

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ειρήνης Σιατραβάνη

Ιούνιος 2020

Τίτλος: Μοριακή επιδημιολογία στελεχών *Neisseria gonorrhoeae* στην Ελλάδα. Γονοτυπικός χαρακτηρισμός ανθεκτικών στελεχών και ανάλυση μηχανισμών αντοχής

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η *Neisseria gonorrhoeae* (κν. γονόκοκκος) είναι το παθογόνο αίτιο της γονόρροιας, ενός από τα κυριότερα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα βακτηριακής αιτιολογίας. Σύμφωνα με τις πιο πρόσφατες εκτιμήσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO), η παγκόσμια επίπτωση της γονόρροιας έφτασε, το 2012, σε 78 εκατομμύρια περιστατικά, από τα οποία τα 4,7 εκατομμύρια στην Ευρώπη και άλλα 4,5 εκατομμύρια στην περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου (5). Εξ αιτίας της επίπτωσης της νόσου και των σοβαρών επιπλοκών της, όταν δεν θεραπεύεται εγκαίρως, ο έλεγχος της γονόρροιας συνιστά θέμα υψηλής προτεραιότητας για τη Δημόσια Υγεία.

Ο γονόκοκκος είναι εγγενώς ευαίσθητος στα αντιβιοτικά, αλλά παράλληλα και ιδιαίτερα ικανός να αποκτά νέες ιδιότητες, χάρη στα γενετικά του πλεονεκτήματα (υψηλός ρυθμός μεταλλαγών, φυσική ικανότητα πρόσληψης DNA με γενετική μεταμόρφωση) που του προσφέρουν ισχυρό δυναμικό προσαρμογής στις μεταβαλλόμενες συνθήκες του περιβάλλοντος.

Συνοπτικά, οι κυριότεροι μηχανισμοί αντοχής που έχουν έως σήμερα παρατηρηθεί στο γονόκοκκο (10, 12, 13) συνίστανται σε:

(α) Απόκτηση πλασμιδίων που οδηγούν σε υψηλού επιπέδου αντοχή είτε στις πενικιλίνες, εφόσον φέρουν γονίδια υπεύθυνα για την παραγωγή πενικιλινασών, είτε στις τετρακυκλίνες, όταν είναι φορείς του *tetM* γονιδίου, το οποίο κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που συνδέεται με το ριβόσωμα και το προστατεύει από την ανασταλτική δράση της τετρακυκλίνης. (β) Απόκτηση συζευκτικών τρανσποζονίων που ευθύνονται για υψηλού επιπέδου αντοχή στις μακρολίδες, φέροντας γονίδια *erm* ή γονίδια *mef*. Τα *erm* (erythromycin methylase genes) κωδικοποιούν την παραγωγή μιας μεθυλάσης που προστατεύει την 23S υπομονάδα του ριβοσώματος από τη δράση των μακρολιδών, ενώ τα *mef* (macrolide efflux genes) ευθύνονται για την ενεργοποίηση μιας ειδικής αντλίας εκροής που απομακρύνει τις μακρολίδες από το κύτταρο του γονοκόκκου. (γ) Σημειακές μεταλλαγές που θίγουν ριβοσωματικές πρωτεΐνες (16S, 5S) και οδηγούν σε υψηλού επιπέδου αντοχή στη σπεκτινομυκίνη παρεμποδίζοντας τη σύνδεσή της στο ριβόσωμα, καθώς και άλλες ριβοσωματικές μεταλλαγές που οδηγούν σε υψηλού επιπέδου αντοχή στις μακρολίδες, όπως μεταλλαγές στην περιοχή V του 23S rRNA γονιδίου ή στα γονίδια *rplD* και *rplV* που κωδικοποιούν για τις ριβοσωματικές πρωτεΐνες L4 και L22, αντίστοιχα. (δ) Συσσώρευση μεταλλαγών στα γονίδια *gyrA* και *parC*, που οδηγούν αθροιστικά σε υψηλού επιπέδου αντοχή στις φθοριοκινολόνες, προκαλώντας τροποποίηση

της δομής των ενζύμων γυράσηA και τοποϊσομεράσηIV, τα οποία αποτελούν το στόχο των κινολονών στο κύτταρο του γονοκόκκου,(ε) Μεμονωμένες μεταλλαγές ή μωσαϊκισμός στο χρωμοσωματικής εντόπισης γονίδιο *penA*, το οποίο κωδικοποιεί την παραγωγή της πενικιλίνο-δεσμευτικής πρωτεΐνης 2 (PBP-2) που αποτελεί το στόχο των β-λακταμικών αντιβιοτικών στο γονοκοκκικό κύτταρο. Οι μεμονωμένες μεταλλαγές, όπως και ο μωσαϊκισμός του *penA* γονιδίου, οδηγούν στην παραγωγή μεταλλαγμένων PBP-2 με διαφορετοποιημένο το φάσμα των β-λακταμικών αντιβιοτικών που μπορούν να δεσμεύουν,(στ) Μεταλλαγές σε πλειάδα χρωμοσωματικών γονιδίων, όπως τα γονίδια *por* (*penB*κ.ά.),που σχετίζονται με τη μείωση της διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης του γονοκόκκου, και τα γονίδια του οπερονίου *mtr*(*RCDE*) που εμπλέκονται στη ρύθμιση της μη-ειδικής αντλίας εκροής (*efflux pump*) του γονοκόκκου. Οι μεταλλαγές αυτές ευθύνονται για παρεμπόδιση της πρόσβασης των αντιβιοτικών στο κύτταρο και στους επί μέρους στόχους τους μέσα στο κύτταρο του γονοκόκκου και οδηγούν σε μη-ειδική αντοχή, δηλαδή σε αντοχή που αφορά ταυτόχρονα πολλά αντιβιοτικά διαφορετικών ομάδων, όπως οι πενικιλίνες, τετρακυκλίνες, μακρολίδες, χλωραμφαινικόλη κ.ά. Η μη-ειδική χρωμοσωματική αντοχή είναι χαμηλού επιπέδου, αλλά είναι αθροιστική και πολύ συχνά φτάνει σε κλινικά σημαντικά επίπεδα (10, 12,13).

Η εμφάνιση και, στη συνέχεια, η ευρεία διασπορά των περισσότερων από τους παραπάνω μηχανισμούς αντοχής έχει αποκλείσει από την **εμπειρική** θεραπεία τα παλαιότερα αντιγονορροϊκά αντιβιοτικά (πενικιλίνη, τετρακυκλίνες, ερυθρομυκίνη, χλωραμφαινικόλη), ενώ στις περισσότερες χώρες, συμπεριλαμβανομένης της Ελλάδας, ούτε οι νεότερες φθοριωμένες κινολόνες μπορούν να χορηγηθούν λόγω απαγορευτικών ποσοστών αντοχής. Παράλληλα, η ανάδυση –το 1998 στην Ιαπωνία– πανανθεκτικών στελεχών γονοκόκκου με μειωμένη ευαισθησία και στις 3^{ης} γενιάς κεφαλοσπορίνες (3ΓΚ) και, κυρίως, η προϊούσα εξάπλωσή τους σε όλο σχεδόν τον κόσμο έχει κάνει ορατό τον κίνδυνο της λεγόμενης «μη-θεραπεύσιμης» γονόρροιας (*untreatable gonorrhoea*) που θεωρείται σήμερα ένα από τα μείζονα προβλήματα Δημόσιας Υγείας (1, 7, 10, 11,13). Η επιτήρηση του γονοκόκκου και της αντοχής των στελεχών είναι απαραίτητη για τον περιορισμό της διασποράς.

Η χρήση τεχνολογιών προσδιορισμού αλληλουχίας υψηλής απόδοσης επιτρέπει την αναγνώριση και παρακολούθηση της διασποράς των γνωστών γονιδίων αντοχής, αλλά διευκολύνει επίσης την αναγνώριση και νέων μεταλλάξεων/γονιδίων αντοχής. Εκτός από τις βελτιωμένες δυνατότητες προσδιορισμού της αντοχής, οι γενωμικές αναλύσεις παρέχουν εργαλεία που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την τυποποίηση των στελεχών γονοκόκκου, για την αναζήτηση φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ στελεχών, για την εντόπιση νέων ανθεκτικών γραμμών στελεχών (*lineages*) στον πληθυσμό και για την εκτίμηση των τρόπων μετάδοσης.

ΣΚΟΠΟΣ αυτής της διδακτορικής διατριβής, η οποία πρόκειται να διεξαχθεί στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας & Ανοσολογίας, του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής σε συνεργασία με το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Γονοκόκκου (ΕΚΑΓ) στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, είναι να συμβάλει στην μοριακή επιδημιολογία και την επιτήρηση της αντοχής του γονοκόκκου στην Ελλάδα, με την εξασφάλιση στοιχείων για τα στελέχη της τριετίας 2020-2022 και την αξιολόγησή τους σε σύγκριση με εκείνα προηγούμενων ετών. Η επιτήρηση θα συμπεριλάβει τον γονοτυπικό χαρακτηρισμό όλων των στελεχών του γονοκόκκου, την ανάλυση μηχανισμών αντοχής, τον γονοτυπικό

χαρακτηρισμό των ανθεκτικών στελεχών καθώς και την διερεύνηση της προέλευσης και των οδών διασποράς του γονοκόκκου και την φυλογενετική μελέτη του γονοκοκκικού πληθυσμού στην ελληνική κοινότητα.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Βιολογικό υλικό. Υλικό της διατριβής θα αποτελέσουν όλα τα στελέχη *N. gonorrhoeae* που θα συγκεντρωθούν στο ΕΚΑΓ κατά την τριετία 2020-2022, προερχόμενα από ισάριθμα, διακριτά περιστατικά γονοκοκκικών λοιμώξεων που θα διαγνωστούν κατά τη διάρκεια αυτής της τριετίας σε νοσοκομεία ή άλλα διαγνωστικά κέντρα της Ελλάδας (~100-150 στελέχη ετησίως).

Κατάρτιση Συλλογής – Ταυτοποίηση – Συντήρηση - Καλλιέργεια Γονοκόκκων. Για όλα τα στελέχη που θα καταρτίσουν τη συλλογή γονοκόκκων της τριετίας 2020-2022, θα γίνει επιβεβαίωση της εργαστηριακής διάγνωσης με το σύστημα ταυτοποίησης RapidNHSystem (Remel), καθώς και μεβάζση την οροτυπία, την καλλιέργεια (μορφολογία, αντίδραση οξειδάσης, ανάπτυξη σε εκλεκτικό υλικό) και την ανίχνευση του κρυπτικού πλασμίδιου του γονοκόκκου (6). Η καλλιέργεια των γονοκόκκων θα γίνεται σε GCάγαρ με Vitox supplement (Oxoid), με ή χωρίς αντιβιοτικά (VCNsupplement, Oxoid) με επώαση 18-48h στους 35-37°C, σε υγρή ατμόσφαιρα (70%), εμπλουτισμένη με CO₂ (5-7%). Τα στελέχη της συλλογής θα φυλάγονται στους -80°C, σε υλικό συντήρησης BrainHeart Infusion Broth εμπλουτισμένο με 20% (v/v) γλυκερόλη (glycerol stocks).

Συλλογή και Επεξεργασία Επιδημιολογικών Στοιχείων. Όλα τα στελέχη θα συνοδεύονται με ιστορικό, με βάση προτυποποιημένο ερωτηματολόγιο του ΕΚΑΓ (2), που θα περιλαμβάνει δημογραφικά, επιδημιολογικά και κλινικά στοιχεία για τα αντίστοιχα περιστατικά γονοκοκκικών λοιμώξεων. Οι πληροφορίες αυτές θα τύχουν στατιστικής επεξεργασίας και θα διερευνηθούν πιθανές συσχετίσεις με τους τύπους των στελεχών γονοκόκκου, με στόχο την ανάλυση των οδών διασποράς της αντοχής, αλλά και την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τις ομάδες πληθυσμού στις οποίες ενδεχομένως συγκεντρώνονται τα ανθεκτικά στελέχη και τις επιδημιολογικές παραμέτρους που επηρεάζουν την μετάδοσή τους.

Για τα επιδημιολογικά στοιχεία που θα συλλεγούν θα εφαρμόζεται ανωνυμοποίηση ή ψευδωνυμοποίηση των προσωπικών δεδομένων, ενώ μόνο τα απαραίτητα για τη μελέτη δεδομένα θα διατηρούνται σε κρυπτογραφημένο αρχείο.

Προσδιορισμός Επιπέδων Ευαισθησίας στα Αντιβιοτικά. Όλα τα στελέχη θα ελεγχθούν για τα επίπεδα ευαισθησίας τους σε οκτώ αντιβιοτικά (πενικιλίνη G, κεφιξίμη κεφτριαξόνη, τετρακυκλίνη, αζιθρομυκίνη, σπεκτινομυκίνη, γενταμικίνη, σιπροφλοξακίνη), ενώ για επίλεκτα στελέχη με χαρακτηριστικούς φαινότυπους αντοχής/ευαισθησίας ο έλεγχος θα επεκταθεί σε ευρύτερο φάσμα αντιβιοτικών. Ο έλεγχος των επιπέδων ευαισθησίας θα γίνει με προσδιορισμό των Ελαχίστων Ανασταλτικών Συγκεντρώσεων (MIC) των αντιβιοτικών με Etest (AB-Biodisk, Biomérieux). Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και την κατάταξη των στελεχών σε κατηγορίες ευαισθησίας θα χρησιμοποιηθούν τα κριτήρια της EUCAST (www.eucast.org).

Χαρακτηρισμός Μηχανισμών Αντοχής. Οι μηχανισμοί αντοχής των ανθεκτικών στελεχών θα ταυτοποιηθούν με βάση το φαινότυπό τους και τη χρήση φαινοτυπικών δοκιμασιών και

γονοτυπικών μεθόδων που εφαρμόζονται κατά περίπτωση. Θα χρησιμοποιηθούν η δοκιμασία νιτροσεφίνης για την ανίχνευση των πενικιλινασο-παραγωγών (PPNG) στελεχών, η ανάλυση πλασμιδιακού περιεχομένου στα PPNG στελέχη και στα στελέχη με υψηλού επιπέδου αντοχή στην τετρακυκλίνη (TRNG), η εφαρμογή PCR και PCR-RFLP για την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό του *tetM* γονιδίου στα TRNG στελέχη, ο χαρακτηρισμός των μεταλλαγών γυράσης και τοποϊσομεράσης IV σε QRNG στελέχη, ο χαρακτηρισμός του μηχανισμού αντοχής στις μακρολίδες σε στελέχη με υψηλού επιπέδου αντοχή στην αζιθρομυκίνη, καθώς και η απομόνωση του *penA* γονιδίου με PCR και η ανάλυση της νουκλεοτιδικής του αλληλουχίας στα ανθεκτικά στις 3ΓΚ στελέχη (CDS).

Τυποποίηση στελεχών. Όλα τα στελέχη της συλλογής θα καταταγούν σε ορότυπους με χρήση του GC συστήματος μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της κύριας πρωτεΐνης I της εξωτερικής μεμβράνης του γονοκόκκου (Phadebact GC Serovar Panel, MKL Diagnostics AB, Stockholm, Sweden) (8,9). Ομάδες στελεχών με ενδείξεις κλωνικότητας ή και μεμονωμένα στελέχη με μηχανισμούς αντοχής που χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης θα χαρακτηριστούν αναλυτικότερα με εφαρμογή μεθόδων μοριακής τυποποίησης. Συγκεκριμένα, για τη σύγκριση πιθανώς κλωνικά συνδεδεμένων στελεχών θα χρησιμοποιηθεί η μέθοδος Ηλεκτροφόρησης Γενωμικού DNA σε Παλλόμενο Πεδίο (PFGE) (3, 9), ενώ για το χαρακτηρισμό νέων στελεχών ή αντιπροσωπευτικών στελεχών συγκεκριμένων κλώνων θα χρησιμοποιηθούν και οι μεθοδολογίες NG-MAST (*N. gonorrhoeae Multi Antigen Sequencing Typing*) και MLST (*Multi Locus Sequencing Typing*), από τις οποίες η μεν Ng-MAST αναλύει τις αλληλουχίες υπερμεταβλητών γονιδίων και χρησιμοποιείται για την εκτίμηση γενετικής ομοιότητας στελεχών που απομονώνονται μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα, με στόχο την ανίχνευση επιδημικών κλώνων, η δε MLST προσδιορίζει τις αλληλουχίες συντηρημένων γονιδίων του γονοκόκκου, με στόχο την εκτίμηση φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ στελεχών (4).

Ανάλυση γονιδιωμάτων με αλληλούχηση νέας γενιάς (NGS). Με τη χρήση μεθόδων NGS θα χαρακτηριστούν τα γονιδιώματα των κλώνων *N. gonorrhoeae* που επικρατούν στην κοινότητα και συγχρόνως θα προσδιοριστεί το σύνολο των γονιδίων αντοχής (resistome) και παθογονικότητας. Θα γίνει απομόνωση του ολικού γενωμικού DNA των στελεχών *N. gonorrhoeae* και προσδιορισμός της ποιότητας και ποσότητάς του. Θα κατασκευαστούν γονιδιωματικές βιβλιοθήκες με μέσο μέγεθος 400 bp και θα γίνει αλληλούχηση νέας γενιάς σε πλατφόρμα Ion Torrent S5. Θα ακολουθήσει βιοπληροφορική ανάλυση των παραγόμενων δεδομένων με την χρήση λογισμικών πακέτων. Οι φυλογενετικές σχέσεις των στελεχών θα διερευνηθούν μέσω της ανάλυσης των γονιδιωμάτων των στελεχών αποκαλύπτοντας την δομή του πληθυσμού των γονοκόκκων στην Ελλάδα (population structure).

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στα αποτελέσματα που αναμένεται να προκύψουν από τη διδακτορική διατριβή συμπεριλαμβάνονται:

- Η καταγραφή των συχνοτήτων αντοχής της *N. gonorrhoeae* στα αντιβιοτικά και των τύπων γονοκόκκου που θα απομονωθούν κατά την τριετία 2020-2022.
- Η εκτίμηση των μικροβιολογικών και επιδημιολογικών παραμέτρων που συμβάλλουν στη διασπορά της αντοχής.

- Ο χαρακτηρισμός των μηχανισμών αντοχής στα στελέχη γονοκόκκου που απομονώνονται στην Ελλάδα.
- Ο χαρακτηρισμός των γονιδιωμάτων των στελεχών γονοκόκκου που απομονώνονται στην Ελλάδα.
- Δημιουργία ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων - Σύνδεση κλινικών, επιδημιολογικών και μικροβιολογικών δεδομένων με τις πληροφορίες που θα παρέχει η γονιδιωματική ανάλυση.
- Οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των στελεχών γονοκόκκου θα απομονωθούν κατά την τριετία 2020-2022 και η δομή του πληθυσμού των γονοκόκκων στην Ελλάδα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Ison CA, Deal C, Unemo M. Current and future treatment options for gonorrhoea. *Sexually Transmitted Infections* 2013, 89 (Suppl. 4):iv52-6.
- (2) Kyriakis KP, Tzelepi E, Avgerinou H, Tzouveleki LS, Flemetakis A, Frangouli E. Current characteristics of gonorrhoea in Athens, Greece. *Sexually Transmitted Infections* 2002, 78, e5 [www.sextransinf.com/cgi/content/full/78/4/e5].
- (3) Mavroidi A, Tzouveleki LS, Kyriakis KP, Avgerinou H, Daniilidou M, Tzelepi E. Multidrug-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* in Greece. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 2001, 45, 2651-2654.
- (4) Mavroidi A, Tzelepi E, Siatravani E, Godoy D, Miriagou V, Spratt BG. Analysis of emergence of quinolone-resistant gonococci in Greece by combined use of *Neisseria gonorrhoeae* multi-antigen sequence typing and multi-locus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology* 2011, 49, 1196-1201.
- (5) Newman L, Rowley J, Vander Hoorn S, Wijesooriya NS, Unemo M, Low N, et al. Global estimates of the prevalence and incidence of four curable sexually transmitted infections in 2012 based on systematic review and global reporting. *PLoS ONE*. 2015; 10(12):e0143304. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143304> PMID: 26646541.
- (6) Stathi M, Flemetakis A, Miriagou V, Kyriakis KP, Maniatis A, Tzelepi E. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Greece. Data for the years 1994 – 2004. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006, 57, 775-779.
- (7) Tapsall JW, Ndowa F, Lewis DA, Unemo M. Meeting the public health challenge of multidrug- and extensively drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Expert Reviews on Anti Infective Therapy* 2009, 7:821–834.
- (8) Tzelepi E, Frangouli E, Athanassopoulou V, Tzanakaki G, Tseliou P. *Neisseria gonorrhoeae* in Athens, Greece: Epidemiological classification and antimicrobial susceptibility patterns of strains isolated during 1986-1989. *Sexually Transmitted Diseases* 1991, 18, 238-244.
- (9) Tzelepi E, Daniilidou M, Miriagou V, Siatravani E, Pavlidou E, Flemetakis A. Cluster of multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to the newer cephalosporins in Northern Greece. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008, 62, 637-639.
- (10) Unemo M, Shafer WM. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: Past evolution and future. *Clinical Microbiology Reviews* 2014, 27, 587-613.
- (11) Weston EJ, Workowski K, Torrone E, Weinstock H, Stenger MR. Adherence to CDC recommendations for the treatment of uncomplicated gonorrhoea – STD Surveillance Network United States, 2016. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2018, 67, 473-476.
- (12) Τζελέπη Ε. Αντοχή στα αντιβιοτικά στη *Neisseria gonorrhoeae*. Σε: Κλινικά Φροντιστήρια 2005, τόμος 17(τεύχος 3), σελ. 91–115, Εκδόσεις Ιατρικής Εταιρείας Αθηνών, Αθήνα 2005.

(13) Τζελέπη Ε. Επιδημιολογική επιτήρηση της αντοχής του Γονοκόκκου στα αντιβιοτικά – Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Γονοκόκκου. Ενημερωτικό Δελτίο ΚΕΕΛΠΝΟ, Σεπτέμβριος 14, 2012.

ΤΟΕΠΙΒΛΕΠΟΝ ΜΕΛΟΣ Δ.Ε.Π.	Η ΥΠΟΨΗΦΙΑ
Επικ. Καθηγ. Απόστολος Μπελούκας	Ειρήνη Σιατραβάνη