα στελέχη των ST-1 και ST-2 αποικίζουν το βλεννογόνο του αναπνευστικού συστήματος προκαλώντας κατά βάση λοιμώξεις του αναπνευστικού. Ως εκ τούτου, η απομόνωση στελεχών *A. baumannnii* ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στη παρούσα μελέτη κυρίως από δείγματα βρογχικών εκκρίσεων και πτυέλων από τη ΜΕΘ και τη πνευμονολογική κλινική είναι δικαιολογημένη.

Παρά το γεγονός ότι το γονίδιο της καρβαπενεμάσης OXA-23 έχει βρεθεί να εδράζεται επί τεσσάρων διαφορετικών γενετικών περιβαλλόντων, εντούτοις το εν λόγω γονίδιο συνήθως

εδράζεται επί ενός σύνθετου τρανσποζονίου γνωστό ως Tn2006 (Mugnier *et al.* 2010). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνουν τα ευρήματα αυτά καθώς σε όλα τα στελέχη που έφεραν το γονίδιο OXA-23, αυτό εδράζονταν επί του τρανσποζονίου Tn2006 εκατέρωθεν του οποίου βρίσκονταν δυο αντίγραφα της αλληλουχίας ένθεσης ISAba1 με αντίρροπες κατεύθυνσης. Αξιοσημείωτο είναι ότι η συνήθης αυτή αλληλουχία ένθεσης του γονιδιώματος του είδους *A. baumannnii* παρέχει τον υποκινητή για την έκφραση του γονιδίου OXA-23, του οποίου η παρουσία ανοδικά του γονιδίου αυτού αλλά και άλλων γονιδίων, όπως το ampC και το sulII, έχει συσχετιστεί με την υπερπαραγωγή αυτών (Turton *et al.* 2006, Segal *et al.* 2004, Segal *et al.* 2005).

Το γονίδιο της καρβαπενεμάσης OXA-58 έχει βρεθεί να περιβάλλεται από αρκετά διαφορετικά γενετικά περιβάλλοντα, στα όποια συμμετέχουν αλληλουχίες ένθεσης όπως οι ISAba1, ISAba2, ISAba3 και IS18 (Poirel & Nordmann, 2006). Οι εν λόγω αλληλουχίες παρέχουν ισχυρούς υποκινητές για την έκφραση του γονιδίου της καρβαπενεμάσης OXA-58, ενισχύοντας την έκφραση του (Poirel & Nordmann, 2006). Στα στελέχη της παρούσας μελέτης διαπιστώθηκε ότι το εν λόγω γονίδιο περιβάλλονταν από δυο αντίγραφα αντίθετης φοράς της σύνθετης αλληλουχίας εισδοχής ISAba3, η παρουσία των οποίων εκατέρωθεν αυτού έχει βρεθεί από αρκετούς μελετητές (Poirel *et al.* 2005β, Merkier *et al.* 2008, Tsakris *et al.* 2008, Boo & Crowley, 2009, Drissi *et al.* 2010, Villalón *et al.* 2013).

Τέλος, το γονίδιο της καρβαπενεμάσης OXA-23 δεν βρέθηκε να εδράζεται επί κάποιου πλασμιδίου, υποδεικνύοντας τη χρωμοσωμική του εντόπιση του συγκεκριμένου γονιδίου, όπως έχει καταγράφει από μια ποικιλία στελεχών από διάφορες γεωγραφικές περιοχές που φέρουν το γονίδιο OXA-23 (Bonnet *et al.* 2002, Zhou *et al.* 2007, Mugnier *et al.* 2010, Bonnin *et al.* 2011, Mansour *et al.* 2012). Αντιθέτως, το γονίδιο της καρβαπενεμάσης OXA-58 στα στελέχη της παρούσας μελέτης θεωρήθηκε πλασμιδιακής εντόπισης, όπως έχει αναφερθεί κι από άλλους μελετητές (Tsakris *et al.* 2008, Zarrilli *et al.* 2008, Chen *et al.* 2008, Boo & Crowley, 2009, Chen *et al.* 2010). Ωστόσο, η αδυναμία μεταφοράς μέσω σύζευξης των εν λόγω πλασμιδίων παρά τις επαναλαμβανόμενες προσπάθειες, πιθανώς υποδεικνύει ότι τα συγκεκριμένα πλασμίδια είναι μη συζευκτικά, αν και δεν δύναται να μη ληφθεί υπόψη η πιθανότητα αδυναμίας μεταφοράς πλασμιδίων από το είδος *A. baumannii* στο είδος *E. coli*.

4.2 Ανθεκτικότητα στις Καρβαπενέμες των Στελεχών P. aeruginosa

Αντίθετα με τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *A. baumannii*, προηγούμενες μελέτες που αφορούν την Ελλάδα έχουν καταδείξει τη σχετική διατήρηση του ποσοστού των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες κλινικών στελεχών *P. aeruginosa* εν γένει αλλά και ειδικά στις μονάδες εντατικής θεραπείας των ελληνικών νοσοκομείων, με τα ποσοστά για το 2010 να υπερβαίνουν το 25% και το 55%, αντίστοιχα (Miyakis *et al,* 2011). Στη παρούσα μελέτη τα απομονωθέντα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη *P. aeruginosa* ανέρχονταν στο 67% του συνόλου των εν λόγω στελεχών που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα ασθενών του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας κατά το έτος 2011. Το πολύ υψηλό αυτό ποσοστό καθιστά αναγκαία την περαιτέρω μελέτη των συγκεκριμένων στελεχών.

Περάν από την ανθεκτικότητα έναντι των καρβαπενέμων τα απομονωθέντα στελέχη χαρακτηρίζονταν από πολυανθεκτικό φαινότυπο (ανθεκτικότητα σε τουλάχιστον 3 διαφορετικές τάξεις αντιβιοτικών) με τα ποσοστά ανθεκτικότητας για την πλειονότητα των αντιβιοτικών παραγόντων που ελέχθησαν να κυμαίνεται από 73,24% έως και 100% περιορίζοντας τις υπάρχουσες θεραπευτικές επιλογές, όπως έχει ήδη αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες (Tsakris *et al,* 2000, Samuelsen *et al,* 2010, Koutsogiannou *et al,* 2013). Η αζτρεονάμη φάνηκε να αποτελεί μια σχετικά υποσχόμενη θεραπευτική επιλογή καθώς έφερε το μεγαλύτερο ποσοστό ευαισθησίας 18,31% μεταξύ των υπό μελέτη στελεχών, ενώ το 47,89% των στελεχών εμφάνισαν ενδιάμεσο φαινότυπο σε αυτήν.

Παγκόσμιες μελέτες έχουν σχετιστεί μια πληθώρα μεταλλο-β-λακταμασών (GIM, IMP, NDM, SPM και VIM) με την εμφάνιση ανθεκτικού στις καρβαπενέμες φαινοτύπου σε στελέχη *P. aeruginosa* (Rieber *et al.* 2012, Gilarranz *et al.* 2013, Flateau *et al.* 2012, Polotto *et al.* 2012). Ωστόσο, από τον περιορισμένο αριθμό προηγούμενων μελετών που αφορούν την Ελλάδα είχε αποδειχτεί ότι ο ανθεκτικός στις καρβαπενέμες φαινότυπος οφείλονταν στη παρουσία γονιδίων τύπου VIM μεταξύ των στελεχών *P. aeruginosa* (Mavroidi *et al,* 2000, Tsakris *et al,* 2000, Pournaras *et al,* 2002, Giakkoupi *et al,* 2003β, Siarkou *et al,* 2009, Koutsogiannou *et al,* 2013). Το εν λόγω γεγονός τεκμηριώθηκε κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης αποδεικνύοντας την εξάπλωση στελεχών *P. aeruginosa* που παράγουν καρβαπενεμάσες τύπου VIM και συγκεκριμένα τις VIM-2, VIM-4 και VIM-17 σε ποσοστό 60%, 39% και 1%, αντίστοιχα. Από τη μηνιαία κατανομή των στελεχών που έφεραν τις VIM-2 και VIM-4 καρβαπενεμάσες

παρατηρηθηκε μια αύξηση στα ποσοστά ανάκτησης των στελεχών που έφεραν την VIM-2 μεταξύ του Μάρτιου και του Αύγουστου του 2011, ενώ αυτά που έφεραν την VIM-4 ανακτήθηκαν σε υψηλότερες συχνότητες το Μάιο και το Σεπτέμβριο του 2011.

Δύο κλωνικά συμπλέγματα, το CC111 και το CC235, έχει αποδειχθεί να κυριαρχούν μεταξύ των στελεχών *P. aeruginosa* που παράγουν μεταλλο-β-λακταμάσες σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές (Giske *et al,* 2006, Empel *et al,* 2007, Lepsanovic *et al,* 2008, Libisch *et al,* 2008, Duljasz *et al,* 2009, Kouda *et al,* 2009, Samuelsen *et al,* 2010). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από την παρούσα μελέτη, η οποία κατέδειξε ότι μεταξύ των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών *P. aeruginosa* το 47,27% άνηκε στο CC111 (ST-111), ενώ το 38,18% στο CC235 (ST-235). Τα στελέχη των CC111 και CC235 έχουν συσχετιστεί με τα παλαιοτέρα γνωστά επιδημικά στελέχη των οροτύπων O:12 και O:11 (Samuelsen *et al,* 2010). Τα στελέχη των εν λόγω κλωνικών συμπλεγμάτων, και κυρίως του CC235, έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση πολυανθεκτικού φαινοτύπου αλλά και με την παρουσία του εκκριτικού συστήματος τύπου III (TTSS) (Maatallah *et al,* 2011, Koutsogiannou *et al,* 2013).

Το εκκριτικό σύστημα τύπου III, αποτελεί ένα γνωστό παράγοντα παθογονικότητας στελεχών του είδους *P. aeruginosa*, η παρουσία του οποίου σχετίζεται με πνευμονική βλάβη, σήψη και εξαπλάσια πιθανότητα θνησιμότητας (Roy-Burman *et al,* 2001, Faure *et al,* 2003). Ως εκ τούτου, η απομόνωση στελεχών *P. aeruginosa* ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στη παρούσα μελέτη με μεγάλη συχνότητα από δείγματα βρογχικών εκκρίσεων, πτυέλων και αίματος από τη ΜΕΘ, τη παθολογική και τη πνευμονολογική κλινική είναι δικαιολογημένη.

Στην παρούσα μελέτη τα γονίδια των καρβαπενεμασών τύπου VIM εδράζονταν επί ιντεγκρονίων τάξης I, τα οποία έφεραν πέντε διαφορετικές μεταβλητές περιοχές. Συγκεκριμένα τρεις διαφορετικές γενετικές δομές βρέθηκε να σχετίζονται με το γονίδιο της VIM-2 (*aacA29a*|*bla*$_{\text{VIM-2}}$|*aacA29b, bla*$_{\text{VIM-2}}$|*aacA7*|*dfrB,* and *bla*$_{\text{OXA-10}}$|*aacA4*|*bla*$_{\text{VIM-2}}$|*smr-2*), μια με το γονίδιο της VIM-4 (*bla*$_{\text{VIM-4}}$|*arr-7*|*aacA4*|*bla*$_{\text{PSE-1}}$) και μια με το γονίδιο της VIM-17 (*aacA29a*|*bla*$_{\text{VIM-17}}$|*aacA29b*). Οι τρεις από τις εν λόγω ιντεκρονιακές δομές έχουν περιγράφει προηγουμένως σε στελέχη *P. aeruginosa* ανθεκτικά στις καρβαπενέμες, ενώ στις άλλες δυο το γονίδιο της VIM-2 βρέθηκε να αποτελεί μέρος νέων γονιδιακών συστοιχιών (KC527014.1 και KC527015.1) (Siarkou *et al,* 2009, Samuelsen *et al,* 2010).

Η γονιδιακή συστοιχία *aacA29a*|*bla*$_{\text{VIM-2}}$|*aacA29b* (In59-like) εντοπίστηκε στο 93,75% των στελεχών *P. aeruginosa* που έφεραν το γονίδιο της καρβαπενεμάσης VIM-2, τα οποία άνηκαν

στους ST-111, ST-244, ST-253, ST-277 και ST-773. Ωστόσο, η πλειονότητα των στελεχών με τη συγκεκριμένη γονιδιακή συστοιχία άνηκε στον ST-111 και απομονώθηκε κυρίως από βρογχικές εκκρίσεις ασθενών που νοσηλεύονταν στη ΜΕΘ. Το εύρημα αυτό επιβεβαιώνει μια πρόσφατη μελέτη που αφορά την Ελλάδα και υποδεικνύει την εξάπλωση αυτών των στελεχών εξαιτίας των διαδικασιών φροντίδας της αναπνευστικής οδού των διασωληνωμένων ασθενών της ΜΕΘ, όπως έχει αναφερθεί και από προηγούμενη μελέτη (Koutsogiannou *et al,* 2013, Park *et al,* 2011). Το γεγονός της απομόνωσης των εν λόγω στελεχών και από άλλες κλινικές τεκμηριώνει την ευρεία διασπορά των στελεχών αυτών εντός του νοσοκομειακού περιβάλλοντος.

Τα στελέχη που άνηκαν στους ST-244, ST-253, ST-277 και ST-773 και έφεραν τη γονιδιακή συστοιχία In59-like ανακτήθηκαν στη πλειοψηφία τους από τη παθολογική κλινική, όπως έχει ήδη αναφερθεί στην Ελλάδα (Siarkou *et al,* 2009). Στελέχη *P. aeruginosa* με την εν λόγω γονιδιακή συστοιχία έχουν περιγραφεί και στη Σουηδία, απομονωθέντα από ασθενείς που είχαν νοσηλευτεί προηγουμένως στην Ελλάδα (Samuelsen *et al,* 2010). Η παρουσία τη γονιδιακής συστοιχίας In59-like σε στελέχη *P. aeruginosa* με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο (διαφορετικοί STs) υπογραμμίζει τη δυνατοτητα οριζόντιας μεταφοράς του εν λόγω ιντεγκρονίου υποδεικνύει πιθανώς τη σχέση του με κάποιο μεταθετό στοιχειό.

Στα στελέχη που έφεραν το γονίδιο της καρβαπενεμάσης VIM-4, αυτό βρέθηκε να σχετίζεται αποκλειστικά με τη γονιδιακή συστοιχία $bla_{\text{VIM-4}}|arr\text{-}7|aacA4|bla_{\text{PSE-1}}$, η οποία περιγράφηκε πρώτη φορά στη Σκανδιναβία σε στελέχη απομονωθέντα από ασθενείς που είχαν νοσηλευτεί προηγουμένως στην Ελλάδα και τη Κύπρο (Samuelsen *et al,* 2010). Ομοίως με τα απομονωθέντα στη Σκανδιναβία στελέχη, τα στελέχη της παρούσας μελέτης που έφεραν τη συγκεκριμένη γονιδιακή συστοιχία άνηκαν στο ST-235. Τα στελέχη αυτά απομονώθηκαν κυρίως από δείγματα ούρων ασθενών από την παθολογική και τη ουρολογική κλινική, αλλά και δείγματα ασθενών από άλλες κλινικές, γεγονός που υποδηλώνει την ευρεία διασπορά αυτών των στελεχών.

Καθώς το νοσηλευτικό προσωπικό και ο ιατρικός εξοπλισμός συχνά μοιράζεται μεταξύ της παθολογικής και της ουρολογικής κλινικής πιθανολογείται ότι τα δυο αυτά γεγονότα αποτέλεσαν το εφαλτήριο της διασποράς των συγκεκριμένων στελεχών από τη παθολογική στη ουρολογική κλινική. Το εν λόγω πιστοποιείται από το γεγονός ότι από το Μάρτιο έως τον Αύγουστο του 2011 στελέχη που έφεραν το γονίδιο της καρβαπενεμάσης VIM-4 ως μέρος της

γονιδιακής συστοιχίας *bla*$_{VIM-4}$|*arr-7*|*aacA4*|*bla*$_{PSE-1}$ και άνηκαν στο ST-235 απομονώνονταν κυρίως από τη παθολογική κλινική, ενώ το Σεπτέμβριο του 2011 τα στελέχη αυτά άρχισαν να απομονώνονται κι από ασθενείς της ουρολογικής κλινικής.

Στο 4,17% και στο 2,08% των στελεχών *P. aeruginosa* που έφεραν το γονίδιο της καρβαπενεμάσης VIM-2, το γονίδιο αυτό βρέθηκε να αποτελεί μέρος των νέων γονιδιακών συστοιχιών *bla*$_{OXA-10}$|*aacA4*|*bla*$_{VIM-2}$|*smr-2* και *bla*$_{VIM-2}$|*aacA7*|*dfrB*, αντίστοιχα. Τέλος, το γονίδιο της καρβαπενεμάσης VIM-17, που προήρθε από σημειακές μεταλλαγές του γονιδίου της VIM-2 και έχει αναφερθεί αποκλειστικά στην Ελλάδα, βρέθηκε ως μέρος της γονιδιακής συστοιχίας *aacA29a*|*bla*$_{VIM-17}$|*aacA29b*, ενώ τα στελέχη που έφεραν την εν λόγω συστοιχία άνηκαν σε ένα νέο ST, γνωστό πλέον ως ST-1457, ο οποίος ανήκει στο CC235 (Siarkou *et al,* 2009).

Τα ιντεγκρόνια είναι ευρέως διαδεδομένα ευέλικτα γενετικά στοιχεία, παρόλο που για τη μεταφορά τους εξαρτώνται από άλλα γενετικά στοιχειά (Partridge *et al,* 2009). Η ικανότητα τους για ενσωμάτωση γονιδίων και ιδιαίτερα γονιδίων που παρέχουν ανθεκτικότητα έναντι αντιμικροβιακών παραγόντων, καθιστά τα εν λόγω γενετικά στοιχειά πρωταρχικές δεξαμενές για την περαιτέρω διάδοση της ανθεκτικότητας έναντι των αντιβιοτικών (Fluit & Schmitz,1999 Partridge *et al,* 2009).

Στις γονιδιακές συστοιχίες των ιντεγκρονίων εδράζονται περισσότερα από ένα γονίδια που παρέχουν ανθεκτικότητα έναντι διαφόρων αντιβιοτικών και συχνά σχετίζονται με άλλα γενετικά στοιχεία που, επίσης, μεταφέρουν τέτοια γονίδια. Είναι κατανοητό, λοιπόν, ότι υπό την επιλεκτική πίεση ενός και μονό αντιβιοτικού επιλέγονται στελέχη που έκτος της ανθεκτικότητας έναντι του συγκεκριμένου αντιβιοτικού χαρακτηρίζονται από ανθεκτικοτητα έναντι μιας πλειάδας αντιβιοτικών, με αποτέλεσμα την επικράτηση στελεχών με πολυανθεκτικούς φαινοτύπους. Αξίζει να σημειωθεί ότι, τα περισσότερα ιντεγκρόνια φέρουν γονίδια που παρέχουν ανθεκτικότητα έναντι παλαιότερων αντιβιοτικών (Partridge *et al,* 2009). Ωστόσο, τα στελέχη της παρούσας μελέτης έφεραν επί των ιντεγκρονίων τους μεταξύ άλλων τα γονίδια VIM-2, VIM-4 και VIM-17, παρέχοντας ανθεκτικότητα έναντι των νέων αντιβιοτικών που ανήκουν στις καρβαπενέμες.

Τέλος, τα γονίδια των καρβαπενεμάσών VIM-2, VIM-4 και VIM-17 δεν βρέθηκε να εδράζονται επί κάποιου πλασμιδίου, υποδεικνύοντας τη χρωμοσωμική τους εντόπιση, όπως έχει καταγράφει από μια ποικιλία στελεχών από διάφορες γεωγραφικές περιοχές που φέρουν τα συγκεκριμένα γονίδια (Maniati *et al.* 2007, Tseng *et al.* 2007, Siarkou *et al,* 2009, Patzer *et al.*

2009, Juan *et al.* 2010, Corich *et al.* 2010). Η αδυναμία μεταφοράς μέσω σύζευξης του ανθεκτικού στις καρβαπενέμες φαινοτύπου των υπό μελέτη στελεχών *P. aeruginosa* παρά τις επαναλαμβανόμενες προσπάθειες, ενισχύει την υπόθεση για χρωμοσωμική εντόπιση των γονιδίων VIM-2, VIM-4 και VIM-17, αν και δεν δύναται να μη ληφθεί υπόψη η πιθανότητα αδυναμίας μεταφοράς πλασμιδίων από το είδος *P. aeruginosa* στο είδος *E. coli*.

4.3 Γενικά Συμπεράσματα

- Το ποσοστό των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών των ειδών *A baumannii* και *P. aeruginosa* στη περιοχή της Θεσσαλίας ήταν πολύ υψηλό.
- Τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελεχών των ειδών *A baumannii* και *P. aeruginosa* εμφάνιζαν πολυανθεκτικούς φαινοτύπους (ανθεκτικότητα σε τουλάχιστον 3 διαφορετικές τάξεις αντιβιοτικών), περιορίζοντας τις υπάρχουσες θεραπευτικές επιλογές.
- Την πιο υποσχόμενη θεραπευτική επιλογή για τα ανθεκτικά στις καρβαπενέμες στελέχη του είδους *A baumannii* αποτέλεσε η Κολιστίνη, ενώ για αυτά του είδους *P. aeruginosa* η Αζτρεονάμη.
- Η ανθεκτικά στις καρβαπενέμες των στελεχών του είδους *A baumannii* οφείλονταν κυρίως στη παρουσία του γονιδίου OXA-23, το οποίο ανιχνεύεται για πρώτη φορά στον Ελλαδικό Χώρο, ενώ αυτή των στελεχών του είδους *P. aeruginosa* στη παρουσία των αλληλομόρφων του γονιδίου VIM (VIM-2, VIM-4 και VIM-17).
- Η πλειονότητα των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες στελεχών των ειδών *A baumannii* (ST-1^{MLST} και ST-2^{MLST}) και *P. aeruginosa* (ST-111^{MLST} και ST-258^{MLST}) άνηκαν σε παγκόσμιους επιδημικούς κλώνους.
- Στα στελεχών του είδους *A baumannii* τα υπεύθυνα για την ανθεκτικότητα έναντι των καρβαπενέμων γονίδια (OXA-23 και OXA-58) βρέθηκε να εδράζονται επί μεταθετών γενετικών στοιχείων που διευκολύνουν την οριζόντια μεταφορά αυτών και συντελούν στην υπερπαραγωγή τους θέτοντας τα υπό των έλεγχο ενός ισχυρού υποκινητή.
- Στα στελεχών του είδους *P. aeruginosa* τα υπεύθυνα για την ανθεκτικότητα έναντι των καρβαπενέμων γονίδια (VIM-2, VIM-4 και VIM-17) βρέθηκε να εδράζονται επί ιντεγκρονίων, γενετικών δομών με ικανότητα ενσωμάτωσης πλειάδας γονιδίων ανθεκτικότητας.

- Τα γονίδια OXA-23 του είδους *A baumannii* και VIM-2, VIM-4 και VIM-17 του είδους *P. aeruginosa* βρέθηκε να εδράζονται στο χρωμόσωμα των ειδών αυτών, ενώ το γονίδιο OXA-58 βρέθηκε να εδράζονται επί πλασμιδίων.
- Τέλος, διαπιστώθηκε η αδυναμία μεταφοράς των υπεύθυνων για την ανθεκτικότητα έναντι των καρβαπενέμων γονίδιων (OXA-23, OXA-58, VIM-2, VIM-4 και VIM-17) μέσω βακτηριακής σύζευξης.

Βιβλιογραφία

Afzal-Shah, M., Villar, H.E., Livermore, D.M., (1999). Biochemical characteristics of a carbapenemase from an *Acinetobacter baumannii* isolate collected in Buenos Aires, Argentina. J. Antimicrob. Chemother. 43, 127–131.

Afzal-Shah, M., Woodford, N., Livermore, D.M., (2001). Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 583–588.

Alba, J., Ishii, Y., Thomson, K., Moland, E.S., Yamaguchi, K., (2005). Kinetics Study of KPC-3, a Plasmid-Encoded Class A Carbapenem-Hydrolyzing β-Lactamase. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 4760–4762.

Aloush, V., Navon-Venezia, S., Seigman-Igra, Y., Cabili, S., Carmeli, Y., (2006). Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa: risk factors and clinical impact. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 43–48.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., (1990). Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403–410.

Ambler, R.P., (1980**).** The structure of beta-lactamases. Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. 289, 321–331.

Ambler, R.P., Coulson, A.F., Frère, J.M., Ghuysen, J.M., Joris, B., Forsman, M., Levesque, R.C., Tiraby, G., Waley, S.G., (1991). A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. Biochem. J. 276 (Pt 1), 269–270.

Andriamanantena, T.S., Ratsima, E., Rakotonirina, H.C., Randrianirina, F., Ramparany, L., Carod, J.-F., Richard, V., Talarmin, A., (2010). Dissemination of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in various hospitals of Antananarivo Madagascar. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 9, 17.

Arakawa, Y., Murakami, M., Suzuki, K., Ito, H., Wacharotayankun, R., Ohsuka, S., Kato, N., Ohta, M., (1995α). A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. Antimicrob. Agents Chemother. 39, 1612–1615.

Arakawa, Y., Murakami, M., Suzuki, K., Ito, H., Wacharotayankun, R., Ohsuka, S., Kato, N., Ohta, M., (1995β). A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. Antimicrob. Agents Chemother. 39, 1612–1615.

Arbeit, R.D., Arthur, M., Dunn, R., Kim, C., Selander, R.K., Goldstein, R., (1990). Resolution of recent evolutionary divergence among *Escherichia coli* from related lineages: the application of pulsed field electrophoresis to molecular epidemiology. J. Infect. Dis. 161, 230–235.

Aubert, D., Naas, T., Nordmann, P., (2003). IS1999 increases expression of the extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 in Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. 185, 5314–5319.

Aubron, C., Poirel, L., Ash, R.J., Nordmann, P., (2005α). Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, U.S. rivers. Emerging Infect. Dis. 11, 260–264.

Aubron, C., Poirel, L., Fortineau, N., Nicolas, P., Collet, L., Nordmann, P., (2005β). Nosocomial spread of Pseudomonas aeruginosa isolates expressing the metallo-beta-lactamase VIM-2 in a hematology unit of a French hospital. Microb. Drug Resist. 11, 254–259.

Avison, M.B., Higgins, C.S., von Heldreich, C.J., Bennett, P.M., Walsh, T.R., (2001). Plasmid location and molecular heterogeneity of the L1 and L2 beta-lactamase genes of Stenotrophomonas maltophilia. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 413–419.

Babouee, B., Widmer, A.F., Dubuis, O., Ciardo, D., Droz, S., Betsch, B.Y., Garzoni, C., Führer, U., Battegay, M., Frei, R., Goldenberger, D., (2011). Emergence of four cases of KPC-2 and KPC-3-carrying *Klebsiella pneumoniae* introduced to Switzerland, 2009-10. Euro Surveill. 16.

Bae, I.K., Lee, Y.-N., Jeong, S.H., Hong, S.G., Lee, J.H., Lee, S.H., Kim, H.J., Youn, H., (2007). Genetic and biochemical characterization of GES-5, an extended-spectrum class A beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae* . Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 58, 465–468.

Bahar, G., Mazzariol, A., Koncan, R., Mert, A., Fontana, R., Rossolini, G.M., Cornaglia, G., (2004). Detection of VIM-5 metallo-beta-lactamase in a Pseudomonas aeruginosa clinical isolate from Turkey. J. Antimicrob. Chemother. 54, 282–283.

Barlow, M., Hall, B.G., (2002). Phylogenetic analysis shows that the OXA beta-lactamase genes have been on plasmids for millions of years. J. Mol. Evol. 55, 314–321.

Barton, B.M., Harding, G.P., Zuccarelli, A.J., (1995). A general method for detecting and sizing large plasmids. Anal. Biochem. 226, 235–240.

Bellais, S., Mimoz, O., Léotard, S., Jacolot, A., Petitjean, O., Nordmann, P., (2002). Efficacy of beta-lactams for treating experimentally induced pneumonia due to a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase-producing strain of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents Chemother. 46, 2032–2034.

Bennett, P.M., (1999). Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. J. Antimicrob. Chemother. 43, 1–4.

Bergogne-Bérézin, E., Towner, K.J., (1996). Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin. Microbiol. Rev. 9, 148–165.

Billal, D.S., Feng, J., Leprohon, P., Légaré, D., Ouellette, M., (2011). Whole genome analysis of linezolid resistance in Streptococcus pneumoniae reveals resistance and compensatory mutations. BMC Genomics 12, 512.

Bogaerts, P., Cuzon, G., Naas, T., Bauraing, C., Deplano, A., Lissoir, B., Nordmann, P., Glupczynski, Y., (2008). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the blaOXA-23 gene associated with ISAba4 in Belgium. Antimicrob. Agents Chemother. 52, 4205–4206.

Bogaerts, P., de Castro, R.R., Deplano, A., Bouchahrouf, W., Tsobo, C., Denis, O., Glupczynski, Y., (2011). Detection of a VIM-27-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in a patient following surgical tourism in Greece. Antimicrob. Agents Chemother. 55, 4488–4489.

Bonnet, R., Marchandin, H., Chanal, C., Sirot, D., Labia, R., De Champs, C., Jumas-Bilak, E., Sirot, J., (2002). Chromosome-Encoded Class Dβ-Lactamase OXA-23 in Proteus mirabilis. Antimicrob Agents Chemother 46, 2004–2006.

Bonnin, R.A., Poirel, L., Licker, M., Nordmann, P., (2011). Genetic diversity of carbapenem-hydrolysing β-lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Romanian hospitals. Clinical Microbiology and Infection 17, 1524–1528.

Boo, T.W., Crowley, B., (2009). Detection of blaOXA-58 and blaOXA-23-like genes in carbapenem-susceptible Acinetobacter clinical isolates: should we be concerned? J Med Microbiol 58, 839–841.

Bou, G., Oliver, A., Martínez-Beltrán, J., (2000). OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 1556–1561.

Bounaga, S., Laws, A.P., Galleni, M., Page, M.I., (1998). The mechanism of catalysis and the inhibition of the Bacillus cereus zinc-dependent beta-lactamase. Biochem. J. 331(3), 703–711.

Bratu, S., Landman, D., Alam, M., Tolentino, E., Quale, J., (2005α). Detection of KPC Carbapenem-Hydrolyzing Enzymes in Enterobacter spp. from Brooklyn, New York. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 776–778.

Bratu, S., Mooty, M., Nichani, S., Landman, D., Gullans, C., Pettinato, B., Karumudi, U., Tolaney, P., Quale, J., (2005β). Emergence of KPC-Possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: Epidemiology and Recommendations for Detection. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 3018–3020.

Brown, S., Amyes, S.G.B., (2005). The sequences of seven class D beta-lactamases isolated from carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from four continents. Clin. Microbiol. Infect. 11, 326–329.

Brown, S., Young, H.K., Amyes, S.G.B., (2005). Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. Clin. Microbiol. Infect. 11, 15–23.

Bush, K., (1988). Recent developments in beta-lactamase research and their implications for the future. Rev. Infect. Dis. 10, 681–690.

Bush, K., (1989). Classification of beta-lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4. Antimicrob Agents Chemother 33, 271–276.

Bush, K., Jacoby, G.A., Medeiros, A.A., (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother. 39, 1211–1233.

Carmeli, Y., Akova, M., Cornaglia, G., Daikos, G.L., Garau, J., Harbarth, S., Rossolini, G.M., Souli, M., Giamarellou, H., (2010). Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control. Clin. Microbiol. Infect. 16, 102–111.

Carretto, E., Barbarini, D., Dijkshoorn, L., van der Reijden, T.J.K., Brisse, S., Passet, V., Farina, C., APSI Acinetobacter Study Group, (2011). Widespread carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* clones in Italian hospitals revealed by a multicenter study. Infect. Genet. Evol. 11, 1319–1326.

Carvalho, K.R., Carvalho-Assef, A.P.D., Peirano, G., Santos, L.C.G.D., Pereira, M.J.F., Asensi, M.D., (2009). Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying bla(OXA-23) collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. Int. J. Antimicrob. Agents 34, 25–28.

Castanheira, M., Toleman, M.A., Jones, R.N., Schmidt, F.J., Walsh, T.R., (2004). Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 4654–4661.

Cavanagh, J.P., Klingenberg, C., Hanssen, A.-M., Fredheim, E.A., Francois, P., Schrenzel, J., Flægstad, T., Sollid, J.E., (2012). Core genome conservation of Staphylococcus haemolyticus limits sequence based population structure analysis. J. Microbiol. Methods 89, 159–166.

Chang, H.L., Tang, C.-H., Hsu, Y.-M., Wan, L., Chang, Y.-F., Lin, C.-T., Tseng, Y.-R., Lin, Y.-J., Sheu, J.J.-C., Lin, C.-W., Chang, Y.-C., Ho, M.-W., Lin, C.-D., Ho, C.-M., Lai, C.-H., (2009). Nosocomial outbreak of infection with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a medical center in Taiwan. Infect Control Hosp Epidemiol 30, 34–38.

Chen, T.L., Chang, W.-C., Kuo, S.-C., Lee, Y.-T., Chen, C.-P., Siu, L.-K., Cho, W.-L., Fung, C.-P., (2010). Contribution of a Plasmid-Borne blaOXA-58 Gene with Its Hybrid Promoter Provided by IS1006 and an ISAba3-Like Element to β-Lactam Resistance in Acinetobacter Genomic Species 13TU. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 3107–3112.

Chen, T.L., Wu, R.C.-C., Shaio, M.-F., Fung, C.-P., Cho, W.L., (2008). Acquisition of a Plasmid-Borne blaOXA-58 Gene with an Upstream IS1008 Insertion Conferring a High Level of Carbapenem Resistance to *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 52, 2573–2580.

Chomczynski, P., (1992). Solubilization in formamide protects RNA from degradation. Nucleic Acids Res. 20, 3791–3792.

Chu, Y.W., Afzal-Shah, M., Houang, E.T., Palepou, M.I., Lyon, D.J., Woodford, N., Livermore, D.M., (2001). IMP-4, a novel metallo-beta-lactamase from nosocomial Acinetobacter spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 710–714.

Church, G.M., Gilbert, W., (1984). Genomic sequencing. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 1991–1995.

Corich, L., Dolzani, L., Tonin, E.A., Vitali, L.A., Lagatolla, C., (2010). Metallo-β-lactamase expression confers an advantage to Pseudomonas aeruginosa isolates compared with other β-lactam resistance mechanisms, favoring the prevalence of metallo-β-lactamase producers in a clinical environment. Microb. Drug Resist. 16, 223–230.

Cornaglia, G., Riccio, M.L., Mazzariol, A., Lauretti, L., Fontana, R., Rossolini, G.M., (1999). Appearance of IMP-1 metallo-beta-lactamase in Europe. Lancet 353, 899–900.

Couture, F., Lachapelle, J., Levesque, R.C., (1992). Phylogeny of LCR-1 and OXA-5 with class A and class D beta-lactamases. Mol. Microbiol. 6, 1693–1705.

Crowder, M.W., Wang, Z., Franklin, S.L., Zovinka, E.P., Benkovic, S.J., (1996). Characterization of the metal-binding sites of the beta-lactamase from Bacteroides fragilis. Biochemistry 35, 12126–12132.

Cullmann, W., Dalhoff, A., Dick, W., (1984). Nonspecific induction of beta-lactamase in Enterobacter cloacae. J. Gen. Microbiol. 130, 1781–1786.

Curran, B., Jonas, D., Grundmann, H., Pitt, T., Dowson, C.G., (2004). Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen Pseudomonas aeruginosa. J. Clin. Microbiol. 42, 5644–5649.

Cuzon, G., Naas, T., Demachy, M.C., Nordmann, P., (2008). Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolate from Greece. Antimicrob. Agents Chemother. 52, 796–797.

D'Arezzo, S., Principe, L., Capone, A., Petrosillo, N., Petrucca, A., Visca, P., (2011). Changing carbapenemase gene pattern in an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* lineage causing multiple outbreaks in central Italy. J. Antimicrob. Chemother. 66, 54–61.

Daikos, G.L., Markogiannakis, A., (2011). Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* : (when) might we still consider treating with carbapenems? Clin. Microbiol. Infect. 17, 1135–1141.

Daikos, G.L., Vryonis, E., Psichogiou, M., Tzouvelekis, L.S., Liatis, S., Petrikkos, P., Kosmidis, C., Tassios, P.T., Bamias, G., Skoutelis, A., (2010). Risk factors for bloodstream infection with *Klebsiella pneumoniae* producing VIM-1 metallo-beta-lactamase. J. Antimicrob. Chemother. 65, 784–788.

Dalhoff, A., Cullmann, W., (1984). Specificity of beta-lactamase induction in Pseudomonas aeruginosa. J. Antimicrob. Chemother. 14, 349–357.

Dalla-Costa, L.M., Coelho, J.M., Souza, H.A.P.H.M., Castro, M.E.S., Stier, C.J.N., Bragagnolo, K.L., Rea-Neto, A., Penteado-Filho, S.R., Livermore, D.M., Woodford, N., (2003). Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. J. Clin. Microbiol. 41, 3403–3406.

De Breij, A., Dijkshoorn, L., Lagendijk, E., van der Meer, J., Koster, A., Bloemberg, G., Wolterbeek, R., van den Broek, P., Nibbering, P., (2010). Do Biofilm Formation and Interactions with Human Cells Explain the Clinical Success of *Acinetobacter baumannii*? PLoS ONE 5, e10732.

Deshpande, P., Rodrigues, C., Shetty, A., Kapadia, F., Hedge, A., Soman, R., (2010). New Delhi Metallo-beta lactamase (NDM-1) in Enterobacteriaceae: treatment options with carbapenems compromised. J Assoc Physicians India 58, 147–149.

Di Popolo, A., Giannouli, M., Triassi, M., Brisse, S., Zarrilli, R., (2011). Molecular epidemiological investigation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in four Mediterranean countries with a multilocus sequence typing scheme. Clin. Microbiol. Infect. 17, 197–201.

Diancourt, L., Passet, V., Nemec, A., Dijkshoorn, L., Brisse, S., (2010). The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. PLoS ONE 5, e10034.

Dixon, R.E., Centers for Disease Control and Prevention (CDC), (2011). Control of health-care-associated infections, 1961-2011. MMWR Surveill Summ 60 Suppl 4, 58–63.

Docquier, J.D., Lamotte-Brasseur, J., Galleni, M., Amicosante, G., Frère, J.-M., Rossolini, G.M., Feb (2003β). On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo-beta-lactamases. J. Antimicrob. Chemother. 51, 257–266.

Docquier, J.D., Riccio, M.L., Mugnaioli, C., Luzzaro, F., Endimiani, A., Toniolo, A., Amicosante, G., Rossolini, G.M., (2003α). IMP-12, a new plasmid-encoded metallo-beta-lactamase from a Pseudomonas putida clinical isolate. Antimicrob. Agents Chemother. 47, 1522–1528.

Donald, H.M., Scaife, W., Amyes, S.G., Young, H.K., (2000). Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 196–199.

Drissi, M., Poirel, L., Mugnier, P.D., Ahmed, Z.B., Nordmann, P., (2010). Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii*, Algeria. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 29, 1457–1458.

Duim, B., Wassenaar, T.M., Rigter, A., Wagenaar, J., (1999). High-resolution genotyping of Campylobacter strains isolated from poultry and humans with amplified fragment length polymorphism fingerprinting. Appl. Environ. Microbiol. 65, 2369–2375.

Duljasz, W., Gniadkowski, M., Sitter, S., Wojna, A., Jebelean, C., (2009). First Organisms with Acquired Metallo-β-Lactamases (IMP-13, IMP-22, and VIM-2) Reported in Austria. Antimicrob. Agents Chemother. 53, 2221–2222.

Elberse, K.E.M., Nunes, S., Sá-Leão, R., van der Heide, H.G.J., Schouls, L.M., (2011). Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis for Streptococcus pneumoniae: Comparison with PFGE and MLST. PLoS ONE 6, e19668.

Empel, J., Filczak, K., Mrówka, A., Hryniewicz, W., Livermore, D.M., Gniadkowski, M., (2007). Outbreak of Pseudomonas aeruginosa Infections with PER-1 Extended-Spectrum β-Lactamase in Warsaw, Poland: Further Evidence for an International Clonal Complex. J. Clin. Microbiol. 45, 2829–2834.

Enoch, D.A., Birkett, C.I., Ludlam, H.A., (2007). Non-fermentative Gram-negative bacteria. Int. J. Antimicrob. Agents 29 Suppl 3, S33–41.

Faure, K., Shimabukuro, D., Ajayi, T., Allmond, L.R., Sawa, T., Wiener-Kronish, J.P., (2003). O-antigen serotypes and type III secretory toxins in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. J. Clin. Microbiol. 41, 2158–2160.

Feil, E.J., Li, B.C., Aanensen, D.M., Hanage, W.P., Spratt, B.G., (2004). eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. J. Bacteriol. 186, 1518–1530.

Feil, E.J., Spratt, B.G., (2001). Recombination and the population structures of bacterial pathogens. Annu. Rev. Microbiol. 55, 561–590.

Fillo, S., Giordani, F., Anniballi, F., Gorgé, O., Ramisse, V., Vergnaud, G., Riehm, J.M., Scholz, H.C., Splettstoesser, W.D., Kieboom, J., Olsen, J.S., Fenicia, L., Lista, F., (2011). Clostridium botulinum Group I Strain Genotyping by 15-Locus Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis. J. Clin. Microbiol. 49, 4252–4263.

Flateau, C., Janvier, F., Delacour, H., Males, S., Ficko, C., Andriamanantena, D., Jeannot, K., Merens, A., Rapp, C., (2012). Recurrent pyelonephritis due to NDM-1 metallo-beta-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa in a patient returning from Serbia, France, 2012. Euro Surveill. 17.

Fluit, A.C., Schmitz, F.J., (1999). Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 18, 761–770.

Fluit, A.C., Schmitz, F.J., (2004). Resistance integrons and super-integrons. Clin. Microbiol. Infect. 10, 272–288.

Fonseca, F., Sarmento, A.C., Henriques, I., Samyn, B., Beeumen, J. van, Domingues, P., Domingues, M.R., Saavedra, M.J., Correia, A., (2007). Biochemical Characterization of SFC-1, a Class A Carbapenem-Hydrolyzing β-Lactamase. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 4512–4514.

Fonzé, E., Vanhove, M., Dive, G., Sauvage, E., Frère, J.-M., Charlier, P., (2002). Crystal structures of the Bacillus licheniformis BS3 class A beta-lactamase and of the acyl-enzyme adduct formed with cefoxitin. Biochemistry 41, 1877–1885.

Francois, P., Huyghe, A., Charbonnier, Y., Bento, M., Herzig, S., Topolski, I., Fleury, B., Lew, D., Vaudaux, P., Harbarth, S., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Blanc, D.S., Pittet, D., Schrenzel, J., (2005). Use of an automated multiple-locus, variable-number tandem repeat-based method for rapid and high-throughput genotyping of Staphylococcus aureus isolates. J. Clin. Microbiol. 43, 3346–3355.

Frère, J.M., (1995). Beta-lactamases and bacterial resistance to antibiotics. Mol. Microbiol. 16, 385–395.

Frère, J.M., Galleni, M., Bush, K., Dideberg, O., (2005). Is it necessary to change the classification of {beta}-lactamases? J. Antimicrob. Chemother. 55, 1051–1053.

Galani, I., Souli, M., Koratzanis, E., Chryssouli, Z., Giamarellou, H., (2006). Molecular characterization of an *Escherichia coli* clinical isolate that produces both metallo-β-lactamase VIM-2 and extended-spectrum β-lactamase GES-7: identification of the In8 integron carrying the blaVIM-2 gene. J. Antimicrob. Chemother. 58, 432–433.

Gales, A.C., Menezes, L.C., Silbert, S., Sader, H.S., (2003α). Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa producing SPM metallo-beta-lactamase. J. Antimicrob. Chemother. 52, 699–702.

Gales, A.C., Tognim, M.C.B., Reis, A.O., Jones, R.N., Sader, H.S., (2003β). Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 45, 77–79.

Galleni, M., Amicosante, G., Frère, J.M., (1988). A survey of the kinetic parameters of class C beta-lactamases. Cephalosporins and other beta-lactam compounds. Biochem. J. 255, 123–129.

Galleni, M., Lamotte-Brasseur, J., Rossolini, G.M., Spencer, J., Dideberg, O., Frère, J.M., (2001). Standard numbering scheme for class B beta-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 660–663.

Garau, G., García-Sáez, I., Bebrone, C., Anne, C., Mercuri, P., Galleni, M., Frère, J.-M., Dideberg, O., (2004). Update of the standard numbering scheme for class B beta-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 2347–2349.

Giakkoupi, P., Petrikkos, G., Tzouvelekis, L.S., Tsonas, S., Legakis, N.J., Vatopoulos, A.C., WHONET Greece Study Group, (2003β). Spread of integron-associated VIM-type metallo-beta-lactamase genes among imipenem-nonsusceptible Pseudomonas aeruginosa strains in Greek hospitals. J. Clin. Microbiol. 41, 822–825.

Giakkoupi, P., Xanthaki, A., Kanelopoulou, M., Vlahaki, A., Miriagou, V., Kontou, S., Papafraggas, E., Malamou-Lada, H., Tzouvelekis, L.S., Legakis, N.J., Vatopoulos, A.C., (2003α). VIM-1 Metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. J. Clin. Microbiol. 41, 3893–3896.

Giakoupi, P., Maltezou, H., Polemis, M., Pappa, O., Saroglou, G., Vatopoulos, A., Greek System for the Surveillance of Antimicrobial Resistance, (2009). KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Greek hospitals are mainly due to a hyperepidemic clone. Euro Surveill. 14.

Giannouli, M., Antunes, L.C., Marchetti, V., Triassi, M., Visca, P., Zarrilli, R., (2013). Virulence-related traits of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains belonging to the international clonal lineages I-III and to the emerging genotypes ST25 and ST78. BMC Infectious Diseases 13, 282.

Giannouli, M., Tomasone, F., Agodi, A., Vahaboglu, H., Daoud, Z., Triassi, M., Tsakris, A., Zarrilli, R., (2009). Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in intensive care units of multiple Mediterranean hospitals. J. Antimicrob. Chemother. 63, 828–830.

Gibb, A.P., Tribuddharat, C., Moore, R.A., Louie, T.J., Krulicki, W., Livermore, D.M., Palepou, M.-F.I., Woodford, N., (2002). Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa with a new bla(IMP) allele, bla(IMP-7). Antimicrob. Agents Chemother. 46, 255–258.

Gilarranz, R., Juan, C., Castillo-Vera, J., Chamizo, F.J., Artiles, F., Alamo, I., Oliver, A., (2013). First detection in Europe of the metallo-β-lactamase IMP-15 in clinical strains of Pseudomonas putida and Pseudomonas aeruginosa. Clin. Microbiol. Infect.

Girlich, D., Naas, T., Nordmann, P., (2004α). Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 2043–2048.

Girlich, D., Naas, T., Nordmann, P., (2004β). OXA-60, a chromosomal, inducible, and imipenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from Ralstonia pickettii. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 4217–4225.

Giske, C.G., Libisch, B., Colinon, C., Scoulica, E., Pagani, L., Füzi, M., Kronvall, G., Rossolini, G.M., (2006). Establishing clonal relationships between VIM-1-like metallo-beta-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa strains from four European countries by multilocus sequence typing. J. Clin. Microbiol. 44, 4309–4315.

Giske, C.G., Rylander, M., Kronvall, G., (2003). VIM-4 in a carbapenem-resistant strain of Pseudomonas aeruginosa isolated in Sweden. Antimicrob. Agents Chemother. 47, 3034–3035.

Goering, R.V., (2010). Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. Infect. Genet. Evol. 10, 866–875.

Gogou, V., Pournaras, S., Giannouli, M., Voulgari, E., Piperaki, E.T., Zarrilli, R., Tsakris, A., (2011). Evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages: a 10 year study in Greece (2000-09). J. Antimicrob. Chemother. 66, 2767–2772.

Gordillo, M.E., Singh, K.V., Baker, C.J., Murray, B.E., (1993). Typing of group B streptococci: comparison of pulsed-field gel electrophoresis and conventional electrophoresis. J Clin Microbiol 31, 1430–1434.

Gur, D., Korten, V., Unal, S., Deshpande, L.M., Castanheira, M., (2008). Increasing carbapenem resistance due to the clonal dissemination of oxacillinase (OXA-23 and OXA-58)-producing *Acinetobacter baumannii*: report from the Turkish SENTRY Program sites. J. Med. Microbiol. 57, 1529–1532.

Hæggman, S., Löfdahl, S., Paauw, A., Verhoef, J., Brisse, S., (2004). Diversity and Evolution of the Class A Chromosomal Beta-Lactamase Gene in *Klebsiella pneumoniae* . Antimicrob. Agents Chemother. 48, 2400–2408.

Han, X.Y., Pham, A.S., Tarrand, J.J., Sood, P.K., Luthra, R., (2002). Rapid and accurate identification of mycobacteria by sequencing hypervariable regions of the 16S ribosomal RNA gene. Am. J. Clin. Pathol. 118, 796–801.

Hanson, N.D., Sanders, C.C., (1999). Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among Enterobacteriaceae. Curr. Pharm. Des. 5, 881–894.

Harris, A., Torres-Viera, C., Venkataraman, L., DeGirolami, P., Samore, M., Carmeli, Y., (1999). Epidemiology and clinical outcomes of patients with multiresistant Pseudomonas aeruginosa. Clin. Infect. Dis. 28, 1128–1133.

Hawkey, P.M., Xiong, J., Ye, H., Li, H., M'Zali, F.H., (2001). Occurrence of a new metallo-beta-lactamase IMP-4 carried on a conjugative plasmid in Citrobacter youngae from the People's Republic of China. FEMS Microbiol. Lett. 194, 53–57.

Healy, M., Huong, J., Bittner, T., Lising, M., Frye, S., Raza, S., Schrock, R., Manry, J., Renwick, A., Nieto, R., Woods, C., Versalovic, J., Lupski, J.R., (2005). Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. J. Clin. Microbiol. 43, 199–207.

Heidelberg, J.F., Paulsen, I.T., Nelson, K.E., Gaidos, E.J., Nelson, W.C., Read, T.D., Eisen, J.A., Seshadri, R., Ward, N., Methe, B., Clayton, R.A., Meyer, T., Tsapin, A., Scott, J., Beanan, M., Brinkac, L., Daugherty, S., DeBoy, R.T., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Haft, D.H., Kolonay, J.F., Madupu, R., Peterson, J.D., Umayam, L.A., White, O., Wolf, A.M., Vamathevan, J., Weidman, J., Impraim, M., Lee, K., Berry, K., Lee, C., Mueller, J., Khouri, H., Gill, J., Utterback, T.R., McDonald, L.A., Feldblyum, T.V., Smith, H.O., Venter, J.C., Nealson, K.H., Fraser, C.M., (2002). Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium Shewanella oneidensis. Nat. Biotechnol. 20, 1118–1123.

Henriques, I., Moura, A., Alves, A., Saavedra, M.J., Correia, A., (2004). Molecular Characterization of a Carbapenem-Hydrolyzing Class A β-Lactamase, SFC-1, from Serratia fonticola UTAD54. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 2321–2324.

Héritier, C., Poirel, L., Aubert, D., Nordmann, P., (2003). Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 47, 268–273.

Héritier, C., Poirel, L., Fournier, P.-E., Claverie, J.-M., Raoult, D., Nordmann, P., (2005α). Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 4174–4179.

Héritier, C., Poirel, L., Lambert, T., Nordmann, P., (2005β). Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 3198–3202.

Héritier, C., Poirel, L., Nordmann, P., (2004). Genetic and biochemical characterization of a chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing ambler class D beta-lactamase from Shewanella algae. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 1670–1675.

Hermann, J.C., Ridder, L., Mulholland, A.J., Höltje, H.D., (2003). Identification of Glu166 as the general base in the acylation reaction of class A beta-lactamases through QM/MM modeling. J. Am. Chem. Soc. 125, 9590–9591.

Higgins, P.G., Dammhayn, C., Hackel, M., Seifert, H., (2010β). Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. J. Antimicrob. Chemother. 65, 233–238.

Higgins, P.G., Lehmann, M., Seifert, H., (2010α). Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in Acinetobacter spp. International Journal of Antimicrobial Agents 35, 305.

Ho, S.E., Subramaniam, G., Palasubramaniam, S., Navaratnam, P., (2002). Carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa in malaysia producing IMP-7 beta-lactamase. Antimicrob. Agents Chemother. 46, 3286–3287.

Hodge, W., Ciak, J., Tramont, E.C., (1978). Simple Method for Detection of Penicillinase-Producing Neisseria gonorrhoeae. J. Clin. Microbiol. 7, 102–103.

Horan, T.C., Andrus, M., Dudeck, M.A., (2008). CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. Am J Infect Control 36, 309–332.

Hornstein, M., Sautjeau-Rostoker, C., Péduzzi, J., Vessières, A., Hong, L.T., Barthélémy, M., Scavizzi, M., Labia, R., (1997). Oxacillin-hydrolyzing beta-lactamase involved in resistance to imipenem in *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiol. Lett. 153, 333–339.

Houang, E.T.S., Chu, Y.W., Lo, W.S., Chu, K.-Y., Cheng, A.F.B., (2003). Epidemiology of rifampin ADP-ribosyltransferase (arr-2) and metallo-beta-lactamase (blaIMP-4) gene cassettes in class 1 integrons in Acinetobacter strains isolated from blood cultures in 1997 to 2000. Antimicrob. Agents Chemother. 47, 1382–1390.

Hrabák, J., Niemczyková, J., Chudáčková, E., Fridrichová, M., Studentová, V., Cervená, D., Urbášková, P., Zemličková, H., (2011). KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from a Czech patient previously hospitalized in Greece and in vivo selection of colistin resistance. Folia Microbiol. (Praha) 56, 361–365.

Huang, X.Z., Chahine, M.A., Frye, J.G., Cash, D.M., Lesho, E.P., Craft, D.W., Lindler, L.E., Nikolich, M.P., (2012). Molecular analysis of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from US service members wounded in Iraq, 2003-2008. Epidemiol. Infect. 140, 2302–2307.

Ito, H., Arakawa, Y., Ohsuka, S., Wacharotayankun, R., Kato, N., Ohta, M., (1995). Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of Serratia marcescens. Antimicrob. Agents Chemother. 39, 824–829.

Iyobe, S., Kusadokoro, H., Ozaki, J., Matsumura, N., Minami, S., Haruta, S., Sawai, T., O'Hara, K., (2000). Amino acid substitutions in a variant of IMP-1 metallo-beta-lactamase. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 2023–2027.

Iyobe, S., Kusadokoro, H., Takahashi, A., Yomoda, S., Okubo, T., Nakamura, A., O'Hara, K., (2002). Detection of a variant metallo-beta-lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of Pseudomonas aeruginosa and an alcaligenes xylosoxidans strain. Antimicrob. Agents Chemother. 46, 2014–2016.

Jackson, S.A., Kotewicz, M.L., Patel, I.R., Lacher, D.W., Gangiredla, J., Elkins, C.A., (2012). Rapid genomic-scale analysis of *Escherichia coli* O104:H4 by using high-resolution alternative methods to next-generation sequencing. Appl. Environ. Microbiol. 78, 1601–1605.

Jeon, B.C., Jeong, S.H., Bae, I.K., Kwon, S.B., Lee, K., Young, D., Lee, J.H., Song, J.S., Lee, S.H., (2005). Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 beta-lactamase in korea. J. Clin. Microbiol. 43, 2241–2245.

Jeong, S.H., Bae, I.K., Kim, D., Hong, S.G., Song, J.S., Lee, J.H., Lee, S.H., (2005). First Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates Producing GES-5 and SHV-12 Extended-Spectrum β-Lactamases in Korea. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 4809–4810.

Jeong, S.H., Lee, K., Chong, Y., Yum, J.H., Lee, S.H., Choi, H.J., Kim, J.M., Park, K.H., Han, B.H., Lee, S.W., Jeong, T.S., (2003). Characterization of a new integron containing VIM-2, a metallo- beta-lactamase gene cassette, in a clinical isolate of Enterobacter cloacae. J. Antimicrob. Chemother. 51, 397–400.

Juan, C., Zamorano, L., Mena, A., Albertí, S., Pérez, J.L., Oliver, A., (2010). Metallo-beta-lactamase-producing Pseudomonas putida as a reservoir of multidrug resistance elements that can be transferred to successful *Pseudomonas aeruginosa* clones. J. Antimicrob. Chemother. 65, 474–478.

Karah, N., Sundsfjord, A., Towner, K., Samuelsen, Ø., (2012). Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. Drug Resist. Updat. 15, 237–247.

Karlowsky, J.A., Jones, M.E., Thornsberry, C., Friedland, I.R., Sahm, D.F., (2003). Trends in Antimicrobial Susceptibilities among Enterobacteriaceae Isolated from Hospitalized Patients in the United States from 1998 to 2001. Antimicrob. Agents Chemother. 47, 1672–1680.

Kassis-Chikhani, N., Decré, D., Gautier, V., Burghoffer, B., Saliba, F., Mathieu, D., Samuel, D., Castaing, D., Petit, J.-C., Dussaix, E., Arlet, G., (2006). First outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying blaVIM-1 and blaSHV-5 in a French university hospital. J. Antimicrob. Chemother. 57, 142–145.

Kim, Y., Tesar, C., Mire, J., Jedrzejczak, R., Binkowski, A., Babnigg, G., Sacchettini, J., Joachimiak, A., (2011). Structure of apo- and monometalated forms of NDM-1--a highly potent carbapenem-hydrolyzing metallo-β-lactamase. PLoS ONE 6, e24621.

Kimura, M., (1969). The Number of Heterozygous Nucleotide Sites Maintained in a Finite Population Due to Steady Flux of Mutations. Genetics 61, 893–903.

Koh, T.H., Sng, L.H., Babini, G.S., Woodford, N., Livermore, D.M., Hall, L.M., (2001). Carbapenem-resistant Klebsiella pnuemoniae in Singapore producing IMP-1 beta-lactamase and lacking an outer membrane protein. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 1939–1940.

Koh, T.H., Wang, G.C.Y., Sng, L.-H., (2004). IMP-1 and a novel metallo-beta-lactamase, VIM-6, in fluorescent pseudomonads isolated in Singapore. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 2334–2336.

Kong, K.F., Jayawardena, S.R., Indulkar, S.D., Del Puerto, A., Koh, C.-L., Høiby, N., Mathee, K., (2005). *Pseudomonas aeruginosa* AmpR is a global transcriptional factor that regulates expression of AmpC and PoxB beta-lactamases, proteases, quorum sensing, and other virulence factors. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 4567–4575.

Köser, C.U., Holden, M.T.G., Ellington, M.J., Cartwright, E.J.P., Brown, N.M., Ogilvy-Stuart, A.L., Hsu, L.Y., Chewapreecha, C., Croucher, N.J., Harris, S.R., Sanders, M., Enright, M.C.,

Dougan, G., Bentley, S.D., Parkhill, J., Fraser, L.J., Betley, J.R., Schulz-Trieglaff, O.B., Smith, G.P., Peacock, S.J., (2012). Rapid whole-genome sequencing for investigation of a neonatal MRSA outbreak. N. Engl. J. Med. 366, 2267–2275.

Koutsogiannou, M., Drougka, E., Liakopoulos, A., Jelastopulu, E., Petinaki, E., Anastassiou, E.D., Spiliopoulou, I., Christofidou, M., (2013). Spread of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clones in a university hospital. J. Clin. Microbiol. 51, 665–668.

Kulah, C., Mooij, M.J., Comert, F., Aktas, E., Celebi, G., Ozlu, N., Rijnsburger, M.C., Savelkoul, P.H.M., (2010). Characterisation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak strains producing OXA-58 in Turkey. Int. J. Antimicrob. Agents 36, 114–118.

Kuzin, A.P., Nukaga, M., Nukaga, Y., Hujer, A.M., Bonomo, R.A., Knox, J.R., (1999). Structure of the SHV-1 beta-lactamase. Biochemistry 38, 5720–5727.

Lagatolla, C., Tonin, E.A., Monti-Bragadin, C., Dolzani, L., Gombac, F., Bearzi, C., Edalucci, E., Gionechetti, F., Rossolini, G.M., (2004). Endemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired metallo-beta-lactamase determinants in European hospital. Emerging Infect. Dis. 10, 535–538.

Lamotte-Brasseur, J., Knox, J., Kelly, J.A., Charlier, P., Fonzé, E., Dideberg, O., Frére, J.M., (1994). The structures and catalytic mechanisms of active-site serine beta-lactamases. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 12, 189–230.

Lanini, S., D'Arezzo, S., Puro, V., Martini, L., Imperi, F., Piselli, P., Montanaro, M., Paoletti, S., Visca, P., Ippolito, G., (2011). Molecular Epidemiology of a *Pseudomonas aeruginosa* Hospital Outbreak Driven by a Contaminated Disinfectant-Soap Dispenser. PLoS ONE 6, e17064.

Laraki, N., Franceschini, N., Rossolini, G.M., Santucci, P., Meunier, C., de Pauw, E., Amicosante, G., Frère, J.M., Galleni, M., (1999). Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 metallo-beta-lactamase IMP-1 produced by Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother. 43, 902–906.

Lauretti, L., Riccio, M.L., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R., Rossolini, G.M., (1999). Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. Antimicrob. Agents Chemother. 43, 1584–1590.

Lee, K., Lee, W.G., Uh, Y., Ha, G.Y., Cho, J., Chong, Y., (2003). VIM- and IMP-type metallo-beta-lactamase-producing Pseudomonas spp. and Acinetobacter spp. in Korean hospitals. Emerging Infect. Dis. 9, 868–871.

Lee, K., Yum, J.H., Yong, D., Lee, H.M., Kim, H.D., Docquier, J.D., Rossolini, G.M., Chong, Y., (2005). Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 4485–4491.

Lee, M.H., Chen, T.L., Lee, Y.-T., Huang, L., Kuo, S.C., Yu, K.-W., Hsueh, P.R., Dou, H.-Y., Su, I.J., Fung, C.P., (2012). Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying Bla(OXA-23) from hospitals in central Taiwan. J Microbiol Immunol Infect.

Lepsanovic, Z., Libisch, B., Tomanovic, B., Nonkovici, Z., Balogh, B., Füzi, M., (2008). Characterisation of the first VIM metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Serbia. Acta Microbiol Immunol Hung 55, 447–454.

Leverstein-van Hall, M.A., Stuart, J.C., Voets, G.M., Versteeg, D., Roelofsen, E., Fluit, A.C., (2010). Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* following foreign travel. Ned Tijdschr Geneeskd 154, A2013.

Li, W., Raoult, D., Fournier, P.E., (2009). Bacterial strain typing in the genomic era. FEMS Microbiol. Rev. 33, 892–916.

Liakopoulos, A., Miriagou, V., Katsifas, E.A., Karagouni, A.D., Daikos, G.L., Tzouvelekis, L.S., Petinaki, E., (2012). Identification of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* in Greece, 2010 to 2011. Euro Surveill. 17.

Libisch, B., Watine, J., Balogh, B., Gacs, M., Muzslay, M., Szabó, G., Füzi, M., (2008). Molecular typing indicates an important role for two international clonal complexes in

dissemination of VIM-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Hungary. Res. Microbiol. 159, 162–168.

Lichtenstein, A.V., Moiseev, V.L., Zaboikin, M.M., (1990). A procedure for DNA and RNA transfer to membrane filters avoiding weight-induced gel flattening. Anal. Biochem. 191, 187–191.

Lim, H.M., Pène, J.J., Shaw, R.W., (1988). Cloning, nucleotide sequence, and expression of the Bacillus cereus 5/B/6 beta-lactamase II structural gene. J. Bacteriol. 170, 2873–2878.

Liu, F., Kariyawasam, S., Jayarao, B.M., Barrangou, R., Gerner-Smidt, P., Ribot, E.M., Knabel, S.J., Dudley, E.G., (2011). Subtyping Salmonella enterica serovar enteritidis isolates from different sources by using sequence typing based on virulence genes and clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs). Appl. Environ. Microbiol. 77, 4520–4526.

Livermore, D.M., Woodford, N., (2006). The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. Trends Microbiol. 14, 413–420.

Lomaestro, B.M., Tobin, E.H., Shang, W., Gootz, T., (2006). The spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing K. pneumoniae to upstate New York. Clin. Infect. Dis. 43, e26–28.

Lombardi, G., Luzzaro, F., Docquier, J.D., Riccio, M.L., Perilli, M., Colì, A., Amicosante, G., Rossolini, G.M., Toniolo, A., (2002). Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of pseudomonas putida producing VIM-1 metallo-beta-lactamase. J. Clin. Microbiol. 40, 4051–4055.

Luzzaro, F., Docquier, J.D., Colinon, C., Endimiani, A., Lombardi, G., Amicosante, G., Rossolini, G.M., Toniolo, A., (2004). Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4 metallo-beta-lactamase encoded by a conjugative plasmid. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 648–650.

Maatallah, M., Cheriaa, J., Backhrouf, A., Iversen, A., Grundmann, H., Do, T., Lanotte, P., Mastouri, M., Elghmati, M.S., Rojo, F., Mejdi, S., Giske, C.G., (2011). Population structure of

Pseudomonas aeruginosa from five Mediterranean countries: evidence for frequent recombination and epidemic occurrence of CC235. PLoS ONE 6, e25617.

Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., Spratt, B.G., (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 3140–3145.

Majiduddin, F.K., Palzkill, T., (2005). Amino acid residues that contribute to substrate specificity of class A beta-lactamase SME-1. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 3421–3427.

Mammeri, H., Poirel, L., Mangeney, N., Nordmann, P., (2003). Chromosomal integration of a cephalosporinase gene from *Acinetobacter baumannii* into Oligella urethralis as a source of acquired resistance to beta-lactams. Antimicrob. Agents Chemother. 47, 1536–1542.

Mammina, C., Bonura, C., Aleo, A., Calà, C., Caputo, G., Cataldo, M.C., Di Benedetto, A., Distefano, S., Fasciana, T., Labisi, M., Sodano, C., Palma, D.M., Giammanco, A., (2011). Characterization of *Acinetobacter baumannii* from intensive care units and home care patients in Palermo, Italy. Clin. Microbiol. Infect. 17, E12–15.

Maniati, M., Ikonomidis, A., Mantzana, P., Daponte, A., Maniatis, A.N., Pournaras, S., (2007). A highly carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate with a novel blaVIM-4/blaP1b integron overexpresses two efflux pumps and lacks OprD. J. Antimicrob. Chemother. 60, 132–135.

Mansour, W., Poirel, L., Bettaieb, D., Bouallegue, O., Boujaafar, N., Nordmann, P., (2008). Dissemination of OXA-23–Producing and Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in a University Hospital in Tunisia. Microbial Drug Resistance 14, 289–292.

Massidda, O., Rossolini, G.M., Satta, G., (1991). The Aeromonas hydrophila cphA gene: molecular heterogeneity among class B metallo-beta-lactamases. J. Bacteriol. 173, 4611–4617.

Matagne, A., Lamotte-Brasseur, J., Frère, J.M., (1998). Catalytic properties of class A beta-lactamases: efficiency and diversity. Biochem. J. 330 (Pt 2), 581–598.

Mavroidi, A., Tsakris, A., Tzelepi, E., Pournaras, S., Loukova, V., Tzouvelekis, L.S., (2000). Carbapenem-hydrolysing VIM-2 metallo- beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* from Greece. J. Antimicrob. Chemother. 46, 1041–1042.

Mazel, D., (2006). Integrons: agents of bacterial evolution. Nat. Rev. Microbiol. 4, 608–620.

McCarthy, A.J., Breathnach, A.S., Lindsay, J.A., (2012). Detection of mobile-genetic-element variation between colonizing and infecting hospital-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates. J. Clin. Microbiol. 50, 1073–1075.

McCarthy, A.J., Lindsay, J.A., (2012). The distribution of plasmids that carry virulence and resistance genes in Staphylococcus aureus is lineage associated. BMC Microbiol. 12, 104.

McDougal, L.K., Steward, C.D., Killgore, G.E., Chaitram, J.M., McAllister, S.K., Tenover, F.C., (2003). Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from the United States: establishing a national database. J. Clin. Microbiol. 41, 5113–5120.

Medeiros, A.A., (1997). Evolution and Dissemination of -Lactamases Accelerated by Generations of -Lactam Antibiotics. Clinical Infectious Diseases 24, S19–S45.

Melino, S., Capo, C., Dragani, B., Aceto, A., Petruzzelli, R., (1998). A zinc-binding motif conserved in glyoxalase II, beta-lactamase and arylsulfatases. Trends Biochem. Sci. 23, 381–382.

Mellmann, A., Mosters, J., Bartelt, E., Roggentin, P., Ammon, A., Friedrich, A.W., Karch, H., Harmsen, D., (2004). Sequence-Based Typing of flaB Is a More Stable Screening Tool Than Typing of flaA for Monitoring of Campylobacter Populations. J. Clin. Microbiol. 42, 4840–4842.

Mendes, R.E., Castanheira, M., Garcia, P., Guzman, M., Toleman, M.A., Walsh, T.R., Jones, R.N., SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, (2004β). First isolation of bla(VIM-2) in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 1433–1434.

Mendes, R.E., Kiyota, K.A., Monteiro, J., Castanheira, M., Andrade, S.S., Gales, A.C., Pignatari, A.C.C., Tufik, S., (2007). Rapid Detection and Identification of Metallo-β-Lactamase-

Encoding Genes by Multiplex Real-Time PCR Assay and Melt Curve Analysis. J. Clin. Microbiol. 45, 544–547.

Mendes, R.E., Toleman, M.A., Ribeiro, J., Sader, H.S., Jones, R.N., Walsh, T.R., (2004α). Integron Carrying a Novel Metallo-β-Lactamase Gene, blaIMP-16, and a Fused Form of Aminoglycoside-Resistant Gene aac(6′)-30/aac(6′)-Ib′: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Antimicrob Agents Chemother 48, 4693–4702.

Merkier, A.K., Catalano, M., Ramírez, M.S., Quiroga, C., Orman, B., Ratier, L., Famiglietti, A., Vay, C., Di Martino, A., Kaufman, S., Centrón, D., (2008). Polyclonal spread of bla(OXA-23) and bla(OXA-58) in *Acinetobacter baumannii* isolates from Argentina. J Infect Dev Ctries 2, 235–240.

Miriagou, V., Tzouvelekis, L.S., Rossiter, S., Tzelepi, E., Angulo, F.J., Whichard, J.M., (2003). Imipenem Resistance in a Salmonella Clinical Strain Due to Plasmid-Mediated Class A Carbapenemase KPC-2. Antimicrob. Agents Chemother. 47, 1297–1300.

Miyakis, S., Pefanis, A., Tsakris, A., (2011). The Challenges of Antimicrobial Drug Resistance in Greece. Clin Infect Dis. 53, 177–184.

Moland, E.S., Hanson, N.D., Herrera, V.L., Black, J.A., Lockhart, T.J., Hossain, A., Johnson, J.A., Goering, R.V., Thomson, K.S., (2003). Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing β-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. J. Antimicrob. Chemother. 51, 711–714.

Monecke, S., Coombs, G., Shore, A.C., Coleman, D.C., Akpaka, P., Borg, M., Chow, H., Ip, M., Jatzwauk, L., Jonas, D., Kadlec, K., Kearns, A., Laurent, F., O'Brien, F.G., Pearson, J., Ruppelt, A., Schwarz, S., Scicluna, E., Slickers, P., Tan, H.L., Weber, S., Ehricht, R., (2011). A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. PLoS ONE 6, e17936.

Mortimer, P., Arnold, C., (2001). FAFLP: last word in microbial genotyping? J. Med. Microbiol. 50, 393–395.

Moyes, R.B., Reynolds, J., Breakwell, D.P., (2009). Differential staining of bacteria: gram stain. Curr Protoc Microbiol Appendix 3, Appendix 3C

Mugnier, P.D., Poirel, L., Naas, T., Nordmann, P., (2010). Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. Emerging Infect. Dis. 16, 35–40.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 51 Pt 1, 263–273.

Murchan, S., Kaufmann, M.E., Deplano, A., de Ryck, R., Struelens, M., Zinn, C.E., Fussing, V., Salmenlinna, S., Vuopio-Varkila, J., El Solh, N., Cuny, C., Witte, W., Tassios, P.T., Legakis, N., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Vindel, A., Laconcha, I., Garaizar, J., Haeggman, S., Olsson-Liljequist, B., Ransjo, U., Coombes, G., Cookson, B., (2003). Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. J. Clin. Microbiol. 41, 1574–1585.

Murphy, T.A., Simm, A.M., Toleman, M.A., Jones, R.N., Walsh, T.R., (2003). Biochemical characterization of the acquired metallo-beta-lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 47, 582–587.

Naas, T., Bellais, S., Nordmann, P., (2003). Molecular and biochemical characterization of a carbapenem-hydrolysing beta-lactamase from Flavobacterium johnsoniae. J. Antimicrob. Chemother. 51, 267–273.

Naas, T., Livermore, D.M., Nordmann, P., (1995). Characterization of an LysR family protein, SmeR from Serratia marcescens S6, its effect on expression of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase Sme-1, and comparison of this regulator with other beta-lactamase regulators. Antimicrob. Agents Chemother. 39, 629–637.

Naas, T., Nordmann, P., (1994). Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. PNAS 91, 7693–7697.

Nemec, A., Dolzani, L., Brisse, S., van den Broek, P., Dijkshoorn, L., (2004). Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. J. Med. Microbiol. 53, 1233–1240.

Niumsup, P.R., Boonkerd, N., Tansawai, U., Tiloklurs, M., (2009). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 in Thailand. Jpn. J. Infect. Dis. 62, 152–154.

Nucleo, E., Steffanoni, L., Fugazza, G., Migliavacca, R., Giacobone, E., Navarra, A., Pagani, L., Landini, P., (2009). Growth in glucose-based medium and exposure to subinhibitory concentrations of imipenem induce biofilm formation in a multidrug-resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. BMC Microbiology 9, 270.

Núñez, L.E., Méndez, C., Braña, A.F., Blanco, G., Salas, J.A., (2003). The biosynthetic gene cluster for the beta-lactam carbapenem thienamycin in Streptomyces cattleya. Chem. Biol. 10, 301–311.

Oh, E.J., Lee, S., Park, Y.J., Park, J.J., Park, K., Kim, S.I., Kang, M.W., Kim, B.K., (2003). Prevalence of metallo-beta-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo-beta-lactamase. J. Microbiol. Methods 54, 411–418.

Olszewska, E., Jones, K., (1988). Vacuum blotting enhances nucleic acid transfer. Trends Genet. 4, 92–94.

Osano, E., Arakawa, Y., Wacharotayankun, R., Ohta, M., Horii, T., Ito, H., Yoshimura, F., Kato, N., (1994). Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of Serratia marcescens that shows imipenem resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 38, 71–78.

Paetzel, M., Danel, F., de Castro, L., Mosimann, S.C., Page, M.G., Strynadka, N.C., (2000). Crystal structure of the class D beta-lactamase OXA-10. Nat. Struct. Biol. 7, 918–925.

Page, C., Curtis, M., Walker, M., Hoffman, B., (2005). Integrated pharmacology, 2nd ed. Mosby, London.

Page, M.I., (1999). The reactivity of beta-lactams, the mechanism of catalysis and the inhibition of beta-lactamases. Curr. Pharm. Des. 5, 895–913.

Palzkill, T., (2013). Metallo-β-lactamase structure and function. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1277, 91–104.

Park, Y.K., Lee, G.H., Baek, J.Y., Chung, D.R., Peck, K.R., Song, J.H., Ko, K.S., (2010). A single clone of *Acinetobacter baumannii*, ST22, is responsible for high antimicrobial resistance rates of Acinetobacter spp. isolates that cause bacteremia and urinary tract infections in Korea. Microb. Drug Resist. 16, 143–149.

Park, Y.K., Peck, K.R., Cheong, H.S., Chung, D.R., Song, J.H., Ko, K.S., (2009). Extreme drug resistance in *Acinetobacter baumannii* infections in intensive care units, South Korea. Emerging Infect. Dis. 15, 1325–1327.

Park, Y.S., Lee, H., Chin, B.S., Han, S.H., Hong, S.G., Hong, S.K., Kim, H.Y., Uh, Y., Shin, H.B., Choo, E.J., Han, S.-H., Song, W., Jeong, S.H., Lee, K., Kim, J.M., (2011). Acquisition of extensive drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients: risk factors and resistance mechanisms to carbapenems. J. Hosp. Infect. 79, 54–58.

Parmar, J.S., Nasser, S., (2005). Antibiotic allergy in cystic fibrosis. Thorax 60, 517–520.

Partridge, S.R., Hall, R.M., (2003). The IS1111 family members IS4321 and IS5075 have subterminal inverted repeats and target the terminal inverted repeats of Tn21 family transposons. J. Bacteriol. 185, 6371–6384.

Partridge, S.R., Tsafnat, G., Coiera, E., Iredell, J.R., (2009). Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. FEMS Microbiol. Rev. 33, 757–784.

Pasteran, F., Faccone, D., Petroni, A., Rapoport, M., Galas, M., Vázquez, M., Procopio, A., (2005). Novel Variant (blaVIM-11) of the Metallo-β-Lactamase blaVIM Family in a GES-1 Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate in Argentina. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 474–475.

Paton, R., Miles, R.S., Hood, J., Amyes, S.G., Miles, R.S., Amyes, S.G., (1993). ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Int. J. Antimicrob. Agents 2, 81–87.

Patzer, J., Toleman, M.A., Deshpande, L.M., Kamińska, W., Dzierzanowska, D., Bennett, P.M., Jones, R.N., Walsh, T.R., (2004). *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring an unusual

blaVIM-4 gene cassette isolated from hospitalized children in Poland (1998-2001). J. Antimicrob. Chemother. 53, 451–456.

Patzer, J.A., Walsh, T.R., Weeks, J., Dzierzanowska, D., Toleman, M.A., (2009). Emergence and persistence of integron structures harbouring VIM genes in the Children's Memorial Health Institute, Warsaw, Poland, 1998-2006. J. Antimicrob. Chemother. 63, 269–273.

Payne, D.J., (1993). Metallo-beta-lactamases: a new therapeutic challenge. J. Med. Microbiol. 39, 93–99.

Pernot, L., Frénois, F., Rybkine, T., L'Hermite, G., Petrella, S., Delettré, J., Jarlier, V., Collatz, E., Sougakoff, W., (2001). Crystal structures of the class D beta-lactamase OXA-13 in the native form and in complex with meropenem. J. Mol. Biol. 310, 859–874.

Poirel, L., Brinas, L., Verlinde, A., Ide, L., Nordmann, P., (2005). BEL-1, a Novel Clavulanic Acid-Inhibited Extended-Spectrum β-Lactamase, and the Class 1 Integron In120 in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 3743–3748.

Poirel, L., Collet, L., Nordmann, P., (2000β). Carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. Emerging Infect. Dis. 6, 84–85.

Poirel, L., Héritier, C., Nordmann, P., (2004γ). Chromosome-encoded ambler class D beta-lactamase of Shewanella oneidensis as a progenitor of carbapenem-hydrolyzing oxacillinase. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 348–351.

Poirel, L., Héritier, C., Podglajen, I., Sougakoff, W., Gutmann, L., Nordmann, P., (2003). Emergence in *Klebsiella pneumoniae* of a Chromosome-Encoded SHV β-Lactamase That Compromises the Efficacy of Imipenem. Antimicrob. Agents Chemother. 47, 755–758.

Poirel, L., Héritier, C., Tolün, V., Nordmann, P., (2004δ). Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae* . Antimicrob. Agents Chemother. 48, 15–22.

Poirel, L., Lambert, T., Türkoglü, S., Ronco, E., Gaillard, J., Nordmann, P., (2001β). Characterization of Class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the bla(VIM-2)

carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 546–552.

Poirel, L., Magalhaes, M., Lopes, M., Nordmann, P., (2004β). Molecular analysis of metallo-beta-lactamase gene bla(SPM-1)-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 1406–1409.

Poirel, L., Marqué, S., Héritier, C., Segonds, C., Chabanon, G., Nordmann, P., (2005β). OXA-58, a novel class D {beta}-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 202–208.

Poirel, L., Nordmann, P., (2006). Genetic Structures at the Origin of Acquisition and Expression of the Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase Gene blaOXA-58 in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 1442–1448.

Poirel, L., Pham, J.N., Cabanne, L., Gatus, B.J., Bell, S.M., Nordmann, P., (2004α). Carbapenem-hydrolysing metallo-beta-lactamases from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolated in Australia. Pathology 36, 366–367.

Poirel, L., Rodríguez-Martínez, J.M., Al Naiemi, N., Debets-Ossenkopp, Y.J., Nordmann, P., (2010). Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo-beta-lactamase from a Pseudomonas stutzeri clinical isolate in the Netherlands. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 2420–2424.

Poirel, L., Thomas, I.L., Naas, T., Karim, A., Nordmann, P., (2000). Biochemical Sequence Analyses of GES-1, a Novel Class A Extended-Spectrum β-Lactamase, and the Class 1 Integron In52 from *Klebsiella pneumoniae* . Antimicrob. Agents Chemother. 44, 622–632.

Poirel, L., Weldhagen, G.F., Champs, C.D., Nordmann, P., (2002). A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum β-lactamase GES-2 in South Africa. J. Antimicrob. Chemother. 49, 561–565.

Poirel, L., Weldhagen, G.F., Naas, T., Champs, C.D., Dove, M.G., Nordmann, P., (2001). GES-2, a Class A β-Lactamase from*Pseudomonas aeruginosa* with Increased Hydrolysis of Imipenem. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 2598–2603.

Polotto, M., Casella, T., de Lucca Oliveira, M.G., Rúbio, F.G., Nogueira, M.L., de Almeida, M.T., Nogueira, M.C., (2012). Detection of P. aeruginosa harboring bla CTX-M-2, bla GES-1 and bla GES-5, bla IMP-1 and bla SPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. BMC Infect. Dis. 12, 176.

Pournaras, S., Maniati, M., Petinaki, E., Tzouvelekis, L.S., Tsakris, A., Legakis, N.J., Maniatis, A.N., (2003). Hospital outbreak of multiple clones of *Pseudomonas aeruginosa* carrying the unrelated metallo-beta-lactamase gene variants blaVIM-2 and blaVIM-4. J. Antimicrob. Chemother. 51, 1409–1414.

Pournaras, S., Maniati, M., Spanakis, N., Ikonomidis, A., Tassios, P.T., Tsakris, A., Legakis, N.J., Maniatis, A.N., (2005). Spread of efflux pump-overexpressing, non-metallo-beta-lactamase-producing, meropenem-resistant but ceftazidime-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* in a region with blaVIM endemicity. J. Antimicrob. Chemother. 56, 761–764.

Pournaras, S., Tsakris, A., Maniati, M., Tzouvelekis, L.S., Maniatis, A.N., (2002). Novel variant (bla(VIM-4)) of the metallo-beta-lactamase gene bla(VIM-1) in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 46, 4026–4028.

Prévost, G., Pottecher, B., Dahlet, M., Bientz, M., Mantz, J.M., Piémont, Y., (1991). Pulsed field gel electrophoresis as a new epidemiological tool for monitoring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. J. Hosp. Infect. 17, 255–269.

Prior, A.R., Roche, C., Lynch, M., Kelly, S., O'Rourke, K., Crowley, B., (2010). First identified case of VIM-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the Republic of Ireland associated with fatal outcome. Euro Surveill. 15.

Queenan, A.M., Bush, K., (2007). Carbapenemases: the Versatile β-Lactamases. Clin. Microbiol. Rev. 20, 440–458.

Queenan, A.M., Shang, W., Schreckenberger, P., Lolans, K., Bush, K., Quinn, J., (2006). SME-3, a Novel Member of the *Serratia marcescens* SME Family of Carbapenem-Hydrolyzing β-Lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 3485–3487.

Queenan, A.M., Torres-Viera, C., Gold, H.S., Carmeli, Y., Eliopoulos, G.M., Moellering, R.C., Quinn, J.P., Hindler, J., Medeiros, A.A., Bush, K., (2000). SME-Type Carbapenem-Hydrolyzing Class A β-Lactamases from Geographically Diverse *Serratia marcescens* Strains. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 3035–3039.

Quiroga, M.I., Franceschini, N., Rossolini, G.M., Gutkind, G., Bonfiglio, G., Franchino, L., Amicosante, G., (2000). Interaction of cefotetan and the metallo-beta-lactamases produced in *Aeromonas spp*. and in vitro activity. Chemotherapy 46, 177–183.

Rasmussen, B.A., Bush, K., (1997). Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 41, 223–232.

Rasmussen, B.A., Bush, K., Keeney, D., Yang, Y., Hare, R., O'Gara, C., Medeiros, A.A., (1996). Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. Antimicrob. Agents Chemother. 40, 2080–2086.

Riccio, M.L., Franceschini, N., Boschi, L., Caravelli, B., Cornaglia, G., Fontana, R., Amicosante, G., Rossolini, G.M., (2000). Characterization of the metallo-beta-lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of bla(IMP) allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 1229–1235.

Riccio, M.L., Pallecchi, L., Fontana, R., Rossolini, G.M., (2001). In70 of plasmid pAX22, a bla(VIM-1)-containing integron carrying a new aminoglycoside phosphotransferase gene cassette. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 1249–1253.

Rieber, H., Frontzek, A., von Baum, H., Pfeifer, Y., (2012). Emergence of metallo-β-lactamases GIM-1 and VIM in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in North Rhine-Westphalia, Germany. J. Antimicrob. Chemother. 67, 1043–1045.

Rossolini, G.M., Franceschini, N., Lauretti, L., Caravelli, B., Riccio, M.L., Galleni, M., Frère, J.M., Amicosante, G., (1999). Cloning of a *Chryseobacterium* (*Flavobacterium*) *meningosepticum* chromosomal gene (blaA(CME)) encoding an extended-spectrum class A beta-lactamase related to the Bacteroides cephalosporinases and the VEB-1 and PER beta-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 43, 2193–2199.

Roy-Burman, A., Savel, R.H., Racine, S., Swanson, B.L., Revadigar, N.S., Fujimoto, J., Sawa, T., Frank, D.W., Wiener-Kronish, J.P., (2001). Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections. J. Infect. Dis. 183, 1767–1774.

Sabat, A., Krzyszton-Russjan, J., Strzalka, W., Filipek, R., Kosowska, K., Hryniewicz, W., Travis, J., Potempa, J., (2003). New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. J. Clin. Microbiol. 41, 1801–1804.

Sabat, A.J., Budimir, A., Nashev, D., Sá-Leão, R., van Dijl, J. m, Laurent, F., Grundmann, H., Friedrich, A.W., ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM), (2013). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. Euro Surveill. 18, 20380.

Sabat, A.J., Chlebowicz, M.A., Grundmann, H., Arends, J.P., Kampinga, G., Meessen, N.E.L., Friedrich, A.W., van Dijl, J.M., (2012). Microfluidic-chip-based multiple-locus variable-number tandem-repeat fingerprinting with new primer sets for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 50, 2255–2262.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239, 487–491.

Saitou, N., Nei, M., (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4, 406–425.

Samuelsen, Ø., Toleman, M.A., Sundsfjord, A., Rydberg, J., Leegaard, T.M., Walder, M., Lia, A., Ranheim, T.E., Rajendra, Y., Hermansen, N.O., Walsh, T.R., Giske, C.G., (2010). Molecular Epidemiology of Metallo-β-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Norway and Sweden Shows Import of International Clones and Local Clonal Expansion. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 346–352.

Schouls, L.M., Spalburg, E.C., van Luit, M., Huijsdens, X.W., Pluister, G.N., van Santen-Verheuvel, M.G., van der Heide, H.G.J., Grundmann, H., Heck, M.E.O.C., de Neeling, A.J.,

(2009). Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis of *Staphylococcus aureus*: Comparison with Pulsed-Field Gel Electrophoresis and spa-Typing. PLoS ONE 4, e5082.

Schwaber, M.J., Lev, B., Israeli, A., Solter, E., Smollan, G., Rubinovitch, B., Shalit, I., Carmeli, Y., Israel Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Working Group, (2011). Containment of a country-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Israeli hospitals via a nationally implemented intervention. Clin. Infect. Dis. 52, 848–855.

Scoulica, E.V., Neonakis, I.K., Gikas, A.I., Tselentis, Y.J., (2004). Spread of bla(VIM-1)-producing *E. coli* in a university hospital in Greece. Genetic analysis of the integron carrying the bla(VIM-1) metallo-beta-lactamase gene. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 48, 167–172.

Segal, H., Garny, S., Elisha, B.G., (2005). Is IS(ABA-1) customized for Acinetobacter? FEMS Microbiol. Lett. 243, 425–429.

Segal, H., Nelson, E.C., Elisha, B.G., (2004). Genetic Environment and Transcription of ampC in an *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolate. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 612–614.

Sekiguchi, J., Morita, K., Kitao, T., Watanabe, N., Okazaki, M., Miyoshi-Akiyama, T., Kanamori, M., Kirikae, T., (2008). KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. Antimicrob. Agents Chemother. 52, 4194–4197.

Senda, K., Arakawa, Y., Ichiyama, S., Nakashima, K., Ito, H., Ohsuka, S., Shimokata, K., Kato, N., Ohta, M., (1996α). PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. J. Clin. Microbiol. 34, 2909–2913.

Senda, K., Arakawa, Y., Nakashima, K., Ito, H., Ichiyama, S., Shimokata, K., Kato, N., Ohta, M., (1996β). Multifocal outbreaks of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum beta-lactams, including carbapenems. Antimicrob. Agents Chemother. 40, 349–353.

Shibata, N., Doi, Y., Yamane, K., Yagi, T., Kurokawa, H., Shibayama, K., Kato, H., Kai, K., Arakawa, Y., (2003). PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. J. Clin. Microbiol. 41, 5407–5413.

Shimizu-Ibuka, A., Matsuzawa, H., Sakai, H., (2004). An engineered disulfide bond between residues 69 and 238 in extended-spectrum beta-lactamase Toho-1 reduces its activity toward third-generation cephalosporins. Biochemistry 43, 15737–15745.

Siarkou, V.I., Vitti, D., Protonotariou, E., Ikonomidis, A., Sofianou, D., (2009). Molecular epidemiology of outbreak-related *pseudomonas aeruginosa* strains carrying the novel variant blaVIM-17 metallo-beta-lactamase gene. Antimicrob. Agents Chemother. 53, 1325–1330.

Simm, A.M., Higgins, C.S., Pullan, S.T., Avison, M.B., Niumsup, P., Erdozain, O., Bennett, P.M., Walsh, T.R., (2001). A novel metallo-beta-lactamase, Mbl1b, produced by the environmental bacterium *Caulobacter crescentus*. FEBS Lett. 509, 350–354.

Smith, P.B., Tomfohrde, K.M., Rhoden, D.L., Balows, A., (1972). API System: a Multitube Micromethod for Identification of Enterobacteriaceae. Appl Microbiol 24, 449–452.

Sougakoff, W., L'Hermite, G., Pernot, L., Naas, T., Guillet, V., Nordmann, P., Jarlier, V., Delettré, J., (2002). Structure of the imipenem-hydrolyzing class A beta-lactamase SME-1 from *Serratia marcescens*. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 58, 267–274.

Sougakoff, W., Naas, T., Nordmann, P., Collatz, E., Jarlier, V., (1999). Role of ser-237 in the substrate specificity of the carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase Sme-1. Biochim. Biophys. Acta 1433, 153–158.

Souli, M., Galani, I., Antoniadou, A., Papadomichelakis, E., Poulakou, G., Panagea, T., Vourli, S., Zerva, L., Armaganidis, A., Kanellakopoulou, K., Giamarellou, H., (2010). An outbreak of infection due to beta-Lactamase *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. Clin. Infect. Dis. 50, 364–373.

Southern, E.M., (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503–517.

Spencer, J., Clarke, A.R., Walsh, T.R., (2001). Novel mechanism of hydrolysis of therapeutic beta-lactams by *Stenotrophomonas maltophilia* L1 metallo-beta-lactamase. J. Biol. Chem. 276, 33638–33644.

Steer, A.C., Law, I., Matatolu, L., Beall, B.W., Carapetis, J.R., (2009). Global emm type distribution of group A streptococci: systematic review and implications for vaccine development. Lancet Infect Dis 9, 611–616.

Stellwag, E.J., Dahlberg, A.E., (1980). Electrophoretic transfer of DNA, RNA and protein onto diazobenzyloxymethyl (DBM)-paper. Nucleic Acids Res. 8, 299–317.

Stoeva, T., Higgins, P.G., Bojkova, K., Seifert, H., (2008). Clonal spread of carbapenem-resistant OXA-23-positive *Acinetobacter baumannii* in a Bulgarian university hospital. Clin. Microbiol. Infect. 14, 723–727.

Struelens, M.J., (1996). Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. Clin. Microbiol. Infect. 2, 2–11.

Sun, T., Nukaga, M., Mayama, K., Braswell, E.H., Knox, J.R., (2003). Comparison of beta-lactamases of classes A and D: 1.5-A crystallographic structure of the class D OXA-1 oxacillinase. Protein Sci. 12, 82–91.

Swaminathan, B., Barrett, T.J., Hunter, S.B., Tauxe, R.V., (2001). PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. Emerging Infect. Dis. 7, 382–389.

Sykes, R.B., Matthew, M., (1976). The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. J. Antimicrob. Chemother. 2, 115–157.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24, 1596–1599.

Teh, C.S.J., Chua, K.H., Thong, K.L., (2011). Genetic variation analysis of *Vibrio cholerae* using multilocus sequencing typing and multi-virulence locus sequencing typing. Infect. Genet. Evol. 11, 1121–1128.

Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B., (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 33, 2233–2239.

Tenover, F.C., Kalsi, R.K., Williams, P.P., Carey, R.B., Stocker, S., Lonsway, D., Rasheed, J.K., Biddle, J.W., McGowan, J.E., Jr, Hanna, B., (2006). Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. Emerging Infect. Dis. 12, 1209–1213.

Toleman, M.A., Biedenbach, D., Bennett, D., Jones, R.N., Walsh, T.R., (2003). Genetic characterization of a novel metallo-beta-lactamase gene, blaIMP-13, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. J. Antimicrob. Chemother. 52, 583–590.

Toleman, M.A., Rolston, K., Jones, R.N., Walsh, T.R., (2004). blaVIM-7, an evolutionarily distinct metallo-beta-lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 329–332.

Toleman, M.A., Simm, A.M., Murphy, T.A., Gales, A.C., Biedenbach, D.J., Jones, R.N., Walsh, T.R., (2002). Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. J. Antimicrob. Chemother. 50, 673–679.

Tosh, P.K., Disbot, M., Duffy, J.M., Boom, M.L., Heseltine, G., Srinivasan, A., Gould, C.V., Berríos-Torres, S.I., (2011). Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* surgical site infections after arthroscopic procedures: Texas, 2009. Infect Control Hosp Epidemiol 32, 1179–1186.

Tóth, A., Damjanova, I., Puskás, E., Jánvári, L., Farkas, M., Dobák, A., Böröcz, K., Pászti, J., (2010). Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 29, 765–769.

Towner, K.J., Gee, T., Boswell, T., (2002). An unwanted import to the UK: a carbapenem-resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* producing metallo-beta-lactamase. J. Antimicrob. Chemother. 50, 1092–1093.

Trnovsky, J., (1992). Semi-dry electroblotting of DNA and RNA from agarose and polyacrylamide gels. BioTechniques 13, 800–804.

Tsakris, A., Ikonomidis, A., Poulou, A., Spanakis, N., Vrizas, D., Diomidous, M., Pournaras, S., Markou, F., (2008). Clusters of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones producing different carbapenemases in an intensive care unit. Clinical Microbiology and Infection 14, 588–594.

Tsakris, A., Poulou, A., Pournaras, S., Voulgari, E., Vrioni, G., Themeli-Digalaki, K., Petropoulou, D., Sofianou, D., (2010). A simple phenotypic method for the differentiation of metallo-beta-lactamases and class A KPC carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates. J. Antimicrob. Chemother. 65, 1664–1671.

Tsakris, A., Pournaras, S., Woodford, N., Palepou, M.-F.I., Babini, G.S., Douboyas, J., Livermore, D.M., (2000). Outbreak of Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa* Producing VIM-1 Carbapenemase in Greece. J. Clin. Microbiol. 38, 1290–1292.

Tseng, S.P., Hsueh, P.R., Tsai, J.C., Teng, L.J., (2007). Tn6001, a transposon-like element containing the blaVIM-3-harboring integron In450. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 4187–4190.

Turton, J.F., Gabriel, S.N., Valderrey, C., Kaufmann, M.E., Pitt, T.L., (2007). Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. Clin. Microbiol. Infect. 13, 807–815.

Turton, J.F., Ward, M.E., Woodford, N., Kaufmann, M.E., Pike, R., Livermore, D.M., Pitt, T.L., (2006). The role of ISAba1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiology Letters 258, 72–77.

Tysall, L., Stockdale, M.W., Chadwick, P.R., Palepou, M.-F.I., Towner, K.J., Livermore, D.M., Woodford, N., (2002). IMP-1 carbapenemase detected in an Acinetobacter clinical isolate from the UK. J. Antimicrob. Chemother. 49, 217–218.

Umscheid, C.A., Mitchell, M.D., Doshi, J.A., Agarwal, R., Williams, K., Brennan, P.J., 2011. Estimating the proportion of healthcare-associated infections that are reasonably preventable and the related mortality and costs. Infect Control Hosp Epidemiol 32, 101–114.

Urwin, R., Maiden, M.C.J., (2003). Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. Trends Microbiol. 11, 479–487.

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

Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K.E., Nelson, W., Fouts, D.E., Levy, S., Knap, A.H., Lomas, M.W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.-H., Smith, H.O., (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. Science 304, 66–74.

Verghese, B., Schwalm, N.D., 3rd, Dudley, E.G., Knabel, S.J., (2012). A combined multi-virulence-locus sequence typing and Staphylococcal Cassette Chromosome mec typing scheme possesses enhanced discriminatory power for genotyping MRSA. Infect. Genet. Evol. 12, 1816–1821.

Vernet, G., Saha, S., Satzke, C., Burgess, D.H., Alderson, M., Maisonneuve, J.-F., Beall, B.W., Steinhoff, M.C., Klugman, K.P., (2011). Laboratory-based diagnosis of pneumococcal pneumonia: state of the art and unmet needs. Clin. Microbiol. Infect. 17 Suppl 3, 1–13.

Versalovic, J., Kapur, V., Koeuth, T., Mazurek, G.H., Whittam, T.S., Musser, J.M., Lupski, J.R., (1995). DNA fingerprinting of pathogenic bacteria by fluorophore-enhanced repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Arch. Pathol. Lab. Med. 119, 23–29.

Villalón, P., Valdezate, S., Medina-Pascual, M.J., Carrasco, G., Vindel, A., Saez-Nieto, J.A., (2012). Epidemiology of the Acinetobacter-derived cephalosporinase, carbapenem-hydrolysing oxacillinase and metallo-β-lactamase genes, and of common insertion sequences, in epidemic clones of *Acinetobacter baumannii* from Spain. J. Antimicrob. Chemother.

Villegas, M.V., Lolans, K., Correa, A., Kattan, J.N., Lopez, J.A., Quinn, J.P., (2007). First Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Producing a KPC-Type Carbapenem-Hydrolyzing β-Lactamase. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 1553–1555.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23, 4407–4414.

Vourli, S., Giakkoupi, P., Miriagou, V., Tzelepi, E., Vatopoulos, A.C., Tzouvelekis, L.S., (2004). Novel GES/IBC extended-spectrum beta-lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. FEMS Microbiol. Lett. 234, 209–213.

Wachino, J., Doi, Y., Yamane, K., Shibata, N., Yagi, T., Kubota, T., Ito, H., Arakawa, Y., (20040. Nosocomial Spread of Ceftazidime-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains Producing a Novel Class A β-Lactamase, GES-3, in a Neonatal Intensive Care Unit in Japan. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 1960–1967.

Walsh, T.R., Hall, L., Assinder, S.J., Nichols, W.W., Cartwright, S.J., MacGowan, A.P., Bennett, P.M., (1994). Sequence analysis of the L1 metallo-beta-lactamase from *Xanthomonas maltophilia*. Biochim. Biophys. Acta 1218, 199–201.

Walsh, T.R., MacGowan, A.P., Bennett, P.M., (1997). Sequence analysis and enzyme kinetics of the L2 serine beta-lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob. Agents Chemother. 41, 1460–1464.

Walsh, T.R., Toleman, M.A., Hryniewicz, W., Bennett, P.M., Jones, R.N., (2003). Evolution of an integron carrying blaVIM-2 in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. J. Antimicrob. Chemother. 52, 116–119.

Walsh, T.R., Toleman, M.A., Poirel, L., Nordmann, P., (2005). Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? Clin. Microbiol. Rev. 18, 306–325.

Walther-Rasmussen, J., Høiby, N., (2006). OXA-type carbapenemases. J. Antimicrob. Chemother. 57, 373–383.

Walther-Rasmussen, J., Høiby, N., (2007). Class A carbapenemases. J. Antimicrob. Chemother. 60, 470–482.

Wang, Z., Fast, W., Valentine, A.M., Benkovic, S.J., (1999). Metallo-beta-lactamase: structure and mechanism. Curr Opin Chem Biol 3, 614–622.

Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M., Mitsuhashi, S., (1991). Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 35, 147–151.

Wilson, M.K., Lane, A.B., Law, B.F., Miller, W.G., Joens, L.A., Konkel, M.E., White, B.A., (2009). Analysis of the Pan Genome of Campylobacter jejuni Isolates Recovered from Poultry by Pulsed-Field Gel Electrophoresis, Multilocus Sequence Typing (MLST), and Repetitive Sequence Polymerase Chain Reaction (rep-PCR) Reveals Different Discriminatory Capabilities. Microb Ecol 58, 843–855.

Woodford, N., Zhang, J., Warner, M., Kaufmann, M.E., Matos, J., Macdonald, A., Brudney, D., Sompolinsky, D., Navon-Venezia, S., Livermore, D.M., (2008). Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. J. Antimicrob. Chemother. 62, 1261–1264.

Yan, J.J., Hsueh, P.R., Ko, W.C., Luh, K.T., Tsai, S.H., Wu, H.M., Wu, J.J., (2001β). Metallo-beta-lactamases in clinical Pseudomonas isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 2224–2228.

Yan, J.J., Ko, W.-C., Chuang, C.L., Wu, J.J., (2002). Metallo-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates in a university hospital in Taiwan: prevalence of IMP-8 in *Enterobacter cloacae* and first identification of VIM-2 in *Citrobacter freundii*. J. Antimicrob. Chemother. 50, 503–511.

Yan, J.J., Ko, W.C., Tsai, S.H., Wu, H.M., Wu, J.J., (2001α). Outbreak of infection with multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying bla(IMP-8) in a university medical center in Taiwan. J. Clin. Microbiol. 39, 4433–4439.

Yan, Z.Q., Shen, D.X., Cao, J.R., Chen, R., Wei, X., Liu, L.P., Xu, X.L., (2010). Susceptibility patterns and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains from three military hospitals in China. Int. J. Antimicrob. Agents 35, 269–273.

Yang, Y.J., Wu, P.J., Livermore, D.M., (1990). Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 34, 755–758.

Yano, H., Kuga, A., Okamoto, R., Kitasato, H., Kobayashi, T., Inoue, M., (2001). Plasmid-encoded metallo-beta-lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 1343–1348.

Yatsuyanagi, J., Saito, S., Harata, S., Suzuki, N., Ito, Y., Amano, K.I., Enomoto, K., (2004). Class 1 integron containing metallo-beta-lactamase gene blaVIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated in Japan. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 626–628.

Yigit, H., Queenan, A.M., Anderson, G.J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J.W., Steward, C.D., Alberti, S., Bush, K., Tenover, F.C., (2001). Novel Carbapenem-Hydrolyzing β-Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 1151–1161.

Yigit, H., Queenan, A.M., Rasheed, J.K., Biddle, J.W., Domenech-Sanchez, A., Alberti, S., Bush, K., Tenover, F.C., (2003). Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella oxytoca* Harboring Carbapenem-Hydrolyzingβ -Lactamase KPC-2. Antimicrob. Agents Chemother. 47, 3881–3889.

Yong, D., Toleman, M.A., Bell, J., Ritchie, B., Pratt, R., Ryley, H., Walsh, T.R., (2012). Genetic and biochemical characterization of an acquired subgroup B3 metallo-β-lactamase gene, blaAIM-1, and its unique genetic context in Pseudomonas aeruginosa from Australia. Antimicrob. Agents Chemother. 56, 6154–6159.

Yong, D., Toleman, M.A., Giske, C.G., Cho, H.S., Sundman, K., Lee, K., Walsh, T.R., (2009). Characterization of a New Metallo-β-Lactamase Gene, blaNDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. Antimicrob Agents Chemother 53, 5046–5054.

Yu, F., Ying, Q., Chen, C., Li, T., Ding, B., Liu, Y., Lu, Y., Qin, Z., Parsons, C., Salgado, C., Qu, D., Pan, J., Wang, L., (2012). Outbreak of pulmonary infection caused by *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring blaIMP-4 and blaDHA-1 in a neonatal intensive care unit in China. J Med Microbiol.

Yu, Y.S., Du, X.X., Zhou, Z.-H., Chen, Y.G., Li, L.J., (2006). First Isolation of blaIMI-2 in an *Enterobacter cloacae* Clinical Isolate from China. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 1610–1611.

Yum, J.H., Yong, D., Lee, K., Kim, H.S., Chong, Y., (2002). A new integron carrying VIM-2 metallo-beta-lactamase gene cassette in a *Serratia marcescens* isolate. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 42, 217–219.

Zarrilli, R., Vitale, D., Popolo, A.D., Bagattini, M., Daoud, Z., Khan, A.U., Afif, C., Triassi, M., (2008). A Plasmid-Borne blaOXA-58 Gene Confers Imipenem Resistance to *Acinetobacter baumannii* Isolates from a Lebanese Hospital. Antimicrob. Agents Chemother. 52, 4115–4120.

Zhang, W., Jayarao, B.M., Knabel, S.J., (2004). Multi-virulence-locus sequence typing of *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 70, 913–920.

Zhao, S., Mitchell, S.E., Meng, J., Kresovich, S., Doyle, M.P., Dean, R.E., Casa, A.M., Weller, J.W., (2000). Genomic typing of *Escherichia coli* O157:H7 by semi-automated fluorescent AFLP analysis. Microbes Infect. 2, 107–113.

Zhou, H., Pi, B.R., Yang, Q., Yu, Y.S., Chen, Y.G., Li, L.J., Zheng, S.S., (2007). Dissemination of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains carrying the ISAba1 blaOXA-23 genes in a Chinese hospital. J. Med. Microbiol. 56, 1076–1080.

Παράρτημα

6.1 Ανάλυση eBURST στελεχών A. baumannii

eBURST Report - Sat Feb 09 21:30:31 EET 2013

No. isolates = 233 | No. STs = 233 | No. re-samplings for bootstrapping = 1000

No. loci per isolate = 7 | No. identical loci for group def = 6 | No. groups = 32

Group 1: No. Isolates = 20 | No. STs = 20 | Predicted Founder = 1

						Average		ST Bootstrap	
ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance		Group	Subgrp
1	1	12	5	1	1	1.52	100%	100%	
19	1	5	10	2	2	2.10	22%	41%	
202	1	4	11	2	2	2.15	9%	4%	
230	1	3	12	2	2	2.21	0%	0%	
7	1	3	11	5	0	2.10	2%	0%	
81	1	3	11	5	0	2.10	3%	0%	
20	1	3	11	3	2	2.26	4%	0%	
231	1	3	10	5	1	2.21	0%	0%	
160	1	3	10	5	1	2.21	0%	0%	
101	1	3	3	9	4	2.73	8%	10%	
8	1	2	12	5	0	2.15	0%	0%	
125	1	2	12	3	2	2.31	0%	0%	
116	1	2	11	5	1	2.26	0%	0%	
100	1	2	3	4	10	3.31	0%	0%	
233	1	1	13	3	2	2.36	0%	0%	
174	1	1	7	7	4	2.78	0%	0%	
173	1	1	5	10	3	2.94	0%	0%	
94	1	1	5	10	3	2.94	0%	0%	
194	1	1	3	11	4	3.10	0%	0%	
102	1	1	1	3	14	4.26	0%	0%	

Group 2: No. Isolates = 15 | No. STs = 15 | Predicted Founder = 2

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
2	1	12	2	0	0	1.14	100%	100%	
104	1	4	8	2	0	1.85	4%	11%	
187	1	4	8	2	0	1.85	3%	11%	
185	1	4	8	2	0	1.85	6%	11%	
143	1	4	8	2	0	1.85	8%	11%	
98	1	3	10	1	0	1.85	14%	0%	
183	1	3	9	2	0	1.92	1%	0%	
47	1	3	9	2	0	1.92	3%	0%	
45	1	3	9	2	0	1.92	6%	0%	
97	1	2	12	0	0	1.85	0%	0%	
184	1	2	11	1	0	1.92	0%	0%	
195	1	2	11	1	0	1.92	0%	0%	
96	1	2	2	10	0	2.57	2%	0%	
115	1	1	11	2	0	2.07	0%	0%	
196	1	1	2	11	0	2.71	0%	0%	

Group 3: No. Isolates = 11 | No. STs = 11 | Predicted Founder = 79

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
79	1	5	1	3	1	2.0	62%	71%	
167	1	4	2	4	0	2.0	32%	37%	
109	1	4	2	3	1	2.1	36%	45%	
170	1	3	3	4	0	2.1	6%	4%	
175	1	3	3	3	1	2.2	5%	4%	
166	1	3	3	3	1	2.2	4%	3%	
168	1	3	2	4	1	2.3	0%	3%	
171	1	3	2	4	1	2.3	1%	4%	
169	1	2	7	1	0	1.9	0%	0%	

156	1	1	4	2	3	2.7	0%	0%
83	1	1	3	3	3	2.8	0%	0%

Group 4: No. Isolates = 8 | No. STs = 8 | Predicted Founder = 32

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
32	1	3	1	1	2	2.28	49%	21%	
53	1	2	3	1	1	2.14	14%	0%	
212	1	2	2	3	0	2.14	15%	0%	
36	1	2	2	2	1	2.28	20%	0%	
105	1	2	1	1	3	2.71	18%	0%	
128	1	1	2	2	2	2.71	0%	0%	
28	1	1	2	1	3	2.85	0%	0%	
40	1	1	1	1	4	3.14	0%	0%	

Group 5: No. Isolates = 6 | No. STs = 6 | Predicted Founder = 15

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
15	1	4	1	0	0	1.2	85%	50%	
180	1	2	3	0	0	1.6	6%	0%	
232	1	1	3	1	0	2.0	0%	0%	
84	1	1	3	1	0	2.0	0%	0%	
165	1	1	3	1	0	2.0	0%	0%	
182	1	1	1	3	0	2.4	0%	0%	

Group 6: No. Isolates = 6 | No. STs = 6 | Predicted Founder = 216

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
216	1	4	1	0	0	1.2	74%	49%	
203	1	3	2	0	0	1.4	35%	17%	
58	1	2	3	0	0	1.6	1%	0%	

146	1	1	3	1	0	2.0	0%	0%
145	1	1	3	1	0	2.0	0%	0%
37	1	1	2	2	0	2.2	0%	0%

Group 7: No. Isolates = 5 | No. STs = 5 | Predicted Founder = Multiple Candidates

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
124	1	3	1	0	0	1.25	46%	19%
3	1	3	1	0	0	1.25	48%	17%
181	1	2	2	0	0	1.5	3%	0%
229	1	1	2	1	0	2.0	0%	0%
14	1	1	2	1	0	2.0	0%	0%

Group 8: No. Isolates = 5 | No. STs = 5 | Predicted Founder = 33

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
33	1	3	1	0	0	1.25	62%	16%
213	1	2	2	0	0	1.5	17%	0%
151	1	1	2	1	0	2.0	0%	0%
132	1	1	2	1	0	2.0	0%	0%
138	1	1	1	2	0	2.25	0%	0%

Group 9: No. Isolates = 4 | No. STs = 4 | Predicted Founder = 121

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
121	1	3	0	0	0	1.0	60%	12%
93	1	2	1	0	0	1.33	4%	0%
210	1	2	1	0	0	1.33	10%	0%
122	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%

Group 10: No. Isolates = 4 | No. STs = 4 | Predicted Founder = 113

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
113	1	3	0	0	0	1.0	76%	15%	
197	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%	
178	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%	
114	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%	

Group 11: No. Isolates = 4 | No. STs = 4 | Predicted Founder = Multiple Candidates

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
64	1	2	1	0	0	1.33	30%	0%	
63	1	2	1	0	0	1.33	24%	0%	
75	1	1	1	1	0	2.0	0%	0%	
208	1	1	1	1	0	2.0	0%	0%	

Group 12: No. Isolates = 4 | No. STs = 4 | Predicted Founder = Multiple Candidates

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
130	1	2	1	0	0	1.33	27%	0%	
34	1	2	1	0	0	1.33	26%	0%	
153	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%	
120	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%	

Group 13: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 198

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
198	1	2	0	0	0	1.0	31%	0%	
199	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	
65	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	

Group 14: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 10

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
10	1	2	0	0	0	1.0	32%	0%	
82	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	
23	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	

Group 15: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 207

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
207	1	2	0	0	0	1.0	29%	0%	
227	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	
220	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	

Group 16: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 70

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
70	1	2	0	0	0	1.0	32%	0%	
225	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	
205	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	

Group 17: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 162

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
162	1	2	0	0	0	1.0	33%	0%	
189	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	
163	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	

Group 18: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 215

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp

215	1	2	0	0	0	1.0	31%	0%
144	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
127	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 19: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
108	1	1	0	0	0	1.0
112	1	1	0	0	0	1.0

Group 20: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
99	1	1	0	0	0	1.0
54	1	1	0	0	0	1.0

Group 21: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
95	1	1	0	0	0	1.0
157	1	1	0	0	0	1.0

Group 22: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
85	1	1	0	0	0	1.0
6	1	1	0	0	0	1.0

Group 23: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
228	1	1	0	0	0	1.0
25	1	1	0	0	0	1.0

Group 24: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance

221	1	1	0	0	0	1.0
133	1	1	0	0	0	1.0

Group 25: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
186	1	1	0	0	0	1.0
49	1	1	0	0	0	1.0

Group 26: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
73	1	1	0	0	0	1.0
214	1	1	0	0	0	1.0

Group 27: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
71	1	1	0	0	0	1.0
161	1	1	0	0	0	1.0

Group 28: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
217	1	1	0	0	0	1.0
68	1	1	0	0	0	1.0

Group 29: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
69	1	1	0	0	0	1.0
201	1	1	0	0	0	1.0

Group 30: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
67	1	1	0	0	0	1.0

66	1	1	0	0	0	1.0

Group 31: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
59	1	1	0	0	0	1.0
136	1	1	0	0	0	1.0

Group 32: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
46	1	1	0	0	0	1.0
149	1	1	0	0	0	1.0

Singletons: size 95

107, 106, 103, 92, 91, 90, 193, 192, 191, 190, 89, 88, 87, 86, 80, 226, 224, 223, 222, 188, 78, 77, 76, 74, 72, 219, 218, 211, 179, 177, 176, 172, 62, 61, 60, 209, 206, 204, 200, 164, 57, 56, 55, 52, 51, 50, 159, 158, 155, 154, 152, 150, 48, 44, 43, 42, 41, 148, 147, 142, 141, 140, 39, 38, 35, 31, 30, 139, 137, 135, 134, 131, 29, 27, 26, 24, 22, 21, 9, 129, 5, 4, 126, 123, 18, 17, 16, 13, 12, 11, 119, 118, 117, 111, 110.

6.2 Ανάλυση eBURST στελεχών P. aeruginisa

eBURST Report - Sun Jun 02 05:21:22 EEST 2013
No. isolates = 1565 | No. STs = 1565 | No. re-samplings for bootstrapping = 1000
No. loci per isolate = 7 | No. identical loci for group def = 6 | No. groups = 246

Group 1: No. Isolates = 65 | No. STs = 65 | Predicted Founder = 833

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
833	1	10	20	12	22	2.79	71%	95%	
111	1	9	3	6	46	3.89	38%	99%	
241	1	8	14	25	17	2.90	17%	78%	
653	1	7	16	15	26	3.07	7%	57%	
641	1	7	10	16	31	3.29	10%	80%	
775	1	6	16	16	26	3.12	0%	25%	
687	1	5	16	25	18	2.92	1%	49%	
803	1	5	10	22	27	3.17	2%	58%	

1492	1	5	8	12	39	3.65	0%	18%
772	1	5	7	7	45	3.93	0%	16%
1524	1	5	7	6	46	3.95	0%	17%
146	1	5	6	7	46	3.90	2%	66%
247	1	4	17	17	26	3.17	0%	0%
683	1	4	9	22	29	3.26	0%	18%
471	1	4	8	23	29	3.31	0%	17%
1075	1	4	8	6	46	3.96	0%	0%
412	1	4	5	16	39	3.90	0%	18%
1202	1	3	11	19	31	3.54	0%	0%
562	1	3	11	18	32	3.37	0%	7%
680	1	3	8	8	45	3.92	0%	4%
102	1	3	7	14	40	3.79	0%	5%
808	1	3	6	20	35	3.68	0%	2%
1451	1	2	15	16	31	3.37	0%	0%
834	1	2	12	22	28	3.48	0%	0%
839	1	2	12	17	33	3.59	0%	0%
1442	1	2	9	24	29	3.35	0%	0%
269	1	2	9	18	35	3.60	0%	0%
814	1	2	9	7	46	4.03	0%	0%
686	1	2	7	25	30	3.37	0%	0%
914	1	2	7	20	35	3.68	0%	0%
886	1	2	7	19	36	3.59	0%	0%
509	1	2	7	16	39	3.93	0%	0%
1245	1	2	7	10	45	4.07	0%	0%
1166	1	2	7	10	45	4.09	0%	0%
1082	1	2	6	11	45	4.0	0%	0%
973	1	2	6	11	45	4.0	0%	0%
589	1	2	4	14	44	3.87	0%	0%
866	1	2	4	14	44	3.87	0%	0%
414	1	2	4	5	53	4.75	0%	0%
232	1	2	3	20	39	3.73	0%	0%
1505	1	2	3	7	52	4.67	0%	0%
508	1	2	2	11	49	4.12	0%	0%
635	1	2	1	6	55	4.76	0%	0%
739	1	1	10	29	24	3.28	0%	0%
883	1	1	9	16	38	3.70	0%	0%
283	1	1	9	8	46	4.04	0%	0%
934	1	1	8	18	37	3.57	0%	0%
284	1	1	8	7	48	4.14	0%	0%
113	1	1	8	3	52	4.67	0%	0%
966	1	1	8	3	52	4.75	0%	0%
421	1	1	6	14	43	4.15	0%	0%
970	1	1	6	14	43	3.81	0%	0%
791	1	1	5	15	43	3.75	0%	0%
819	1	1	5	12	46	4.10	0%	0%

681	1	1	5	5	53	4.48	0%	0%
374	1	1	4	8	51	4.21	0%	0%
1065	1	1	4	7	52	4.64	0%	0%
1083	1	1	3	10	50	4.48	0%	0%
1164	1	1	3	9	51	4.65	0%	0%
50	1	1	2	15	46	4.40	0%	0%
669	1	1	2	10	51	4.14	0%	0%
418	1	1	2	3	58	5.31	0%	0%
937	1	1	1	6	56	4.40	0%	0%
577	1	1	1	4	58	4.43	0%	0%
480	1	1	1	1	61	5.04	0%	0%

Group 2: No. Isolates = 30 | No. STs = 30 | Predicted Founder = 17

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
17	1	15	3	2	9	2.24	97%	99%
27	1	8	3	4	14	2.96	24%	94%
187	1	7	13	5	4	2.20	13%	30%
845	1	6	14	4	5	2.31	7%	48%
157	1	6	12	2	9	2.55	0%	14%
445	1	6	12	2	9	2.55	0%	14%
339	1	6	12	2	9	2.55	0%	14%
1557	1	6	12	2	9	2.55	0%	12%
1529	1	6	12	2	9	2.55	1%	14%
321	1	6	10	12	1	2.27	8%	47%
129	1	4	5	3	17	3.27	0%	13%
318	1	3	15	2	9	2.65	0%	0%
1163	1	3	15	2	9	2.65	0%	0%
688	1	3	12	3	11	3.10	0%	0%
958	1	3	12	3	11	3.10	0%	0%
202	1	3	12	3	11	3.10	0%	0%
449	1	3	11	11	4	2.55	0%	2%
380	1	3	11	10	5	2.62	0%	0%
1132	1	3	11	10	5	2.62	0%	0%
119	1	3	6	3	17	3.31	0%	0%
1402	1	3	6	3	17	3.31	0%	0%
322	1	2	13	5	9	2.79	0%	0%
636	1	2	13	5	9	2.79	0%	0%
182	1	2	6	16	5	2.82	0%	0%
700	1	2	6	6	15	3.31	0%	0%
334	1	2	6	6	15	3.31	0%	0%
1313	1	1	14	3	11	3.20	0%	0%
294	1	1	9	5	14	3.24	0%	0%
120	1	1	7	3	18	3.93	0%	0%
1382	1	1	3	5	20	4.13	0%	0%

Group 3: No. Isolates = 27 | No. STs = 27 | Predicted Founder = 235

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
235	1	23	3	0	0	1.11	100%	100%	
1081	1	7	18	1	0	1.76	27%	54%	
1015	1	6	17	3	0	1.88	0%	25%	
651	1	6	17	3	0	1.88	0%	26%	
989	1	6	17	3	0	1.88	1%	26%	
976	1	6	17	3	0	1.88	1%	26%	
1162	1	6	17	3	0	1.88	2%	26%	
533	1	6	17	3	0	1.88	7%	26%	
141	1	5	20	1	0	1.84	0%	5%	
745	1	5	20	1	0	1.84	0%	4%	
696	1	5	20	1	0	1.84	0%	5%	
1457	1	5	20	1	0	1.84	1%	4%	
622	1	4	20	2	0	1.92	4%	9%	
457	1	4	19	3	0	1.96	0%	8%	
1140	1	4	19	3	0	1.96	0%	8%	
230	1	4	19	3	0	1.96	1%	8%	
824	1	4	19	3	0	1.96	1%	8%	
660	1	3	21	2	0	1.96	0%	0%	
342	1	3	21	2	0	1.96	0%	0%	
323	1	3	21	2	0	1.96	0%	0%	
304	1	3	21	2	0	1.96	0%	0%	
593	1	3	21	2	0	1.96	0%	0%	
534	1	3	21	2	0	1.96	0%	0%	
227	1	2	22	2	0	2.0	0%	0%	
1300	1	2	4	18	2	2.76	0%	0%	
85	1	1	9	15	1	2.61	0%	0%	
657	1	1	6	18	1	2.73	0%	0%	

Group 4: No. Isolates = 25 | No. STs = 25 | Predicted Founder = 244

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
244	1	18	6	0	0	1.25	100%	100%	
441	1	6	16	2	0	1.83	11%	21%	
766	1	6	16	2	0	1.83	14%	24%	
594	1	6	16	2	0	1.83	14%	22%	
1481	1	5	17	2	0	1.87	0%	1%	
595	1	5	17	2	0	1.87	1%	1%	
1484	1	5	16	3	0	1.91	9%	25%	
1038	1	4	17	3	0	1.95	0%	3%	
630	1	4	17	3	0	1.95	0%	3%	
1423	1	4	17	3	0	1.95	0%	3%	
1227	1	4	16	4	0	2.0	2%	9%	
597	1	4	16	4	0	2.0	2%	10%	

336	1	4	15	5	0	2.04	0%	10%
990	1	4	15	5	0	2.04	0%	10%
1181	1	4	15	5	0	2.04	0%	10%
1412	1	4	15	5	0	2.04	1%	10%
1338	1	3	17	4	0	2.04	0%	0%
986	1	2	17	5	0	2.12	0%	0%
462	1	2	5	15	2	2.70	0%	0%
1531	1	1	18	5	0	2.16	0%	0%
1161	1	1	10	12	1	2.54	0%	0%
1467	1	1	10	12	1	2.54	0%	0%
752	1	1	9	12	2	2.62	0%	0%
1037	1	1	7	14	2	2.70	0%	0%
1530	1	1	4	15	4	2.91	0%	0%

Group 5: No. Isolates = 18 | No. STs = 18 | Predicted Founder = 155

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
155	1	16	1	0	0	1.05	100%	100%	
210	1	4	13	0	0	1.76	21%	11%	
461	1	4	12	1	0	1.82	2%	10%	
13	1	4	12	1	0	1.82	3%	10%	
280	1	4	12	1	0	1.82	5%	10%	
579	1	4	12	1	0	1.82	9%	11%	
786	1	3	14	0	0	1.82	1%	0%	
1499	1	3	14	0	0	1.82	2%	0%	
1335	1	2	15	0	0	1.88	0%	0%	
811	1	2	15	0	0	1.88	0%	0%	
1010	1	2	14	1	0	1.94	0%	0%	
1341	1	2	14	1	0	1.94	0%	0%	
1316	1	2	14	1	0	1.94	0%	0%	
1276	1	2	14	1	0	1.94	0%	0%	
677	1	2	14	1	0	1.94	0%	0%	
250	1	2	14	1	0	1.94	0%	0%	
541	1	1	15	1	0	2.0	0%	0%	
1388	1	1	5	11	0	2.58	0%	0%	

Group 6: No. Isolates = 17 | No. STs = 17 | Predicted Founder = 274

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
274	1	16	0	0	0	1.0	99%	99%	
466	1	6	10	0	0	1.62	4%	29%	
1326	1	6	10	0	0	1.62	3%	28%	
1291	1	6	10	0	0	1.62	5%	31%	
276	1	6	10	0	0	1.62	8%	28%	
209	1	6	10	0	0	1.62	10%	30%	
1438	1	6	10	0	0	1.62	16%	28%	

1301	1	3	13	0	0	1.81	0%	0%
1533	1	3	13	0	0	1.81	1%	0%
546	1	3	13	0	0	1.81	3%	0%
1303	1	2	14	0	0	1.87	0%	0%
268	1	2	14	0	0	1.87	0%	0%
1466	1	2	14	0	0	1.87	0%	0%
1421	1	2	14	0	0	1.87	0%	0%
1068	1	1	15	0	0	1.93	0%	0%
1043	1	1	15	0	0	1.93	0%	0%
936	1	1	15	0	0	1.93	0%	0%

Group 7: No. Isolates = 16 | No. STs = 16 | Predicted Founder = 179

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
179	1	11	4	0	0	1.26	99%	99%
156	1	5	9	1	0	1.73	28%	43%
180	1	4	9	2	0	1.86	10%	11%
158	1	4	9	2	0	1.86	11%	11%
353	1	3	11	1	0	1.86	0%	0%
1494	1	3	11	1	0	1.86	0%	0%
1496	1	3	10	2	0	1.93	0%	0%
178	1	2	10	3	0	2.06	0%	0%
1305	1	2	10	3	0	2.06	0%	0%
1544	1	2	9	4	0	2.13	0%	0%
1543	1	2	9	4	0	2.13	0%	0%
1088	1	1	10	4	0	2.2	0%	0%
1387	1	1	6	8	0	2.46	0%	0%
188	1	1	5	7	2	2.66	0%	0%
1386	1	1	4	9	1	2.66	0%	0%
747	1	1	4	9	1	2.66	0%	0%

Group 8: No. Isolates = 14 | No. STs = 14 | Predicted Founder = 252

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
252	1	10	3	0	0	1.23	100%	100%
9	1	5	7	1	0	1.69	30%	45%
498	1	4	6	3	0	1.92	2%	8%
420	1	4	6	3	0	1.92	1%	8%
1508	1	4	6	3	0	1.92	4%	8%
924	1	4	6	3	0	1.92	5%	9%
495	1	3	9	1	0	1.84	0%	0%
702	1	3	9	1	0	1.84	0%	0%
411	1	2	9	2	0	2.0	0%	0%
984	1	1	10	2	0	2.07	0%	0%
1107	1	1	10	2	0	2.07	0%	0%
163	1	1	5	6	1	2.53	0%	0%

118	1	1	5	6	1	2.53	0%	0%
429	1	1	1	9	2	2.92	0%	0%

Group 9: No. Isolates = 13 | No. STs = 13 | Predicted Founder = 395

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
395	1	11	1	0	0	1.08	99%	100%	
1193	1	6	6	0	0	1.5	24%	29%	
1556	1	5	7	0	0	1.58	2%	8%	
1546	1	5	7	0	0	1.58	3%	9%	
632	1	5	7	0	0	1.58	4%	9%	
1145	1	5	7	0	0	1.58	8%	9%	
112	1	3	8	1	0	1.83	0%	0%	
407	1	3	8	1	0	1.83	1%	0%	
661	1	3	8	1	0	1.83	2%	0%	
442	1	2	9	1	0	1.91	0%	0%	
618	1	2	9	1	0	1.91	0%	0%	
625	1	1	10	1	0	2.0	0%	0%	
1095	1	1	5	6	0	2.41	0%	0%	

Group 10: No. Isolates = 12 | No. STs = 12 | Predicted Founder = 406

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
406	1	10	1	0	0	1.09	98%	100%	
484	1	6	5	0	0	1.45	27%	32%	
1318	1	5	6	0	0	1.54	3%	9%	
405	1	5	6	0	0	1.54	2%	10%	
536	1	5	6	0	0	1.54	5%	11%	
523	1	5	6	0	0	1.54	8%	10%	
489	1	2	8	1	0	1.90	0%	0%	
1235	1	2	8	1	0	1.90	0%	0%	
1214	1	2	8	1	0	1.90	0%	0%	
547	1	2	8	1	0	1.90	0%	0%	
608	1	1	9	1	0	2.0	0%	0%	
1312	1	1	5	5	0	2.36	0%	0%	

Group 11: No. Isolates = 11 | No. STs = 11 | Predicted Founder = 217

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
217	1	5	2	3	0	1.8	80%	75%	
181	1	3	3	4	0	2.1	24%	17%	
387	1	3	3	4	0	2.1	26%	19%	
1134	1	2	6	2	0	2.0	1%	0%	
417	1	2	3	2	3	2.6	0%	0%	
1536	1	2	3	2	3	2.6	0%	0%	
950	1	1	4	4	1	2.5	0%	0%	

14	1	1	4	3	2	2.6	0%	0%
403	1	1	3	3	3	2.8	0%	0%
980	1	1	3	3	3	2.8	0%	0%
730	1	1	2	4	3	2.9	0%	0%

Group 12: No. Isolates = 11 | No. STs = 11 | Predicted Founder = 835

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
835	1	4	3	2	1	2.0	64%	53%
1052	1	3	3	1	3	2.5	15%	13%
731	1	3	3	1	3	2.5	13%	15%
272	1	3	2	3	2	2.4	31%	21%
891	1	2	5	3	0	2.1	2%	0%
1506	1	2	4	2	2	2.5	3%	0%
932	1	2	3	1	4	3.0	5%	0%
384	1	2	2	1	5	3.1	2%	0%
838	1	1	4	1	4	3.1	0%	0%
1170	1	1	2	3	4	3.0	0%	0%
1159	1	1	1	2	6	4.0	0%	0%

Group 13: No. Isolates = 10 | No. STs = 10 | Predicted Founder = 195

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
195	1	5	3	1	0	1.55	90%	79%
1221	1	3	4	2	0	1.88	20%	10%
1278	1	2	5	1	1	2.11	1%	0%
349	1	2	4	3	0	2.11	0%	0%
1222	1	2	3	2	2	2.44	4%	0%
224	1	2	2	3	2	2.66	13%	0%
977	1	1	6	1	1	2.22	0%	0%
1555	1	1	5	3	0	2.22	0%	0%
719	1	1	3	3	2	2.77	0%	0%
574	1	1	1	3	4	3.33	0%	0%

Group 14: No. Isolates = 10 | No. STs = 10 | Predicted Founder = 560

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
560	1	9	0	0	0	1.0	100%	99%
137	1	3	6	0	0	1.66	4%	0%
340	1	3	6	0	0	1.66	5%	0%
332	1	3	6	0	0	1.66	7%	0%
1056	1	2	7	0	0	1.77	0%	0%
729	1	2	7	0	0	1.77	0%	0%
1268	1	2	7	0	0	1.77	0%	0%
671	1	2	7	0	0	1.77	0%	0%
1288	1	1	8	0	0	1.88	0%	0%

1267	1	1	8	0	0	1.88	0%	0%

Group 15: No. Isolates = 10 | No. STs = 10 | Predicted Founder = 175

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
175	1	8	1	0	0	1.11	99%	99%
171	1	3	6	0	0	1.66	15%	0%
159	1	2	7	0	0	1.77	0%	0%
101	1	2	6	1	0	1.88	0%	0%
619	1	2	6	1	0	1.88	0%	0%
951	1	2	6	1	0	1.88	0%	0%
201	1	2	6	1	0	1.88	0%	0%
1139	1	1	8	0	0	1.88	0%	0%
228	1	1	7	1	0	2.0	0%	0%
1540	1	1	3	5	0	2.44	0%	0%

Group 16: No. Isolates = 9 | No. STs = 9 | Predicted Founder = 253

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
253	1	6	2	0	0	1.25	95%	94%
540	1	3	5	0	0	1.62	18%	21%
1304	1	2	4	2	0	2.0	0%	0%
317	1	2	4	2	0	2.0	0%	0%
109	1	1	5	2	0	2.12	0%	0%
1282	1	1	5	2	0	2.12	0%	0%
828	1	1	5	2	0	2.12	0%	0%
692	1	1	2	5	0	2.5	0%	0%
551	1	1	2	5	0	2.5	0%	0%

Group 17: No. Isolates = 9 | No. STs = 9 | Predicted Founder = 446

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
446	1	5	3	0	0	1.37	85%	76%
1216	1	3	4	1	0	1.75	16%	18%
298	1	3	4	1	0	1.75	19%	20%
650	1	3	3	2	0	1.87	2%	4%
1185	1	3	3	2	0	1.87	3%	4%
1131	1	3	3	2	0	1.87	5%	5%
539	1	2	3	3	0	2.12	2%	0%
1286	1	1	5	1	1	2.25	0%	0%
691	1	1	2	4	1	2.62	0%	0%

Group 18: No. Isolates = 7 | No. STs = 7 | Predicted Founder = 1058

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
1058	1	4	2	0	0	1.33	64%	52%

626	1	3	3	0	0	1.5	25%	16%
258	1	3	3	0	0	1.5	26%	16%
1055	1	2	2	2	0	2.0	0%	0%
734	1	2	2	2	0	2.0	0%	0%
1518	1	1	2	3	0	2.33	0%	0%
167	1	1	2	3	0	2.33	0%	0%

Group 19: No. Isolates = 7 | No. STs = 7 | Predicted Founder = 233

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
233	1	6	0	0	0	1.0	99%	94%
743	1	2	4	0	0	1.66	0%	0%
1488	1	2	4	0	0	1.66	0%	0%
1391	1	1	5	0	0	1.83	0%	0%
742	1	1	5	0	0	1.83	0%	0%
629	1	1	5	0	0	1.83	0%	0%
1472	1	1	5	0	0	1.83	0%	0%

Group 20: No. Isolates = 7 | No. STs = 7 | Predicted Founder = 277

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
277	1	6	0	0	0	1.0	99%	96%
758	1	2	4	0	0	1.66	0%	0%
659	1	2	4	0	0	1.66	0%	0%
1390	1	1	5	0	0	1.83	0%	0%
1252	1	1	5	0	0	1.83	0%	0%
364	1	1	5	0	0	1.83	0%	0%
1128	1	1	5	0	0	1.83	0%	0%

Group 21: No. Isolates = 7 | No. STs = 7 | Predicted Founder = 148

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
148	1	6	0	0	0	1.0	99%	94%
140	1	2	4	0	0	1.66	0%	0%
371	1	2	4	0	0	1.66	0%	0%
956	1	2	4	0	0	1.66	0%	0%
568	1	2	4	0	0	1.66	0%	0%
682	1	1	5	0	0	1.83	0%	0%
952	1	1	5	0	0	1.83	0%	0%

Group 22: No. Isolates = 7 | No. STs = 7 | Predicted Founder = 514

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
514	1	3	2	1	0	1.66	51%	18%
482	1	2	3	1	0	1.83	14%	0%
556	1	2	3	1	0	1.83	12%	0%

1487	1	2	2	2	0	2.0	23%	0%
133	1	1	2	3	0	2.33	0%	0%
513	1	1	1	3	1	2.66	0%	0%
802	1	1	1	3	1	2.66	0%	0%

Group 23: No. Isolates = 7 | No. STs = 7 | Predicted Founder = 308

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
308	1	6	0	0	0	1.0	96%	94%
1004	1	3	3	0	0	1.5	4%	2%
345	1	3	3	0	0	1.5	4%	2%
628	1	3	3	0	0	1.5	10%	2%
481	1	2	4	0	0	1.66	0%	0%
1410	1	2	4	0	0	1.66	0%	0%
978	1	1	5	0	0	1.83	0%	0%

Group 24: No. Isolates = 7 | No. STs = 7 | Predicted Founder = 654

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
654	1	4	2	0	0	1.33	62%	49%
1289	1	3	3	0	0	1.5	26%	14%
964	1	3	3	0	0	1.5	30%	15%
1562	1	1	4	1	0	2.0	0%	0%
1309	1	1	3	2	0	2.16	0%	0%
741	1	1	3	2	0	2.16	0%	0%
993	1	1	2	3	0	2.33	0%	0%

Group 25: No. Isolates = 7 | No. STs = 7 | Predicted Founder = 1239

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
1239	1	4	2	0	0	1.33	68%	50%
262	1	3	3	0	0	1.5	38%	21%
774	1	2	1	3	0	2.16	0%	0%
1165	1	2	1	3	0	2.16	0%	0%
423	1	1	3	2	0	2.16	0%	0%
899	1	1	3	2	0	2.16	0%	0%
822	1	1	3	2	0	2.16	0%	0%

Group 26: No. Isolates = 7 | No. STs = 7 | Predicted Founder = 381

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
381	1	6	0	0	0	1.0	99%	95%
1294	1	2	4	0	0	1.66	0%	0%
1256	1	2	4	0	0	1.66	0%	0%
1255	1	2	4	0	0	1.66	0%	0%
1526	1	2	4	0	0	1.66	0%	0%

343	1	1	5	0	0	1.83	0%	0%
1516	1	1	5	0	0	1.83	0%	0%

Group 27: No. Isolates = 6 | No. STs = 6 | Predicted Founder = 170

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
170	1	4	1	0	0	1.2	84%	51%	
367	1	2	3	0	0	1.6	7%	0%	
1315	1	2	2	1	0	1.8	0%	0%	
997	1	2	2	1	0	1.8	0%	0%	
652	1	1	3	1	0	2.0	0%	0%	
373	1	1	1	3	0	2.4	0%	0%	

Group 28: No. Isolates = 6 | No. STs = 6 | Predicted Founder = 245

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
245	1	4	1	0	0	1.2	73%	53%	
561	1	3	2	0	0	1.4	35%	16%	
580	1	2	3	0	0	1.6	1%	0%	
142	1	2	2	1	0	1.8	0%	0%	
740	1	2	2	1	0	1.8	0%	0%	
1217	1	1	2	2	0	2.2	0%	0%	

Group 29: No. Isolates = 6 | No. STs = 6 | Predicted Founder = 309

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
309	1	5	0	0	0	1.0	96%	81%	
1017	1	2	3	0	0	1.6	0%	0%	
458	1	2	3	0	0	1.6	0%	0%	
311	1	2	3	0	0	1.6	1%	0%	
658	1	2	3	0	0	1.6	0%	0%	
223	1	1	4	0	0	1.8	0%	0%	

Group 30: No. Isolates = 6 | No. STs = 6 | Predicted Founder = 132

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
132	1	5	0	0	0	1.0	97%	83%	
329	1	2	3	0	0	1.6	0%	0%	
607	1	2	3	0	0	1.6	0%	0%	
665	1	1	4	0	0	1.8	0%	0%	
615	1	1	4	0	0	1.8	0%	0%	
505	1	1	4	0	0	1.8	0%	0%	

Group 31: No. Isolates = 6 | No. STs = 6 | Predicted Founder = 348

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
348	1	5	0	0	0	1.0	98%	84%	
1320	1	2	3	0	0	1.6	0%	0%	
1136	1	2	3	0	0	1.6	0%	0%	
416	1	1	4	0	0	1.8	0%	0%	
1213	1	1	4	0	0	1.8	0%	0%	
331	1	1	4	0	0	1.8	0%	0%	

Group 32: No. Isolates = 6 | No. STs = 6 | Predicted Founder = 399

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
399	1	4	1	0	0	1.2	73%	50%	
656	1	3	2	0	0	1.4	34%	17%	
398	1	2	3	0	0	1.6	1%	0%	
401	1	1	3	1	0	2.0	0%	0%	
400	1	1	3	1	0	2.0	0%	0%	
668	1	1	2	2	0	2.2	0%	0%	

Group 33: No. Isolates = 6 | No. STs = 6 | Predicted Founder = 360

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
360	1	4	1	0	0	1.2	84%	50%	
861	1	2	3	0	0	1.6	9%	0%	
1561	1	1	3	1	0	2.0	0%	0%	
1176	1	1	3	1	0	2.0	0%	0%	
864	1	1	3	1	0	2.0	0%	0%	
862	1	1	1	3	0	2.4	0%	0%	

Group 34: No. Isolates = 5 | No. STs = 5 | Predicted Founder = Multiple Candidates

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
847	1	3	1	0	0	1.25	51%	17%	
598	1	3	1	0	0	1.25	46%	15%	
896	1	2	2	0	0	1.5	2%	0%	
1087	1	1	2	1	0	2.0	0%	0%	
226	1	1	2	1	0	2.0	0%	0%	

Group 35: No. Isolates = 5 | No. STs = 5 | Predicted Founder = 164

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
164	1	4	0	0	0	1.0	92%	53%	
193	1	1	3	0	0	1.75	0%	0%	
1274	1	1	3	0	0	1.75	0%	0%	
1407	1	1	3	0	0	1.75	0%	0%	
512	1	1	3	0	0	1.75	0%	0%	

Group 36: No. Isolates = 5 | No. STs = 5 | Predicted Founder = 192

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
192	1	3	1	0	0	1.25	61%	17%	
165	1	2	2	0	0	1.5	20%	0%	
1495	1	1	2	1	0	2.0	0%	0%	
220	1	1	2	1	0	2.0	0%	0%	
1389	1	1	1	2	0	2.25	0%	0%	

Group 37: No. Isolates = 5 | No. STs = 5 | Predicted Founder = 313

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
313	1	4	0	0	0	1.0	94%	51%	
174	1	1	3	0	0	1.75	0%	0%	
678	1	1	3	0	0	1.75	0%	0%	
648	1	1	3	0	0	1.75	0%	0%	
1462	1	1	3	0	0	1.75	0%	0%	

Group 38: No. Isolates = 5 | No. STs = 5 | Predicted Founder = 385

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
385	1	4	0	0	0	1.0	88%	52%	
1036	1	2	2	0	0	1.5	1%	0%	
920	1	2	2	0	0	1.5	2%	0%	
443	1	1	3	0	0	1.75	0%	0%	
1541	1	1	3	0	0	1.75	0%	0%	

Group 39: No. Isolates = 5 | No. STs = 5 | Predicted Founder = Multiple Candidates

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
153	1	2	2	0	0	1.5	28%	0%	
219	1	2	2	0	0	1.5	20%	0%	
887	1	2	1	1	0	1.75	26%	0%	
583	1	1	2	1	0	2.0	0%	0%	
41	1	1	1	2	0	2.25	0%	0%	

Group 40: No. Isolates = 5 | No. STs = 5 | Predicted Founder = Multiple Candidates

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
1025	1	3	1	0	0	1.25	50%	18%	
645	1	3	1	0	0	1.25	43%	13%	
256	1	2	2	0	0	1.5	3%	0%	
1333	1	1	3	0	0	1.75	0%	0%	
968	1	1	3	0	0	1.75	0%	0%	

Group 41: No. Isolates = 5 | No. STs = 5 | Predicted Founder = 389

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
389	1	4	0	0	0	1.0	94%	49%	
1380	1	1	3	0	0	1.75	0%	0%	
121	1	1	3	0	0	1.75	0%	0%	
424	1	1	3	0	0	1.75	0%	0%	
1408	1	1	3	0	0	1.75	0%	0%	

Group 42: No. Isolates = 5 | No. STs = 5 | Predicted Founder = 497

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
497	1	4	0	0	0	1.0	89%	51%	
602	1	2	2	0	0	1.5	2%	0%	
576	1	2	2	0	0	1.5	4%	0%	
1317	1	1	3	0	0	1.75	0%	0%	
544	1	1	3	0	0	1.75	0%	0%	

Group 43: No. Isolates = 5 | No. STs = 5 | Predicted Founder = 549

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
549	1	3	1	0	0	1.25	62%	19%	
699	1	2	2	0	0	1.5	18%	0%	
1512	1	1	3	0	0	1.75	0%	0%	
1331	1	1	2	1	0	2.0	0%	0%	
944	1	1	2	1	0	2.0	0%	0%	

Group 44: No. Isolates = 5 | No. STs = 5 | Predicted Founder = 282

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
282	1	4	0	0	0	1.0	87%	51%	
444	1	2	2	0	0	1.5	2%	0%	
278	1	2	2	0	0	1.5	4%	0%	
410	1	1	3	0	0	1.75	0%	0%	
959	1	1	3	0	0	1.75	0%	0%	

Group 45: No. Isolates = 5 | No. STs = 5 | Predicted Founder = 620

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
620	1	4	0	0	0	1.0	68%	52%	
753	1	3	1	0	0	1.25	9%	12%	
338	1	3	1	0	0	1.25	13%	12%	
320	1	3	1	0	0	1.25	21%	12%	
520	1	1	3	0	0	1.75	0%	0%	

Group 46: No. Isolates = 5 | No. STs = 5 | Predicted Founder = 231

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
231	1	4	0	0	0	1.0	83%	50%	
1264	1	2	2	0	0	1.5	1%	0%	
376	1	2	2	0	0	1.5	3%	0%	
370	1	2	2	0	0	1.5	1%	0%	
1504	1	2	2	0	0	1.5	4%	0%	

Group 47: No. Isolates = 5 | No. STs = 5 | Predicted Founder = 260

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
260	1	4	0	0	0	1.0	89%	53%	
1519	1	2	2	0	0	1.5	1%	0%	
264	1	2	2	0	0	1.5	2%	0%	
1436	1	1	3	0	0	1.75	0%	0%	
503	1	1	3	0	0	1.75	0%	0%	

Group 48: No. Isolates = 4 | No. STs = 4 | Predicted Founder = 152

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
152	1	3	0	0	0	1.0	76%	14%	
185	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%	
749	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%	
953	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%	

Group 49: No. Isolates = 4 | No. STs = 4 | Predicted Founder = Multiple Candidates

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
1047	1	3	0	0	0	1.0	18%	12%	
1028	1	3	0	0	0	1.0	18%	12%	
377	1	3	0	0	0	1.0	21%	12%	
1110	1	3	0	0	0	1.0	38%	11%	

Group 50: No. Isolates = 4 | No. STs = 4 | Predicted Founder = Multiple Candidates

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
1012	1	2	1	0	0	1.33	23%	0%	
571	1	2	1	0	0	1.33	29%	0%	
1013	1	1	1	1	0	2.0	0%	0%	
938	1	1	1	1	0	2.0	0%	0%	

Group 51: No. Isolates = 4 | No. STs = 4 | Predicted Founder = 238

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
238	1	3	0	0	0	1.0	60%	13%	

243	1	2	1	0	0	1.33	5%	0%
237	1	2	1	0	0	1.33	9%	0%
1001	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%

Group 52: No. Isolates = 4 | No. STs = 4 | Predicted Founder = 108

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
108	1	3	0	0	0	1.0	77%	15%
425	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%
1473	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%
581	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%

Group 53: No. Isolates = 4 | No. STs = 4 | Predicted Founder = 1339

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
1339	1	3	0	0	0	1.0	59%	12%
382	1	2	1	0	0	1.33	5%	0%
1450	1	2	1	0	0	1.33	11%	0%
765	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%

Group 54: No. Isolates = 4 | No. STs = 4 | Predicted Founder = 525

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
525	1	3	0	0	0	1.0	63%	15%
354	1	2	1	0	0	1.33	5%	0%
350	1	2	1	0	0	1.33	9%	0%
1321	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%

Group 55: No. Isolates = 4 | No. STs = 4 | Predicted Founder = 378

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
378	1	3	0	0	0	1.0	60%	13%
797	1	2	1	0	0	1.33	5%	0%
638	1	2	1	0	0	1.33	10%	0%
1109	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%

Group 56: No. Isolates = 4 | No. STs = 4 | Predicted Founder = 569

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
569	1	3	0	0	0	1.0	75%	15%
432	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%
529	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%
848	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%

Group 57: No. Isolates = 4 | No. STs = 4 | Predicted Founder = 782

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
782	1	3	0	0	0	1.0	76%	14%	
785	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%	
784	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%	
783	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%	

Group 58: No. Isolates = 4 | No. STs = 4 | Predicted Founder = 257

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
257	1	3	0	0	0	1.0	76%	15%	
780	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%	
1464	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%	
1401	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%	

Group 59: No. Isolates = 4 | No. STs = 4 | Predicted Founder = 357

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
357	1	3	0	0	0	1.0	58%	13%	
1153	1	2	1	0	0	1.33	6%	0%	
1424	1	2	1	0	0	1.33	10%	0%	
746	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%	

Group 60: No. Isolates = 4 | No. STs = 4 | Predicted Founder = 1284

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
1284	1	3	0	0	0	1.0	72%	13%	
1224	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%	
1563	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%	
631	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%	

Group 61: No. Isolates = 4 | No. STs = 4 | Predicted Founder = Multiple Candidates

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
1262	1	3	0	0	0	1.0	17%	12%	
1261	1	3	0	0	0	1.0	16%	12%	
1260	1	3	0	0	0	1.0	21%	12%	
1259	1	3	0	0	0	1.0	39%	11%	

Group 62: No. Isolates = 4 | No. STs = 4 | Predicted Founder = 1141

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
1141	1	3	0	0	0	1.0	58%	11%	
1258	1	2	1	0	0	1.33	5%	0%	
1257	1	2	1	0	0	1.33	11%	0%	

565	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%

Group 63: No. Isolates = 4 | No. STs = 4 | Predicted Founder = 1249

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
1249	1	3	0	0	0	1.0	55%	12%
1456	1	2	1	0	0	1.33	5%	0%
830	1	2	1	0	0	1.33	12%	0%
1155	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%

Group 64: No. Isolates = 4 | No. STs = 4 | Predicted Founder = 1219

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
1219	1	3	0	0	0	1.0	59%	11%
316	1	2	1	0	0	1.33	4%	0%
507	1	2	1	0	0	1.33	12%	0%
613	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%

Group 65: No. Isolates = 4 | No. STs = 4 | Predicted Founder = Multiple Candidates

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
261	1	2	1	0	0	1.33	26%	0%
810	1	2	1	0	0	1.33	24%	0%
1538	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%
1517	1	1	2	0	0	1.66	0%	0%

Group 66: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 1098

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
1098	1	2	0	0	0	1.0	33%	0%
919	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
1439	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 67: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = Multiple Candidates

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
1093	1	2	0	0	0	1.0	8%	0%
1254	1	2	0	0	0	1.0	6%	0%
1146	1	2	0	0	0	1.0	17%	0%

Group 68: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 1076

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Bootstrap Group	Subgrp
1076	1	2	0	0	0	1.0	29%	0%
315	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
301	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 69: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 312

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Group	Bootstrap Subgrp
312	1	2	0	0	0	1.0	29%	0%
1071	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
279	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 70: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 254

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Group	Bootstrap Subgrp
254	1	2	0	0	0	1.0	31%	0%
1041	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
666	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 71: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 1485

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Group	Bootstrap Subgrp
1485	1	2	0	0	0	1.0	33%	0%
1398	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
1113	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 72: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 485

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Group	Bootstrap Subgrp
485	1	2	0	0	0	1.0	30%	0%
1033	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
855	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 73: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 1381

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Group	Bootstrap Subgrp
1381	1	2	0	0	0	1.0	33%	0%
499	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
122	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 74: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 139

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Group	Bootstrap Subgrp
139	1	2	0	0	0	1.0	31%	0%
115	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
452	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 75: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 535

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Group	Bootstrap Subgrp
535	1	2	0	0	0	1.0	31%	0%

490	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
1231	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 76: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 675

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
675	1	2	0	0	0	1.0	30%	0%	
1008	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	
1549	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	

Group 77: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 676

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
676	1	2	0	0	0	1.0	33%	0%	
128	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	
450	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	

Group 78: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 319

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
319	1	2	0	0	0	1.0	29%	0%	
486	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	
1160	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	

Group 79: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 110

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
110	1	2	0	0	0	1.0	32%	0%	
363	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	
1199	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	

Group 80: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 31

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
31	1	2	0	0	0	1.0	34%	0%	
1349	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	
39	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	

Group 81: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 667

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
667	1	2	0	0	0	1.0	31%	0%	
468	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	
502	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	

Group 82: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 1337

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Group	Bootstrap Subgrp
1337	1	2	0	0	0	1.0	33%	0%
1167	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
1440	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 83: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 242

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Group	Bootstrap Subgrp
242	1	2	0	0	0	1.0	30%	0%
456	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
996	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 84: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 1105

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Group	Bootstrap Subgrp
1105	1	2	0	0	0	1.0	29%	0%
795	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
1127	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 85: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 974

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Group	Bootstrap Subgrp
974	1	2	0	0	0	1.0	33%	0%
413	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
1144	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 86: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 611

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Group	Bootstrap Subgrp
611	1	2	0	0	0	1.0	30%	0%
767	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
1273	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 87: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 709

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Group	Bootstrap Subgrp
709	1	2	0	0	0	1.0	33%	0%
738	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
655	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 88: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 4

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance	ST Group	Bootstrap Subgrp
4	1	2	0	0	0	1.0	33%	0%

1283	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%
801	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%

Group 89: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 266

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
266	1	2	0	0	0	1.0	33%	0%	
1269	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	
873	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	

Group 90: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 368

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
368	1	2	0	0	0	1.0	30%	0%	
372	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	
366	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	

Group 91: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 365

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
365	1	2	0	0	0	1.0	32%	0%	
922	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	
522	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	

Group 92: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 882

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
882	1	2	0	0	0	1.0	29%	0%	
1233	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	
1151	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	

Group 93: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 273

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
273	1	2	0	0	0	1.0	32%	0%	
695	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	
510	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	

Group 94: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = Multiple Candidates

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
1203	1	2	0	0	0	1.0	8%	0%	
327	1	2	0	0	0	1.0	6%	0%	
325	1	2	0	0	0	1.0	15%	0%	

Group 95: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 532

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
532	1	2	0	0	0	1.0	32%	0%	
1175	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	
297	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	

Group 96: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 804

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
804	1	2	0	0	0	1.0	29%	0%	
1148	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	
554	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	

Group 97: No. Isolates = 3 | No. STs = 3 | Predicted Founder = 236

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Average Distance		ST Bootstrap Group	Subgrp
236	1	2	0	0	0	1.0	30%	0%	
240	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	
239	1	1	1	0	0	1.5	0%	0%	

Group 98: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1099	1	1	0	0	0	1.0
1100	1	1	0	0	0	1.0

Group 99: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1097	1	1	0	0	0	1.0
1096	1	1	0	0	0	1.0

Group 100: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1094	1	1	0	0	0	1.0
1265	1	1	0	0	0	1.0

Group 101: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1090	1	1	0	0	0	1.0
286	1	1	0	0	0	1.0

Group 102: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1084	1	1	0	0	0	1.0
172	1	1	0	0	0	1.0

Group 103: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1080	1	1	0	0	0	1.0
1123	1	1	0	0	0	1.0

Group 104: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1078	1	1	0	0	0	1.0
1182	1	1	0	0	0	1.0

Group 105: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
198	1	1	0	0	0	1.0
1048	1	1	0	0	0	1.0

Group 106: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
197	1	1	0	0	0	1.0
125	1	1	0	0	0	1.0

Group 107: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
190	1	1	0	0	0	1.0
566	1	1	0	0	0	1.0

Group 108: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1067	1	1	0	0	0	1.0
1009	1	1	0	0	0	1.0

Group 109: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1066	1	1	0	0	0	1.0
633	1	1	0	0	0	1.0

Group 110: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
184	1	1	0	0	0	1.0
160	1	1	0	0	0	1.0

Group 111: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
183	1	1	0	0	0	1.0
1215	1	1	0	0	0	1.0

Group 112: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1054	1	1	0	0	0	1.0
543	1	1	0	0	0	1.0

Group 113: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1050	1	1	0	0	0	1.0
1297	1	1	0	0	0	1.0

Group 114: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
177	1	1	0	0	0	1.0
176	1	1	0	0	0	1.0

Group 115: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
173	1	1	0	0	0	1.0
1031	1	1	0	0	0	1.0

Group 116: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
162	1	1	0	0	0	1.0
1511	1	1	0	0	0	1.0

Group 117: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1394	1	1	0	0	0	1.0
672	1	1	0	0	0	1.0

Group 118: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1393	1	1	0	0	0	1.0
670	1	1	0	0	0	1.0

Group 119: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1392	1	1	0	0	0	1.0
259	1	1	0	0	0	1.0

Group 120: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1029	1	1	0	0	0	1.0
1229	1	1	0	0	0	1.0

Group 121: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1027	1	1	0	0	0	1.0
307	1	1	0	0	0	1.0

Group 122: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1385	1	1	0	0	0	1.0
1244	1	1	0	0	0	1.0

Group 123: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1021	1	1	0	0	0	1.0
341	1	1	0	0	0	1.0

Group 124: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
149	1	1	0	0	0	1.0
1130	1	1	0	0	0	1.0

Group 125: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1379	1	1	0	0	0	1.0
100	1	1	0	0	0	1.0

Group 126: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1378	1	1	0	0	0	1.0
98	1	1	0	0	0	1.0

Group 127: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1377	1	1	0	0	0	1.0
96	1	1	0	0	0	1.0

Group 128: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1376	1	1	0	0	0	1.0
92	1	1	0	0	0	1.0

Group 129: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1375	1	1	0	0	0	1.0
91	1	1	0	0	0	1.0

Group 130: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1374	1	1	0	0	0	1.0
90	1	1	0	0	0	1.0

Group 131: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1373	1	1	0	0	0	1.0
87	1	1	0	0	0	1.0

Group 132: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1372	1	1	0	0	0	1.0
80	1	1	0	0	0	1.0

Group 133: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1371	1	1	0	0	0	1.0
79	1	1	0	0	0	1.0

Group 134: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1370	1	1	0	0	0	1.0
77	1	1	0	0	0	1.0

Group 135: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
131	1	1	0	0	0	1.0
663	1	1	0	0	0	1.0

Group 136: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
493	1	1	0	0	0	1.0
701	1	1	0	0	0	1.0

Group 137: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
492	1	1	0	0	0	1.0
1237	1	1	0	0	0	1.0

Group 138: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
491	1	1	0	0	0	1.0
300	1	1	0	0	0	1.0

Group 139: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1368	1	1	0	0	0	1.0
74	1	1	0	0	0	1.0

Group 140: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1367	1	1	0	0	0	1.0
69	1	1	0	0	0	1.0

Group 141: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1366	1	1	0	0	0	1.0
68	1	1	0	0	0	1.0

Group 142: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1365	1	1	0	0	0	1.0
67	1	1	0	0	0	1.0

Group 143: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1003	1	1	0	0	0	1.0
575	1	1	0	0	0	1.0

Group 144: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1364	1	1	0	0	0	1.0
66	1	1	0	0	0	1.0

Group 145: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1361	1	1	0	0	0	1.0
60	1	1	0	0	0	1.0

Group 146: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
487	1	1	0	0	0	1.0
737	1	1	0	0	0	1.0

Group 147: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
124	1	1	0	0	0	1.0
1347	1	1	0	0	0	1.0

Group 148: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
123	1	1	0	0	0	1.0
344	1	1	0	0	0	1.0

Group 149: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1358	1	1	0	0	0	1.0
54	1	1	0	0	0	1.0

Group 150: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1357	1	1	0	0	0	1.0
51	1	1	0	0	0	1.0

Group 151: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1355	1	1	0	0	0	1.0
49	1	1	0	0	0	1.0

Group 152: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1354	1	1	0	0	0	1.0
48	1	1	0	0	0	1.0

Group 153: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1353	1	1	0	0	0	1.0
42	1	1	0	0	0	1.0

Group 154: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1351	1	1	0	0	0	1.0
36	1	1	0	0	0	1.0

Group 155: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1350	1	1	0	0	0	1.0
33	1	1	0	0	0	1.0

Group 156: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
475	1	1	0	0	0	1.0
527	1	1	0	0	0	1.0

Group 157: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1346	1	1	0	0	0	1.0
29	1	1	0	0	0	1.0

Group 158: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1345	1	1	0	0	0	1.0
24	1	1	0	0	0	1.0

Group 159: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1343	1	1	0	0	0	1.0
19	1	1	0	0	0	1.0

Group 160: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1340	1	1	0	0	0	1.0
792	1	1	0	0	0	1.0

Group 161: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1332	1	1	0	0	0	1.0
563	1	1	0	0	0	1.0

Group 162: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
459	1	1	0	0	0	1.0
1194	1	1	0	0	0	1.0

Group 163: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
455	1	1	0	0	0	1.0
578	1	1	0	0	0	1.0

Group 164: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1323	1	1	0	0	0	1.0
588	1	1	0	0	0	1.0

Group 165: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1322	1	1	0	0	0	1.0
511	1	1	0	0	0	1.0

Group 166: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
448	1	1	0	0	0	1.0
447	1	1	0	0	0	1.0

Group 167: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
440	1	1	0	0	0	1.0
267	1	1	0	0	0	1.0

Group 168: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1319	1	1	0	0	0	1.0
584	1	1	0	0	0	1.0

Group 169: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
439	1	1	0	0	0	1.0
515	1	1	0	0	0	1.0

Group 170: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
799	1	1	0	0	0	1.0
800	1	1	0	0	0	1.0

Group 171: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
798	1	1	0	0	0	1.0
736	1	1	0	0	0	1.0

Group 172: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
434	1	1	0	0	0	1.0
840	1	1	0	0	0	1.0

Group 173: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
433	1	1	0	0	0	1.0
552	1	1	0	0	0	1.0

Group 174: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1307	1	1	0	0	0	1.0
1548	1	1	0	0	0	1.0

Group 175: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1302	1	1	0	0	0	1.0
867	1	1	0	0	0	1.0

Group 176: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
428	1	1	0	0	0	1.0
427	1	1	0	0	0	1.0

Group 177: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
426	1	1	0	0	0	1.0
1525	1	1	0	0	0	1.0

Group 178: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
788	1	1	0	0	0	1.0
787	1	1	0	0	0	1.0

Group 179: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
773	1	1	0	0	0	1.0
1152	1	1	0	0	0	1.0

Group 180: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
763	1	1	0	0	0	1.0
1196	1	1	0	0	0	1.0

Group 181: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
761	1	1	0	0	0	1.0
591	1	1	0	0	0	1.0

Group 182: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
756	1	1	0	0	0	1.0
712	1	1	0	0	0	1.0

Group 183: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
755	1	1	0	0	0	1.0
751	1	1	0	0	0	1.0

Group 184: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
754	1	1	0	0	0	1.0
234	1	1	0	0	0	1.0

Group 185: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
733	1	1	0	0	0	1.0
392	1	1	0	0	0	1.0

Group 186: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
728	1	1	0	0	0	1.0
1418	1	1	0	0	0	1.0

Group 187: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
708	1	1	0	0	0	1.0
1433	1	1	0	0	0	1.0

Group 188: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1285	1	1	0	0	0	1.0
991	1	1	0	0	0	1.0

Group 189: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1280	1	1	0	0	0	1.0
1474	1	1	0	0	0	1.0

Group 190: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1277	1	1	0	0	0	1.0
829	1	1	0	0	0	1.0

Group 191: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
397	1	1	0	0	0	1.0
396	1	1	0	0	0	1.0

Group 192: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
53	1	1	0	0	0	1.0
601	1	1	0	0	0	1.0

Group 193: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
394	1	1	0	0	0	1.0
386	1	1	0	0	0	1.0

Group 194: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
52	1	1	0	0	0	1.0
45	1	1	0	0	0	1.0

Group 195: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
393	1	1	0	0	0	1.0
1522	1	1	0	0	0	1.0

Group 196: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
388	1	1	0	0	0	1.0
1234	1	1	0	0	0	1.0

Group 197: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
46	1	1	0	0	0	1.0
38	1	1	0	0	0	1.0

Group 198: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
43	1	1	0	0	0	1.0
347	1	1	0	0	0	1.0

Group 199: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1248	1	1	0	0	0	1.0
1149	1	1	0	0	0	1.0

Group 200: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1241	1	1	0	0	0	1.0
506	1	1	0	0	0	1.0

Group 201: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1232	1	1	0	0	0	1.0
1441	1	1	0	0	0	1.0

Group 202: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
356	1	1	0	0	0	1.0
355	1	1	0	0	0	1.0

Group 203: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
12	1	1	0	0	0	1.0
1452	1	1	0	0	0	1.0

Group 204: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
351	1	1	0	0	0	1.0
1226	1	1	0	0	0	1.0

Group 205: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1228	1	1	0	0	0	1.0
570	1	1	0	0	0	1.0

Group 206: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1225	1	1	0	0	0	1.0
517	1	1	0	0	0	1.0

Group 207: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1223	1	1	0	0	0	1.0
501	1	1	0	0	0	1.0

Group 208: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
694	1	1	0	0	0	1.0
1197	1	1	0	0	0	1.0

Group 209: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1207	1	1	0	0	0	1.0
1447	1	1	0	0	0	1.0

Group 210: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1204	1	1	0	0	0	1.0
841	1	1	0	0	0	1.0

Group 211: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
685	1	1	0	0	0	1.0
684	1	1	0	0	0	1.0

Group 212: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1559	1	1	0	0	0	1.0
205	1	1	0	0	0	1.0

Group 213: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
310	1	1	0	0	0	1.0
306	1	1	0	0	0	1.0

Group 214: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1542	1	1	0	0	0	1.0
910	1	1	0	0	0	1.0

Group 215: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1523	1	1	0	0	0	1.0
874	1	1	0	0	0	1.0

Group 216: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
647	1	1	0	0	0	1.0
1168	1	1	0	0	0	1.0

Group 217: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
642	1	1	0	0	0	1.0
211	1	1	0	0	0	1.0

Group 218: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1514	1	1	0	0	0	1.0
293	1	1	0	0	0	1.0

Group 219: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
639	1	1	0	0	0	1.0
853	1	1	0	0	0	1.0

Group 220: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1500	1	1	0	0	0	1.0
865	1	1	0	0	0	1.0

Group 221: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
623	1	1	0	0	0	1.0
1147	1	1	0	0	0	1.0

Group 222: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
981	1	1	0	0	0	1.0
880	1	1	0	0	0	1.0

Group 223: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
609	1	1	0	0	0	1.0
1415	1	1	0	0	0	1.0

Group 224: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
604	1	1	0	0	0	1.0
564	1	1	0	0	0	1.0

Group 225: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
965	1	1	0	0	0	1.0
528	1	1	0	0	0	1.0

Group 226: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
954	1	1	0	0	0	1.0
281	1	1	0	0	0	1.0

Group 227: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
935	1	1	0	0	0	1.0
1453	1	1	0	0	0	1.0

Group 228: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
931	1	1	0	0	0	1.0
881	1	1	0	0	0	1.0

Group 229: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
928	1	1	0	0	0	1.0
1475	1	1	0	0	0	1.0

Group 230: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
917	1	1	0	0	0	1.0
214	1	1	0	0	0	1.0

Group 231: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1191	1	1	0	0	0	1.0
1190	1	1	0	0	0	1.0

Group 232: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
296	1	1	0	0	0	1.0
538	1	1	0	0	0	1.0

Group 233: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
288	1	1	0	0	0	1.0
287	1	1	0	0	0	1.0

Group 234: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1158	1	1	0	0	0	1.0
1409	1	1	0	0	0	1.0

Group 235: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1157	1	1	0	0	0	1.0
1446	1	1	0	0	0	1.0

Group 236: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1150	1	1	0	0	0	1.0
207	1	1	0	0	0	1.0

Group 237: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
265	1	1	0	0	0	1.0
248	1	1	0	0	0	1.0

Group 238: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1482	1	1	0	0	0	1.0
1479	1	1	0	0	0	1.0

Group 239: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
596	1	1	0	0	0	1.0
871	1	1	0	0	0	1.0

Group 240: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
573	1	1	0	0	0	1.0
555	1	1	0	0	0	1.0

Group 241: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1426	1	1	0	0	0	1.0
1425	1	1	0	0	0	1.0

Group 242: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
1403	1	1	0	0	0	1.0
872	1	1	0	0	0	1.0

Group 243: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
889	1	1	0	0	0	1.0
884	1	1	0	0	0	1.0

Group 244: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
859	1	1	0	0	0	1.0
858	1	1	0	0	0	1.0

Group 245: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
843	1	1	0	0	0	1.0
3	1	1	0	0	0	1.0

Group 246: No. Isolates = 2 | No. STs = 2 | Predicted Founder = None

ST	FREQ	SLV	DLV	TLV	SAT	Distance
806	1	1	0	0	0	1.0
805	1	1	0	0	0	1.0

Singletons: size 617
1092, 1091, 1089, 1086, 1085, 1079, 1077, 1074, 1073, 1072, 1070, 199, 196, 194, 191, 1069, 1064, 1063, 1062, 1061, 1060, 189, 186, 1059, 1057, 1053, 1051, 1049, 1046, 1045, 1044, 1042, 1040, 169, 168, 166, 161, 1039, 1399, 1397, 1035, 1396, 1034, 1395, 1032, 1030, 154, 151, 150, 1026, 1024, 1023, 1384, 1022, 1383, 1020, 147, 145, 144, 143, 1019, 1018, 1016, 1014, 1011, 138, 136, 135, 134, 496, 494, 130, 1369, 1007, 1006, 1005, 1002, 1363, 1362, 1000, 1360, 127, 126, 488, 483, 1359, 1356, 1352, 117, 479, 116, 478, 477, 114, 476, 474, 473, 472, 470, 1348, 1342, 107, 469, 106, 105, 467, 104, 103, 465, 464, 463, 460, 1336, 1334, 1330, 454, 453, 451, 1329, 1328, 1327, 1325, 1324, 1314, 1311, 1310, 438, 437, 436, 435, 796, 794, 431, 793, 430, 790, 1308, 1306, 789, 422, 781, 419, 779, 778, 415, 777, 776, 771, 770, 409, 408, 769, 768, 404, 402, 764, 762, 760, 759, 757, 750, 748, 744, 735, 732, 727, 726, 725, 724, 723, 722, 721, 720, 718, 717, 716, 715, 714, 713, 711, 710, 707, 706, 705, 704, 703, 99, 97, 95, 94, 93, 89, 88, 86, 84, 83, 82, 81, 1299, 1298, 1296, 1295, 1293, 1292, 1290, 78, 76, 75, 73, 72, 71, 70, 1287, 1281, 65, 64, 63, 62, 61, 1279, 1275, 1272, 1271, 1270, 59, 58, 57, 56, 55, 391, 390, 1266, 1263, 47, 44, 383, 40, 1253, 1251, 1250, 379, 37, 35, 34, 375, 32, 30, 1247, 1246, 1243, 1242, 1240, 28, 369, 26, 25, 23, 22, 21, 362, 20, 361, 1238, 1236, 1230, 18, 359, 358, 16, 15, 11, 352, 10, 1220, 346, 344, 1218, 1212, 1211, 1210, 337, 698, 335, 697, 333, 693, 330, 690, 1209, 1208, 1206, 1205, 1565, 1564, 1201, 1200, 1560, 328, 689, 326, 324, 1558, 1554, 1553, 1552, 1551, 1550, 679, 314, 674, 673, 1547, 1545, 305, 303, 302, 664, 662, 1539, 1537, 1535, 1534, 1532, 1528, 1527, 1521, 1520, 649, 646, 644, 643, 640, 1515, 1513, 1510, 637, 999, 998, 634, 995, 994, 992, 1509, 1507, 1503, 1502, 1501, 627, 988, 987, 624, 985, 621, 983, 982, 617, 979, 616, 614, 975, 612, 610, 972, 971, 969, 606, 605, 967, 603, 963, 600, 962, 961, 960, 957, 955, 949, 948, 947, 946, 945, 943, 942, 941, 940, 939, 933, 930, 929, 927, 926, 925, 923, 921, 918, 916, 915, 913, 912, 911, 909, 908, 907, 906, 905, 904, 903, 902, 901, 900, 1198, 1195, 1192, 1189, 1188, 1187, 1186, 1184, 1183, 1180, 1179, 1178, 1177, 1174, 1173, 1172, 1171, 299, 295, 292, 291, 290, 1169, 289, 285, 1156, 1154, 275, 271, 270, 1143, 1142, 263, 1138, 1137, 1498, 1497, 1135, 1133, 1493, 1491, 1490, 255, 251, 1129, 1489, 1126, 1125, 1486, 1124, 1122, 1483, 1121, 1120, 1480, 249, 246, 1119, 1118, 1117, 1478, 1116, 1477, 1115, 1476, 1114, 1112, 1111, 1471, 1470, 599, 592, 590, 1108, 1469, 1468, 1106, 1104, 1465, 1103, 1102, 1463, 1101, 1461, 1460, 229, 225, 587, 586, 585, 222, 221, 582, 1459, 1458, 1455, 1454, 218, 216, 215, 213, 212, 572, 1449, 1448, 1445, 1444, 1443, 208, 206, 567, 204, 203, 200, 1437, 1435, 1434, 1432, 1431, 1430, 559, 558, 557, 553, 550, 1429, 1428, 1427, 1422, 1420, 548, 545, 542, 1419, 1417, 1416, 1414, 1413, 1411, 537, 898, 897, 895, 894, 531, 893, 530, 892, 890, 1406, 1405, 1404, 1400, 526, 888, 524, 885, 521, 519, 518, 879, 516, 878, 877, 876, 875, 870, 869, 868, 504, 863, 500, 860, 857, 856, 854, 852, 851, 850, 849, 846, 844, 842, 837, 836, 832, 831, 827, 826, 825, 823, 821, 820, 818, 817, 816, 815, 813, 812, 809, 807, 8, 7, 6, 5, 2, 1.

Περιεχόμενα

Εισαγωγή ***1***
1.1 β-λακταμικά αντιβιοτικά 2
1.1.1 Πενικιλλίνες 3
1.1.2 Κεφαλοσπορίνες 3
1.1.3 Καρβαπενέμες 4
1.1.4 Μονοβακτάμες 5
1.1.5 Αναστολείς β-λακταμασών 5
1.2 Καρβαπενεμάσες: οι πολύπλευρες β-λακταμάσες 7
1.2.1 Ταξινόμηση Καρβαπενεμασών 8
1.2.2 Καρβαπενεμάσες Τάξης Α 9
1.2.2.1 Καρβαπενεμάσες Τύπου GES 10
1.2.2.2 Καρβαπενεμάσες Τύπου KPC 12
1.2.2.3 Καρβαπενεμάσες Τύπου SME 14
1.2.2.4 Καρβαπενεμάσες Τύπου IMI/NMC-A 15
1.2.2.5 Καρβαπενεμάσες SFC-1 και SHV-38 16
1.2.2.6 Προέλευση Καρβαπενεμασών Τάξης Α 17
1.2.2.7 Βιοχημικές Ιδιότητες Καρβαπενεμασών Τάξης Α 18
1.2.2.8 Σχέση Δομής και Λειτουργιάς Καρβαπενεμασών Τάξης Α 22
1.2.3 Καρβαπενεμάσες Τάξης Β 25
1.2.3.1 Ταξινόμηση Καρβαπενεμασών Τάξης Β 25
1.2.3.2 Χρωμοσωμικές Καρβαπενεμάσες Τάξης Β 27
1.2.3.3 Επίκτητες Καρβαπενεμάσες Τάξης Β 29
1.2.3.3.1 Καρβαπενεμάσες Τύπου IMP 29
1.2.3.3.2 Καρβαπενεμάσες Τύπου VIM 35
1.2.3.3.3 Καρβαπενεμάσες Τύπου SPM 40
1.2.3.3.4 Καρβαπενεμάσες Τύπου GIM 40
1.2.3.3.5 Καρβαπενεμάσες Τύπου SIM 41
1.2.3.3.6 Νεότερες Καρβαπενεμάσες Τάξης Β 42
1.2.3.3.7 Γενετικό Περιβάλλον Γονιδίων των Καρβαπενεμασών Τάξης Β 43
1.2.3.4 Βιοχημικές Ιδιότητες Καρβαπενεμασών Τάξης Β 46
1.2.4 Καρβαπενεμάσες Τάξης D 50
1.2.4.1 Ταξινόμηση Καρβαπενεμασών Τάξης D 51
1.2.4.2 Προέλευση Καρβαπενεμασών Τάξης D 52
1.2.4.3 Βιοχημικές Ιδιότητες Καρβαπενεμασών Τάξης D 54
1.2.4.4 Σχέση Δομής και Λειτουργιάς Καρβαπενεμασών Τάξης D 58
1.2.4.5 Γενετικό Περιβάλλον Γονιδίων των Καρβαπενεμασών Τάξης D 58
1.3 Μοριακές Μέθοδοι Τυποποίησης 61
1.3.1 Ηλεκτροφόρηση Παλλόμενου Ηλεκτρικού Πεδίου (PFGE) 62
1.3.2 Πολυμορφισμός Μήκους Ενισχυόμενων Τμημάτων DNA (AFLP) 64
1.3.3 Τεχνική Τυχαία Ενισχυμένων Πολυμορφικών Τμημάτων DNA (RAPD) 65
1.3.4 PCR Τυχαίων Εκκινητών (AP-PCR) 66
1.3.5 PCR Επαναλαμβανόμενων Στοιχείων (rep-PCR) 66
1.3.6 Τεχνική Μεταβλητού Αριθμού Διαδοχικών Επαναλήψεων (VNTR) 68

1.3.7 Τυποποίηση Μονοτοπικής Αλληλούχισης (SLST) 71
1.3.8 Τυποποίηση Πολυτοπικής Αλληλούχισης (MLST) 71
1.3.9 Γονιδιωματικός Συγκριτικός Υβριδισμός (CGH) 74
1.3.10 Πλήρης Αλληλούχιση Γονιδιώματος (WGS) 76
1.4 Σκοπός της Εργασίας 79
***Μέθοδοι & Υλικά* 82**
2.1 Μικροβιολογικό Υλικό 83
2.2 Ταυτοποίηση Μικροοργανισμών με Κλασικές Μεθόδους 84
2.2.1 Χρώση κατά Gram 84
2.2.2 Σύστημα ταυτοποίησης api 20E 85
2.3 Ταυτοποίηση Μικροοργανισμών με Μοριακές Μεθόδους 85
2.3.1 Εκχύλιση Γενετικού Υλικού 85
2.3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός νουκλεϊκών οξέων με φασματοφωτόμετρο 86
2.3.3 Ενίσχυση της Αλληλουχίας του16S rDNA 86
2.3.4 Ηλεκτροφόρηση σε Πήκτωμα Αγαρόζης 89
2.3.5 Καθαρισμός Προϊόντων της PCR 89
2.3.6 Ανάλυση πρωτοδιάταξης αλληλουχίας DNA (Sequencing) 90
2.3.7 Σύγκριση Αλληλουχιών DNA 92
2.4 Αντιβιόγραμμα 93
2.4.1 Δοκιμασία Διάχυσης των Δίσκων 93
2.4.2 Προσδιορισμός Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης (MIC) 94
2.5 Φαινοτυπική Διερεύνηση Ανθεκτικότητας έναντι Καρβαπενέμων 96
2.5.1 Τροποποιημένη Δοκιμασία κατά Hodge 96
2.5.2 Δοκιμασία Αναστολής Αντλιών Εκροής 97
2.5.3 Δοκιμασία Αναστολής με Συνδυασμό Δίσκων 97
2.6 Μοριακή Ανίχνευση γονιδίων Καρβαπενεμασών 98
2.6.1 Ανίχνευση Γονιδίων Καρβαπενεμασών Τάξης A 98
2.6.2 Ανίχνευση Γονιδίων Καρβαπενεμασών Τάξης B 99
2.6.3 Ανίχνευση Γονιδίων Καρβαπενεμασών Τάξης D 100
2.7 Μοριακή Τυποποίηση Στελεχών 102
2.7.1 Τυποποίηση με BOX-PCR 102
2.7.2 Τυποποίηση με 3LST 103
2.7.3 Τυποποίηση με MLST 104
2.8 Κλωνική και Φυλογενετική Συγγένεια Στελεχών 109
2.8.1 Δημιουργία Διαγραμμάτων Κλωνικών Συμπλεγμάτων eBURST 109
2.8.2 Δημιουργία Φυλογενετικών Δένδρων κατά Neighbor Joining 111
2.9 Συνταινικότητα Γονιδίων των Καρβαπενεμασών 112
2.9.1 Χαρτογράφηση Δομών Ιντεγκρονίου 112
2.9.2 Χαρτογράφηση Δομών Τρανσποζονίου 113
2.10 Πλασμιδιακή Εντόπιση γονιδίων Καρβαπενεμασών 115
2.10.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση 115
2.10.2 Εκχύλιση DNA με φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη 116
2.10.3 Κατακρήμνιση DNA με αιθανόλη 117
2.10.4 Υβριδοποίηση κατά Southern 118
2.10.4.1 Σήμανση Ανιχνευτών 118
2.10.4.2 Μεταφορά σε Νάιλον Μεμβράνη 119

2.10.4.3 Υβριδοποίηση του Σημασμένου Ανιχνευτή 121
2.10.4.4 Ανίχνευση σήματος 122
2.11 Δοκιμασία Βακτηριακής Σύζευξης 123
Αποτελέσματα ***125***
3.1 Επιλογή Μικροβιακών Στελεχών 126
3.2 Ταυτοποίηση Μικροοργανισμών με Κλασικές Μεθόδους 127
3.3 Ταυτοποίηση Μικροοργανισμών με Μοριακές Μεθόδους 129
3. 4 Ανθεκτικότητα Μικροβιακών Στελεχών 130
3.5 Φαινοτυπική Διερεύνηση Ανθεκτικότητας έναντι Καρβαπενέμων 137
3.5.1 Παρουσία καρβαπενεμασών στα Μικροβιακά Στελέχη 137
3.5.2 Παρουσία Αντλιών Εκροής στα Μικροβιακά Στελέχη 137
3.5.3 Τύπος καρβαπενεμασών στα Μικροβιακά Στελέχη 138
3.6 Μελέτη Γονιδίων Καρβαπενεμασών 139
3.7 Μοριακή Τυποποίηση Στελεχών 142
3. 8 Κλωνική και Φυλογενετική Συγγένεια Στελεχών 145
3.8.1 Απεικόνιση Κλωνικών Συμπλεγμάτων Στελεχών κατά eBURST 145
3.8.2 Απεικόνιση Φυλογενετικών Δένδρων Στελεχών κατά Neighbor Joining 147
3.9 Μελέτη της Συνταινικότητα Γονιδίων των Καρβαπενεμασών 149
3.10 Πλασμιδιακή Εντόπιση γονιδίων Καρβαπενεμασών 153
3.11 Βακτηριακή Σύζευξη των Μικροβιακών Στελεχών 155
Συζήτηση & Συμπεράσματα ***156***
4.1 Ανθεκτικότητα στις Καρβαπενέμες των Στελεχών A baumannii 157
4.2 Ανθεκτικότητα στις Καρβαπενέμες των Στελεχών P. aeruginosa 163
4.3 Γενικά Συμπεράσματα 167
Βιβλιογραφία ***169***
Παράρτημα ***211***
6.1 Ανάλυση eBURST στελεχών A. baumannii 212
6.2 Ανάλυση eBURST στελεχών P. aeruginisa 220
Περιεχόμενα ***261***