



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΓΙΕΙΝΗΣ & ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ
Διευθυντής: Καθηγητής Χρήστος ΧΑΤΖΗΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΥ



?

«ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΞΑΡΤΗΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΛΙΝΕΖΟΛΙΔΗ ΠΟΛΥΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ»

Καραβασίλης Ε. Βασίλειος
Ιατρός Βιοπαθολόγος

Λάρισα, Νοέμβριος 2017

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. Λοιμώξεις από *S. epidermidis*

1. Παθογονικότητα
2. Παθογόνος δράση
3. Αντιβιοτικά και μηχανισμοί αντοχής

B. *S. epidermidis* και λινεζολίδη

1. Λινεζολίδη – γενικά
2. *S. epidermidis* και αντοχή στη λινεζολίδη
3. Εξάρτηση *S. epidermidis* από τη λινεζολίδη

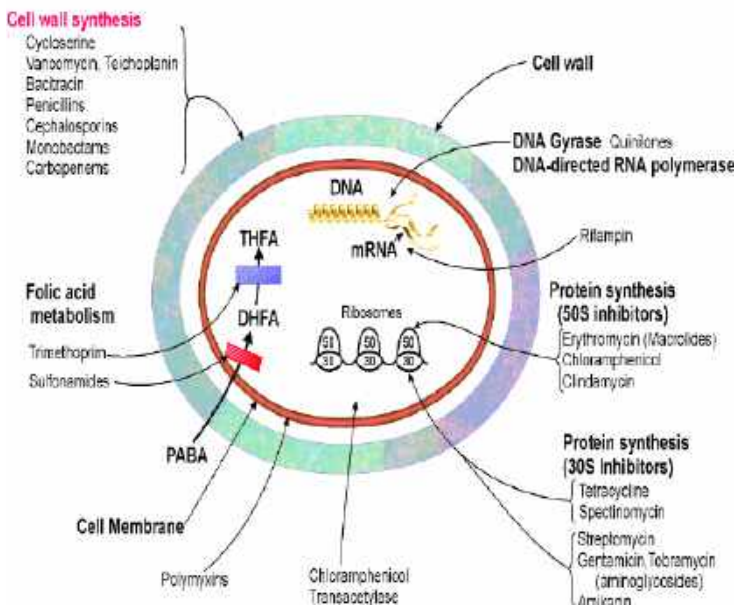
Παθογονικότητα *S. epidermidis*

- Φυσικοί αποικιστές του δέρματος και των βλεννογόνων
- Επιβίωση σε επιφάνειες και ιατρικό εξοπλισμό για μεγάλα χρονικά διαστήματα
- ανάπτυξη μηχανισμών αντοχής έναντι των αντιβιοτικών (βακτηριακή «νοημοσύνη»)
- σχηματισμός βιομεμβρανών (biofilm) – (*ica* γονίδια)

S. epidermidis: λοιμογόνος δράση

Λοίμωξη	Ξενιστής
Μικροβιαμία-σηψαιμία	Νεογνά
	Ανοσοκασταλμένοι
	Ασθενείς με ενδοφλεβίους καθετήρες
Λοιμώξεις προσθετικών υλικών (πλην ενδοφλεβίων καθετήρων)	Ενδοκαρδίτιδα προσθετικών βαλβίδων
	Ενδοφλέβια ενδοκαρδιακά ηλεκτρόδια
	Παρακαμπτήρια μοσχεύματα
	Φορητή περιτοναϊκή διάλυση
	Αναστομώσεις ΕΝΥ
	Αρθροπλαστικές – υλικά οστεοσύνδεσης
	Ενδοφθαλμίτιδα
Λοιμώξεις που δεν σχετίζονται με προσθετικά υλικά	Λοιμώξεις χειρουργικών τραυμάτων – οστεομυελίτιδα
	Ενδοκαρδίτιδα φυσικών βαλβίδων
	Λοιμώξεις ουροποιητικού
	Δερματικές λοιμώξεις

S. epidermidis και αντιβιοτικά



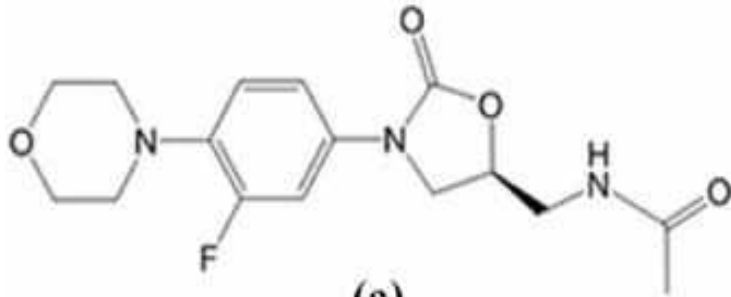
A' ΕΠΙΛΟΓΗΣ	B-λακταμικά	Oxacillin, penicillin Cefalosporin
B' ΕΠΙΛΟΓΗΣ	Μακρολίδες → Λινκοσαμίδες → Οξαζολιδινόνες → Σουλφοναμίδες → Γλυκοπεπτίδια →	Erythromycin, Clarithromycin Clindamycin Linezolid Sulfamethoxazole/Trimethoprim Vancomycin, Teicoplanin
Γ' ΕΠΙΛΟΓΗΣ	Αμινογλυκοσίδες → Κινολόνες → Στρεπτογραμμίνες → Φενικόλες → Ανσαμυκίνες → Φουσιδάνες →	Gentamicin, Amikacin, Netilmicin Ciprofloxacin, Levofloxacin Quinupristin/dalfopristin Chloramphenicol Tetracyclin, Doxycyclin Fucidic acid

Μηχανισμοί αντοχής σε αντιβιοτικά

αντιβιοτικό	Μηχανισμός αντοχής	γονίδια
Methicillin (β-λακταμικά)	Αλλαγή στόχου (PBP2a)	<i>mecA</i>
Αμινογλυκοσίδες	AMEs (ένζυμα μετατροπής αμινογλυκοσιδών)	<i>ant(4')-Ia</i> , <i>aph(3')-IIIa</i>
Μακρολίδες - Λινκοσαμίδες	- Αλλαγή ριβοσωμικού στόχου (MLSB φαινότυπος) - Μηχανισμός αντλίας (M-φαινότυπος)	<i>erm</i> <i>mef</i>
Κινουπριστίνη-νταλφοπριστίνη	- Παραγωγή ακετυλοτρανσφερασών - Παραγωγή πρωτεϊνών που συνδέονται με το ATP	<i>vat</i> <i>vga</i> , <i>lsa</i>
Γλυκοπεπτίδια	Αλλαγή στόχου (D-Ala-D-Lac)	<i>vanA</i>

S. epidermidis και λινεζολίδα

Γενικά



(a)



(b)

- Ανήκει στις **οξαζολιδίνες** ή οξαζολιδινόνες
- Συνθετικό προϊόν – εισαγωγή στη θεραπευτική το 2000
- Άριστη δραστηκότητα έναντι των **Gram(+)** βακτηρίων (σταφυλοκόκκους, εντεροκόκκους)
- Στόχος δράσης της το ριβόσωμα - αναστέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση συνδεόμενη στο ενεργό κέντρο της πεπτιδυλοτρανσφεράσης (**PTC**)

S. epidermidis και αντοχή στη λινεζολίδη

Επιδημιολογικά στοιχεία

- Έχει αναφερθεί αντοχή σε: Ελλάδα, Γερμανία, Ιταλία, Ισπανία, Γαλλία, Ιρλανδία, ΗΠΑ, Μεξικό, Ινδία, Βραζιλία...
- Εμφάνιση «επιδημιών» LRSE σε ΜΕΘ* σε παγκόσμιο επίπεδο
- Ελλάδα: πρώτη καταγραφή LRSE το 2008**

Μηχανισμοί αντοχής

- Μεταλλάξεις στην περιοχή V του 23S rRNA (G2576T, T2500A,..)
- Μηχανισμός σχετιζόμενος με τις 50S ριβοσωμικές πρωτεΐνες L3, L4 και L22 (γονίδια *rplC*, *rplD*, *rplV*).
- Μηχανισμός Cfr (Chloramphenicol - Florfenicol Resistance)
- Μηχανισμός σχετιζόμενος με την μεθυλοτρανσφεράση RlmN

* (Treviño M et al 2009, Barros M et al 2014, Layer F et al 2015)

** (Liakopoulos A et al 2009, Pournaras S et al 2013)

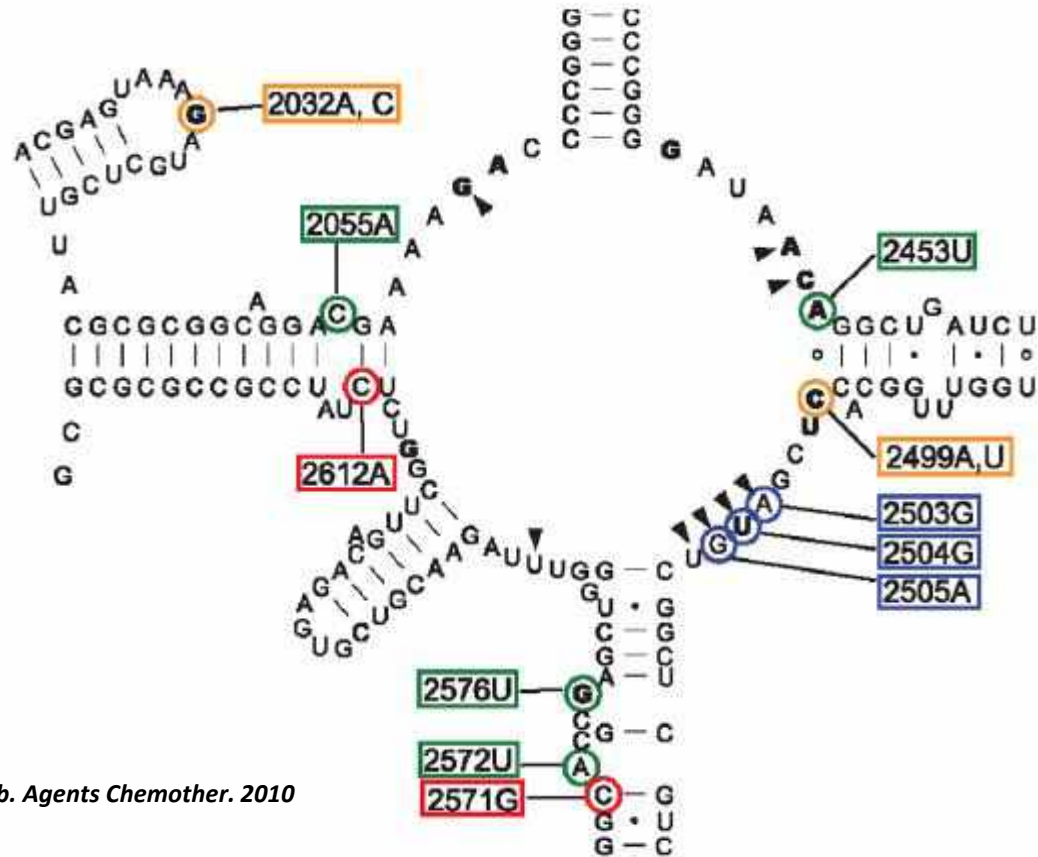
S. epidermidis και αντοχή στη λινεζολίδη

Μηχανισμοί αντοχής

1. Μεταλλάξεις στην περιοχή V του 23S rRNA

- Αφορούν τον κεντρικό βρόχο της περιοχής **V του 23S rRNA**
- Οι συχνότερες είναι οι **G2576T, T2500A** - έχει καταγραφεί πλήθος άλλων (**T2502A, T2504A, C2532T, C2190T, G2603T, C2192T, A2503G, T2504C, G2766T ...**)
- Προκαλούν **αλλαγή της χωροδιάταξης** της περιοχής V του 23S rRNA και έτσι αδυναμία σύνδεσης της λινεζολίδης σ' αυτήν
- Όσα περισσότερα **αντίγραφα γονιδίων** φέρουν τη μετάλλαξη τόσο μεγαλύτερη είναι η προκύπτουσα αντοχή στη λινεζολίδη (*rrlABCDEF*)
- Σημαντικές αποδεικνύονται και μεταλλάξεις σε βάσεις μακριά από το σημείο σύνδεσης της PTC (π.χ. **A2062, G2447, A2453, G2576** κλπ)

Μεταλλάξεις στην περιοχή V του 23S rRNA



Long et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010

Secondary structure of the 23S rRNA Peptidyltransferase loop; colored mutations indicate 1st (blue), 2nd (green), 3rd (orange) and outer layer (red) nucleotides with respect to linezolid

S. epidermidis και αντοχή στη λινεζολίδη

Μηχανισμοί αντοχής

2. Μηχανισμός σχετιζόμενος με τις 50S ριβοσωμικές πρωτεΐνες L3, L4 και L22

- Σχετιζόμενα γονίδια: *rplC*, *rplD* και *rplV*.
- Μεταλλάξεις:
 - rplC*: G301C, G455A, G456T, A474T,
 - rplD*: T150C, A383C, A521G, G545A,
 - rplV*: A138G, C141T, G166A
- Προκαλούν αλλαγή της χωροδιάταξης του PTC και έτσι η λινεζολίδη δεν μπορεί να συνδεθεί στο ριβόσωμα

2. Μηχανισμός σχετιζόμενος με τις 50S ριβοσωμικές πρωτεΐνες L3, L4 και L22

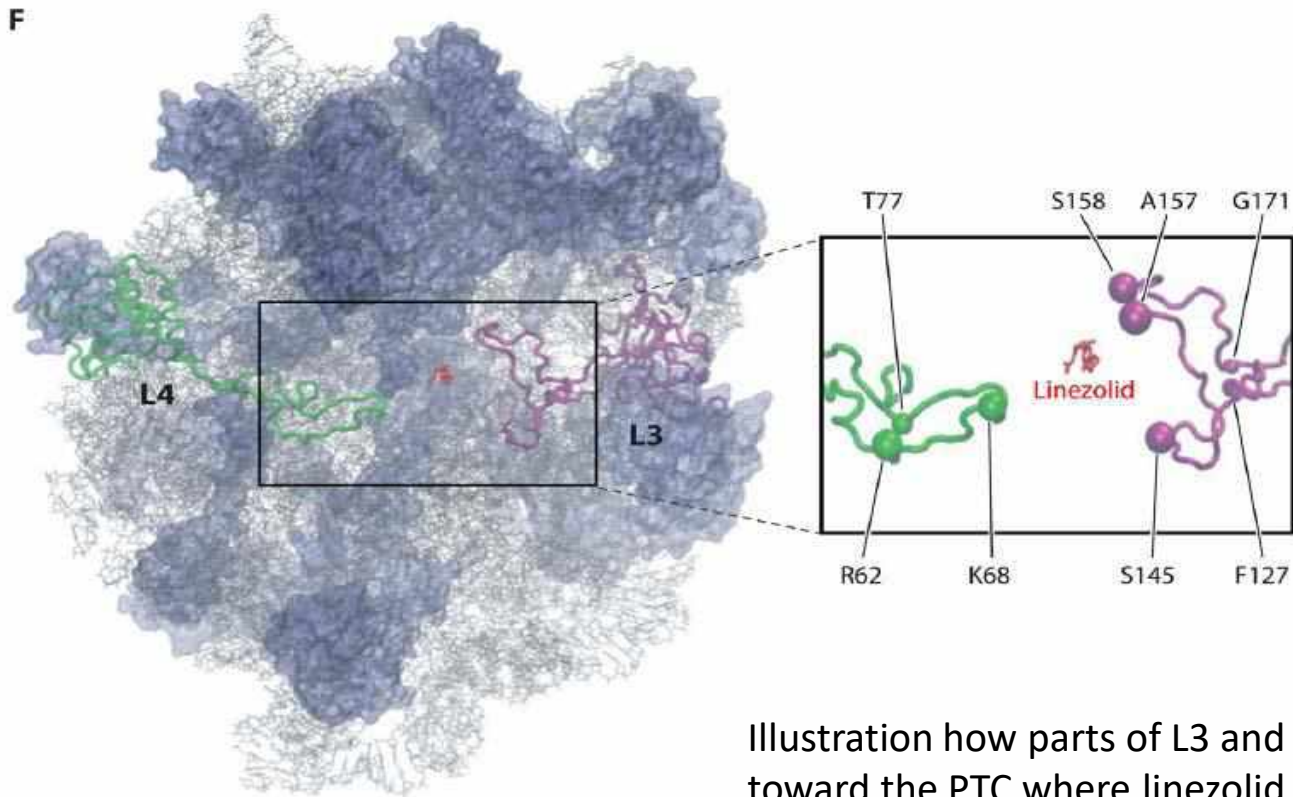


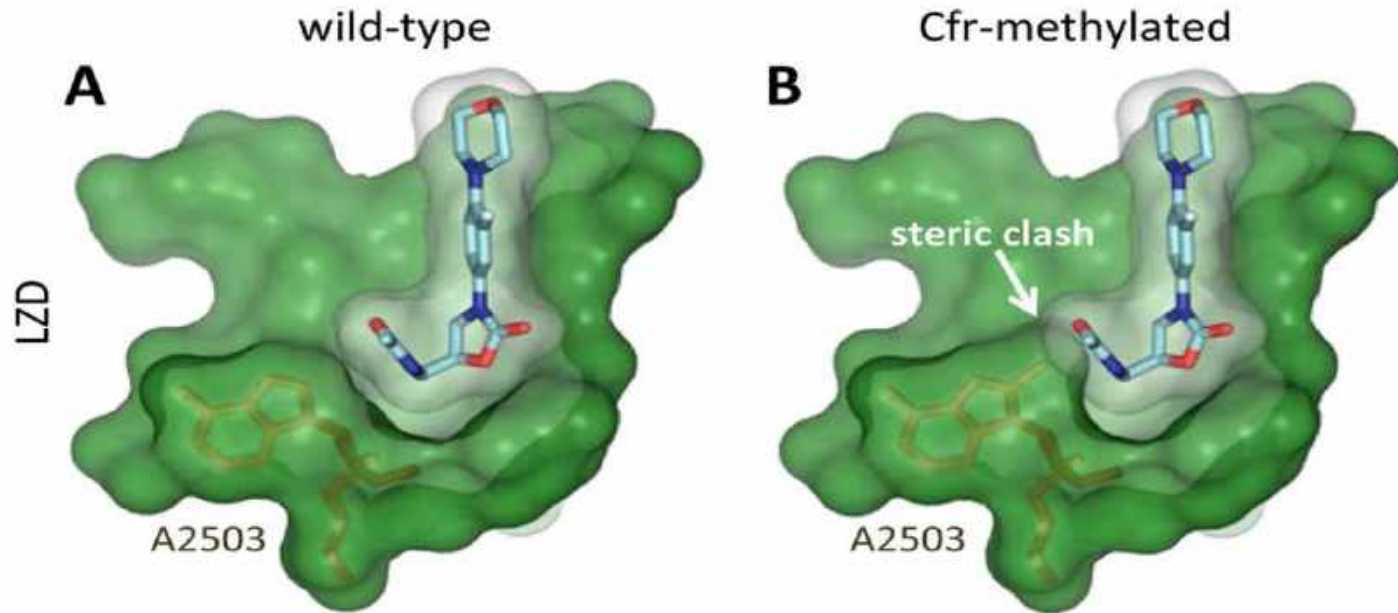
Illustration how parts of L3 and L4 extend toward the PTC where linezolid is bound

S. epidermidis και αντοχή στη λινεζολίδα

Μηχανισμοί αντοχής

3. Μηχανισμός Cfr (Chloramphenicol - Florfenicol Resistance)

- Σχετιζόμενο γονίδιο: ***cfr***
- **Πρωτεΐνη Cfr:** δράση **RNA μεθυλοτρανσφεράσης** – μεθυλίωση της αδενίνης στη θέση C8 του A2503 του 23S rRNA
- Προκύπτων φαινότυπος αντοχής: **PhLOPSA** (Phenicol, Lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilines, streptogramin A) **όχι μακρολίδες!**
- Έδραση σε **πλασμίδια** (p12-00322 και p12-02300) – δυνατότητα μεταφοράς σε στελέχη σταφυλοκόκκου, ακόμη και άλλου είδους

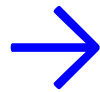


PhLOPSA phenotype (resistance to Phenicol, Lincosamide, Oxazolidinone, Pleuromutilin and Streptogramin A Antibiotics)

Εξάρτηση *S. epidermidis* από τη λινεζολίδα (linezolid dependence)

Σημαντική επιτάχυνση του ρυθμού ανάπτυξης των LRSE, σε περιβάλλον παρουσία λινεζολίδης, σε σχέση με την ανάπτυξή τους σε περιβάλλον χωρίς το αντιβιοτικό

Πρώτη περιγραφή του φαινομένου διεθνώς, από την Ελλάδα



**Linezolid
Dependence in
*Staphylococcus
epidermidis*
Bloodstream
Isolates**

Spyros Pournaras, Eleni Ntokou,
Olympia Zarkotou, Kyriaki Ranellou,
Katerina Themeli-Digalaki,
Constantinos Stathopoulos,
and Athanassios Tsakris

Περιγραφή της εξάρτησης των LRSE από τη λινεζολίδα

Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 19, No. 1, January 2013

Συμπεράσματα

- LRSE με ↑ αντοχή στη λινεζολίδα (MIC>256μg/ml) (μεταλλάξεις σε 5-6 αντίγραφα του 23S rRNA)
- Συγκεκριμένες μεταλλάξεις στο 23S rRNA (T2504A και C2534U) και αμινοξικές αντικαταστάσεις στην πρωτεΐνη L3 (G152D ή D159Y, μαζί με την L101V)
- Η λινεζολίδα ίσως συνδεόμενη με πρόδρομα ριβοσωμικά μόρια οδηγεί στο σχηματισμό τροποποιημένων ριβοσωμάτων που συνθέτουν πρωτεΐνες ταχύτερα

Linezolid-Dependent Function and Structure Adaptation of Ribosomes in a *Staphylococcus epidermidis* Strain Exhibiting Linezolid Dependence

August 2014 Volume 58 Number 8

Antimicrobial Agents and Chemotherapy p. 4651–4656

Sofia Kokkori,^a Maria Apostolidi,^a Athanassios Tsakris,^b Spyros Pourmaras,^b Constantinos Stathopoulos,^a George Dinos^a

- **Linezolid most likely modified the ribosomal assembly procedure, leading to a new functional ribosomal population active only in the presence of linezolid**
- **Therefore, the higher growth rate of the linezolid-dependent strains could be attributed to the functional and structural adaptations of ribosomes to linezolid**

Μελέτη ριβοσωμάτων εξαρτημένων στελεχών απουσία (LRSE^D) και παρουσία λινεζολίδης (LRSE^{D+L})

August 2014 Volume 58 Number 8

Antimicrobial Agents and Chemotherapy p. 4651–4656

- Αύξηση δραστηριότητας πεπτιδυλοτρανσφεράσης
- Δομικές αλλαγές πρόδρομων ριβοσωμικών υπομονάδων (30S και 50S)

Τροποποίηση διαδικασίας συναρμολόγησης ριβοσωμάτων

Νέος ριβοσωμικός πληθυσμός

+ LZD

ΤΑΧΥΤΕΡΗ ΠΡΩΤΕΙΝΟΣΥΝΘΕΣΗ

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. Επιδημιολογική μελέτη των LRSE στην Ελλάδα

B. Μελέτη του φαινομένου της εξάρτησης των LRSE από την λινεζολίδη

1. Υλικά – μέθοδοι
2. Φαινοτυπικά πειράματα για τη μελέτη της εξάρτησης των LRSE
3. Μελέτη της γενετικής συσχέτισης των στελεχών με PFGE και MLST
4. Συλλογή LRSE από Γερμανία
5. Συλλογή LRSE από Ιταλία
6. Μελέτη του φαινομένου της εξάρτησης σε συγκέντρωση LZD: 8 µg/ml
7. Μελέτη της επίδρασης της έκθεσης στη λινεζολίδη στην εμφάνιση της εξάρτησης στους LRSE
8. Συμπεράσματα

Wide dissemination of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* in Greece is associated with a linezolid-dependent ST22 clone

Vasilios Karavasilis^{1†}, Olympia Zarkotou^{2†}, Maria Panopoulou³, Melina Kachrimanidou⁴, Katerina Themeli-Digalaki², Antonios Stylianakis⁵, Vassiliki Gennimata⁶, Eleni Ntokou¹, Constantinos Stathopoulos⁷, Athanasios Tsakris⁶ and Spyros Pournaras^{6*} on behalf of the Greek Study Group on Staphylococcal Linezolid Resistance‡

Acknowledgements

The following members of the Greek Study Group on Staphylococcal Linezolid Resistance contributed significantly to the study design, strain collection and data analysis: E. Kouskouni and G. Vrioni, National and Kapodistrian University of Athens, Athens; V. Mamali, E. Kousouli and P. Papagiannakopoulou, Tzaneio General Hospital, Piraeus; I. Kristo, K. Dafopoulou and C. Hadjichristodoulou, University of Thessaly, Larissa; P. Carle and M. Kimouli, Saint Panteleimon Hospital, Nicea; E. Perivolioti, M. Nepka and K. Foudoulis, Evangelismos General Hospital, Athens; F. Stathoulopoulou and P. Papanikolaou, KAT General Hospital, Athens; A. Poulou, Serres General Hospital, Serres; and Eleni Tsorlini, George Papanikolaou General Hospital, Thessaloniki, Greece.

Α. Επιδημιολογική μελέτη της διασποράς των LRSE στην Ελλάδα

- Συμμετοχή 6 διαφορετικών νοσοκομείων από την ελληνική επικράτεια
- Κλινικά σημαντικές λοιμώξεις από *S. epidermidis*, από το 2011 έως το 2013
- Περισσότερα από 7500 στελέχη
- Ποσοστά αυξανόμενα συν τω χρόνω – σχετιζόμενα με την παρατεταμένη χορήγηση λινεζολίδης
- Συνολικό ποσοστό LRSE για την 3ετία: 8,8%
- Υψηλότερα ποσοστά αντοχής στη λινεζολίδα σε ΜΕΘ (μέχρι και 35,3%)

Συνολο ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ *S. Epidermidis* (

	2011		2012		2013	
Νοσοκομείο	ΜΕΘ	μη-ΜΕΘ	ΜΕΘ	μη-ΜΕΘ	ΜΕΘ	μη-ΜΕΘ
1	46 (23.9%)	78 (6.4%)	59 (27.1)	58 (12.2%)	49 (32.6%)	59 (8.5%)
2	121 (8.3%)	430 (2.1%)	128 (20.3)	437 (3.0%)	155 (18.7%)	535 (2.1%)
3	200 (3.0%)	411 (1.7%)	183 (18.6)	465 (2.6%)	169 (18.9%)	502 (1.6%)
4	51 (35.3%)	571 (6.7%)	33 (18.1)	501 (9.4%)	38 (31.7%)	312 (9.6%)
5	134(17.9%)	78 (1.3%)	140 (12.2)	109 (0.9%)	156 (16.7%)	158 (4.4%)
6	182 (23.1%)	302 (3%)	234 (24.0)	380 (4.0%)	186 (22.6%)	317 (6.0%)
ΣΥΝΟΛΟ	734 (15.1%)	1870 (3.7%)	777 (20.0%)	1950 (4.9%)	753 (20.9%)	1883 (4.2%)
overall	6,9%		2727 (9,1%)		2636 9,0%	

B. Μελέτη της εξάρτησης των LRSE από τη λινεζολίδα

1. Υλικά – μέθοδοι

- 63 LRSE με υψηλή αντοχή στη λινεζολίδα
- Ταυτοποίηση →
 - φαινοτυπικές μέθοδοι
 - VITEK 2, Maldi biotyper
- Φαινότυποι αντοχής →
 - VITEK 2
 - E-test
 - Μέθοδος διαδ. αραιώσεων

Προέλευση LRSE

Σε σχέση με το υλικό απομόνωσης

ΔΕΙΓΜΑ (είδος)	Απομονωθέντα δείγματα
Αίμα	47
ΚΦ Καθετήρας	6
Τραύμα / πύο	7
Πλευριτικό υγρό	3
ΣΥΝΟΛΟ	63

Σε σχέση με την κλινική νοσηλείας

ΕΙΔΟΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ	Απομονωθέντα δείγματα
ΜΕΘ	46
ΜΑΦ	4
Καρδιοχειρουργική	1
Παθολογική	4
Νευρολογική	1
Ορθοπαιδική	1
Αγγειοχειρουργική	1
Νευροχειρουργική	2
ΦΙΑ	3
ΣΥΝΟΛΟ	63

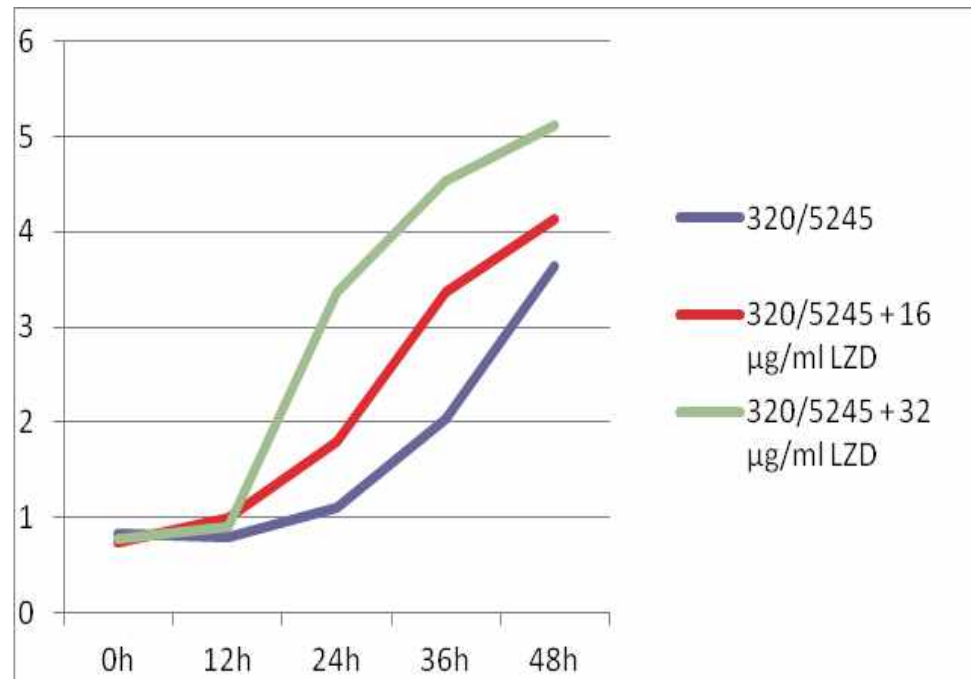
Στο 85,2%, μακροχρόνια θεραπεία με λινεζολίδη – από 3 ως 28 ημέρες (Μ.Ο.: 16,25 ημέρες)

2. Φαινοτυπικά πειράματα για τη μελέτη της εξάρτησης

Μέθοδος

- Ανάπτυξη των LRSE σε Mueller Hinton Broth απουσία και παρουσία λινεζολίδης (επώαση σε ειδικό κλίβανο με δυνατότητα ανακίνησης / 100-110 rpm / 37° C)
- Συγκεντρώσεις λινεζολίδης: 0, 16, 32 µg/ml
- Εκτέλεση εις τριπλούν για διασφάλιση της επαναληψιμότητας
- Μέτρηση με διαπιστευμένο θολοσίμετρο και σε πρότυπες μονάδες MacFarland, της ανάπτυξης των LRSE, ανά 12ωρο και για 48 ώρες.
- Αποτύπωση των αποτελεσμάτων σε καμπύλες ανάπτυξης
- Στατιστική ανάλυση των στοιχείων με τη διπλή δοκιμασία *t-test* και χ^2 -*test* και με τη βοήθεια λογισμικού Minitab software (version 13.31) - η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε στο $p < 0.05$.
- Ως control χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο στέλεχος *S.aureus* ATCC29213 (LZD MIC: 0,5 µg/ml)

Καμπύλες ανάπτυξης («growth curves»)



Καμπύλες ανάπτυξης ενδεικτικού στελέχους
S. epidermidis (No 320/5245)
με εξάρτηση από τη λινεζολίδα (linezolid-dependent)

3. Μελέτη της γενετικής συσχέτισης των στελεχών με PFGE και MLST

ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ		PFGE τύπος / MLST τύπος						
			Ia/ST22	Ib/ST22	Ic/ST22	Id/ST22	Ie/ST22	II/ST9*	III/ST204**
1	D	10	9	-	-	-	1	-	-
	ND	1	-	-	-	-	1	-	-
2	D	5	5	-	-	-	-	-	-
	ND	5	3	-	-	-	-	1	1
3	D	6	5	1	-	-	-	-	-
	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
4	D	12	9	1	2	-	-	-	-
	ND	3	2	1	-	-	-	-	-
5	D	8	7	-	-	1	-	-	-
	ND	1	1	-	-	-	-	-	-
6	D	6	6	-	-	-	-	-	-
	ND	6	5	-	1	-	-	-	-
ΣΥΝΟΛΑ	D	47	41	2	2	1	1	-	-
	ND	16	11	1	1	-	1	1	1

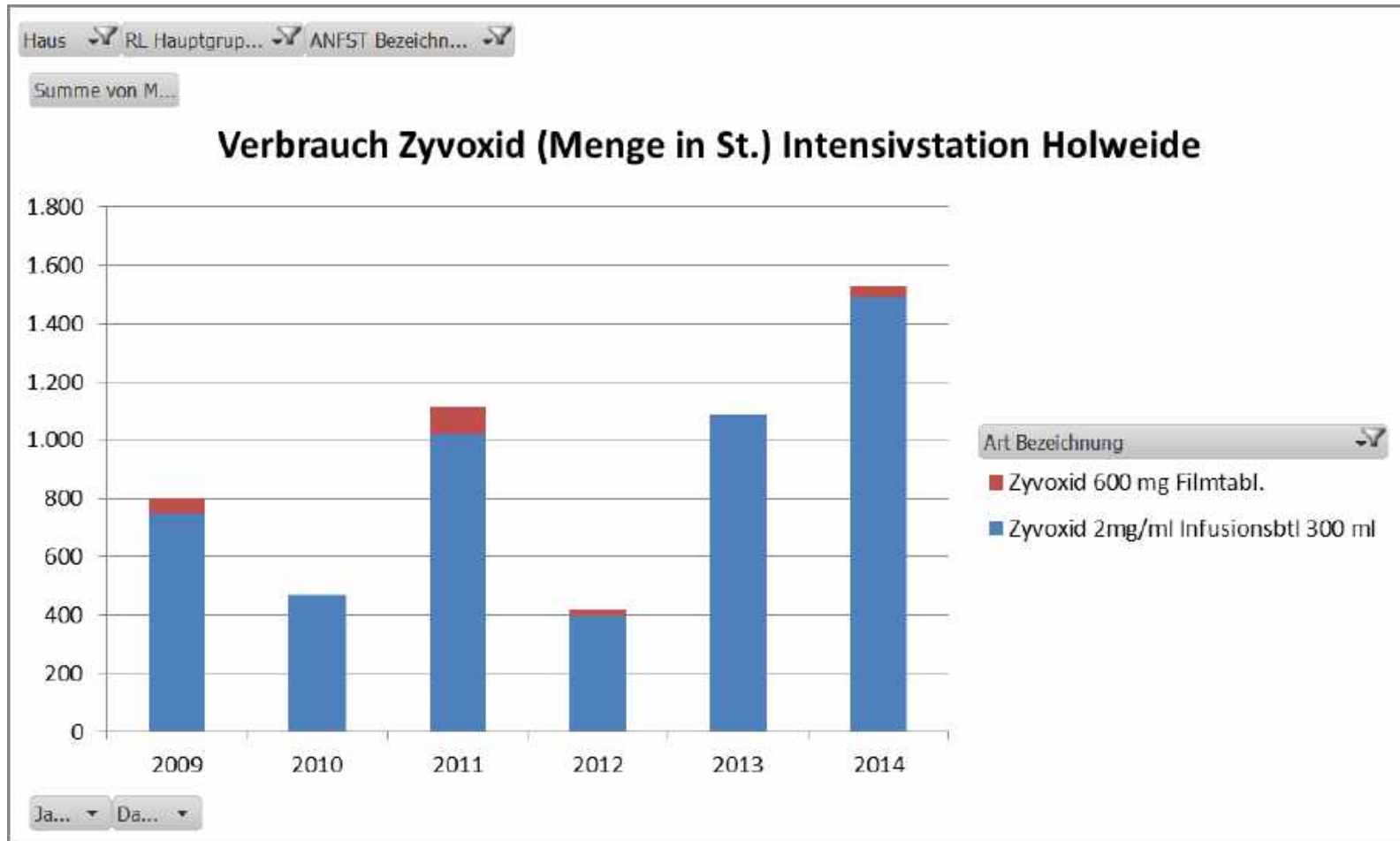
Αποτελέσματα

- ✓ 61/63 (96,8%) στελέχη LRSE της μελέτης ανήκαν στον τύπο ST22 (μέλος του κλωνικού συμπλέγματος CC5)
- ✓ 47/63 (74,6%) στελέχη ήταν linezolid-dependent
- ✓ Όλα τα εξαρτημένα στελέχη ανήκαν στον ST22 τύπο (77% επί των ST22)
- ✓ Ο ST22 κλώνος αναδεικνύεται σε προεξάρχων στην Ελλάδα (*Pournaras S et al, 2013, Papadimitriou-Olivgeris M et al, 2013*)
- ✓ Εξάρτηση: σύμφυτο χαρακτηριστικό ή μεμονωμένη μετάλλαξη που εξαπλώθηκε μαζί με τον ST22 κλώνο;

4. Συλλογή LRSE από Γερμανία

- 14 στελέχη από 5 διαφορετικά Γερμανικά Νοσοκομεία (2012-2014)
- 11/14 με υψηλού επιπέδου αντοχή στη λινεζολίδη (MIC>256 µg/ml)
- 10/14 στελέχη (71,4%) εμφάνισαν το φαινόμενο της εξάρτησης - όλα είχαν υψηλού επιπέδου αντοχή στη λινεζολίδη (91%, των στελεχών με υψηλή αντοχή!)
- Τυποποίηση εξαρτημένων στελεχών: ST22 (7), ST2 (1), ST5 (1), ST168 (1) – κλωνικό σύμπλεγμα CC5

Συσχέτιση της έξαρσης LRSE λοιμώξεων με την ↑ κατανάλωση LZD



Ανίχνευση μηχανισμών αντοχής στην λινεζολίδη με PCR

α/α	στέλεχος	ST τύπος	<i>cfr</i>	23-S RNA V region	Gene <i>rpIC</i> /Pr L3	Gene <i>rpID</i> /Pr L4	Gene <i>rpIV</i> / Protein L22
1	12-01569	ST22	(-)	C2161T/T2502A/C2532T	C301G/Leu101Val G455A,C456T/ Gly152Asp A474T / - G475T / Asp159Tyr	T150C/- A383C/ Glu 128 Ala A512G / Gin174Arg G545A/Arg182Gin	A138G / - C141T / - G166A / -
2	12-02439	ST22	(-)	-/-	-/-	-/-	-/-
3	12-03718	ST22	(-)	-/-	-/-	-/-	-/-
4	12-03723	ST22	(-)	-/-	-/-	-/-	-/-
5	13-00905	ST22	(-)	-/-	-/-	T150C / - A383C/ Glu 128 Ala A512G / Gin174Arg G545A/Arg182G in Pos 138 His Insertion (ACC)	-/-
6	13-01045	ST22	(-)	-/-	-/-	-/-	-/-
7	13-01084	ST22	(-)	-/-	-/-	-/-	-/-
8	14-03576	ST2	(-)	-/-	C301G/Leu101Val C456T / -	C78T / - T 102C / - T240G/ Ser61Arg A473G/ Asn158Ser	-/-
9	14-01514	ST5	(+)	C2190T	T438G /His 146Gin G460T / Val154Leu G469A, C470G / Ala157Arg	213-GGT-214/ 71-Gly-72 T240G/ Ser61Arg A473G/ Asn158Ser	-/-
10	14-02427	ST168*	(+)	C2190T	C301G/Leu101Val G455A/Gly152Asp	Wildtype	wildtype

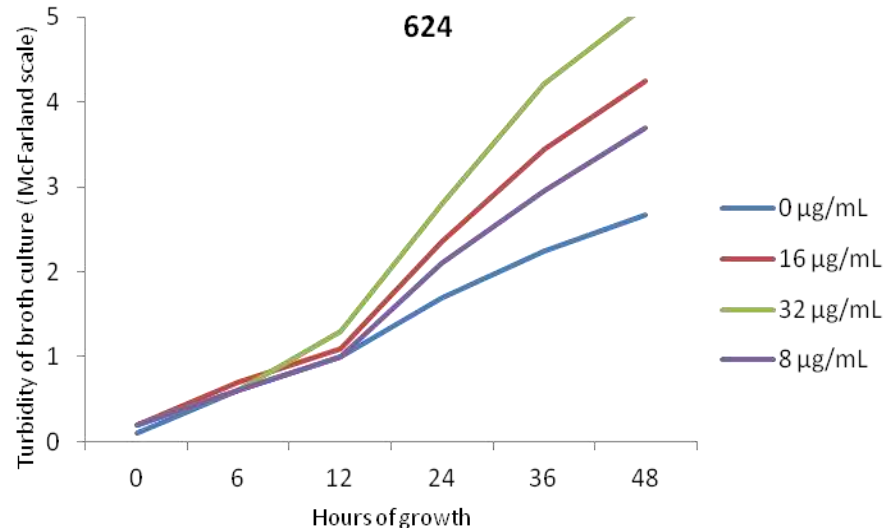
Μηχανισμοί αντοχής των LRSE^D από Γερμανία σε σχέση με τον ελληνικό κλώνο

- Τα 7 ST22 γερμανικά στελέχη έφεραν στο 23S rRNA 2 μεταλλάξεις σε γειτονική θέση σε σχέση με τα ελληνικά (T2502A/C2532T έναντι των T2504A και C2534U). Επίσης έφεραν 2 αμινοξικές αντικατάστασεις στις ίδιες θέσεις (L101 και G152) για την L3 πρωτεΐνη.
- Ειδικά η L101V εμφανίζεται και στα ST2 και ST5 στελέχη και αποτελεί την κοινή μετάλλαξη όλων των εξαρτημένων στελεχών (με εξαίρεση το ST168)
- Το *cfr* γονίδιο ανιχνεύτηκε σε 2 από τα 10 στελέχη

5. Συλλογή από Ιταλία

- 9 στελέχη από ιταλικά νοσοκομεία της περιοχής της Τοσκάνης
- Όλα με μετρίου ή χαμηλού επιπέδου αντοχή στη λινεζολίδα (MICs: 8 - 64 $\mu\text{g/ml}$)
- Κανένα στέλεχος δεν εμφάνισε το φαινόμενο της εξάρτησης

6. Μελέτη του φαινομένου της εξάρτησης σε συγκέντρωση LZD: 8μg/ml*



- Σε 6 LRSE^D μελετήθηκε το φαινόμενο της εξάρτησης με καμπύλες ανάπτυξης και σε συγκεντρώσεις LZD: 8 μg/ml
- 5/6 εκδήλωσαν εξάρτηση και σ' αυτή τη συγκέντρωση

* Συγκεντρώσεις LZD που επιτυγχάνονται *in vivo* με τα συνήθη θεραπευτικά πρωτόκολλα (Dehghanyar P et al, AAC, 2005, Stalker DJ et al, JAC, 2003)

7. Μελέτη της επίδρασης της έκθεσης στη λινεζολίδα στην εμφάνιση της εξάρτησης στους LRSE

- 6 LRSE^D $\xrightarrow[ΧΩΡΙΣ\ LZD]{7\ ανακαλλιέργειες}$ 3 LRSE^D + 3 LRSEND

- 6 LRSEND $\xrightarrow[ΜΕ\ LZD\ 8\ \mu g/ml]{7\ ανακαλλιέργειες}$ 5 LRSE^D + 1 LRSEND

Η «μεταστροφή» των 5 LRSEND στελεχών σε LRSE^D επιτεύχθηκε ακόμη και μετά από μία και μόνη 18ωρη επώαση γύρω από δισκίο λινεζολίδης σε agar MH (*linezolid 30μg, susceptibility disks, Bio-Rad, France*)

8. Συμπεράσματα:

LRSE με LZD MIC > 256 μg/ml

Γενετικό χαρακτηριστικό του κλωνικού συμπλέγματος CC5 (ST22, ST2, ST5, ST168)




Εκδηλώνεται και σε συγκεντρώσεις LZD: 8 μg/ml

Ευνοεί την επικράτηση και τη διασπορά των LRSE

Σχετίζεται σαφώς με την έκθεση στη λινεζολίδη

Καταγραφή υψηλών ποσοστών LRSE^D επί των LRSE στην Ελλάδα και τη Γερμανία

ΣΥΝΟΨΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Καταγράφηκαν **σημαντικά και αυξανόμενα** συν τω χρόνω ποσοστά LRSE στα Ελληνικά νοσοκομεία (20.9% σε ασθενείς ΜΕΘ, 4.2% σε μη ΜΕΘ συνολικά για το 2013), που σαφώς **σχετίζονται με την αύξηση της κατανάλωσης της LZD**
 - Το φαινόμενο της **εξάρτησης** των LRSE από τη λινεζολίδη, συσχετίστηκε επιδημιολογικά και πειραματικά **με την έκθεση στη λινεζολίδη και μόνο με στελέχη με υψηλού επιπέδου αντοχή στη λινεζολίδη (MIC>256μg/ml)**
 - Όλα τα εξαρτημένα στελέχη της μελέτης ανήκαν στο **κλωνικό σύμπλεγμα CC5**. Επί πλέον, ο επικρατών ST22 κλώνος των ελληνικών νοσοκομείων, ταυτοποιήθηκε και σε στελέχη LRSE^D στη Γερμανία
- 
- Πιθανώς **η εξάρτηση** ως γενετικό χαρακτηριστικό του CC5 συμπλέγματος δίνει σ' αυτά τα στελέχη, **το εξελικτικό πλεονέκτημα για επικράτηση και διασπορά σε παγκόσμιο επίπεδο.**

Η αναδυόμενη απειλή της εξάπλωσης των LRSE με τη μορφή επιδημιών σε παγκόσμιο επίπεδο σε σχέση και με το φαινόμενο της εξάρτησης αλλά και την κατάχρηση της λινεζολίδης στη θεραπευτική κάνει επιβεβλημένη τη στενή παρακολούθηση του φαινομένου αλλά και τη λήψη μέτρων για την αντιμετώπισή του και τον περιορισμό της εξάπλωσης τέτοιων στελεχών._

Σας ευχαριστώ

Δρ. Χρήστος Χατζηχριστοδούλου

Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δρ. Σπυρίδων Πουρνάρας

Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δρ. Παναγιώτης Λιάκος

Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δρ. Αθανάσιος Τσακρής

Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δημήτριος Μόσιαλος

Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δρ. Μελίνα Καχριμανίδου

Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Δρ. Ευθυμία Πρωτονοταρίου

Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης