

δελτίον  
ελληνικής  
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ  
ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ



Acta Microbiologica Hellenica

ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ  
QUARTERLY JOURNAL OF THE HELLENIC SOCIETY FOR MICROBIOLOGY

Οκτώβριος-Δεκέμβριος 2022 • Τόμος 67 • Τεύχος 4  
October-December 2022 • Volume 67 • Issue 4



*Επίσημη Έκδοση της Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας*  
*Official Publication of the Hellenic Society for Microbiology*

ISSN: 0438-9573  
e-ISSN: 2459-4113

# Ἑλληνικὴ Μικροβιολογικὴ Εταιρεία



ISSN: 0438-9573 – e-ISSN: 2459-4113

## Board of the Hellenic Society for Microbiology

2022-2025

### President

A. Tsakris

### Vice President

A. Papa-Konidari

### Secretary General

G. Vrioni

### Secretary

E. Kouskouni

### Treasurer

S. Karachalios

### Members

K. Gartzonika

I. Daniil

### Society Secretariat:

“ASCENT”,

29 Michalakopoulou, GR-115 28 Athens, Greece,

tel.: +30 210 7213225, fax: +30 210 7246180,

website: [www.ascentltd.gr](http://www.ascentltd.gr)

**Mailing Address of Journal:** [info@hms.org.gr](mailto:info@hms.org.gr)

**Annual Subscriptions:** (50,00 €)

Cited in sites HMS, IATROTEK & SCOPUS

<https://acta.hms.org.gr/>

[www.mednet.gr](http://www.mednet.gr)

[www.iatrotek.org](http://www.iatrotek.org)

[www.scopus.com](http://www.scopus.com)

## Acta Microbiologica Hellenica

JOURNAL OF THE HELLENIC SOCIETY FOR MICROBIOLOGY

### Editor in Chief

A. Tsakris (Greece)

### Scientific Assistant

C. Tsiamis (Greece)

### Editorial Board

C. Anastasopoulou (Greece)

Ş. Aydemir (Turkey)

M. Exindari (Greece)

A. Friedrich (Netherlands)

A.S. Galabov (Bulgaria)

G. Gioula (Greece)

S. Göttig (Germany)

E. Hadziyannis (Greece)

P.G. Higgins (Germany)

Th. Kantardjieff (Bulgaria)

M. Kantzanou (Greece)

V. Kempf (Germany)

B. Kocić (Serbia)

M. Murdjeva (Bulgaria)

A.-M. Năşcuţiu (Romania)

A. Papa-Konidari (Greece)

J. Papaparaskevas (Greece)

G. Pappas (Greece)

S. Pournaras (Greece)

A. Rafila (Romania)

G.M. Rossolini (Italy)

L. Skoura (Greece)

N. Spanakis (Greece)

S. Stefani (Italy)

A. Tsantes (Greece)

G. Vrioni (Greece)

O. Zarkotou (Greece)

### Scientific Advisory Board

G. Antonakos

A. Argyropoulou

S. Baka

D. Chatzidimitriou

M. Chatzidimitriou

S. Chryssou

M. Dalamaga

J. Daniil

E. Dimitroulia

M. Drogari-Apiranthitou

C. Gartzonika

M. Kachrimanidou

E. Kalogeropoulou

S. Karachalios

P. Karle

M. Kimouli

V. Koumaki

E. Kouskouni

V. Lampropoulou

I. Lamprou

E. Lebessi

V. Mamali

S. Maraki

M. Mavrouli

F. Markou

G. Meletis

A. Melidou

A. Mentis

M. Orfanidou

F. Paliogianni

M. Panopoulou

A. Pantazatou

P. Paraskevopoulou

E. Petinaki

E. Piperaki

V. Pityriga

A. Poulou

E. Priavali

E. Protonotariou

J. Routsias

V. Skandami

A. Stilianakis

K. Theodoridou

E. Vagdatli

H. Vagiakou

C. Vassalos

E. Vassalou

A. Vatopoulos

T.A. Vyzantiadis

E. Zervou

# Δελτίον ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας



ISSN: 0438-9573 – e-ISSN: 2459-4113

## Διοικητικό Συμβούλιο της Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας

Για την Τριετία 2022-2025

### Πρόεδρος

A. Τσακρής

### Αντιπρόεδρος

A. Παπά-Κονιδάρη

### Γενικός Γραμματέας

Γ. Βρυώνη

### Ειδικός Γραμματέας

E. Κουσκούνη

### Ταμίας

Σ. Καραχάλιος

### Σύμβουλοι

K. Γκαρτζονίκα

I. Δανιήλ

### Γραμματεία Εταιρείας:

«ASCENT»,

Μιχαλακοπούλου 29, 115 28 Αθήνα,

τηλ: +30 210 7213225, fax: +30 210 7246180,

website: www.ascentltd.gr

Αλληλογραφία Περιοδικού: info@hms.org.gr

### Ετήσια Συνδρομή

Εσωτερικού: (30,00 €), Εταιρειών: (90,00 €)

Εξωτερικού (50,00 €)

Περιλαμβάνεται στους ιστότοπους

της ΕΜΕ, ΙΑΤΡΟΤΕΚ & SCOPUS

<https://acta.hms.org.gr/el/>

[www.mednet.gr](http://www.mednet.gr)

[www.iatrotek.org](http://www.iatrotek.org)

[www.scopus.com](http://www.scopus.com)

## Acta Microbiologica Hellenica

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ

### Διευθυντής Σύνταξης

A. Τσακρής

### Επιστημονικός Σύμβουλος

K. Τσιάμης

### Συντακτική Επιτροπή

K. Αναστασοπούλου (Ελλάδα)

Σ. Aydemir (Τουρκία)

Γ. Βρυώνη (Ελλάδα)

Γ. Γκιούλα (Ελλάδα)

M. Εξηντάρη (Ελλάδα)

A. Friedrich (Ολλανδία)

O. Ζαρκωτού (Ελλάδα)

A.S. Galabov (Βουλγαρία)

S. Göttig (Γερμανία)

P.G. Higgins (Γερμανία)

Th. Kantardjieff (Βουλγαρία)

M. Καντζανού (Ελλάδα)

V. Kempf (Γερμανία)

B. Kocić (Σερβία)

M. Murdjeva (Βουλγαρία)

A.-M. Născuțiu (Ρουμανία)

A. Παπά-Κονιδάρη (Ελλάδα)

I. Παπαπαρασκευάς (Ελλάδα)

Γ. Παππάς (Ελλάδα)

Σ. Πουρνάρας (Ελλάδα)

A. Rafila (Ρουμανία)

G.M. Rossolini (Ιταλία)

Λ. Σκούρα (Ελλάδα)

N. Σπανάκης (Ελλάδα)

S. Stefani (Ιταλία)

A. Τσαντές (Ελλάδα)

E. Χατζηγιάννη (Ελλάδα)

### Επιστημονική Συμβουλευτική Επιτροπή

Γ. Αντωνάκος

A. Αργυροπούλου

E. Βαγδατλή

E. Βαγιάκου

K. Βασσάλος

E. Βασσάλου

A. Βατόπουλος

T.A. Βυζαντιάδης

K. Γκαρτζονίκα

I. Δανιήλ

E. Δημητρούλια

M. Δρογκάρη-Απειρανθίτου

E. Ζερβού

K. Θεοδωρίδου

E. Καλογεροπούλου

Σ. Καραχάλιος

Π. Κάρλε

M. Καχριμανίδου

M. Κιμούλη

B. Κουμάκη

E. Κουσκούνη

B. Λαμπροπούλου

E. Λάμπρου

E. Λεμπέση

B. Μάμαλη

Σ. Μαράκη

Φ. Μάρκου

M. Μαυρούλη

Γ. Μελέτης

A. Μελίδου

A. Μεντής

Σ. Μπάκα

M. Νταλαμάγκα

M. Ορφανίδου

Φ. Παληογιάννη

M. Πανοπούλου

A. Πανταζάτου

Π. Παρασκευοπούλου

E. Πετεινάκη

E. Πιπεράκη

B. Πιτυρίγκα

A. Πούλου

E. Πριάβαλη

E. Πρωτονοταρίου

I. Ρούτσιας

B. Σκανδάμη

A. Στυλιανάκης

Δ. Χατζηδημητρίου

M. Χατζηδημητρίου

Σ. Χρυσού

	REVIEW	231
<b>COVID-19 infection and cold antibody autoimmune hemolytic anemia</b> <i>Maria Kehagia, Rea Chatzikyriakou</i>		
	REVIEW	239
<b>Pathophysiology of severe COVID-19 infection: predisposing factors and evolution</b> <i>Ioannis Chonianakis, Eleuthera Giachanou, Maria Anna Kyriazidi, Sotiris Varlamis, Asimoula Kavvada, Christos Tenis, Maria Chatzidimitriou</i>		
	REVIEW	255
<b>Vaborbactam: perspective of a new <math>\beta</math>-lactamase inhibitor in the antimicrobial chemotherapy</b> <i>Eirini Amargianitaki, Vasiliki Koumaki, Athanassios Tsakris, Joseph Papaparaskevas</i>		
	REVIEW	269
<b>A comprehensive review of monkeypox (mpox) on the occasion of the ongoing multicountry outbreak of the disease</b> <i>Panagiotis Toumasis, Vasileios Paparizos, Georgia Vrioni</i>		
	ORIGINAL ARTICLE	279
<b>Multi-locus sequence typing (MLST) of clinical isolates of methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) from systemic infections in two hospitals in Quito-Ecuador</b> <i>Doménica Andrade, Tatiana Lara, Marcelo Grijalva</i>		
	INSTRUCTIONS TO AUTHORS	299

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ 231

**Λοίμωξη COVID-19 και αυτοάνοση αιμολυτική  
αναιμία από ψυχρά αντισώματα**  
*Μαρία Κεχαγιά, Ρέα Χατζηκυριάκου*

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ 239

**Παθοφυσιολογία βαριάς νόσου COVID-19:  
προδιαθεσικοί παράγοντες και εξέλιξη**  
*Ιωάννης Χωνιανάκης, Ελευθερία Γιαχανού, Μαρία Άννα Κυριαζίδη,  
Σωτήρης Βαρλάμης, Ασημούλα Καββαδά, Χρήστος Τένης, Μαρία Χατζηδημητρίου*

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ 255

**Vaborbactam: perspective of a new  $\beta$ -lactamase inhibitor  
in the antimicrobial chemotherapy**  
*Ειρήνη Αμαργιανιτάκη, Βασιλική Κουμάκη, Αθανάσιος Τσακρής,  
Ιωσήφ Παπαπαρασκευάς*

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ 269

**Λοίμωξη από ιό της ευλογιάς των πιθήκων (monkeypox, mpox):  
ανασκόπηση της βιβλιογραφίας με αφορμή τη συνεχιζόμενη,  
πολυεθνική έξαρση της νόσου**  
*Παναγιώτης Τουμάσης, Βασίλειος Παπαρίζος, Γεωργία Βρυώνη*

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ 279

**Multi-locus sequence typing (MLST) of clinical isolates  
of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)  
from systemic infections in two hospitals in Quito-Ecuador**  
*Doménica Andrade, Tatiana Lara, Marcelo Grijalva*

ΟΔΗΓΙΕΣ ΠΡΟΣ ΤΟΥΣ ΣΥΓΓΡΑΦΕΙΣ 293



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ  
ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΜΥΚΗΤΟΛΟΓΙΑΣ  
[www.hsomm.gr](http://www.hsomm.gr)

**10<sup>ο</sup> ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΣΕΜΙΝΑΡΙΟ  
ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΜΥΚΗΤΟΛΟΓΙΑΣ**

# **ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΥΚΗΤΙΑΣΕΩΝ: ΜΕ ΤΟ ΒΛΕΜΜΑ ΣΤΟ ΜΕΛΛΟΝ!**

**Σάββατο 28 Ιανουαρίου 2023**  
Πολεμικό Μουσείο. Αθήνα  
(υβριδικό)

**ΧΟΡΗΓΟΥΝΤΑΙ ΜΟΡΙΑ ΣΥΝΕΧΙΖΟΜΕΝΗΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ (C.M.E. CREDITS)**

Πληροφορίες:



Congresses  
Publications  
Digital Constructions

Μιχαλακοπούλου 29, Αθήνα • Τ: 210 7213225  
E: [sioran@ascentltd.gr](mailto:sioran@ascentltd.gr) • [www.ascentltd.gr](http://www.ascentltd.gr)

## Λοίμωξη COVID-19 και αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία από ψυχρά αντισώματα

**Μαρία Κεχαγιά, Ρέα Χατζηκυριάκου**

*Αιματολογικό Εργαστήριο, Γενικό Νοσοκομείο Αττικής «Σισμανόγλειο-Αμαλία Φλέμιγκ» – Νοσοκομειακή Μονάδα «Σισμανόγλειο», Μαρούσι, Αττική*

231



## Περίληψη

Αυξανόμενες αναφορές σχετικών περιστατικών υποδεικνύουν την πιθανή συσχέτιση της COVID-19 με την ανάπτυξη αυτοάνοσης αιμολυτικής αναιμίας, μίας νοσολογικής οντότητας που έχει συσχετισθεί και με άλλες λοιμώξεις. Μέχρι στιγμής έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί που πιθανώς συνδέουν παθογενετικά τις δυο αυτές καταστάσεις, χωρίς να έχουν εξακριβωθεί πλήρως. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία από ψυχρά αντισώ-

ματα σε έδαφος COVID-19, η επίπτωση της οποίας, παρά τις σχετικά περιορισμένες βιβλιογραφικές αναφορές, φαίνεται να παρουσιάζει αυξητική τάση από την έναρξη της πανδημίας και πιθανώς υποεκτιμάται.



### Λέξεις κλειδιά

COVID-19, λοιμώξεις, αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία, ψυχρά αντισώματα

### Υπεύθυνος αλληλογραφίας

Μαρία Κεχαγιά,

Αιματολογικό Εργαστήριο

Γενικού Νοσοκομείου Αττικής «Σισμανόγλειο»,

Σισμανογλείου 1, ΤΚ:15126, Μαρούσι

Τηλ. 6972176916

Email: maria.keh@hotmail.com

## Εισαγωγή

Από την έναρξη της πανδημίας και μέχρι την περίοδο συγγραφής της παρούσας ανασκόπησης πάνω από 580 εκατομμύρια επιβεβαιωμένα κρούσματα της νόσου COVID-19 έχουν καταγραφεί, συμπεριλαμβανομένων και των πάνω από 6.4 εκατομμύρια θανάτων,<sup>1</sup> καθιστώντας την σταθερά μία από τις κυριότερες προτεραιότητες σε όλους σχεδόν τους τομείς ιατρικής έρευνας και στρατηγικής από το 2019. Ως συνέπεια της ιδιαίτερης έμφασης που έχει δοθεί στη μελέτη της δομής και συμπεριφοράς του αιτιολογικού παράγοντα, του ιού SARS-CoV-2 και των παθοφυσιολογικών μηχανισμών που διέπουν τη λοίμωξη, οι κλινικές εκδηλώσεις της, οι επιπλοκές της και η συσχέτισή της με άλλες νοσολογικές καταστάσεις έχουν αρχίσει να αποσαφηνίζονται. Μία από τις πλέον ενδιαφέρουσες αναδυόμενες συσχετίσεις της COVID-19 είναι εκείνη με ένα ευρύ φάσμα αυτοάνοσων συνδρόμων και αναμένεται να αποτελέσει κίνητρο για την περαιτέρω διερεύνηση της μεταξύ τους αιτιολογικής σχέσης. Ενδεικτικά, σύμφωνα με αναφορές στις αυτοάνοσες εκδηλώσεις της, η COVID-19 πιθανώς συσχετίζεται με αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία (AAA), αυτοάνοση θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα, υποξεία θυρεοειδίτιδα, αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, νόσο Kawasaki, σύνδρομο Guillain-Barré και αυτοάνοσες δερματικές παθήσεις.<sup>2</sup> Ενώ η ανίχνευση ειδικών αυτοαντισωμάτων ενισχύει την πιθανότητα αιτιολογικής συσχέτισης της

COVID-19 με την αυτοάνοση, σε κάποιες περιπτώσεις οι ενδείξεις μπορεί να είναι λιγότερο σαφείς. Αφορμή για τη συγγραφή της παρούσας ανασκόπησης η οποία αναφέρεται στην AAA σε έδαφος COVID-19, με ειδική έμφαση στην εκ ψυχρών αντισωμάτων, αποτέλεσε η επαναλαμβανόμενη διαπίστωση στο εργαστήριό μας, κατά τη μικροσκόπηση επιχρισμάτων περιφερικού αίματος μεγάλης μερίδας ασθενών με COVID-19, της παρουσίας συγκολλήσεων ερυθρών αιμοσφαιρίων άλλοτε άλλης έκτασης η οποία συνοδευόταν από διαταραχή της αναλογίας αιμοσφαιρίνης-αιματοκρίτη, εντόνων ή ήπια θετική δοκιμασία ψυχροσυγκολλητινών, σε συνδυασμό με τη σχεδόν πάντα, έστω και ασθενώς, θετική στο C3d άμεση δοκιμασία Coombs όταν αυτή ήταν διαθέσιμη. Οι ασθενείς συνήθως αλλά όχι πάντα, παρουσίαζαν εικόνα κλινικής αιμόλυσης, ποικίλης έντασης, και συχνά το φαινόμενο ήταν παροδικό ή αυτοπεριοριζόμενο.

## Λοιμώξεις και αυτοάνοσα νοσήματα

Η συμβολή των λοιμώξεων, ως περιβαλλοντικών παραγόντων, στην περίπλοκη παθοφυσιολογία της αυτοάνοσης είναι ευρέως γνωστή. Ο ρόλος τους μπορεί να είναι εκλυτικός ή ενισχυτικός, με διάφορους μηχανισμούς να έχουν προταθεί ως υπεύθυνοι για τη συνεισφορά τους στις αυτοάνοσες διεργασίες. Ο λοιμογόνος παράγοντας είναι πιθανό να προσομοιάζει σε



αντιγόνα του ξενιστή, διαθέτοντας επιτόπους με παρόμοιες με αυτά αλληλουχίες αμινοξέων. Μέσω αυτού του μηχανισμού «μοριακής μίμησης» όπως κοινώς αποκαλείται, τα αποκρινόμενα στη λοίμωξη λεμφοκύτταρα χαρακτηρίζονται από διασταυρούμενη αντιδραστικότητα έναντι «ιδίων» αντιγόνων με αποτέλεσμα την άμεσα βλαπτική τους δράση και την περαιτέρω ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Δρώντας ως υπεραντιγόνα, οι ιοί και τα βακτήρια είναι δυνατό επίσης να ενεργοποιήσουν μεγάλο αριθμό Τ λεμφοκυττάρων χωρίς περιορισμό από το μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας ή την αντιγονική τους ειδικότητα. Από τη άλλη, σύμφωνα με ένα άλλο πιθανό παθογενετικό μοντέλο, τα αντιγόνα τα οποία απελευθερώνονται κατόπιν ιστικής βλάβης, είτε στα πλαίσια της ίδιας της λοίμωξης ή ως συνέπεια της ανοσολογικής απόκρισης σε αυτή, προσλαμβάνονται και παρουσιάζονται από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, ενεργοποιώντας τους αυτοάνοσους μηχανισμούς. Παρόμοιο ρόλο μπορεί να διαδραματίζουν και οι συνθήκες φλεγμονής κατά τη διάρκεια της λοίμωξης, ενεργοποιώντας τα αυτοάνοσα στοιχεία της ανοσολογικής αντίδρασης του οργανισμού εντός ενός μη ειδικού φαύλου κύκλου. Τέλος η παρουσίαση «κρυπτικών», συνήθως μη εκτεθειμένων στο ανοσοποιητικό σύστημα αντιγόνων, πιθανώς αποτελεί έτερο μηχανισμό με τον οποίο μία λοίμωξη μπορεί να οδηγεί στην αυτοανοσία. Οι ανωτέρω μηχανισμοί είναι δυνατό να επιδρούν συνδυαστικά και φαίνεται πως συνεισφέρουν διαφορετικά, ανάλογα με τον εκάστοτε αιτιολογικό λοιμογόνο παράγοντα και τη χρονική διάρκεια της λοίμωξης.<sup>3-5</sup> Εστιάζοντας στη συσχέτιση των ιών με αυτοάνοσες παθήσεις, παραδείγματα τα οποία ενισχύουν τον ρόλο τους στην ανάπτυξη ή αναζωπύρωσή τους αποτελούν η πιθανή σχέση των ιών *Coxsackie*, του Κυτταρομεγαλοϊού, και των Εντεροϊών με τον διαβήτη τύπου Ι, του Παρβοϊού Β19, και του ιού της ηπατίτιδος C με το συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο, καθώς και εκείνη των ιών Ανεμυλογιάς/ Έρπητα Ζωστήρα, Epstein-Barr και Ιλαράς με την πολλαπλή σκλήρυνση.<sup>6-13</sup>

Αν και σε πρώιμο ακόμη στάδιο, βάσει των αυξανόμενων αναφορών αυτοάνοσων εκδηλώσεων στα πλαίσια της λοίμωξης, το ερευνητικό ενδιαφέρον γύρω από την πιθανή συσχέτιση της COVID-19 με διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα έχει ενταθεί. Οι προταθείσες θεωρίες περιλαμβάνουν, πέραν της παραγωγής αυτοαντισωμάτων με διασταυρούμενη ειδικότητα έναντι «ιδίων» αντιγόνων και του ρόλου των ενεργοποιημένων Τ λεμφοκυττάρων μέσω συντήρησης ενός φλεγμονώδους επιβαρυντικού περιβάλλοντος ή με απευθείας κυτταρική βλάβη και άλλους μηχανισμούς, εξαρτώμενους από αντισώματα έναντι της ακιδικικής ιικής πρωτεΐνης, με επακόλουθη δημιουργία ανοσοσυμπλεγμάτων.<sup>14</sup>

Κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα είναι ενδεικτικά της υπέρμετρης ενεργοποίησης, αλλά και απορρύθμισης του ανοσοποιητικού κατά τη λοίμωξη από τον SARS-CoV-2, ιδίως σε ασθενείς με βαριά νόσο. Σχετικές μελέτες έχουν διαπιστώσει υψηλότερα επίπεδα ιντερλευκίνης (interleukin, IL) -2, IL-7, IL-10, IL-1β, IL-6, IL-8, παράγοντα νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor, TNF)-α, ιντερφερόνης (interferon, IFN)-γ καθώς και εντονότερη ελάττωση του αριθμού των Τ λεμφοκυττάρων έναντι των Β λεμφοκυττάρων και των κυττάρων φυσικών φονέων (natural killer, NK), ιδίως του ανοσορρυθμιστικού πληθυσμού των Τ-ρυθμιστικών κυττάρων (Treg), σε ασθενείς με βαρύτερη νόσο,<sup>15,16</sup> πιθανώς καταδεικνύοντας το ρόλο τόσο της αδυναμίας επίτευξης ανοσιακής ισορροπίας όσο και της έκλυσης εκσεσημασμένων φλεγμονωδών αντιδράσεων στα φαινόμενα της αυτοανοσίας που παρατηρούνται στην COVID-19.

Αυτοάνοσα φαινόμενα στην COVID-19 έχουν αναφερθεί και εξακολουθούν να αναφέρονται, εντούτοις οι σχετικές δημοσιεύσεις παραμένουν σχετικά περιορισμένες, πιθανώς λόγω της δυσχέρειας εξεύρεσης επαρκών κλινικών και εργαστηριακών ευρημάτων που να επιτρέπουν να τεθεί η υπόθεση μίας αιτιολογικής συσχέτισης μεταξύ των δύο οντοτήτων. Πιθανώς η πρώτη αναφορά αυτοάνοσης εκδήλωσης από το κεντρικό νευρικό σύστημα στα πλαίσια της λοίμωξης αφορά μία περίπτωση επιβεβαιωμένου συνδρόμου Guillain-Barré με αρκετές άλλες περιπτώσεις να έχουν περιγραφεί έκτοτε.<sup>14,17</sup> Αυξανόμενες είναι επίσης οι αναφορές στις αιματολογικές αυτοάνοσες επιπλοκές του ιού, με συχνότερες εκείνες της αυτοάνοσης θρομβοπενικής πορφύρας, η επίπτωση της οποίας ενδέχεται να είναι μεγαλύτερη από την καταγεγραμμένη, εάν ληφθεί υπόψιν το γεγονός ότι η θρομβοπενία χαρακτηρίζει σημαντικό ποσοστό των ασθενών και εντείνεται ανάλογα με τη βαρύτητα της νόσου.<sup>18</sup> Μέχρι στιγμής η πιο εκτεταμένη αναφορά στις αυτοάνοσες επιπλοκές της λοίμωξης έχει γίνει σε μία μετα-ανάλυση του 2020 των Saad και συνεργατών η οποία κατέληξε στην περιγραφή και αναφορά 98 περιπτώσεων αυτοανοσίας στις οποίες πιθανώς ο SARS-CoV-2 εμπλέκεται αιτιολογικά.<sup>2</sup> Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης το 48.5% των περιπτώσεων αντιστοιχούσε σε σύνδρομο Guillain-Barré, το 24.2% σε AAA, το 6.1% σε αυτοάνοση θρομβοπενική πορφύρα και το 3% σε νόσο Kawasaki.

### Αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία και COVID-19

Η AAA αποτελεί ετερογενή επίκτητη αυτοάνοση κατάσταση η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία



αντισωμάτων έναντι αυτόλογων ερυθρών αιμοσφαιρίων και η οποία μπορεί να είναι είτε ιδιοπαθής ή δευτεροπαθής, σχετιζόμενη με φάρμακα, λοιπές αυτοάνοσες παθήσεις, αιματολογικές κακοήθειες, ιογενείς ή βακτηριακές λοιμώξεις κ.λπ.<sup>19</sup> Η ετερογένεια της νόσου αποδίδεται στους διαφορετικούς τύπους των αιμολυτικών αυτοαντισωμάτων και την ποικίλλουσα κλινική εικόνα και γενικώς συνοψίζεται σε 4 υποκατηγορίες (Πίνακας 1) με συχνότερη την αιμολυτική αναιμία «θερμού τύπου» η οποία διαμεσολαβείται από IgG ανοσοσφαιρίνες με δράση στους 37°C και χαρακτηρίζεται από, κατά το πλείστον, εξωαγγειακή αιμόλυση, ακολουθούμενη από την νόσο των ψυχροσυγκολλητινών (αιμολυτική αναιμία «ψυχρού τύπου»). Η δεύτερη χαρακτηρίζεται από IgM αντισώματα τα οποία συγκολλούν τα ερυθρά αιμοσφαίρια, δεσμεύουν το συμπλήρωμα και προκαλούν κυρίως ενδαγγειακή αιμόλυση, αλλά και φαγοκυττάρωση εξωαγγειακά.<sup>20</sup>

Οι αναφορές περιστατικών με AAA, αν και γενικά σπάνιες με ετήσια συχνότητα 13/100.000 άτομα, παρουσιάζουν προοδευτική αύξηση η οποία έχει εν μέρει αποδοθεί και στη συμβολή εκείνων που έχουν εκδηλωθεί στα πλαίσια της επιδημιολογικά κυρίαρχης πλέον λοίμωξης COVID-19.<sup>21</sup> Πράγματι, ο αριθμός των περιπτώσεων της λοίμωξης με συνοδό αιμόλυση αποδιδόμενη στην παρουσία αυτοαντισωμάτων αυξάνεται σταδιακά και πιθανώς υποεκτιμάται, δεδομένης της ετερογένειας και της διαγνωστικής πολυπλοκότητας που τις χαρακτηρίζει. Μέχρι τα μέσα του 2021 οι βιβλιογραφικές αναφορές AAA σχετιζόμενης με COVID-19 ήταν 29 με την επιπλοκή να αποτελεί τη δεύτερη σε συχνότητα μεταξύ των αυτοάνοσων αιματολογικών διαταραχών μετά την αυτοάνοση θρομβοπενική πορφύρα,<sup>22,23</sup> ενώ εντός μερικών μηνών του ίδιου έτους, σύμφωνα με την ανασκόπηση των Jacobs

και Booth είχαν ανέλθει στις 50.<sup>24</sup> Ο ρόλος των αυτοάνοσων αιμολυτικών διαταραχών στην κλινική πορεία της COVID-19 είναι σημαντικός καθώς έχει συνδεθεί με δυσμενέστερη πρόγνωση και παρατεταμένη νοσηλεία, με τη μελέτη των Algassim και συν. να αναφέρει πως παρατηρείται στο 14.7% των ασθενών που χρήζουν εισαγωγής στη μονάδα εντατικής θεραπείας έναντι του 9% των υπολοίπων, με θνησιμότητα της τάξης του 32%.<sup>25</sup>

Αν και ο ακριβής υπεύθυνος μηχανισμός για την εμφάνιση AAA στην COVID-19 δεν είναι πλήρως εξακριβωμένος, μία προτεινόμενη θεωρία αφορά στον ρόλο της φλεγμονής και των κυτταροκινών στην δημιουργία κρυπτικών αντιγόνων τα οποία ενεργοποιούν τα T λεμφοκύτταρα, με αποτέλεσμα την επαγωγή αυτοαντιδραστικών B λεμφοκυττάρων και επακόλουθη παραγωγή αντισωμάτων έναντι αυτών, κάτι το οποίο έχει αναπαραχθεί και πειραματικά με την ανάμιξη πλάσματος ασθενών με αλλογενή ερυθροκύτταρα.<sup>22,26,27</sup> Παρομοίως, η απορρύθμιση του καταρράκτη του συμπληρώματος κατά την οξεία φάση της λοίμωξης και η επακόλουθη επικάλυψη της ερυθροκυτταρικής επιφάνειας με ανοσοσυμπλέγματα και συστατικά του συμπληρώματος πιθανώς συμβάλλει τόσο στην ευθραπτότητα της μεμβράνης τους προκαλώντας λύση της, όσο και στην απώλεια της ελαστικότητάς της με αποτέλεσμα την αυξημένη τάση θρόμβωσης των ασθενών.<sup>21,28,29</sup> Παράλληλα, στη μελέτη τους οι Angileri και συν. διατύπωσαν την υπόθεση της μοριακής μίμησης ως υπεύθυνης για την ανάπτυξη αιμολυτικών αυτοαντισωμάτων στην COVID-19 και την απέδωσαν στην αντιγονική ομοιότητα της αγκυρίνης-1 της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης με την ακιδική πρωτεΐνη του SARS-CoV-2.<sup>30,31</sup> Τέλος, καθώς και κάποιοι από τους φαρμακευτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται

**Πίνακας 1** Βασικές κατηγορίες αυτοάνοσης αιμολυτικής αναιμίας (Προσαρμογή από: Liebman HA, Weitz IC. Autoimmune Hemolytic Anemia. *Med Clin North Am* 2017; 101: 351–9).

Κατηγορία	Συχνότητα	Αντισώματα
Θερμών αντισωμάτων	65%-70%	IgG
Ψυχρών αντισωμάτων	20%-25%	IgM
Παροξυσμική αιμοσφαιρινουρία εκ ψύχους	1%-3%	IgG (διφασικά αντισώματα Donath-Landsteiner)
Αρνητική κατά Coombs	~5%	IgG (χαμηλοί τίτλοι), IgA, μονομερή IgM

στα πλαίσια της θεραπευτικής αγωγής της νόσου και των επιπλοκών της ενδεχομένως να εμπλέκονται στην παθογένεση της αυτοάνοσης αιμόλυσης, η συμβολή τους στην εμφάνισή της πιθανώς δεν είναι αμελητέα και θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν στην αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας έναντι του ρίσκου χορήγησής τους.<sup>21</sup>

Η εργαστηριακή διάγνωση της AAA συνοπτικά στηρίζεται στην ανεύρεση βιοχημικών δεικτών αιμόλυσης σε συνδυασμό με συμβατούς με αιμολυτική αναιμία, δείκτες αναιμίας (χολερυθρίνη, γαλακτική αφυδρογονάση, απτοσφαιρίνες, αιμοσφαιρίνη ούρων, γενική αίματος, δικτυοερυθροκύτταρα κ.λπ.), συνοδευόμενη από θετική άμεση δοκιμασία Coombs (direct Coombs test, DAT). Επιπλέον, η διάκριση μεταξύ των υποκατηγοριών περιλαμβάνει την επιβεβαίωση της θετικότητας της DAT σε αντι-IgG ή/και αντι-C3d αντιορούς, ενώ η διάγνωση δε μπορεί να αποκλειστεί ακόμη και σε έδαφος αρνητικής δοκιμασίας λόγω της πιθανότητας χαμηλών τίτλων και παρουσίας IgA αυτοαντισωμάτων.<sup>32</sup> Η δε κλινική υποψία γενικώς τίθεται επί οξείας εμφάνισης ικτέρου ή αιματουρίας, παρουσία αναιμίας.<sup>33</sup>

## Αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία από ψυχρά αντισώματα και COVID-19

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η AAA εκ ψυχρών αντισωμάτων (cold agglutinin disease, CAD), των αποκαλούμενων και ψυχροσυγκολλητινών, στο έδαφος της COVID-19, η επίπτωση της οποίας έχει επίσης παρουσιάσει αυξητικές τάσεις από την έναρξη της πανδημίας όπως καταδεικνύεται από τις αναδυόμενες αναφορές σχετικών περιπτώσεων.

Η πλειοψηφία των ενδείξεων συσχέτισης μεταξύ της λοίμωξης από SARS-CoV-2 και AAA ψυχρού τύπου προκύπτει από μεμονωμένες βιβλιογραφικές αναφορές περιστατικών,<sup>34-43</sup> με την πλειονότητά τους να αφορά σε νέες περιπτώσεις παρά σε αναζωοπυρώσεις προϋπάρχουσας CAD. Εντούτοις, σύμφωνα με δύο πιο εκτεταμένες συστηματικές ανασκοπήσεις της διεθνούς βιβλιογραφίας, μέχρι το Σεπτέμβριο του 2021 είχαν ανακοινωθεί 20 και 18 περιπτώσεις αντίστοιχα.<sup>24,44</sup> Λόγω της συχνά περίπλοκης διαφορικής διάγνωσης και της ίδιας της φύσης της λοίμωξης η συχνότητα της CAD στα πλαίσια της COVID-19 δεν αποκλείεται να υποεκτιμάται και εκ πρώτης όψews φαίνεται πως το ποσοστό είναι υψηλότερο από εκείνο στο σύνολο των περιπτώσεων AAA.<sup>44,45</sup> Αυτή η πιθανότητα αποτελεί και δική μας υπόθεση, καθώς στο εργαστήριό μας είναι πολύ συχνή η διαπίστωση της παρουσίας συγκολλησεων ερυθρών αιμοσφαιρίων σε επιχρίσματα περιφερικού αίματος νοσηλευόμενων

ασθενών με COVID-19, με συνοδό αναιμία, θετική δοκιμασία ανίχνευσης ψυχροσυγκολλητινών και βιοχημικούς δείκτες αιμόλυσης, σε συνδυασμό με θετική στο C3d DAT, όταν αυτή είναι διαθέσιμη. Επιπροσθέτως, συχνό σε αυτή την ομάδα ασθενών είναι και το μικροσκοπικό εύρημα γενικευμένων συγκολλησεων ερυθροκυττάρων μικρής όμως έκτασης, συχνά χωρίς λοιπά ευρήματα αιμόλυσης, το οποίο υποχωρεί κατόπιν επώασης του δείγματος στους 37°C και το οποίο, αν και συνήθως δε διερευνάται περαιτέρω εργαστηριακά προς αυτή την κατεύθυνση, θα μπορούσε να αποτελεί ένδειξη παρουσίας ψυχροσυγκολλητινών, πιθανώς σε χαμηλό τίτλο.

Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία στην πλειοψηφία των ασθενών με CAD στα πλαίσια COVID-19 ανιχνεύθηκαν ψυχροσυγκολλητίνες, συνήθως σε τίτλο  $\geq 1/64$ ,<sup>24</sup> το ηλικιακό τους εύρος ήταν μεταξύ 17 και 77 ετών, η πλειοψηφία τους εμφάνιζε μέτρια ή βαριά κλινική εικόνα λοίμωξης<sup>44</sup> και η διάγνωση των περισσότερων έγινε εντός των δύο πρώτων εβδομάδων από την έναρξή της.<sup>22</sup> Σπανιότερα, παρά την ανίχνευση ψυχροσυγκολλητινών, οι οποίες μάλιστα μπορεί να έχουν ταυτοποιηθεί ως αντι-I, ακόμη και σε υψηλό τίτλο, οι ασθενείς ενδέχεται να μην παρουσιάζουν εικόνα αιμόλυσης.<sup>42</sup>

Από πλευράς παθογένεσης, οι προταθέντες μηχανισμοί περιλαμβάνουν τη θεωρία της μοριακής μίμησης και της φλεγμονής που έχουν προαναφερθεί, ενώ και το οξειδωτικό στρες της λοίμωξης μπορεί να ευνοεί την έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης της επιφανείας των ερυθρών αιμοσφαιρίων, με συνέπεια την επικάλυψή της από συστατικά του συμπληρώματος.<sup>26,28,46</sup>

Πέραν της αποδιδόμενης στην κλινική αιμόλυση αναμενόμενης επιδείνωσης, η CAD πιθανώς ευθύνεται για δυσμενέστερη πρόγνωση και λόγω του αυξημένου κινδύνου θρόμβωσης των ασθενών.<sup>47</sup> Αν και σπάνιες, περιπτώσεις με συνύπαρξη CAD και θρόμβωσης στα πλαίσια COVID-19 έχουν αναφερθεί χωρίς όμως να είναι εφικτή η αιτιολογική τους σύνδεση, καθώς οι θρομβωτικές επιπλοκές αποτελούν βασικό χαρακτηριστικό της ίδιας της λοίμωξης.<sup>48</sup> Η συσχέτιση της φλεβικής και αρτηριακής θρόμβωσης με την αιμόλυση ψυχρού τύπου έχει τεκμηριωθεί σε μελέτες και οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που έχουν προταθεί ως υπεύθυνοι περιλαμβάνουν την επίδραση των μειωμένων επιπέδων μονοξειδίου του αζώτου που προκαλούν αγγειοσυστολή, συσσώρευση αιμοπεταλίων και αυξημένη έκφραση μορίων ενδοθηλιακής προσκόλλησης και τα αυξημένα επίπεδα ελεύθερης αίμης τα οποία επάγοντας την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών καταλήγουν στην ενδοθηλιακή βλάβη και στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.<sup>49</sup> Επιπροσθέτως, όπως έχει αναφερθεί ανωτέρω, η επικάλυψη



της ερυθροκυτταρικής επιφανείας με ανοσοσυμπλέγματα και συστατικά του συμπληρώματος πιθανώς συμβάλλει στην απώλεια της ελαστικότητάς της με αποτέλεσμα την αυξημένη θρομβωτική τάση.<sup>21</sup>

Η συνήθης αντιμετώπιση της CAD στην COVID-19 περιλαμβάνει χορήγηση κορτικοστεροειδών και μεταγγίσεις, αν και η πλήρης ύφεση επιτυγχάνεται κυρίως με την αποδρομή της λοίμωξης. Η αγωγή με ριτουξιμάμπη (rituximab), παρόλο που αποτελεί θεραπεία εκλογής, είτε ως μονοθεραπεία ή σε συνδυα-

σμό με βενδαμουστίνη (bendamustine), θεωρείται αμφιλεγόμενη και δεν προτιμάται, καθώς υπάρχει πιθανότητα να συνδέεται με επιδείνωση της λοίμωξης. Τέλος, η θεραπευτική πλασμαφαίρεση η οποία έχει χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος ελάττωσης των κυκλοφορούντων παθολογικών IgM αντισωμάτων αποτελεί επικουρική θεραπεία σε συνδυασμό με κορτικοστεροειδή και επιλέγεται ως λύση ανάγκης σε περιπτώσεις καλπάζουσας CAD.<sup>35,43</sup>



## Summary

### COVID-19 infection and cold antibody autoimmune hemolytic anemia

Maria Kehagia\*, Rea Chatzikyriakou

Hematology Laboratory of General Hospital of Athens "Sismanoglio-Amalia Fleming" – "Sismanoglio" Hospital Unit

\*Corresponding author

236

Several case reports have implicated an association between COVID-19 infection and autoimmune hemolytic anemia, a known hematologic sequel of various infections. Given the complexity of the pathophysiologic relationship between SARS-Cov-2 infection and autoimmune hemolysis, the underlying mechanisms proposed so far have not yet been fully elucidated. Despite the still sparse case reports and possible underreporting, cold antibody hemolytic anemia in the setting of COVID-19 is of particular interest, with the number of its cases growing since the start of the pandemic.



#### Key words

COVID-19, infections, autoimmune hemolytic anemia, cold antibodies

## Βιβλιογραφία

- World Health Organization (WHO). WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Updated Sep 24, 2022. WHO website. <https://covid19.who.int>, τελευταία επίσκεψη 24 Σεπτεμβρίου 2022
- Saad MA, Alfshawy M, Nassar M, Mohamed M, Esene IN, Elbendary A. COVID-19 and Autoimmune Diseases: A Systematic Review of Reported Cases. *Curr Rheumatol Rev* 2020; 17:193–204.
- Ercolini AM, Miller SD. The role of infections in autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 2009; 155:1–15.
- Wucherpfennig KW. Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. *J Clin Invest* 2001; 108:1097–1104.
- Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Huster KM, Jansson M, Granucci F, Shim DJ, et al. Analysis of the Relationship between Viral Infection and Autoimmune Disease. *Immunity* 2001; 15:137–147.
- Pak CY, Eun HM, McArthur RG, Yoon JW. Association of cytomegalovirus infection with autoimmune type 1 diabetes. *Lancet* 1988; 2:1–4
- Eizirik DL, Op de Beeck A. Coxsackievirus and Type 1 Diabetes Mellitus: The Wolf's Footprints. *Trends Endocrinol Metab* 2018; 29:137–139.
- Stene LC, Rewers M. Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: the enterovirus link to type 1 diabetes: critical review of human studies. *Clin Exp Immunol* 2012; 168:12–23.
- Aslanidis S, Pырpasopoulou A, Kontotasios K, Doulmas S, Zamboulis C. Parvovirus B19 infection and systemic lupus erythematosus: Activation of an aberrant pathway? *Eur J Intern Med* 2008; 19:314–318.
- Stölzel U, Schuppan D, Tillmann HL, Manns MP, Tannapfel A, Doss MO, et al. Autoimmunity and HCV infection in porphyria cutanea tarda: a controlled study. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2002; 48:43–47.
- Tucker WG, Andrew Paskauskas R. The MSMV hypothesis: measles virus and multiple sclerosis, etiology and treatment. *Med Hypotheses* 2008; 71:682–689.
- Guan Y, Jakimovski D, Ramanathan M, Weinstock-Guttman B, Zivadinov R. The role of Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: from molecular pathophysiology to in vivo imaging. *Neural Regen Res* 2019; 14:373–386.
- Sotelo J, Ordoñez G, Pineda B. Varicella-zoster virus at relapses of multiple sclerosis. *J Neurol* 2007; 254:493–500.
- Yazdanpanah N, Rezaei N. Autoimmune complications of COVID-19. *J Med Virol* 2022; 94:54–62.
- Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020; 395:497–506.
- Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis* 2020; 71:762–768.
- Zhao H, Shen D, Zhou H, Liu J, Chen S. Guillain-Barré syndrome associated with SARS-CoV-2 infection: causality or coincidence? *Lancet Neurol* 2020; 19:383–384.
- Levrant M, Ottavi M, Lechtman S, Mondain V, Jandel P. Immune thrombocytopenic purpura after COVID-19 infection. *Int J Lab Hematol* 2021; 43:e28–e30.
- Sokol RJ, Booker DJ, Stamps R. The pathology of autoimmune haemolytic anaemia. *J Clin Pathol* 1992; 45:1047–1052.
- Liebman HA, Weitz IC. Autoimmune Hemolytic Anemia. *Med Clin North Am* 2017; 101:351–359.
- Al-kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Kaushik A, Kujawska M, Batiha GES. Hemolytic anemia in COVID-19. *Ann Hematol* 2022; 101:1887–1895.
- AbouYabis AN, Bell GT. Hemolytic Anemia Complicating COVID-19 Infection. *J Hematol* 2021; 10:221–227.
- Taherifard E, Taherifard E, Movahed H, Mousavi MR. Hematologic autoimmune disorders in the course of COVID-19: a systematic review of reported cases. *Hematol* 2021; 26:225–239.
- Jacobs JW, Booth GS. COVID-19 and Immune-Mediated RBC Destruction. *Am J Clin Pathol* 2021; XX:1-8
- Algassim AA, Elghazaly AA, Alnahdi AS, Mohammed-Rahim OM, Alanazi AG, Aldhuwayhi NA, et al. Prognostic significance of hemoglobin level and autoimmune hemolytic anemia in SARS-CoV-2 infection. *Ann Hematol* 2021; 100:37–43
- Prasad S, Starck SR, Shastri N. Presentation of Cryptic Peptides by MHC Class I Is Enhanced by Inflammatory Stimuli. *J Immunol* 2016; 197(8):2981–2991.
- Brochier A, Cabo J, Guerrieri C, Belkhir L, Laterre PF, Deneys V. Autoimmune hemolytic anemia in COVID-19 patients, the «transmissible» direct Coombs test. *J Hematol Clin Res* 2021; 5:004–8.
- Lam LKM, Reilly JP, Rux AH, Murphy SJ, Kuri-Cervantes L, Weisman AR, et al. Erythrocytes identify complement activation in patients with COVID-19. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2021; 321:L485–489.
- Solari D, Alberio L, Ribi C, Grandoni F, Stalder G. Autoimmune Hemolytic Anemia and Pulmonary Embolism: An Association to Consider. *TH Open* 2021; 5: e8–e13



30. Sujana IPS, Widiyari NPA, Arisanti NLPE, Rai IBN, Rena NMRA. Autoimmune Hemolytic Anemia as a Novel Complication of COVID-19 Infection in Sanglah General Hospital Bali, Indonesia. *Open Access Maced J Med Sci* 2020; 8:509-513.
31. Angileri F, Légaré S, Marino Gammazza A, Conway de Macario E, Macario AJL, Cappello F. Is molecular mimicry the culprit in the autoimmune haemolytic anaemia affecting patients with COVID-19? *Br J Haematol* 2020; 190: e92-e93.
32. Park SH. Diagnosis and treatment of autoimmune hemolytic anemia: classic approach and recent advances. *Blood Res* 2016; 51:69-71.
33. Phillips J, Henderson AC. Hemolytic Anemia: Evaluation and Differential Diagnosis. *Am Fam Physician* 2018; 98:354-361.
34. Douen A, George T, Ramsamoj K, Basit A, Kaur P, Shah T. A case of COVID-19-induced cold agglutinin disease. *Chest* 2021; 160: A880
35. Lai R. Cold Agglutinin Disease in the Context of the COVID-19 Pandemic. *Rare Disease Advisor*. <https://www.rarediseaseadvisor.com/insights/cad-insights/cold-agglutinin-disease-in-covid-19-pandemic/>, τελευταία επίσκεψη 24 Σεπτεμβρίου 2022
36. Huscenot T, Galland J, Ouvrat M, Rossignol M, Mouly S, Sène D, *et al.* SARS-CoV-2-associated cold agglutinin disease: a report of two cases. *Ann Hematol* 2020; 99:1943-1944.
37. Lai R. The Curious Association Between COVID-19 and Cold Agglutinin Disease. *Rare Disease Advisor*. <https://www.rarediseaseadvisor.com/insights/cad-insights/covid-19-cold-agglutinin-disease/>, τελευταία επίσκεψη 24 Σεπτεμβρίου 2022
38. Brazel D, Eid T, Harding C. Warm and Cold Autoimmune Hemolytic Anemia in the Setting of COVID-19 Disease. *Cureus* 2021; 13: e18127.
39. Bhagat YV, Hussien S, Queenan H, Michael MB. Exacerbation of Secondary Cold Agglutinin Syndrome in the Setting of SARS-CoV-2. *Cureus* 2021; 13: e19387
40. Jensen CE, Wilson S, Thombare A, Weiss S, Ma A. Cold agglutinin syndrome as a complication of Covid-19 in two cases. *Clin Infect Pract* 2020; 7:100041.
41. Kumarihamy P. A Case of COVID-19 Infection Associated with Severe Cold Agglutinin Autoimmune Hemolytic Anaemia. *Clin Med Rev Case Rep* 2021; 8:358.
42. Imoto H, Yoshioka S, Nakagawa D, Hasegawa K, Kuroda H, Hasuike T, *et al.* Cold agglutinin anti-I antibodies in two patients with COVID-19. *J Clin Lab Anal* 2022; 36:e24629.
43. Ahmed Y, Khandelwal A, Walker L. Cold agglutinin disease and COVID-19 requiring therapeutic plasma exchange. *BMJ Case Rep* 2021; 14: e244227.
44. Fattizzo B, Pasquale R, Bellani V, Barcellini W, Kulasekararaj AG. Complement Mediated Hemolytic Anemias in the COVID-19 Era: Case Series and Review of the Literature. *Front Immunol* 2021; 12:791429
45. Berentsen S. New Insights in the Pathogenesis and Therapy of Cold Agglutinin-Mediated Autoimmune Hemolytic Anemia. *Front Immunol* 2020; 11:590.
46. Kubánková M, Hohberger B, Hoffmanns J, Fürst J, Herrmann M, Guck J, *et al.* Physical phenotype of blood cells is altered in COVID-19. *Biophys J* 2021; 120:2838-2847.
47. Maslov DV, Simenson V, Jain S, Badari A. COVID-19 and Cold Agglutinin Hemolytic Anemia. *TH Open* 2020; 4: e175-e177.
48. Patil NR, Herc ES, Girgis M. Cold agglutinin disease and autoimmune hemolytic anemia with pulmonary embolism as a presentation of COVID-19 infection. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2022; 15:213-216.
49. Broome CM, Cunningham JM, Mullins M, Jiang X, Bylsma LC, Fryzek JP, *et al.* Increased risk of thrombotic events in cold agglutinin disease: A 10-year retrospective analysis. *Res Pract Thromb Haemost* 2020; 4:628-635.

## Παθοφυσιολογία βαριάς νόσου COVID-19: προδιαθεσικοί παράγοντες και εξέλιξη

Ιωάννης Χωνιανάκης<sup>1</sup>, Ελευθερία Γιαχανού<sup>1</sup>, Μαρία Άννα Κυριαζίδη<sup>2</sup>, Σωτήρης Βαρλάμης<sup>1</sup>,  
Ασημούλα Καββαδά<sup>2</sup>, Χρήστος Τένης<sup>1</sup>, Μαρία Χατζηδημητρίου<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Διεθνές Πανεπιστήμιο της Ελλάδος, <sup>2</sup>Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης



### Περίληψη

Ο κορονοϊός SARS-CoV-2 ευθύνεται για τη λοίμωξη COVID-19, η οποία λαμβάνει πανδημικές διαστάσεις τα τελευταία τρία χρόνια. Ο ιός μεταδίδεται μέσω της αναπνευστικής οδού, κυρίως με εισπνοή αερολυμάτων και η λοιμογόνος δράση του παρόλο που αρχικά είχε επικεντρωθεί ιδίως στο κατώτερο αναπνευστικό σύστημα, πλέον μέσω εξελικτικών μηχανισμών και μεταλλάξεων του ιικού γενώματος, έχει περιοριστεί στο ανώτερο αναπνευστικό. Η νόσος COVID-19 παρουσιάζει ένα ευρύτατο φάσμα βαρύτητας, που κυμαίνεται από υποκλινική λοίμωξη (ασυμπτωματική), ήπια συμπτωματολογία, έως και σοβαρές εκβάσεις, όχι σπάνια θανατηφόρες. Η σοβαρότητα της ασθένειας εξαρτάται από την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή, καθώς

πολλές φορές στις κρίσιμες περιπτώσεις παρατηρούνται διαδικασίες υπερφλεγμονής και υπεραντίδρασης τόσο του έμφυτου όσο και του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος, με τελικά αποτελέσματα το Σύνδρομο Καταιγίδας Κυτταροκινών και περιστατικά υπερπηκτικότητας. Βαρέως πάσχοντες ασθενείς εμφανίζουν έντονη λεμφοπενία, ηωσινοπενία και ουδετεροφιλία, ενώ παράλληλα εντοπίζονται και ραγδαίως αυξημένα επίπεδα D-dimers. Χαρακτηριστικές επιπλοκές της νόσου αποτελούν η πνευμονία και το Σύνδρομο Οξείας Αναπνευστικής Δυσχέρειας (ARDS), καταστάσεις ιδιαίτερα σοβαρές και απειλητικές για τη ζωή. Στην παρούσα ανασκόπηση θα εξηγηθούν οι επακριβείς μηχανισμοί, που διέπουν τον παθοφυσιολογικό χαρακτήρα της σοβαρής έκβασης της λοίμωξης COVID-19. Αρχικά, θα αναλύσουμε την υπέρμετρη ανοσολογική απόκριση και την εκτεταμένη φλεγμονή, που ακολουθεί κατά τη σοβαρή νόσο, μια κατάσταση γνωστή ως Σύνδρομο Καταιγίδας Κυτταροκινών. Ακόμη, θα διερευνήσουμε επιπλοκές που αφορούν στην υπερπηκτικότητα και στο σχηματισμό θρομβώσεων, με ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην ανάπτυξη πνευμονικής εμβολής, αλλά και στην αλόγιστη ενεργοποίηση του συστήματος συμπληρώματος. Επιπλέον, θα γίνουν αναφορές σε προδιαθεσικούς παράγοντες, όπως γενετικές μεταλλάξεις και ομάδες αίματος, οι οποίοι έχουν συσχετιστεί με την επιβαρυσμένη συμπτωματολογία της λοίμωξης, καθώς επίσης και σε μηχανισμούς αναστολής της ανοσιακής απάντησης, που διαθέτει ο SARS-CoV-2, δεδομένα που χρήζουν περαιτέρω αποσαφήνιση και διερεύνηση. Τέλος, θα εξηγηθεί η εξελικτική πορεία του ιού από τις αρχές της πανδημίας, έως σήμερα, ομαδοποιώντας τα στελέχη με παραλλαγές ανησυχίας (VOC) και αναφέροντας τις μεταξύ τους διαφορές, τόσο σε γενετικό επίπεδο, όσο και στις ιδιότητες που τους προσδίδουν οι εκάστοτε μεταλλάξεις που διαθέτουν.



### Λέξεις κλειδιά

COVID-19, SARS-CoV-2, ARDS, Καταιγίδα Κυτταροκινών, υπερπηκτικότητα, μεταλλάξεις

### Υπεύθυνος Αλληλογραφίας

Ιωάννης Χωνιανάκης

Τηλέφωνο: 6987404847

Email: chonianakis2000@gmail.com

## Εισαγωγή

Οι κορονοϊοί είναι μια μεγάλη οικογένεια Coronaviridae, η οποία διαχωρίζεται στις υποοικογένειες Orthocoronaviridae και Toroviridae. Η πρώτη, αποτελείται από τέσσερα γένη, τους άλφα, βήτα, γάμα και δέλτα κορονοϊούς. Στο γένος των βήτα κορονοϊών ταξινομείται ο ιός SARS-CoV, ο οποίος προκάλεσε την επιδημία του Σοβαρού Οξέος Συνδρόμου Αναπνευστικής Δυσχέρειας (ARDS) το 2003 και ο MERS-CoV, που ευθύνεται για την επιδημία του Αναπνευστικού Συνδρό-

μου της Μέσης Ανατολής το 2012. Από το Δεκέμβριο του 2019, ο νεοεμφανιζόμενος SARS-CoV-2, εντάχθηκε στην κατηγορία των βήτα κορονοϊών, λόγω της μεγάλης γενετικής ομοιότητας με τα παραπάνω ιικά στελέχη, προκαλώντας την πιο πρόσφατη πανδημική λοίμωξη στην ιστορία της ανθρωπότητας, την ονομαζόμενη COVID-19.<sup>1</sup>

Όπως όλοι οι κορονοϊοί, έτσι και ο SARS-CoV-2 μεταδίδεται κυρίως μέσω της αναπνευστικής οδού. Έπειτα από την είσοδό του στον οργανισμό, ο ιός εγκαθίσταται αρχικά στο ανώτερο αναπνευστικό σύ-



στημα και κατόπιν καταλήγει στους πνεύμονες, ικανός να προκαλέσει ARDS.<sup>2</sup>

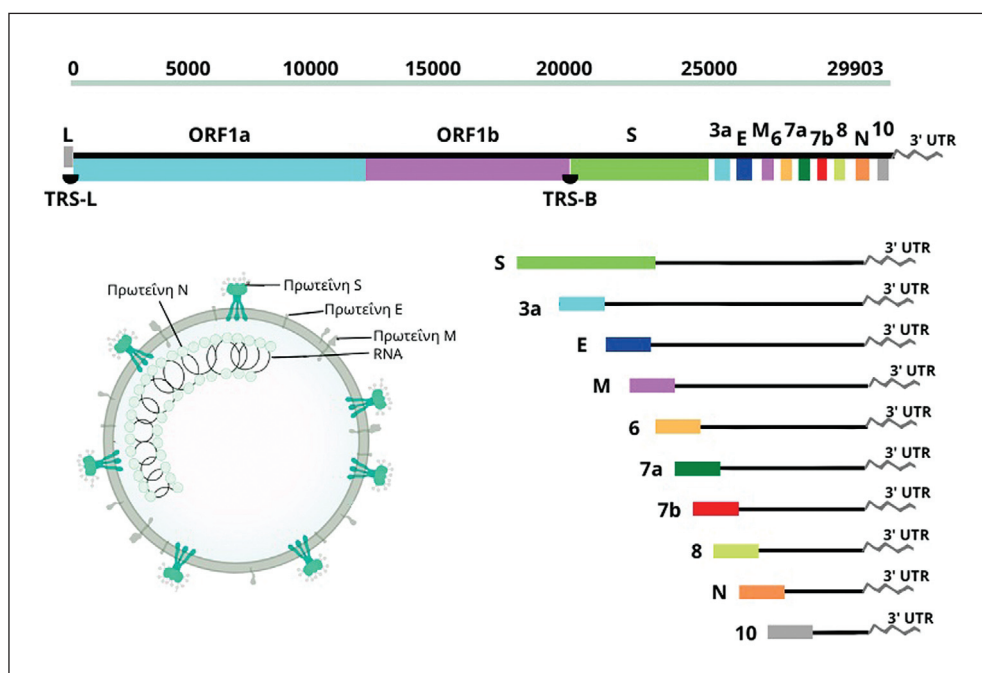
Ο κύκλος ζωής του SARS-CoV-2 αποτελεί μια περίπλοκη διαδικασία. Στην επιφάνεια του ιικού σωματιδίου, φέρονται οι δομικές πρωτεΐνες: ακίδας (S) που διαχωρίζεται σε δύο μέρη S1 και S2, φακέλου (E) και μεμβράνης (M), ενώ εντός αυτού παρατηρείται η πρωτεΐνη νουκλεοκαψιδίου (N), η οποία είναι υπεύθυνη για τη σταθεροποίηση του μονόκλωνου RNA, που διαθέτει ο ιός.<sup>1,3</sup>

Αρχικά, το ιικό σωματίδιο συνδέεται στην επιφάνεια του κυττάρου – ξενιστή, μέσω της S1 περιοχής, η οποία δεσμεύει τον υποδοχέα ACE-2.<sup>1,4</sup> Μέσω πρωτεασών του ξενιστή και κυρίως της TMPRSS2 διασπάται η S1 και αποκαλύπτεται η S2, με αποτέλεσμα τη σύντηξη των μεμβρανών ιού και κυττάρου, την ενδοκυττάρωση του ιικού σωματιδίου και τελικά την απελευθέρωση του γενώματός του.<sup>1</sup> Ο ιός μπορεί να απελευθερώσει το γενετικό του υλικό και μέσω απλής σύνδεσης στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή, χωρίς να προηγηθεί η διαδικασία ενδοκυττάρωσης.<sup>2</sup>

Το γενετικό υλικό του SARS-CoV-2, που απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή, αποτελείται από μια μονόκλωνη αλυσίδα RNA μήκους περίπου 30.000 βάσεων, η οποία συμβολίζεται ως RNA (+), ενώ το αντίγραφο της συμβολίζεται ως RNA (-). Στο μεγαλύτερο μέρος της αλυσίδας εκτείνονται τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης ORF1a και ORF1b, ενώ μικρή πε-

ριοχή καταλαμβάνουν τα γονίδια, που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες του ιού S, E, M και N, καθώς επίσης και έναν αριθμό βοηθητικών πρωτεϊνών.<sup>5,6</sup>

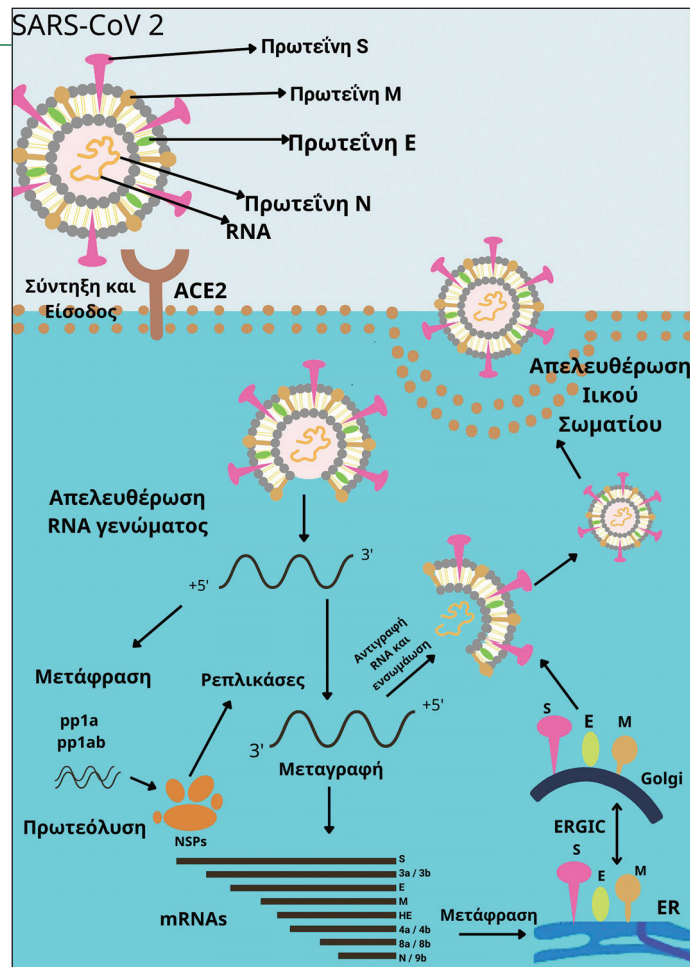
Κατά την απελευθέρωση του RNA, προσελκύνονται ριβοσώματα, τα οποία ξεκινούν τη διαδικασία μετάφρασης των περιοχών ORF1a και ORF1b, προς σχηματισμό των πολυπρωτεϊνών pp1a και pp1ab. Οι πολυπρωτεΐνες αυτές υφίστανται πρωτεολυτική διάσπαση σε μικρότερου μεγέθους πρωτεΐνες, τις ονομαζόμενες ρεπλικάσες και μεταγραφάσες (nsps), που σχηματίζουν μεταξύ τους συμπλέγματα και συμμετέχουν ενεργά στην αντιγραφή και μεταγραφή του ιικού γενώματος.<sup>5,6</sup> Οι ρεπλικάσες δρουν στο RNA (+) αντιγράφοντάς το και δημιουργώντας το RNA (-), το οποίο με τη σειρά του μπορεί να αντιγραφεί ξανά στο αρχικό μόριο RNA (+) ή να δεχτεί ασυνεχή μεταγραφή, μέσω μεταγραφασών, σε συνεργασία με την RNA πολυμεράση. Έτσι, γίνεται η μεταγραφή των ιικών γονιδίων και προκύπτουν τα αντίστοιχα mRNAs, που μεταφραζόμενα από ριβοσώματα, προάγουν την παραγωγή των πρωτεϊνών του SARS-CoV-2. Οι πρωτεΐνες που έχουν σχηματιστεί συλλέγονται, στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, μαζί με τους θετικούς κλώνους RNA που έχουν προκύψει από την αντιγραφή των αρνητικών και συναρμολογούνται στο σύμπλεγμα Golgi. Τελικά, δημιουργούνται τα νέα ιικά σωματίδια, τα οποία μέσω εξωκυττάρωσης απελευθερώνονται στο χώρο, έτοιμα να μολύνουν νέα κύτταρα.<sup>3,7,8</sup>



Εικόνα 1 Δομή γενετικού υλικού SARS-CoV-2.

**Εικόνα 2**

Διαδικασία αναπαραγωγής του SARS-CoV-2.



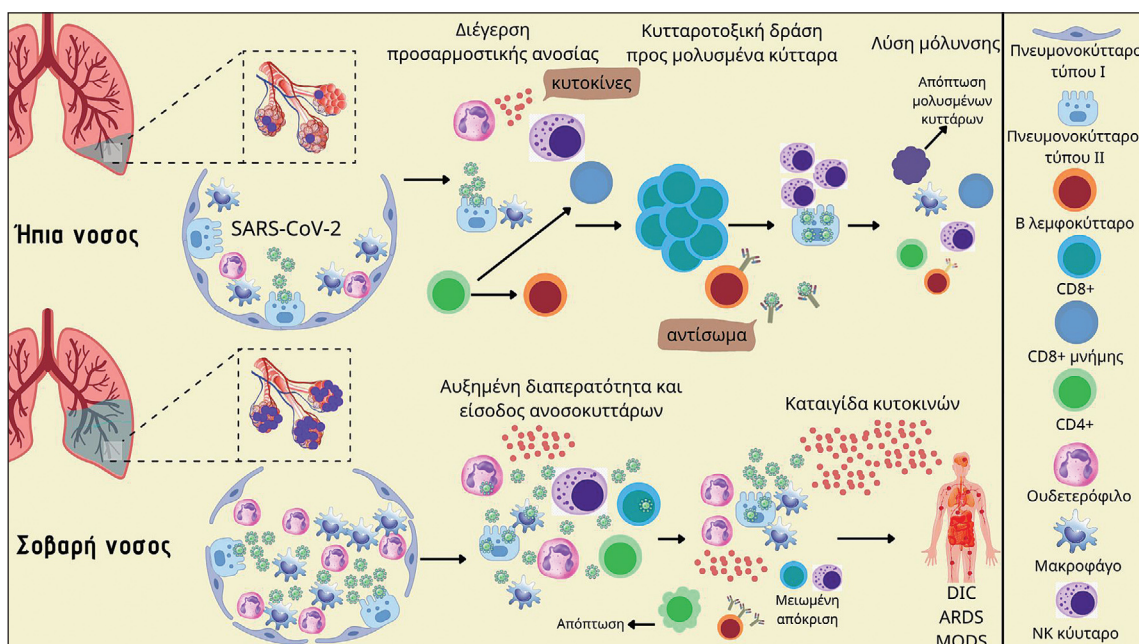
## Σύνδρομο Καταιγίδας Κυτταροκινών

Όπως σε κάθε ιογενή λοίμωξη, έτσι και στη μόλυνση από SARS-CoV-2, ως πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού παρουσιάζεται το έμφυτο ανοσολογικό σύστημα. Σπουδαίο χαρακτηριστικό του συστήματος αυτού, αποτελεί η απελευθέρωση μορίων από ανοσοκύτταρα, των ονομαζόμενων κυτταροκινών και χημειοκινών, που ως στόχο έχουν την αρχική καταστολή του ιικού πολλαπλασιασμού και την ενεργοποίηση της προσαρμοστικής ανοσίας, για την τελική λύση της μόλυνσης. Ωστόσο, σε ασθενείς με σοβαρή νόσο COVID-19 έχει παρατηρηθεί υπέρμετρη έκκριση τέτοιου είδους μορίων, γνωστή ως καταιγίδα κυτταροκινών, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε κρίσιμες επιπλοκές, όπως στο Σύνδρομο Οξείας Αναπνευστικής Δυσχέρειας (ARDS) ή στη Δυσλειτουργία Πολλαπλών Οργάνων (MODS), που δύνανται να κριθούν θανατηφόρες.<sup>9,10</sup>

Κατά τη βλάβη κυττάρων του αναπνευστικού συστήματος και ειδικότερα πνευμονοκυττάρων τύπου 2, διεγείρονται δένδριτικά κύτταρα, τα οποία ξεκινούν την έκκριση ιντερφερονών (IFNs), προς προσέλκυση

επιπρόσθετων έμφυτων ανοσοκυττάρων. Στην περίπτωση της COVID-19 λοίμωξης, εξαιτίας μηχανισμών διαφυγής που αναπτύσσει ο ιός έναντι των ανοσολογικών αντιδράσεων του ξενιστή, έχει σημειωθεί ασυνήθιστα χαμηλή παραγωγή ιντερφερονών, που ευθύνονται για την καθυστερημένη απόκριση του ανοσολογικού συστήματος.<sup>8</sup> Επόμενο στάδιο αποτελεί η στρατολόγηση κυψελιδικών μακροφάγων στο σημείο μόλυνσης, τα οποία μέσω πολυάριθμων χημειοκινών (CCL2, CCL5, CCL8, CXCL10 κ.ά) προκαλούν διήθηση μεγάλου όγκου λευκοκυττάρων και πιο συγκεκριμένα περαιτέρω δένδριτικών, μακροφάγων και ουδετερόφιλων στον πνευμονικό ιστό.<sup>9,11</sup>

Έτσι, αρχίζει μια διαδικασία ανεξέλεγκτης παραγωγής και απελευθέρωσης προφλεγμονωδών κυτταροκινών, με κύριους εκπροσώπους την IL-6, IL-1β, TNF-α, IFN-α και IFN-β, που όχι μόνο ευθύνονται για ιστικές βλάβες, αλλά και αλληλοεξαρτώνται, καθώς επηρεάζονται θετικά μεταξύ τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της αλληλεπίδρασης, αποτελεί η IL-1, που επάγει την αύξηση του TNF-α και της IL-6, με την υπερπαραγωγή της τελευταίας να καθορίζει τη σοβαρό-



Εικόνα 3 Ήπια και σοβαρή λοίμωξη COVID-19.

τητα της νόσου, ενέχοντας μεγάλο κίνδυνο για κρίσιμες έως και θανατηφόρες καταστάσεις.<sup>9,11</sup>

Τόσο η υπέρμετρη συσσώρευση μακροφάγων και ουδετερόφιλων στο σημείο φλεγμονής, όσο και τα μεγάλα ποσά κυτταροκινών που απελευθερώνονται, οδηγούν από τη μία σε αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας, η οποία καταλήγει σε ενδιάμεσο οίδημα και από την άλλη σε ιστική καταστροφή.<sup>10</sup> Το ενδιάμεσο οίδημα και η ιστική βλάβη, συνδυαστικά οδηγούν σε κυψελιδικό οίδημα, που τελικά είναι ικανό να προκαλέσει τοπική (ARDS) ή γενικευμένη υποξία (MODS). Παράλληλα, η καταιγίδα κυτταροκινών διεγείρει T λεμφοκύτταρα, με σκοπό την διαφοροποίησή τους σε CD4<sup>+</sup> και CD8<sup>+</sup>, καθώς επίσης και B λεμφοκύτταρα, προς σχηματισμό ειδικών αντισωμάτων για τον παθογόνο ιό. Τα T λεμφοκύτταρα, ενεργοποιημένα πλέον, παράγουν IFN- $\gamma$ , προάγοντας περαιτέρω απελευθέρωση κυτταροκινών, των οποίων η υπερβολική συγκέντρωσή ενισχύει την επιδείνωση σε ARDS ή MODS και προωθεί την απόπτωση των κυττάρων αυτών, με τελικό αποτέλεσμα την επικίνδυνη μείωσή τους στον οργανισμό.<sup>9,10</sup>

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, αποδεικνύεται ότι η ανοσολογική απόκριση έναντι παθογόνων προσδίδει ευεργετική προφύλαξη, υπό την προϋπόθεση να περιορίζεται εντός συγκεκριμένων πλαισίων. Αντίθετα, η ανεξέλεγκτη και υπέρμετρη ενεργοποίηση των ανοσοκυττάρων όχι μόνο δεν τελεί προστατευτικό ρόλο, αλλά μπορεί να μετατραπεί σε εχθρό του ίδιου του οργανισμού, προκαλώντας μη αναστρέψιμες βλάβες.<sup>9</sup>

## Υπερπηκτικότητα και θρόμβωση

Η υπέρμετρη και ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση των αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή, είναι ικανή, μεταξύ άλλων, να προκαλέσει πολλαπλές και συστηματικές αποκρίσεις πήξης και δημιουργία θρόμβων.<sup>12</sup> Οι πηκτικές διαταραχές, που έχουν παρατηρηθεί σε μερίδα ασθενών με COVID-19 λοίμωξη, μπορούν να οδηγήσουν σε θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια και σε εκδήλωση διάχυτης ενδοαγγειακής πήξης (DIC) στα τελευταία στάδια της νόσου. Οι επιπλοκές αυτές, σχετίζονται με υψηλό κίνδυνο νοσηρότητας και θνησιμότητας, είναι πολυπαραγοντικής φύσης και αποτελούν αίτιο θανάτου μεγάλου ποσοστού βαρέως πασχόντων ασθενών.<sup>13</sup>

Κατά τη διάρκεια της λοίμωξης, έχουν διαπιστωθεί πολλαπλές περιπτώσεις ενδοθηλιακών τραυματισμών. Η άμεση μόλυνση ενδοθηλίου μέσω υποδοχέα ACE-2, η αυξημένη διήθηση λευκών αιμοσφαιρίων και κυρίως μονοκυττάρων και ουδετερόφιλων, αλλά και η υπερέκκριση κυτταροκινών από τα συσσωρευμένα ανοσοκύτταρα, ευθύνονται για τις βλάβες και την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Έτσι, η λύση της ενδοθηλιακής συνέχειας που προκύπτει, ενδέχεται να εκκινήσει τους μηχανισμούς πήξης, εμφανίζοντας θρομβωτική δράση και να προάγει την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση.<sup>12</sup>

Τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν μόρια προσκόλλησης (P-σελεκτίνη, E-σελεκτίνη), ιστικό παράγοντα (TF) και παράγοντα von Willebrand (vWF).

Ο TF συνιστά έναυσμα ενεργοποίησης της εξωγενούς οδού πήξης, ενώ τα μόρια προσκόλλησης και ο vWF αποτελούν γέφυρες σύνδεσης αιμοπεταλίων στο αγγειακό ενδοθήλιο, με αποτέλεσμα τη συσσωμάτωσή τους και το σχηματισμό συστηματικών θρομβώσεων.<sup>14</sup> Ακόμη, ο TF προάγει την παραγωγή θρομβίνης από προθρομβίνη, η οποία με τη σειρά της μετατρέπει διαδοχικά το κυκλοφορούν ινωδογόνο σε ινώδες.<sup>15</sup> Επιπλέον, προκαλείται απελευθέρωση πλασμινογόνου, το οποίο μεταπίπτει σε πλασμίνη, που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αποδομή του ινώδους, ενισχύοντας το φαινόμενο της θρόμβωσης, κυρίως εντός των πνευμόνων. Συνεπώς, τόσο η επαγόμενη από TF θρομβίνη, όσο και η πλασμίνη, ευθύνονται για τον σχηματισμό θρόμβων με βάση το ινώδες.<sup>16</sup>

Η προκύπτουσα φλεγμονή, από το SARS-CoV-2, ενέχει τον κίνδυνο υπερέκκρισης κυτταροκινών, οι οποίες μπορούν να συμβάλλουν ενεργά στις πηκτικές και θρομβωτικές διαταραχές. Πιο συγκεκριμένα, οι TNF-α, IL-1 και IL-6 προάγουν την έκφραση TF στα μονοκύτταρα, τα οποία απελευθερώνουν συνδυαστικά και μικροκυστίδια, εκκινώντας τη διαδικασία πήξης και παραγωγής θρομβίνης, με όμοιο τρόπο με το ενεργοποιημένο ενδοθήλιο, όπως προαναφέρθηκε.<sup>14,16</sup> Παράλληλα, οι παραπάνω κυτταροκίνες έχουν την δυνατότητα καταστολής ενδογενών αντιπηκτικών οδών π.χ. αντιθρομβίνη και αναστολέα TF, με αποτέλεσμα την επιπρόσθετη διάδοση της πήξης στον οργανισμό.<sup>8,15</sup> Σε απουσία αγγειακής βλάβης, η έναρξη του καταρράκτη πήξης εξαρτάται εξ ολοκλήρου από τη στρατολόγηση μονοκυττάρων που εκφράζουν TF.<sup>15,17</sup>

Οι αγγειακές βλάβες χαρακτηρίζονται από υπερενεργοποίηση και συσσώρευση αιμοπεταλίων, προς σχηματισμό θρόμβων. Ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απελευθερώνουν διαλυτή P-σελεκτίνη, προάγοντας την προσκόλληση λευκών αιμοσφαιρίων τόσο με τα ίδια τα αιμοπετάλια, όσο και με τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενδυναμώνοντας περισσότερο τους σχηματισμένους θρόμβους.<sup>18</sup> Σύνδεση αιμοπεταλίων με ουδετερόφιλα, μέσω P-σελεκτίνης και PSGL-1, σηματοδοτεί παραγωγή εξωκυττάρων παγίδων ουδετερόφιλων (NETs). Τα NETs συνίστανται από αποσυμπυκνωμένη πυρηνική χρωματίνη, ιστόνες και πρωτεΐνες ουδετερόφιλων και διαθέτουν καίριο ρόλο στη δέσμευση παθογόνων μικροοργανισμών. Τα NETs μπορούν να ενεργοποιήσουν την οδό της πήξης και τα πνευμονικά μεγακαρυοκύτταρα μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ ιστών και αιμοπεταλιακών φωσφολιπιδίων, ενώ ταυτόχρονα επεξεργάζονται φυσικά αντιπηκτικά, ενισχύοντας την τάση πήξης.<sup>8,18</sup> Τέλος, έχει παρατηρηθεί μόλυνση αιμοπεταλίων από SARS-CoV-2 διαμέσου του υποδοχέα TLR-4, όπου το ιικό σωματίδιο ενδοκυτταρώνεται και το ssRNA προ-

σκολλάται στον ενδοσωμικό υποδοχέα TLR-7, ενεργοποιώντας το κύτταρο, με αποτέλεσμα την παραγωγή P-σελεκτίνης και τον επερχόμενο σχηματισμό συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων με λευκοκύτταρα.<sup>19</sup> Η κατανάλωση αιμοπεταλίων, που οφείλεται στις παραπάνω διαδικασίες, οδηγεί σε σχετική αιμορραγική διάθεση, σε σπάνια περιστατικά COVID-19.<sup>20</sup>

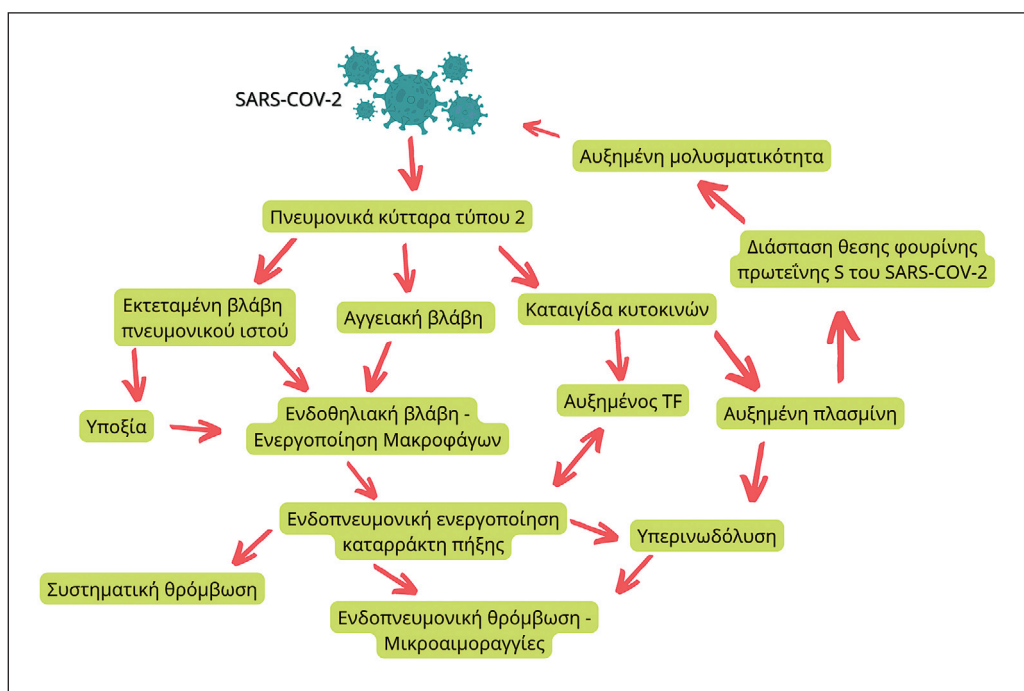
## Πνευμονική εμβολή

Μια από τις πιο σοβαρές και συχνές θρομβωτικές επιπλοκές από COVID-19 λοίμωξη, αποτελεί η πνευμονική εμβολή. Ο SARS-CoV-2 μολύνει άμεσα πνευμονικά κύτταρα τύπου 2, μέσω του υποδοχέα ACE-2, του οποίου η αυξημένη έκφραση στον συγκεκριμένο τύπο κυττάρων, οδηγεί σε εκτεταμένη βλάβη πνευμονικού ιστού και αγγείων, με αποτέλεσμα την έξαρση καταγίδας κυτταροκινών. Η αγγειακή καταστροφή και η αύξηση των κυτταροκινών, επάγουν την έκφραση TF από το ενδοθήλιο, ενώ η πνευμονική απόπτωση καταλήγει σε υποξία και σε ενδοθηλιακό τραυματισμό. Έτσι, ο ιστικός παράγοντας και η ιστική βλάβη ενεργοποιούν τον καταρράκτη πήξης εντός του πνεύμονα. Η φλεγμονή αυτή, συμβάλει στη διατήρηση χαμηλών επιπέδων αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1), με αποτέλεσμα αυξημένα ποσοστά πλασμίνης, που οδηγούν σε υπερνωδόλυση και τελικά σε ενδοπνευμονική θρόμβωση και μικροαιμοραγίες, που σε κάποιους ασθενείς διαφεύγουν του πνεύμονα, προκαλώντας συστηματικές θρομβώσεις. Ακόμη, η πλασμίνη διασπά τη θέση φουρίνης στην πρωτεΐνη S του ιού, αυξάνοντας τη μολυσματικότητά του και ενδυναμώνοντας την καταστροφική του δράση.<sup>21</sup>

## Ενεργοποίηση συστήματος συμπληρώματος

Το Σοβαρό Οξύ Αναπνευστικό Σύνδρομο από SARS-CoV-2, έχει αποδειχθεί ότι πυροδοτείται από την υπερβολική ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος. Ο ιός δύναται να ενεργοποιήσει το συμπλήρωμα άμεσα, καθώς η πρωτεΐνη νουκλεοκαψιδίου N και η πρωτεΐνη S, πλούσιες σε μαννόζη, αναγνωρίζονται και δεσμεύονται από την MBL. Η MBL είναι συστατικό του συμπληρώματος που αναγνωρίζει υπολείμματα μαννόζης στην επιφάνεια ποικίλων μικροοργανισμών και εν προκειμένω δεσμεύει τις πρωτεΐνες N και S του SARS-CoV-2. Για την ενεργοποίηση της οδού λεκτίνης, απαιτείται η αλληλεπίδραση MBL με MASP-2, εκκινώντας άμεσα τον καταρράκτη του συμπληρώματος.<sup>17, 22-25</sup>

Ακόμη, ανοσοσυμπλέγματα IgG και IgM συνδεόμενα με τον υποδοχέα της πρωτεΐνης ακίδας, μπορούν να ενεργοποιήσουν την κλασική οδό του συμπληρώ-



Εικόνα 4 Μηχανισμός πνευμονικής εμβολής στην COVID-19 λοίμωξη.

ματος, ενώ μεμονωμένη η πρωτεΐνη S απορρυθμίζει την εναλλακτική οδό, μέσω της δέσμευσής της με θειική ηπαρίνη και του ανταγωνισμού με τον παράγοντα H, ο οποίος αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της δραστηριότητας του συμπληρώματος. Η εναλλακτική οδός μπορεί να διεγερθεί και μέσω αλληλεπίδρασης του ιού με υποδοχείς TLRs ανοσοκυττάρων. Τέλος, η ενδοθηλιοπάθεια και θρομβοφλεγμονή που προκαλείται από τη λοίμωξη, αποτελεί έναν έμμεσο τρόπο ενεργοποίησης του συμπληρώματος από τον SARS-CoV-2.<sup>23,25</sup>

Κυριότερη και πιο κοινή πηγή προέλευσης του συμπληρώματος συνιστά το ήπαρ, ενώ ανοσοποιητικά και μη κύτταρα αναφέρονται ως δευτερεύουσα πηγή προέλευσης. Στην περίπτωση της COVID-19 λοίμωξης, T λεμφοκύτταρα εξέρχονται του αγγειακού τοιχώματος, μέσω αλληλεπιδράσεων μορίων προσκόλλησης ICAM-1 ενδοθηλιακών κυττάρων με μόρια επιφανείας LFA-1 T λεμφοκυττάρων προς μετανάστευσή τους στα πάσχοντα όργανα. Η διαδικασία αυτή, γνωστή και ως διαπίδυση, έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση συστατικών συμπληρώματος από τα λεμφοκύτταρα, με αποτέλεσμα την τοπική εναπόθεση συμπληρώματος στους ιστούς.<sup>23</sup>

Έχει παρατηρηθεί, μεταξύ άλλων, ότι πηγή C3 αποτελούν και τα επιθηλιακά κύτταρα αεραγωγών (AECs). Η μόλυνση των AECs από SARS-CoV-2 οδηγεί σε ενεργοποίηση σηματοδότησης IFN-1 δια της οδού JAK-STAT, με αποτέλεσμα την έκφραση γονιδίων συμπληρώματος C3 και CFB, όπου το δεύτερο εξ αυτών

κωδικοποιεί τον παράγοντα B, ο οποίος καταλύει τη διάσπαση του C3 σε C3a.<sup>23</sup>

Η ενεργοποίηση των οδών του συμπληρώματος οδηγεί στο σχηματισμό κονβερτάσης C3, η οποία διασπάται σε αναφυλατοξίνη C3a και C3b, με αποτέλεσμα τη δημιουργία C5 και την επακόλουθη διάσπασή του σε C5a και C5b. Έχει αποδειχτεί ότι οι αναφυλατοξίνες C3a και C5a διαδραματίζουν καταλυτικό ρόλο στην πρόκληση ανοσοθρόμβωσης σε ασθενείς με COVID-19 λοίμωξη.<sup>17</sup> Η C3a προάγει την ενεργοποίηση αιμοπεταλίων διαμέσου C3aR υποδοχέων, με αποτέλεσμα το σχηματισμό θρομβίνης. Η θρομβίνη, συνδυαστικά με την C5a, επάγει την έκφραση ιστικού παράγοντα από τα ουδετερόφιλα, αλλά και την παραγωγή NETs, τα οποία φέρουν επίσης ιστικό παράγοντα, με τελικό επακόλουθο την ενεργοποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων και την αύξηση της προπηκτικής δράσης των κυττάρων.<sup>26</sup>

Ο άξονας C3 – C3aR προωθεί την στρατολόγηση ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων στους πνεύμονες και την απελευθέρωση κυτταροκινών από μακροφάγα, συμβάλλοντας στην υπερενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων και τελικά στην επιδείνωση του ARDS. Ακόμη, μέσω του άξονα αυτού, προάγονται προθρομβωτικές επιπλοκές, ενδοθηλίτιδα και θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια, που οφείλονται στην αλληλεπίδραση C3 με C3aR ενδοθηλιακών κυττάρων, με στόχο την έκφραση μορίων προσκόλλησης και στην αντίστοιχη αλληλεπίδραση με αιμοπετάλια και ουδε-

τερόφιλα, που δεσμεύονται στο ενδοθήλιο, σχηματίζοντας ανοσοθρόμβους.<sup>27</sup>

Τα προϊόντα του συμπληρώματος C3 και C5 εμπλέκονται σημαντικά με τις επιπλοκές της COVID-19 λοίμωξης. Οι κονβερτάσες C3 και C5 διεγείρουν ουδετερόφιλα και μακροφάγα, προς απελευθέρωση IL-1, IL-6, IL-8, IL-21, TNF και CCL2, επιτείνοντας ή κατ' ουσία προκαλώντας το σύνδρομο ARDS.<sup>25</sup> Επιπρόσθετα, η στρατολόγηση ουδετερόφιλων από C3a και C5a οδηγεί στην παραγωγή NETs, που περιέχουν C3, προπερδίνη και παράγοντα B, ενεργοποιώντας την εναλλακτική οδό του συμπληρώματος. Το σύστημα συμπληρώματος, συνδυαστικά με τα σχηματιζόμενα NETs, ενισχύει τη φλεγμονή και την ενδοθηλιακή βλάβη. Έτσι, παράγονται από το κατεστραμμένο ενδοθήλιο κυτοκίνες, όπως IL-6, IL-8 και IL-1β, οι οποίες επάγουν την περαιτέρω απελευθέρωση NETs. Παράλληλα, οι ενδοθηλιακές βλάβες ωθούν τον οργανισμό σε καταστάσεις υπερπηκτικότητας, που καταλήγουν σε επιπρόσθετη ενεργοποίηση του συμπληρώματος, καθώς η θρομβίνη, ο παράγοντας XII και η καλλικρεΐνη ενεργοποιούν τα συστατικά C5, C1 και C3 αντίστοιχα.<sup>24</sup>

Όσον αφορά τα τελικά προϊόντα του συστήματος του συμπληρώματος, το σύμπλεγμα προσβολής μεμβράνης (MAC), συμβάλλει εξίσου στις καταστάσεις υπερπηκτικότητας και θρόμβωσης σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς. Τα προϊόντα αυτά επιδεινώνουν τις βλάβες του ενδοθηλίου, διεγείροντας την έκκριση χημειοκινών και την έκφραση μορίων προσκόλλησης από τα πληττόμενα ενδοθηλιακά κύτταρα. Κατ' αυτόν τον τρόπο, εκφράζεται παράγοντας vWF και P-σελεκτίνη από αυτά, στρατολογώντας αιμοπετάλια, καθώς επίσης εκφράζεται ιστικός παράγοντας και αποβάλλεται η θρομβομοντουλίνη από τις κυτταρικές επιφάνειες. Τα παραπάνω γεγονότα έχουν ως τελική απόρροια την πυροδότηση των καταρρακτών πήξης και τον συνεχή σχηματισμό θρόμβων.<sup>25</sup>

Ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί η δέσμευση θραυσμάτων C3, C4 ακόμη και πρωτεΐνης S του SARS-CoV-2 σε ερυθρά αιμοσφαίρια. Έτσι, ενεργοποιείται η κλασική οδός του συμπληρώματος, ενώ ταυτόχρονα εναποτίθενται ανοσοσυμπλέγματα στα ερυθροκύτταρα, μεταβάλλοντας τη ροή τους και προάγοντας ενδαγγειακή στασιμότητα και κατ' επέκταση θρόμβωση.<sup>28</sup>

## Βιομετρικοί δείκτες βαριάς λοίμωξης COVID-19

Από την έναρξη της πανδημίας, έως και σήμερα, έχουν παρατηρηθεί σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς, με λοίμωξη COVID-19, σημαντικές μεταβολές των φυσιολογικών τιμών πολλών εργαστηριακών εξετάσεων. Οι βιοδείκτες, οι οποίοι μπορούν να εμφανίσουν ποσοτικές μεταβολές σε βαριά νόσηση, αφορούν κυρίως

στους κυτταρικούς πληθυσμούς του ανοσοποιητικού συστήματος και στις παραμέτρους της πήξης.

Χαρακτηριστικό εύρημα σοβαρής νόσησης από SARS-CoV-2, συνιστά η έντονη λεμφοπενία, με σοβαρά μειωμένα επίπεδα όλων των τύπων λεμφοκυττάρων.<sup>4,29,30</sup> Η ελάττωση του αριθμού των λεμφοκυττάρων οφείλεται, μερικώς, στην παρουσία του υποδοχέα ACE-2, στην επιφάνειά τους, με αποτέλεσμα τη σύνδεση του ιού και την πρόκληση λύσης των κυττάρων. Ακόμη, η προκύπτουσα από τη μόλυνση, καταϊγίδα κυτταροκινών, προάγει την απόπτωση των λεμφοκυττάρων, οδηγώντας σε ατροφία των λεμφικών οργάνων και ακολούθως σε μείωση της αναγέννησης νέων λεμφοκυττάρων. Τα παραπάνω γεγονότα συνάδουν στην εμφάνιση λεμφοπενίας, καθιστώντας τον οργανισμό αδύναμο για την αντιμετώπιση του ιού.<sup>4,14,31</sup> Επιπρόσθετοι εργαστηριακοί δείκτες είναι η ουδετεροφιλία, λόγω μαζικής συγκέντρωσης στην κυκλοφορία και η μείωση ηωσινόφιλων, βασεόφιλων και μονοκυττάρων, εξαιτίας της εξάντλησής τους στην περιφέρεια ή του υψηλού ρυθμού μετανάστευσής τους σε μολυσμένο όργανο.<sup>7,29,30</sup> Ωστόσο, υψηλή διαγνωστική αξία διαθέτουν οι λόγοι ουδετερόφιλων / λεμφοκυττάρων και λεμφοκυττάρων / συνολικού αριθμού λευκών αιμοσφαιρίων, οι οποίοι παρουσιάζουν αυξημένες και μειωμένες, αντίστοιχα τιμές και μετρούνται εκτενώς, κατά την παρακολούθηση της πορείας της νόσου βαρέως πάσχοντων ασθενών.<sup>29,31</sup>

Ανάλογες σημαντικές μεταβολές παρουσιάζονται στους βιοδείκτες πήξης, οι οποίες παρατηρούνται σε νοσηλευόμενους με εμφάνιση υπερπηκτικότητας. Αρχικά, ανευρίσκεται έντονη θρομβοπενία, που προκαλείται από πολυπαραγοντικά αίτια, όπως καταστροφή αιμοπεταλίων από καταϊγίδα κυτταροκινών, άμεση κυτταροπαθολογική επίδραση στο μυελό των οστών και ύπαρξη αντιαιμοπεταλιακών αντισωμάτων. Επίσης, η προσβολή του πνεύμονα μπορεί να καταλήξει σε κατανάλωση αιμοπεταλίων ή σε μείωση κατακερματισμού μεγακαρυοκυττάρων, λόγω αλλοίωσης των πνευμονικών τριχοειδικών αγγείων και τελικά σε αναστολή παραγωγής αιμοπεταλίων.<sup>4,8</sup> Εξίσου σύνηθες εύρημα, αποτελούν οι αυξημένες τιμές D – dimers, που κυμαίνονται εκθετικά, ανάλογα με τη σοβαρότητα της νόσου. Τα D – dimers συνιστούν τα τελικά προϊόντα αποδόμησης του σταθεροποιημένου ινώδους και έτσι σε καταστάσεις αυξημένης ινωδολυτικής δραστηριότητας και πήξης, όπως συμβαίνει στις πηκτικές επιπλοκές της COVID-19, παρατηρείται έντονος σχηματισμός τους. Επιπλέον, το ινωδογόνο εμφανίζει τιμές κοντά στα ανώτερα φυσιολογικά όρια, καθώς αποτελεί πρωτεΐνη οξείας φάσης, ενώ σε περιπτώσεις DIC και αμέσως πριν το θάνατο, μειώνεται σημαντικά.<sup>4,12,13,16</sup> Τέλος, εξαιτίας των πηκτικών ανωμαλιών, οι χρόνοι προθρομβίνης και μερικής θρομβοπλαστί-

νης, παρατείνονται σε κρίσιμες καταστάσεις.<sup>12,16</sup>

Επιπρόσθετα εργαστηριακά ευρήματα, για τη διάγνωση σοβαρής λοίμωξης COVID-19, περιλαμβάνουν τις αυξημένες τιμές πρωτεϊνών οξείας φάσης, όπως C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), αμυλοειδούς Α ορού και φερριτίνης, αλλά και μείωση μερικών εξ αυτών, όπως στην περίπτωση της προλευκωματίνης. Η αύξηση των πρωτεϊνών οξείας φάσης, οφείλεται στην ισχυρή δράση IL-6, IL-1 και TNF-α, που προκύπτουν από την καταιγίδα κυτταροκινών, στο ήπαρ, ενώ η μείωση της προλευκωματίνης, προκύπτει από την κατανάλωσή της ως μη ειδική αμυντική ουσία και από το μικρό χρόνο ημιζωής της.<sup>14,31,32</sup> Επίσης, έχει συσχετιστεί η ραγδαία αύξηση της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) με βαριά νόσηση από SARS-CoV-2, καθώς το συγκεκριμένο ένζυμο εκφράζεται σε όλα σχεδόν τα ανθρώπινα κύτταρα, με αποτέλεσμα οι ιστικές βλάβες, που συνοδεύουν τη φλεγμονή, να οδηγούν στην απελευθέρωσή του και τελικά στην ποσοτική αύξησή του στον ορό.<sup>14,33-35</sup> Όσον αφορά στην αύξηση της φερριτίνης, ο SARS-CoV-2 επιτίθεται άμεσα στην 1-β-αλυσίδα της αιμοσφαιρίνης, επάγοντας τη διάσπαση των πορφυρινών, με τελική απόρροια την απελευθέρωση σιδήρου στην αιματική κυκλοφορία. Έτσι, αυξάνεται η απελευθέρωση της φερριτίνης πρωτίστως προς δέσμευση της υπέρμετρης ποσότητας σιδήρου και δευτερευόντως ως απόκριση οξείας φάσης από το ήπαρ.<sup>14-16</sup>

Τέλος, συχνά αξιολογούνται τα ποσοτικά επίπεδα των συστατικών του συστήματος συμπληρώματος. Χαρακτηριστική είναι η ελάττωση των κονβερτάσων, αρχικά της C3 και μετέπειτα της C4, λόγω ενεργοποίησης της εναλλακτικής οδού και κατανάλωσής τους.<sup>32</sup> Από την άλλη, παρατηρείται έντονη αύξηση του παράγοντα C5 και του τελικού προϊόντος του συμπληρώματος, C5b-9, ως αποτέλεσμα της παραπάνω ενεργοποίησης.<sup>23</sup>

## Επιβαρυντικοί παράγοντες νόσου COVID-19

Με βάση νέες μελέτες, που στοχεύουν στην κατανόηση της κλινικής μεταβλητότητας της νόσου COVID-19, έχουν διαπιστωθεί ανθρώπινοι γενετικοί παράγοντες, οι οποίοι συμβάλλουν ενεργά στην κατάταξη της ασθένειας ως βαριάς μορφής. Τέτοιου είδους παράγοντες αποτελούν πολλαπλά αλληλόμορφα γονίδια διαφορετικών χρωμοσωμάτων, η ομάδα αίματος κατά ABO και Rhesus, ενώ παράλληλα έχουν αποσαφηνιστεί οι μηχανισμοί, τόσο της αναστολής της ανοσολογικής απόκρισης από το SARS-CoV-2, όσο και της ανάπτυξης αυτοανοσίας.

Γονίδια που βρίσκονται στον τόπο 3p21.31 του 3ου χρωμοσώματος έχουν ενοχοποιηθεί για δυσμενή κλινική έκβαση της ασθένειας και εκδήλωση αναπνευ-

στικής ανεπάρκειας. Τα γονίδια που εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή, περιλαμβάνουν το *LZTFL1*, που εκφράζεται έντονα στα ανθρώπινα πνευμονικά κύτταρα και το γονίδιο *SLC6A20*, το οποίο κωδικοποιεί το μεταφορέα προλίνης 1 (SIT1), που με τη σειρά του αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα ACE-2. Αντίστοιχη επίδραση παρουσιάζουν και τα γονίδια *CXCR6*, *CCR9*, *CCR1* και *CCR2*, που κωδικοποιούν υποδοχείς χημειοκινών των οικογενειών CC και CXC. Ωστόσο, δεν αρκεί ένα γονίδιο, για να καταστεί η νόσος κρίσιμη, αλλά απαιτείται η ύπαρξη συμπλέγματος πολλαπλών γονιδίων στο χρωμόσωμα 3.<sup>36</sup>

Η απολιποπρωτεΐνη E (ApoE) διαθέτει τρεις κύριες ισομορφές, τις ApoE2, ApoE3 και ApoE4, οι οποίες κωδικοποιούνται από τα αντίστοιχα αλληλόμορφα γονίδια *e2*, *e3* και *e4* του χρωμοσώματος 19. Έχει συσχετιστεί ο ομόζυγος γονότυπος *e4e4* με αυξημένο κίνδυνο σοβαρής νόσησης COVID-19 (γνωστός ήδη για την λειτουργία των λιποπρωτεϊνών, με επακόλουθο την ανάπτυξη καρδιαγγειακών παθήσεων), μέσω κατευασμού προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών φαινοτύπων των μακροφάγων, επιτρέποντας την παρατεταμένη επιβίωση του ιού.<sup>36</sup>

Έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες, οι οποίες καταδεικνύουν την συμμετοχή των γονιδίων *HLA* στη λοίμωξη από SARS-CoV-2. Ειδικότερα, το αλληλόμορφο *HLA-B 46:01* έχει αποδειχτεί ως υπεύθυνο για αυξημένη ευαισθησία προς τον ιό και έχει αναγνωριστεί ως έγκυρος βιοδείκτης. Ακόμη, τα αλληλόμορφα *HLA-A 11:01*, *HLA-B 51:01* και *HLA-C 14:02* προδιαθέτουν τους ασθενείς σε σοβαρότερη νόσηση.<sup>36,37</sup>

Ομοίως, μεταλλάξεις των γονιδίων *TLR3*, *TLR7* και *IR77* του X χρωμοσώματος έχουν παρατηρηθεί στο 3% των ασθενών με κρίσιμη νόσο COVID-19. Παραλλαγές στα συγκεκριμένα γονίδια οδηγούν σε δυσλειτουργία έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας, μέσω μειωμένης έκφρασης TLR υποδοχέων και απόκρισης IFN.<sup>36,38</sup> Επιπλέον, έχουν μελετηθεί και πολυμορφισμοί των γονιδίων των ACE-2 και *TMPRSS2* (*HGNC: 13557* και *HGNC: 11876* αντίστοιχα), που ευνοούν τον τροπισμό του SARS-CoV-2.<sup>36,37</sup>

Τέλος, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες πολυμορφισμών γονιδίων κυτταροκινών, όπως αυτών της IL6, IL1β και TNF. Παραλλαγές στο γονίδιο της IL6 προάγουν την αύξηση των επιπέδων της κυτταροκίνης στον ορό, ενώ παράλληλα παραλλαγές στα γονίδια των IL1β, IL1RN, IL1R1 μεγιστοποιούν τις πιθανότητες εμφάνισης φλεβικής θρόμβωσης. Ακόμη, το γονίδιο *IL6*, σε συνδυασμό με το γονίδιο *FCGR2A*, επάγει την καταιγίδα κυτταροκινών, καταλήγοντας σε βαριά πνευμονία.<sup>37</sup> Μεταξύ άλλων, ερευνώνται μεταλλάξεις των γονιδίων *IFITM3* και *TMEM189 – UBE2VI*, οι οποίες πιθανώς να οδηγούν σε ανεπιθύμητη έκβαση της ασθένειας.<sup>36</sup>



Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η συσχέτιση των ομάδων αίματος ABO με τη σοβαρότητα της νόσου. Αποτελέσματα ερευνών αποδεικνύουν το χαμηλότερο κίνδυνο θνησιμότητας και τις λιγότερες πιθανότητες μόλυνσης ατόμων ομάδας αίματος O, σε αντίθεση με τους ασθενείς ομάδας αίματος A, που διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο μόλυνσης. Τα ευρήματα αυτά, βασίζονται τόσο στην ύπαρξη του σακχάρου N-ακετυλο-γαλακτοζαμίνη στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων ομάδας A, με αποτέλεσμα τη πρόσδεση του SARS-CoV-2 μέσω ειδικών πρωτεϊνών που φέρει, όσο και στην ιδιότητα των αντισωμάτων αντι-A να παρεμβαίνουν στη σύνδεση ανάμεσα στην ιική πρωτεΐνη S και στον υποδοχέα ACE-2.<sup>39,40</sup> Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι αντισώματα αντι-A ομάδας αίματος O (IgG) διασφαλίζουν μεγαλύτερο βαθμού προστασία, σε σχέση με αντισώματα ομάδας αίματος B (IgM). Τέλος, έχουν εντοπιστεί 4 πολυμορφισμοί του γονιδίου *ABH* (*rs495828*, *rs8176740*, *rs8176746*, *rs12683493*) σε άτομα ομάδας αίματος διαφορετικής της O, οι οποίοι ρυθμίζουν την αυξημένη δραστηριότητα του υποδοχέα ACE-2.<sup>39</sup> Αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα παραπάνω δεδομένα αφορούν Rh+ τύπους αίματος, ενώ η συσχέτιση βαρύτητας νόσου – ομάδας AB, χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.<sup>40</sup>

Μελέτες σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς έχουν καταδείξει μειωμένα επίπεδα IFN στην κυκλοφορία, γεγονός που επηρεάζει την παθογένεια της νόσου COVID-19. Έχουν αναγνωρισθεί μηχανισμοί, τους οποίους χρησιμοποιεί ο SARS-CoV-2, προς αποφυγή της πρώιμης ανοσολογικής απόκρισης και έκκρισης IFN, με απώτερο σκοπό την αύξηση της επιβίωσης και του πολλαπλασιασμού του. Αρχικά, μη δομικές ιικές πρωτεΐνες, όπως *nsp14* και *nsp16*, προκαλούν την τροποποίηση του ιικού RNA, με αποτέλεσμα ο ιός να καθίσταται μη αναγνωρίσιμος από υποδοχείς PRRs, που ανιχνεύουν στοιχεία παθογόνων και οδηγούν σε παραγωγή IFN, αλλά και από πρωτεΐνες IFIT1, οι οποίες επάγονται από IFN, αναστέλλουν την ιική αντιγραφή και εμποδίζουν τη μετάφραση. Επιπλέον, η πρωτεΐνη *nsp16* συμπλοκοποιείται με την *nsp10* και μεθυλιώνει το 5' άκρο του ιικού mRNA, με στόχο τη μίμηση του mRNA του ξενιστή, ενώ παράλληλα, οι δομικές πρωτεΐνες N και M συνδέονται και καταστέλλουν τη δράση του RIG-1, ο οποίος συγκαταλέγεται στους PRR υποδοχείς.<sup>41</sup>

Επιπρόσθετοι παράγοντες που συμμετέχουν στην αναστολή απόκρισης IFN, αποτελούν οι πρωτεΐνες *nsp8* και *nsp9*, οι οποίες εμποδίζουν τη μεταβίβαση μεμβρανικών πρωτεϊνών, μεταξύ αυτών και IFN, σε μολυσμένα κύτταρα. Πληθώρα πρωτεϊνών του ιού (*nsp1*, *nsp3*, *nsp5*, *nsp6*, *nsp9*, *nsp13*, *nsp14*, *nsp15*, N, M, *orf3b*, *orf6*, *orf9b*) έχουν τη δυνατότητα να αποτρέψουν την έκκριση IFN, μέσω παρέμβασης σε οδούς σηματοδότησης, όπως RLR-MAVS, TRAF3, TBK1, IRF3.

Έτσι, ο SARS-CoV-2 επιτυγχάνει την παρεμπόδιση της παραγωγής IFN, στα πρώιμα στάδια της ασθένειας, με αποτέλεσμα την καθυστερημένη ανοσοαπόκριση, που οδηγεί σε βαριά νόσηση COVID-19.<sup>42</sup> Τέλος, η IFN παρουσιάζει ραγδαία αύξηση κατά τα τελικά στάδια της νόσου, καθώς Th1 κύτταρα απελευθερώνουν μεγάλα ποσά IFN- $\gamma$ , η οποία προσελκύει μακροφάγα τύπου 1, προάγοντας την ιστική βλάβη, σε συνδυασμό με τα μολυσμένα κύτταρα, που εκκρίνουν υπέρμετρα IFN-I-III, εντείνοντας τις ανεπιθύμητες ή και θανατηφόρες επιπλοκές της COVID-19.<sup>42</sup>

Μελέτες καταδεικνύουν ότι ασθενείς με σοβαρή ή/και μακρά νόσο COVID-19 (long COVID-19), εμφάνισαν αυτοανοσία κατά τη διάρκεια της ασθένειας.<sup>41-42</sup> Εργαστηριακά ευρήματα προσδιορίζουν την παρουσία αυτοαντισωμάτων ANA, ANCA και APL σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς, γεγονός που επιβεβαιώνει το παραπάνω θεώρημα.<sup>42</sup> Έχει αποδειχθεί, ότι ο SARS-CoV-2 διαθέτει επιτόπους, που προσομοιάζουν ανθρώπινα πεπτίδια, με αποτέλεσμα να παρατηρείται αυτοάνοση αντίδραση, οφειλόμενη σε αντισώματα έναντι των αντίστοιχων ιικών αντιγόνων, κατάσταση γνωστή ως μοριακή μίμηση. Οι δομικές πρωτεΐνες του ιού S και E, φέρουν ομόλογες περιοχές με ανθρώπινες πρωτεΐνες, ενώ ταυτόχρονα μη δομικά πεπτίδια και αλληλουχίες *orf3a*, *orf7a*, *orf7b*, *orf8* και *orf9b* μιμούνται μοριακά τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ 60 και 90, ενεργοποιώντας την αυτοάνοση απόκριση.<sup>41,42</sup> Μοριακή μίμηση παρουσιάζουν περιοχές του ιού με τις πρωτεΐνες DAB1, AIFM και SURF1 του συμπλέγματος preBötzingger του εγκεφαλικού στελέχους, οδηγώντας σε αναπνευστική ανεπάρκεια, όπως επίσης και μια θέση διάσπασης των τμημάτων S1 και S2, της πρωτεΐνης S, η οποία εμφανίζει διασταυρούμενη αντίδραση με ένα πεπτίδιο της  $\alpha$  υπομονάδας της πρωτεΐνης ENaC- $\alpha$ , διαταράσσοντας την ομοιότητα των αεραγωγών. Γενικότερα, πληθώρα μελετών έχει υποδείξει την μοριακή μίμηση του SARS-CoV-2 με 33 διαφορετικά 8μερή και 9μερή ανθρώπινα πεπτίδια, 20 από τα οποία παρατηρούνται μόνο στο συγκεκριμένο στέλεχος κορονοϊού.<sup>42</sup>

### Εξελικτική Πορεία του SARS-CoV-2 κατά τη διάρκεια της πανδημίας

Οι πανδημίες ιικής προέλευσης συχνά χαρακτηρίζονται από την εμφάνιση πολυάριθμων παραλλαγών του αρχικού ιικού στελέχους, οι οποίες προκύπτουν από την παρουσία πολλαπλών συγχρόνως μεταλλάξεων του γενετικού τους υλικού. Το φαινόμενο αυτό συναντάται κυρίως σε RNA ιούς, όπως στον SARS-CoV-2.<sup>43</sup> Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), οι έως τώρα αναγνωρίσιμες παραλλαγές του SARS-CoV-2 ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες,



στις παραλλαγές ενδιαφέροντος (VOI), στις παραλλαγές ανησυχίας (VOC) και στις παραλλαγές υπό διερεύνηση (VUM). Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι παραλλαγές Λάμδα και Μι, στη δεύτερη οι παραλλαγές Άλφα, Βήτα, Γάμα, Δέλτα και Όμικρον, ενώ στη τρίτη συμπεριλαμβάνονται οι παραλλαγές Έψιλον, Ήτα, Γιώτα και Κάπα.<sup>43,44</sup> Γενικότερα, ο αυξημένος ρυθμός αντιγραφής του ιού συμβάλλει στη δημιουργία νέων ιικών στελεχών, λόγω ενσωμάτωσης πολλαπλών μεταλλάξεων στην πρωτεΐνη ακίδα. Έτσι, μεγιστοποιείται η αποτελεσματικότητα της μετάδοσης, ο τροπισμός των κυττάρων, η παθογένεια της νόσου και η διαφυγή του ιού από τη χυμική ανοσιακή απόκριση.<sup>43</sup>

Ο χαρακτηρισμός VOC οφείλεται στην αποδεδειγμένη αυξημένη μεταδοτικότητα, στην έντονη ανοσοδιαφυγή και στην πρόκληση βαρύτερης συμπτωματολογίας των πέντε στελεχών, συγκριτικά με τον «άγριο τύπο», SARS-CoV-2, που εντοπίστηκε στη Γουάιν της Κίνας στις αρχές του 2020.<sup>44</sup> Στα συγκεκριμένα στελέχη, οι μεταλλάξεις εντοπίζονται κυρίως στην πρωτεΐνη S και πιο συγκεκριμένα στην περιοχή δέσμευσης υποδοχέα (RBD), που εδράζεται στην υπομονάδα S1 της πρωτεΐνης.<sup>44,45</sup> Το τμήμα RBD αναγνωρίζει και δεσμεύει σάκχαρα και πρωτεΐνες, μια εκ των οποίων αποτελεί ο πρωτεϊνικός υποδοχέας ACE2, με αποτέλεσμα να δραματίζει εξέχοντα ρόλο στην ιική μετάδοση.<sup>45</sup> Μεταλλάξεις στο τμήμα αυτό, οδηγούν σε αυξημένη μολυσματικότητα, καθώς επίσης και σε ισχυρή ανοσοδιαφυγή, δεδομένου ότι το 40% των εξουδετερωτικών αντισωμάτων κατά του SARS-CoV-2, στοχεύουν την περιοχή RBD.<sup>44</sup> Η μονάδα RBD αποτελείται από μια C-τερματική περιοχή σύνδεσης υποδοχέα (CTD) και μια N-τερματική περιοχή (NTD), με την τελευταία να απασχολεί ιδιαίτερα τις μελέτες, καθώς μεταλλάξεις σε αυτή σχετίζονται με ιική ανοσοδιαφυγή, γεγονός που χρήζει περαιτέρω διερεύνηση.<sup>44,45</sup>

Ως η πιο διαδεδομένη μετάλλαξη της πρωτεΐνης S προσδιορίζεται η D614G, που οφείλεται σε αντικατάσταση του αμινοξέως Asp614 από Gly και έχει εντοπιστεί σε πάνω από το 99% των περιπτώσεων COVID-19 λοίμωξης, έως το 2022.<sup>43-45</sup> Η μετάλλαξη αυτή δεν εμφανίζεται σταθερά σε κάποια περιοχή, αλλά επιδρά σε πολλαπλά σημεία της πρωτεΐνης ακίδας, αυξάνοντας την έκφρασή της και μεταβάλλοντας τη διαμόρφωση της RBD περιοχής.<sup>44</sup> Κατ' αυτόν τον τρόπο, μεγιστοποιείται η μολυσματικότητα, η προσβολή πολλών και διαφορετικών τύπων κυττάρων οργάνων (π.χ. πνεύμονα, ήπατος, παχέος εντέρου) και η ανθεκτικότητα σε πρωτεολυτική διάσπαση.<sup>45</sup> Η D614G προσδίδει 4-9 φορές μεγαλύτερη μολυσματικότητα στα ιικά στελέχη που τη φέρουν, αλλά δεν έχει βρεθεί συσχέτιση της με διαφυγή του ιού από την ανοσιακή απόκριση.<sup>44,45</sup>

Μια ακόμη συνήθης μετάλλαξη αποτελεί η P681, που παρατηρείται στα αμινοξέα 680-689 της S1 περιο-

χής, τα οποία ευθύνονται για τη διάσπαση της φουρίνης, κατά την παραγωγή νέων ιικών σωματιδίων. Έτσι, παρατηρείται αυξημένη διάσπαση φουρίνης και κατ' επέκταση έντονη μολυσματικότητα. Άλλες μεταλλάξεις που έχουν εντοπιστεί στην υπομονάδα S1 είναι οι H49Y, Q239K, N439K, L452R, T478I, E484D, G476S και 1570D. Όσον αφορά τις μεταλλάξεις στην S2 υπομονάδα, εντοπίζονται σε πολύ μικρότερο βαθμό σε σχέση με αυτές της S1. Παραδείγματα αυτών αποτελούν οι μεταλλάξεις T716I, D950N, S982A και D1118H.<sup>44</sup>

Περνώντας στις παραλλαγές VOC, η Άλφα αποτελεί το πρωτοεμφανιζόμενο στέλεχος παραλλαγής, που εντοπίστηκε στο Ηνωμένο Βασίλειο το Σεπτέμβριο του 2020. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία 9 μεταλλάξεων στην πρωτεΐνη S (69-70del, 144del, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H), που αυξάνουν την ιική μεταδοτικότητα, τον κίνδυνο νοσηλείας και το ποσοστό θνησιμότητας. Πιο συγκεκριμένα, οι μεταλλάξεις στις θέσεις Q493N και Q498Y προσδίδουν αυξημένη δέσμευση στον SARS-CoV-2 με τον υποδοχέα ACE2. Οι μεταλλάξεις H69del και V70del στην NTD περιοχή ευθύνονται για τη μειωμένη αποτελεσματικότητα της διαφυγής του ιού από την ανοσολογική απόκριση των εξουδετερωτικών αντισωμάτων, σε αντίθεση με την μετάλλαξη P681H, που προκαλεί αντίσταση στην IFNβ.<sup>43,46</sup>

Στην παραλλαγή Βήτα, που πρωτοεμφανίστηκε στη Νότια Αφρική το Σεπτέμβριο του 2020, έχουν αναγνωριστεί αντίστοιχα 9 μεταλλάξεις στην S πρωτεΐνη (L18F, D80A, D215G, 241-243del, K417N, E484K, N501Y, D614G, A701V). Μεταξύ αυτών, οι μεταλλάξεις στον τομέα RBD (K417N, E484K, N501Y) οδηγούν στη διαφυγή από την ανοσολογική απόκριση και ενισχύουν έως και 19 φορές τη συγγένεια με τον υποδοχέα ACE2.<sup>43,46</sup>

Η παραλλαγή Γάμα ανιχνεύτηκε στην Βραζιλία και την Ιαπωνία (σε ταξιδιώτες από την Βραζιλία) το Νοέμβριο του 2020 και διαθέτει 12 μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη ακίδα (L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417N/T, E484K, N501Y, D614G, H655Y, T1027I, V1176F), μερικές εκ των οποίων παρατηρούνται και στην προηγούμενη παραλλαγή. Ο συγκεκριμένος τύπος έχει συσχετιστεί με σημαντικές επιπτώσεις στο ρυθμό μεταδοτικότητας και επαναλοίμωξης, καθώς επίσης παρουσιάζει αντίσταση σε θεραπείες μονοκλωνικών αντισωμάτων.<sup>43,46</sup>

Η παραλλαγή Δέλτα, που διαγνώστηκε στην Ινδία τον Οκτώβριο του 2020 και επεκτάθηκε παγκοσμίως έως τον Ιούνιο του 2021, διαθέτει 11 μεταλλάξεις στην S πρωτεΐνη (T19R, T95I, G142D, 156del, 157del, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N). Ωστόσο, δεν περιλαμβάνει μεταλλάξεις στις θέσεις 501 και 484 της περιοχής RBD, που σχετίζονται με διαφυγή του ιού από τη



δράση εξουδετερωτικών αντισωμάτων. Πιστεύεται ότι οι L452R και T478K ευθύνονται εν μέρει για την μειωμένη αποτελεσματικότητα των εμβολίων έναντι των στελεχών SARS-CoV-2 παραλλαγής Δέλτα, ενώ η P681R εντείνει τη διάσπαση της S1 σε S2, με αποτέλεσμα τη μέγιστη μολυσματικότητα των ιικών σωματιδίων.<sup>43,46,47</sup>

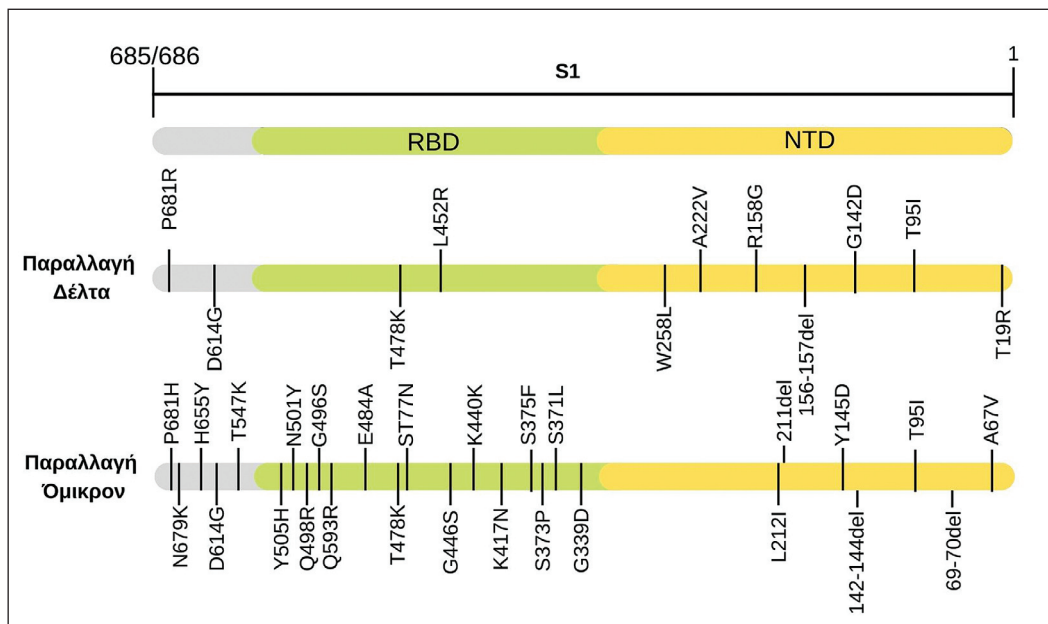
Τέλος, η παραλλαγή Όμικρον εντοπίστηκε αρχικά στη Μποτσουάνα της Αφρικής το Νοέμβριο του 2021 και έκτοτε αποτελεί το κυρίαρχο στέλεχος διεθνώς.<sup>43</sup> Περιλαμβάνει πάνω από 30 μεταλλάξεις, μεταξύ αυτών 28 υποκαταστάσεις, 1 εισαγωγή και 3 διαγραφές αμινοξέων.<sup>43,46,48</sup> Η παραλλαγή φαίνεται να προέκυψε από την εξέλιξη του ιού σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα, διαθέτοντας κοινές μεταλλάξεις με προηγούμενα στελέχη και κατορθώνοντας να κατακτήσει πλεονεκτική ικανότητα μετάδοσης και ανοσοδιαφυγής.<sup>43,45,47</sup> Ειδικότερα, η μετάλλαξη N501Y, που ανευρίσκεται και στα στελέχη Άλφα, Βήτα και Γάμα, οδηγεί σε βελτιωμένη σύνδεση του τομέα RBD με τον υποδοχέα ACE2, ενώ παράλληλα οι μεταλλάξεις K417N και E484A, που εντοπίζονται στις παραλλαγές Βήτα και Γάμα, προσδίδουν στον ιό ικανότητα διαφυγής από την ανοσιακή απάντηση.<sup>43,46</sup> Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η ταυτόχρονη τριπλή μετάλλαξη «K417N – E484A – N501Y» προκαλεί δομικές μεταβολές στην πρωτεΐνη S, πολύ μεγαλύτερες από αυτές που δημιουργούν οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις μεμονωμένα, με αποτέλεσμα η παρουσία και των τριών μεταλλάξεων να ενισχύει σε μέγιστο βαθμό την ανοσοδιαφυγή και την μεταδοτικότητα του ιού.<sup>46</sup>

Πέραν των μεταλλάξεων στην S πρωτεΐνη της παραλλαγής Όμικρον, έχουν αποσαφηνιστεί μεταλλάξεις στην περιοχή ORF1ab και στις πρωτεΐνες M, E, N και nsps του SARS-CoV-2. Οι μεταλλάξεις P323L και Δ105-107 στις πρωτεΐνες nsr12 και nsr6 αντίστοιχα, δρουν αρνητικά προς την επιβίωση του ιικού στελέχους, καθώς η πρώτη μειώνει την ακρίβεια της αντιγραφής και της μεταγραφής, ενώ η δεύτερη επηρεάζει αρνητικά την αποτελεσματικότητα της απόκρισης της έμφυτης ανοσίας και των T λεμφοκυττάρων.<sup>46</sup>

Παρόλο που η παραλλαγή Όμικρον έχει συσχετιστεί με υψηλότερο ποσοστό μεταδοτικότητας, μέγιστο κίνδυνο επαναμόλυνσης και εντονότερη ικανότητα ανοσοδιαφυγής, συγκριτικά με τα πρότερα στελέχη, χαρακτηρίζεται από μειωμένη μολυσματικότητα των πνευμόνων, η οποία συνάδει με ηπιότερη συμπτωματολογία.<sup>43,47</sup> Αποτελέσματα ερευνών καταδεικνύουν χαμηλότερο ρυθμό αντιγραφής του SARS-CoV-2 παραλλαγής Όμικρον, στα πνευμονικά κύτταρα, γεγονός που δικαιολογεί τον περιορισμό του ιού στο ανώτερο αναπνευστικό, σε αντίθεση με τις παλαιότερες παραλλαγές, οι οποίες επεκτείνονταν και δημιουργούσαν βλάβες στο κατώτερο.<sup>43</sup> Φαίνεται λοιπόν, ότι ο ιός προσπαθεί να επιβιώσει και μέσω αλλαγών του γενετικού του υλικού τροποποιεί την παθογονικότητά του και περιορίζει τη δράση του στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα.<sup>47</sup>

#### Δήλωση Σύγκρουσης Συμφερόντων

Όλοι οι συγγραφείς δηλώνουν υπεύθυνα ότι δεν υπάρχει σύγκρουση συμφερόντων.



Εικόνα 5 Μεταλλάξεις S1 πρωτεΐνης σε παραλλαγές Δέλτα – Όμικρον.



## Summary

### Pathophysiology of severe COVID-19 infection: predisposing factors and evolution

Ioannis Chonianakis\*<sup>1</sup>, Eleuthera Giachanou<sup>1</sup>, Maria Anna Kyriazidi<sup>2</sup>, Sotiris Varlamis<sup>1</sup>, Asimoula Kavvada<sup>2</sup>, Christos Tenis<sup>1</sup>, Maria Chatzidimitriou<sup>1</sup>

<sup>1</sup>International Hellenic University

<sup>2</sup>Aristotle University of Thessaloniki

\*Corresponding author

An extremely contagious virus SARS-CoV-2 emerged two years ago causing COVID-19 infection and resulting to the current pandemic, the most challenging public health crisis we have ever faced. The virus is transmitted through the respiratory tract, mostly by inhalation of aerosols, and although its virulence was initially focused mainly on the lower respiratory system, now through evolutionary mechanisms and mutations of the viral genome, it has been confined to the upper respiratory system. The COVID-19 disease presents a very wide spectrum of severity, ranging from subclinical infection (asymptomatic), mild symptoms, to critical cases, not rarely fatal. The severity of the disease depends on the immune response of the host. In critical cases, hyperinflammation and hyperreaction processes of the innate and adaptive immune systems are observed, ultimately resulting in Cytokine Storm Syndrome and cases of hypercoagulation. Severely ill patients may develop acute lymphopenia, eosinopenia and neutrophilia, and/or rapidly increased levels of D-dimers. Characteristic complications of the disease are pneumonia and Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS), which represent severe and life-threatening conditions. This review will explain the precise mechanisms concerning the pathophysiology of the severe COVID-19 infection. Firstly, we will analyze the excessive immune response and the extensive inflammation that follows during the emergent condition known as Cytokine Storm Syndrome. Furthermore, we will research complications related to hypercoagulation and thrombus formation, with particular reference to the development of pulmonary embolism and the aggressive activation of the complement system. In addition, references will be made to predisposing factors, such as genetic mutations and blood groups, which have been associated with the aggravated symptomatology of the infection, as well as to mechanisms of inhibition of the immune response disposed to SARS-CoV-2, data that need further clarification. Finally, the evolutionary course of the virus from the beginning of the pandemic until today will be explained by grouping the strains of variants of concern (VOC) and mentioning the differences between them, both at the genetic level and the properties that each emerging mutation provides.



#### Key words

COVID-19, SARS-CoV-2, ARDS, Cytokine Storm, hypercoagulation, mutations



## Βιβλιογραφία

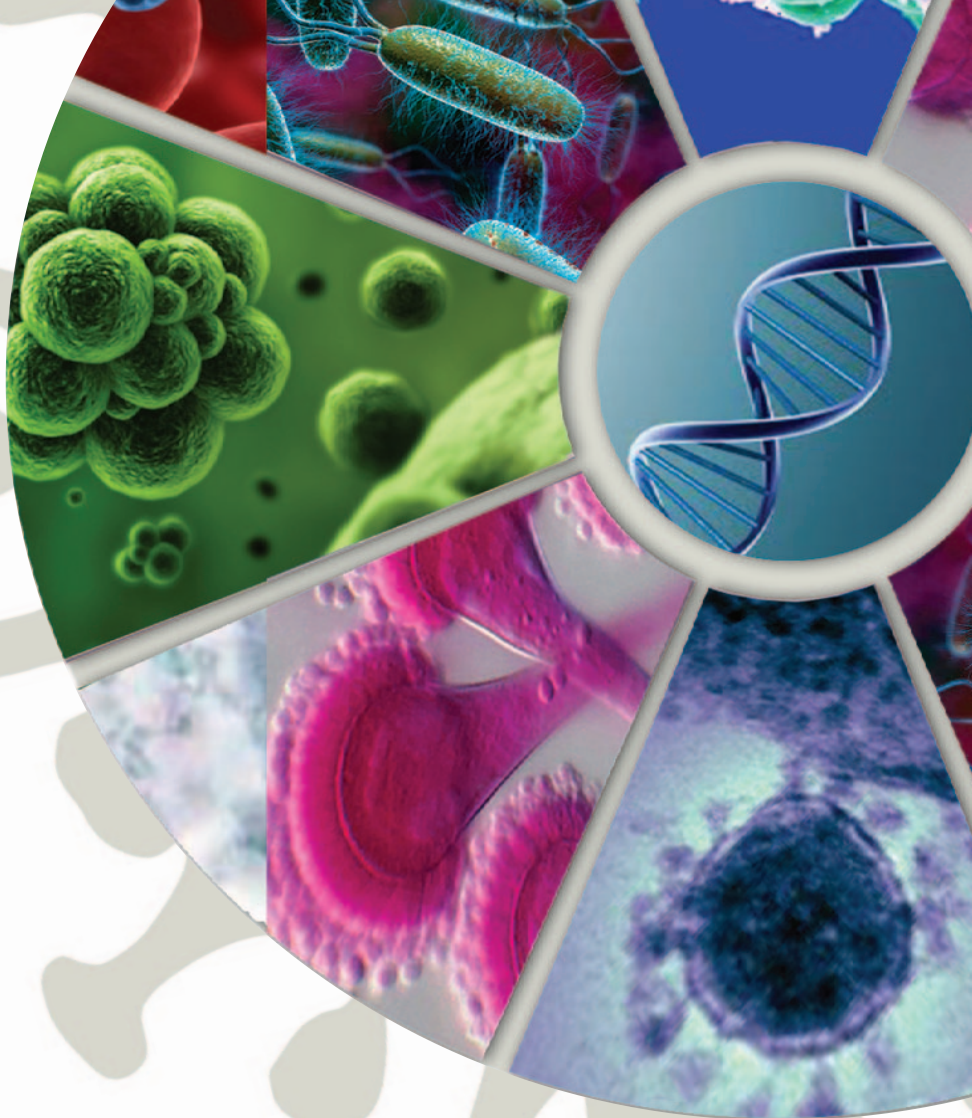
- Tufan A, Avanoğlu Güler A, Matucci-Cerinic M. COVID-19, immune system response, hyperinflammation and repurposing antirheumatic drugs. *Turk J Med Sci* 2020; 50(SI-1):620-632.
- Bordallo B, Bellas M, Cortez AF, Vieira M, Pinheiro M. Severe COVID-19: what have we learned with the immunopathogenesis? *Adv Rheumatol* 2020; 60:50.
- V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* 2021; 19:155–170.
- Kaur S, Bansal R, Kollimuttathuillam S, Gowda AM, Singh B, Mehta D, et al. The looming storm: Blood and cytokines in COVID-19. *Blood Rev* 2021; 46:100743.
- Kim D, Lee JY, Yang JS, Kim JW, Kim VN, Chang H. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell* 2020; 181:914-921.e10.
- Malone B, Urakova N, Snijder EJ, Campbell EA. Structures and functions of coronavirus replication–transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2022; 23:21–39.
- Azkar AK, Akdis M, Azkar D, Sokolowska M, van de Veen W, Brügggen MC, et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy* 2020; 75:1564-1581.
- Perico L, Benigni A, Casiraghi F, Ng LFP, Renia L, Remuzzi G. Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19. *Nat Rev Nephrol* 2021; 17:46-64.
- Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the “Cytokine Storm” in COVID-19. *J Infect* 2020; 80:607-613.
- Savla SR, Prabhavalkar KS, Bhatt LK. Cytokine storm associated coagulation complications in COVID-19 patients: Pathogenesis and Management. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2021; 19:1397-1413.
- Yang L, Xie X, Tu Z, Fu J, Xu D, Zhou Y. The signal pathways and treatment of cytokine storm in COVID-19 [published correction appears in *Signal Transduct Target Ther* 2021; 6:326]. *Signal Transduct Target Ther* 2021; 6:255.
- Connors JM, Levy JH. COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. *Blood* 2020; 135:2033-2040.
- Ulanowska M, Olas B. Modulation of Hemostasis in COVID-19; Blood Platelets May Be Important Pieces in the COVID-19 Puzzle. *Pathogens* 2021; 10:370.
- Rahi MS, Jindal V, Reyes SP, Gunasekaran K, Gupta R, Jaiyesimi I. Hematologic disorders associated with COVID-19: a review. *Ann Hematol* 2021; 100:309-320.
- Habib HM, Ibrahim S, Zaim A, Ibrahim WH. The role of iron in the pathogenesis of COVID-19 and possible treatment with lactoferrin and other iron chelators. *Biomed Pharmacother* 2021; 136:111228.
- Levi M, Thachil J, Iba T, Levy JH. Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19. *Lancet Haematol* 2020; 7:e438-e440.
- Boechat JL, Chora I, Morais A, Delgado L. The immune response to SARS-CoV-2 and COVID-19 immunopathology - Current perspectives. *Pulmonology* 2021; 27:423-437.
- Yatim N, Boussier J, Chocron R, Hadjadj J, Philippe A, Gendron N, et al. Platelet activation in critically ill COVID-19 patients. *Ann Intensive Care* 2021; 11:113.
- Fard MB, Fard SB, Ramazi S, Atashi A, Eslamifard Z. Thrombosis in COVID-19 infection: Role of platelet activation-mediated immunity. *Thrombosis J* 2021;19:59.
- Hanff TC, Mohareb AM, Giri J, Cohen JB, Chirinos JA. Thrombosis in COVID-19. *Am J Hematol* 2020; 95:1578-1589.
- Aggarwal M, Dass J, Mahapatra M. Hemostatic Abnormalities in COVID-19: An Update. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2020; 36:1-11.
- Afzali B, Noris M, Lambrecht BN, Kemper C. The state of complement in COVID-19. *Nat Rev Immunol* 2022; 22:77-84.
- Java A, Apicelli AJ, Liszewski MK, Coler-Reilly A, Atkinson JP, Kim AH, et al. The complement system in COVID-19: friend and foe?. *JCI Insight* 2020; 5:e140711.
- Risitano AM, Mastellos DC, Huber-Lang M, Yancopoulos D, Garlanda C, Ciceri F, et al. Complement as a target in COVID-19? [published correction appears in *Nat Rev Immunol* 2020; 20:448]. *Nat Rev Immunol* 2020; 20:343-344.
- Skendros P, Mitsios A, Chrysanthopoulou A, Mastellos DC, Metallidis S, Rafailidis P, et al. Complement and tissue factor-enriched neutrophil extracellular traps are key drivers in COVID-19 immunothrombosis. *J Clin Invest* 2020; 130:6151-6157.
- Mastellos DC, Pires da Silva BGP, Fonseca BAL, Fonseca NP, Auxiliadora-Martins M, Mastaglio S, et al. Complement C3 vs C5 inhibition in severe COVID-19: Early clinical findings reveal differential biological efficacy. *Clin Immunol* 2020; 220:108598.
- Lam LKM, Reilly JP, Rux AH, Murphy SJ, Kuri-Cervantes L, Weisman AR, et al. Erythrocytes identify complement activation in patients with COVID-19. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2021; 321:L485-L489.
- Anka AU, Tahir MI, Abubakar SD, Alsabbagh M,

- Zian Z, Hamedifar H, *et al.* Coronavirus disease 2019 (COVID-19): An overview of the immunopathology, serological diagnosis and management. *Scand J Immunol* 2021; 93:e12998.
29. Paces J, Strizova Z, Smrz D, Cerny J. COVID-19 and the immune system. *Physiol Res* 2020; 69:379-388.
  30. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Elalamy I, Kastritis E, Sergentanis TN, Politou M, *et al.* Hematological findings and complications of COVID-19. *Am J Hematol* 2020; 95:834-847.
  31. Li L, Chen C. Contribution of acute-phase reaction proteins to the diagnosis and treatment of 2019 novel coronavirus disease (COVID-19). *Epidemiol Infect* 2020; 148:e164.
  32. Bivona G, Agnello L, Ciaccio M. Biomarkers for Prognosis and Treatment Response in COVID-19 Patients. *Ann Lab Med* 2021; 41:540-548.
  33. Henry BM, Aggarwal G, Wong J, Benoit S, Vikse J, Plebani M, *et al.* Lactate dehydrogenase levels predict coronavirus disease 2019 (COVID-19) severity and mortality: A pooled analysis. *Am J Emerg Med* 2020; 38:1722-1726.
  34. Bartziokas K, Kostikas K. Lactate dehydrogenase, COVID-19 and mortality. Lactato deshidrogenasa, COVID-19 y mortalidad. *Med Clin (Barc)* 2021; 156:37.
  35. Anastassopoulou C, Gkizarioti Z, Patrinos GP, Tsakris A. Human genetic factors associated with susceptibility to SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease severity. *Hum Genomics* 2020; 14:40.
  36. Fricke-Galindo I, Falfán-Valencia R. Genetics Insight for COVID-19 Susceptibility and Severity: A Review. *Front Immunol* 2021; 12:622176.
  37. Novelli G, Biancolella M. COVID-19 and Molecular Genetics. *Genes (Basel)* 2022; 13:676.
  38. Shibebe S, Khan A. ABO blood group association and COVID-19. COVID-19 susceptibility and severity: a review. *Hematol Transfus Cell Ther* 2022; 44:70-75.
  39. Zaidi FZ, Zaidi ARZ, Abdullah SM, Zaidi SZA. COVID-19 and the ABO blood group connection. *Transfus Apher Sci* 2020; 59:102838.
  40. Gusev E, Sarapultsev A, Solomatina L, Chereshnev V. SARS-CoV-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19. *Int J Mol Sci* 2022; 23:1716.
  41. Liu Y, Sawalha AH, Lu Q. COVID-19 and autoimmune diseases. *Curr Opin Rheumatol* 2021; 33:155-162.
  42. Flores-Vega VR, Monroy-Molina JV, Jiménez-Hernández LE, Torres AG, Santos-Preciado JI, Rosales-Reyes R. SARS-CoV-2: Evolution and Emergence of New Viral Variants. *Viruses* 2022; 14:653.
  43. Magazine N, Zhang T, Wu Y, McGee MC, Veggiani G, Huang W. Mutations and Evolution of the SARS-CoV-2 Spike Protein. *Viruses* 2022; 14:640.
  44. Cosar B, Karagulleoglu ZY, Unal S, Ince AT, Uncuoglu DB, Tuncer G, *et al.* SARS-CoV-2 Mutations and their Viral Variants. *Cytokine Growth Factor Rev* 2022; 63:10-22.
  45. Tian D, Sun Y, Xu H, Ye Q. The emergence and epidemic characteristics of the highly mutated SARS-CoV-2 Omicron variant. *J Med Virol* 2022; 94:2376-2383.
  46. Papanikolaou V, Chrysovergis A, Ragos V, Tsiambas E, Katsinis S, Manoli A, *et al.* From delta to Omicron: S1-RBD/S2 mutation/deletion equilibrium in SARS-CoV-2 defined variants. *Gene* 2022; 814:146134.
  47. Zhang L, Li Q, Liang Z, Li T, Liu S, Cui Q, *et al.* The significant immune escape of pseudotyped SARS-CoV-2 variant Omicron. *Emerg Microbes Infect* 2022; 11:1-5.





ΕΛΛΗΝΙΚΗ  
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ  
ΕΤΑΙΡΕΙΑ  
ΕΤΟΣ ΙΔΡΥΣΗΣ 1932



# 11<sup>ο</sup>

ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ  
ΣΥΝΕΔΡΙΟ

ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

2-4 Μαρτίου 2023 (Υβριδικό)

**Crowne Plaza Athens Centre Hotel**

ΧΟΡΗΓΟΥΝΤΑΙ ΜΟΡΙΑ ΣΥΝΕΧΙΖΟΜΕΝΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ (C.M.E. CREDITS)



Congresses - Publications - Digital Constructions

Μιχαλακοπούλου 29, Αθήνα • Τ. 210 7213225 • Ε: sioran@ascentltd.gr • www.ascentltd.gr

## Vaborbactam: perspective of a new $\beta$ -lactamase inhibitor in the anti-microbial chemotherapy

Eirini Amargianitaki<sup>1</sup>, Vasiliki Koumaki<sup>1</sup>, Athanassios Tsakris<sup>1</sup>, Joseph Papaparaskevas<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Department of Microbiology, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens



### Summary

Infections due to carbapenem-resistant *Enterobacterales*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* constitute a global public health threat and are associated with high morbidity and mortality rates. Resistance is mainly due to the production of various types of carbapenemases. Vaborbactam is a novel boronic acid-based  $\beta$ -lactamase inhibitor with high potency against class A carbapenemases, including KPC variants. Combined with meropenem, it almost fully restores its activity against KPC carbapenemase-producing *Enterobacterales*. However, it has limited activity against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. Clinical efficacy and safety of the combination were evaluated in two clinical trials, TANGO I and II: it was proved to be non-inferior compared to other therapeutic

options. It was also found safe, having few serious adverse effects, especially in terms of nephrotoxicity. Based on available *in vitro* and *in vivo* data it appears to retain a low propensity for resistance selection. Vaborbactam exhibits pharmacokinetic properties similar to those of meropenem. Meropenem-vaborbactam has been approved for use in adults with complicated urinary tract and intrabdominal infections, hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia, as well as infections due to aerobic Gram-negative organisms in adults with limited treatment options. Studies regarding its use in real-life settings show promising clinical cure rates and lower rates of adverse effects, even when it comes to cases of very fragile patients.



### Key words

carbapenem resistant organisms, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, vaborbactam, meropenem-vaborbactam

### Corresponding author

Eirini Amargianitaki,  
Department of Microbiology,  
Medical School,  
National and Kapodistrian University of Athens,  
75 M. Asias, 11527, Athens, Greece  
Tel: +306949333463  
e-mail: eirini\_amar@hotmail.gr

## Introduction

Carbapenem-resistant organisms constitute an urgent health threat as they have spread worldwide and cause infections with increased morbidity and mortality.<sup>1,2</sup> Notably, in 2017, the WHO deemed carbapenem-resistant *Enterobacteriales* (CRE), carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (CRPA), and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) as the three critical pathogens demanding new antimicrobial options.<sup>3</sup>

The main mechanism leading to carbapenem resistance in Gram-negative pathogens is the production of carbapenemases. Less often, it is due to the loss of outer membrane proteins and the presence of efflux pumps.<sup>4</sup> The most significant carbapenemases are *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs), class B or metallo- $\beta$ -lactamases (MBLs), and class D or OXA-type carbapenemases.<sup>5</sup> The development of new combinations based on a  $\beta$ -lactam molecule and a novel  $\beta$ -lactamase inhibitor active on carbapenemases is one of the promising strategies in the treatment of

infections due to carbapenem-resistant organisms.<sup>6</sup>

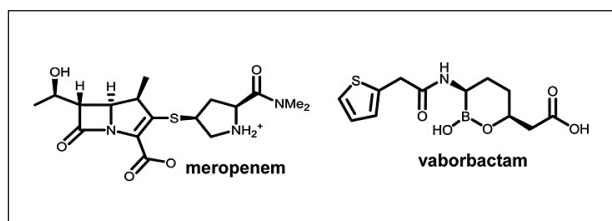
Recently meropenem-vaborbactam joined ceftazidime-avibactam in the group of  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor combinations available for the treatment of CRE infections.

## Mechanism of action

Vaborbactam is a novel cyclic boronic acid-based  $\beta$ -lactamase inhibitor. The boron atom of vaborbactam forms a covalent bond with the catalytic serine side chain of  $\beta$ -lactamases, mimicking  $\beta$ -lactam hydrolysis and inhibiting the activity of the enzymes. While the bond is reversible, the rate of dissociation of the complex varies depending on the enzyme. The most stable complex forms between vaborbactam and enzymes KPC-2 and KPC-3.<sup>7</sup> Using a series of *Escherichia coli* strains expressing different types of  $\beta$ -lactamases, vaborbactam was found to be a potent inhibitor of KPC carbapenemases and other class A carbapenemases, such as SME and NMC. However, it



did not appear to inactivate SHV and TEM  $\beta$ -lactamases, making meropenem the most proper option for a combination. It exhibited no activity against metallo- $\beta$ -lactamases (MBLs) and class D carbapenemases.<sup>8</sup> It is also inactive against mammalian serine proteases.<sup>9</sup> Vaborbactam uses porins OmpK35 and OmpK36 to cross the outer membrane in *Klebsiella pneumoniae*, but OmpK36 appears to play a more significant role.<sup>8</sup>



**Figure 1** Chemical structure of vaborbactam.<sup>8</sup>

## Spectrum of activity

Given its  $\beta$ -lactamase inhibition profile, vaborbactam restores the activity of meropenem against carbapenem-resistant *Enterobacterales* that produce KPC and other class A carbapenemases. As for carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*, the activity of meropenem-vaborbactam is similar to that of meropenem alone, since resistance is mostly mediated by different mechanisms.<sup>12-18</sup>

Regarding Gram-positive organisms, vaborbactam does not improve the activity of meropenem.<sup>10</sup> Against anaerobes, it does not potentiate the activity of biapenem, therefore it is not expected to potentiate the activity of meropenem either.<sup>11</sup>

## Epidemiological studies

The degree to which vaborbactam restores the activity of meropenem against carbapenem-resistant Gram-negative bacteria has been explored in various *in vitro* studies. In a 2016 study, 315 carbapenemase-producing *Enterobacterales* strains were examined. Most were *K. pneumoniae* producing KPC-2 or KPC-3. When combined with increasing doses of vaborbactam, up to 32  $\mu\text{g/ml}$ , the activity of meropenem at a concentration of 2  $\mu\text{g/ml}$  was restored against 98.1% of strains.<sup>12</sup> Earlier, 131 out of 133 KPC-producing *Enterobacterales* strains (98.5%) were inhibited in the presence of meropenem-vaborbactam at a concen-

tration of 1/8  $\mu\text{g/ml}$ .<sup>13</sup> Similarly, in other studies meropenem-vaborbactam was active against 99-100% of KPC-producing *Enterobacterales* strains.<sup>14,16</sup> In all studies involving *P. aeruginosa* and *A. baumannii* strains, as well as *Enterobacterales* strains that produced MBLs or OXA-48 carbapenemases, vaborbactam did not improve the activity of meropenem.<sup>13,14,16</sup> In the cases of KPC-producing *Enterobacterales* where vaborbactam failed to restore the activity of meropenem, defects of porins OmpK35, OmpK36 were detected.<sup>13,15</sup> In a study comparing the activity of meropenem-vaborbactam against CRE to other antibiotics, it was 99.2% effective against KPC-producers. Compared to other antibiotics, only tigecycline could produce similar results. A KPC-producing *Citrobacter freundii* strain was non-susceptible to meropenem-vaborbactam due to defects in OmpF and OmpC, the outer membrane proteins that are homologous to OmpK35 and OmpK36.<sup>17</sup>

## Experimental infections

In a neutropenic mouse thigh infection model using carbapenem-resistant *K. pneumoniae*, *E. coli*, or *Enterobacter cloacae* strains, the use of meropenem alone had the same results as leaving the mice untreated. The addition of various doses of vaborbactam increased bacterial killing in a dose-dependent manner. Similar results were obtained in a mouse lung infection model.<sup>18</sup>

As for neutropenic mouse thigh infections caused by *P. aeruginosa* or *A. baumannii*, the activity of meropenem-vaborbactam was found to be similar to that of meropenem alone, as meropenem resistance is largely mediated by mechanisms other than KPC production (e.g. outer membrane impermeability, up-regulation of efflux pumps, hyperproduction of class C  $\beta$ -lactamases, MBLs, class D carbapenemases).<sup>19</sup>

## Clinical studies

The clinical efficacy and safety of meropenem-vaborbactam were evaluated in two phase 3 clinical studies.<sup>20,21</sup>

The TANGO I (Targeting Antibiotic Non-Susceptible Gram-Negative Organisms) was a multicenter, double-blind, randomized, phase 3 study comparing the use of meropenem-vaborbactam (M/V, 2 g/2 g over a 3-hour intravenous infusion every 8 hours) to piperacillin-tazobactam (TZP, 4 g/0.5g over a 30-minute intravenous infusion every 8 hours) in adult patients with complicated urinary tract infections (cUTIs) including

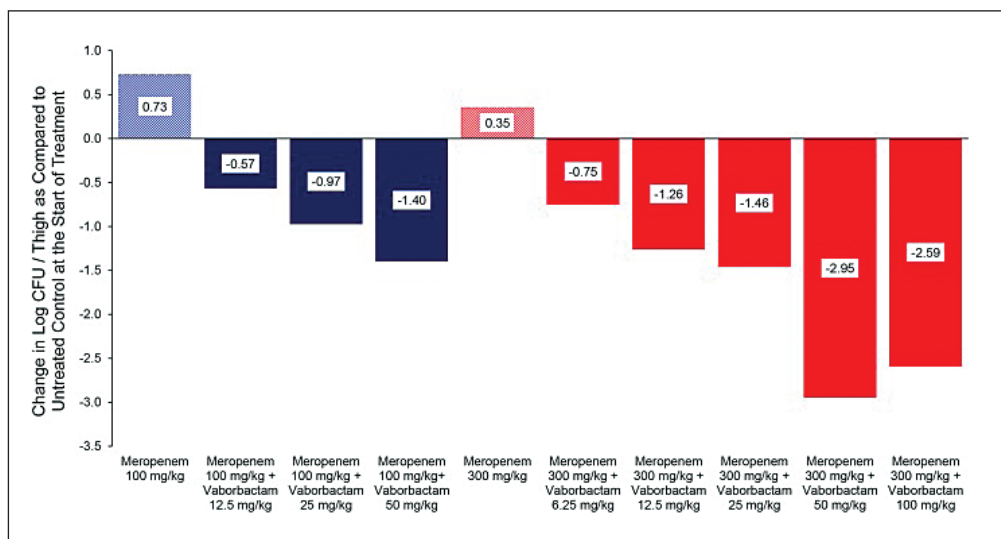


Figure 2 Activity in a neutropenic mouse thigh infection model.<sup>18</sup>

acute pyelonephritis. If patients met certain clinical criteria for oral stepdown therapy, after a minimum of 15 doses of study drug, they switched to levofloxacin 500 mg oral tablets once a day. Total treatment duration was 10 days. The primary endpoint for FDA was overall success, a combination of clinical cure and microbiological eradication at the end of intravenous treatment (EOIVT), whereas for EMA primary endpoint was microbiological eradication at test-of-cure visit (TOC, 7 days after the end of treatment). A total of 545 patients were randomized and received at least one dose of study drug, and 374 of them (microbiological modified intent to treat population – mMITT, 192 vs 182) had a positive urine culture (>100,000 cfu/ml) or had the same pathogen in both urine and blood cultures. Almost all pathogens were susceptible to meropenem. Overall success was achieved in a high proportion of patients in both groups (M/V 98.4% vs TZP 94%). Microbiological eradication at test-of-cure visit was achieved in 66.7% for M/V, and in 57.7% for TZP. The difference met the established non-inferiority margin. Among patients in both groups, the number experiencing any adverse effect was similar. Meropenem-vaborbactam appeared to be well-tolerated, with headache being the most common adverse effect (8.8%).<sup>20</sup>

TANGO II was a randomized, open-label phase 3 clinical in patients with cUTI, including acute pyelonephritis, hospital-acquired pneumonia or ventilator-associated pneumonia, bloodstream infection, or complicated intraabdominal infection, due to known or suspected CRE. Patients were randomized 2:1 to re-

ceive meropenem-vaborbactam (2 g/2g over 3-hour IV infusion, every 8 hours) or best available treatment (BAT). BAT included monotherapy or combination therapy of a carbapenem, aminoglycoside, colistin, tigecycline, or ceftazidime-avibactam (monotherapy only). Among the 75 patients who received the study drugs, 47 had a confirmed infection with a CRE isolate (mCRE-MITT population). The most common pathogen was KPC-producing *K. pneumoniae*. The primary endpoint was clinical cure, defined as complete resolution of signs and symptoms. Meropenem-vaborbactam was associated with higher rates of clinical cure both at the end of treatment (65.6% vs 33.3%) and at TOC (59.4% vs 26.7%). In the subgroup of patients with cUTI/AP overall success was higher for meropenem-vaborbactam (75% vs 50%). As for drug-related adverse effects, they occurred in a lower rate in the meropenem-vaborbactam group (24.4% vs 44%). The most common ones were diarrhea, anemia, hypokalemia. In the BAT group, they included sepsis/septic shock, diarrhea, anemia, hypotension, and acute renal failure. Not surprisingly, fewer renal-related adverse effects were noticed in the M/V group, considering that BAT regimens usually contained aminoglycosides and colistin.<sup>21</sup>

TANGOKIDS, an open label, dose-finding, pharmacokinetics, safety, and tolerability study of a single dose infusion of meropenem-vaborbactam in pediatric subjects from birth to less than 18 years of age with serious bacterial infections, is ongoing (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02687906).<sup>22</sup>

## Pharmacokinetic properties

According to data from preclinical studies and phase 1 studies, its pharmacokinetic properties are similar to those of  $\beta$ -lactams, that is high maximum serum concentration ( $C_{max}$ ) and area under the curve (AUC), short half-life time, and low volume of distribution. Exposure to vaborbactam, as defined by  $C_{max}$  and AUC, increased proportionately with dose, and no accumulation was observed following multiple doses in healthy adults. The average plasma protein binding was found to be 33%, and its clearance is mainly renal, with almost 90% of vaborbactam excreted unchanged in urine.<sup>23</sup> All pharmacokinetic properties were similar when meropenem and vaborbactam were given together, implying no drug-to-drug interactions, and the combination was well tolerated.<sup>24</sup>

The combination has also been studied in subjects with chronic renal impairment receiving a single dose of 1 g/1 g over a 3-hour intravenous infusion, in a phase 1, open-label study. The plasma clearance of both meropenem and vaborbactam decreased in a similar manner with decreasing renal function, increasing exposure to the drugs and indicating the need of dose adjustment in patients with renal impairment. Both meropenem and vaborbactam were removed by hemodialysis. The combination was well tolerated regardless of the degree of decrease in renal function.<sup>25</sup>

The penetration of vaborbactam in the epithelial lining fluid of healthy adults has also been evaluated. Both meropenem and vaborbactam achieved and maintained over time similar concentrations, with penetration of 63% and 53% respectively.<sup>26</sup>

## Pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation

Meropenem exhibits time-dependent activity, and the concentration of the drug needs to be maintained above the MIC value for a prolonged amount of time to achieve bactericidal activity (%f T>MIC of 40%).<sup>27</sup>

An *in vitro* study using a hollow-fiber model was conducted in order to estimate the exposure to meropenem-vaborbactam that would bring about bacterial killing and would prevent the development of resistance. A total of 17 *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae* strains that combined KPC production with other possible resistance mechanisms, such as porin loss or other  $\beta$ -lactamases, were studied using high inoculum and concentrations of meropenem-vaborbactam based on dose regimens of phase 1 and phase 3 trials. When the lowest dose was used, development of re-

sistance in a *K. pneumoniae* strain was observed (an MIC value of >32mg/l was developed while the initial value was 1 mg/l). However, when exposure was adjusted to resemble that of phase 3 trials, the free 24-h AUC value was ~550 mg x h/l, and bacterial killing was achieved, even against strains with a MIC value of 16 mg/l. Also, the combination suppressed any development of resistance.<sup>28</sup>

A second study using the same CRE strains evaluated the PK/PD parameter that would best describe the activity of meropenem-vaborbactam. Using the hollow-fiber model, authors concluded that it is best described by the free 24-h AUC/MIC ratio. A ratio value of 24 or more leads to both bactericidal activity and suppression of resistance development. The dose regimen of 2 g/2 g given over a 3-hour intravenous infusion, every 8 hours results in bacterial killing and suppression of resistance development against *Enterobacterales* strains with MIC values of up to 8 mg/l.<sup>29</sup>

## Resistance mechanisms

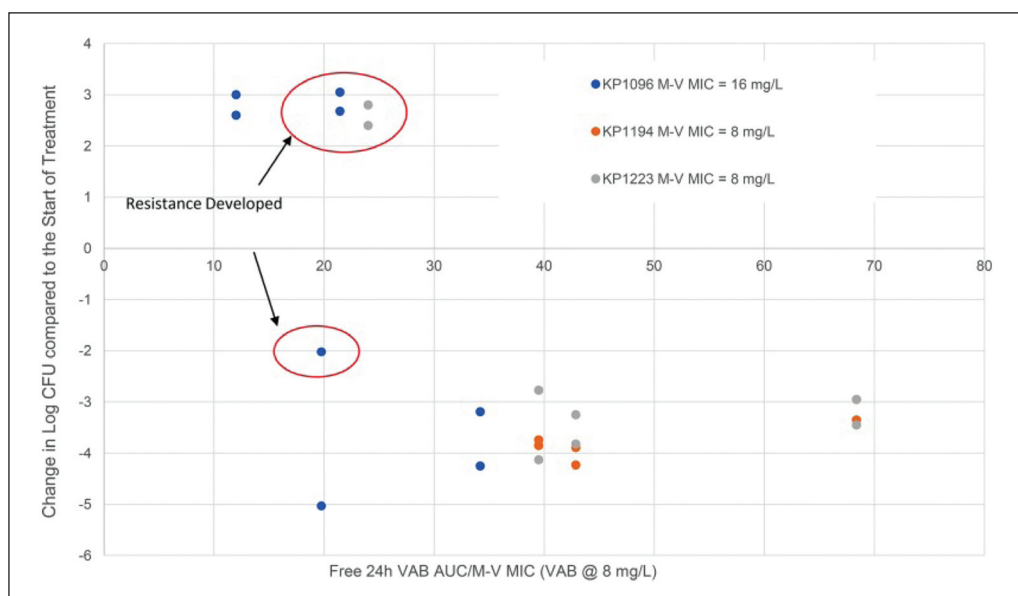
So far, resistance to meropenem-vaborbactam in KPC-producing *Enterobacterales* is associated with permeability disorders due to porin mutations, along with increased  $\beta$ -lactamase expression and increased efflux pump production.<sup>30</sup>

*In vitro* experiments highlight the effect of porins OmpK35, OmpK36 on the activity of vaborbactam. In particular, inactivation of OmpK35 reduces the activity of vaborbactam, but much less than inactivation of OmpK36. A variant of OmpK36 frequently found in clinical strains of *K. pneumoniae* carries a duplication of glycine (G) and aspartic acid (D) at positions 134 and 135 of the protein (GD repeat), and the porin in this case has a narrower inner channel. In the experiment, the strain carrying the GD repeat mutation had a higher meropenem MIC value and vaborbactam showed lower activity against it compared to a strain whose sole difference was the absence of the repeat.<sup>8</sup>

The AcrAB-TolC efflux pump is a common mechanism of resistance to many antibiotics, but it does not seem to contribute to resistance to meropenem-vaborbactam. A mutation in the *ramR* gene causes down-regulation of the porin OmpK35 and increased expression of the pump, but does not affect the *in vitro* activity of meropenem-vaborbactam. However, increased expression of the pump combined with inactivation of the porins OmpK35, OmpK36 causes an increase in the MIC value of meropenem-vaborbactam.<sup>8</sup>

Another *in vitro* study of meropenem-vaborbactam activity against carbapenem-resistant *Enterobacterales*





**Figure 3** Relationship between 24-h AUC/MIC and resistance suppression in *K. pneumoniae* strains.<sup>29</sup>

highlighted the IS5 addition to the *ompK36* promoter as a mutation leading to reduced susceptibility. This mutation results in reduced expression of OmpK36 porin.<sup>31</sup>

Reduced susceptibility to meropenem-vaborbactam due to loss of the KvrA protein has also been described in KPC-3 -producing *K. pneumoniae* strains. KvrA acts as a transcription factor. This loss, caused by mutations in the *kvrA* gene, ultimately results in reduced expression of the OmpK35 and OmpK36 porins and reduced meropenem-vaborbactam activity.<sup>32</sup>

Regarding KPC, there is no report of a mutation conferring reduced susceptibility or resistance to meropenem-vaborbactam. In a recent study, the effect of two mutations conferring resistance to ceftazidime-avibactam on the activity of meropenem-vaborbactam was investigated. The most common mutations reported cause the D179Y amino acid substitution in KPC-2 and KPC-3, and the L169P substitution in KPC-2. Both mutations confer resistance to ceftazidime-avibactam but lead to loss of resistance to carbapenems and susceptibility to meropenem-vaborbactam. In *P. aeruginosa* strains engineered to express the KPC-2 mutations, the ability of vaborbactam to enhance the activity of ceftazidime, cefepime, and piperacillin was reduced less than twofold, compared to avibactam, whose activity was reduced from 8 to 32 times for D179Y, and from 4 to 16 times for L169P, depending on the antibiotic.<sup>33</sup>

Another study aimed at defining the concentration of meropenem and vaborbactam that would not allow

the emergence of strains with reduced susceptibility due to mutations. Eighteen KPC-producing *K. pneumoniae* strains with varying degrees of susceptibility to meropenem and meropenem-vaborbactam were used. Meropenem and vaborbactam, at 8 µg/ml each, reduced the incidence of mutations to  $<1 \times 10^{-8}$  in 77.8% of strains (14/18), and in all strains when meropenem was increased to 16 µg/ml. Mutations detected at low concentrations of meropenem-vaborbactam mainly involved OmpK36 inactivation and *bla*<sub>KPC</sub> copy number increase. It is noted that no mutations were found in the coding region of *bla*<sub>KPC</sub>. Mutations in OmpK36 were associated with the greatest increase in meropenem-vaborbactam MIC values, while *bla*<sub>KPC</sub> copy number increase is significant when combined with a partially functional OmpK36.<sup>34</sup>

No resistant isolates were identified during the TANGO II clinical trial. The microbiological analysis revealed only one isolate with a fourfold MIC increase, from 0.25 to 1 mg/l, that remained in the susceptibility range.<sup>21</sup>

### Susceptibility testing

Both EUCAST and CLSI have set susceptibility and resistance breakpoints for meropenem-vaborbactam (at a dose of 2g/2g every 8 hours in a 3-hour infusion) with a fixed concentration of vaborbactam of 8 mg/l. EUCAST has set the breakpoints for susceptibility and resistance at MIC values of less than or equal to 8 mg/l

and greater than 8 mg/l, respectively, for both *Enterobacteriales* and *P. aeruginosa*,<sup>35</sup> while CLSI has set them at an MIC value less than or equal to 4 mg/l and greater than 8 mg/l only for *Enterobacteriales*.<sup>36</sup> Susceptibility can be tested using the method of broth microdilution, with a fixed concentration of vaborbactam of 8 mg/l. Gradient diffusion tests (Etest, bioMérieux or MIC Test Strips, Liofilchem) are also available, as well as testing in semi-automated commercial systems (e. g. Microscan, Beckman Coulter).<sup>37</sup> Disk diffusion can be used for susceptibility testing according to both CLSI and EUCAST.<sup>35,36</sup>

## Data from the clinical use

In August 2017, FDA approved the use of meropenem-vaborbactam for the treatment of adults with complicated UTI, including pyelonephritis.<sup>38</sup> EMA then approved its use in adults with complicated UTI, including pyelonephritis, complicated intra-abdominal infection, hospital-acquired pneumonia (HAP), and ventilator-associated pneumonia (VAP), bacteremia associated with the above infections, and infections due to aerobic Gram-negative bacteria in adults with limited treatment options.<sup>39</sup> Since then, data from the clinical use of meropenem-vaborbactam have appeared in the literature, providing important information as they come from patients who are mainly elderly, critically ill, more severely immunosuppressed, and more likely to have vital organ damage, for example renal failure.

In 2020, Shields et al. published an observational study of 20 critically ill patients with carbapenem-resistant *Enterobacteriales* infections treated for >48 hours with meropenem-vaborbactam. The dose they received was 2g/2g intravenously every 8 hours, with adjustment in case of impaired renal function. Infections included bacteremia (n=8), pneumonia (n=6, VAP 5/6), tracheobronchitis (n=2, ventilator-associated 1/2), skin and soft tissue infections (n=2), pyelonephritis (n=1), and peritonitis with intra-abdominal abscess (n=1). The main pathogen was *Klebsiella pneumoniae* (n=14), followed by *Klebsiella oxytoca* (n=2), *Escherichia coli* (n=2), *Enterobacter cloacae* (n=1), and *Citrobacter freundii* (n=1). Eighteen strains produced KPC enzymes, including one *K. pneumoniae* strain that produced KPC-31, resistant to ceftazidime-avibactam but sensitive to carbapenems. Two strains did not produce KPC (one *E. coli* carrying *bla<sub>CMY</sub>* and one *K. oxytoca* carrying *bla<sub>CMY</sub>*, *bla<sub>ACC</sub>* and *bla<sub>DHA</sub>*). In 80% of patients the combination was administered as monotherapy. Clinical success was noted in 65% of patients, and more specifically in 63% in the case of

bacteremia and in 67% of pneumonia. APACHE-II score was higher where no clinical success was observed. Microbiological failure within 90 days occurred in 6 of 20 patients. Notably, one failure involved a patient with bacteremia due to a KPC-31-producing *K. pneumoniae* strain, with resistance to ceftazidime-avibactam and a meropenem-vaborbactam MIC of 0.12 µg/ml. On day 12 of meropenem-vaborbactam treatment, the patient developed an abdominal wall abscess, from which a *K. pneumoniae* strain with a meropenem-vaborbactam MIC of 8 µg/ml was isolated. WGS analysis revealed an IS5 insertion in the promoter of the *OmpK36* gene that was not present initially, while the *bla<sub>KPC</sub>* gene remained unchanged. This was the first report of a treatment-emergent non-susceptible strain. Regarding adverse effects, one patient developed eosinophilia.<sup>40</sup>

A retrospective study by Alosaimy et al. included 40 patients from 7 US centers who had received meropenem-vaborbactam for more than 72 hours for infections due to multidrug resistant Gram-negative pathogens. Infections included pneumonia (13/40), urinary tract infection (8/40), intra-abdominal infection (5/40) and skin and soft tissue infections (5/40). Clinical success was noted in 70% of patients. Failure was due to persistence of symptoms, relapse, and death. Only 5 patients were screened for development of resistance to meropenem-vaborbactam, none developing. One patient developed Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis 3 days after initiation of meropenem-vaborbactam therapy.<sup>41</sup>

A multicenter retrospective study of patients treated with ceftazidime-avibactam or meropenem-vaborbactam for >72 hours was published in 2020. Of the 131 patients included, 105 had received ceftazidime-avibactam and 26 meropenem-vaborbactam. The main pathogen was *K. pneumoniae*. Clinical success was similar, at 61.9% in the ceftazidime-avibactam group and 69.2% in the meropenem-vaborbactam group (P=0.49). The most common adverse effect was nephrotoxicity, with a rate of 29.2% for ceftazidime-avibactam and 14.3% for meropenem-vaborbactam. The difference was not statistically significant, while it is noted that the majority of patients receiving ceftazidime-avibactam were also receiving any of the following in combination: colistin, tigecycline, quinolone, aminoglycoside. Regarding the development of resistance, 3 patients receiving ceftazidime-avibactam monotherapy developed resistant strains. No cases of emergence of resistance to meropenem-vaborbactam were noted.<sup>42</sup>

A retrospective study of 15 patients with CRE infections was the first to include bone and joint infections (5, 33.3%), other than primary bacteremia (3, 20%),



complicated intra-abdominal infections (2, 13.3%), pneumonia (2, 13.3%), urinary tract infections (2, 13.3%), and soft tissue infection with secondary bacteremia (1, 6.7%). Bacteria isolated were *K. pneumoniae* (10, 66.7%), *E. coli* (3, 20%), *Klebsiella aerogenes* (1, 6.7%), *Citrobacter koseri* (1, 6.7%). Fourteen patients had received antibiotic therapy prior to initiation of meropenem-vaborbactam. The mean time to initiation of meropenem-vaborbactam treatment was 73 hours. The outcome was positive for 9 patients (60%), negative for 5 (33.3%), and uncertain for 1 patient (6.7%). For both cases the mean time to initiation of treatment was similar. One patient developed recurrent bacteremia from a meropenem-vaborbactam-susceptible strain within 30 days of the end of treatment. Three out of 5 cases of bone and joint infections had a positive clinical outcome. Regarding the patients with a negative response, 3 (60%) were found to have inadequate source control, 1 died of an infection-related cause, and 1 of another cause before the end of treatment. Repeat cultures within 3 days of starting treatment were obtained in 6 patients, of whom 4 (66.7%) had a positive microbiological response. As for adverse effects, one patient developed *C. difficile* diarrhea on day 2 of meropenem-vaborbactam therapy, although other broad-spectrum antibiotics had already been used.<sup>43</sup>

Few case reports about the successful use of meropenem-vaborbactam have also been published. Jorgensen et al. presented the case of a young HIV patient with a complex clinical history and bacteremia due to carbapenem-resistant *Serratia marcescens* and *Enterobacter aerogenes*. The patient was initially treated with ceftazidime-avibactam, which failed to clear the bacteremia. Subsequently, the infection was treated successfully with meropenem-vaborbactam plus source control.<sup>44</sup> Another case report describes the case of a liver transplant recipient who developed bacteremia and a liver abscess due to KPC-producing *K. pneumoniae* (KPC-Kp) strain. After initial monotherapy with ceftazidime-avibactam, the strain developed *de novo* resistance, and treatment was changed to colistin plus gentamicin. Due to renal failure, meropenem-vaborbactam was used as salvage therapy. Renal function improved and bacteremia was cleared, allowing retransplantation.<sup>45</sup> In the case of a woman with septic thrombosis and bacteremia due to KPC-Kp, meropenem-vaborbactam was successfully combined with fosfomycin, after failing to treat her, first with ceftazidime-avibactam, and then with colistin plus fosfomycin.<sup>46</sup> Most recently, a case report about the use of meropenem-vaborbactam in a thoracic aorta graft infection due to a ceftazidime-avibactam-resistant KPC-Kp strain has been published. The infec-

tion was treated successfully with the combination of meropenem-vaborbactam with tigecycline. Tigecycline was then discontinued, and the patient showed no sign of recurrence until dying of another cause.<sup>47</sup>

### Treatment of infections due to carbapenem-resistant Gram-negative bacteria

Treatment of infections with carbapenem-resistant Gram-negative bacteria is challenging and requires a multifactorial strategy. Given the need for early initiation of treatment, it is important to identify patients at increased risk for such infections based on their individual history, and at the same time to have knowledge of the local epidemiology of resistance mechanisms. The use of phenotypic and molecular techniques to identify resistance mechanisms can also contribute to applying the appropriate therapy.<sup>48</sup> Before the novel  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor combinations became available, treatment of infections due to carbapenem-resistant Gram-negative bacteria relied on the use of colistin (except for intrinsically resistant bacteria), as monotherapy or in combination with tigecycline, fosfomycin, high doses of carbapenems, and sulbactam, depending on the pathogen and the site of infection.<sup>48</sup>

When it comes to less severe *Enterobacterales* infections, the use of older antibiotics is preferred.<sup>49,50</sup> In uncomplicated cystitis, quinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole, aminoglycosides, nitrofurantoin, remain good options. However, in case of resistance or failure, the use of novel  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor combinations, that is meropenem-vaborbactam, ceftazidime-avibactam, and imipenem-relebactam, is recommended. If these are also ineffective, cefiderocol, a novel siderophore cephalosporin, may be used.<sup>49</sup> In severe infections, both complicated urinary tract infections and non-urinary tract infections, administration of meropenem-vaborbactam or ceftazidime-avibactam or imipenem-relebactam is recommended.<sup>49</sup> Alternatively, cefiderocol can be used in case of resistance to the available combinations.<sup>49,50</sup>

If metallo- $\beta$ -lactamase production is detected, the use of cefiderocol is recommended. A combination of ceftazidime-avibactam with aztreonam can also be used.<sup>49,50</sup> In case of OXA-48 production, the first choice is ceftazidime-avibactam and, alternatively, cefiderocol.<sup>49</sup>

Given the fact that vaborbactam does not restore the activity of meropenem against carbapenem-resistant *P. aeruginosa* and carbapenem-resistant *A. baumannii*, meropenem-vaborbactam has no place in the treatment of such infections. As for *P. aeruginosa*,

the first choice for severe infections is ceftolozane/tazobactam,<sup>49,50</sup> while for milder infections the use of older antipseudomonal antibiotics, such as aminoglycosides, is recommended.<sup>49</sup> For severe *A. baumannii* infections, the European Society for Clinical Microbiology and Infection currently recommends a combination of colistin, aminoglycoside, tigecycline, sulbactam.<sup>50</sup>

## Conclusion

The addition of vaborbactam to meropenem restores the activity of the latter against Gram-negative bacteria producing class A  $\beta$ -lactamases, as it is highly active against KPC, as shown by large surveillance studies. It is important to emphasize that the combination is not effective against class B and class D carbapenemases, nor does it improve the activity of meropenem against multidrug-resistant *P. aeruginosa* and *A. baumannii*. The results of clinical studies highlight its efficacy in urinary tract infections, as well as other serious infections caused by Gram-negative bacteria. At the same time, it is characterized as safe, with a low occurrence of serious adverse effects, while it can be

used safely in cases of reduced renal function. Based on the so far scarce data after its introduction in clinical practice, it appears to be effective even in complicated cases of patients, and less toxic than the regimens used until now. The so far low frequency of resistance development both *in vitro* and *in vivo* is significant. Therefore, meropenem-vaborbactam constitutes a promising solution in the treatment of serious infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria. However, it is necessary to follow a strict surveillance strategy to ensure its appropriate use in order to minimize the chance of resistance. At the same time, it is vital to continue the search for agents that will fill the gap regarding metallo- $\beta$ -lactamases and multidrug-resistant *P. aeruginosa* and *A. baumannii*, and maintain an armamentarium against the non-stop evolution of bacteria and their ability to develop resistance to available antibiotics.

## Acknowledgements

This work was part of the Thesis in the Postgraduate M.Sc. Program "Molecular Medical Biopathology".

## Conflict of interest

All authors declare no conflict of interest.



## Περίληψη

### Vaborbactam: perspective of a new $\beta$ -lactamase inhibitor in the anti-microbial chemotherapy

Ειρήνη Αμαργιανιτάκη\*<sup>1</sup>, Βασιλική Κουμάκη<sup>1</sup>, Αθανάσιος Τσακρής<sup>1</sup>, Ιωσήφ Παπαπαρασκευάς<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνική και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα

\*Υπεύθυνος αλληλογραφίας

Οι λοιμώξεις που οφείλονται σε ανθεκτικά στις καρβαπενέμες *Enterobacterales*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Acinetobacter baumannii* αποτελούν παγκοσμίως απειλή για τη δημόσια υγεία και συνδέονται με υψηλά ποσοστά νοσηρότητας και θνητότητας. Η αντοχή οφείλεται κυρίως στην παραγωγή διαφόρων τύπων καρβαπενεμασών. Η βαμπορβακτάμη είναι ένας νέος αναστολέας  $\beta$ -λακταμασών, χημικά προερχόμενος από το βορονικό οξύ και με υψηλή ισχύ έναντι των καρβαπενεμασών τάξης A, συμπεριλαμβανομένης της KPC. Σε συνδυασμό με τη μεροπενέμη, αποκαθιστά σχεδόν πλήρως τη δραστηριότητά της έναντι *Enterobacterales* που παράγουν καρβαπενεμάση KPC. Ωστόσο, έχει περιορισμένη δράση έναντι των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες *Pseudomonas aeruginosa* και *Acinetobacter baumannii*. Η κλινική αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια του συνδυασμού αξιολογήθηκαν σε δύο κλινικές δοκιμές, τις TANGO I και II, όπου αποδείχθηκε ότι είναι μη-κατώτερος σε σύγκριση με άλλες θεραπευτικές επιλογές. Έχει λίγες σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες, ειδικά όσον αφορά τη νεφροτοξικότητα. Φαίνεται να διατηρεί χαμηλή τάση για ανάπτυξη αντοχής. Εμφανίζει φαρμακοκινητικές ιδιότητες παρόμοιες με αυτές της μεροπενέμης. Έχει εγκριθεί για χρήση σε ενήλικες με επιπλεγμένες ουρολοιμώξεις και ενδοκοιλιακές λοιμώξεις, νοσοκομειακή πνευμονία και πνευμονία σχετιζόμενη με αναπνευστήρα, καθώς και λοιμώξεις λόγω αερόβιων Gram-αρνητικών οργανισμών σε ενήλικες με περιορισμένες θεραπευτικές επιλογές. Μελέτες χρήσης σε πραγματικές συνθήκες δείχνουν υποσχόμενα ποσοστά ίασης και χαμηλότερα ποσοστά ανεπιθύμητων ενεργειών, ακόμη και σε περιπτώσεις βεβαρυμένων ασθενών.



#### Λέξεις κλειδιά

αντοχή στις καρβαπενέμες, *Klebsiella pneumoniae* καρβαπενεμάση, βαμπορβακτάμη, μεροπενέμη-βαμπορβακτάμη



## References

- van Duin D, Kaye KS, Neuner EA, Bonomo RA. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a review of treatment and outcomes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 75:115-120.
- Cai B, Echols R, Magee G, Arjona Ferreira JC, Morgan G, Ariyasu M *et al*. Prevalence of carbapenem-resistant Gram-negative infections in the United States predominated by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Open Forum Infect Dis* 2017; 4:ofx176.
- World Health Organization, 2017. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Available online from <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (last accessed 31 January 2023).
- Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and diagnostics of carbapenem resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis*. 2019;69(Suppl 7):S521-S528. doi: 10.1093/cid/ciz824.
- Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20:440-458.
- Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23:160-201.
- Tsvikovski R, Lomovskaya O. Biochemical activity of Vaborbactam. *Antimicrob Agents Chemother* 2020; 64:e01935-19.
- Lomovskaya O, Sun D, Rubio-Aparicio D, Nelson K, Tsvikovski R, Griffith DC *et al*. Vaborbactam: Spectrum of beta-lactamase inhibition and impact of resistance mechanisms on activity in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61:e01443-17.
- Hecker SJ, Reddy KR, Totrov M, Hirst GC, Lomovskaya O, Griffith DC *et al*. Discovery of a cyclic boronic acid  $\beta$ -lactamase inhibitor (RPX7009) with utility vs class A serine carbapenemases. *J Med Chem* 2015; 58:3682-3692.
- Bhowmick, T., Weinstein, M.P. Microbiology of meropenem-vaborbactam: A novel carbapenem beta-lactamase inhibitor combination for carbapenem-resistant Enterobacteriales infections. *Infect Dis Ther* 2020; 9:757-767.
- Goldstein EJ, Citron DM, Tyrrell KL, Merriam CV. In vitro activity of Biapenem plus RPX7009, a carbapenem combined with a serine  $\beta$ -lactamase inhibitor, against anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57:2620-2630.
- Castanheira M, Rhomberg PR, Flamm RK, Jones RN. Effect of the  $\beta$ -lactamase inhibitor vaborbactam combined with meropenem against serine carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60:5454-5458.
- Lapuebla A, Abdallah M, Olafisoye O, Cortes C, Urban C, Quale J *et al*. Activity of meropenem combined with RPX7009, a novel  $\beta$ -lactamase inhibitor, against Gram-negative clinical isolates in New York City. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59:4856-4860.
- Castanheira M, Huband MD, Mendes RE, Flamm RK. Meropenem-Vaborbactam tested against contemporary Gram-negative isolates collected worldwide during 2014, including carbapenem-resistant, KPC-producing, multidrug-resistant, and extensively drug-resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61:e00567-17.
- Pfaller MA, Huband MD, Mendes RE, Flamm RK, Castanheira M. *In vitro* activity of meropenem/vaborbactam and characterisation of carbapenem resistance mechanisms among carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from the 2015 meropenem/vaborbactam surveillance program. *Int J Antimicrob Agents* 2018; 52:144-150.
- Hackel MA, Lomovskaya O, Dudley MN, Karlowsky JA, Sahm DF. *In Vitro* activity of meropenem-vaborbactam against clinical isolates of KPC-positive Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 62:e01904-17.
- Castanheira M, Doyle TB, Kantro V, Mendes RE, Shortridge D. Meropenem-vaborbactam activity against carbapenem-resistant Enterobacteriales isolates collected in U.S. hospitals during 2016 to 2018. *Antimicrob Agents Chemother* 2020; 64:e01951-19.
- Sabet M, Tarazi Z, Nolan T, Parkinson J, Rubio-Aparicio D, Lomovskaya O *et al*. Activity of meropenem-vaborbactam in mouse models of infection due to KPC-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 62:e01446-17.
- Sabet M, Tarazi Z, Griffith DC. Activity of meropenem-vaborbactam against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a neutropenic mouse thigh infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 63:e01665-18.
- Kaye KS, Bhowmick T, Metallidis S, Bleasdale SC, Sagan OS, Stus V *et al*. Effect of meropenem-vaborbactam vs piperacillin-tazobactam on clinical cure or improvement and microbial eradication in complicated urinary tract infection: The TANGO I randomized clinical trial. *JAMA* 2018; 319:788-799.
- Wunderink RG, Giamarellou-Bourboulis EJ, Rahav G, Mathers AJ, Bassetti M, Vazquez J *et al*. Effect and safety of meropenem-vaborbactam versus best-avail-

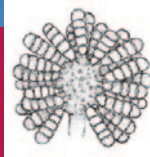


- able therapy in patients with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections: The TANGO II randomized clinical trial. *Infect Dis Ther* 2018; 7:439-455.
22. Dose-finding, pharmacokinetics, and safety of VABOMERE in pediatric subjects with bacterial infections (TANGOKIDS). Available from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02687906> (last accessed 31 January 2023).
  23. Griffith DC, Loutit JS, Morgan EE, Durso S, Dudley MN. Phase 1 study of the safety, tolerability, and pharmacokinetics of the  $\beta$ -lactamase inhibitor vaborbactam (RPX7009) in healthy adult subjects. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60:6326-6332.
  24. Rubino CM, Bhavnani SM, Loutit JS, Morgan EE, White D, Dudley MN *et al*. Phase 1 study of the safety, tolerability, and pharmacokinetics of vaborbactam and meropenem alone and in combination following single and multiple doses in healthy adult subjects. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 62:e02228-17.
  25. Rubino CM, Bhavnani SM, Loutit JS, Lohse B, Dudley MN, Griffith DC. Single-dose pharmacokinetics and safety of meropenem-vaborbactam in subjects with chronic renal impairment. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 62:e02103-17.
  26. Wenzler E, Gotfried MH, Loutit JS, Durso S, Griffith DC, Dudley MN *et al*. Meropenem-RPX7009 concentrations in plasma, epithelial lining fluid, and alveolar macrophages of healthy adult subjects. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59:7232-7239.
  27. Jorgensen SCJ, Rybak MJ. Meropenem and Vaborbactam: Stepping up the battle against carbapenem-resistant enterobacteriaceae. *Pharmacotherapy* 2018; 38:444-461.
  28. Sabet M, Tarazi Z, Rubio-Aparicio D, Nolan TG, Parkinson J, Lomovskaya O *et al*. Activity of simulated human dosage regimens of meropenem and vaborbactam against carbapenem-resistant enterobacteriaceae in an *in vitro* hollow-fiber model. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 62:e01969-17.
  29. Griffith DC, Sabet M, Tarazi Z, Lomovskaya O, Dudley MN. Pharmacokinetics / Pharmacodynamics of vaborbactam, a novel beta-lactamase inhibitor, in combination with meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 63:e01659-18.
  30. Gaibani P, Giani T, Bovo F, Lombardo D, Amadesi S, Lazzarotto T *et al*. Resistance to ceftazidime/avibactam, meropenem/vaborbactam and imipenem/relebactam in Gram-negative MDR bacilli: Molecular mechanisms and susceptibility testing. *Antibiotics (Basel)* 2022; 11:628.
  31. Wilson WR, Kline EG, Jones CE, Morder KT, Mettus RT, Doi Y *et al*. Effects of KPC variant and porin genotype on the *in vitro* activity of meropenem-vaborbactam against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; 63:e02048-18.
  32. Dulyayangkul P, Wan Nur Ismah WAK, Douglas EJA, Avison MB. Mutation of *kvrA* causes *OmpK35* and *OmpK36* porin downregulation and reduced meropenem-vaborbactam susceptibility in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2020; 64:e02208-19.
  33. Tsivkovski R, Lomovskaya O. Potency of vaborbactam is less affected than that of avibactam in strains producing KPC-2 mutations that confer resistance to ceftazidime-avibactam. *Antimicrob Agents Chemother* 2020; 64:e01936-19.
  34. Sun D, Rubio-Aparicio D, Nelson K, Dudley MN, Lomovskaya O. Meropenem-vaborbactam resistance selection, resistance prevention, and molecular mechanisms in mutants of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61:e01694-17.
  35. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0, 2022. Available from <http://www.eucast.org> (last accessed 31 January 2023).
  36. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 31st ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2021.
  37. Novelli A, Del Giacomo P, Rossolini GM, Tumbarello M. Meropenem/vaborbactam: a next generation  $\beta$ -lactam  $\beta$ -lactamase inhibitor combination. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2020; 18:643-655.
  38. Vabomere™ (meropenem and vaborbactam) for injection, for intravenous use, package insert. Available from [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2017/209776lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/209776lbl.pdf) (last accessed 31 January 2023)
  39. Vaboreme (previously Vabomere), European Medicines Agency. Available from <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vaborem#authorization-details-section> (last accessed 31 January 2023).
  40. Shields RK, McCreary EK, Marini RV, Kline EG, Jones CE, Hao B *et al*. Early experience with meropenem-vaborbactam for treatment of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. *Clin Infect Dis* 2020; 71:667-671. Erratum in: *Clin Infect Dis* 2020; 70:1265.
  41. Alosaimy S, Jorgensen SCJ, Lagnf AM, Melvin S, Mynatt RP, Carlson TJ *et al*. Real-world multicenter analysis of clinical outcomes and safety of meropenem-vaborbactam in patients treated for serious Gram-negative bacterial infections. *Open Forum Infect Dis* 2020; 7:ofaa051.
  42. Ackley R, Roshdy D, Meredith J, Minor S, Anderson WE, Capraro GA *et al*. Meropenem-vaborbactam versus ceftazidime-avibactam for treatment of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2020; 64:e02313-19.

43. Zhang HL, Cressman L, Lautenbach E. Real-world clinical outcomes of meropenem/vaborbactam for treatment of carbapenem-resistant Enterobacterales infections. *J Glob Antimicrob Resist* 2021; 27:299-302.
44. Jorgensen SCJ, McDonald P, Mynatt RP, Pogue JM, Lerner SA, Dhar S *et al*. Averting the post-antibiotic era: successful use of meropenem/vaborbactam for carbapenem-resistant *Serratia marcescens* and *Enterobacter aerogenes* bacteraemia in a haemodialysis patient. *J Antimicrob Chemother* 2018;73:3529-3531.
45. Athans V, Neuner EA, Hassouna H, Richter SS, Keller G, Castanheira M *et al*. Meropenem-vaborbactam as salvage therapy for ceftazidime-avibactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia and abscess in a liver transplant recipient. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 63:e01551-18.
46. Oliva A, Curtolo A, Volpicelli L, Cogliati Dezza F, De Angelis M, Cairoli S *et al*. Synergistic meropenem/vaborbactam plus fosfomycin treatment of KPC producing *K. pneumoniae* septic thrombosis unresponsive to ceftazidime/avibactam: From the bench to the bedside. *Antibiotics (Basel)* 2021; 10:781.
47. Belati A, Novara R, Bavaro DF, Procopio A, Fico C, Diella L *et al*. Thoracic aorta graft infection by avibactam-resistant KPC-producing *K. pneumoniae* treated with meropenem/vaborbactam: a case report and literature review. *Infez Med* 2022; 30:277-284.
48. Bassetti M, Kanj SS, Kiratisin P, Rodrigues C, Van Duin D, Villegas MV *et al*. Early appropriate diagnostics and treatment of MDR Gram-negative infections. *JAC Antimicrob Resist* 2022; 4:dla089.
49. Tamma PD, Aitken SL, Bonomo RA, Mathers AJ, van Duin D, Clancy CJ. Infectious Diseases Society of America 2022 guidance on the treatment of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing Enterobacterales (ESBL-E), carbapenem-resistant Enterobacterales (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with difficult-to-treat resistance (DTR-P. aeruginosa). *Clin Infect Dis* 2022; 75:187-212.
50. Paul M, Carrara E, Retamar P, Tängdén T, Bitterman R, Bonomo RA *et al*. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) guidelines for the treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli (endorsed by European Society of Intensive Care Medicine). *Clin Microbiol Infect* 2022; 28:521-547.



TIMM



Trends in Medical Mycology

# 11<sup>th</sup> Trends in Medical Mycology



## TIMM 2023

20-23 October 2023, Athens, Greece

[www.timm2023.org](http://www.timm2023.org)

### IMPORTANT DATES 2023

30 April 2023	Deadline early-bird registration fee
1 June 2023	Abstract deadline
July 2023	Abstracts letters of acceptance will be mailed
1 August 2023	Deadline late breaking abstracts
13 September 2023	Deadline regular registration fee



## A comprehensive review of monkeypox (mpox) on the occasion of the ongoing multicountry outbreak of the disease

Panagiotis Toumasis<sup>1</sup>, Vasileios Paparizos<sup>2</sup>, Georgia Vrioni<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece.

<sup>2</sup>Sexually Transmitted Infections Unit, 1st Department of Dermatology and Venereology, Andreas Syggros University Hospital of Athens, Athens, Greece.



### Summary

The ongoing recent outbreak of mpox, extending to both endemic and non endemic regions, has emerged as a growing international public health threat. The purpose of this review is to highlight the basics of the disease. Mpox is a zoonotic infectious disease, caused by MPV, a DNA virus in the genus *Orthopoxvirus*. There are two possible means of mpox transmission: animal-to-human and human-to-human transmission. In this epidemic, mpox is predominantly affecting men who have sex with men. The early symptoms and signs of mpox are nonspecific but the subsequent evolution of the skin lesions is characteristic. The preferred diagnostic method for mpox is Polymerase Chain Reaction (PCR) testing of samples from skin lesions. The

management of mpox includes supportive care and pain relief medication. There is no treatment approved specifically for mpox. However, there is evidence that antiviral agents that are effective against variola virus are also effective against MPV. There are several simple precautions in order to avoid mpox, including vaccination.



### Key words

mpox, outbreak, epidemic

### Corresponding author

Georgia Vrioni

Department of Microbiology  
Medical School,

National and Kapodistrian University of Athens

75, M. Asias, 115 27, Athens, Greece

Tel. +30 210 7492129

Email: gvrioni@med.uoa.gr

## Introduction

The 2022 outbreak of monkeypox (recently renamed as “mpox”<sup>1</sup>) extending to both endemic and non-endemic regions is an issue that has alerted the international scientific society, while the World Health Organisation (WHO) declares the spread of the disease a “public health emergency of international concern”. In the shadow of COVID19 pandemic, mpox virus has been considered by some as the next great viral threat.

Mpox virus was first identified in 1958 by Danish virologist Preben von Magnus in monkeys kept for research<sup>2</sup> but was first identified in humans, specifically in a 9-month-old boy, in 1970 in the Democratic Republic of Congo.<sup>3</sup> The virus is endemic in the tropical rainforest regions across Central and West Africa, where sporadic outbreaks have occurred over the past 50 years. Cases that happen outside endemic countries are related to international travel to endemic regions. Since May 2022, multiple cases of mpox have been reported worldwide from non-endemic countries and most of them are associated with trips to countries in Europe and North America, rather than African endemic countries.<sup>4</sup> Besides, reported mpox cases have involved mainly, but not exclusively, men who have sex with men (MSM).<sup>5</sup>

Mpox case numbers have grown up progressively. So, although cases decreased significantly after September 2022, it is critical for healthcare professionals worldwide to stay up-to-date and be well informed on mpox, since they might encounter this condition in their practice. The purpose of this review is to shed light to the basics of mpox, including its clinical presentation, management and prophylaxis.

## Virology

Mpox virus (MPV, MPXV, or hMPXV) is the cause of mpox in both humans and animals. MPV is a zoonotic (transmitted to humans from animals), double-stranded DNA virus, belonging to the *Poxviridae* family, the *Chordopoxvirinae* subfamily, and the genus *Orthopoxvirus*.<sup>6</sup> Regarding the species that are contained in the Orthopoxvirus genus, we should highlight the other 3 species that cause infection in humans: *variola virus* (VARV), the cause of smallpox, *cowpox virus* (CPX), the cause of cowpox and *vaccinia virus* (VACV), which is the source of the modern smallpox vaccine.<sup>6</sup> Two distinct genetic clades of the mpox virus are described: Clade I, formerly the Congo Basin (Central African) Clade, and Clade II, formerly the West African clade.<sup>7</sup> The latter consists of two subclades:

Clade IIa and Clade IIb.<sup>7</sup> In comparison with Clade II, Clade I has been associated with a more severe form of the disease with higher mortality and more evident human-human transmission.<sup>6</sup> All publicly available MPV genomes from the 2022 mpox outbreak to date belong to Clade II, subclade IIb.<sup>8</sup>

On electron microscopy, MPV appears large as its size ranges from 200 to 250 nanometers.<sup>10</sup> MPV has the same morphological characteristics as other orthopoxviruses: a linear double-stranded DNA genome surrounded by a lipoprotein outer membrane in an oval or brick-shaped appearance.<sup>10</sup> MPV genome is about 197 kb and contains about 190 nonoverlapping ORFs >180 nt long.<sup>11</sup>

Despite the fact that MPV is a DNA virus –which means that MPV would express its genome in the nucleus of eukaryotic cells– its life cycle takes place in the cytoplasm of infected cells.<sup>10</sup> MPV genome encodes all the proteins that are required for viral DNA replication, including the RNA polymerase system, using the host ribosomes.<sup>10</sup>

## Transmission path

There are two possible means of mpox transmission: animal-to-human transmission and human-to-human transmission (Figure 1).

Regarding the former, mpox is known to be a zoonosis: a disease that is transmitted from animals to humans.<sup>9</sup> The animal reservoir for mpox disease is considered to include various species of monkeys and rodents, namely squirrels, rats and dormice, found in African regions.<sup>9</sup> Zoonotic transmission happens via direct contact with the blood, body fluids, and inoculation from mucocutaneous lesions of an infected animal.<sup>12</sup> The MPV transmission could occur whether the aforementioned natural viral hosts are alive, i.e. via bites/scratches or dead, i.e. handling infected carcasses or consumption of inadequately cooked meat.<sup>12</sup>

Concerning inter-human transmission, it is attributed to respiratory exposure to droplets from infected individuals, which means that prolonged face-to-face contact increases the risk of transmission.<sup>12</sup> In addition, MPV can be transmitted via close contact with skin lesions of infected individuals or recently contaminated objects such as towels or clothing.<sup>12</sup> Also, congenital mpox should be considered since MPV can be transmitted via the placenta from infected mother to fetus or via close contact with the newborn during and after birth.<sup>13</sup>

It should be mentioned that the ongoing epidemic has unique characteristics since the disease is spreading primarily through sexual contact<sup>14</sup> (via direct con-

tact with groin and genital lesions) and is predominantly affecting men who have sex with men.<sup>15</sup> However, it is insufficient to classify mpox as a sexually transmitted disease. In the current epidemic outbreak, the reproduction number R0 for MPV is estimated to be 2,44. with high variability among European countries and possibly affected by major cluster events of human to human transmission.<sup>8</sup> This high R0 indicates that the MPV may persist in the human population. Like other Sexually Transmitted Diseases, e.g. syphilis or warts, MPOX probably not transmitted by semen, but in the vast majority of cases the transmission took place through sexual contact.

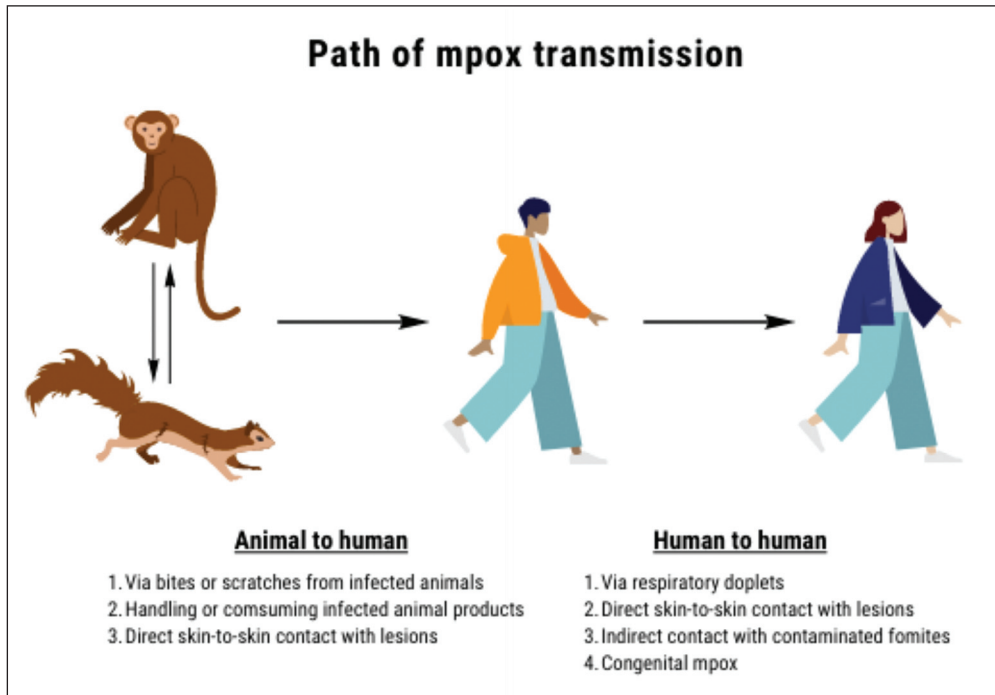
## Clinical presentation

The time between exposure to mpox virus and appearance of the first clinical features (“incubation period”) has been estimated at 6 to 13 days (range from 5 to 21 days).<sup>12</sup> The early symptoms and signs of mpox are nonspecific, with fever, chills, fatigue, swollen lymph nodes and muscle pains being the most common.<sup>16</sup> Within 1 to 5 days after the first clinical features, skin lesions make their initial appearance.<sup>17</sup> The latter, characteristically, appear on the face before appearing on the trunk then elsewhere across the patient’s body.<sup>17</sup> Very often they appear in the genital area and the anus (Figures 2a, 2b). The evolution of the skin lesions progresses through four stages: macules (lesions with a flat base), papules (slightly raised firm lesions), vesicles (lesions filled with clear fluid), pustules (lesions filled with yellowish fluid), and scabs.<sup>17</sup> (Figure 3). Patients could suffer with pain. Also, they usually have itchy skin in the healing stage of skin lesions.

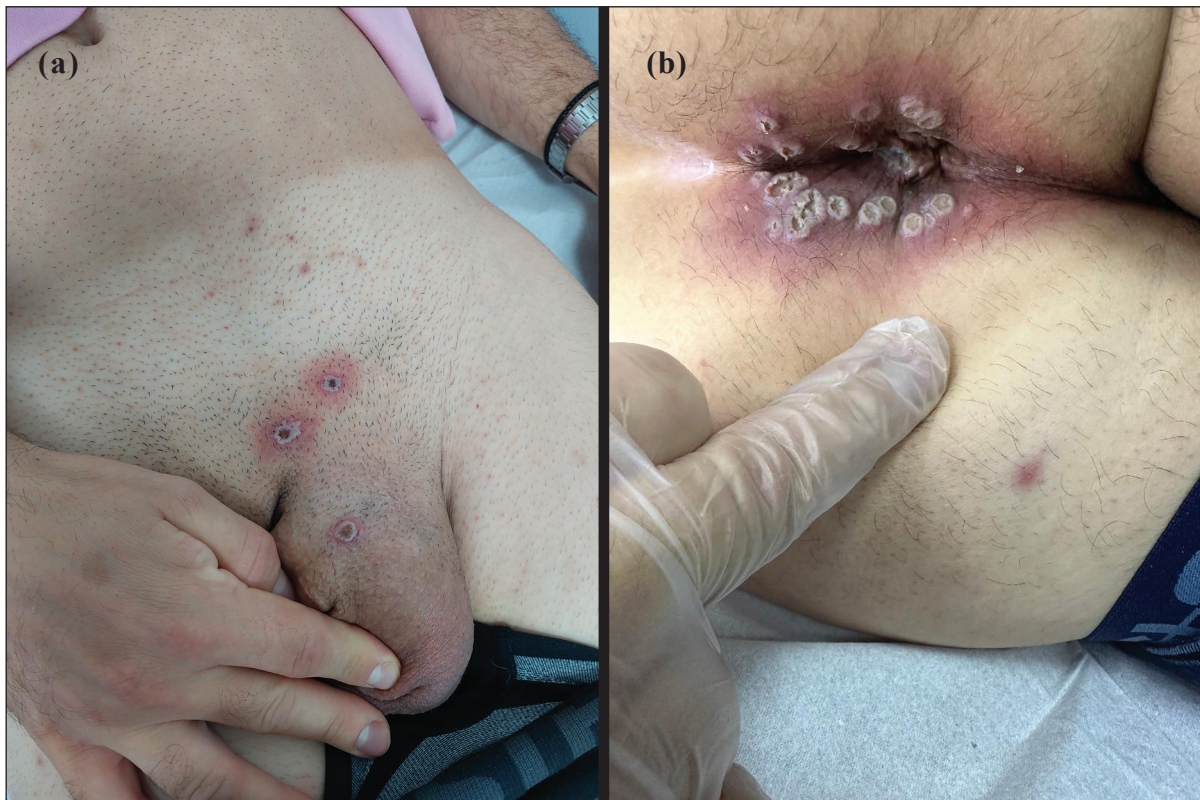
First on the list of differential diagnosis stands smallpox, since many clinical features of the latter are similar to mpox. Key points for clinicians to distinguish mpox is early lymphadenopathy that usually appears at the same time with the onset of the fever (which is typically absent in smallpox infection) and slower maturation of skin lesions<sup>18</sup> (monkeypox lesions tend to be similar in size and present at the same evolution stage). Except for smallpox, differential diagnosis of mpox includes: chickenpox, generalized vaccinia, disseminated zoster, eczema herpeticum, disseminated herpes simplex, syphilis, yaws, scabies, rickettsialpox, measles, bacterial skin infections and drug-associated eruption.<sup>9</sup>

Mpox is usually a self-limited disease and its duration is estimated at 2 to 4 weeks.<sup>12</sup> The severity of illness can be determined by many factors such as the initial health of the individual i.e. immunocompro-



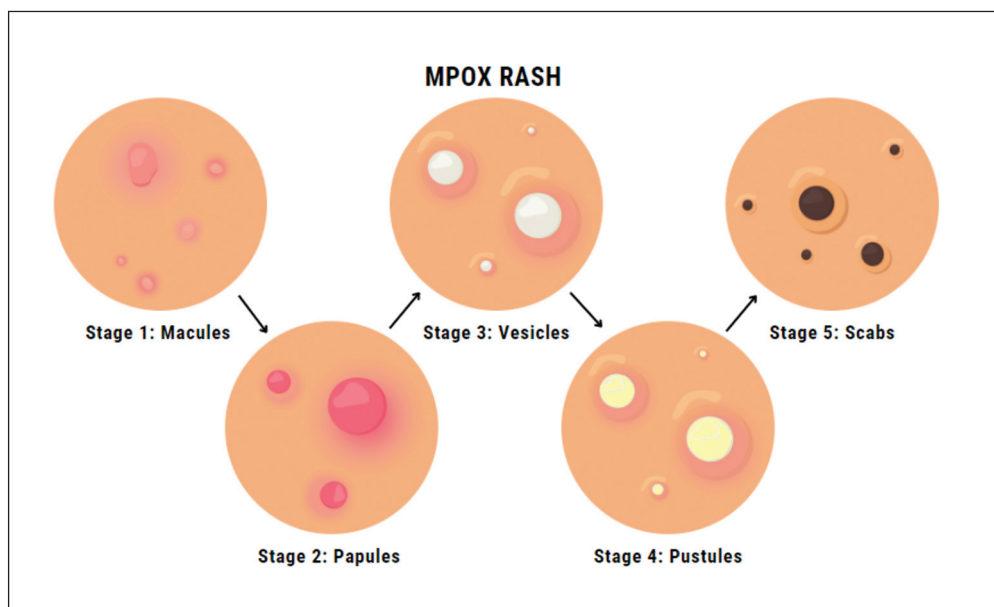


**Figure 1** Pathways of mpox transmission.



**Figure 2** Skin lesions in the genital area (a) and the anus (b).





**Figure 3** Evolution of the skin lesions due to mpxo infection.

mised patients are disproportionately severely affected in comparison with non-immunocompromised patients, but also the clade of mpox virus. Concerning the latter, clade I has been associated with a more severe form of the disease and higher mortality.<sup>6</sup> Fatality rate for clade II is less than 1% and on the other hand fatality rate for clade I is estimated up to 11% in unvaccinated kids.<sup>9</sup> Patients suffering with mpox might experience complications such as mouth lesions leading to deteriorated nutrition, secondary bacterial infections of the skin lesions, pneumonitis, conjunctivitis or keratitis and hardly ever sepsis and septic shock. On the contrary, the existence of asymptomatic mpox infection is not impossible.<sup>19</sup> The asymptomatic patients don't know about their status and can transmit the disease to their healthy close contacts.

## Diagnosis

Diagnosis of mpox is made on the basis of phenotypic methods, namely medical signs and reported symptoms, and genetic methods. Among diagnostic laboratory tests the golden standard is Polymerase Chain Reaction (PCR), given its high sensitivity and specificity.<sup>20</sup> Clinicians should take samples from skin lesions, namely the roof or fluid from vesicles and pustules, and dry crusts, keep them in a dry, sterile tube and send them to a laboratory. PCR blood tests are

usually inconclusive since MPV stays in blood only a short time.

## Clinical management

Patients with mild mpox usually recover without medical intervention. However, sometimes they need supportive care or/and pain relief medication.<sup>21</sup> Regarding the first, supportive care includes maintenance of adequate fluid balance, hemodynamic support, supplemental oxygen, treatment of bacterial superinfections of skin lesions.<sup>21</sup> Regarding the second, clinicians should consider acetaminophen, NSAIDs and topical steroids and anesthetics such as lidocaine.

Regarding antiviral therapy, there is no treatment approved specifically for mpox. However, there is evidence that antiviral agents that are effective against variola virus are also effective against mpox virus.<sup>21</sup> Those are *tecovirimat*, *cidofovir* and *brincidofovir*, a prodrug of *cidofovir*, conjugated with a lipid molecule.<sup>21</sup>

*Tecovirimat*. Clinicians should consider *tecovirimat* as the treatment of choice. *Tecovirimat*, also known as TPOXX or ST-246, is an inhibitor of the orthopoxvirus VP37 envelope wrapping protein, preventing replication and dissemination of the virus into the host.<sup>22</sup> In mid-July 2018, the United States Food and Drug Administration (FDA) approved TPOXX as the first drug

with an indication for treatment of smallpox in adults and children,<sup>23</sup> and in January 2022, the European Medicines Agency, also, approved TPOXX for treatment of smallpox and cowpox.<sup>24</sup> TPOXX is not approved as a treatment for other orthopoxvirus infections including mpox since there is no data on its efficacy in humans. But, a non-research expanded access Investigational New Drug protocol (EA-IND), held by CDC, permits clinicians to use TPOXX to treat mpox.<sup>25</sup> Also, since September 2022, there has been an ongoing clinical trial, named STOMP.<sup>26</sup> The latter is a randomized, placebo-controlled, double-blind study to evaluate the effectiveness of tecovirimat for the treatment of people with laboratory-confirmed or presumptive mpox disease.<sup>26</sup> Tecovirimat is available as oral capsules (each capsule contains 200mg TPOXX) and injection vials.<sup>25</sup> Based on EA-IND protocol, the recommended dose is calculated based on the patient's weight.<sup>25</sup> For instance, for patients weighing from 40 kg to < 120 kg, the recommended oral dose is 600 mg (3 capsules) every 12 hours.<sup>25</sup> The standard duration of therapy is 14 days.<sup>25</sup> The most frequently reported adverse reactions of TPOXX were headache, nausea, abdominal pain and vomiting, if TPOXX was taken orally, and pain, swelling, erythema and extravasation at infusion site and headache, if TPOXX was taken IV.<sup>25</sup>

**Cidofovir / Brincidofovir.** In the mid 1996, FDA approved the cidofovir, also known as Vistide, as a treatment option for CMV retinitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS).<sup>27</sup> Cidofovir seems to be effective against orthopoxviruses in vitro and animal studies but there is no data on its effectiveness in human mpox. Brincidofovir, also known as CMX001 or Tembexa, is a prodrug of cidofovir. In mid-June 2021, CMX001 was approved by the FDA for the treatment of human smallpox disease in both adults and children, including neonates.<sup>28</sup>

Except for antiviral agents, *vaccinia immune globulin (VIGIV)* is another potential treatment of mpox. DFA approved VIGIV for the treatment of complications due to vaccinia vaccination.<sup>29</sup> Lately, CDC holds an expanded access IND protocol that allows the use of VIGIV for the treatment of orthopoxviruses (including mpox) in an outbreak.<sup>30</sup>

## Prevention and immunization

According to CDC, individuals should be aware of several simple precautions to reduce their chances of contracting mpox virus.<sup>31</sup> Those are the following:

1. Avoiding close contact with animals that are able to harbor mpox (rodents and primates) and with individuals who are diagnosed with mpox or have a rash that looks like mpox. Also, avoiding objects that were used by the latter.
2. Having proper hand hygiene.
3. Getting vaccinated

Since the ongoing epidemic is spreading primarily through sexual contact among men who have sex with men (MSM), the latter should adapt some aspects of their sex life, apart the aforementioned protective measures.<sup>32</sup> MSM should take a temporary break from sex activities until two weeks after their second dose have passed, limit their number of sex partners, use condoms in order to lower the risk of direct contact with groin and genital lesions etc. There can be no doubt raising public awareness and educational interventions should be of high priority.

There are two available vaccines against mpox: Modified Vaccinia Ankara (MVA) vaccine, known as JYNNEOS in USA, IMVANEX in Europe, and IMVAMUNE in Canada and ACAM2000 vaccine. The first is a third-generation vaccine and contains an attenuated strain of the vaccinia virus. In August 2022, the FDA issued an emergency use authorization for this vaccine to be injected intradermally in individuals aged 18 years and older who are at high risk for mpox infection.<sup>33</sup> The first dose gives some protection against mpox, but in order to provide stronger protection, the vaccine should be administered as two doses given four weeks apart.<sup>34</sup> The safety profile of this vaccine seems to be excellent. It can be used individuals with immunocompromising conditions.<sup>33</sup> The second is licensed by FDA to be used against smallpox but it can be used under an expanded-access investigational new drug (IND) application through the CDC.<sup>35</sup> The adverse effects associated with ACAM2000 vaccine seems to be more than the adverse effects of MVA vaccine, including myopericarditis/pericarditis. ACAM2000 is contraindicated in immunocompromised individuals.

## Conclusion

Nowadays, since we live in a globalized world, we should not ignore neglected tropical diseases. Mpox has been declared as a public health emergency. Individuals all over the world, especially health professionals and high-risk populations, should be concerned and well informed about the current situation, placing emphasis on the preventive measurements, in order to impede the increase of mpox burden.



## Περίληψη

### Λοίμωξη από ιό της ευλογιάς των πιθήκων (monkeypox, mpox): ανασκόπηση της βιβλιογραφίας με αφορμή τη συνεχιζόμενη, πολυεθνική έξαρση της νόσου

Παναγιώτης Τουμάσης<sup>1</sup>, Βασίλειος Παπαρίζος<sup>2</sup>, Γεωργία Βρυώνη\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

<sup>2</sup>Μονάδα Ειδικών Λοιμώξεων, 1η Πανεπιστημιακή Δερματολογική Κλινική, Νοσοκομείο Δερματικών και Αφροδισίων Νοσημάτων «Α. Συγγρός», Αθήνα.

\*Υπεύθυνος αλληλογραφίας

Η έξαρση της λοίμωξης mpox, τόσο σε ενδημικές όσο και σε μη ενδημικές περιοχές, αναδεικνύεται ως μια εξελισσόμενη απειλή για την δημόσια υγεία παγκοσμίως. Σκοπό της παρούσας ανασκόπησης αποτελεί η υπογράμμιση των βασικών σημείων σχετικά με τη λοίμωξη. Η νόσος mpox είναι ζωνόσος, η οποία προκαλείται από τον ιό MPV, έναν DNA ιό που ανήκει στο γένος *Orthoroxvirus*. Υπάρχουν δύο πιθανοί οδοί μετάδοσης: από ζώα στον άνθρωπο και από άνθρωπο σε άνθρωπο. Στη τωρινή επιδημία, η νόσος εξαπλώθηκε κυρίως σε άνδρες που κάνουν σεξ με άνδρες. Τα πρώιμα συμπτώματα και σημεία της νόσου δεν είναι ειδικά αλλά η επακόλουθη ανάπτυξη δερματικών βλαβών είναι χαρακτηριστική. Η διαγνωστική μέθοδος που προτιμάται είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) σε δείγματα δερματικών βλαβών. Η διαχείριση της νόσου περιλαμβάνει υποστηρικτική θεραπεία και αναλγητική αγωγή. Δεν υπάρχει ειδική θεραπεία για την νόσο mpox. Εντούτοις, υπάρχουν ενδείξεις πως αντιικές ουσίες που είναι αποτελεσματικές έναντι του ιού της ευλογιάς είναι αποτελεσματικές και για τον ιό MPV. Υπάρχουν αρκετά απλά μέτρα πρόληψης της νόσου mpox, συμπεριλαμβανομένου του εμβολιασμού.



**Λέξεις κλειδιά**

mpox, έξαρση, επιδημία



## References

- World Health Organization. (n.d.). WHO recommends new name for Monkeypox disease. World Health Organization. Retrieved January 5, 2023, from <https://www.who.int/news/item/28-11-2022-who-recommends-new-name-for-monkeypox-disease>
- Magnus PV, Andersen EK, Petersen KB, Birch-Andersen A. A pox-like disease in cynomolgus monkeys. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica* 1959; 46:156-176.
- Breman JG, Ruti K, Steniowski MV, Zanotto E, Gromyko AI, Arita I, & World Health Organization. (1980). Human monkeypox 1970-1979/by JG Bremen, Kalisa-Ruti, MV Steniowski, E. Zanotto, AI Gromyko and I. Arita.
- World Health Organization. (n.d.). Mpox (Monkeypox) outbreak 2022. World Health Organization. Retrieved January 5, 2023, from <https://www.who.int/emergencies/situations/monkeypox-oubreak-2022>
- Iñigo Martínez J, Gil Montalbán E, Jiménez Bueno S, Martín Martínez F, Nieto Juliá A, Sánchez Díaz J, et al. Monkeypox outbreak predominantly affecting men who have sex with men, Madrid, Spain, 26 April to 16 June 2022. *Euro Surveill* 2022; 27:2200471.
- Lansiaux E, Jain N, Laivacuma S, Reinis A. The virology of human monkeypox virus (hMPXV): A brief overview. *Virus Res* 2022; 322:198932.
- Gigante CM, Korber B, Seabolt MH, Wilkins K, Davidson W, Rao AK, et al. Multiple lineages of monkeypox virus detected in the United States, 2021-2022. *Science* 2022; 378:560-565..
- Branda F, Pierini M, Mazzoli S. Monkeypox: Early estimation of basic reproduction number R0 in Europe. *J Med Virol* 2023; 95:e28270.
- Moore MJ, Rathish B, Zahra F. Mpox (Monkeypox) [Updated 2022 Nov 30]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK574519/>
- Alakunle E, Moens U, Nchinda G, Okeke MI. Monkeypox Virus in Nigeria: Infection Biology, Epidemiology, and Evolution. *Viruses* 2020; 12:1257.
- Kugelman JR, Johnston SC, Mulembakani PM, Kisalu N, Lee MS, Koroleva G, et al. Genomic variability of monkeypox virus among humans, Democratic Republic of the Congo. *Emerg Infect Dis* 2014; 20:232-239.
- World Health Organization. (n.d.). Monkeypox transmission . World Health Organization. Retrieved January 9, 2023, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/monkeypox>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2022, October 14). Clinical considerations for Mpox in people who are pregnant or breastfeeding. Centers for Disease Control and Prevention. Retrieved January 9, 2023, from <https://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/clinicians/pregnancy.html>
- WHO disease outbreak news. Monkeypox - United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland. 18 May, 2022. Available at: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreaknews/item/2022-DON383>.
- Liu X, Zhu Z, He Y, Lim JW, Lane B, Wang H, et al. Monkeypox claims new victims: the outbreak in men who have sex with men. *Infect Dis Poverty* 2022; 11:84.
- NHS. (n.d.). Monkeypox. NHS choices. Retrieved January 10, 2023, from <https://www.nhs.uk/conditions/monkeypox/>
- Petersen E, Kantele A, Koopmans M, Asogun D, Yinka-Ogunleye A, et al. Human Monkeypox: Epidemiologic and Clinical Characteristics, Diagnosis, and Prevention. *Infect Dis Clin North Am* 2019; 33:1027-1043.
- Jezek Z, Szczeniowski M, Paluku KM, Mutombo M, Grab B. Human monkeypox: confusion with chickenpox. *Acta Trop* 1988; 45:297-307.
- De Baetselier I, Van Dijck C, Kenyon C, Coppens J, Michiels J, de Block T, et al. Retrospective detection of asymptomatic monkeypox virus infections among male sexual health clinic attendees in Belgium. *Nat Med* 2022; 28:2288-2292.
- Patel M, Adnan M, Aldarhami A, Bazaid AS, Saeedi NH, Alkayyal AA, et al. Current Insights into Diagnosis, Prevention Strategies, Treatment, Therapeutic Targets, and Challenges of Monkeypox (Mpox) Infections in Human Populations. *Life* 2023; 13:249.
- Centers for Disease Control and Prevention. Treatment Information for Healthcare Professionals. Available at: <https://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/clinicians/treatment.html>
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 16124688, Tecovirimat. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tecovirimat>. Accessed Jan. 2, 2023.
- U.S Food & Drug Administration . FDA approves the first drug with an indication for treatment of smallpox. 2018. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-drug-indication-treatment-smallpox>
- European Medicines Agency. Tecovirimat SIGA. 2022. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/tecovirimat-siga>.
- Centers for Disease Control and Prevention. Guidance for Tecovirimat Use Under Expanded Access Investigational New Drug Protocol during 2022 U.S. Monkeypox Cases. Available at: <https://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/clinicians/Tecovirimat.html>.

26. ClinicalTrials.gov. Study of Tecovirimat for Human Monkeypox Virus (STOMP). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05534984>
27. FDA approves cidofovir for treatment of CMV retinitis. Food and Drug Administration. *J Int Assoc Physicians AIDS Care*. 1996 Aug;2(8):30. PMID: 11363758.
28. US Food and Drug Administration. FDA approves drug to treat smallpox. Rockville, MD: US Food and Drug Administration; June 4, 2021 (News Release). Available at: <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fda-approves-drug-treat-smallpox>.
29. <https://www.fda.gov/media/78174/download>
30. Centers for Disease Control and Prevention. Expanded Access IND Protocol: Use of Vaccinia Immune Globulin Intravenous (VIGIV, CNJ-016) for Treatment of Human Orthopoxvirus Infection in Adults and Children. Available at: <https://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/pdf/VIGIV-IND-Protocol.pdf>
31. CDC. “Mpox in the U.S.” Centers for Disease Control and Prevention, 31 Oct. 2022, [www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/prevention/protect-yourself.html](http://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/prevention/protect-yourself.html).
32. CDC. “Mpox in the U.S.” Centers for Disease Control and Prevention, 16 Dec. 2022, [www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/prevention/sexual-health.html](http://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/prevention/sexual-health.html).
33. “Monkeypox Update: FDA Authorizes Emergency Use of JYNNEOS Vaccine to Increase Vaccine Supply.” Monkeypox Update: FDA Authorizes Emergency Use of JYNNEOS Vaccine to Increase Vaccine Supply | FDA, 9 Aug. 2022, [www.fda.gov/news-events/press-announcements/monkeypox-update-fda-authorizes-emergency-use-jynneos-vaccine-increase-vaccine-supply](http://www.fda.gov/news-events/press-announcements/monkeypox-update-fda-authorizes-emergency-use-jynneos-vaccine-increase-vaccine-supply).
34. Kuehn BM. Single Monkeypox Vaccine Dose Provides Some Protection. *JAMA* 2022; 328:1801.
35. CDC. “ACAM 2000 Vaccine.” Centers for Disease Control and Prevention, 21 Oct. 2022, [www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/interim-considerations/acam2000-vaccine.html](http://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/interim-considerations/acam2000-vaccine.html).





## Multi-locus sequence typing (MLST) of clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from systemic infections in two hospitals in Quito-Ecuador

Doménica Andrade<sup>1</sup>, Tatiana Lara<sup>2</sup>, Marcelo Grijalva<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Sanidad Humana y Animal – GISAH, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Sangolquí, Ecuador.

<sup>2</sup>Centro de Nanociencia y Nanotecnología, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Sangolquí, Ecuador.



### Summary

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections are currently a serious clinical and epidemiological problem. This opportunistic pathogen has been commonly associated with hospital infections. However, community variants of high infectivity have recently appeared and have raised concerns due to their virulence. In this research, twenty-six clinical isolates from blood cultures belonging to patients from two reference hospitals in Ecuador, were analyzed using Multilocus Sequence Typing (MLST). PCR assays were standardized and optimized for the housekeeping MLST genes (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpiA*, and *yqiL*) and for the cyclic sequencing reaction required in the Sanger sequencing method, along with necessary purification proce-

dures. The isolates' allelic variants and their sequence types (ST) were analyzed using the PubMLST database. Eight previously undetermined sequence types (UST) were obtained, along with two alleles with point mutations. The analysis of these data using Maximum Parsimony Trees and Minimum Spanning Trees (MSTree) showed no closer phylogenetic associations for the isolates studied and the most commonly reported clones, demonstrating the emergence of new variants in Ecuador, presumably community-type ones. The present study may contribute to timely clinical and epidemiological surveillance of MRSA infections at a local level.



### Key words

*Staphylococcus aureus*, Antibiotic resistance, Multilocus sequence typing

### Corresponding author

Marcelo Grijalva, M.D., Ph.D.,  
Phone: +593 984 015 558,  
Email: rmgrijalva@espe.edu.ec

## 1. Introduction

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is an opportunistic Gram-positive pathogen with the ability to invade tissues and cause a wide range of infections, including serious ones such as osteomyelitis, endocarditis, necrotizing pneumonia, and bacteremia.<sup>1-3</sup> Particularly, MRSA bacteremia represents a challenge, as it can evolve into metastatic infections and life-threatening complications, with higher morbidity and mortality rates.<sup>4,5</sup>

The World Health Organization,<sup>6</sup> has included MRSA among high-priority microorganisms, with a 64% higher probability of death in patients carrying these strains compared to those infected by non-resistant strains. Moreover, MRSA infections are currently considered the leading cause of morbidity and mortality among antibiotic-resistant pathogens.<sup>7,8</sup>

MRSA resistance to methicillin and ceftioxin is conferred by the acquisition of *mecA* gene within the Staphylococcal Cassette Chromosome (SCCmec).<sup>1</sup> The *mecA* gene encodes an alternative penicillin-binding protein (PBP2a) which avoids the  $\beta$ -lactam antibiotics binding to the bacterial cell wall, thereby preventing the cell membrane collapse.<sup>9,10</sup>

MRSA spreads by direct or indirect contact and has increased its presence significantly in hospitals and

communities. Hospital and community-acquired MRSA strains (HA and CA, respectively) have different types of SCCmec cassettes and express different genes that may be associated with the strain's virulent phenotype and spread success.<sup>11-13</sup> Some strains are even known to be restricted to a geographical area, while others have pandemic spread.<sup>7</sup> In Ecuador, there is a limited number of studies related to HA and CA MRSA strains and even fewer related to their evolution, epidemiology, and virulence.<sup>14-16</sup> Therefore, efforts are needed to address these gaps and improve diagnostic, treatment, and surveillance strategies for MRSA bacterial infections and their complications.<sup>17</sup>

Molecular typing has proven to be an important tool for monitoring the distribution, dissemination, and evolution of bacterial strains and their clones.<sup>18</sup> In this way, the Multi-Locus Sequence Typing (MLST) technique is widely used for its unambiguous capacity for bacterial strain characterization based on internal sequencing of certain housekeeping genes. Using MLST, housekeeping gene sequences for every isolate can be assigned to defined alleles. The set of genes for each isolate generates a specific allelic profile known as Sequence Type (ST).<sup>19</sup> The MLST technique provides easy reproducibility and interpretation, while allowing the acquisition of significant amounts of data and high discriminatory power.<sup>20</sup>



The aim of the study was to characterize a collection of MRSA isolates from blood cultures of patients with bacteremia. Patients belonged to intensive care units of two tertiary care hospitals in Quito. We used the MLST typing tool with a seven-gene panel and the Sanger sequencing technique. We analyzed the isolates' evolutionary relationships and their association to specific clonal complexes.

## 2. Materials and methods

### 1. Recovery of Clinical Isolates

The collection was obtained from blood cultures of ICU patients belonging to two tertiary-care hospitals, the Eugenio Espejo (HEE) Hospital from the Ministry of Health of Ecuador and the Carlos Andrade Marín (HCAM) Hospital, the largest health facility of the Ecuadorian Institute of Social Security (IESS). The hospitals serve different populations in Quito and are referral facilities for different provinces in the country.

The initial collection included fifty-three MRSA isolates that were cryopreserved in our laboratory at Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. For isolates recovery, cryovials were placed at room temperature for one hour and then incubated at 36°C for 15 minutes. Each isolate was then inoculated to separate nutrient broth (Merck), nutrient agar (Merck), TSA (Beckton, Dickinson, and Company), and 5% blood agar (Beckton, Dickinson, and Company).<sup>21,22</sup> The cultures were incubated at 36°C for 20 hours. Later, Gram staining was performed on those dishes with growth. The presence of Gram-positive cocci was verified using the optical microscope. Gram-positive cocci isolates were cryopreserved in BHI (Liofilchem) supplemented with 20% glycerol and stored in cryovials (CryoBank Mixed, COPAN Diagnostics Inc.) at -80°C.<sup>23</sup>

### 2. Molecular Characterization

A multiplex PCR assay was applied to the recovered isolates to confirm *S. aureus* identity (*nuc* and *16S rRNA* genes) and their methicillin-resistant or methicillin-susceptible antimicrobial (MRSA or MSSA) profiles (*mecA* gene). For this purpose, DNA extraction protocols and multiplex *nuc*, *16S rRNA*, and *mecA* PCR protocols previously reported by Noboa, 2020<sup>24</sup> were used. The PCR products were visualized by electrophoresis on 2% agarose gels (Invitrogen).

### 3. MLST technique

#### 2.1.1. End-point PCR

The GoTaq Flexi Polymerase kit (Promega) was used for the end-point PCR (final reaction volume of 15

μL),<sup>25</sup> following the Enright et al. procedure for 7 MLST housekeeping genes (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpiA*, and *yqiL*).<sup>26</sup> The thermocycler program parameters were taken from Saunders and Holmes,<sup>27</sup> and used with slight modifications. The presence of the amplified genes was verified by electrophoresis on ultra-pure agarose gels (Invitrogen) at 2%.

Amplicons were subjected to a purification process with the PureLink Quick PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific).<sup>28</sup> The purified DNA was stored at 4°C or -20° for short or long-term storage, respectively.

#### 2.1.2. Sanger sequencing

The cyclic sequencing reaction was performed with the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, 2016).<sup>29</sup> The forward primer was used for almost all housekeeping genes reactions, except for the *pta* and *yqiL* genes where forward and reverse sequencing was necessary. Sequencing reaction components and the program used were standardized following the manufacturer's instructions.<sup>29</sup> For the purification of cyclic PCR products, we used a Sephadex G-50 method described by Chen and Yung.<sup>30</sup>

The sequencing electrophoresis was performed using the 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) with a 36cm capillary array (Applied Biosystems, CA). Raw fluorescence data were analyzed using the Sequencer Analysis Software v 5.1 (Applied Biosystems, 2003, USA).

### 4. Bioinformatic Analysis

#### 2.4.1 Sequence curation

Software packages Geneious Prime v 10.1.2,<sup>31</sup> and SnapGene 5.3.2 (GSL Biotech, IL) were employed to perform sequence curation and analysis.

#### 2.4.2 Identification of allelic numbers and sequence types

The allelic numbers for each locus were obtained using the University of Oxford Pub-MLST database (available on the site [https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst\\_saureus\\_seqdef](https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_saureus_seqdef)). Alleles obtained for each locus were downloaded and analyzed using the Geneious Prime 2020.0.4 software. The alignment with the sequences of the isolate in question was performed using the MUSCLE ALIGNMENT tool.<sup>32</sup> The threshold to choose the best allelic number was equal to or greater than 98.2% (identity assignment). And finally, the combination of the 7 allelic numbers for each isolate was used to obtain its sequence type using the same database.

#### 2.4.3 Phylogenetic analysis

Sequence alignments for each gene and for the con-



catenation of the 7 loci were performed with the ClustalW algorithm from the "Align" tool in MEGA-X.<sup>33</sup> The evolutionary history was inferred using the UPGMA method to obtain the optimal tree for each gene and for the concatenated sequences of all genes.<sup>34,35</sup> Evolutionary distances were computed using the p-distance method,<sup>36</sup> and were expressed as the number of base differences per site. Central STs sequences belonging to the most frequently found clonal complexes in the PubMLST database were used for comparison through a Minimum Spanning Tree,<sup>19</sup> which was built using the online software Phyloviz (<http://www.phyloviz.net/>).<sup>37</sup>

### 3. Results and Discussion

Although 53 isolates were initially available, their preservation at different temperatures for extended periods had an impact on the efficiency of culture restoration. The maintenance of bacteria at temperatures below 4°C for extended periods, induces the accumulation of mutations that disrupt the cell's transcription and translation.<sup>38</sup> This is reflected in changes in the thickness of the cell wall and reduction of enzyme activity, but above all, an increase in membrane permeability caused by dehydration and cell shrinkage.<sup>39</sup>

For *S.aureus* identification, we targeted the *16SrRNA* gene, which allows the identification of the minor subunit component of ribosomes in prokaryotes,<sup>40</sup> along with the *nuc* gene that has long been used for the identification of *Staphylococcus aureus*, as this encodes a thermonuclease characteristic of this species.<sup>21</sup> Also, a region of the *mecA* gene was amplified as it encodes the PBP2a protein, which grants methicillin resistance.<sup>41</sup> Isolates that did not amplify any gene of interest, were removed from the study. Regarding the presence of *mecA* gene, we observed no amplification for the *nuc* gene in five isolates. Hoegh et al.<sup>42</sup> previously described that the absence of the *nuc* gene in these cases might be caused by partial deletions of the gene, resulting in a *nuc*-negative PCR. These isolates were also discarded for next processing. Later, we successfully amplified the seven housekeeping genes for the 26 remaining isolates that showed the MRSA ARM pattern.

Our study successfully assigned an allelic variant for each gene sequence, but no sequence type (ST) could be obtained for any isolate. The new allelic combinations were called undetermined sequences (UST). In this way, the isolates were pooled into 8 USTs with a preponderance of UST-1 and UST-4 (Table 1). It has been reported that in South American isolates, the

predominantly circulating sequence types are ST-1, ST-5, and ST-8.<sup>20</sup> In Ecuador, ST-8 (related to USA300), ST-45, ST-30, ST-5, and ST-22 have been reported along with epidemic clones such as the Brazilian (ST-239-MRSA-III), pediatric (ST-5-MRSA-IV), and the New York/Japan (ST-5-MRSA-II) ones.<sup>16</sup> Nevertheless, other studies carried out in LATAM showed the appearance of new allele combinations. Monteiro et al.,<sup>43</sup> discovered 9 new STs in Brazil, while ST-8 predominates in Chile, but new allele combinations were also found.<sup>44</sup> Even though two Argentine studies found a predominance of ST-5 and ST-30, they also described several non-typeable strains.<sup>45</sup>

The epidemiology of *S. aureus* reveals that only a few STs tend to predominate in studies worldwide.<sup>5</sup> New clones and ST could appear, however, due to adaptation and also with new studies being conducted, particularly in our region, where large-scale MLST studies are still scarce.

The emergence of new allelic variant combinations involves an evolutionary process that allows the bacterium to adapt to epigenetic variables in order to survive.<sup>46</sup> This fact, along with the low number of isolates reported in the database from the South American area (393 in total, 1 from Ecuador), could support the appearance not only of new STs, but also of different clonal complexes and allele variation rates. Large-scale MRSA MLST analysis from different hospital and community sources will be needed to better understand the variety of STs circulating in the country.

The Table 1 shows the allelic variability among the seven genes studied. *ArcC*, *aroE*, *gmk* and *yqiL* genes presented greater variability, with 4 allelic possibilities each. The *glpF*, *pta* and *tpiA* genes had only 2 allelic variants, with the *glpF* gene being the most conserved since only one isolate had a different allele. In the research of Enright et al.,<sup>26</sup> the most diverse gene fragments corresponded to *arcC* and *aroE* and the most uniform were those of *glpF*. In the same way, the analysis carried out by Polveiro et al.,<sup>47</sup> demonstrated that *aroE*, *gmk* and *yqiL* were the genes with the highest diversity, showing polymorphic sites of 2.93%, 2.15%, and 2.90%, respectively, while *glpF*, *pta* and *tpiA* remained the ones with the lowest mutation rates, with 1.07%, 1.26% and 1.74%, respectively.

The allelic assignment of MLST genes revealed two isolates with one different point mutation each. The mutations were found in isolates X8 and R1, in *aroE* and *pta* genes, respectively (Figure. 1), and thus these two isolates were considered as single-locus variants (SLVs) of UST-1 with a 99.99% of similarity. Polymorphisms in metabolic genes of *S. aureus* are unexpectedly common and are generated by the adaptation of the bacterium to its environment to survive

**Table 1**

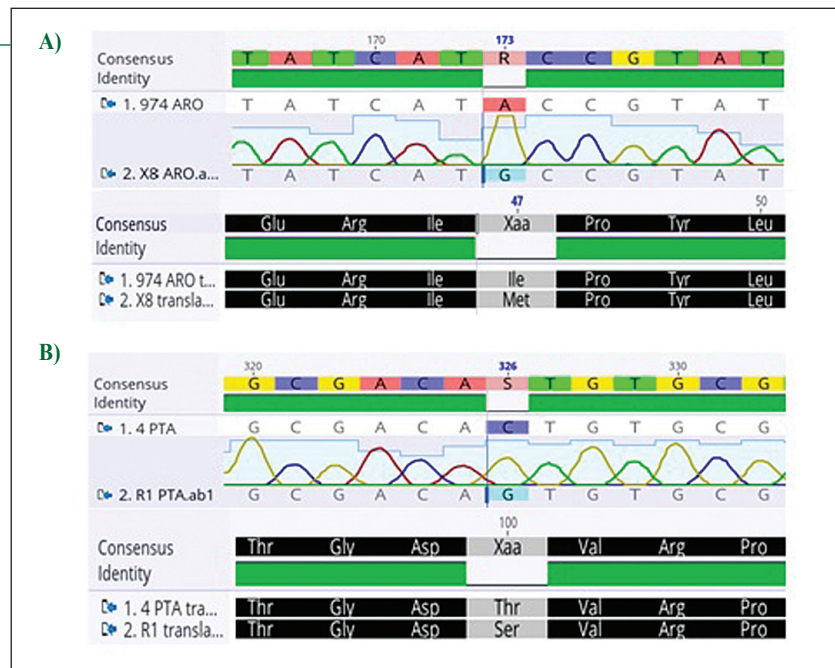
Allelic profiles of MLST genes (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpiA*, and *yqiL*) obtained for the 26 isolates analyzed. ST: Sequence Type; UST: Undetermined Sequence Type.

Strain	<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>pta</i>	<i>tpiA</i>	<i>yqiL</i>	ST
A11	892	974	933	78	4	819	989	UST-1
A17	892	974	933	78	4	819	989	UST-1
B5	892	974	933	78	4	819	989	UST-1
B7	892	974	933	78	4	819	989	UST-1
B8	892	974	933	78	4	819	989	UST-1
B9	892	974	933	78	4	819	989	UST-1
R5	892	974	933	78	4	819	989	UST-1
R9	892	974	933	78	4	819	989	UST-1
R10	838	974	933	78	4	819	989	UST-1
X9	892	974	933	78	4	819	989	UST-1
X10	892	974	933	78	4	819	989	UST-1
R1	892	974	933	78	New allele : 99% similarity with allele4	819	989	SLV-1 of UST-1
X8	892	New allele : 99% similarity with allele 974	933	78	4	819	989	SLV -2 of UST-1
A19	620	974	933	78	4	819	989	UST-2
A13	620	974	933	542	4	819	989	UST-3
A12	838	377	933	8	899	815	992	UST-4
A14	838	377	933	8	899	815	992	UST-4
A15	838	377	933	8	899	815	992	UST-4
B6	838	377	933	8	899	815	992	UST-4
B11	838	377	933	8	899	815	992	UST-4
R2	838	377	933	8	899	815	992	UST-4
R8	838	377	933	8	899	815	992	UST-4
A16	838	971	933	8	4	819	989	UST-5
A18	838	971	933	8	899	815	992	UST-6
R6	22	716	14	470	899	819	747	UST-7
B10	838	971	933	8	899	815	483	UST-8



**Figure 1**

Point mutations observed in the study and their translation products. A) Allelic variant with point mutation A→G at nucleotide 173 of the *aroE* gene in the X8 sample, non-synonymous mutation. B) Allelic variant with point mutation C→G at nucleotide 326 of the *pta* gene in sample R1, non-synonymous mutation.



stress, maintain its pathogenicity or adapt its growth. Furthermore, considering that the stored samples underwent several procedures from the sampling to the cryopreservation and the time elapsed from sampling to genotyping, point mutations in the bacterial genetic material might be expected.<sup>48,49</sup>

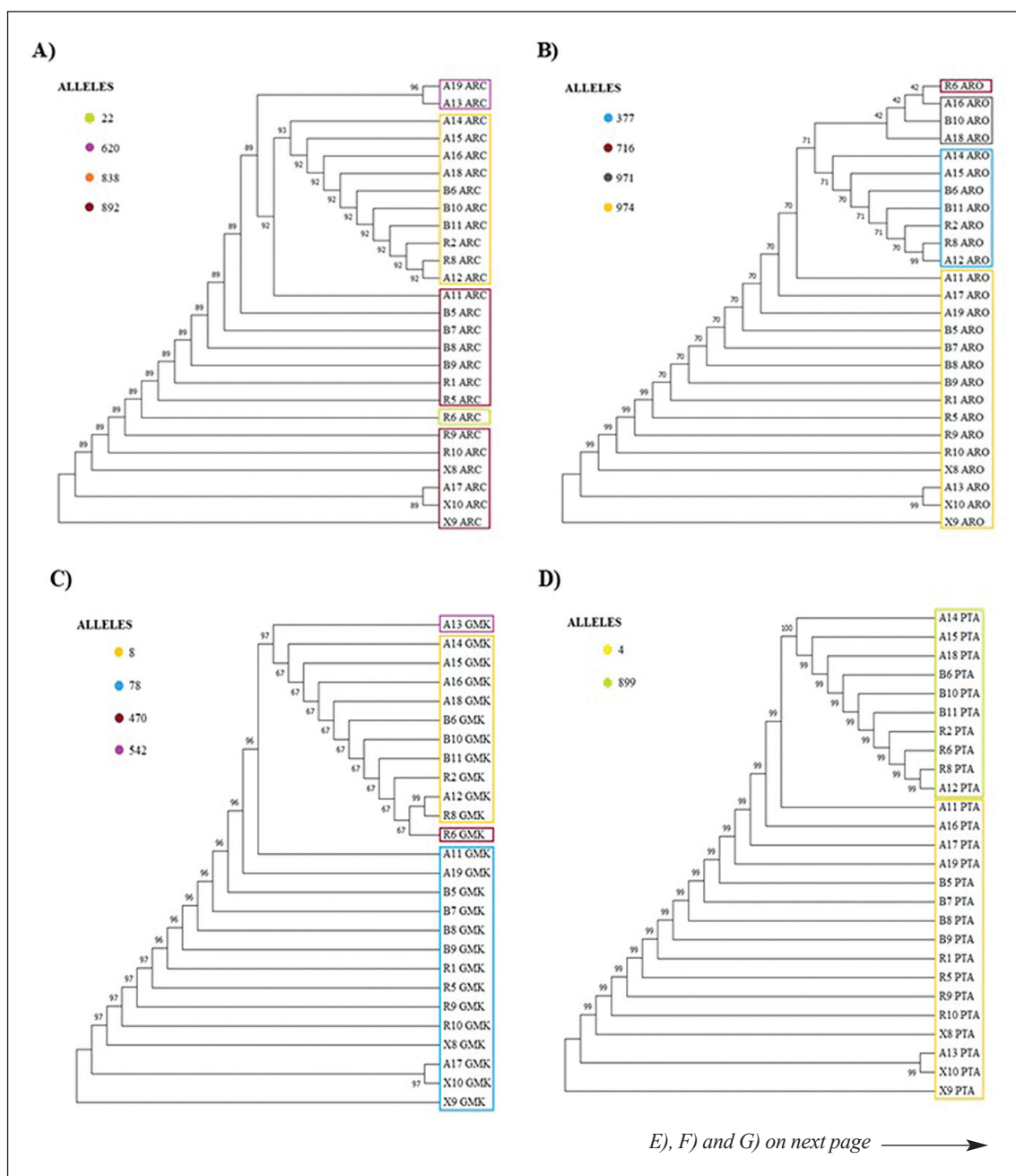
Mutations were confirmed by repeating both amplification and sequencing, including forward and reverse primers for each gene. Each mutation was translated to determine if it was synonymous or non-synonymous. Translated mutations present a variation in the encoded amino acid, which gives rise to altered proteins. Despite that, the BLAST analysis of the *aroE* gene mutation yielded 99.77% similarity to the identified shikimate dehydrogenase protein. In the case of the mutation found in the *pta* gene, a 99.97% similarity with the acetyltransferase phosphate protein was obtained.

As expected in each case, the alignments were analogous to the relevant metabolic proteins. It is important to consider the potential implications these mutations could have. They could affect the survival rate and the rate of extracellular acidification during host infection, also affecting the ability of the bacteria to form biofilms.<sup>50,51</sup>

The evolutionary relationships of each gene are evidenced in individual phylogenetic trees (Figure. 2, A-F), where isolates are grouped based on the alleles that were assigned by the database. The same analysis was conducted for the set of isolates using the concatenated MLST sequences (Figure. 2, G), where a

range of taxa was observed, suggesting the existence of many independent evolutionary events arising within the evolutionary history of each strain.<sup>52</sup> It is also remarkable that isolates provided by the same facility, are not related to each other in our trees, strengthening the argument that the isolates studied belong to CA-MRSA and are evolving individually. In their study, Florida et al.,<sup>53</sup> conclude that intraspecific evolutionary stories can be modeled by the isolate's lifestyle, which conditions their horizontal gene transfer possibilities, genome alterations, and selection of accessory genes. In turn, the pattern of bifurcations leads to the emergence of different taxa, grouped based on the USTs identified for each isolate. Although in this work the selected isolates could not be cataloged within specific clonal groups, cluster formation can be observed (Figure 2).

In the Minimum Spanning Tree (Figure.3), no close clonal relationship between our study isolates and the previously reported STs was found. Furthermore, the values of divergency presented in Table 2, show that ST-5 and ST-8 are the closest STs to the study group, USTs from 1 to 3, including the samples with mutations, are closely related to ST-8, while USTs from 4-8 have better correlation with ST-5. Interestingly, most of the isolates could not be grouped into specific clonal complexes (CC). Arévalo,<sup>54</sup> suggests that the divergence within isolates may be related to a spread of hospital strains (HA-MRSA) at the community level (CA-MRSA), where they acquire new genetic characteristics, including greater genetic variability. An increased prev-

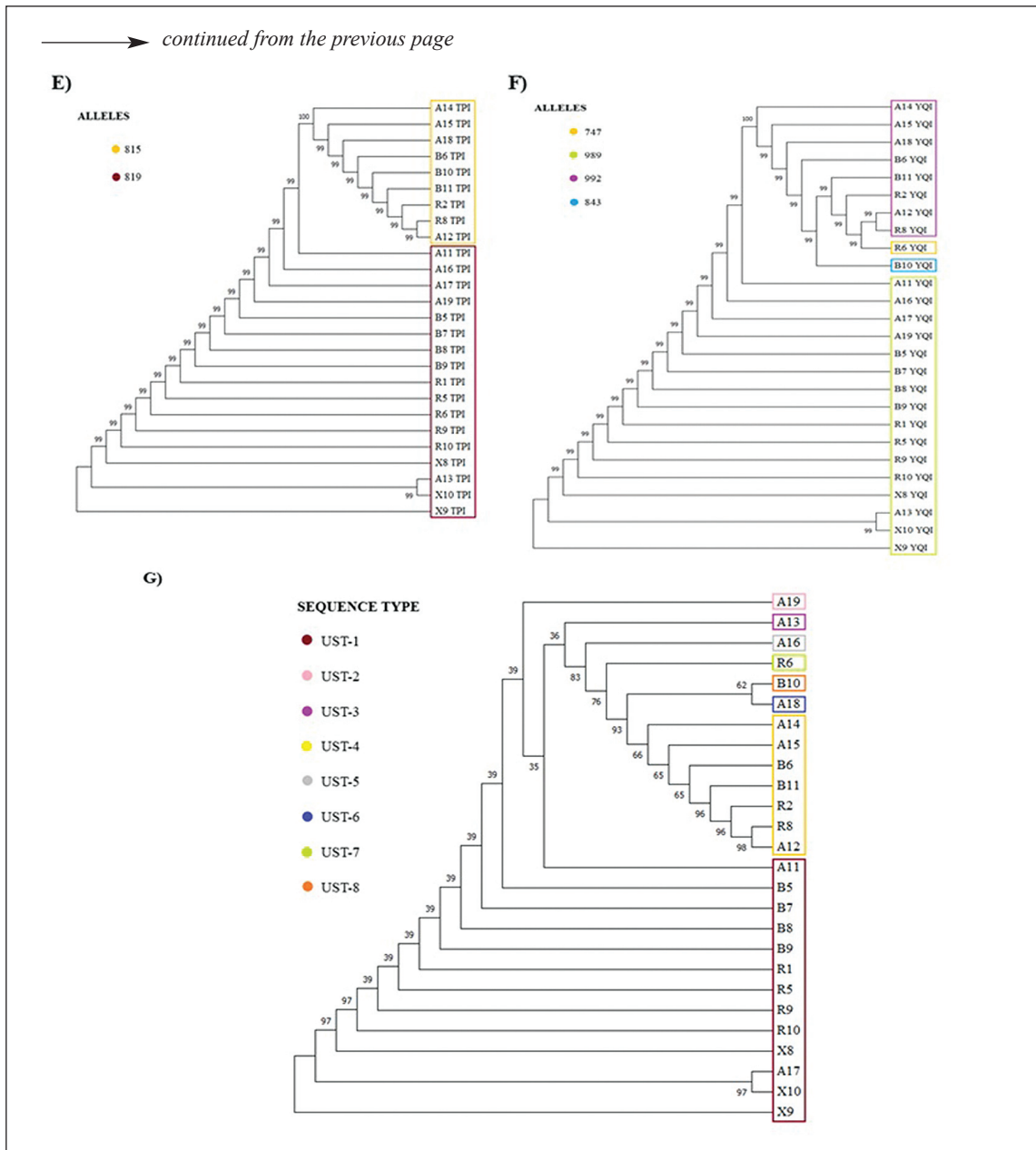


**Figure 2** Maximum Parsimony Trees obtained for A) *arcC* gene; B) *aroE* gene; C) *gmK* gene; D) *pta* gene; E) *tpiA* gene; F) *yqiL* gene and G) concatenated sequences of the 26 isolates. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (500 replicates) are shown next to the branches.

absence of CA-MRSA could generate a greater number of potentially multi-resistant and virulent variants. Data from studies in Brazil, Ecuador, Venezuela, and Colombia rate the CA-MRSA isolates at 27%.<sup>55</sup>

One of the most notable characteristics of MRSA clones in recent decades has been the spread of community strains over hospital strains, as well as the acquisition of new resistant genes and virulence factors

to improve their regulatory systems.<sup>56</sup> Lakhundi and Zhang agreed that HA-MRSA is primarily distributed in two clonal complexes around the world, whereas CA-MRSA is more dispersed between CC and has only a few genetic similarities. They also stated that due to the rapid evolution of MRSA adaptation, new strains may emerge. Furthermore, new clonal complexes may emerge as a result of genetic variation and recombina-



**Figure 2** Maximum Parsimony Trees obtained for A) *arcC* gene; B) *aroE* gene; C) *gmkg* gene; D) *pta* gene; E) *tpiA* gene; F) *yqiL* gene and G) concatenated sequences of the 26 isolates. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (500 replicates) are shown next to the branches.

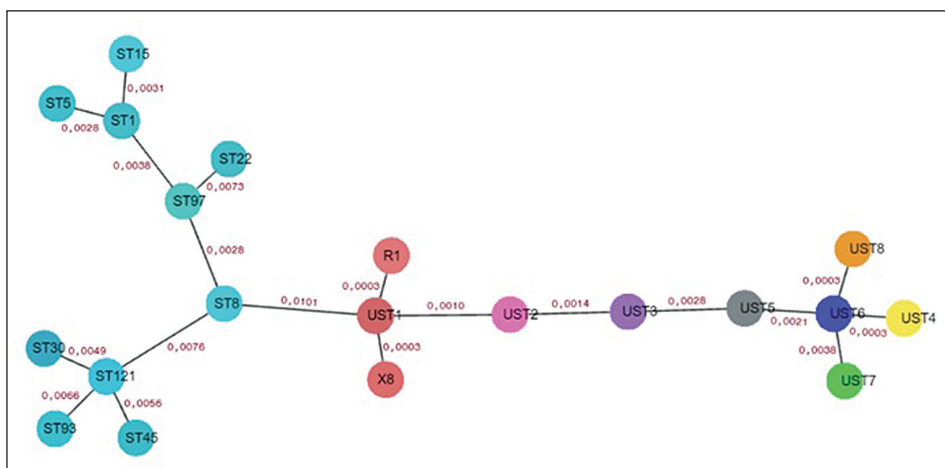
nation combined with strain demographic pressure, which can promote the replacement of successful strains with emerging new ones (a phenomenon called clonal replacement).<sup>57</sup>

#### 4. Conclusions

Molecular typing of MRSA isolates determined the

presence of eight new sequence types. No defined clonal complexes were found, nor was a significant relationship with previously described clones in the region demonstrated. These findings, as well as the variability of strain clonal complexes, could be attributed to CA-MRSA origin.

The existence of new allelic variants was evidenced by the identification of non-synonymous mutations in the *aroE* and *pta* gene alleles. New variants, as well



**Figure 3** Minimum Spanning Tree (MSTree) generated by goeBURST A) MSTree of 26 MRSA isolates of the present study; B) MST of 26 MRSA isolates of the present study compared to clonal complexes central clone.

**Table 2**

Estimates of Evolutionary Divergence between Sequences. The closest divergences between the isolates in this study and the central STs are highlighted.

	ST1	ST5	ST8	ST15	ST22	ST30	ST45	ST93	ST97	ST121	UST1	UST2	UST3	UST4	UST5	UST6	UST8	UST7	R1	X8
ST1	0,0000																			
ST5	0,0028	0,0000																		
ST8	0,0045	0,0052	0,0000																	
ST15	0,0031	0,0045	0,0056	0,0000																
ST22	0,0083	0,0076	0,0087	0,0094	0,0000															
ST30	0,0101	0,0094	0,0083	0,0104	0,0101	0,0000														
ST45	0,0087	0,0080	0,0090	0,0090	0,0094	0,0056	0,0000													
ST93	0,0128	0,0115	0,0104	0,0132	0,0135	0,0090	0,0094	0,0000												
ST97	0,0038	0,0066	0,0028	0,0062	0,0073	0,0090	0,0097	0,0118	0,0000											
ST121	0,0094	0,0087	0,0076	0,0097	0,0094	0,0049	0,0056	0,0066	0,0083	0,0000										
UST1	0,0146	0,0153	0,0101	0,0156	0,0187	0,0184	0,0191	0,0198	0,0128	0,0177	0,0000									
UST2	0,0156	0,0163	0,0111	0,0167	0,0198	0,0174	0,0194	0,0208	0,0139	0,0187	0,0010	0,0000								
UST3	0,0170	0,0149	0,0125	0,0180	0,0198	0,0167	0,0187	0,0201	0,0153	0,0180	0,0024	0,0014	0,0000							
UST4	0,0132	0,0104	0,0156	0,0149	0,0180	0,0198	0,0184	0,0212	0,0170	0,0191	0,0056	0,0066	0,0052	0,0000						
UST5	0,0149	0,0121	0,0132	0,0160	0,0170	0,0187	0,0174	0,0201	0,0153	0,0180	0,0031	0,0042	0,0028	0,0024	0,0000					
UST6	0,0128	0,0101	0,0153	0,0146	0,0177	0,0194	0,0180	0,0208	0,0167	0,0187	0,0052	0,0062	0,0049	0,0003	0,0021	0,0000				
UST8	0,0132	0,0104	0,0156	0,0149	0,0180	0,0198	0,0184	0,0212	0,0170	0,0191	0,0056	0,0066	0,0052	0,0007	0,0024	0,0003	0,0000			
UST7	0,0146	0,0139	0,0149	0,0170	0,0187	0,0191	0,0198	0,0212	0,0149	0,0184	0,0049	0,0059	0,0052	0,0042	0,0045	0,0038	0,0042	0,0000		
R1	0,0149	0,0156	0,0104	0,0160	0,0191	0,0187	0,0194	0,0201	0,0132	0,0180	0,0003	0,0014	0,0028	0,0059	0,0035	0,0056	0,0059	0,0052	0,0000	
X8	0,0149	0,0156	0,0104	0,0160	0,0191	0,0187	0,0194	0,0201	0,0132	0,0180	0,0003	0,0014	0,0028	0,0059	0,0035	0,0056	0,0059	0,0052	0,0007	0,0000

as new sequence types found in this study, should be reported to the PubMLST database.

The present study may contribute to timely clinical and epidemiological surveillance of MRSA infections at a local level. Nevertheless, it has limitations in terms of the number of isolates, and new larger-scale NGS-based investigations should follow as they can provide larger amplicon sizes. This might result in fewer differences in sequence coverage among alleles and an increased likelihood of higher numbers of mutations identified within each gene.

**Acknowledgments:** We would like to thank Francisco Flores, Judith Torres, Dayana Aguilar, and Kirsty Noboa for their helpful comments and guidance during the realization of this study.

**Declaration of conflict of interest:** The authors have no conflicts of interest to declare.

**Author agreement:** All authors have seen and approved the final version of the manuscript being submitted. The manuscript is an original work that has not been published before, and is not under consideration for publication elsewhere.



## Περίληψη

### Multi-locus sequence typing (MLST) of clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from systemic infections in two hospitals in Quito-Ecuador

Doménica Andrade<sup>1</sup>, Tatiana Lara<sup>2</sup>, Marcelo Grijalva\*<sup>1-2</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Sanidad Humana y Animal – GISAH, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Sangolquí, Ecuador.

<sup>2</sup>Centro de Nanociencia y Nanotecnología, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Sangolquí, Ecuador.

\*Υπεύθυνος αλληλογραφίας

Οι λοιμώξεις από *Staphylococcus aureus* ανθεκτικούς στη μεθικιλίνη (MRSA) αποτελούν σήμερα ένα σοβαρό κλινικό και επιδημιολογικό πρόβλημα. Αυτό το ευκαιριακό παθογόνο εντοπίζεται συνήθως με νοσοκομειακές λοιμώξεις. Ωστόσο, πρόσφατα εμφανίστηκαν παραλλαγές στην κοινότητα υψηλής μολυσματικότητας και έχουν εγείρει ανησυχίες λόγω της λοιμογόνου δυναμικής τους. Στην παρούσα μελέτη, είκοσι έξι κλινικά απομονωμένα στελέχη από καλλιέργειες αίματος που ανήκαν σε ασθενείς από δύο νοσοκομεία αναφοράς στον Ισημερινό, αναλύθηκαν με τη χρήση Multilocus Sequence Typing (MLST). Οι μοριακές αναλύσεις με PCR τυποποιήθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν για τα γονίδια MLST (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpiA*, *ycjL*) και για την αντίδραση κυκλικής αλληλουχίας που απαιτείται στη μέθοδο προσδιορισμού αλληλουχίας κατά Sanger, μαζί με τις απαραίτητες διαδικασίες καθαρισμού. Οι αλληλόμορφες παραλλαγές, καθώς και οι τύποι αλληλουχίας τους (sequence types, ST) αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων PubMLST. Απομονώθηκαν οκτώ προηγούμενως μη καθορισμένοι τύποι αλληλουχίας (undetermined ST, UST), μαζί με δύο αλληλόμορφα με σημειακές μεταλλάξεις. Η ανάλυση αυτών των δεδομένων χρησιμοποιώντας Maximum Parsimony Trees και Minimum Spanning Trees (MSTree) δεν έδειξε στενές φυλογενετικές συσχετίσεις για τα στελέχη που μελετήθηκαν και τους πιο συχνά αναφερόμενους κλώνους, αποδεικνύοντας την εμφάνιση νέων παραλλαγών στον Εκουαδόρ, πιθανώς τύπου της κοινότητας. Η παρούσα μελέτη μπορεί να συμβάλει στην έγκαιρη κλινική και επιδημιολογική επιτήρηση των λοιμώξεων από MRSA σε τοπικό επίπεδο.



#### Λέξεις κλειδιά

*Staphylococcus aureus*, Αντοχή στα αντιβιοτικά,  
Τυποποίηση αλληλουχίας πολλαπλών τόπων



## References

1. Algammal AM, Hetta HF, Elkelish A, Alkhalifah DHH, Hozzein WN, Batiha GES, *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): One health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. *Infect Drug Resist* 2020; 13:3255–3265.
2. Cervantes E, García R, Salazar P. Importancia de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente intrahospitalario y adquirido en la comunidad. *Rev Mex Patol Clin Med Lab* 2014; 61:196-204.
3. Silva V, Hermenegildo S, Ferreira C, Manaia CM, Capita R, Alonso C, *et al.* Genetic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from human bloodstream infections: Detection of MLSB resistance. *Antibiotics* 2020; 9:1–9.
4. Kimmig A, Hagel S, Weis S, Bahrs C, Löffler B, Pletz MW. Management of *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections. *Front Med (Lausanne)* 2021; 7:616524.
5. Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M, *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol* 2019; 17:203–218.
6. WHO: World Health Organization [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2017. Press release, WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed; 2017 Feb 27[cited 2022 Jun 8]; [about 3 screens]. Available from: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
7. Goudarzi M, Seyedjavadi SS, Nasiri MJ, Goudarzi H, Sajadi Nia R, Dabiri H. Molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from patients with bacteremia based on MLST, SCCmec, spa, and agr locus types analysis. *Microb Pathog* 2017; 104:328–335.
8. Tsouklidis N, Kumar R, Heindl SE, Soni R, Khan S. Understanding the Fight Against Resistance: Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* vs. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Cureus* 2020; 12:e8867.
9. Garbacz K, Wierzbowska M, Kwapisz E, Kosecka-Strojek M, Bronk M, Saki M, *et al.* Distribution and antibiotic-resistance of different *Staphylococcus* species identified by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) isolated from the oral cavity. *J Oral Microbiol* 2021; 13:1983322.
10. Kolesnik-Goldmann N, Bodendoerfer E, Röthlin K, Herren S, Imkamp F, Marchesi M, *et al.* Rapid Detection of PBP2a in *Staphylococci* from Shortly Incubated Subcultures of Positive Blood Cultures by an Immunochromatographic Assay. *Microbiol Spectr* 2021; 9:e0046221.
11. Sit P, Teh C, Idris N, Sam IC, Syed S, Sulaiman H, *et al.* Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection and the molecular characteristics of MRSA bacteraemia over a two-year period in a tertiary teaching hospital in Malaysia. *BMC Infect Dis* 2017; 17:274.
12. Vivas M, Gutierrez A. Typification Methods and Molecular Epidemiology of *Staphylococcus aureus* with Methicillin Resistance. In: Hemeg H, Ozbak H, Afrin F, editors. *Staphylococcus aureus* [Internet]. London: IntechOpen; 2018 [cited 2022 Jun 6]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/60849>.doi: 10.5772/intechopen.76442
13. Recker M, Laabei M, Toleman MS, Reuter S, Sanderson RB, Blane B, *et al.* Clonal differences in *Staphylococcus aureus* bacteraemia-associated mortality. *Nat Microbiol* 2017; 2:1381–1388.
14. Vaca S, Cruz S, Iñiguez Samuel. Prevalencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en el personal de salud de un Hospital de Especialidades en Quito-Ecuador. *Revista San Gregorio* 2021; 1:86–98.
15. Reyes J, Rincón S, Díaz L, Panesso D, Contreras GA, Zurita J, *et al.* Dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 sequence type 8 lineage in Latin America. *Clin Infect Dis* 2009; 49:1861–1867.
16. Zurita J, Barba P, Ortega D, Mora M, Rivadeneira S. Local circulating clones of *Staphylococcus aureus* in Ecuador. *Braz J Infect Dis* 2016; 20:525–533.
17. Asadollahi P, Farahani NN, Mirzaii M, Khoramrooz SS, van Belkum A, Asadollahi K, *et al.* Distribution of the Most Prevalent Spa Types among Clinical Isolates of Methicillin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcus aureus* around the World: A Review. *Front Microbiol* 2018; 9:163.
18. Arcenas RC. Molecular Methods for Healthcare-Acquired Infections. In: Coleman W, Tsongalis G, editors. *Diagnostic Molecular Pathology*. US: Elsevier; 2017. p. 163–177.
19. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res* 2018; 3:124.



20. Rodríguez F, Fernández S, Haim S, Mollerach M, Basualdo W, Castro H, *et al.* Estandarización del análisis multi-locus de número variable de repeticiones en tándem para el estudio de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina aislados de la comunidad en Paraguay. *Duazary* 2017; 14:1-10.
21. Public Health England, National Health Service. Identification of *Staphylococcus* species, *Micrococcus* species and *Rothia* species [Internet]. UK Standards for Microbiology Investigations. 2019 [cited 2022 Feb 15]. Available from: [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/832968/ID\\_7\\_dj\\_.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/832968/ID_7_dj_.pdf)
22. Vitko NP, Richardson AR. Laboratory Maintenance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Curr Protoc Microbiol.* 2013; Chapter 9: Unit-9 C.2.
23. Missiakas DM, Schneewind O. Growth and Laboratory Maintenance of *Staphylococcus aureus*. *Curr Protoc Microbiol.* 2013; Chapter 9:Unit-9C.1.
24. Noboa K. Estudio de expresión génica de factores de virulencia de aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* causantes de bacteremia. Sangolquí: Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE; 2020. 50-120 p. <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/22528/T-ESPE-043854.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
25. Promega. GoTaqFlexi DNA Polymerase (M829) Protocol [Internet]. 2018 [cited 2021 Dec 15]. Available from: [https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaqflexi-dna-polymerase-m829.pdf?rev=f4d69130c5f7402898bc2116cc0e3584&sc\\_lang=en](https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaqflexi-dna-polymerase-m829.pdf?rev=f4d69130c5f7402898bc2116cc0e3584&sc_lang=en)
26. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1008–15.
27. Saunders NA, Holmes A. Multilocus sequence typing (MLST) of *Staphylococcus aureus*. *Methods Mol Biol* 2007; 391:71-85.
28. Life Technologies Corporation. PureLink® PCR Purification Kit For rapid, efficient purification of PCR products Catalog numbers K3100-01 and K3100-02 [Internet]. 2011 [cited 2021 Dec 15]. Available from: [https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/purelink\\_pcr\\_man.pdf?\\_ga=2.130614344.690066872.1639688301-1651989391.1639688301](https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/purelink_pcr_man.pdf?_ga=2.130614344.690066872.1639688301-1651989391.1639688301)
29. Applied Biosystems. Quick Reference: BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit [Internet]. 2016 [cited 2021 Dec 15]. Available from: [https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0015666\\_BigDyeTerminator\\_V3\\_1\\_CycleSeq\\_QR.pdf](https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0015666_BigDyeTerminator_V3_1_CycleSeq_QR.pdf)
30. Chen N, Yun L. DNA recovery from agarose gels with a simple centrifuge-driven Sephadex filtration. *For Stud China* 2006; 8:32–34.
31. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, *et al.* Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 2012; 28:1647–1649.
32. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 2004; 32:1792–1797.
33. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007; 23:2947–2948.
34. Kannan L, Wheeler WC. Maximum Parsimony on Phylogenetic networks. *Algorithms Mol Biol* 2012; 7:9.
35. Sneath P, Sokal R. Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification. 2nd ed. San Francisco:Freeman; 1973.
36. Nei M, Kumar S. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford: Oxford University Press; 2000.
37. Francisco A, Bugalho M, Ramirez M, Carriço JA. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinformatics* 2009; 10:152.
38. Guo N, Wei Q, Xu Y. Optimization of cryopreservation of pathogenic microbial strains. *Int J Biosaf Biosecurity* 2020; 2:66–70.
39. Suo B, Yang H, Wang Y, Lv H, Li Z, Xu C, *et al.* Comparative Proteomic and Morphological Change Analyses of *Staphylococcus aureus* During Resuscitation From Prolonged Freezing. *Front Microbiol* 2018; 9:866.
40. Sune D, Rydberg H, Augustinsson ÅN, Serrander L, Jungeström MB. Optimization of 16S rRNA gene analysis for use in the diagnostic clinical microbiology service. *J Microbiol Methods* 2020; 170:105854.
41. Preeja PP, Kumar SH, Shetty V. Prevalence and Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Community- and Hospital-Associated Infections: A Tertiary Care Center Study. *Antibiotics* 2021; 10:197.
42. Hoegh S., Skov MN, Boye K, Worning P, Jensen TG, Kemp M. Variations in the *Staphylococcus aureus*-specific nuc gene can potentially lead to misidentification of methicillin-susceptible and -resistant *S. aureus*. *Int J Med Micr:*1020–1022.
43. Monteiro A, Pinto B, Monteiro J, Ferreira R, Ribeiro P, Bando S, *et al.* Phylogenetic and Molecular Profile of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bloodstream Infections in Northeast Brazil. *Microorganisms* 2019; 7:210.

44. Instituto de Salud Pública de Chile. Vigilancia de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente adquirido en la comunidad. Report No.: 10. [Internet]. Chile: Instituto de Salud Pública de Chile; 2017 [cited 2022 Mar 6]. Available from: [https://www.ispch.cl/sites/default/files/BoletinStahylococcusResistente-20062018A%20\(1\).pdf](https://www.ispch.cl/sites/default/files/BoletinStahylococcusResistente-20062018A%20(1).pdf)
45. Tomatis C, Baroni M, Mendosa M, Nagel A, Mollerach A, Alvarez C, *et al.* Tipos de spa no reportados en nuestro país en *Staphylococcus aureus* de pacientes adultos de un hospital escuela, Santa Fe, Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2018; 50:244–248.
46. Bobay L, Ochman H. Impact of Recombination on the Base Composition of Bacteria and Archaea. *Mol Biol Evol* 2017; 34:2627–2636.
47. Polveiro RC, Granja MMC, Roldão TCB, da Silva Lopes I, Vidigal PMP, Lima MC, *et al.* Multilocus sequence analysis reveals genetic diversity in *Staphylococcus aureus* isolate of goat with mastitis persistent after treatment with enrofloxacin. *Sci Rep* 2021; 11:17252.
48. Acker KP, Wong Fok Lung T, West E, Craft J, Narechania A, Smith H, *et al.* Strains of *Staphylococcus aureus* that Colonize and Infect Skin Harbor Mutations in Metabolic Genes. *iScience* 2019; 19:281–290.
49. Salazar MJ, Machado H, Dillon NA, Tsunemoto H, Szubin R, Dahesh S, *et al.* Genetic Determinants Enabling Medium-Dependent Adaptation to Nafcillin in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *mSystems* 2020; 5:e00828-19.
50. Gabryszewski S, Wong T, Annavajhala M, Tomlinson K, Riquelme S, Khan I, *et al.* Metabolic Adaptation in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2019; 61:185–197.
51. Kim G, Hooven TA, Norambuena J, Li B, Boyd J, Yang J, *et al.* Growth and Stress Tolerance Comprise Independent Metabolic Strategies Critical for *Staphylococcus aureus* Infection. *mBio* 2021; 12:e0081421.
52. Khan N, Ahsan M, Yoshizawa S, Hosoya S, Yokota A, Kogure K. Multilocus Sequence Typing and Phylogenetic Analyses of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from the Ocean. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74:6194–6205.
53. Florida-Yapur N, Rusman F, Diosque P, Tomasini N. Genome data vs MLST for exploring intraspecific evolutionary history in bacteria: Much is not always better. *Infect Genet Evol* 2021; 93:104990.
54. Arévalo J. Genotipificación de *Klebsiella Pneumoniae* mediante el análisis de secuencias de Locus Múltiples (MLST) en una colección de aislados clínicos provenientes de infecciones sistémicas de dos hospitales de referencia del Ecuador. [Sangolquí]: Universidad de las Fuerzas Armada ESPE; 2018. <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/14116>
55. Cabrejos L, Vives C, Inga J, Astocondor L, Hinostroza N, García C. Frecuencia de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente adquirido en la comunidad en un hospital de tercer nivel en Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 2021; 38:313–317.
56. Rodríguez E, Seas C, Guzmán-Blanco M, Mejía C, Alvarez C, Bavestrello L, *et al.* Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. *Int J Infect Dis* 2010; 14:e560-e566.





## ΔΕΛΤΙΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ

### Οδηγίες προς τους συγγραφείς

#### Γενικά στοιχεία - Σκοπός του περιοδικού

Το Δελτίον Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας είναι η επίσημη τριμηνιαία έκδοση της Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας, με σκοπό τη συνεχή εκπαίδευση των Βιοπαθολόγων, Κλινικών Μικροβιολόγων, αλλά και κάθε επιστήμονα που ασχολείται με την εργαστηριακή και κλινική ιατρική.

Κύρια επιδίωξη είναι η δημοσίευση μελετών στην Ελληνική ή την Αγγλική γλώσσα που αφορούν όλους τους τομείς της Κλινικής Μικροβιολογίας (Βακτηριολογία, Παρασιτολογία, Μυκητολογία, Ιολογία), αλλά και τις λοιπές εξειδικεύσεις της Ιατρικής Βιοπαθολογίας (Εργαστηριακή Αιματολογία-Αιμοδοσία, Ιατρική Βιοχημεία και Ανοσολογία).

#### Πρόσβαση στο περιοδικό

Η πρόσβαση στο περιοδικό γίνεται με ηλεκτρονικό τρόπο, σε όλα τα μέλη της Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας, μέσω της ιστοσελίδας του περιοδικού της Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας (<https://acta.hms.org.gr/>).

#### Διαδικασία υποβολής προς δημοσίευση

Τα άρθρα υποβάλλονται αποκλειστικά μέσω της ηλεκτρονικής πλατφόρμας στο [www.hms.org.gr](http://www.hms.org.gr) (Περιοδικό/Ηλεκτρονική Υποβολή Άρθρων). Χειρόγραφα που παραλαμβάνονται με το ταχυδρομείο, ανεξάρτητα της ύπαρξης ή όχι ηλεκτρονικού αρχείου, δεν θα λαμβάνονται υπ' όψιν. Το υποβαλλόμενο άρθρο θα πρέπει να συνοδεύεται από επιστολή-δήλωση του υπεύθυνου συγγραφέα που να βεβαιώνει ότι όλοι οι συγγραφείς έχουν διαβάσει και συμφωνούν με την υποβολή του χειρογράφου και ότι το άρθρο ή ένα σημαντικό μέρος αυτού δεν έχει δημοσιευθεί ή υποβληθεί για δημοσίευση κάπου αλλού. Επίσης θα πρέπει να αναφέρεται κάθε σύγκρουση συμφερόντων όλων των συγγραφέων. Κατά την παραλαβή, το άρθρο ελέγχεται για την πληρότητα και στη συνέχεια αποστέλλεται απαντητικό ηλεκτρονικό μήνυμα στον υπεύθυνο για αλληλογραφία συγγραφέα.

#### Είδη άρθρων προς δημοσίευση

Δημοσιεύονται οι παρακάτω κατηγορίες άρθρων:

**Ερευνητικές εργασίες:** Περιέχουν αποτελέσματα εργαστηριακών, επιδημιολογικών ή κλινικών μελετών προοπτικού ή αναδρομικού χαρακτήρα που δημοσιεύονται για πρώτη φορά. Η έκταση του κειμένου χωρίς τη βιβλιογραφία δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 5.000 λέξεις.

**Βραχείες δημοσιεύσεις:** Έχουν την γενική δομή των ερευνητικών εργασιών, όμως έχουν μικρότερο μέγεθος έως 1.800 λέξεις και έως 15 βιβλιογραφικές αναφορές. Αφορούν μελέτες που δεν δικαιολογούν την έκταση μιας πλήρους ερευνητικής εργασίας. Η Συντακτική Επιτροπή, μετά από πρόταση των εκάστοτε κριτών, διατηρεί το δικαίωμα να συστήσει στους συγγραφείς να μετατρέψουν μια πλήρη ερευνητική εργασία σε βραχεία δημοσίευση, εφόσον, κατά την κρίση τους, δεν δικαιολογείται η έκταση που έχει δοθεί. Οι συγγραφείς μπορούν επίσης να υποβάλλουν εργασίες που έχουν εξ αρχής τη μορφή βραχειών δημοσιεύσεων.

**Ενδιαφέρουσες περιπτώσεις:** Αποτελούν νέες ή πολύ σπάνιες περιπτώσεις νοσημάτων, σπάνιες εκδηλώσεις, εφαρμογή νέων διαγνωστικών κριτηρίων ή νέων θεραπευτικών μεθόδων. Η έκταση του κυρίως κειμένου να μην υπερβαίνει τις 1.500 λέξεις και η βιβλιογραφία να μην υπερβαίνει τις 15 παραπομπές.

**Ανασκοπήσεις:** Αναλύονται σύγχρονα ιατρικά θέματα, στα οποία παρουσιάζονται οι πρόσφατες εξελίξεις ή αναφέρονται τα συμπεράσματα σειράς ερευνητικών μελετών των συγγραφέων. Οι ανασκοπήσεις γράφονται από έναν ή περισσότερους συγγραφείς, ανάλογα με τη θεματολογία τους. Η έκταση του κυρίως κειμένου να μην υπερβαίνει τις 10.000 λέξεις και η βιβλιογραφία τις 100 παραπομπές.

**Επιστολές προς την Σύνταξη:** Περιέχουν κρίσεις ή παρατηρήσεις για δημοσιευμένες μελέτες κ.λπ. Η



έκτασή τους να μην υπερβαίνει τις 500 λέξεις και η βιβλιογραφία τις 5 αναφορές.

**Άρθρα της Σύνταξης:** Σύντομα άρθρα σχολιασμού ή κρίσης επίκαιρων θεμάτων, τα οποία γράφονται μετά από πρόσκληση της συντακτικής επιτροπής. Η έκτασή τους να μην υπερβαίνει τις 1.000 λέξεις και η βιβλιογραφία τις 10 αναφορές.

### Ορισμός συγγραφέα άρθρου

Ως συγγραφέας ενός άρθρου ορίζεται ένα άτομο που έχει συνεισφέρει στον σχεδιασμό ή στην εκτέλεση της συγκεκριμένης έρευνας που παρουσιάζει το άρθρο, σύμφωνα με τις οδηγίες της Διεθνούς Επιτροπής Συντακτών Ιατρικών Περιοδικών (ICMJE): [[http://www.icmje.org/ethical\\_1author.html](http://www.icmje.org/ethical_1author.html)]. Το περιοδικό θεωρεί όλους τους συγγραφείς, ανεξάρτητα της σειράς τους, ως φέροντες εξίσου την πλήρη ευθύνη ενός άρθρου, συμπεριλαμβανομένου και του ορισμού του τίτλου και της σειράς των υπολοίπων συγγραφέων. Άτομα που παρεχώρησαν προς χρήση εγκαταστάσεις ή εξοπλισμό, κλινικά ή πρότυπα στελέχη, αναλώσιμα ή αντιδραστήρια, έδωσαν οικονομική βοήθεια μέσω δημόσιας ή ιδιωτικής χρηματοδότησης, ή συμπλήρωσαν ερωτηματολόγια, δεν μπορούν να θεωρηθούν ότι πληρούν τα κριτήρια του συγγραφέα. Επίσης τα κριτήρια αυτά δεν πληρούν άτομα που σχολίασαν, ή διόρθωσαν ή παρείχαν συμβουλές κατά τη διαδικασία της συγγραφής μέρους ή όλου του άρθρου. Αυτά τα άτομα μπορούν να αναφερθούν στο κεφάλαιο των ευχαριστιών. Ομάδες εργασίας μπορεί να αναφερθούν ως συγγραφείς, εφόσον όλα τα μέλη που αποτελούν την ομάδα πληρούν τα κριτήρια που αναφέρθηκαν πιο πάνω. Τέλος, αναφέρεται ρητά ότι ο τίτλος του συγγραφέα δεν μπορεί να αποδοθεί «τιμής ένεκεν» λόγω θέσης. Τυχόν διαφωνίες που ανακύψουν σχετικά με την απονομή του τίτλου του συγγραφέα ή την σειρά των συγγραφέων σε ένα άρθρο, θα σημαίνουν αυτόματα την αναστολή της διαδικασίας κρίσης, έως ότου αυτά λυθούν, είτε από το σύνολο των συγγραφέων, ή από την αρμόδια επιτροπή βιοηθικής και δεοντολογίας του ιδρύματος προέλευσης του άρθρου.

### Ευχαριστίες

Τα άτομα στο κεφάλαιο των ευχαριστιών θα πρέπει να έχουν εγκρίνει την συμμετοχή τους σε αυτό. Για

υλικό που έχει δημοσιευθεί με οποιοδήποτε άλλο τρόπο και υπόκειται σε περιορισμό πνευματικής ιδιοκτησίας και δικαιωμάτων (copyright) θα πρέπει να αναφερθεί αναλυτικά ο τρόπος με τον οποίο αυτό αποκτήθηκε και πως δόθηκε η άδεια. Κάθε οικονομική βοήθεια, είτε δημόσια είτε ιδιωτική θα πρέπει να αναφέρεται ρητά.

### Σύγκρουση συμφερόντων

Όλοι οι συγγραφείς θα πρέπει να αναφέρουν στο άρθρο κάθε πιθανή σύγκρουση συμφερόντων, σχετικά με την υπό δημοσίευση μελέτη, σύμφωνα με τις οδηγίες της Διεθνούς Επιτροπής Συντακτών Ιατρικών Περιοδικών (ICMJE):

[[http://www.icmje.org/ethical\\_4conflicts.html](http://www.icmje.org/ethical_4conflicts.html)]. Θα πρέπει να αναφέρεται κάθε χρηματοδότηση που θα μπορούσε να οδηγήσει ή να υπονοήσει κατευθυνόμενη εξαγωγή συμπερασμάτων, όπως επίσης κάθε οικονομική δραστηριότητα που μπορεί να έχει σχέση με την μελέτη (π.χ. και όχι περιοριστικά, προηγούμενη κατοχή μετοχών ή συμμετοχή σε Διοικητικά Συμβούλια ή λήψη χρηματοδότησης για ομιλίες από εταιρία της οποίας τα προϊόντα ελέγχονται στην συγκεκριμένη μελέτη, κ.λπ.). Η μη ύπαρξη σύγκρουσης συμφερόντων θα πρέπει επίσης να αναφέρεται. Εδώ σημειώνεται ότι οι λεπτομέρειες της σύγκρουσης συμφερόντων δεν δημοσιεύονται μαζί με το άρθρο, αλλά παραμένουν στην Συντακτική Επιτροπή υπό αυστηρή εχεμύθεια. Στο άρθρο δημοσιεύεται μια γενικόλογη φράση, π.χ. «Ο συγγραφέας Χ.Χ έλαβε ενίσχυση από την εταιρία Ψ.Ψ. για ερευνητικούς σκοπούς, ή για ομιλίες σε συνέδρια κ.λπ.». Αποτυχία της συμμόρφωσης με αυτή την οδηγία θα οδηγήσει σε επιστροφή του άρθρου για συμπλήρωση, πριν την επιστημονική κρίση. Σε περίπτωση που εκ των υστέρων αποκαλυφθεί σύγκρουση συμφερόντων που δεν δηλώθηκε, η συντακτική επιτροπή διατηρεί το δικαίωμα να το αναφέρει σε επόμενο τεύχος με την μορφή «Ο συγγραφέας Χ.Χ. δεν δήλωσε πιθανή σύγκρουση συμφερόντων, σχετικά με το άρθρο Ζ.Ζ. και την εταιρία Ψ.Ψ.».

### Οδηγίες σύνταξης άρθρων

Για τη σύνταξη των άρθρων το περιοδικό ακολουθεί τις υποδείξεις της Διεθνούς Επιτροπής Συντακτών Ιατρικών Περιοδικών (ICMJE):

[[http://www.icmje.org/urm\\_main.html](http://www.icmje.org/urm_main.html)]. Αποτυχία των συγγραφέων να συμμορφωθούν με τις οδηγίες μπορεί να σημαίνει επιστροφή του άρθρου, πριν την κρίση, για διόρθωση και εκ νέου υποβολή. Το χειρόγραφο, με την χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή και λογισμικού επεξεργασίας κειμένου, δακτυλογραφείται σε μορφοποίηση μεγέθους σελίδας A4 (212 x 297 mm) με περιθώρια εκατέρωθεν τουλάχιστον 2,5 cm, σε διπλό διάστημα και με συνεχή αρίθμηση σειρών στο αριστερό περιθώριο (Μενού: Διάταξη σελίδας/Αρίθμηση γραμμών/Συνεχόμενη αρίθμηση).

Οι **ερευνητικές εργασίες**, οι **βραχείες δημοσιεύσεις** και οι **ενδιαφέρουσες περιπτώσεις** θα πρέπει να έχουν την ίδια κοινή δομή και να περιλαμβάνουν τα εξής τμήματα, σε ένα ενιαίο αρχείο κειμένου (word, text, ή άλλο): τη σελίδα τίτλου, την ελληνική περίληψη με τις λέξεις κλειδιά, την αγγλική περίληψη με τις λέξεις κλειδιά στα αγγλικά, το κυρίως κείμενο, τις ευχαριστίες, τη δήλωση σύγκρουσης συμφερόντων, τη δήλωση άδειας από την αρμόδια Επιτροπή Βιοηθικής ή/και τον ΕΟΦ (εφόσον απαιτείται, σύμφωνα με την κείμενη νομοθεσία, για ερευνητικές εργασίες παρεμβατικού τύπου), τη βιβλιογραφία, τους πίνακες και τις λεζάντες των εικόνων. Οι εικόνες θα πρέπει να υποβάλλονται σε ξεχωριστά αρχεία, σύμφωνα με τις οδηγίες που ακολουθούν.

Η **σελίδα τίτλου** αποτελεί την πρώτη σελίδα του άρθρου και περιλαμβάνει: (α) τον τίτλο του άρθρου, στον οποίο δεν επιτρέπονται συντμήσεις λέξεων, (β) τα ονόματα των συγγραφέων (πλήρες όνομα και επώνυμο), (γ) το εργαστήριο ή την κλινική και το νοσοκομείο ή το ίδρυμα από το οποίο προέρχεται η εργασία, (δ) την πλήρη διεύθυνση του υπεύθυνου για την αλληλογραφία συγγραφέα, συμπεριλαμβανομένου ενός αριθμού τηλεφώνου και μιας ενεργούς διεύθυνσης ηλεκτρονικής αλληλογραφίας (e-mail) και (ε) βραχύ τίτλο όχι μεγαλύτερο από 40 γράμματα με τα διαστήματα. Όλες οι παραπάνω πληροφορίες θα πρέπει να αναφέρονται στην Ελληνική γλώσσα και στη συνέχεια και στην Αγγλική γλώσσα.

Η **περίληψη** θα πρέπει να έχει έκταση 250–400 λέξεις (εκτός από τις ενδιαφέρουσες περιπτώσεις

που θα έχει έκταση έως 250 λέξεις), στην Ελληνική και την Αγγλική γλώσσα και θα πρέπει να χωρίζεται σε 4 παραγράφους (Σκοπός, Υλικό-Μέθοδος, Αποτελέσματα, Συμπεράσματα). Κάτω από την περίληψη θα πρέπει να αναφέρονται οι **λέξεις κλειδιά** (3-6) στην Ελληνική και την Αγγλική γλώσσα, που πρέπει να αντιστοιχούν στους διεθνείς όρους του Index Medicus και να αποδίδονται στα Ελληνικά σύμφωνα με το ΙΑΤΡΟΤΕΚ (MeSH-Hellas-Βιοϊατρική Ορολογία).

Το **κυρίως κείμενο** θα πρέπει να χωρίζεται στα τμήματα: **Εισαγωγή, Υλικό και μέθοδοι, Αποτελέσματα, Συζήτηση**, εκτός από τις ενδιαφέρουσες περιπτώσεις που θα πρέπει να αποτελούνται από τα τμήματα: **Εισαγωγή, Περιγραφή περίπτωσης, Σχόλιο ή Συζήτηση**. Στο Υλικό και Μέθοδοι περιγράφεται λεπτομερώς ο τρόπος επιλογής του υλικού ή των ασθενών, καθώς και οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν, ώστε η έρευνα να μπορεί να αναπαραχθεί από ερευνητές που επιθυμούν την εφαρμογή της. Σε περιπτώσεις ερευνών που αφορούν σε ανθρώπους, πρέπει να διευκρινίζεται ότι τηρήθηκε η Διακήρυξη του Ελσίνκι (1975) και θα πρέπει να αναφέρεται εάν η μελέτη έχει λάβει έγκριση από την αντίστοιχη Επιτροπή Βιοηθικής και Δεοντολογίας. Στα αποτελέσματα θα πρέπει να αναφέρονται αναλυτικά τα αποτελέσματα με μορφή κειμένου ή πινάκων (όσο πιο συνοπτικά γίνεται, χωρίς επαναλήψεις). Στη συζήτηση μπορεί να γίνει σύγκριση με τα αποτελέσματα άλλων εργασιών και να αναφέρονται τα συμπεράσματα, τα οποία προκύπτουν από τα αποτελέσματα της μελέτης. Ανάλογα με το μέγεθος του άρθρου μπορεί να γίνει σύντμηση των κεφαλαίων των αποτελεσμάτων και της συζήτησης σε ένα κεφάλαιο (Αποτελέσματα-Συζήτηση).

Οι **ευχαριστίες** θα πρέπει να απευθύνονται σε άτομα με ουσιαστική συμβολή στην πραγματοποίηση της έρευνας, όπως προαναφέρθηκε πιο πάνω.

Η **δήλωση σύγκρουσης συμφερόντων** θα πρέπει να είναι αναλυτική για όλους τους συγγραφείς.

Η **δήλωση έγκρισης από την αρμόδια Επιτροπή Βιοηθικής ή τον ΕΟΦ** (για μελέτες που αυτό απαιτείται σύμφωνα με την κείμενη νομοθεσία, π.χ. μελέτες παρεμβατικού τύπου, με ασθενείς, μελέτες



ασθενών-μαρτύρων, κ.λπ.) θα πρέπει να περιλαμβάνει τον αριθμό πρωτοκόλλου και την ημερομηνία έγκρισης. Καθίσταται σαφές ότι δεν μπορεί να δημοσιευθεί μελέτη για την οποία οι συγγραφείς ζήτησαν αναδρομικά έγκριση για εργασίες που ήδη είχαν γίνει. Οι επιδημιολογικές μελέτες, οι εργασίες ελέγχου της μικροβιακής αντοχής, οι συγκρίσεις εργαστηριακής μεθοδολογίας και οι παρουσιάσεις περιστατικών αποτελούν είδη ερευνητικών εργασιών που δεν απαιτούν παρόμοια έγκριση.

Στη **βιβλιογραφία** ακολουθείται το διεθνές σύστημα Vancouver. Επειδή η αναπαραγωγή των άρθρων από τις ιστοσελίδες ανεύρεσης δεν μεταφέρει απόλυτα όλα τα τυπογραφικά στοιχεία (π.χ. ειδικά γράμματα) οι συγγραφείς για να εξασφαλίσουν την ορθή απόδοση των αναφορών θα πρέπει να ανατρέχουν στο τυπωμένο κείμενο, είτε σε έντυπη, είτε σε ηλεκτρονική μορφή (αρχεία .pdf). Όλοι οι συγγραφείς ενός άρθρου θεωρούνται από κοινού υπεύθυνοι για την σωστή αναπαραγωγή των βιβλιογραφικών αναφορών του άρθρου και η συντακτική ομάδα του περιοδικού δεν ελέγχει την τυπογραφική ακρίβειά τους. Κόστος διόρθωσης λάθους αναφοράς που τυχόν ζητηθεί από τρίτο άτομο μετά την τελική εκτύπωση του τεύχους του περιοδικού, επιβαρύνει εξ ολοκλήρου τους συγγραφείς. Η αρίθμηση των αναφορών στο κείμενο γίνεται με την σειρά που αναφέρονται στο κείμενο, με αραβικούς αριθμούς, ως εκθέτες, μετά τα σημεία στίξης (π.χ.: η συγκεκριμένη παρατήρηση έχει αναφερθεί αρχικά από τους Jones και συν.<sup>4</sup> και έχει επιβεβαιωθεί και από άλλες μελέτες.<sup>5,7,8-12</sup>).

**Άρθρα περιοδικών δημοσιευμένα:** Γράφονται τα επώνυμα των συγγραφέων και τα αρχικά του ονόματος χωρίς τελείες, στην συνέχεια το περιοδικό στην συντετμημένη του μορφή με πλάγια γράμματα, στην συνέχεια το έτος, ο αριθμός τόμου (χωρίς τον αριθμό τεύχους σε παρένθεση) και οι σελίδες (π.χ. Klotz SA, Penn CC, Negvesky GJ, Butrus SI. Fungal and parasitic infections of the eye. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:662-685). Όταν οι συγγραφείς είναι περισσότεροι από έξι, αναγράφονται τα πρώτα έξι ονόματα και ακολουθεί η λέξη "et al." με πλάγια γράμματα, ή «και συν.» για ελληνικό άρθρο (π.χ. Garcia HH, Herrera G, Gilman RH, Tsang VC, Pilcher JB, Diaz JF et al. Discrepancies between cerebral computed

tomography and western blot in the diagnosis of neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50:152-157). Σε περίπτωση αναφοράς ονομάτων συγγραφέων στο κείμενο, αναγράφεται μόνο το επώνυμό τους. Εάν οι συγγραφείς είναι δύο, μεταξύ των επωνύμων τοποθετείται η λέξη "and" ή «και» (για ελληνική δημοσίευση). Αν το άρθρο είναι ανυπόγραφο, στη θέση των ονομάτων των συγγραφέων αναφέρεται "Anonymous" ή «Ανώνυμος» (για ελληνική δημοσίευση). Για τα ηλεκτρονικά περιοδικά που δεν έχουν σελιδοποίηση, ή όπου αυτό επίσης είναι εφικτό, μετά την συντομογραφία του τίτλου του περιοδικού θα πρέπει να αναφέρεται ο κωδικός DOI (Digital Object Identifier) (π.χ. Kalil AC. *Is cefepime safe for clinical use? A Bayesian viewpoint. J Antimicrob Chemother* 2011; doi: 10.1093/jac/ dkr 138).

**Άρθρα περιοδικών υπό δημοσίευση:** Αφορά άρθρα που έχουν γίνει αποδεκτά και εκκρεμεί η τελική δημοσίευσή τους. Ακολουθείται η προηγούμενη οδηγία και μετά την συντομογραφία του περιοδικού αναγράφεται "in press" ή «υπό δημοσίευση». Εάν κατά την διάρκεια της διαδικασίας κρίσης το άρθρο τελικά δημοσιευθεί, οι συγγραφείς είναι υπεύθυνοι για την ανανέωση της αναφοράς με τα στοιχεία του περιοδικού (τεύχος, σελίδες ή νούμερο DOI).

**Σύγγραμμα:** αναφέρονται το όνομα του συγγραφέα, ο τίτλος, ο αριθμός της έκδοσης (αν υπάρχουν περισσότερες από μία), ο εκδότης, ο τόπος έκδοσης, το έτος και οι σελίδες της αναφοράς. Για τα κεφάλαια βιβλίων αναφέρεται επιπλέον μετά το όνομα του εκδότη και ο τίτλος του βιβλίου (π.χ. Griffiths WD. Old world cutaneous leishmaniasis. In: Peters W, Killick-Kendrick R (eds). *The leishmaniasis in biology and medicine*. Vol. II. London, Academic Press, 1987:617-636).

**Εργασίες υπό μορφή ανακοινώσεων σε συνέδρια** (προφορικές ή ανητημένες), δεν περιλαμβάνονται στην βιβλιογραφία, αλλά μπορεί να παρατίθενται σε παρένθεση στο κείμενο, εφόσον δεν έχουν παρέλθει πάνω από δύο έτη από την παρουσίασή τους, αναφέροντας το όνομα του πρώτου συγγραφέα, το συνέδριο και την σελίδα του τόμου πρακτικών (π.χ. Juncosa B et al, XVII Lancefield International Symposium on Streptococci & Streptococcal Diseases, Porto Heli, Greece, 2008, pp63 ). Με παρόμοιο τρόπο θα πρέπει να αναγράφονται και οι



αναφορές σε ιστοσελίδες, όπου επιπλέον θα πρέπει να αναφέρεται και η ημερομηνία της τελευταίας επίσκεψης και ελέγχου από τους συγγραφείς (π.χ. <http://www.mednet.gr/whonet>, τελευταία επίσκεψη, 1η Μαΐου 2013).

Οι **φωτογραφίες**, τα **σχήματα**, τα **διαγράμματα** κ.λπ. ονομάζονται ως εικόνες (εφόσον είναι φωτογραφίες) ή γραφήματα (εφόσον είναι σχέδια), αναφέρονται στα σημεία του κειμένου όπου αντιστοιχούν και αριθμούνται με αραβικούς αριθμούς (εικόνα 1, εικόνα 2, κ.ο.κ.). Υποβάλλονται ηλεκτρονικά ως ανεξάρτητα αρχεία εικόνων (JPEG, TIFF, EPS, κλπ.) στην υψηλότερη δυνατή ανάλυση (το λιγότερο 300 dpi για ασπρόμαυρες ή έγχρωμες φωτογραφίες και 600 dpi για γραφήματα που περιέχουν σχέδια και γράμματα) και όχι ενσωματωμένα στο αρχείο κειμένου του άρθρου. Η τελική αποδοχή προϋποθέτει τον έλεγχο τους από τεχνική άποψη. Για εικόνες που δεν πληρούν τις τεχνικές προδιαγραφές ζητείται η εκ νέου υποβολή τους από τους συγγραφείς. Οι λεζάντες των εικόνων θα πρέπει να γράφονται όλες μαζί σε ξεχωριστή σελίδα στο κείμενο του άρθρου.

Όλοι οι **πίνακες** αναφέρονται στα σημεία του κειμένου όπου αντιστοιχούν και αριθμούνται με συνεχόμενους αραβικούς αριθμούς (πίνακας 1, πίνακας 2, κ.ο.κ.). Οι πίνακες δακτυλογραφούνται σε διπλό διάστημα και σε ξεχωριστή σελίδα ο καθένας. Η έκταση κάθε πίνακα καλόν είναι να μην υπερβαίνει τη μία σελίδα. Όλοι οι πίνακες πρέπει να έχουν λεζάντες, οι οποίες γράφονται στο άνω μέρος της αντίστοιχης σελίδας. Τυχόν επεξηγήσεις αναφέρονται με παραπομπές στο τέλος του πίνακα.

Στην **ονοματολογία** και στις **μονάδες μέτρησης**, οι φαρμακευτικές ουσίες αναφέρονται με την χημική και όχι την εμπορική ονομασία τους. Οι μονάδες των διαφόρων μεγεθών αναφέρονται με τους διεθνώς παραδεκτούς συμβολισμούς και όχι με τις ελληνικές ονομασίες τους. Για παράδειγμα, γράφεται κύτταρα/μl και όχι κύτταρα κ.κ.χ. Η ονοματολογία των βακτηρίων είναι αυτή που αναφέρεται στο: *Approved lists of Bacterial names* (Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA, ed. American Society for Microbiology (1989) και στο *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Τα ονόματα των ιών θα πρέπει να είναι τα εγκεκριμένα

από τη διεθνή επιτροπή για την ταξινόμηση των ιών (ICTV), όπως αναφέρονται στο *Virus Taxonomy: Classification and nomenclature of viruses, Seventh report of the international Committee on Taxonomy of Viruses* (van Regenmortel et al, ed. Academic Press, San Diego, Calif, 2000).

Οι **ανασκοπήσεις** ακολουθούν τις ίδιες προηγούμενες γενικές οδηγίες εκτός της κεφαλαιοποίησης που είναι ανάλογη του θέματος (δεν ακολουθείται δηλ. η κεφαλαιοποίηση «εισαγωγή, υλικό και μέθοδοι, αποτελέσματα συζήτησης»).

Οι **επιστολές προς την Σύntαξη** και τα **άρθρα της Σύntαξης** ακολουθούν τις προηγούμενες γενικές οδηγίες, εκτός του γεγονότος ότι δεν έχουν περιληψη ή κεφαλαιοποίηση (υποβάλλονται σε μια ενιαία παράγραφο).

### Διαδικασία κρίσης

Όλες οι εργασίες που υποβάλλονται κρίνονται από τουλάχιστον έναν εξωτερικό κριτή και από την ομάδα σύntαξης του περιοδικού. Οι κριτές μπορεί να αποτελούν μέλη της Συντακτικής Επιτροπής ή να είναι άλλοι, ειδικοί για το θέμα, επιστήμονες. Καταβάλλεται κάθε δυνατή προσπάθεια η κρίση για την αποδοχή, την τροποποίηση ή την απόρριψη μια υποβληθείσας εργασίας να ολοκληρώνεται σε εύλογο χρονικό διάστημα (τρεις έως τέσσερις εβδομάδες) από την ημερομηνία υποβολής της. Όλη η αλληλογραφία πραγματοποιείται μέσω της ηλεκτρονικής διεύθυνσης (email) του υπεύθυνου συγγραφέα, γι' αυτό τον λόγο ένας ενεργός λογαριασμός ηλεκτρονικού ταχυδρομείου είναι απολύτως απαραίτητος. Σε περίπτωση που οι κριτές ζητήσουν διορθώσεις ή προτείνουν αλλαγές, το τελικό διορθωμένο κείμενο υποβάλλεται εκ νέου από τον υπεύθυνο συγγραφέα, σε διάστημα τριών εβδομάδων από την επιστροφή του για τροποποίηση και συνοδευόμενο από επιστολή στην οποία θα αναφέρονται σημείο προς σημείο όλες οι αλλαγές στο κείμενο, καθώς και η αιτιολογημένη αποδοχή ή απόρριψη των προτάσεων των κριτών. Μετά την τελική αποδοχή, η μελέτη αποστέλλεται στο τυπογραφείο. Οι συγγραφείς, εφόσον το επιθυμούν, δύνανται να λάβουν τυπογραφικά δοκίμια για έλεγχο. Τα δοκίμια πρέπει να επιστρέφονται στο Τυπογραφείο σε τρεις



το πολύ ημέρες με την χρήση ηλεκτρονικού ταχυδρομείου. Εφόσον οι συγγραφείς επιθυμούν ανάτυπα, θα πρέπει να αποστείλουν επιστολή που θα δηλώνουν τον αριθμό ανατύπων που επιθυμούν. Η σχετική δαπάνη βαρύνει εξ ολοκλήρου τους συγγραφείς. Δεν επιτρέπεται αλλαγή του κειμένου στο στάδιο των τυπογραφικών δοκιμών χωρίς την άδεια της Σύνταξης.

### **Δήλωση άδειας έκδοσης**

Μετά την οριστική αποδοχή του άρθρου προς δημοσίευση, ο υπεύθυνος συγγραφέας θα πρέπει να

συμπληρώσει και να υπογράψει την επιστολή ανάθεσης της άδειας έκδοσης που μπορεί να βρει στην ιστοσελίδα της Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας. Η συμπληρωμένη φόρμα θα πρέπει να ταχυδρομηθεί (κατά προτίμηση με συστημένη επιστολή ή υπηρεσία ταχυμεταφοράς) στην διεύθυνση «Συντακτική Επιτροπή, Δελτίο Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας, ASCENT IKE, Μιχαλακοπούλου 29, 115 28, Αθήνα». Σημειώνεται εδώ ότι μόνο μετά την παραλαβή της επιστολής θα ξεκινάει η διαδικασία ενσωμάτωσης του άρθρου στο επόμενο τεύχος και η στοιχειοθέτησή του.

# JOURNAL OF THE HELLENIC MICROBIOLOGICAL SOCIETY

## Instructions to authors

### General features – Scope of the Journal

The *Journal of the Hellenic Society for Microbiology (Journal of HMS)* is the official Journal of the Hellenic Society for Microbiology, aiming at the constant education of Biopathologists, Clinical Microbiologists, as well as of every scientist involved in Laboratory and Clinical Medicine. The *Journal of the Hellenic Society for Microbiology* is a quarterly peer-reviewed journal, cited in Scopus® database.

Its main objective is the publication of studies in Greek and/or English language, which are relevant to all fields of Clinical Microbiology (Bacteriology, Parasitology, Mycology, Virology) and to the other subspecialties of Medical Biopathology (Laboratory Haematology- Blood Donation, Medical Biochemistry and Immunology). In addition, *Journal of HMS* is an appropriate forum for the publication of information related to the role of the laboratory in both the management of infectious diseases and the elucidation of the epidemiology of infections. Manuscripts which present the results of original scientific investigations are encouraged. Finally, *Journal of HMS* welcomes submission of manuscripts which describe novel molecular methods for use in the diagnosis or elucidation of infections. The Journal does not charge page or article processing or any other fees to the authors. All articles are available over the Internet after publications as Open Access.

### Access to the Journal

All members of the Hellenic Society for Microbiology can access the journal through the HMS website (<https://acta.hms.org.gr/>).

### Submission procedure for publication

Submit your manuscript through our online system [www.hms.org.gr](http://www.hms.org.gr) (Journal/Submission). Manuscripts received by post, regardless of whether compleme-

nted with an electronic file or not, will not be taken into consideration.

Submitted manuscripts must be accompanied by a relevant personal statement of the author confirming that all authors involved have read the manuscript and agree with its submission, and that neither the article nor a substantial part of it have been published or submitted for publication elsewhere. In addition, any conflict of interest among all authors has to be mentioned. Upon its receipt, the manuscript will be checked for its integrity; a reply e-mail will then be sent to the author in charge of the correspondence.

### Types of papers for publication

The following types of articles are published in the journal:

**Original articles:** contain the results of prospective or retrospective laboratory, epidemiological or clinical studies which are published for the first time. The length of the text -excluding literature- should not exceed 5,000 words, four to five tables or figures and 35 bibliographical references.

**Short communication:** generally share the same structure as research papers, but their length is smaller and does not exceed 1,800 words, two tables or figures and 15 bibliographical references. They relate to studies that do not justify the scope of a full research paper. The Editorial Board reserves the right to ask the authors to convert a research paper into a short-form paper, upon a relevant proposal by the respective referees, when they consider that the topic does not justify the original length. The authors may submit their work in the form of short papers from the outset.

**Case reports:** include new or very rare cases of diseases, rare occurrences and the implementation of



new diagnostics criteria or new therapeutic methods. The length of the text should not exceed 1,500 words two tables or figures and 15 bibliographical references.

**Review articles:** modern medical issues are analyzed, where the latest developments are presented or the conclusions of series of research studies by the authors are listed. Review articles are written by one or more authors, according to their theme. The main text should not exceed 10,000 words, including up to 100 references.

**Letters to the Editors:** contain opinions or comments on published studies, etc. Their length should be no more than 500 words, including up to 5 references.

**Editorial articles:** brief articles commenting on or assessing contemporary issues, published upon invitation by the Editorial Board. Their length should not exceed 1,000 words and 10 references.

### Defining the author of an article

The author of an article is defined as the person who has assisted in designing and/ or carrying out a specific research presented in the article, according to the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE)

[[http://www.icmje.org/ethical\\_1author.html](http://www.icmje.org/ethical_1author.html)].

The journal considers all authors, irrespective of the order of appearance, as equally bearing full responsibility of an article, including its title and order of appearance of other authors. Any individuals who offered specific equipment or facilities, clinical or reference strains, consumables or reagents, financial assistance through public or private financing, or who completed questionnaires, do not meet the criteria of an author and cannot be defined as such. Moreover, individuals who commented, edited or advised during the writing process of the article cannot be included as authors. Rather, these individuals can be mentioned in the *Acknowledgements* section. Working groups can be included as auth-

ors, provided that all group members fulfill the criteria mentioned above. Finally, it is explicitly stated that no individual can be included as an author *honoris causa*, because of a position that he/she holds. Any disputes that arise with regard to the inclusion of an individual as an author or to the authors' order of appearance in an article, will automatically trigger the suspension of the evaluation process until these disputes are resolved, either by all authors or by the competent bioethics and ethics committee of the institution of origin of the article.

### Acknowledgements

The inclusion of individuals in the *Acknowledgements* section must have been approved by the former beforehand. In case of material which has been published in any other manner and is subject to copyright provisions, the way in which this material and the permission to publish it were acquired has to be indicated in detail. Any relevant funding, either from public or private sources, must be explicitly stated.

### Conflict of interest

All authors must state any conflict of interest in the article, regarding the study under publication, according to the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE):

[[http://www.icmje.org/ethical\\_4conflicts.html](http://www.icmje.org/ethical_4conflicts.html)].

Any source of funding with direct or indirect implications of biased conclusions has to be mentioned, along with any financial activity that could be associated with the study (for instance –and not exclusively– previous shareholding or participation in Boards of Directors, financing of lectures by specific companies whose products are examined in the study, etc.). Nonexistence of conflicting interests should also be mentioned. At this point, it should be noted that all details regarding conflicting interests are not published together with the article; instead, the Editorial Board shall retain them under strict confidentiality. In the latter case, the article will be accompanied by a generic phrase, e.g. “Author XX re-

ceived support from the company YY for research purposes, or for lectures at conferences, etc.” Failure to comply with this guideline will result in the article being returned to its authors for completion, before its scientific evaluation. Should an undeclared conflict of interest emerge ex post, the Editorial Board reserves the right to report it in the next issue, in the form of “Author XX did not state a potential conflict of interest concerning article ZZ and company YY”.

## Guidelines for writing articles

Regarding the writing of articles, the journal complies with the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) [[http://www.icmje.org/urm\\_main.html](http://www.icmje.org/urm_main.html)].

Failure of the authors to comply with these guidelines can lead to the article being returned for adjustments and resubmission, prior to its evaluation.

With the use of a computer and word processing software, the manuscript is typed on A4 page format (212 x 297 mm) with margins on both sides of at least 2,5 cm, double-spaced and with continuous line numbering in the left margin (Menu: Page Layout > Line Numbers > Continuous).

**Research papers, Short-form papers and Interesting cases** should have a common structure and include the following sections in a single text file (word, text or other): title page, Greek abstract with key words (for manuscripts in Greek), English abstract with key words, main body of the text, acknowledgements, declaration of competing interests, declaration of authorization by the competent Bioethics Committee and/ or the National Organization for Medicines (for Greek authors EOF) (when required, in accordance with current legislation, in the case of interventionist research papers), references, tables and image captions. Images have to be submitted in separate files, in accordance with the instructions that follow.

The **title page** is the first page of the article and includes: (a) the title of the article, where no abbreviations can be used, (b) the names of the authors (full name and surname), (c) the laboratory or clinic

and hospital or institution where the study was carried out, (d) the full address of the author in charge of correspondence, including a telephone and fax number and an active e-mail address, and (e) a brief title no longer than 40 characters including spaces. All the above information should be provided first in Greek and then in English.

The **abstract** has to be between 250 and 400 words (except for interesting cases where the abstract should not exceed 250 words) in the Greek and English language (for a Greek speaking article) or solely in English (for an English speaking article) and it should be divided into four paragraphs (Aim of the study, Materials and Methodology, Results, Conclusions). **Three to six key words** are listed below the abstract both in Greek and/or English (as mentioned above), which must correspond to the international terms of *Index Medicus* and be attributable to Greek according to IATROTEK (MeSH-Hellas-Biomedical Terminology).

The main body of the text, for the **Research papers** and the **Short-form papers**, must be divided into sections: **Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion**. For the **Interesting Cases format** it should be divided into the following sections: **Introduction, Case Description, Comments or Discussion**.

In the **Materials and Methods section**, the way in which the material or patients were selected is described in detail, as well as the methods implemented, in order for other researchers to be able to reproduce the research. In case that the research involves people, compliance with the Declaration of Helsinki (1975) has to be stated, whereas it should also be defined whether the study has been approved by the respective Bioethics and Ethics Committee and the respective decision No has to be quoted (please see below).

In the **Results section**, the results have to be mentioned analytically in the form of either text or tables (as concisely as possible, without repetitions). The results can then be compared with the results of other studies in the **Discussion section**, where



the conclusions stemming from these results will also be mentioned. According to the length of the article, the **Results and Discussion sections** can be merged into a single section (Results-Discussion).

The **Acknowledgements section** has to be addressed to individuals with substantial contribution to the realization of the research, as mentioned above.

The **declaration of competing interests** should be analytical for all authors involved.

**The declaration of authorization by the competent Bioethics Committee or the National Organization for Medicines (for Greek authors-EOF)** (when required in accordance with current legislation, e.g. for interventionist research papers, research involving patients, studies of patients-witnesses, etc.) must include the protocol number and date of authorization. It is made clear that no research can be published for which the authors requested retroactive authorization for work that had already been carried out. Epidemiological studies, antimicrobial resistance control reports, comparisons between laboratory methodologies and cases reports constitute types of research that require no such authorization.

**References** follow the international Vancouver system (Vancouver reference style). Due to the fact that the referencing of articles from their websites of origin does not fully transfer all typefaces used (e.g. special lettering), the authors should refer to the relevant printed text in order to ensure proper referencing, either in printed or in electronic format (.pdf files). The authors of an article are all held equally responsible for the proper reproduction of references, whereas the Editorial Board of the journal does not check references for their typographical accuracy. In case of any request by a third party to correct a reference error after the final print of the respective issue of the journal, the financial cost is entirely borne by the authors. The numbering of references follows the sequence in which they appear

in the text, using Arabic numerals, in the form of superscripts and following punctuation (e.g.: this was originally observed by Jones *et al.*<sup>4</sup> and has been confirmed by other studies as well.<sup>5,7,8-12</sup>).

**Published journal articles:** The surnames of the authors are written first along with the initials of their names without dots, followed by the title of the journal in its abbreviated form in italics, then by the year, volume number (without the issue number in parentheses) and pages (e.g. Klotz SA, Penn CC, Negvesky GJ, Butrus SI. Fungal and parasitic infections of the eye. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:662-685). When the authors are more than six, the first six names are listed and followed by the phrase “*et al.*” in italics (e.g. Garcia HH, Herrera G, Gilman RH, Tsang VC, Pilcher JB, Diaz JF *et al.* Discrepancies between cerebral computed tomography and western blot in the diagnosis of neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50:152-157). When mentioning the name of an author within the text, only their surname is given. If the authors are two, the word “and” should be placed between their surnames. When an article is unsigned, instead of the names of the authors the word “Anonymous” is used. For electronic journals with no page numbers, or whenever this is possible, the DOI (Digital Object Identifier) code should follow the abbreviated title of the journal (e.g. *Kalil AC. Is cefepime safe for clinical use? A Bayesian viewpoint. J Antimicrob Chemother* 2011; doi: 10.1093/jac/dkr138).

**Journal articles under publication:** these are articles which have been approved and pending final publication. The previous instructions should be followed, whereas the abbreviated journal title is followed by the phrase “in press” or “under publication”. When an article is published during the evaluation process, the authors are responsible for renewing the reference by mentioning the relevant journal details (issue, page numbers or DOI).

**PhD thesis, book chapters or equivalent:** the reference includes the name of the author, title, publication edition (in case of more than one editions), publisher, city of publication, year and page numbers. For book chapters, the title of the book must also be mentioned after the name of the publisher

(e.g. Griffiths WD. Old world cutaneous leishmaniasis. In: Peters W, Killick-Kendrick R (eds). The leishmaniasis in biology and medicine. Vol. II. London, Academic Press, 1987:617-636).

*Works in the form of notices at conferences* (either oral or posted) are not included in literature, but they can be set out in the text in parentheses, as long as no more than two years have passed since their presentation, indicating the name of the first author, the conference and specific page(s) in the volume of the minutes of the conference (e.g. Juncoosa B et al, XVII Lancefield International Symposium on Streptococci & Streptococcal Diseases, Porto Heli, Greece, 2008, pp63). References to websites should be listed in a similar manner, further indicating the date of the authors' last access to the website (e.g. <http://www.mednet.gr/whonet>, cited 1 September 2015).

**Photographs, figures, diagrams**, etc. are defined as images (in case of photos) or graphs (in case of drawings) and they are listed in the corresponding points of the text and numbered in Arabic numerals (Figure 1, Figure 2, etc.). They are submitted in electronic format as individual image files (JPEG, TIFF, EPS, etc.) in the highest possible resolution (at least 300 dpi for black and white or color photos and 600 dpi for graphs containing drawings and letters) and not as attachments to the text file of the article. Their final admission requires approval after technical control. When images do not meet the specifications, the authors will be requested to resubmit them. Image captions should be written together on a separate page in the text.

All **tables** are listed in the corresponding points of the text and numbered in continuous Arabic numerals (Table 1, Table 2, etc.). The tables must be typed using double-spacing, at the end of the manuscript, after the references, in the same file. Each table should fit in one page. All tables must be accompanied by captions, which are written in the upper part of the corresponding page. Any clarifications are listed as references at the end of the table.

As far as **nomenclature** and **units of measure-**

**ment** are concerned, pharmaceutical substances are mentioned by their chemical rather than by their brand name. The various units of measurement are referred to according to the internationally acceptable standards. The nomenclature of bacteria can be found in: Approved lists of Bacterial names (Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA, ed. American Society for Microbiology (1989) and in the International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. The nomenclature of viruses has to be approved by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), as referred to in Virus Taxonomy: Classification and nomenclature of viruses, Seventh report of the international Committee on Taxonomy of Viruses (van Regenmortel et al, ed. Academic Press, San Diego, Calif, 2000).

**Reviews** follow the same general guidelines except for their structure, which should be analogous to the subject (i.e. the "introduction, materials and methodology, results, discussion" structure is not applicable).

**Letters to the editors and Editorial articles** conform to the general guidelines laid out above, apart from the fact that they have no abstract and no individual sections (instead, they are submitted in a single paragraph).

### Evaluation process

All submitted manuscripts are evaluated by at least one external reviewer, as well as by the Editorial Board. The reviewers may be members of the Editorial Board or other scientists who are experts on the respective subject. Every effort is made so as to complete the evaluation process within a reasonable time (three to four weeks) from the date of its submission, regardless of whether the paper is accepted or rejected, or has to be modified. All correspondence takes place via the e-mail of the author in charge and therefore an active e-mail account is necessary. In case that the reviewers request corrections or suggest modifications, the final amended version will be resubmitted by the author in charge,



within three weeks from its return and accompanied by a relevant letter stating all modifications made in the text point by point, as well as the reasoned acceptance or rejection of the reviewers' proposals. Following its final acceptance, the manuscript is sent for printing. If they wish, the authors may receive printing proofs for checking. The proofs have to be re-sent to the printing office by e-mail within three days at the most. If the authors wish to receive reprints, they should send a letter stating the number of desired copies. The relevant expense is borne entirely by the authors. Extensive changes cannot be performed while in the process of proof reading without prior permission by the Editorial Board.

### **Declaration of publication permission**

After the final acceptance of the article for publication, the author in charge must fill in and sign the letter of publication and printing permission, which can be found on the Hellenic Society for Microbiology website ([www.hms.org.gr](http://www.hms.org.gr)). The completed form should be mailed (preferably by registered mail or courier) to the address: "Editorial Board, Journal of Hellenic Society for Microbiology, Ascent, 29 Michalakopoulou 11528, Athens, Greece". It should be noted here that the article will be sent to the printer's only after the letter of permission has been received.