

δελτίον
ελληνικής
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ
ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ



Acta Microbiologica Hellenica

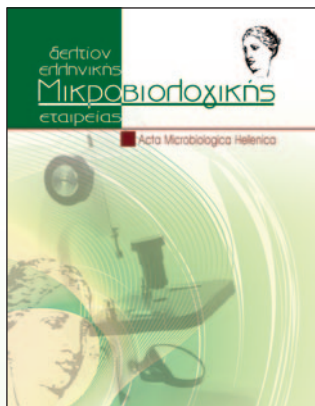
ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ
QUARTERLY JOURNAL OF THE HELLENIC SOCIETY FOR MICROBIOLOGY

Απρίλιος-Ιούνιος 2023 • Τόμος 68 • Τεύχος 2
April-June 2023 • Volume 68 • Issue 2

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

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

ἑλληνικὴ ἐταιρεία Μικροβιολογικῆς ἐταιρείας



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

Mailing Address of Journal: info@hms.org.gr

Annual Subscriptions: (50,00 €)

Cited in sites HMS, IATROTEK & SCOPUS

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

www.mednet.gr

www.iatrotek.org

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

www.iatrotek.org

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. Kocic (Σερβία)

M. Murdjeva (Βουλγαρία)

A.-M. Născuțiu (Ρουμανία)

A. Παπά-Κονιδάρη (Ελλάδα)

I. Παπαπαρασκευάς (Ελλάδα)

Γ. Παππάς (Ελλάδα)

Σ. Πournάρας (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 95

Determining antimicrobial susceptibility and antimicrobial resistance mechanisms in the clinical laboratory: where are we and where are we heading?
Nektaria Rekleiti

ORIGINAL ARTICLE 105

Investigation of virulence factors and their relationship with antimicrobial resistance among uropathogenic *Escherichia coli* isolates identified from patients in Basrah city, Iraq
Huda Al-Moslem, Seyedeh Elham Rezatofghi, Yasin Yacoup Yousif AL-Luaibi, Mohammad Reza Akhoond

ORIGINAL ARTICLE 117

Differences in the detection of virulence genes among clinical isolates of Coagulase-Negative Staphylococci
Anastasios Vogiatzakis, Despina Tassi-Papatheou, Lemonia Skoura, Konstantinos Tsiamis, Athanassios Tsakris, Georgia Vrioni, Joseph Papaparaskevas

ORIGINAL ARTICLE 125

Workflow for microbiological diagnosis of bacterial gastroenteritis combining a molecular assay as first-line with reflective stool culture
Maria Jose Munoz-Davila, C. Candel-Pérez, M.R. Vicente, M. Piqueras, J.M. Artero

ORIGINAL ARTICLE 137

Diagnostic performance of the serology screening testing of blood donors. Retrospective study (2018–2022) conducted at the Serology Laboratory of AHEPA Blood Center
Magdalini Pape, Vasiliki Bakaloudi, Parthena Lazaridou, Dimitris, Pisokas, Pashalia Poulioudi, George Nikolaidis, Aikaterini Boukouvala, Christina Andrikopoulou, Sultana Nikolaidou, Iliana Pentsiou, Chariklia Pafli, Maria Chatzikyrkou

INSTRUCTIONS TO AUTHORS 149

Μεθοδολογίες προσδιορισμού της αντιμικροβιακής ευαισθησίας και των μηχανισμών μικροβιακής αντοχής στο κλινικό εργαστήριο: πού βρισκόμαστε και πού οδεύουμε;
Νεκταρία Ρεκλείτη

Investigation of virulence factors and their relationship with antimicrobial resistance among uropathogenic *Escherichia coli* isolates identified from patients in Basrah city, Iraq
Huda Al-Moslem, Seyedeh Elham Rezatofghi, Yasin Yacoup Yousif AL-Luaibi, Mohammad Reza Akhoond

Διαφορές στην ανίχνευση μολυσματικών γονιδίων μεταξύ κλινικών στελεχών κοαγκουλάση αρνητικών Σταφυλόκοκκων
Αναστάσιος Βογιατζάκης, Δέσποινα Τασσή-Παπαθέου, Λεμονιά Σκούρα, Κωνσταντίνος Τσιάμης, Αθανάσιος Τσακρής, Γεωργία Βρυώνη, Ιωσήφ Παπαπαρασκευάς

Workflow for microbiological diagnosis of bacterial gastroenteritis combining a molecular assay as first-line with reflective stool culture
Maria Jose Munoz-Davila, C. Candel-Pérez, M.R. Vicente, M. Piqueras, J.M. Artero

Αξιολόγηση της διαγνωστικής απόδοσης ορολογικών μεθόδων διαλογής σε αιμοδοτικό πληθυσμό. Αναδρομική μελέτη (2018-2022) του Ορολογικού Εργαστηρίου του Κέντρου Αίματος ΑΧΕΠΑ
Μαγδαληνή Παπέ, Βασιλική Μπακαλούδη, Παρθένα Λαζαρίδου, Δημήτρης Πισώκας, Πασχαλιά Πουλιούδη, Γιώργος Νικολαΐδης, Αικατερίνη Μπουκουβάλα, Χριστίνα Ανδρικοπούλου, Σουλτάνα Νικολαΐδου, Ηλιάνα Πέντσιου, Χαρίκλεια Παφίλη, Μαρία Χατζηκύρκου



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΜΥΚΗΤΟΛΟΓΙΑΣ
www.hsomm.gr

ΗΜΕΡΙΔΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΜΥΚΗΤΟΛΟΓΙΑΣ Υβριδική

ΜΥΚΗΤΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ: ΝΕΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΕΡΓΑΛΕΙΑ ΚΑΙ ΝΕΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

Πέμπτη 19 Οκτωβρίου 2023

The Golden Age Hotel, Αθήνα

ΠΡΟΣΥΝΕΔΡΙΑΚΗ
ΕΚΔΗΛΩΣΗ ΤΟΥ



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

CONGRESSES • PUBLICATIONS • DIGITAL CONSTRUCTIONS



Determining antimicrobial susceptibility and antimicrobial resistance mechanisms in the clinical laboratory: where are we and where are we heading?

Nektaria Rekleiti

Laboratory of Microbiology, Tzaneio General Hospital of Piraeus



Summary

Since the discovery of penicillin, almost a century ago, the battle against resistant microbes has been fierce but uneven. Microbes have been proven quite adaptable and have developed many different antimicrobial resistance (AMR) mechanisms to evade antibiotics. These AMR mechanisms mainly regulate cephalosporin and carbapenem resistance for Gram-negative bacteria, methicillin resistance for *Staphylococcus aureus* and vancomycin resistance for Enterococci. Greece is endemic for most known multi-drug resistant organisms (MDRO) that often cause community and hospital-acquired infections, perplexing treatment, increasing length of stay in the hospital and relevant costs, and increasing morbidity and mortality. Detection and treatment of such infections in a timely and effective way is imperative. For the past few decades, scientists from dif-

ferent scientific fields have been developing technologies and methods to assist the early and reliable detection of AMR to optimize not only treatment but also infection control practices in an effort to restrain it. This review focuses on current practices to detect AMR and the corresponding resistance mechanisms. From the well-established classic diffusion antibiogram to the rapid automated tools that provide susceptibility profiles of bacteria within a few hours, and from the time-consuming phenotypic AMR detection methods to rapid molecular AMR mechanism detection directly from the sample, Microbiology has come a long way. Most microbiological laboratories are currently using a combination of phenotypic and molecular methods for AMR detection, in an effort to make the best out of both. Integrating novel technologies into the laboratory routine workflow has its challenges, with the financial burden being one of the most significant. However, if the progress in the field of Microbiology since the emergence of the first resistant microbe until now is any indication, the future holds many more adventures and scientific breakthroughs in the fight against AMR.



Key words

Antimicrobial susceptibility; antimicrobial resistance mechanisms; phenotypic resistance detection; molecular resistance detection

Corresponding author

*Nektaria Rekleiti
Laboratory of Microbiology
Tzaneio General Hospital of Piraeus
Zanni - Afentouli av., 185 36 Piraeus
Email: nekrek@gmail.com*

The road so far

Microbes have been living on Earth long before humans came into the picture. They have left their small carbon footprints in rocks and stromatolites dating back approximately 3.5 billion years. All this extra time has worked on their benefit, rendering them smarter, fitter, and more adaptable through countless evolutionary events. After the discovery of penicillin by Sir Alexander Fleming in 1928, the medical community, and along with it all of humanity, thought that triumph over microbes and subsequently the end of microbial infections was near. Unfortunately, it went down the exact opposite way. A few years later, in 1940, Abraham and Chain reported an *Escherichia coli* strain that produced penicillinase, followed by reports of resistant *Staphylococcus aureus* strains.^{1,2} For every new antibiotic agent ever since, bacteria would adapt and develop a corresponding resistance mechanism.

The World Health Organisation has included antimicrobial resistance (AMR) in the three most important public health threats of the 21st century.³

Sharing the same ecological niche with other organisms that naturally produced antibiotic compounds, led to species exhibiting a plethora of different intrinsic resistance profiles.⁴ However, intrinsic resistance does not substantially add to the AMR problem. When observing the AMR issue through the clinical lens, acquired resistance, i.e. resistance to antibiotics to which they were previously susceptible, is of importance. Acquired resistance can be a result of either a series of genetic mutating events altering the way a bacterium responds to the antibiotic compound, or by obtaining genetic material associated with resistance through horizontal transfer. Genetic mutations can lead to alterations in the antimicrobial target, decrease in the drug uptake, activation of efflux mechanisms extruding the compound, or alter-

ations in important metabolic pathways.⁵ Genetic horizontal transfer is the result of transformation, transduction, and conjugation. Clinically relevant bacteria often acquire resistance through conjugation, using genetic mobile elements, namely plasmids, transposons and intergrons.⁶

Main mechanisms of resistance in *Enterobacterales* are the production of extended spectrum β -lactamases (ESBL) rendering them resistant to third generation cephalosporins, and carbapenemase production leading to carbapenem resistance. Carbapenemases are classified in four classes according to Ambler, the most frequently used classification system. Clinically important strains produce *Klebsiella pneumoniae*-carbapenemases (KPC) (class A), metallo- β -lactamases VIM and NDM (class B) and OXA-48 (class D).⁷ Resistance to carbapenems in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by OprD loss and class B carbapenemase production such as VIM, IMP or NDM, while *Acinetobacter baumannii* produces non-OXA-48 class D carbapenemases.^{8,9} The main mechanism for resistance to β -lactams in *S. aureus* is penicillin-binding protein production (PBP) resulting in low β -lactam affinity. Genes *mecA* and *mecC* code for production of PBP2a and PBP2, leading to methicillin resistance (MRSA).¹⁰ Lastly, VanA or VanB ligases lead to reduced glycopeptides binding resulting in vancomycin resistance (VRE).¹¹

Greece is endemic for most known multi-drug-resistant organisms (MDRO). According to the latest antimicrobial resistance report,¹² *Escherichia coli* strains reported from Greece are resistant to third generation cephalosporins at a percentage of 21.9%, to fluoroquinolones 32.7% and to aminoglycosides 18.7%. Reported *K. pneumoniae* isolates are resistant to third generation cephalosporins at a percentage of 74.5%, to carbapenems 66.3%, to fluoroquinolones 74.4% and 61.0% to aminoglycosides. Furthermore, 35.7% and 28.6% of *P. aeruginosa* strains are resistant to carbapenems and aminoglycosides, respectively, while 94.6% of *A. baumannii* strains are carbapenem-resistant. In regard to Gram-positive bacteria, 40.2% of reported *S. aureus* strains are resistant to methicillin and 41.8% of *Enterococcus faecium* strains are resistant to vancomycin.¹²

Pathogens exhibiting resistance to different antibiotic compounds often cause community and hospital-acquired infections, perplexing treatment, increasing length of stay in the hospital and relevant costs and increasing morbidity and mortality.¹³ It is imperative to detect and treat these infections in a timely and effective way. For the past few decades, scientists from different scientific fields have been developing technologies and methods to assist the early and reliable detection of AMR to optimize not only

treatment but also infection control practices in an effort to restrain it.

Where are we

Antimicrobial susceptibility testing (Antibiogram)

1. Classic tools

Antimicrobial susceptibility testing (AST) is the first step to determine the resistance profile of a strain. Classical methods include agar and broth macro- and micro- dilution to determine minimal inhibitory concentration (MIC) of antibiotic agents.¹⁴ The broth microdilution method has been used extensively and is currently the basis of both the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) standard methodologies. MIC can also be determined by using ETEST[®], an antibiotic gradient method that combines agar dilution and disk diffusion principles. Disk diffusion as described by Kirby and Bauer in 1956, is easy to perform, and microbiological laboratories around the world have incorporated this method in their clinical routine workflows, for decades.^{15,16} Disk diffusion is well established and standardised, easy, simple, practical and of low cost. Breakpoints for all relevant clinical and emerging bacteria for disk diffusion, broth microdilution and ETEST[®] methods are available according to both, CLSI and EUCAST.¹⁷ Furthermore, during the past two decades, a variety of chromogenic agar media for detection of resistant strains, including ESBL and carbapenemases production in Gram-negative bacteria, MRSA and VRE, has been developed.^{18,19} Lastly, colorimetric tests for the detection of carbapenemase production, that utilize pH changes indicative of growth of resistant bacteria have been developed in recent years.²⁰

2. Automated tools

The introduction of automated devices for AST has changed the landscape of the daily microbiological routine. These devices perform broth-based microdilution testing utilising wells with broth with increasing concentrations of various antibiotics and continuous monitoring of microbial growth and turbidity to provide MIC. They are efficient, easy to use, of relatively low cost and provide results for both identification and AST fast, significantly reducing the turnaround time compared to the classical methods. The three most widely used Food and Drug Administration (FDA)-approved automated systems are VITEK 2 (bioMérieux, France), Phoenix system (BD Diagnostic Systems, Baltimore, MD, USA) and MicroScan Walkaway (Dade-Behring MicroScan, Deerfield, IL, USA).²¹



3. Rapid tools

Increasing pressure for identification and susceptibility testing of microbes causing life-threatening infections, such as blood stream infections, has led to the development of rapid AST systems. The use of these rapid systems can reduce even further the turnaround time, with identification and AST results in up to 4-6 hours. Technologies behind rapid systems include darkfield microscopy, real imaging, cell sorting, flow cytometry, microfluidics, and bioluminescence.²² Three rapid AST systems have been more extensively described and evaluated in the existing literature. QMAC-dRAST system (QuantaMatrix, Seoul, South Korea), not FDA-approved yet (application submitted in November 2019), utilizes time-lapse microscopic imagery of bacterial colony formation in agarose to determine AST directly from positive blood cultures in as low as 4 hours. In a study from Switzerland that included 130 *Enterobacteriales*, 20 non-fermentative Gram-negative bacteria, 69 staphylococci and 31 enterococci, the overall categorical agreement, compared to BD Phoenix™ M50, was 95.1%, 91.2%, 93.4% and 94.5%, respectively. The median time to result was 6.7 hours and observed very major errors (classification of a resistant strain as susceptible) were below 4%, with the exception of staphylococci (7%).²³ Specific Reveal™ (bioMérieux, France) is a Breakthrough Device Designation – FDA-approved device for rapid AST results, directly from positive blood cultures with a turnaround time of approximately 5.5 hours. The device uses small molecule sensors to detect the volatiles released by microbes as they grow, to quantify antibiotic efficacy. In a recent American study, Specific Reveal showed 96.3% and 96.2% categorical agreement, when compared to Sensititre and Vitek 2, respectively. Very major errors were observed at a percentage of 1.3%.²⁴ Accelerate Pheno® system (Accelerate Diagnostics, USA) is an FDA approved method for microbial identification and AST in 2 and 7 hours, respectively. The system uses gel electrofiltration and fluorescence *in situ* hybridization for identification of Gram-negative bacteria and automated microscopy for bacterial growth rates for AST. In recent studies, Accelerate Pheno has shown high categorical agreement and low percentage of very major errors when compared to different methods, including MALDI-TOF and Vitek 2^{25,26} and is currently under clinical evaluation.

AMR detection

1. Phenotypic tools

Phenotypic tests for detection of AMR mechanisms from microbial colonies have been widely used in mi-

crobiological laboratories. Double Disk Synergy Test is used to detect ESBL production in Gram-negative bacteria, interpreting inhibition zone diameter differences for cephalosporins with and without β -lactamase inhibitors such as clavulanate.²⁷ Several tests have been developed to detect carbapenemase production, some of which can also differentiate between different carbapenemase classes. The use of the Modified Hodge Test for carbapenemase detection is no longer recommended by the CLSI due to false positive results for ESBL and AmpC producers, and false negative results for metallo- β -lactamase producers.²⁸ The Carbapenem Inactivation Method (CIM) detects carbapenemase production by assessing growth or no growth of a susceptible *E. coli* strain around a meropenem disk previously immersed in a suspension of the microbe under investigation. A modified version of CIM, exhibiting high sensitivity and specificity, is recommended by the CLSI.²⁹ The Combination Meropenem Disk Test is based on the inhibiting abilities of boronic acid for KPC carbapenemase and EDTA for metallo- β -lactamase to differentiate between different carbapenemase classes.³⁰

CLSI guidelines recommend Carba NP, CIM, and/or a molecular assay for carbapenemase detection when suspected, namely when MIC for imipenem and meropenem is below 4 $\mu\text{g/ml}$ and below 2 $\mu\text{g/ml}$ for ertapenem. Screening cut-off values for carbapenemase production according to EUCAST for meropenem and ertapenem MIC is 0.125 $\mu\text{g/ml}$ and 28 and 25 mm, respectively. Further investigation is recommended by using a phenotypic method such as a combined disk test, a colorimetric assay, or a lateral flow immunoassay (LFIA). Choosing the appropriate method for carbapenemase production depends mostly on the available resources and the local epidemiology of resistant microorganisms. Greece is endemic for most carbapenemases-producing *Enterobacteriales*, hence laboratories use a combined disk test, such as the Combination Meropenem Disk Test, that confirms carbapenemase production and at the same time differentiates between different classes.

The main disadvantage of the growth-based methods is the need for an incubation of up to 24 hours. Colorimetric tests are based on biochemical or electrochemical reactions that provide result in a few hours. Carba NP test and its variants utilize incubating imipenem with the strain under investigation and a pH indicator. Hydrolysis of imipenem is indicated by the change of colour when the pH changes.³¹ Sensitivity and specificity are high for most carbapenemases produced by *Enterobacteriales*, with the exception of OXA-48. Modified versions of the colorimetric tests have shown improved detection for all carba-

penemases including enzymes produced by non-fermentative Gram-negative bacteria.³² LFIA for detection of carbapenemase production can provide definitive results directly from grown colonies in as little as 15 minutes. Multiplex LFIA exhibit high sensitivity and specificity for all clinically relevant carbapenemases, namely KPC, metallo- β -lactamases and OXA-48 produced by both *Enterobacteriales* and non-fermenters.³³ Local epidemiology and the fact that LFIA cannot detect newly emerging carbapenemases or rare ones should be taken under account. Even though LFIA is a simple to use and rapid method, the relatively high cost is an important factor of consideration when integrating the method in routine laboratory workflow.

Resistance to methicillin for *Staphylococcus aureus* strains can be determined using a disk of cefoxitin as recommended by both the CLSI and EUCAST, with a sensitivity of 97.2% and specificity of 100%, or by any AST method. Resistance to methicillin can also be determined by detecting the PBP2a protein directly on isolated colonies, using latex agglutination (Oxoid, Thermo Fisher Scientific Inc., Lenexa, KS, USA) and an immunochromatographic method (Alere, Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA). Both methods exhibit high sensitivity but relatively low specificity, due to inability to detect methicillin resistance mediated by the *mecC* gene.³⁴ Different AST methods either based on inhibition zones or MIC, can be used to determine resistance to vancomycin for enterococci. Correct species identification is imperative to avoid reporting strains intrinsically resistant to vancomycin, such as *Enterococcus gallinarum* and *E. casseliflavus*. Resistance to both vancomycin and teicoplanin indicate the presence of *vanA* gene while resistance only to vancomycin the presence of *vanB* gene.³⁵ LFIA and immunoassays have been proposed and tested for the detection of VRE in clinical and food samples. The NG-Test *VanA* and *VanB* (NG Biotech, France) have shown excellent sensitivity and specificity.^{36,37} However, determining the presence of *VanA* or *VanB* using LFIA or immunoassays significantly increases the cost, when resistance to vancomycin can be detected by classic cheaper methods like disk diffusion, while not adding to the infection control practices.

2. Molecular tools

Several molecular methods have been used during the past few decades for the detection of resistance genes associated with all known AMR mechanisms, like pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), amplified fragment length polymorphism (AFLP), arbitrarily primed PCR (e.g. RAPD) and multilocus sequence typing (MLST). Whole genome sequence (WGS) has slowly replaced these methods, providing an abundance of

information not only in regard to AMR genes, but also to phylogenetic relatedness and bacterial typing.³⁸ However, WGS has certain disadvantages, like high costs, and requiring special equipment and trained personnel, rendering integrating the method into laboratory routine workflows difficult.³⁹

Genotypic AMR detection methods provide quick and reliable results, either from bacterial colonies or directly from clinical samples, without time-consuming incubation. Such methods may detect a single AMR mechanism or use syndromic panels to detect multiple AMR mechanisms.⁴⁰ Several FDA-approved systems have already been integrated into routine microbiological workflows and evaluated in clinical settings, in recent years.⁴¹

The GeneXpert® system (Cepheid, USA), is an automated platform that provides a variety of assays for AMR detection using real-time polymerase chain reaction (PCR). The instrument can detect the presence of genes associated with all clinically relevant carbapenemases (*bla_{IMP}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{KPC}*) produced by *Enterobacteriales* and *P. aeruginosa* from bacterial colonies, using the CARBA-R assay. The MRSA/SA SSTI and Xpert MRSA/SA, MRSA Nasal Complete assays can detect *mecA*, *SCC_{mec}* and *attB* junction for MRSA, from skin and soft tissue and nasal swabs, respectively. In addition, the Xpert *vanA* and Xpert Carba-R assays can detect *vanA* VRE and carbapenemase genes from *Enterobacteriales*, *A. baumannii* and *P. aeruginosa*, directly from rectal swabs. An Xpert MRSA/SA BC assay has been developed for MRSA detection directly from positive blood cultures.⁴²

The VERIGENE® II System (Luminex, USA) is a molecular diagnostic platform that performs both targeted and multiplex testing on a single sample. The Staphylococcus Blood Culture (BC-S) Nucleic Acid assay detects the *mecA* gene for MRSA and the *mecA*, *vanA*, *vanB* genes for MRSA and enterococci, directly from positive blood cultures.⁴³ In addition, the BC-GN assay detects carbapenemase related genes (*bla_{CTX-M}*, *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{OXA}*, *bla_{KPC}*) for Gram-negative bacteria in positive blood cultures.

The FilmArray (BioFire Diagnostics, USA) platform is a sample-to-answer multiplex PCR syndromic system for the identification of relevant microbial pathogens and detection of AMR genes. The BioFire PN panel detects clinically relevant microbes and associated AMR genes from lower tract respiratory specimens. In addition, the BioFire BCID2 panel detects a wide variety of pathogens from positive blood cultures and AMR genes associated with carbapenemase and ESBL production for Gram-negative bacteria, methicillin resistance for *S. aureus* and vancomycin resistance for enterococci.⁴⁴



3. Proteomic tools

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has been extensively used in recent years for the rapid identification of microorganisms. The method has also been used to detect specific resistance mechanisms by quantifying bacterial enzyme activity towards antibiotics or direct detection of genes associated with antibiotic resistance.⁴⁵ However, the application of the method in practice is debatable since MIC determination is not possible. Furthermore, detection of resistance gene presence does not necessarily translate to resistance to antibiotics.

Where are we heading

Road bumps ahead and future perspectives

Most microbiological laboratories are currently using a combination of phenotypic and molecular methods for AMR detection, in an effort to make the best out of both. Phenotypic detection often requires prolonged turnaround time but is of lower cost, while molecular methods are fast, yet expensive. Patients might benefit from laboratory workflows that prioritize molecular detection in clinical specimens with indication of invasive life-threatening infection. For example, using a combination of a rapid identification system such as MALDI-TOF, after rapid incubation of a positive blood culture, with a rapid AST platform, followed by phenotypic AMR detection via LFIA, could yield results in only a few hours. In addition, for critically ill patients or patients with known MDRO risk factors, with a positive blood culture, using a sample-to-answer syndromic platform, can provide valuable information in as fast as one hour. Furthermore, rapid detection or no detection of any AMR mechanism can optimize antibiotic stewardship efforts.

Even though Microbiology has come a long way since the detection of the first resistant microbe, there are still some obstacles we need to overcome. Integrating rapid phenotypic and molecular methods for AMR detection in the daily laboratory routine requires keeping up with innovative and cutting-edge technologies, special equipment, trained personnel, and efficiently utilize and communicate the relevant information and data to clinicians, in order to optimize clinical practices. More importantly, these methods need to be integrated in a financially sustainable way, especially in MDRO endemic environments like Greece, where the high number of isolated MDRO can substantially increase the costs.

There are currently many promising technologies

in the field of AMR detection, at the stage of proof of concept. These include microfluidics with automated time-lapse photomicrography, measuring optical density and the scattered intensity by forward laser light scattering, single-cell morphological analysis, detection of volatile organic compounds associated with microbial metabolism, and cultivation and semi quantitative smartphone-based visual analysis of nucleic acid products.⁴⁶

Artificial intelligence (AI) is a field that combines computer science and robust datasets, to enable problem-solving. Machine-learning is a branch of AI that utilizes data and algorithms to imitate the way the human brain learns and processes information to improve performance. AI has already been tested through different angles, in order to determine the different approaches that can be used regarding AMR detection and management. These approaches include the prediction of AMR by a combination of flow cytometry and machine learning and a combination of infrared spectroscopy with artificial neural network.⁴⁷ In addition, AI can analyse and manage shotgun or metagenomic DNA sequences for the prediction of AMR. Furthermore, machine learning models have shown potential for diagnosing sepsis based on parameters such as clinical signs, biochemical factors and biomarkers, and ultimately support the optimization of antibiotic strategies for sepsis. However, integrating AI for AMR detection in clinical laboratories poses some significant challenges. In addition to the extensive training needed to use AI programs and interpret the results, obtaining the necessary big data to export clinically relevant conclusions is expensive and time consuming. Data quality, also significantly affects AI performance. Lastly, when it comes to AMR mechanisms for less common microorganisms or isolated from unusual environments, it is challenging to develop effective machine-learning models.^{48,49}

Conclusions

This review demonstrates the abundance of methods at our disposal when it comes to battling AMR. The susceptibility profile of a microorganism can be determined by the inhibition zones of the simple disk diffusion method, by the MIC provided by BMD, ETEST© and automated tools or even directly from positive blood cultures in a matter of a few hours. In addition, AMR mechanisms can be detected using phenotypic disk tests, immunoassays, LFIA and more elaborate molecular methods. Many more principles and methods are currently being developed and tested to that end.

Undoubtedly, evolution of AMR poses various challenges and often complicates the development of efficient diagnostic tools, the determination of optimal treatment and the implementation of appropriate infection control practices. However, if the progress in the field of Microbiology since the emergence of the first resistant microbe until now is any indication, the future holds many more adventures and scientific breakthroughs in the fight against AMR.

Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.

The author has received a 2 months scholarship grant from the Hellenic Society for Microbiology (year 2023, at Clinical Microbiology and Virology Unit, Careggi University Hospital, Florence, Italy.)



Περίληψη

Μεθοδολογίες προσδιορισμού της αντιμικροβιακής ευαισθησίας και των μηχανισμών μικροβιακής αντοχής στο κλινικό εργαστήριο: πού βρισκόμαστε και πού οδεύουμε;

Νεκταρία Ρεκλείτη

Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Γενικό Νοσοκομείο Πειραιά «Τζάνειο»

Από την ανακάλυψη της πενικιλίνης, περίπου έναν αιώνα πριν μέχρι σήμερα, η μάχη εναντίον των μικροβίων έχει υπάρξει σφοδρή αλλά και άνιση. Τα μικρόβια έχουν αποδειχθεί εξαιρετικά ευπροσάρμοστα αναπτύσσοντας πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς αντοχής απέναντι στα αντιβιοτικά. Οι κυριότεροι μηχανισμοί αντοχής αφορούν την αδρανοποίηση των κεφαλοσπορινών και των καρβαπενεμών για τα Gram αρνητικά βακτήρια, την αντοχή στην μεθικιλίνη για τον *Staphylococcus aureus* και την αντοχή στην βανκομυκίνη για τους εντεροκόκκους. Η Ελλάδα είναι ενδημική για τα περισσότερα πολυανθεκτικά μικρόβια τα οποία προκαλούν ενδοноσοκομειακές λοιμώξεις, αλλά και λοιμώξεις της κοινότητας που περιπλέκουν την θεραπεία των ασθενών, επιμηκύνουν την παραμονή τους στο νοσοκομείο, αυξάνουν το κόστος νοσηλείας και εμφανίζουν υψηλή νοσηρότητα και θνητότητα. Η ανίχνευση και θεραπεία των λοιμώξεων από πολυανθεκτικά μικρόβια με τρόπο αξιόπιστο και γρήγορο είναι ιδιαίτερα σημαντική. Τις τελευταίες δεκαετίες επιστήμονες από διαφορετικά πεδία έχουν αναπτύξει νέες τεχνολογίες και μεθόδους, με σκοπό να βελτιστοποιηθεί τόσο η θεραπευτική αντιμετώπιση όσο και οι πρακτικές ελέγχου λοιμώξεων. Με την παρούσα μελέτη γίνεται μια ανασκόπηση των μεθόδων ανίχνευσης αντιμικροβιακής αντοχής και των μηχανισμών της. Από το κλασικό αντιβιογράμμα διάχυσης δίσκων στα γρήγορα συστήματα καθορισμού προφίλ ευαισθησίας μέσα σε λίγες μόνο ώρες, και από τις πολύωρες φαινοτυπικές μεθόδους ανίχνευσης αντοχής μέχρι τα γρήγορα μοριακά πάνελ ανίχνευσης μηχανισμού αντοχής απευθείας από το δείγμα, η Μικροβιολογία έχει κάνει άλματα. Τα περισσότερα μικροβιολογικά εργαστήρια χρησιμοποιούν έναν συνδυασμό των κλασικών και των νεότερων μοριακών μεθόδων για την ανίχνευση του μηχανισμού αντοχής, καθώς η αποκλειστική εφαρμογή μοριακών μεθόδων εμφανίζει ακόμη αρκετές προκλήσεις, με μια από τις κυριότερες την οικονομική επιβάρυνση. Ωστόσο, η αλματώδης πρόοδος της Μικροβιολογίας από την εμφάνιση του πρώτου ανθεκτικού μικροβίου μέχρι και σήμερα, αποτελεί ελπιδοφόρο οίονό για το μέλλον και τις συναρπαστικές ανακαλύψεις που θα φέρει.



Λέξεις κλειδιά

Αντιβιογράμμα, μηχανισμός αντοχής στα αντιβιοτικά, φαινοτυπική ανίχνευση αντιμικροβιακής αντοχής, μοριακή ανίχνευση αντιμικροβιακής αντοχής

References

1. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev Infect Dis* 1988; 10:677–678.
2. Rammelkamp CH, Maxon T. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the Action of Penicillin. *Exp Biol Med* 1942; 51:386-389.
3. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. World Health Organization; 2014.
4. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr* 2016; 4:10.1128
5. Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol* 2018; 4:482-501.
6. Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3:711–721.
7. Hall BG, Barlow M. Revised Ambler classification of {beta}-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55:1050–1051.
8. Yoon EJ, Jeong SH. Mobile carbapenemase genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* 2021; 12:614058
9. Nguyen M, Joshi S. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*, and their importance in hospital-acquired infections: A scientific review. *J Appl Microbiol* 2021; 131:2715–2738.
10. Fuda CC, Fisher JF, Mobashery S. Beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptive resistance of a plastic genome. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62:2617-2633.
11. Arthur M, Quintiliani R. Regulation of VanA- and VanB-type glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:375–381.
12. WHO Regional Office for Europe/European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 – 2020 data. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2022.
13. Nelson RE, Hyun D, Jezek A, Samore MH. Mortality, Length of Stay, and Healthcare Costs Associated With Multidrug-Resistant Bacterial Infections Among Elderly Hospitalized Patients in the United States. *Clin Infect Dis* 2022; 74:1070-1080.
14. Golus J, Sawicki R, Widelski J, Ginalska G. The agar microdilution method—A new method for antimicrobial susceptibility testing for essential oils and plant extracts. *J Appl Microbiol* 2016; 121:1291–1299.
15. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45:493–496.
16. Tenover FC. Antimicrobial Susceptibility Testing, Encyclopedia of Microbiology (Fourth Edition), Academic Press, 2019, Pages 166-175
17. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 13.0. <http://www.eucast.org>. Accessed April 2023.
18. Samra Z, Bahar J, Madar-Shapiro L. Evaluation of CHROMagar KPC for rapid detection of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2008; 46:3110–3111.
19. Ledebouer NA, Das K, Eveland M, Roger-Dalbert C, Mailler S, Chatellier S, et al. Evaluation of a novel chromogenic agar medium for isolation and differentiation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates. *J Clin Microbiol* 2007; 45:1556-1560.
20. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2012; 18:1503-1507.
21. Benkova M, Soukup O, Marek J. Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice. *J Appl Microbiol* 2020; 129:806-822.
22. Jacobs MR, Colson JD, Rhoads DD. Recent advances in rapid antimicrobial susceptibility testing systems. *Expert Rev Mol Diagn* 2021; 21:563-578.
23. Rosselin M, Prod'homme G, Greub G, Croxatto A. Performance Evaluation of the Quantamatrix QMAC-dRAST System for Rapid Antibiotic Susceptibility Testing Directly from Blood Cultures. *Microorganisms* 2022; 10:1212.
24. Tibbetts R, George S, Burwell R, Rajeev L, Rhodes PA, Singh P, et al. Performance of the Reveal Rapid Antibiotic Susceptibility Testing System on Gram-Negative Blood Cultures at a Large Urban Hospital. *J Clin Microbiol* 2022; 60:e0009822.
25. Pantel A, Monier J, Lavigne JP. Performance of the Accelerate Pheno™ system for identification and antimicrobial susceptibility testing of a panel of multi-drug-resistant Gram-negative bacilli directly from positive blood cultures. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73:1546-1552.
26. Patel YA, Kim TJ, Weinstein MP, Uprety P. Systematic Evaluation of the Accelerate Pheno System for Susceptibility Testing of Gram-Negative Bacteria Isolated from Blood Cultures. *Microbiol Spectr* 2021; 9:e0183621.
27. Kaur J, Chopra S, Sheevani, Mahajan G. Modified Double Disc Synergy Test to Detect ESBL Production in Urinary Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Diagn Res* 2013; 7:229-233.
28. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Dong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of



- Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7:88–91.
29. Yamada K, Kashiwa M, Arai K, Nagano N, Saito R. Evaluation of the modified carbapenem inactivation method and sodium mercaptoacetate-combination method for the detection of metallo- β -lactamase production by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Microbiol Methods* 2017; 132:112–115.
 30. Pournaras S, Zarkotou O, Poulou A, Kristo I, Vrioni G, Themeli-Digalaki K, *et al.* A combined disk test for direct differentiation of carbapenemase-producing enterobacteriaceae in surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol* 2013; 51:2986–2990.
 31. Bakour S, Garcia V, Loucif L, Brunel JM, Gharout-Sait A, Touati A, *et al.* Rapid identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* using a modified Carba NP test. *New Microbes New Infect* 2015; 7:89–93.
 32. Literacka E, Herda M, Baraniak A, Zabicka D, Hryniewicz W, Skoczynska A, *et al.* Evaluation of the Carba NP test for carbapenemase detection in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp., and its practical use in the routine work of a national reference laboratory for susceptibility testing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017; 36:2281–2287.
 33. Boutal H, Vogel A, Bernabeu S, Devilliers K, Creton E, Cotellon G, *et al.* A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of NDM-, KPC, IMP- and VIM-type and OXA-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73:909–915.
 34. Sanchini A. Recent Developments in Phenotypic and Molecular Diagnostic Methods for Antimicrobial Resistance Detection in *Staphylococcus aureus*: A Narrative Review. *Diagnostics (Basel)* 2022; 12:208.
 35. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: EUCAST expert rules version 3.2: Intrinsic resistance and exceptional phenotypes tables.
 36. Oueslati S, Volland H, Cattoir V, Bernabeu S, Girlich D, Dulac D, *et al.* Development and validation of a lateral flow immunoassay for rapid detection of VanA-producing enterococci. *J Antimicrob Chemother* 2021; 76:146–151.
 37. Oueslati S, Gonzalez C, Volland H, Cattoir V, Bernabeu S, Girlich D, *et al.* Rapid Detection of VanA/B-Producing Vancomycin-Resistant Enterococci Using Lateral Flow Immunoassay. *Diagnostics (Basel)* 2021; 11:1805.
 38. Fournier PE, Drancourt M, Raoult D. Bacterial genome sequencing and its use in infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 2007; 7:711–723.
 39. Rossen JWA, Friedrich AW, Moran-Gilad J. ESCMID Study Group for Genomic and Molecular Diagnostics (ESGMD). Practical issues in implementing whole-genome-sequencing in routine diagnostic microbiology. *Clin Microbiol Infect* 2018; 24:355–360.
 40. She R, Bender J. Advances in rapid molecular blood culture diagnostics: healthcare impact, laboratory implications, and multiplex technologies. *J Appl Lab Med* 2019; 3:617–630.
 41. Banerjee R, Patel R. Molecular diagnostics for genotypic detection of antibiotic resistance: current landscape and future directions. *JAC Antimicrob Resist* 2023; 5:dlad018.
 42. Buchan BW, Allen S, Burnham CAD, McElvania Te-Kippe E, Davis T, Levi M, *et al.* Comparison of the next-generation Xpert MRSA/SA BC assay and the GeneOhm StaphSR assay to routine culture for identification of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* in positive-blood culture broths. *J Clin Microbiol* 2015; 53:804–809.
 43. Banerjee R, Teng C, Cunningham S, Ihde SM, Steckelberg JM, Moriarty JP, *et al.* Randomized trial of rapid multiplex PCR-based blood culture identification and susceptibility testing. *Clin Infect Dis* 2015; 61:1071–1080.
 44. Altun O, Almuhayawi M, Ullberg M, Ozenci V. Clinical evaluation of FilmArray blood culture identification panel in identification of bacteria and yeasts from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2013; 51:4130–4136.
 45. Benkova M, Soukup O, Marek J. Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice. *J Appl Microbiol* 2020; 129:806–822.
 46. Vasala A, Hytönen VP, Laitinen OH. Modern Tools for Rapid Diagnostics of Antimicrobial Resistance. *Front Cell Infect Microbiol* 2020; 10:308.
 47. Lv J, Deng S, Zhang L. A review of artificial intelligence applications for antimicrobial resistance. *Biosaf Health* 2020; 3:10.1016
 48. Tsoukalas A, Albertson T, Tagkopoulos I. From Data to Optimal Decision Making: A Data-Driven, Probabilistic Machine Learning Approach to Decision Support for Patients With Sepsis. *JMIR Med Inform* 2015; 3:e11
 49. Ali T, Ahmed S, Aslam M. Artificial Intelligence for Antimicrobial Resistance Prediction: Challenges and Opportunities towards Practical Implementation. *Antibiotics* 2023; 12:523.

Investigation of virulence factors and their relationship with antimicrobial resistance among uropathogenic *Escherichia coli* isolates identified from patients in Basrah city, Iraq

Huda Al-Moslem¹; Seyedeh Elham Rezatofighi¹; Yasin Yacoup Yousif AL-Luaibi²; Mohammad Reza Akhoond³

¹Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

²Department of Biology, College of Science; University of Basrah; Basrah; Iraq

³Mathematical Sciences and Computer Faculty, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran



Summary

Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is one of the main causes of urinary tract infections (UTIs). We aimed to investigate the antimicrobial resistance (AMR) pattern, the frequency of some virulence genes (VGs), and the association of AMR with VGs.

A total of 300 urine samples were collected from patients suspected to have UTI. The samples were examined by biochemical and microbiological methods and VITEK2 compact system to identify the bacterial infectious agents. The antimicrobial resistance pattern and virulence genes

(*papAH*, *papC*, *papEF*, *papG*, *fimH*, and *fyuA*) profile of UPEC isolates were investigated and the relationship between these traits was evaluated by statistical methods.

Among these samples, 201 (67%) exhibited a positive growth on culture media. *E. coli* was isolated from 60 (29.85 %) specimens followed by *Klebsiella pneumoniae* 42 (20.90%), *Staphylococcus aureus* 38 (18.9%), *Enterobacter* spp 29 (14.43%), *Pseudomonas aeruginosa* 10 (4.98%), *Proteus mirabilis* 15 (7.46%), others about 7 (3.48 %) isolates. Antibiogram results of 15 antibiotics examined showed that all *E. coli* isolates were multidrug-resistant (MDR). The commonest antimicrobial resistance was observed against Streptomycin (100%), Kanamycin (98.3%), and Ampicillin (96.7%). The most sensitive agents were Meropenem (96.4%), Nitrofurantoin (93.4%), and Imipenem (85%). VGs detected among UPEC isolates were *fimH* (88.3%), *papAH* (85%), *papC* (85%), *papG* (80%), *fyuA* (80%), and *papEF* (60%). These results alleged no strong correlation between VGs and AMR in *E. coli* strains.

Based on the results of the present study, virulence genes, and antimicrobial resistance are independent properties and can transfer to other bacteria separately. Further studies are needed to better understand the relationship between different virulence factors (VFs) and AMR at a molecular level, as most UPEC isolates express several VFs and AMR simultaneously.



Key words

Uropathogenic *Escherichia coli*; Antimicrobial Resistance; Virulence genes; Urinary tract infection

Corresponding author

Seyedeh Elham Rezatofighi

Postal code: 6135743135;

Tel.: +00986113331045; Fax:

+00986113331045;

e.tofighi@yahoo.com; e.tofighi@scu.ac.ir

ORCID ID Seyedeh Elham Rezatofighi:

0000-0003-1373-7346

Introduction

Urinary tract infection (UTI) is an important infectious disease in humans. Previous studies have reported that UTI can be caused by many pathogens such as *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, and other microorganisms.¹ *E. coli*, the main cause of UTI, is a part of the normal flora of healthy individuals but some strains may lead to disease in the intestine or some other organs. Uropathogenic *E. coli* (UPEC) strains have acquired virulence properties that enable them to cause disease. Pathogenic *E. coli* strains are

generally classified into three groups of diarrheagenic, uropathogenic and strains causing other extra-intestinal manifestations, including sepsis/meningitis.²

To form a UTI, *E. coli* needs to overcome several defense lines. Virulence factors (VFs) are molecules produced by bacteria that enable the microorganisms to thrive within host species, and increase the ability of microbes to cause disease.³ Virulence genes (VGs) of UPEC strains are transferred by plasmids or localized on chromosomal gene clusters, called "pathogenicity islands".⁴

Some of the major VFs which found in UPEC are ad-

hesins, protectins, toxins, and iron-acquisition systems.⁵ More than ten different pilus systems are recognized in UPEC strains; however, the most common and best characterized are type 1 and P pili encoded by the *fim* and *pap* operons, respectively.⁶

The second common VG of UPEC is *papC* which plays an important role in producing pyelonephritis caused by ascending UPEC strains. P fimbriae are heteropolymeric fibers composed of different protein subunits including Pap C, Pap A, Pap H, Pap K, Pap E, and Pap F.⁷

Several iron-acquisition systems have been identified in pathogenic *E. coli*. Yersiniabactin is associated with a siderophore system in which low mass molecules have high affinities for iron absorption, and are important in pathogenic bacteria. Yersiniabactin could solubilize the metal bounds in host binding proteins and transport iron to bacteria because of their high affinity to iron. The expression of yersiniabactin is regulated by *fyuA* gene.⁸

Antimicrobial resistance (AMR) genes are typically acquired through mobile genetic elements (MGE) including plasmids, insertion sequence elements, transposons, and integrons.⁹

Many MGEs, especially plasmids, are transferred between different members of the *Enterobacteriaceae* enabling the spread of the resistance genes.¹⁰ MGE scan also encode VFs, and there may be an interplay between virulence and AMR.⁹ AMR is rapidly increasing and has become a global problem. Resistance development and appearance of multidrug-resistant (MDR) strains in UTIs may be due to frequent use of antimicrobial agents usually with broad spectrum, hospitalization, anomalies in the urinary tract system, age, catheterization, and recurrent UTIs.¹¹

Several studies have shown that resistant *E. coli* strains tend to be less pathogenic than susceptible isolates; however, some studies reported opposite results.^{12,13} Furthermore, it remains unclear whether virulence and antimicrobial resistance are co-associated factors or independent. In this study, we investigated the frequency of some VGs and resistance against antibiotics, then their relationships were determined.

Materials and Methods

Sample Collection

The current study was conducted at the AL Zubair Hospital and Dar AL Shifaa Investment Hospital in Basra; Iraq, from November 2020 to March 2021. The urine samples were collected from patients referred to AL Zubair hospital and Dar AL Shifaa Investment hospital in Basra, Iraq. A total of 300 urine specimens

were collected, and then the demographical data such as name, age, gender, address and clinical manifestation (cystitis, pyelonephritis) were recorded by physicians. The samples of patients who had taken any medicine in the past three days were excluded from the study. Midstream urine was collected from suspected patients and sent to the laboratory for further analysis.

Isolation and identification of microorganisms

Urine samples were analyzed and then cultured on blood agar (Merck, Germany) and MacConkey agar (Merck, Germany). Cultured samples were incubated overnight at 37°C. If the growth count was less than 10³ CFU/mL or when growth of two or more species were detected, the samples were considered negative or contaminated, respectively. Urinary infection was positive by the number of ≥10⁵ CFU/mL. Grown bacteria were identified using conventional morphological and biochemical tests including Gram staining, culture on Eosin Methylene Blue (Merck, Germany), Triple Sugar Iron agar (TSI)(Merck, Germany), Methyl Red-Voges-Proskauer (MR-VP)(Merck, Germany), and Simmons Citrate agar (Merck, Germany). Final confirmation was performed using VITEK2 compact system (Biomérieux, USA).

Antimicrobial Susceptibility Testing

All *E. coli* isolates were subjected to antibiotic susceptibility analysis using the Kirby-Bauer disc diffusion method. The selection of antibiotic discs was done according to the guidelines recommended by the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2020).¹⁴ Antibiotic discs (Liofilchem, Italy) used, included streptomycin (10 µg), kanamycin (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), amikacin (30 µg), amoxicillin-clavulanate (30 µg), tetracycline (30 µg), meropenem (10 µg), ampicillin (25 µg), cefotaxime (30 µg), trimethoprim-sulphamethoxazole (25 µg), nitrofurantoin (300 µg), ceftazidime (30 µg), and imipenem (10 µg).

Genomic DNA Extraction

Genomic DNA of *E. coli* isolates was extracted using Wizard® Genomic DNA extraction kit (Promega, USA) according to the instructions. The extracted DNA was stored at -20°C until use.

Multiplex PCR

The presence of *papAH*, *papC*, *papEF*, *papG*, *fimH*, and *fyuA* genes was evaluated by multiplex PCR. The primer sequences and reactions were performed according to protocols described by Johnson and Stell.¹⁵ Amplification was done in a 25-µL reaction mixture containing 12.5 µL PCR master mix (Promega; USA),



5µL DNA template, 0.6 µM of each primer and distilled water up to 25µL. PCR amplifications consisted of primary denaturation at 94°C for 5 min, 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 60°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min and finally an extension at 72°C for 7 min in a thermal cycler (Applied Bio System USA).

Statistical Analysis

Relationship between VFs and antimicrobial resistance was evaluated using Spearman’s correlation coefficient matrix. Results were shown using a correlogram drawn by R software (version 4.1.3). Correlations with a $p < 0.001$ were considered significant. A dendrogram was drawn according to UPGMA (unweighted pair group method with averaging) supported by the Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS) package version 2.02pc to evaluate the similarity between isolates based on VGs profile and antimicrobial resistance pattern of UPEC isolates.

Results

Profile of bacteria isolated from patients with UTI

In the present study, 300 urine samples were collected from patients suspected to have UTI based on clinical manifestations. Among these, 201 (67%) exhibited growth of uropathogenic bacteria, while 99 (33%) showed no growth. Out of 201 detected isolates, 38 (18.9%) and 163 (81.1%) were Gram-positive, and

Gram-negative bacteria, respectively. The positive cultures for women and men were 152 (75.62%) and 49 (24.37%), respectively, which was statistically significant ($p < 0.05$). These identified bacteria belonged to different genera. Among Gram negatives, 60 (29.85%), 42 (20.90%), 29 (14.43%), 15 (7.46%), and 10 (4.98%) urine specimens were positive for *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter sp.*, *Proteus mirabilis*, and *Pseudomonas aeruginosa*, respectively. The other Gram negatives were about seven (3.48 %). *Staphylococcus aureus*, a Gram positive pathogen, was isolated from 38 urine samples (Fig 1). The samples which showed no bacterial growth or growth below 10^5 cfu/mL were excluded from the study. Symptoms of these patients could be attributed to other causes outside the target of this study. Therefore, we found *E. coli* as the predominant etiology of UTI.

Antimicrobial Susceptibility Determination

All UPEC isolates were subjected to antimicrobial susceptibility testing according to the CLSI (2020) guidelines. As shown in Fig 2, antimicrobial resistance was determined, in receding frequency, against streptomycin (100%), ampicillin (95%), ceftazidime (93.3%), cefotaxime (86.7%), trimethoprim-sulphamethoxazole (78.3%), amoxicillin-clavulanate (63.3%), nalidixic acid (58.3%), ciprofloxacin (53.3%), kanamycin (40%), gentamycin (36.7%), amikacin (26.7%), imipenen (15%), nitrofurantoin (6.6%), meropenem (3.3%) (Fig 2).

Distribution of VGs

The PCR results showed that 96% of the UPEC isolates

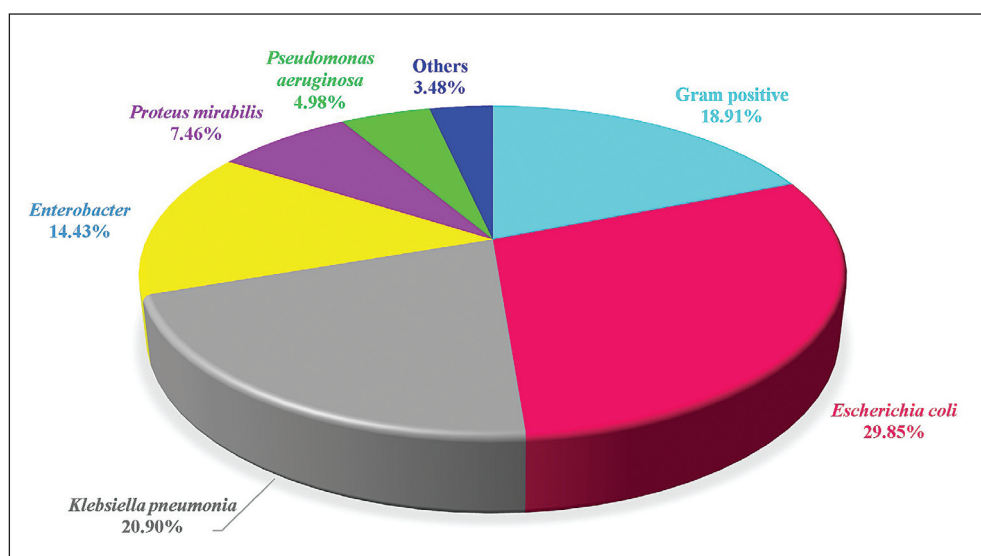


Figure 1 Profile of bacteria isolated from patient with urinary tract infection.

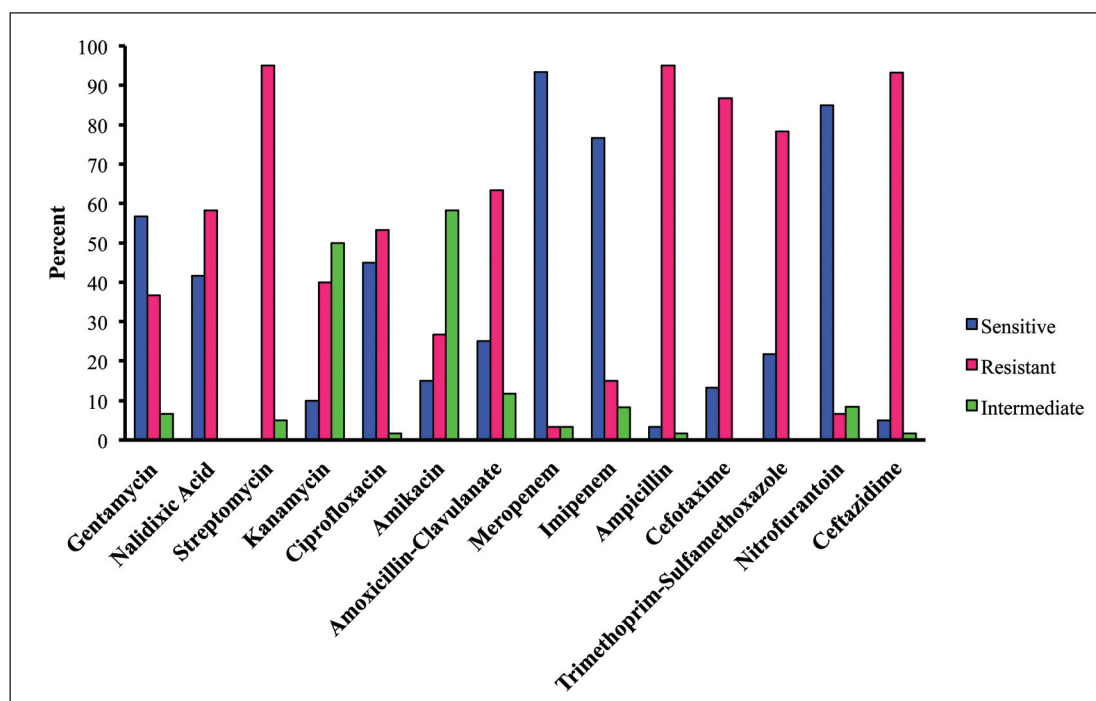


Figure 2 Antibiotic susceptibility pattern of uropathogenic *Escherichia coli* isolates.

had at least one of the investigated VGs. The highest and lowest frequencies were related to the *fimH* (88.3%) and the *papEF* (60%) isolates. The genes of *papC*, *papAH*, *papG*, and *fyuA* were detected in 51 (85%), 51 (85%), 48 (80%), and 48 (80%) of UPEC isolates, respectively.

Correlation between antimicrobial resistance and VGs

Spearman's correlation coefficient matrix was performed to determine the relationship of antimicrobial resistances, VGs, and antimicrobial resistances with VGs. The strongest associations were detected among resistance to: nalidixic acid and gentamycin, ciprofloxacin and gentamycin, ciprofloxacin and nalidixic acid, and amoxicillin-clavulanic acid and kanamycin. *pap* genes showed a relationship with each other (Fig 3).

Cluster analysis

The drawn dendrogram showed 35 (58%) isolates located in one major cluster due to similarity in genetic background and antimicrobial resistance pattern (Coefficient of 0.8) (Fig 4).

Discussion

Based on our results, UPEC is one of the major caus-

ative agents of UTIs in Basrah city, Iraq. In the present study, the frequency of UPEC isolates was higher in females than in males. It could be due to hormonal and anatomical differences of the urinary tract in females.

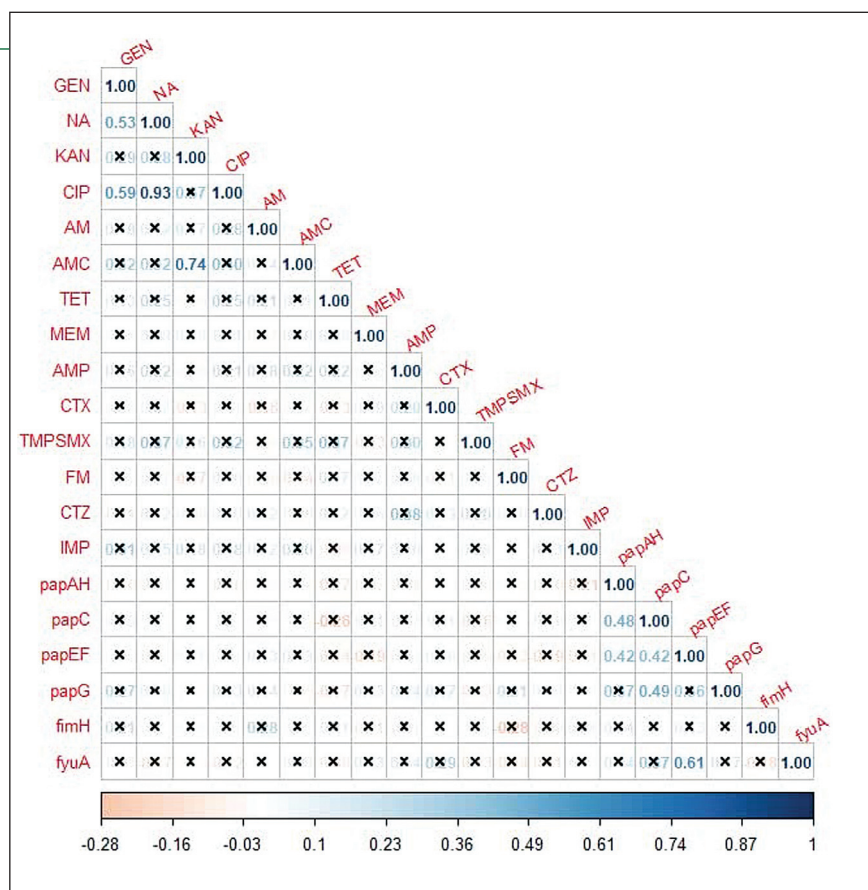
Findings of the present study revealed a high rate of resistance to streptomycin, kanamycin, and ampicillin. Studies from other countries also reported a high frequency of AMR against UPEC isolates.^{12,16} We found that 63.3% of the UPEC isolates were resistant to amoxicillin-clavulanic acid. In Mexico, UPEC strains related to outpatients with uncomplicated UTI showed 19.6% resistance against amoxicillin-clavulanic acid.¹⁷ Another study on community-acquired UTIs in Italy reported 18.2% resistance against amoxicillin-clavulanate in UPEC isolates.¹⁸

With respect to the findings of the present study, UPEC isolates showed high sensitivity to meropenem, nitrofurantoin and imipenem, which was in accordance with the results of other studies.¹⁹⁻²⁰ Nitrofurantoin is prescribed only for the treatment of uncomplicated UTIs, because it cannot reach an appropriate level in the bloodstream. Nitrofurantoin is not recommended for complicated UTI or systemic involvement; however, due to increased resistance against sulfamethoxazole-trimethoprim and quinolones in UPEC strains, the rational use of nitrofurantoin has been recommended in cases such as re-infection or prophylaxis of recurrent uncomplicated UTIs.²¹⁻²²



Figure 3

Correlogram generated according to the relationship between the presence of UPEC virulence genes and antimicrobial susceptibility pattern. The relationships with $p > 0.05$ are marked with a cross (x). GEN: gentamycin; NA: nalidixic acid; KAN: kanamycin; CIP: ciprofloxacin; TET: tetracycline; AM: amikacin, AMC: amoxicillin-clavulanate, TET: tetracycline, MEM: meropenem, AMP: ampicillin, cefotaxime, TMP-SMX: trimthoprim-sulphametoazole, FM: nitrofurantion, CTZ: ceftazidime, and IMP: imipenem.



Detection of VFs can improve our knowledge about the pathogenic processes of UTI and reduce complications such as kidney failure. In the present study, we determined the frequency of six important VGs among UPEC isolates. We deployed a molecular method to explore the association between some VGs and AMR in UPEC strains isolated from patients with UTI in Basrah city, Iraq. UPEC isolates carry different Vgs and are diverse due to the presence of MGEs such as plasmids, transposons, pathogenic islands (PAIs), and bacteriophages. These genetic elements may carry AMR genes in addition to Vgs. It has been reported that some plasmids belonging to the IncF incompatibility group, carry both virulence and antibiotic resistance genes.¹²

Type 1 and P fimbriae are frequent among UPEC strains isolated from cystitis and pyelonephritis, respectively.²³ In the present study, *fimH* which encodes the type 1 fimbria was found in almost (88.3%) UPEC isolates. Other studies reported a lower frequency of *fimH* such as that reported by Paniagua-Contreras *et al* (2017) in Mexico with a prevalence rate of 61.3%.²⁴ Tiba *et al* conducted a study on the VGs of UPEC strains isolated from patients with cystitis.²⁵ The high-

est frequency rates of VFs were related to *fimH* (97.5%) and *papC* (32.7%). In *E. coli* strains isolated from Romanian adults with UTI, the incidence rate of *fimH* and *papC* was reported at 86% and 36%, respectively.²⁶ In our study, both *papC* and *papAH* were found in 85% of UPEC isolates.

The results showed that the UPEC isolates carried these six VFs with high frequencies. These results demonstrated no strong correlation between VGs and AMR in *E. coli* strains. A strong association between *pap* genes indicates that these genes are located in a gene cluster.

Johnson *et al* believe that AMR and virulence do not usually co-evolve and most multidrug resistant isolates are less virulent than susceptible ones.¹³ However, some researchers reported a positive association between virulence traits including *fimH* receptors with AMR.^{27,28} There are many contradictions in this regard. To sum up, UPEC strains differ in their pathogenic potential and susceptibility to antimicrobial drugs in different patient populations, a point that should be considered when guidelines are developed for the management of UTI. Regular evaluations and formulation of antibiotic use policy are essential in

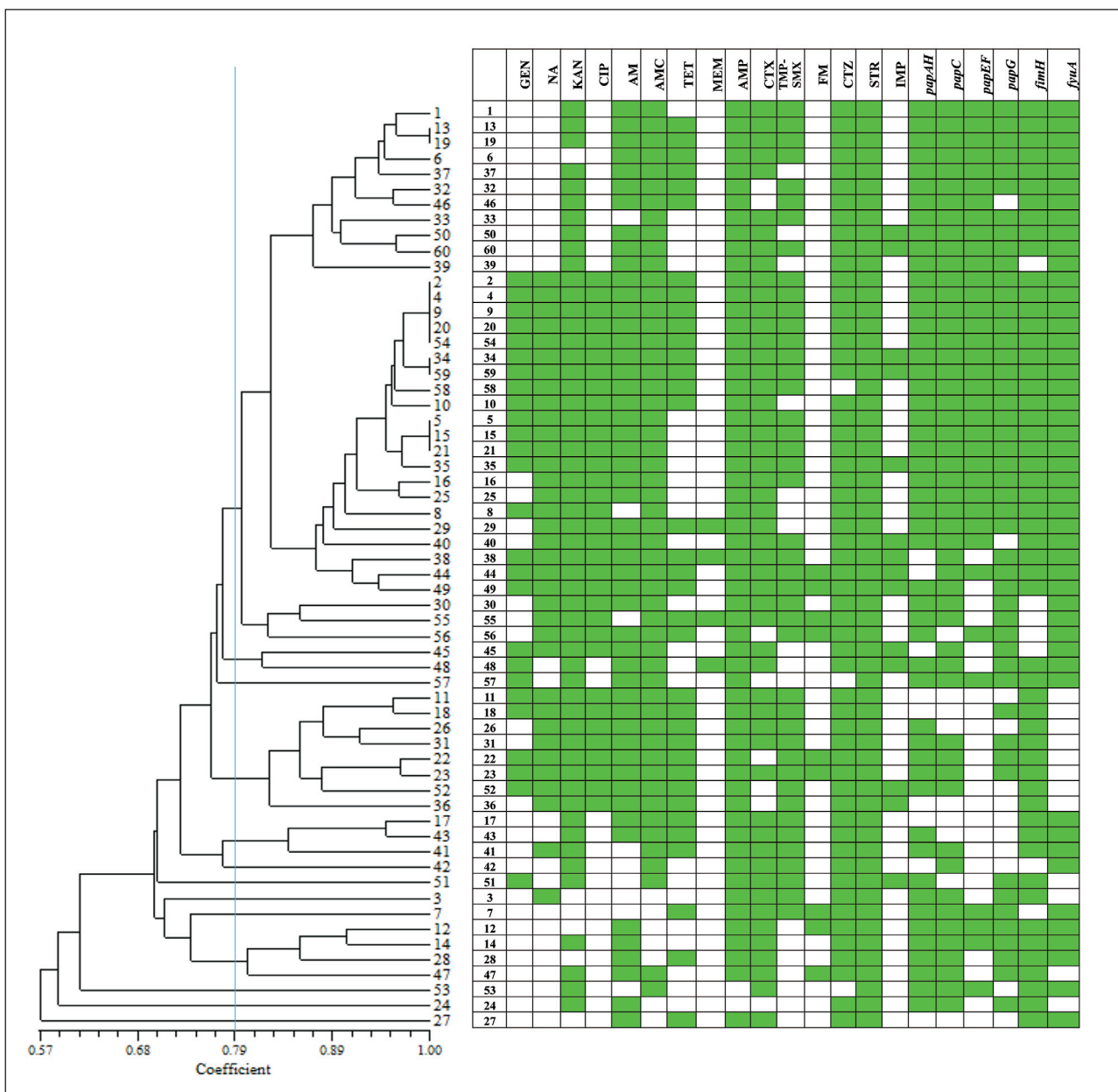


Figure 4 UPGMA (Unweighted pair-group method with arithmetic clustering) dendrogram according to data from antimicrobial resistance phenotype and virulence genes of uropathogenic *Escherichia coli* strains. Positive genes or antimicrobial resistance were shown with green color, while negative genes or antimicrobial susceptibility were shown with white color. GEN: gentamycin; NA: nalidixic acid; KAN: kanamycin; CIP: ciprofloxacin; TET: tetracycline; AM: amikacin, AMC: amoxicillin-clavulanate, TET: tetracycline, MEM: meropenem, AMP: ampicillin, cefotaxime, TMP-SMX: trim-thoprim-sulphametoazole, FM: nitrofurantoin, CTZ: ceftazidime, and IMP: imipenem.

managing the transmission and acquisition of AMR. Further studies are necessary to better understand the relationship between different VFs and AMR at a molecular level as most UPEC isolates simultaneously express several AMR or VFs. However, based on the results of this study VFs and antimicrobial resistance are independent properties and can transfer to other bacteria separately.

Conclusion

E. coli is one of the main causative agents of UTI. The results showed that UPEC isolates harbored different VFs. Moreover, we did not find a strong connection between VFs and AMR in UPEC isolates. Further studies are needed to better understand the relationship between different VFs and AMR at a molecular



level, as the most UPEC isolates simultaneously express several VFs and AMR.

Funding

No funding.

Ethics statement

The study was approved by Ethics Committee of Shahid Chamran University of Ahvaz.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

All authors contributed to the design of the experiment. SER and YYYYA designed and supervised the research study. HA carried out the experiments. MRA participated in the design of the study and data analysis. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors are very thankful to Shahid Chamran University of Ahvaz (Grant Number: SCU.SB1400.658) for the facilities to accomplish the present research project. This study is related to MSc thesis of Huda Al-Moslem.



Περίληψη

Investigation of virulence factors and their relationship with antimicrobial resistance among uropathogenic *Escherichia coli* isolates identified from patients in Basrah city, Iraq

Huda Al-Moslem¹; Seyedeh Elham Rezatofghi^{1*}; Yasin Yacoup Yousif AL-Luaibi²; Mohammad Reza Akhoond³

¹Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

²Department of Biology, College of Science; University of Basrah; Basrah; Iraq

³Mathematical Sciences and Computer Faculty, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

*Corresponding author

Το ουροπαθογόνο στελέχη *Escherichia coli* (UPEC) είναι μια από τις κύριες αιτίες ουρολοιμώξεων (UTIs). Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της αντιμικροβιακής αντοχής (AMR), η συχνότητα ορισμένων γονιδίων λοιμογόνου δράσης (VGs) και η τυχόν συσχέτιση τους. Συνολικά συλλέχθηκαν 300 δείγματα ούρων από ασθενείς με υποψία ουρολοιμώξης. Τα δείγματα εξετάστηκαν με τις κλασικές βιοχημικές και μικροβιολογικές μεθόδους, ενώ η ταυτοποίηση και ο έλεγχος ευαισθησίας των απομονούμενων μικροοργανισμών έγινε με το ημιαυτοποιημένο σύστημα VITEK2 (bioMerieux). Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε το προφίλ γονιδίων λοιμογόνου δράσης (*rapAH*, *rapC*, *rapEF*, *rapG*, *fimH*, and *fyuA*) των απομονούμενων UPEC και έγινε διερεύνηση τυχόν συσχέτισή τους με το αντίστοιχο προφίλ της αντιμικροβιακής αντοχής με στατιστικές μεθόδους. Μεταξύ των δειγμάτων, 201 (67%) έδωσαν θετικό αποτέλεσμα στην καλλιέργεια. Ο μικροοργανισμός *E. coli* απομονώθηκε από 60 (29,85 %) δείγματα, ακολουθούμενος από τους μικροοργανισμούς *Klebsiella pneumoniae* 42 (20,90%), *Staphylococcus aureus* 38 (18,9%), *Enterobacter* spp. 29 (14,43%), *Pseudomonas aeruginosa* 10 (4,98%), *Proteus mirabilis* 15 (7,46%) και λοιποί μικροοργανισμοί 7 (3,48 %). Τα αποτελέσματα αντιβιογράμματος για 15 αντιβιοτικών που εξετάστηκαν έδειξαν ότι όλα τα απομονωμένα στελέχη *E. coli* ήταν πολυανθεκτικά (MDR). Η συνηθέστερη αντιμικροβιακή αντοχή παρατηρήθηκε έναντι στρεπτομυκίνης (100%), καναμυκίνης (98,3%) και αμπικιλίνης (96,7%). Τα μεγαλύτερα ποσοστά ευαισθησίας παρατηρήθηκε σε μεροπενέμη (96,4%), νιτροφουραντοΐνη (93,4%) και ιμιπενέμη (85%). Τα VGs που ανιχνεύθηκαν μεταξύ των απομονώσεων UPEC ήταν: *fimH* (88,3%), *rapAH* (85%), *rapC* (85%), *rapG* (80%), *fyuA* (80%) και *rapEF* (60%). Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι δεν υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ VGs και AMR στα στελέχη *E. coli* της μελέτης. Συμπερασματικά, τα γονίδια λοιμογόνου δράσης και η αντιμικροβιακή αντοχή είναι ανεξάρτητες ιδιότητες και μπορούν να μεταφερθούν χωριστά σε άλλα βακτήρια. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την καλύτερη κατανόηση της σχέσης μεταξύ διαφορετικών παραγόντων λοιμογόνου δράσης (VFs) και AMR σε μοριακό επίπεδο, καθώς τα περισσότερα απομονούμενα στελέχη UPEC εκφράζουν ταυτόχρονα πολλά VFs και πολυαντοχή.



Λέξεις κλειδιά

ουροπαθογόνο *Escherichia coli*, UPEC, αντιμικροβιακή αντοχή, γονίδια λοιμογόνου δράσης, λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος



References

- Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options, *Nat Rev Microbiol* 2015; 13:269-284.
- Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2:123-140.
- Bien J, Sokolova O, Bozko P. Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. *Int J Nephrol* 2012; 2012:681473.
- Navidinia M, Najar Peerayeh S, Fallah F, Bakhshi B, Adabian S, Alimehr S, et al. 2012. Distribution of the Pathogenicity Islands Markers (PAIs) in Uropathogenic *E. coli* Isolated from Children in Mofid Children Hospital. *Arch Pediatr Infect Dis* 2012; 1:75-79.
- Paniagua-Contreras GL, Hernandez-Jaimes T, Monroy-Perez E, Vaca-Paniagua F, Diaz-Velasquez C, Uribe-Garcia A, et al. Comprehensive expression analysis of pathogenicity genes in uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Microb Pathog* 2017; 103:1-7.
- Hospenthal MK, Costa TRD, Waksman G. A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2017; 15:365-379.
- Emo L, Kerenyi M, Nagy G. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 22:29-33.
- Chaturvedi KS, Hung CS, Crowley JR, Stapleton AE, Henderson JP. The siderophore yersiniabactin binds copper to protect pathogens during infection Kaveri. *Nat Chem Biol* 2012; 8:731-736
- Calhau V, Domingues S, Mendonc N, Jorge G, Silva D, Jorge G, et al. Interplay between pathogenicity island carriage, resistance profile and plasmid acquisition in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 2015; 64:828-835.
- Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev* 2018; 31:e00088-17.
- Tenney J, Hudson N, Alnifaity H, Li JTC, Fung KH. Risk factors for acquiring multidrug-resistant organisms in urinary tract infections: A systematic literature review. *Saudi Pharm J* 2018; 26:678-684.
- Rijavec M, Erjavec MS, Avguštin JA, Reissbrodt R, Fruth A, Krizan-Hergouth V, et al. High prevalence of multidrug resistance and random distribution of mobile genetic elements among uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) of the four major phylogenetic groups. *Curr Microbiol* 2006; 53:158-162.
- Johnson JR, Kuskowski MA, Gajewski A, Sahm DF, Karlowsky JA. Virulence characteristics and phylogenetic background of multidrug-resistant and antimicrobial-susceptible clinical isolates of *Escherichia coli* from across the United States, 2000-2001. *J Infect Dis* 2004; 190:1739-1744.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.
- Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* 2000; 181:261-272.
- Johnson JR, Johnston B, Kuskowski MA, Colodner R, Raz R. Spontaneous conversion to quinolone and fluoroquinolone resistance among wild type *Escherichia coli* isolates in relation to phylogenetic background and virulence genotype. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:4739-4744.
- Molina-Lopez J, Aparicio-Ozores G, Ribas-Aparicio RM, GavilanesParra S, Chavez-Berrocual ME, Hernandez-Castro R, et al. Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. *J Infect Dev Ctries* 2011; 5:840-849.
- Pignanelli S, Zaccherini P, Schiavone P, Nardi Pantoli A, Pirazzoli S, Nannini R. *In vitro* antimicrobial activity of several antimicrobial agents against *Escherichia coli* isolated from community acquired uncomplicated urinary tract infections. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013; 17:206-209.
- Arredondo-Garcia JL, Amabile-Cuevas CF. High resistance prevalence towards ampicillin, co-trimoxazole and ciprofloxacin, among uropathogenic *Escherichia coli* isolates in Mexico City. *J Infect Dev Ctries* 2008; 2:350-353.
- Adamus-Bialek W, Zajac E, Parniewski P, Kaca W. Comparison of antibiotic resistance patterns in collections of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* uropathogenic strains. *Mol Biol Rep* 2013; 40:3429-3435.
- Stock I. Nitrofurantoin clinical relevance in uncomplicated urinary tract infections. *Med Monatsschr Pharm* 2014; 37:242-248.
- El Sakka N, Gould IM. Role of old antimicrobial agents in the management of urinary tract infection. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2016; 9:1047-1056.
- Gao Q, Zhang D, Ye Z, Zhu X, Yang W, Dong L, et al. Virulence traits and pathogenicity of uropathogenic *Escherichia coli* isolates with common and uncommon O serotypes. *Microb Pathog* 2017; 104:217-224.
- Paniagua-Contreras GL, Monroy-Pérez E, Rodríguez-Moctezuma JR, Domínguez-Trejo P, Vaca-Paniagua F, Vaca S. Virulence factors, antibiotic resistance phenotypes and O-serogroups of *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infec-

- tion patients in Mexico. *J Microbiol Immunol Infect* 2017; 50:478–485.
25. Tiba MR, Yano T, Leite DS. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2008; 50:255-260.
26. Usein CR, Damian M, Tatu-Chitoiu D, Capusa C, Fagaras R, Tudorache D, *et al.* Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Romanian adult urinary tract infection cases. *J Cell Mol Med* 2001; 5:303–310.
27. Horcajada JP, Soto S, Gajewski A, Smithson A, Jimenez de Anta MT, Mensa J, *et al.* Quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* strains from phylogenetic group B2 have fewer virulence factors than their susceptible counterparts. *J Clin Microbiol* 2005; 43:2962–2964.
28. Zhao L, Chen X, Zhu X, Yang W, Dong L, Xu X, *et al.* Prevalence of virulence factors and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Jiangsu province (China). *Urology* 2009; 74:702–707.



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ
ΕΤΟΣ ΙΔΡΥΣΗΣ 1932



NGS στο σύγχρονο κλινικό εργαστήριο: από τη θεωρία στην πρακτική εφαρμογή

Αθήνα, 23-25 Νοεμβρίου 2023

ΗΜΕΡΙΔΑ

23 Νοεμβρίου

The Golden Age Hotel (Υβριδική)

ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΦΡΟΝΤΙΣΤΗΡΙΟ

24 & 25 Νοεμβρίου

Εργαστήριο Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής
ΕΚΠΑ



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



Congresses - Publications - Digital Constructions

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

Differences in the detection of virulence genes among clinical isolates of Coagulase-Negative Staphylococci

Anastasios Vogiatzakis¹, Despina Tassi-Papatheou², Lemonia Skoura³, Konstantinos Tsiamis⁴, Athanassios Tsakris¹, Georgia Vrioni¹, Joseph Papaparaskevas^{1,2}

¹Department of Microbiology, Medical School, National & Kapodistrian University of Athens, 11527, Athens, Greece.

²Central Diagnostic Laboratories, Onassis Cardiac Surgery Center, 17674, Kallithea, Greece.

³Department of Microbiology, AHEPA University Hospital, Medical School, Aristotle University of Thessaloniki, 54636, Thessaloniki, Greece.

⁴Department of Public and One health, University of Thessaly, 43100, Karditsa, Greece.



Summary

Although Coagulase Negative Staphylococci (CoNS) have been considered for years as colonizers of the human body, it is now clear that they can cause serious infections, especially among immunocompromised patients. Various genes express for pathogenic mechanisms, including the *icaA* and *icaD* which enhance biofilm production, as well as genes than encode for staphylococcal enterotoxins (*sea*, *seb*) and the toxic shock syndrome toxin (*tst*). The aim of

this study was to detect and determine through PCR the presence and distribution of these genes in CoNS strains isolated from clinical specimens. The results of the study showed that *icaA* and *icaD* genes were present in 49% and 52% of CoNS strains respectively, while 36,5% of the strains harbored the *tst* gene. No CoNS strains harbored the enterotoxin A and B genes. The *S. epidermidis* strains harbored the *icaA/D* and *tst* genes more frequently than the remaining CoNS species (statistically significant difference, $p < 0.001$ and $p = 0.001$, respectively).



Key words

Coagulase Negative Staphylococci (CoNS); virulence genes; enterotoxins; the toxic shock syndrome toxin

Corresponding author

Joseph Papaparaskevas,
Department of Microbiology,
Medical School,
National and Kapodistrian University of Athens,
Mikras Asias 75,
11527, Athens, Greece,
email: ipapapar@med.uoa.gr

Introduction

Coagulase-negative staphylococci (CoNS) constitute a large part of the human skin and mucosa microbiome with more than 50 species comprising the group so far.¹ Various species of CoNS are also common colonizers of the anterior nares, external ear canal and upper respiratory and gastrointestinal tract.² Given the fact also that compared to *Staphylococcus aureus*, CoNS are considered to be less virulent, in the past, most of the times, their presence in clinical samples was dismissed as contamination.³ However, recent demographic changes and continuous medical advances have led to higher life expectation which is nevertheless coupled with various comorbidities, increased numbers of immunocompromised patients and an ever-increasing use of catheters and foreign devices. As a result, CoNS have emerged as opportunistic pathogens.⁴ The most frequently isolated CoNS species in clinical samples is *Staphylococcus epidermidis* (>50% of CoNS isolates) followed by *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus hominis*.²

The main risk factor for an infection caused by

CoNS is the existence of a foreign medical device in the human body. Therefore, foreign-body related infections (FBRIs), either local or bloodstream related, are the most common clinical entities associated with CoNS,⁵ such as catheter-related bacteremias,^{6,7} and prosthetic joint infections.⁸ In addition, in late onset neonatal sepsis (i.e., between 3 and 30 days of life), CoNS are common pathogens, especially for infants born at a lower gestational age.⁹

The most important virulence factor of CoNS is their ability to produce biofilm.¹⁰ This extracellular matrix which encapsulates bacterial aggregates allows them to evade the host's immune system and protects them against antibiotics.⁴ The accumulation of biofilm in CoNS is mainly mediated through Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA) whose synthesis relies on enzymes encoded in *icaA/D/B/C* genes. Co-expression of *icaA* and *icaD* genes has been found to significantly increase the amount of biofilm produced.¹¹

Another major category of Staphylococcal virulence factors are toxins, like the enterotoxins (e.g., SEA, SEB, SEC etc., encoded by the *sea/seb/sec* genes) and the Toxic shock syndrome toxin (TSST, encoded by the *tst* gene). Although they have been mostly studied in

S. aureus, the occasional ability of CoNS isolates to produce these toxins has been proved in recent years.^{12,13}

The objective of the present study was to detect the presence and distribution of genes associated with Staphylococcal virulence, more specifically *icaA*, *icaD*, *sea*, *seb*, and *tst*, among CoNS strains isolated from clinical samples of hospitalized patients.

Materials & Methods

All CoNS strains isolated from blood cultures and cultures of i.v. catheters and/or implanted cardiac devices of hospitalized patients at the Onassis Cardiac Surgery Center in Athens, Greece during a three-month period in 2022 were collected.

Genus and species identification was performed using MALDI-TOF technology (MALDI Biotyper, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The minimum acceptable identification score value was set at 1.7. After identification was complete, and if multiple isolates were collected from a single patient, the first isolate per species, per clinical source, per patient was included in the study.

Antimicrobial susceptibility testing was performed using the MIC Panel Type 33 for Gram-positive pathogens (Microscan, Dade Behring). The antibiotics tested and the respective MIC range (mg/L) were: penicillin (0.12-8), ceftaxime (4), oxacillin (0.25-2), ceftaroline (0.5-1), nitrofurantoin (32-64), gentami-

cin (1-8), tobramycin (1-8), amikacin (8-32), mupirocin (256), chloramphenicol (8-16), erythromycin (0.5-4), clindamycin (0.25-2), daptomycin (1-4), ciprofloxacin (1-2), levofloxacin (1-4), moxifloxacin (0.5-1), norfloxacin (4-8), fosfomycin (32-64), linezolid (1-4), pristinamycin (1-2), fusidic acid (2), minocycline (1-8), tetracycline (1-8), vancomycin (0.25-16), teicoplanin (1-16), quinupristin-dalfopristin (1-4), co-trimoxazole (2/38-4/76) and rifampicin (0.5-2).

DNA extraction was performed from colonies harvested from a 24h culture on 5% sheep blood agar plates (Bioprep, Gerakas, Greece) using the Qiagen QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions.

PCR reactions were performed as single reactions for the *icaA* and *icaD* genes and as multiplex reactions for the *sea*, *seb* and *tst* genes, according to previously published protocols.¹⁴⁻¹⁶ The primers used are depicted in Table 1. Each single PCR was carried out in a total volume of 20 µl containing 10µl of GoTaq® 2X Colorless Master Mix (Promega Corporation, USA), and 0.1 µM of forward and reverse primers. Amplification was performed in a Bio-Rad iCycler Thermal Cycler using an initial cycle at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing of the primers at 55°C for 30 sec and extension at 72°C for 30 sec, and a final step at 72°C for 5 min. The multiplex PCR was carried out in a total volume of 25µl containing 12 µl of GoTaq® 2X Colorless Master Mix, 0.1 µM of forward and reverse primer for *sea* and *tst* genes, 0.2 µM of forward and reverse primer for

Table 1 The sequences of the primers used for PCR.

Gene	Primer sequence	Product size (bp)	Reference
<i>icaA</i>	F: 5'-TCTCTTGCAGGAGCAATCAA-3'	188	15
	R: 5'-TCAGGCACTAACATCCAGCA-3'		
<i>icaD</i>	F: 5'-ATGGTCAAGCCCAGACAGAG-3'	198	15
	R: 5'-CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA-3'		
<i>tst</i>	F: 5'-ATCGTAAGCCCTTTGTTG -3'	578	16
	R: 5'-GTGGATCCGTCATTCATTG-3'		
<i>sea</i>	F: 5'-CATTGCCCTAACGTTGAC -3'	619	16
	R: 5'-CGAAGGTTCTGTAGAAGTATGG -3'		
<i>seb</i>	F: 5'-CTAAACCAGATGAGTTGCAC-3'	489	16
	R: 5'-CCAAATAGTGACGAGTTAGG-3'		

seb. Amplification was performed in a Bio-Rad iCycler Thermal Cycler using an initial cycle at 95°C for 15min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 2 min, annealing of the primers at 51°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min, and a final step at 72°C for 5 min.

All PCR products were visualized on a 2% agarose gel under UV illumination and compared to a standard 100bp Ladder (Nippon Genetics, Europe).

Statistical evaluation was performed using χ^2 and significant difference was set at $p < 0.01$.

Results and discussion

A total of 90 CoNS strains were included in the study and were identified as follows: 63 *S. epidermidis*, nine *S. haemolyticus*, eight *S. hominis*, four *S. capitis*, three *S. warneri*, two *S. pettenkoferi* and one *S. pasteuri*. The mean MALDI identification score value was higher than 2 for every isolate.

A total of 69 isolates (evenly distributed among the species) were resistant to antistaphylococcal penicillins (MRCoNS), of which a number of strains were additionally resistant to one or more of the four major antibiotics for MRCoNS (vancomycin, teicoplanin, linezolid and daptomycin) as follows: resistance to teicoplanin was exhibited in 18 isolates (20%) comprising 14 *S. epidermidis* and four *S. haemolyticus*, whilst eight *S. epidermidis* strains (8,8%) were resistant to linezolid, four *S. epidermidis* (4,4%) were resistant to vancomycin and three *S. epidermidis* isolates (3,3%) were resistant to daptomycin. All MSCoNS were susceptible to these four antibiotics. Resistance patterns among *S. epidermidis* and all other CoNS species are shown in Table 2.

Our study showed that although methicillin resistance was detected and evenly distributed among all

CoNS species, resistance to the four above mentioned antibiotics was more frequently detected among MR *S. epidermidis* than other species of MRCoNS, although this difference was not statistically significant.

The reported percentage of methicillin resistance in 76% of the isolated CoNS strains confirms previously published studies such as the one by Asante et al.¹⁷ in which 76.4% of the CoNS strains isolated from blood stream infections were methicillin resistant, or the one by Al-Tamimi et al.¹⁸ in which among CoNS strains isolated from the nostrils of hospitalized patients 73% were methicillin resistant. Methicillin resistance is usually accomplished by the expression of *mecA* gene which encodes for PBP2a with low affinity to penicillin and other beta-lactams.¹⁹ As far as teicoplanin is concerned, the reported resistance of CoNS strains varies from 10.6% to 33% in different studies with our results (20%) falling in between.^{20,21} However, the reported percentages of resistance to the remaining antibiotics (i.e. 4.4% for vancomycin, 3.3% for daptomycin and 8.8% for linezolid) are clearly higher than previously published data which show less than 0,3% resistance to vancomycin and daptomycin^{19,20} and 0.3-1.3% resistance to linezolid.^{19,22} In addition, there are scarce reports of CoNS strains with combined resistance to those antibiotics as well. The main mechanisms through which CoNS develop resistance to antibiotics require mutations to genes encoding the target proteins of each antibiotic category. For example, mutations to genes such as *mprF* and *rpoB* which result in changes in bacterial cell wall thickness, and membrane fluidity and charge can lead to resistance to daptomycin. Furthermore, mutations which modify 23S rRNA of the 50S ribosomal subunit prevent the binding of linezolid rendering the strain resistant.¹⁹ Finally, acquisition of plasmid DNA which bears resistance genes from other species such as *VanA* operon can lead to altered peptidoglycan which cannot bind

Table 2 Antibiotic resistance patterns.

Resistance	<i>S. epidermidis</i>	Other CoNS
Tei	6	4
Lzd	1	0
Van + Tei	1	0
Tei + Lzd	4	0
Van + Tei + Lzd + Dap	3	0
None	48	23

Tei: teicoplanin, Lzd: linezolid, Van: vancomycin, Dap: daptomycin

vancomycin.²³

The genes *icaA*, *icaD* and *tst* were detected in 49.0%, 52.0% and 36.5% of the isolates respectively, whilst the *sea* and *seb* genes were not detected in any CoNS isolate. Interestingly, both the *icaA/D* genes and the *tst* gene were found statistically significantly more often among *S. epidermidis* strains than in other CoNS species ($p < 0.001$ for *icaA/D* genes, $p = 0.001$ for *tst* gene), as shown in Table 3. No correlation between antibiotic resistance and the aforementioned genes was found.

The reported percentages for the *icaA*, *icaD* and *tst* genes (regardless of species) are in accordance with previous studies which observed rates of 57-58% for the *icaA* gene, 56-60% for the *icaD* and 31.4% for the *tst* gene in CoNS isolates.²⁴⁻²⁶ More specifically, in the study by Ahmed et al. 58% of CoNS isolated from

nasal colonization of neonates in the ICU were positive for the *icaA* gene and 60% for the *icaD* gene.²⁴ Accordingly, in a study by Hosbul et al. in CoNS isolated from blood cultures, *icaA* and *icaD* were detected in 5.1% and 56.1% of the strains respectively.²⁵ As far as the toxin producing genes are concerned, Wierzychowska et al. found that 31.4% of CoNS isolated from ready-to-eat food were positive for the *tst* gene whilst no isolate bearing the *sea* or *seb* genes was detected.²⁶

Nevertheless, a statistically significant difference in the frequency of those genes between CoNS species, such as the one reported here, has not been described before and in that respect more studies are needed in order to ascertain whether this observation is the result of the prevailing local flora of the hospital, or it can be further extrapolated to characterize the CoNS species.

Table 3 Number of isolates bearing each gene in *S. epidermidis* or other CoNS species.

Species	No of isolates	<i>icaA</i> (+)	<i>icaA</i> (-)	<i>icaD</i> (+)	<i>icaD</i> (-)	<i>tst</i> (+)	<i>tst</i> (-)	<i>sea</i> (+)	<i>sea</i> (-)	<i>seb</i> (+)	<i>seb</i> (-)
<i>S. epidermidis</i>	63	43	20	44	19	30	33	0	63	0	63
Other CoNS species	27	1	26	3	24	3	24	0	27	0	27



Περίληψη

Διαφορές στην ανίχνευση μολυσματικών γονιδίων μεταξύ κλινικών στελεχών κοαγκουλάση αρνητικών Σταφυλόκοκκων

Αναστάσιος Βογιατζάκης¹, Δέσποινα Τασσή-Παπαθέου², Λεμονιά Σκούρα³, Κωνσταντίνος Τσιάμης⁴, Αθανάσιος Τσακρής¹, Γεωργία Βρυώνη¹, Ιωσήφ Παπαπαρασκευάς^{1,2,*}

¹Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα.

²Κεντρικά Διαγνωστικά Εργαστήρια, Ωνάσειο Καρδιοχειρουργικό Κέντρο, Καλλιθέα, Ελλάδα.

³Εργαστήριο Μικροβιολογίας, ΑΧΕΠΑ Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο, Ιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα.

⁴Τμήμα Δημόσιας και Ενιαίας Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Καρδίτσα, Ελλάδα.

*Υπεύθυνος αλληλογραφίας

Αν και οι κοαγκουλάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (Coagulase Negative Staphylococci, CoNS) θεωρούνται εδώ και χρόνια ως αποικιστές του ανθρώπινου σώματος, είναι πλέον σαφές ότι μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές λοιμώξεις, ειδικά σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Διάφορα γονίδια σχετίζονται με παθογόνους μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των *icaA* και *icaD*, που ενισχύουν την παραγωγή βιομεμβράνης, καθώς και γονίδια που κωδικοποιούν για τις σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες (*sea*, *seb*) και την τοξίνη του συνδρόμου του τοξικού σοκ (*tst*). Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν να ανιχνεύσει και να προσδιορίσει μέσω PCR την παρουσία και κατανομή αυτών των γονιδίων σε στελέχη CoNS που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι τα γονίδια *icaA* και *icaD* υπήρχαν στο 49% και 52% των στελεχών CoNS αντίστοιχα, ενώ το 36,5% των στελεχών έφεραν το γονίδιο *tst*. Κανένα στέλεχος CoNS δεν έφερε τα γονίδια της εντεροτοξίνης A και B. Τα στελέχη *S. epidermidis* έφεραν τα γονίδια *icaA/D* και *tst* πιο συχνά από τα υπόλοιπα είδη CoNS (στατιστικά σημαντική διαφορά, $p < 0,001$ και $p = 0,001$, αντίστοιχα).



Λέξεις κλειδιά

κοαγκουλάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι κοαγκουλάσης (CoNS), γονίδια λοιμογόνου δράσης, εντεροτοξίνες, τοξίνη του συνδρόμου τοξικού σοκ

References

1. Becker K, Both A, Weißelberg S, Heilmann C, Rohde H. Emergence of coagulase-negative staphylococci. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2020; 18:349-366.
2. Piette A, Verschraegen G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Vet Microbiol* 2009; 134:45-54.
3. Natsis NE, Cohen PR. Coagulase-Negative Staphylococcus Skin and Soft Tissue Infections. *Am J Clin Dermatol* 2018; 19:671-677.
4. Heilmann C, Ziebuhr W, Becker K. Are coagulase-negative staphylococci virulent? *Clin Microbiol Infect* 2019; 25:1071-1080.
5. von Eiff C, Jansen B, Kohnen W, Becker K. Infections associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis. *Drugs* 2005; 65:179-214.
6. Rogers KL, Fey PD, Rupp ME. Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infect Dis Clin North Am* 2009; 23:73-98.
7. Widerström M, Wiström J, Sjöstedt A, Monsen T. Coagulase-negative staphylococci: update on the molecular epidemiology and clinical presentation, with a focus on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31:7-20.
8. Lourtet-Hascoët J, Félicé MP, Bicart-See A, Bouige A, Giordano G, Bonnet E. Species and antimicrobial susceptibility testing of coagulase-negative staphylococci in periprosthetic joint infections. *Epidemiol Infect* 2018; 146:1771-1776.
9. Marchant EA, Boyce GK, Sadarangani M, Lavoie PM. Neonatal sepsis due to coagulase-negative staphylococci. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013:586076.
10. Mertens A, Ghebremedhin B. Genetic determinants and biofilm formation of clinical *Staphylococcus epidermidis* isolates from blood cultures and indwelling devices. *Eur J Microbiol Immunol* 2013; 3:111-119.
11. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27:870-926.
12. Podkowiak M, Park JY, Seo KS, Bystron J, Bania J. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. *Int J Food Microbiol* 2013; 163:34-40.
13. da Cunha M de L RS, Calsolari RA, Júnior JP. Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative staphylococci. *Microbiol Immunol* 2007; 51:381-390.
14. Manandhar S, Shrestha R, Tuladhar RS, Lekhak S. Inducible Clindamycin Resistance and Biofilm Production among *Staphylococci* Isolated from Tertiary Care Hospitals in Nepal. *Infect Dis Rep* 2021; 13:1043-1052.
15. Al-Haqan A, Boswihi SS, Pathan S, Udo EE. Antimicrobial resistance and virulence determinants in coagulase-negative staphylococci isolated mainly from preterm neonates. *PLoS One* 2020; 15:e0236713.
16. Udo EE, Al-Mufti S, Albert MJ. The prevalence of antimicrobial resistance and carriage of virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolated from food handlers in Kuwait City restaurants. *BMC Res Notes* 2009; 2:108.
17. Asante J, Hetsa BA, Amoako DG, Abia ALK, Bester LA, Essack SY. Multidrug-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Bloodstream in the uMgungundlovu District of KwaZulu-Natal Province in South Africa: Emerging Pathogens. *Antibiotics (Basel)* 2021; 10:198.
18. Al-Tamimi M, Abu-Raideh J, Himsawi N, Khasawneh A, Hawamdeh H. Methicillin and vancomycin resistance in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from the nostrils of hospitalized patients. *J Infect Dev Ctries* 2020; 14:28-35.
19. Shariati A, Dadashi M, Chegini Z, van Belkum A, Mirzaei M, Khoramrooz SS, Darban-Sarokhalil D. The global prevalence of Daptomycin, Tigecycline, Quinupristin/Dalfopristin, and Linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci strains: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrob Resist Infect Control* 2020; 9:56.
20. Kresken M, Klare I, Wichelhaus TA, Wohlfarth E, Layer-Nicolaou F, Neumann B, Werner G; Study Group 'Antimicrobial Resistance' of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy. Glycopeptide resistance in *Enterococcus* spp. and Coagulase-Negative Staphylococci from hospitalized patients in Germany: occurrence, characteristics and dalbavancin susceptibility. *J Glob Antimicrob Resist* 2022; 28:102-107.
21. Michels R, Last K, Becker SL, Papan C. Update on Coagulase-Negative Staphylococci - What the clinician should know. *Microorganisms* 2021; 9:830.
22. Maarouf L, Omar H, El-Nakeeb M, Abouelfetouh A. Prevalence and mechanisms of linezolid resistance among staphylococcal clinical isolates from Egypt. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2021; 40:815-823.
23. McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale J Biol Med* 2017; 90:269-281.
24. Ahmed DM, Messih MAWA, Ibrahim NH, Meabed MH, Abdel-Salam SM. Frequency of *icaA* and *icaD* determinants and biofilm formation among coagulase-negative staphylococci associated with nasal carriage in neonatal intensive care units. *Germs* 2019; 9:61-70.
25. Hosbul T, Gul-Yurtsever S, Guney-Kaya K, Oryasin E, Bozdogan B. Molecular detection of virulence associated genes in Coagulase Negative Staphylococci isolated from blood culture. *Clin Lab* 2021:67.
26. Chajęcka-Wierzchowska W, Gajewska J, Wiśniewski P, Zadernowska A. Enterotoxigenic potential of Coagulase-Negative Staphylococci from ready-to-eat food. *Pathogens* 2020; 9:734.





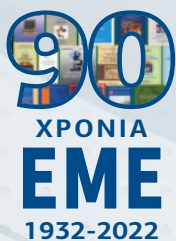
ΗΜΕΡΕΣ
ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ
ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ
2024

ΤΟ ΚΛΙΝΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΣΤΗ
ΜΕΤΑ-COVID ΕΠΟΧΗ:
ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

(Υβριδικό)

22-24 Φεβρουαρίου 2024

Crowne Plaza Hotel, Αθήνα



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

Congresses | Publications
Digital Constructions



Workflow for microbiological diagnosis of bacterial gastroenteritis combining a molecular assay as first-line with reflective stool culture

Maria Jose Munoz-Davila^{1,2}, C. Candel-Pérez¹, M.R. Vicente¹, M. Piqueras², J.M. Artero¹

¹Microbiology laboratory, General University Hospital Reina Sofia, Murcia, Spain.

²Microbiology and Genetics Department, Faculty of Medicine, University of Murcia, Murcia Spain.



Summary

Conventional microbiological methods for bacterial enteric disease diagnosis are time-consuming, labour intensive and provide low sensitivity. The aim of this study was to evaluate the results of a new diagnosis strategy which replaces traditional stool culture with a molecular detection using the BD MAX™ System (BD Life Sciences, Sparks, Maryland, United States) as first-line assay together with reflective culture. A total of 1.590 specimens were prospectively requested for stool culture. The molecular detection included the BD MAX enteric bacterial panel together with the BD MAX extended enteric bacterial panel (BDM GIP) performed simultaneously on the same stool specimen. In 18.8% of specimens (176 of the 936 valid samples) there was one or more than one target positive with the following percent positivity: 9.7%

Campylobacter spp., 5.7% *Salmonella* spp., 1.3% Shiga toxin genes (stx1/stx2), 1.2% *Shigella* spp./enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC), 1% *Yersinia enterocolitica*, 1% *Vibrio* spp. (*V. vulnificus*/*V. parahaemolyticus*/*V. cholerae*), 0.3% *Plesiomonas shigelloides*, and 0.2% Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) enterotoxin LT/ST genes. Positive reflective stool culture noted a correlation of 69.5% with the molecular test, missing 23.9% and 15.4% in the cases of *Campylobacter* spp., and *Salmonella* spp., respectively. In conclusion, this clinical study demonstrated very good performance of the BDM GIP. The performance and ease of use may provide advantages to many laboratories, improving the detection of bacterial stool pathogens and time to reporting results.



Key words

bacterial gastroenteritis, molecular detection, BD MAX™ System

Corresponding author

M.J. Munoz-Davila mariajose.munoz5@um.es
Avenida Intendente Jorge Palacios, 1
30001 Murcia Spain
Phone 34 968 35 90 00, Fax 34 968 35 90 01
<https://orcid.org/0000-0002-5445-4521>

Introduction

Although diarrhoea deaths per year are higher in low income populations, acute infectious gastroenteritis accounts for substantial morbidity, mortality, and cost also in high-income regions.¹ Etiologies of infectious diarrhoea vary and could be bacterial, viral, or parasitic. Bacterial etiology is the second more prevalent after viral, with *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. being the leading causes of enteritis in developed countries followed by infections with *Aeromonas* spp., *Yersinia* spp., and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC).²

The identification of diarrhoeagenic pathogens is important for both the further treatment of patients and public health reports.³ Diagnosing bacterial enteric disease is particularly problematic as stool culture remains the gold standard despite being a moderately sensitive, time-consuming and labour-intensive method.⁴ Commensal microorganisms present in stool may hinder the isolation of possible pathogens, particularly when the pathogens are shed in small amount³ and some studies have shown a diagnostic yield of stool culture as low as 1.5%.⁵

The BD MAX™ System (BD Life Sciences, Sparks, Maryland, United States) is a fully automated device

with a turnaround time of approximately 3 h for up to 24 samples at once with less than five minutes of hands-on time preparation per specimen.⁶ In 2014, the BD MAX enteric bacterial panel (EBP) assay for the detection of *Salmonella* spp., *Shigella* spp./enteroinvasive *E. coli* (EIEC), *Campylobacter* spp., and Shiga toxin genes was U.S. FDA cleared, European CE marked, and Health Canada IVD approved.⁴ As this panel did not cover the full spectrum of enteric bacterial pathogens, the BD MAX extended enteric bacterial panel (EEBP) assay was launched to be used in conjunction with the BD MAX EBP assay as an optional master mix addition to detect *Yersinia enterocolitica*, entero-toxigenic *Escherichia coli* (ETEC), *Vibrio* spp., and *Plesiomonas shigelloides* simultaneously.⁷

Many reports demonstrate the higher sensitivity of BD MAX EBP assay^{4,8-11} or a good correlation of the EEBP assay⁷ compared to traditional culture. Molecular panels are also more likely to detect coinfections.⁴ Laboratories have demonstrated significant reductions in turnaround time with the use of molecular assays.^{12,13} Thus, the BD MAX EBP assay can save technical effort and improve the time of results reporting.⁵ However, a few limitations of the BD MAX should be also considered. Since these tests are based on the detection of specific genetic targets, they are unable

to detect pathogens for which a target is missing. Even though the EEBP assay widens the bacterial spectra detected, an important enteric bacterial pathogen such as *Aeromonas* spp. is not included.¹⁴ Another criticism of molecular tests is that they diagnose without strain isolation necessary for determining susceptibility to antimicrobial agents and for epidemiological analyses in an outbreak situation. Anderson and colleagues suggested that subsequent culture of all positive stools could remedy this.⁸

In order to gain the speed and sensitivity of automated molecular tests, without losing strain isolation for antimicrobial susceptibility testing (AST) and epidemiological purposes, our clinical laboratory implemented a new algorithm which replaces traditional stool culture with a molecular detection as first-line assay followed by the reflective stool culture. We chose the BD MAX system due to its targeted approach as multiplex assays that report bacterial, viral, and parasitic targets simultaneously may generate results that are not requested by clinicians and create complexities in reporting as well as in interpretation.¹⁵ Thus, the aim of this study was to evaluate the results of this new microbiological diagnosis strategy.

Material and methods

A total of 1590 specimens were prospectively requested for stool culture at the General University Hospital Reina Sofia (Murcia, Spain) from January to July 2022. Stool samples were transported to the laboratory unpreserved in a clean container and stored at 2-8°C until their processing. They were evaluated first, according to a laboratory protocol in place, following Spanish Society of Microbiology guidelines,¹⁶ while unformed stool samples were processed, first by molecular methods according to our algorithm.

BD MAX assay

Stools from patients were systematically tested in the BD MAX system between 10 to 17 h from their receipt at the laboratory for the presence of bacteria using both BD MAX Gastrointestinal panels (BDM GIP) in conjunction as a first-line assay for diagnosis.

The samples were tested on the BD MAX System using the BDM GIP according to manufacturer's instructions.

Directed stool culture based on the molecular test (reflective culture)

The stool specimens were inoculated on different culture media depending on the bacterial target detected by the molecular test. The inoculation took

place between 13 to 20 h from their receipt at the laboratory and the samples had been stored at 2-8°C until that moment.

Salmonella-Shigella agar (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) was sowed for the isolation of *Salmonella* spp. and incubated at 37°C at least for 24 h. The specimens were also incubated in a selenite broth (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) for 24 h then the incubated suspension was inoculated on a *Salmonella-Shigella* agar and incubated at 37°C for at least 24 h.

A *Campylobacter* selective agar (bioMérieux) was used for the isolation of *Campylobacter* spp. and was incubated in a microaerophilic genbag (bioMérieux) at 42°C. for 48 h.

For isolation of *Yersinia* spp., stool specimen was inoculated on *Yersinia* agar (bioMérieux) and incubated for 48 h at 30°C.

Specimens positive for *Shigella* spp./EIEC and Shiga toxin genes were inoculated on *Salmonella-Shigella* agar and MacConkey agar (bioMérieux), and incubated up to 48 h at 37°C.

ETEC enterotoxin genes and *Plesiomonas shigelloides* positive specimens were inoculated on MacConkey agar and incubated up to 48 h at 37°C.

For isolation of *Vibrio* spp., stool specimen was inoculated on blood agar (bioMérieux) and incubated for 48 h at 37°C.

Bacterial identification

Suspected colonies were verified by MALDI-TOF MS (Vitek® MS, bioMérieux). Furthermore, in case of *Salmonella* isolates, serological testing was conducted with specific antisera (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). When *Shigella* spp./EIEC target was detected, the suspected colonies grown on the culture plate were checked by the use of the VITEK®2 Microbial GN ID testing system (bioMérieux), because reliable differentiation of *Shigella* spp. and *E. coli* by MALDI-TOF MS has not been confirmed.¹⁷

Statistical analysis

The results of the BD MAX GIP assay and the reflective stool culture were compared to the percentage of positive samples detected by both assays. Demographic statistics were performed with the IBM SPSS version 29.0.0.0. (241).

Results

Demographic data

A total of 1590 specimens were received at the microbiology laboratory for bacterial gastroenteritis dia-



gnosis during the study period. All specimens were collected prospectively. The patients' mean age was 41.4 years (standard deviation, 29.29 years) with a minimum of 14 days and a maximum of 97 years. Approximately 25% of specimens were from children < 12 years of age. A total of 55.1% (876/1590) of specimens belonged to women. Regarding sample origin, stool specimens were collected at the primary care department (1092/1590, 68.6%), from hospitalised patients (254/1590, 16%) and at the emergency room department (207/1590, 13%).

In 2021, in our setting, we performed a total of 2459 traditional stool cultures and found a diagnostic yield of stool culture of 9.1% (224/2459) (data not shown).

Specimens included in the analysis

A total of 619 (39%) specimens were unacceptable and not analysed by BD MAX System due to high consistency. The BDM GIP did not deliver a valid result in 10 (0.6%) cases due to unresolved or inhibitory sample or reagent failure. No technical errors of the BD MAX System were recorded. In 8 out of these 10 spe-

cimens, in which there was enough sample left, traditional stool culture was performed for diagnosis, with a no pathogenic bacteria detected result in all cases. In 25 (1.6%) specimens received at the laboratory during the study period, the BD MAX molecular tests could not be performed in 24 cases due to a stock failure and in one case of a hospitalised patient, a different molecular assay was used. So, a total of 936 (58.9%) specimens were included in the statistical analysis (Fig. 1).

Performance of the BD MAX assay

Of 936 specimens, in 0.3% cases the internal control did not amplify but one of the tested targets did so and it was accepted as a positive result. In 40 cases (4.3%) the EEBP assay failed and only the EBP assay was completed, leading to four negative results. In 720 cases (76.9%) the 8 samples yielded negative results. In 176 specimens (18.8%) one or more than one pathogens were found as follows: 168 stool samples showed one positive target, 10 specimens showed two positive targets and only 1 stool sample showed

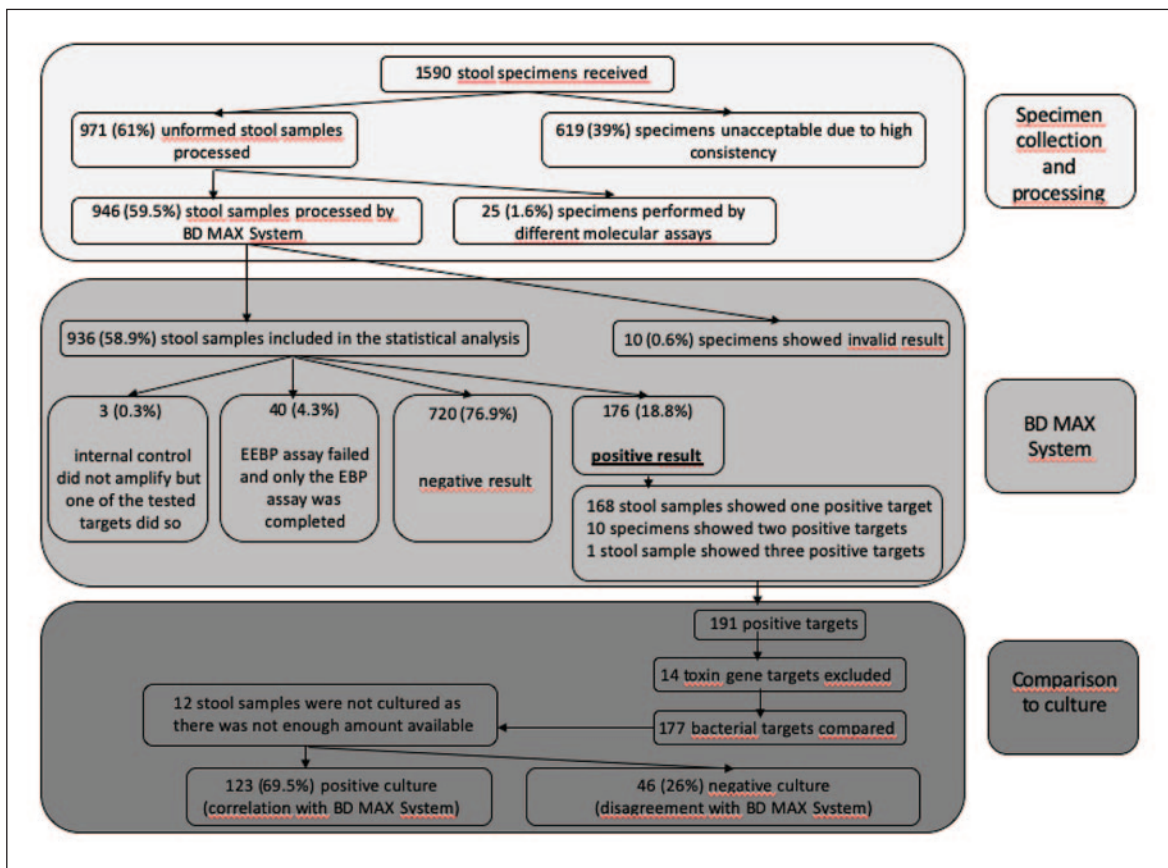


Figure 1 Flow diagram of the study process with the main results.

three positive targets (*Campylobacter* spp., *Plesiomonas shigelloides* and *Vibrio* spp.). Thus, a total of 191 positive targets, from 176 stool specimens, were recorded during the study period (Fig. 1). Based on the molecular method, the global percent positivity rate was 20.4% (191/936) with the following distribution: 9.7% *Campylobacter* spp., 5.7% *Salmonella* spp., 1.3% Shiga toxin genes, 1.2% *Shigella* spp./EIEC, 1% *Yersinia enterocolitica*, 1% *Vibrio* spp., 0.3% *Plesiomonas shigelloides*, and 0.2% ETEC enterotoxin LT/ST genes (Table 1).

In those 10 specimens which showed two positive targets, *Campylobacter* spp. was detected in all cases, together with *Salmonella* spp. in four specimens, *Shigella* spp./EIEC in three cases, and, in one case each, Shiga toxin genes, ETEC enterotoxin LT/ST genes and *Vibrio* spp. Thus, *Yersinia enterocolitica* was never found in combination with any other pathogen.

In 5 of the 11 cases of *Shigella* spp./EIEC positive targets, preserved specimens in Cary-Blair transport medium (FecalSwabTM, Copan Group, Brescia, Italy), were sent to the reference national laboratory (Instituto de Salud Carlos III: National Centre for Microbiology, Majadahonda, Spain) where diarrheagenic *Escherichia coli* strains were detected by conventional PCR. In four cases, genes codifying invasive proteins of enteroinvasive *E. coli* (*ipaH*) were found, and, in one case, the gene codifying the virulence plasmid of enteroaggregative *E. coli*, was found (CVD432).

Comparison to subsequent directed stool culture

Of 176 specimens which yielded a positive result by the molecular test, 12 stool samples were not cultured as there was not enough specimen.

Of the 191 positive targets, 14 cases were not compared to culture as a toxin gene was detected (12 Shiga toxin genes and 2 enterotoxin LT/ST genes); in 4 out of the 12 stool samples that could not be cultured, one of these toxin genes was detected. Thus, a total of 177 positive targets detected were subject of the comparative analysis with the directed stool culture results. Positive stool culture showed no disagreement with the molecular test in 123 targets detected, noting a correlation of 69.5%. So, there was no isolation of pathogenic bacteria in the directed stool culture of the remaining 46 (26%) positive targets detected by the molecular method (Fig. 1). In the case of *Plesiomonas shigelloides* and *Vibrio* spp., none of the molecular targets detected by the molecular method were recovered in culture in all cases in which the stool specimen was available. In case of *Yersinia enterocolitica*, the reflective stool culture failed to recover 4 out of 10 positive targets detected during the study period. In the case of *Shigella* spp./EIEC target, the reflective stool culture did not isolate any of those two bacteria in 3 out of 9 specimens that could be cultured. Regarding the most prevalent pathogenic enteric bacteria, *Salmonella* spp. could not be recovered on the stool culture in 8 of the 52 (15.4%) cases con-

Table 1 Targets detected using BD MAX enteric bacterial and extended enteric bacterial assays.

Target	Number of positive target detections (n=191)	Percentage of positive specimens (n=936)
<i>Campylobacter (jejuni /coli)</i>	91 (47.6%)	9.7%
<i>Salmonella</i> spp.	53 (27.7%)	5.7%
Shiga toxin genes (stx1/stx2)	12 (6.3%)	1.3%
<i>Shigella</i> spp./ enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC)	11 (5.8%)	1.2%
<i>Yersinia enterocolitica</i>	10 (5.2%)	1.0%
<i>Vibrio</i> spp. (<i>V. vulnificus</i> / <i>V. parahaemolyticus</i> / <i>V. cholerae</i>)	9 (4.7%)	1.0%
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	3 (1.6%)	0.3%
Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (ETEC) enterotoxin LT/ST genes	2 (1.0%)	0.2%
Total	191 (100 %)	20.4%

sidered. In case of *Campylobacter* spp., stool culture was possible in 88 of the positive targets, without isolation in 21 (21/88, 23.9%) cases. Correlation between molecular test and reflective stool culture for each target is shown in Fig. 2. The percent positivity rate of enteric bacterial pathogens found by the BD MAX system was 20.4% (191/936) (Table 1) while according to culture it was 13.1% (123/936).

In the 8 cases in which *Salmonella* spp. was not isolated by the reflective stool culture, the cycle threshold (Ct) in the BD MAX System was higher than 30, with a mean of 34.9 (range: 30.9-37.9). Out of the 21 cases in which *Campylobacter* spp. was not recovered on the reflective stool culture, the Ct in the BD MAX System was higher than 30 in only 5 cases with a mean of 33.4 (range: 30.1-37.5).

Discussion

To our knowledge, this is the first prospective clinical study which assays both BD MAX bacterial panels simultaneously and compares the results with the reflective culture.

In the study of Knabl and colleagues, the number of cases in which the analysis with the BD MAX EBP assay did not give a valid result initially was higher than ours (8% and 0.6% respectively).⁹ They described

that failures of the molecular test appeared more often in stool with a higher consistency than in soft or liquid stool specimens. So, our lower percentage could be due to our selection of unformed stool samples. A failure in the testing of 0.6% from a number of 1557 stool specimens that were tested by the Film-Array[®] Gastrointestinal Panel was reported,¹⁸ and this finding is in more accordance with our results. However, we found a percentage of 4.3 of specimens in which the EEBP assay yielded an invalid result due to inappropriate sample or reagent failure. No invalid results are described in the multisite evaluation of the EEBP assay.⁷ Further studies should evaluate the higher percentage of invalid results with the EEBP assay compared to the EBP assay when they are performed at the same time.

The stratification based on the patients' age and the origin of the specimens is highly similar to that recently described in another prospective study in our country.¹⁹

While assessing the targeted techniques, the current study also evaluated the bacterial pathogens causing acute gastroenteritis in our population; the findings revealed that almost half of the cases were attributed to *Campylobacter* spp. (47.6%) and a quarter (27.7%) to *Salmonella* spp. This was followed by Shiga toxin genes (6.3%), *Shigella*/EIEC (5.8%), *Yersinia enterocolitica* (5.2%), *Vibrio* spp. (4.7%), *P. shigel-*

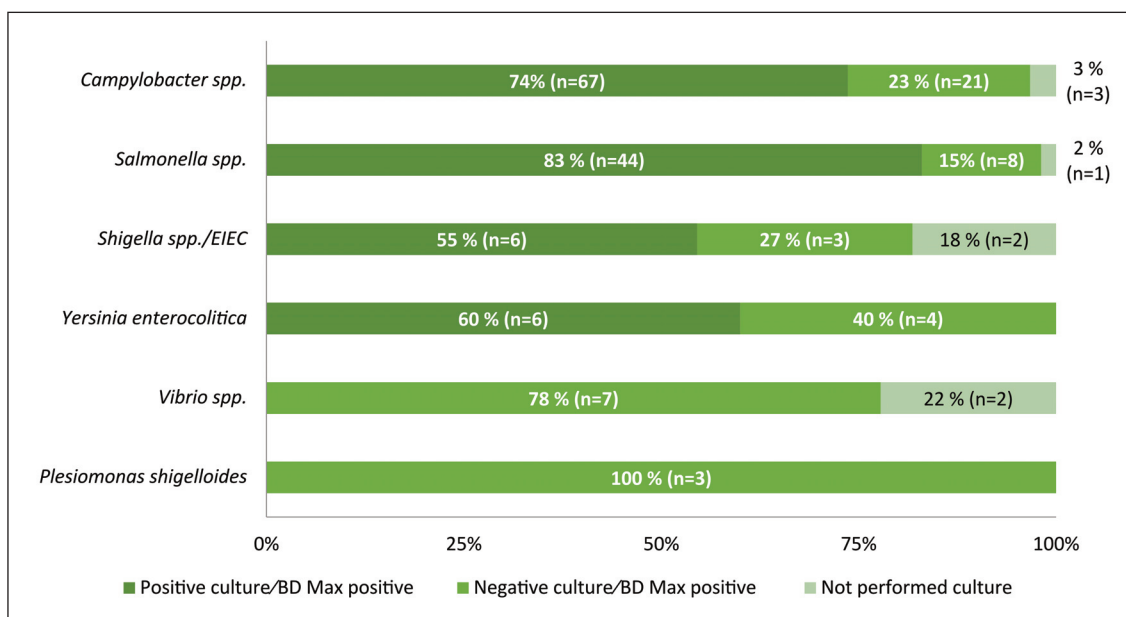


Figure 2 Correlation between BD MAX detection and stool culture result for each target based on the number of positive targets subject of the comparative analysis.

loides (1.6%) and ETEC toxin genes (1%). Our findings are in agreement with those published by Koo and colleagues regarding the Singaporean population, the prevalence of co-infections by two organisms (1.0%) and also their majority of single-pathogen positive samples.¹¹

The correlation rate between the BD MAX and the subsequent stool culture reached 69.5%. The BD MAX had a higher overall detection rate (20.4%) compared to the use of bacterial culture alone (13.1%). Our findings show that the use of the culture method alone would miss 46 (26%) out of 177 positive targets, including *Campylobacter* (n=21), *Salmonella* (n=8), *Shigella*/EIEC (n=3), *Yersinia enterocolitica* (n=4), *Vibrio* spp. (n=7) and *Plesiomonas shigelloides* (n=3). This could possibly be due to non-viable organisms or low copy numbers present on the stool specimens that failed to grow on culture.

Regarding *Campylobacter* spp., Gueduet and colleagues suggested that a BD MAX positive result for *Campylobacter* with Ct >30 should have a special comment until the stool culture was available as it could represent a false negative.²⁰ However, we only had 5 of the 21 disagreements between BD MAX positive and culture negative for *Campylobacter* whose Ct was above 30. Buchan and colleagues also reported that 7/13 (53.4%) specimens positive for *Campylobacter* spp. by the Pro-Gastro SSCS PCR and negative by culture were not confirmed by an alternate PCR method.²¹ Buss and colleagues noted 5/24 (21%) samples false positive for *Campylobacter* by FilmArray® Gastrointestinal panel that were not confirmed by alternate PCR, and Coste and colleagues reported confirming 9/15 (60%) false-positive results by using an alternate PCR and EIA methods.^{18,22}

Only 15.4% of the positive targets for *Salmonella* spp., were not recovered by the reflective stool culture. A possible explanation for these results is the greater sensitivity of the detection of *Salmonella* spp. by stool culture compared to other enteric pathogens, because of the enrichment in selenite broth.^{13,23} All the 8 positive targets, which were not recovered on culture, showed Cts>30.

Our prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* is in accordance with previous findings.^{7,24} When a microorganism is in low numbers in stool specimens, storage conditions may dilute the target below the limit of detection for stool culture.⁴ This fact connected to the results observed in the reference laboratory where none of the 5 stool specimens which were sent recovered *E. coli* on culture and only the characterisation of diarrheagenic *Escherichia coli* strains by conventional PCR was performed.

In the systematic review and meta-analysis con-

ducted by Riahi and colleagues, the pooled prevalence of *Y. enterocolitica* in cases of gastroenteritis was estimated as 1.97% (1.32-2.74%) in the culture method and 2.41% (1.07-4.22%) in the molecular method which is in agreement with our culture and molecular results.²⁵

Stool culture in addition to the molecular method has been suggested as a solution by some authors in cases that *Aeromonas* spp. possibility needs to be excluded.¹¹

Economical parameters of a molecular assay implementation have not been calculated in this study. However, it should be noted that the economical beneficial effects come from the reduced workload, savings in time-consuming isolation procedures and the increased diagnosis of defined pathogens which should be notified.

To our knowledge, no data on implementation of this assay in a routine workflow is available by now. However, we acknowledge some of the study's limitations, such as the fact that we do not display the results for solving discrepancies between the molecular method and culture, as future studies should be conducted to demonstrate which actions are more efficient and cost-effective.

Also, this is a single-site study. Additionally, a correct molecular diagnosis was assumed, but formally, we could not settle the percentage of probable false positives with the BD MAX system as we have not used a reference method.

In summary, this clinical study demonstrated a very good performance of the BDM GIP assay. Many laboratories might take advantage of this strategy improving the detection of bacterial enteritis pathogens as well as the reporting time, and enhancing the spectrum of epidemiological studies.

Acknowledgements

To all the technical staff who contributed to the work.

Statements and Declarations

The study has not been presented previously as an abstract in any congress or symposium.

Funding

The authors declare that no funds, grants, or other support were received during the preparation of this manuscript.

Conflicts of interests

The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.



Author Contributions

M.J. Munoz-Davila contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by M. Piqueras, C. Candel-Pérez and M.J. Munoz-Davila. The first draft of the manuscript was written by M.J. Munoz-Davila and several contributions were made by C. Candel-Pérez who revised it critically. All authors read and approved the final manuscript.

Disclaimer

BD Life Sciences had no influence on the design of this study, data evaluation, and interpretation and was not involved in manuscript preparation.

Ethical approval/informed consent

This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki and approved by the Research Ethics Committee of General University Hospital Reina Sofia (Murcia, Spain). All data were anonymized before analysis.

Data Availability

The datasets generated during and/or analysed during the current study are not publicly available due to adhere to the tenets of the Declaration of Helsinki but are available from the corresponding author on reasonable request.



Περίληψη

Workflow for microbiological diagnosis of bacterial gastroenteritis combining a molecular assay as first-line with reflective stool culture

Maria Jose Munoz-Davila^{1,2*}, C. Candel-Pérez¹, M.R. Vicente¹, M. Piqueras², J.M. Artero¹

¹Microbiology laboratory. General University Hospital Reina Sofia, Murcia. Spain.

²Microbiology and Genetics Department, Faculty of Medicine, University of Murcia, Murcia Spain.

*Corresponding author

Οι συμβατικές μικροβιολογικές μέθοδοι για τη διάγνωση της βακτηριακής γαστρεντερίτιδας είναι χρονοβόρες, κοπιώδεις και παρέχουν χαμηλή ευαισθησία. Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν να αξιολογήσει τα αποτελέσματα μιας νέας στρατηγικής διάγνωσης που αντικαθιστά την κλασική καλλιέργεια κοπράνων με μοριακή ανίχνευση χρησιμοποιώντας το σύστημα BD MAX™ (BD Life Sciences, Sparks, Maryland, United States) ως μεθοδολογία πρώτης γραμμής μαζί με την καλλιέργεια. Συνολικά 1.590 δείγματα κοπράνων μελετήθηκαν για με καλλιέργεια. Η μοριακή ανίχνευση περιελάμβανε το εντερικό βακτηριακό πάνελ BD MAX μαζί με το εκτεταμένο εντερικό βακτηριακό πάνελ BD MAX (BDM GIP) που έγινε ταυτόχρονα στο ίδιο δείγμα κοπράνων. Στο 18,8% των δειγμάτων (176/936) ανιχνεύθηκε ένας ή περισσότεροι από έναν στόχο θετικοί με την ακόλουθη ποσοστιαία θετικότητα: 9,7% *Campylobacter* spp., 5,7% *Salmonella* spp., 1,3% γονίδια Shiga toxin (stx1/stx2), 1,2% *Shigella* spp./εντεροδυσεντερική *Escherichia coli* (EIEC), 1% *Yersinia enterocolitica*, 1% *Vibrio* spp. (*V. vulnificus*/*V. parahaemolyticus*/*V. cholerae*), 0,3% *Plesiomonas shigelloides* και 0,2% γονίδια εντεροτοξίνης *E. coli* (ECET) LT/ST. Η καλλιέργεια κοπράνων έδωσε συμφωνία αποτελεσμάτων σε 69,5% των δειγμάτων με το μοριακό τεστ, με αρνητικό αποτέλεσμα σε 23,9% και 15,4% των περιπτώσεων *Campylobacter* spp. και *Salmonella* spp., αντίστοιχα. Συμπερασματικά, η κλινική μελέτη έδειξε καλή απόδοση του BDM GIP. Η απόδοση και η ευκολία χρήσης μπορεί να προσφέρουν πλεονεκτήματα σε πολλά εργαστήρια, βελτιώνοντας την ανίχνευση βακτηριακών παθογόνων σε δείγματα κοπράνων και μειώνοντας το χρόνο αναφοράς των αποτελεσμάτων.



Λέξεις κλειδιά

βακτηριακή γαστρεντερίτιδα, μοριακή ανίχνευση, BD MAX™ System



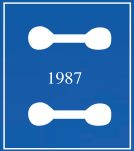
References

1. GBD Diarrhoeal Diseases Collaborators. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Infect Dis* 2017; 17:909-948.
2. García Vera C, García Ventura M, Del Castillo Aguas G, Dominguez Aurrecochea B, Esparza Olcina MJ, Martínez Rubio A, *et al.* Epidemiológica de Pediatría de Atención Primaria (PAPenRED). Gastroenteritis aguda bacteriana: 729 casos reclutados por una red nacional de atención primaria [Acute bacterial gastroenteritis: 729 cases recruited by a Primary Care national network]. *An Pediatr (Barc)* 2017; 87:128-134.
3. Guerrant RL, Van Gilder T, Steiner TS, Thielman NM, Slutsker L, Tauxe RV, *et al.* Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. *Clin Infect Dis* 2001; 32:331-351.
4. Harrington SM, Buchan BW, Doern C, Fader R, Ferraro MJ, Pillai DR, *et al.* Multicenter evaluation of the BD max enteric bacterial panel PCR assay for rapid detection of *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp. (*C. jejuni* and *C. coli*), and Shiga toxin 1 and 2 genes. *J Clin Microbiol* 2015; 53:1639-1647.
5. Lee JY, Cho SY, Hwang HSH, Ryu JY, Lee J, Song ID, *et al.* Diagnostic yield of stool culture and predictive factors for positive culture in patients with diarrheal illness. *Medicine (Baltimore)* 2017; 96:e7641.
6. Stellrecht KA, Espino AA, Maceira VP, Nattanmai SM, Butt SA, Wroblewski D, *et al.* Pre-market evaluations of the IMDx C. difficile for Abbott m2000 Assay and the BD Max Cdiff Assay. *J Clin Microbiol* 2014; 52:1423-1428.
7. Simner PJ, Oethinger M, Stellrecht KA, Pillai DR, Yogev R, Leblond H, *et al.* Multisite Evaluation of the BD Max Extended Enteric Bacterial Panel for Detection of *Yersinia enterocolitica*, Enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Vibrio*, and *Plesiomonas shigelloides* from Stool Specimens. *J Clin Microbiol* 2017; 55:3258-3266.
8. Anderson NW, Buchan BW, Ledebauer NA. Comparison of the BD MAX enteric bacterial panel to routine culture methods for detection of *Campylobacter*, enterohemorrhagic *Escherichia coli* (O157), *Salmonella*, and *Shigella* isolates in preserved stool specimens. *J Clin Microbiol* 2014; 52:1222-1224.
9. Knabl L, Grutsch I, Orth-Höller D. Comparison of the BD MAX® Enteric Bacterial Panel assay with conventional diagnostic procedures in diarrheal stool samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016; 35: 131-136.
10. DeBurger B, Hanna S, Powell EA, Ventrola C, Mortensen JE. Utilizing BD MAX™ Enteric Bacterial Panel to Detect Stool Pathogens from Rectal Swabs. *BMC Clin Pathol* 2017; 17:7.
11. Koo SH, Heng YX, Jiang B, Ng LSY, Sim DMF, Tan TY. Evaluation of the clinical sensitivity and specificity of the BD Max™ Enteric Bacterial Panel for molecular detection of pathogens for acute gastroenteritis in the Singaporean population. *J Microbiol Methods* 2022; 197:106478.
12. O'Leary J, Corcoran D, Lucey B. Comparison of the EntericBio multiplex PCR system with routine culture for detection of bacterial enteric pathogens. *J Clin Microbiol* 2009; 47:3449-3453.
13. McAuliffe GN, Anderson TP, Stevens M, Adams J, Coleman R, Mahagamasekera P, *et al.* Systematic application of multiplex PCR enhances the detection of bacteria, parasites, and viruses in stool samples. *J Infect* 2013; 67:122-129.
14. Vila J, Ruiz J, Gallardo F, Vargas M, Soler L, Figueras MJ, *et al.* *Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: clinical features and antimicrobial resistance. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:552-555.
15. Khare R, Espy MJ, Cebelinski E, Boxrud D, Sloan LM, Cunningham SA, *et al.* Comparative evaluation of two commercial multiplex panels for detection of gastrointestinal pathogens by use of clinical stool specimens. *J Clin Microbiol* 2014; 52:3667-3673.
16. Vila J, Alvarez-Martínez MJ, Buesa J, Castillo J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales [Microbiological diagnosis of gastrointestinal infections]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; 27:406-411.
17. Khot PD, Fisher MA. Novel approach for differentiating *Shigella* species and *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2013; 51:3711-3716.
18. Buss SN, Leber A, Chapin K, Fey PD, Bankowski MJ, Jones MK, *et al.* Multicenter evaluation of the BioFireFilmArray gastrointestinal panel for etiologic diagnosis of infectious gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 2015; 53:915-925.
19. Ferrer J, Giménez E, Carretero D, Buesa J, Morillas F, Granell R, *et al.* BD MAX Enteric Bacterial, Bacterial Plus, and Virus Panels for Diagnosis of Acute Infectious Gastroenteritis: a Cost-Benefit Analysis. *Microbiol Spectr* 2022; 10:e0088022.
20. Gueudet T, Paolini MC, Buissonnière A, Trens A, Rousee JM, Lefranc M, *et al.* How to Interpret a Positive *Campylobacter* PCR Result Using the BD MAX™ System in the Absence of Positive Culture? *J Clin Med* 2019; 8:2138.
21. Buchan BW, Olson WJ, Pezewski M, Marcon MJ, Novicki T, Uphoff TS, *et al.* Clinical evaluation of a real-

- time PCR assay for identification of Salmonella, Shigella, Campylobacter (Campylobacter jejuni and C. coli), and shiga toxin-producing Escherichia coli isolates in stool specimens. *J Clin Microbiol* 2013; 51:4001-4007.
22. Coste JF, Vuiblet V, Moustapha B, Bouin A, Lavaud S, Toupance O, *et al.* Microbiological diagnosis of severe diarrhea in kidney transplant recipients by use of multiplex PCR assays. *J Clin Microbiol* 2013; 51:1841-1849.
23. Valledor S, Valledor I, Gil-Rodríguez MC, Seral C, Castillo J. Comparison of several Real-Time PCR Kits versus a Culture-dependent Algorithm to Identify Enteropathogens in Stool Samples. *Sci Rep* 2020; 10:4301.
24. Sánchez-Prieto S, Herrera-León L, Llorente-Rodríguez MT, Herrera-León S. Infecciones por Escherichia coli diarreagénicas en España: ¿hay un antes y un después del brote de Alemania? [Diarrhoeagenic Escherichia coli infections in Spain: did the German outbreak mark a before and after?]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014; 32:133-135.
25. Riahi SM, Ahmadi E, Zeinali T. Global Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in Cases of Gastroenteritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Microbiol* 2021; 2021:1499869.



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
Με την επιστημονική συνδιοργάνωση της
ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΙΜΟΔΟΣΙΑΣ



10^ο

**Πανελλήνιο Συνέδριο
Ιατρικής Βιοχημείας**

6^ο

**Συμπόσιο Εργαστηριακής
Αιματολογίας & Αιμοδοσίας**

**Αθήνα, Royal Olympic Hotel, 11-13 Απριλίου 2024
(υβριδικό)**

**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

Ερευνητική εργασία

Αξιολόγηση της διαγνωστικής απόδοσης ορολογικών μεθόδων διαλογής σε αιμοδοτικό πληθυσμό. Αναδρομική μελέτη (2018-2022) του Ορολογικού Εργαστηρίου του Κέντρου Αίματος ΑΧΕΠΑ

Μαγδαληνή Παπέ, Βασιλική Μπακαλούδη, Παρθένα Λαζαρίδου, Δημήτρης Πισώκας, Πασχαλιά Πουλιούδη, Γιώργος Νικολαΐδης, Αικατερίνη Μπουκουβάλα, Χριστίνα Ανδρικοπούλου, Σουλτάνα Νικολαΐδου, Ηλιάνα Πέντσιου, Χαρίκλεια Παφίλη, Μαρία Χατζηκύρκου
Εργαστήριο Συγκεντρωτικού Ορολογικού Ελέγχου, Κέντρο Αίματος Π.Γ.Ν.Θ. ΑΧΕΠΑ

137



Περίληψη

Οι ανοσοδιαγνωστικές εξετάσεις, που εφαρμόζονται για τον έλεγχο του αίματος, σαν βασική αρχή πρέπει να έχουν την άριστη ευαισθησία, ώστε να μπορούν να ανιχνεύουν όλους τους αιμοδοτές που είναι πραγματικά θετικοί σε ένα μολυσματικό παράγοντα- λαμβάνοντας υπόψη και τα επίπεδα επιπολασμού λοιμωδών νόσων στην κοινότητα των αιμοδοτών, και επιπλέον να έχουν άριστη ειδικότητα ούτως ώστε να μην αποκλείονται πολλοί αιμοδοτές, αν έχουμε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Σκοπός της μελέτης είναι η ανάλυση του οροθετικού επιπολασμού των μεταδιδόμενων με τη μετάγγιση νοσημάτων κατά την περίοδο 2018-2022 και η επαλήθευση της ειδικότητας και της ακρίβειας των μεθόδων διαλογής κατόπιν σύγκρισης των αποτελεσμάτων

με επιβεβαιωτικές δοκιμασίες. Κατά τα έτη 2018-2022 ελέγχθηκαν συνολικά 875055 μονάδες αίματος στο Εργαστήριο Συγκεντρωτικού Ορολογικού Ελέγχου (ΕΣΟΕ) του Κέντρου Αίματος ΑΧΕΠΑ. Ο αλγόριθμος περιελάμβανε την εφαρμογή μεθόδων διαλογής για τον έλεγχο της σύφιλης, της ηπατίτιδας Β και C, των ιών HIV και HTLV I/II. Για όσα δείγματα καταγράφηκε επαναλαμβανόμενο αντιδρών αποτέλεσμα με τη δοκιμασία διαλογής πραγματοποιήθηκε περαιτέρω έλεγχος με επιβεβαιωτικές δοκιμασίες. Τα δεδομένα μας καταδεικνύουν τον χαμηλό επιπολασμό των μεταδιδόμενων με τη μετάγγιση νοσημάτων στον αιμοδοτικό πληθυσμό. Κατά συνέπεια, η θετική προγνωστική αξία ήταν χαμηλή, με αποτέλεσμα τον αποκλεισμό κάποιων μη μολυσματικών υποψήφιων αιμοδοτών, και τα αποτελέσματά μας δεν μπορούν να αποδοθούν σε κακή απόδοση των ορολογικών δοκιμασιών διαλογής. Η ειδικότητα για το σύνολο των εξετάσεων ήταν σύμφωνη με τις προσδοκίες μας και ίση ή καλύτερη με τη δηλωθείσα στα εσώκλειστα των αντιδραστηρίων. Η χρήση του επιβεβαιωτικού αλγόριθμου προσέφερε πολύτιμη βοήθεια στη διαχείριση και την ενημέρωση των αιμοδοτών.



Λέξεις κλειδιά

αιμοδοτές, αλγόριθμος, διαγνωστική ακρίβεια, ειδικότητα

Υπεύθυνος αλληλογραφίας

Μαγδαληνή Παπέ

Εργαστήριο Συγκεντρωτικού Ορολογικού Ελέγχου,
Κέντρο Αίματος, Π.Γ.Ν.Θ. ΑΧΕΠΑ
Κυριακίδη 1, 546 36, Θεσσαλονίκη
Τηλέφωνο: 2313303298,
email: magdalinipape@gmail.com

Εισαγωγή

Η εκπαίδευση των εθελοντών αιμοδοτών και η συνετή επιλογή τους, οι τεχνολογίες αδρανοποίησης των παθογόνων και φυσικά ο αποτελεσματικός έλεγχος για μολυσματικούς δείκτες είναι βασικά στοιχεία της στρατηγικής για την ασφάλεια του αίματος.^{1,2,3}

Είναι σημαντικό να λαμβάνονται ακριβή αποτελέσματα για κατάλληλους δείκτες μολυσματικών παραγόντων, που μπορούν να μεταδοθούν από προϊόντα αίματος, προκειμένου να διασφαλιστεί η υγεία των ληπτών.^{4,5}

Η επιλογή αδειοδοτημένων, κατάλληλων και επικυρωμένων μεθόδων διαλογής και επιβεβαίωσης θα πρέπει να πληροί τα ισχύοντα εθνικά πρότυπα. Οι αλγόριθμοι διαλογής θα πρέπει να σχεδιάζονται λαμβάνοντας υπόψη τα επιδημιολογικά δεδομένα του ελεγ-

χόμενου αιμοδοτικού πληθυσμού, καθώς αυτά επηρεάζουν τη προ-δοκιμαστική πιθανότητα ενός ακριβούς αποτελέσματος και την απόδοση των δοκιμασιών.^{6,7}

Οι μέθοδοι διαλογής θα πρέπει να έχουν υψηλή ειδικότητα, για να αποφεύγεται η αδικαιολόγητη απώλεια προϊόντων αίματος λόγω μη ειδικής αντιδραστικότητας. Συμπληρωματικές δοκιμασίες μπορούν επιπρόσθετα να πραγματοποιηθούν, προκειμένου να μεγιστοποιείται η αποτελεσματικότητα των συνδυασμένων αναλύσεων. Αυτές θα πρέπει να έχουν παρόμοια ευαισθησία και ειδικότητα με τις δοκιμασίες προσυμπτωματικού ελέγχου και να χρησιμοποιούν διαφορετικούς στόχους ανίχνευσης.^{8,9,10}

Αιμοδοσίες που εμφανίζουν επανειλημμένα αντιδρών αποτέλεσμα σε οποιαδήποτε εξέταση διαλογής, πρέπει να υποβάλλονται σε επιβεβαιωτική δοκιμασία,

προκειμένου να προσδιοριστεί η πραγματική κατάσταση του αιμοδότη.^{11,12}

Συνιστάται η ανάπτυξη αλγόριθμων σε εθνικό επίπεδο, που να επιτρέπουν την κατάλληλη και συνεπή έρευνα και επίλυση της αντιδραστικότητας στις δοκιμασίες διαλογής. Σε περιπτώσεις επιβεβαιωμένων θετικών αποτελεσμάτων, θα πρέπει να πραγματοποιείται κατάλληλη διαχείριση των αιμοδοτών, με την παροχή πληροφοριών και παρακολούθηση αυτών με τη λήψη δειγμάτων επανελέγχου.

Στη χώρα μας η ανάπτυξη και προαγωγή του εθνικού συστήματος αιμοδοσίας είναι αρμοδιότητα του Εθνικού Κέντρου Αιμοδοσίας (Ε.ΚΕ.Α.). Ο ορολογικός έλεγχος πραγματοποιείται σε δύο (2) κέντρα αίματος ανά την επικράτεια, τόσο για την κάλυψη ιδίων αναγκών των κέντρων αυτών όσο και για την κάλυψη σχετικών αναγκών των διασυνδεδεμένων με αυτά υπηρεσιών αιμοδοσίας των νοσοκομείων της χώρας.

Τα δύο (2) κέντρα αίματος της χώρας είναι το Εθνικό Κέντρο Αιμοδοσίας και το Κέντρο Αίματος ΑΧΕΠΑ. Το Εργαστήριο Συγκεντρωτικού Ορολογικού Ελέγχου (Ε.Σ.Ο.Ε) του Κέντρου Αίματος ΑΧΕΠΑ άρχισε να λειτουργεί την 12η Ιουνίου 2017.

Σκοπός της μελέτης μας ήταν να αναλύσουμε τον οροθετικό επιπολασμό μολυσματικών παραγόντων σε εθελοντές αιμοδότες, την περίοδο 2018–2022 και να επαληθεύσουμε την ειδικότητα και την ακρίβεια των μεθόδων διαλογής κατόπιν σύγκρισης των αποτελεσμάτων με επιβεβαιωτικές δοκιμασίες.¹³

Υλικό και μέθοδοι

Κατά τα έτη 2018-2022 ελέγχθηκαν συνολικά 875055 μονάδες αίματος ή προϊόντα αίματος (π.χ. αιμοπεταλιαφαιρέσεις) στο Εργαστήριο Συγκεντρωτικού Ορολογικού Ελέγχου (Ε.Σ.Ο.Ε) του Κέντρου Αίματος ΑΧΕΠΑ.

Το Ε.Σ.Ο.Ε είναι υπεύθυνο για τον ορολογικό έλεγχο μονάδων αίματος από 36 συνολικά Υπηρεσίες Αιμοδοσίας (Κεντρικής, Δυτικής και Ανατολικής Μακεδονίας, Θράκης, Ηπείρου, Στερεάς Ελλάδας και Θεσσαλίας).

Αναλυτικά, στα πέντε έτη της μελέτης, πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθοι έλεγχοι μονάδων αίματος: 170736 το 2018, 164190 το 2019, 167017 το 2020, 181787 το 2021 και 191325 το 2022.

Ακολουθώντας το πρωτόκολλο ελέγχου, κάθε μονάδα αίματος ελέγχθηκε υποχρεωτικά έναντι:

- της σύφιλης (ανάστροφος αλγόριθμος-ανίχνευση αντισωμάτων IgG και IgM έναντι του *Treponema pallidum*)
- του επιφανειακού αντιγόνου του ιού της ηπατίτιδας Β (HBsAg)

- των αντισωμάτων έναντι του ιού της ηπατίτιδας C (αντι-HCV)
- του HIV-1 (αντι-HIV-1) και του HIV-2 (αντι-HIV-2), συμπεριλαμβανομένων ορισμένων σπανίων παραλλαγών του ιού (π.χ. HIV-1 τύπος O) καθώς και το αντιγόνο P24
- των αντισωμάτων έναντι του ανθρωπίνου Τ-λεμφοτρόπου ιού τύπου I (αντί-HTLV-I) και II (αντί-HTLV-II)

Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή μεθόδων διαλογής υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας σε αυτοματοποιημένα συστήματα αναλυτών τελευταίας τεχνολογίας και μεγάλης παραγωγικότητας.

Ειδικότερα εφαρμόστηκαν η μέθοδος CLIA (Ανοσοεξέταση Χημειοφωταύγειας) στον αναλυτή LIASON (DiaSorin) για τον έλεγχο της σύφιλης και οι μέθοδοι ChLIA (Ανοσοεξέταση Χημειοφωταύγειας) στον αναλυτή PRISM (2018-2019) και CMIA (Μικροσωματιδιακή Ανοσοεξέταση Χημειοφωταύγειας) στον αναλυτή Alinity-s (2020-2022) για τον έλεγχο της ηπατίτιδας Β και C, των ιών HIV και HTLV (Abbott Diagnostics).

Στα πλαίσια του ελέγχου ποιότητας αντιδραστηρίων, τεχνικών, μεθόδων και εξοπλισμού, εφαρμόστηκαν προγράμματα εσωτερικού ποιοτικού ελέγχου (καθημερινά), και προγράμματα εξωτερικής διασφάλισης ποιότητας.

Τα δείγματα με απόλυτες μετρήσεις χαμηλότερες της τιμής του ορίου θετικότητας (cutoff) θεωρήθηκαν μη αντιδρώντα ενώ τα δείγματα με απόλυτες μετρήσεις υψηλότερες ή ίσες της τιμής του ορίου θετικότητας θεωρήθηκαν αρχικά αντιδρώντα. Ειδικότερα, για τον έλεγχο της ηπατίτιδας Β και C, των ιών HIV και HTLV, τα δείγματα με τιμές S/CO υψηλότερες ή ίσες του 1.00 θεωρήθηκαν αντιδρώντα. Όσον αφορά τον έλεγχο της σύφιλης, μετρήσεις μεταξύ 0.9 and 1.1 αξιολογήθηκαν ως γκρίζα ζώνη (GZ), σύμφωνα με το εσωκλειστο του αντιδραστηρίου και υποβλήθηκαν στο ίδιο πρωτόκολλο με τα αντιδρώντα.

Σύμφωνα με τον αλγόριθμο του Υπουργείου Υγείας τα αρχικά αντιδρώντα δείγματα επανεξετάστηκαν εις διπλούν με την ίδια μέθοδο διαλογής. Από αυτά ορισμένα παρέμειναν αρχικά αντιδρώντα (IR-initial reactive), ενώ εάν σε κάποια οι επαναλαμβανόμενες δοκιμές ήταν αντιδραστικές, αυτά θεωρήθηκαν επαναλαμβανόμενα αντιδρώντα (RR-repeatedly reactive). Για όλα αυτά τα δείγματα (IR και RR) πραγματοποιήθηκε επιπλέον έλεγχος, από τον ασκό πλάσματος, με την κύρια μέθοδο αλλά και με δεύτερη μέθοδο στον αναλυτή Architect (Abbott Diagnostics). Η δεύτερη μέθοδος εφαρμόζεται συγκεντρωτικά για όλη τη χώρα στο Ε.ΚΕ.Α. Για όσα δείγματα καταγράφηκε επαναλαμβανόμενο αντιδρών αποτέλεσμα με τη δοκιμασία διαλογής τα αντίστοιχα παράγωγα απορρίφθηκαν και πραγματοποιήθηκε περαιτέρω έλεγχος με επιβεβαιωτικές δοκιμασίες.



Οι επιβεβαιωτικές εξετάσεις, που εφαρμόστηκαν στο Ε.Σ.Ο.Ε, ήταν οι FTA (Δοκιμασία Φθορισμού) και ΤΡΗΑ (Δοκιμασία Αιμοσυγκόλλησης) για τη σύφιλη, INNO-LIA (Μέθοδος Ανοσοαποτύπωσης) για τους ιούς HTLV και HCV, Western Blot (Μέθοδος Ανοσοαποτύπωσης) για τον ιό HIV, και δοκιμασία εξουδετέρωσης για τον ιό HBV. Η ευαισθησία των επιβεβαιωτικών εξετάσεων ήταν παρόμοια με τις μεθόδους διαλογής και η ειδικότητά τους κυμαινόταν περίπου στο 99,9%.

Η διαχείριση των δειγμάτων και η εκτέλεση των εξετάσεων έγινε με βάση τις καταγεγραμμένες διαδικασίες του εργαστηρίου (συμμόρφωση με τις Κατευθυντήριες Οδηγίες Ορθής Πρακτικής, όπως αυτές καθορίζονται από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή για την Αιμοδοσία και τη Μετάγγιση του Αίματος (CD-P-TS) του Συμβουλίου της Ευρώπης και έχουν υιοθετηθεί από τη χώρα μας).

Για να αξιολογήσουμε την αξιοπιστία των ανοσοδιαγνωστικών μεθόδων διαλογής, χρησιμοποιήσαμε ως κριτήρια, τη συχνότητα των περιπτώσεων με επιβεβαιωμένη λοίμωξη και τα ποσοστά των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, την ειδικότητα (Specificity) και τη θετική προγνωστική αξία (PPV).

Αποτελέσματα

Με τη δοκιμασίες διαλογής βρέθηκαν επαναλαμβανόμενα θετικά, για το σύνολο των μολυσματικών δεικτών, 4118 (0,47%) δείγματα.

Το ποσοστό οροθετικότητας δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντική μεταβολή ανά έτος. Αναλυτικά ανά έτος, καταγράφησαν τα ακόλουθα ποσοστά οροθετικότητας: 2018 (0,52%) 893 δείγματα, 2019 (0,54%) 890 δείγματα, 2020 (0,43%) 715 δείγματα, 2021 (0,42%) 771 δείγματα, και 2022 (0,44%) 849 δείγματα (πίνακας 1).

Όλα τα επαναλαμβανόμενα αντιδρώντα δείγματα ελέγχθηκαν με επιβεβαιωτικές δοκιμασίες. Με την εφαρμογή του αλγόριθμου, επιβεβαιώθηκε λοίμωξη, για το σύνολο των ελεγχόμενων μολυσματικών δεικτών, σε 1026 (0,12%) δείγματα. Η κατανομή ήταν σχεδόν ταυτόσημη ανά έτος ελέγχου. Αναλυτικά καταγράφηκαν τα ακόλουθα ποσοστά επιβεβαιωμένων λοιμώξεων: 2018 (0,13%) 221 περιπτώσεις, 2019 (0,12%) 206 περιπτώσεις, 2020 (0,11%) 182 περιπτώσεις, 2021 (0,12%) 211 περιπτώσεις, και 2022 (0,11%) 206 περιπτώσεις (πίνακας 1).

Δε καταγράφηκε καμία περίπτωση συλλοίμωξης.

Για κάθε μολυσματικό δείκτη και για όλη την αναφερόμενη περίοδο ελέγχου εκτιμήσαμε τις εξής παραμέτρους:

- αριθμός επαναλαμβανόμενων αντιδρώντων δειγμάτων (RR, repeatedly-reactive)
- αριθμός δειγμάτων που επιβεβαιώθηκαν ως θετικά (TP, true-positive)
- αριθμός μη επιβεβαιωμένων ψευδώς θετικών δειγμάτων (FP, false-positive)
- ειδικότητα (Specificity (%))
- θετική προγνωστική αξία (PPV (%)).

Τα αποτελέσματά μας καταγράφονται αναλυτικά στον πίνακα 2.

Συζήτηση

Οι εγκαταστάσεις και οι διαδικασίες του Εργαστηρίου Συγκεντρωτικού Ορολογικού Ελέγχου (Ε.Σ.Ο.Ε) του Κέντρου Αίματος ΑΧΕΠΑ, συμμορφώνονται με τις Κατευθυντήριες Οδηγίες Ορθής Πρακτικής, όπως αυτές καθορίζονται από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή για την Αιμοδοσία και τη Μετάγγιση του Αίματος (CD-P-TS) του Συμβουλίου της Ευρώπης και έχουν υιοθετηθεί από τη χώρα μας.

Πίνακας 1 Οροθετικότητα έναντι όλων των ελεγχόμενων μολυσματικών δεικτών. Ανάλυση ανά έτος.

Ελεγχόμενες μονάδες αίματος	Έτος	Σύνολο θετικών με δοκιμασία διαλογής	Σύνολο δειγμάτων με επιβεβαιωμένη λοίμωξη
170736	2018	893 (0,52%)	221 (0,13%)
164190	2019	890 (0,54%)	206 (0,12%)
167017	2020	715 (0,43%)	182 (0,11%)
181787	2021	771 (0,42%)	211 (0,12%)
191325	2022	849 (0,44%)	206 (0,11%)

Πίνακας 2 Παράμετροι αξιολόγησης των διαγνωστικών μεθόδων διαλογής.

	RR	TP	FP	SP (%)	PPV (%)
HBV	576	448 (0,05%)	128	99.98	77,77
HCV	858	134 (0,01%)	724	99.92	15,62
HIV	507	40 (0,004%)	467	99.95	7,89
HTLV	298	7 (0,0008%)	291	99.97	2,35
ΣΥΦΙΛΗ	1879	397 (0,04%)	1482	99.83	21,13

RR-επαναλαμβανόμενα αντιδρόντα, TP-επιβεβαιωμένα θετικά, FP-ψευδώς θετικά, SP-ειδικότητα (%), PPV-θετική προγνωστική αξία (%)

Οι ανοσοδιαγνωστικές δοκιμές θα πρέπει να εκτελούνται σύμφωνα με τις πλέον πρόσφατες επιστημονικές και τεχνικές διαδικασίες, οι οποίες αντικατοπτρίζουν τις καλύτερες σύγχρονες πρακτικές. Οι πρακτικές θα πρέπει να αναθεωρούνται τακτικά και να επικαιροποιούνται, λαμβάνοντας υπόψη την επιστημονική πρόοδο, όσον αφορά την ανίχνευση παθογόνων παραγόντων, που μπορούν να μεταδοθούν μέσω της μετάγγισης.

Μία εξέταση διαλογής, για να είναι αποτελεσματική, θα πρέπει ο επιπολασμός της νόσου στον πληθυσμό στόχο να είναι υψηλός, καθώς μια πολύ ευαίσθητη ανάλυση σε χαμηλό επιπολασμό θα οδηγήσει σε αυξημένο αριθμό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων.

Τα δεδομένα του εργαστηρίου μας καταδεικνύουν χαμηλό επιπολασμό των μεταδιδόμενων με τη μετάγγιση νοσημάτων στον αιμοδοτικό πληθυσμό. Κατά συνέπεια, η θετική προγνωστική αξία είναι χαμηλή και τα δεδομένα μας δεν μπορούν να αποδοθούν σε κακή απόδοση των ορολογικών δοκιμασιών διαλογής.

Εξάιρεση αποτελεί η υψηλή θετική προγνωστική αξία όσον αφορά τον έλεγχο για την ηπατίτιδα Β, υποδηλώνοντας ενδεχομένως σχετικά αυξημένο επιπολασμό της νόσου στον αιμοδοτικό πληθυσμό. Είναι γνωστό, ότι η Ελλάδα συγκαταλέγεται ακόμη στις περιοχές ενδιάμεσης ενδημικότητας, με τις μελέτες να καταδεικνύουν επιπολασμό της ηπατίτιδας Β στο γενικό πληθυσμό γύρω στο 2,5-3%. Χρήσιμο θα ήταν να γίνουν στοχευμένες επιδημιολογικές έρευνες στον αιμοδοτικό πληθυσμό, ανά γεωγραφικά διαμερίσματα, προκειμένου να διαπιστωθεί η συχνότητα των φορέων HBV και να ληφθούν επικαιροποιημένες κατευθυντήριες οδηγίες ελέγχου (π.χ. υποχρεωτικός έλεγχος με anti-HBc) σε εθνικό επίπεδο.^{14,15,16}

Τα περισσότερα ψευδώς θετικά αποτελέσματα της μελέτης μας αφορούσαν τον έλεγχο της ηπατίτιδας C και σε σημαντικότερο βαθμό τον έλεγχο της σύφιλης.

Όσον αφορά τον έλεγχο της ηπατίτιδας C, επισημαίνεται ότι από τις 134 επιβεβαιωμένες περιπτώσεις, στις 51 δεν ανιχνεύτηκε ιικό φορτίο (μοριακός έλεγχος αρνητικός). Οι οδηγίες των υπηρεσιών αιμοδοσίας ορίζουν, ότι αποκλείονται από την διαδικασία της αιμοδοσίας άτομα με τρέχουσα αλλά και παρελθούσα λοίμωξη από HCV. Οι μονάδες αίματος από αιμοδοτές με επιβεβαιωμένο αντι-HCV, αλλά χωρίς ιικό φορτίο, θεωρητικά μόνο μπορεί να μην είναι μολυσματικές, καθώς η ασφάλεια τέτοιων μονάδων δεν έχει αποδειχθεί με μελέτες και ως εκ τούτου απορρίπτονται.^{17,18}

Όσον αφορά τον έλεγχο της σύφιλης, η εφαρμογή του ανάστροφου αλγόριθμου κατέδειξε ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε σημαντικό βαθμό. Επισημαίνεται, ότι το 1/3 (453/1482) περίπου αυτών των περιπτώσεων της μελέτης μας, σχετίζεται με αντιδραστικότητα εντός της γκριζας ζώνης. Η απώλεια πάντως των αντίστοιχων παραγώγων, αντισταθμίζεται από τη μεγιστοποίηση της ασφάλειας ανίχνευσης, που προσφέρει ο αναστροφος αλγόριθμος (αυτοματοποιημένη μέθοδος με υψηλή ειδικότητα, αντικειμενικότητα και επαναληψιμότητα των μετρήσεων) σε σύγκριση με τον παραδοσιακό αλγόριθμο (κίνδυνος ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων, λόγω της χαμηλής ευαισθησίας ακόμη και όταν η μόλυνση είναι πρόσφατη και του φαινομένου της προζώνης, αδυναμία εντοπισμού παρελθούσας λοίμωξης, υποκειμενικότητα στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων).^{19,20,21}

Σχετικά με την HTLV I/II λοίμωξη, τα αποτελέσματα μας αποδεικνύουν ότι ο επιπολασμός της στον αιμοδοτικό πληθυσμό της χώρας μας είναι εξαιρετικά χαμηλός. Τα δεδομένα αυτά αναδεικνύουν την ανάγκη



επανακαθορισμού του αλγορίθμου για τον έλεγχο της HTLV I/II λοίμωξης και ανοίγουν τη συζήτηση προς την κατεύθυνση εφαρμογής ελέγχου μόνο στους αιμοδότες 1ης φοράς.^{22,23}

Η ειδικότητα για το σύνολο των εξετάσεων διαλογής και για όλους τους ελεγχόμενους παράγοντες, ήταν σύμφωνη με τις προσδοκίες μας και ίση ή καλύτερη με τη δηλωθείσα στα εσώκλειστα των αντιδραστηρίων, διασφαλίζοντας ότι η απουσία λοίμωξης στους αιμοδότες καταδεικνύεται εργαστηριακά με αρνητικά αποτελέσματα.

Είναι σημαντικό να γνωρίζουμε, ότι όταν σχεδιάζεται αλγόριθμος ανάλυσης, ιδανικά οι δοκιμασίες διαλογής (screening) θα πρέπει να είναι τόσο ειδικές όσο και ευαίσθητες. Ωστόσο, αυτό είναι συχνά δύσκολο να επιτευχθεί, καθώς ο επιπολασμός των λοιμώξεων στον αιμοδοτικό πληθυσμό είναι χαμηλός και ένας σημαντικός αριθμός δοτών χωρίς λοίμωξη μπορεί να προβάλλονται ως ψευδώς θετικοί.

Λόγω της αλληλεπίδρασης της ευαισθησίας και της ειδικότητας, οι δοκιμασίες ελέγχου screening δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται αποκλειστικά για τη διάγνωση μιας λοίμωξης σε αιμοδότες. Δότες, που έχουν θετικό τεστ screening, θα πρέπει να αξιολογούνται και με άλλες μεθόδους, προκειμένου να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα. Οι επιβεβαιωτικές δοκιμασίες είναι απαραίτητο βήμα του αλγορίθμου, βοηθούν στη αποσαφήνιση των αποτελεσμάτων των μεθόδων διαλογής και μας βοηθούν να υποστηρίξουμε τη διαγνωστική μας βεβαιότητα.

Διευκρινίζεται, ότι στις περιπτώσεις επιβεβαιωμένης λοίμωξης, δεν καθορίζουμε το στάδιο της λοίμωξης,

διότι αυτό διαφέρει ανάλογα με τον ελεγχόμενο μολυσματικό παράγοντα και επιπλέον ο ακριβής καθορισμός απαιτεί κλινικο-εργαστηριακή προσέγγιση. Εξάλλου, ο ρόλος των υπηρεσιών αιμοδοσίας είναι η αξιολόγηση της καταλληλότητας των δοτών, με την εφαρμογή κριτηρίων αποδοχής/αποκλεισμού.

Σε περιπτώσεις επιβεβαιωμένων θετικών αποτελεσμάτων, ενεργοποιείται η κατάλληλη διαδικασία διαχείρισης του αιμοδότη, συμπεριλαμβανομένης της σχετικής ενημέρωσής του και των διαδικασιών παρακολούθησης.²⁴

Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε ότι διαπιστώθηκαν χαμηλά επίπεδα οροθετικότητας έναντι όλων των μολυσματικών δεικτών σε όλα τα χρόνια ελέγχου. Η χρήση του επιβεβαιωτικού αλγορίθμου προσέφερε πολύτιμη βοήθεια στη διαχείριση-ενημέρωση των αιμοδοτών.

Συνιστάται η ανάπτυξη αλγορίθμων σε εθνικό επίπεδο, που να διασφαλίζουν την κατάλληλη και συνεπή έρευνα και επίλυση της αντιδραστικότητας στις δοκιμασίες διαλογής. Η διασφάλιση της ποιότητας για προσυμπτωματικές και επιβεβαιωτικές εξετάσεις για λοιμώδεις δείκτες είναι ιδιαίτερα σημαντική και συνεπάγεται συγκεκριμένες προσεγγίσεις. Μόνο δοκιμές που έχουν αδειοδοτηθεί θεωρούνται κατάλληλες για την αιμοδοσία.

Θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στην εκπαίδευση και τη διαρκή αξιολόγησή του προσωπικού, τη συντήρηση και βαθμονόμηση του εξοπλισμού, τη διαχείριση των δειγμάτων, την παρακολούθηση των συνθηκών αποθήκευσης των αντιδραστηρίων, μαζί με τεκμηρίωση όλων αυτών των ενεργειών.



Summary

Diagnostic performance of the serology screening testing of blood donors. Retrospective study (2018–2022) conducted at the Serology Laboratory of AHEPA Blood Center

Magdalini Pape*, Vasiliki Bakaloudi, Parthena Lazaridou, Dimitris, Pisokas, Pashalia Poulioudi, George Nikolaidis, Aikaterini Boukouvala, Christina Andrikopoulou, Soultana Nikolaidou, Iliana Pentsiou, Chariklia Pafli, Maria Chatzikyrkou

Serology Laboratory, Blood Center, AHEPA University General Hospital of Thessaloniki

*Corresponding author

The use of screening tests in a blood donor population, a population with a low prevalence of infectious markers, is a complex process. All assays should have high levels both of sensitivity and specificity. Increased sensitivity is of outmost importance to detect and remove potentially infectious blood products from the blood supply and eliminate false negative results. At the same time, specificity is also important in reducing the number of false positive results, in order to avoid unnecessary exclusion of certain donors. The aim of our study was to analyze the seroprevalence of transfusion-transmissible infectious agents of voluntary blood donors within the period 2018–2022 and verify the accuracy of screening tests followed by confirmatory assays. The study conducted at the Serology Laboratory of AHEPA Blood Center. Blood samples were tested for syphilis, HBsAg, anti-HCV, anti-HTLV I/II and HIV Ag/Ab. The screening strategy included repeated testing of reactive samples, followed by confirmatory testing. Our results confirmed the low prevalence of transfusion transmitted infections in Greek blood donors. As a consequence, the positive predictive value of the screening assays was poor, something not attributed to poor performance of the selected screening tests, and a relevant number of uninfected donations were excluded. Specificity for all assays was within our expectations and definitely equal or better than the value demonstrated on the reagent inserts. The use of the confirmatory algorithm offered valuable help in the management of blood donors.



Key words

blood donor population; algorithm; diagnostic accuracy; specificity



Βιβλιογραφία

1. EDQM. The Collection, Testing and Use of Blood and Blood Components in Europe. 21st Edition 2023. Annual Report .<http://www.who.edqm.eu>.
2. Balint B, Vucetic D, Todorovic-Balint M, Borovcanin N, Jovanovic-Cupic S, Mandusic V. Safety improving by complementary serological and molecular testing combined with pathogen reduction of the donated blood in window period. *Transfus Apher Sci* 2013; 49: 103–104.
3. Blood donor selection: guidelines on assessing donor suitability for blood donation. Dec; 2018; https://www.who.int/bloodsafety/publications/guide_selection_assessing_suitability.pdf 2012.
4. WHO. Screening donated blood for transfusion-transmissible infections. Geneva: WHO; 2009.
5. Dodd RY, Notari EP, Stramer SL. Current prevalence and incidence of infectious disease markers and estimated window-period risk in the American Red Cross blood donor population. *Transfusion* 2002; 42:975–979.
6. Sharma UK, Stramer SL, Wright DJ, Glynn SA, Hermansen S, Schreiber GB, *et al*. Impact of changes in viral marker screening assays. *Transfusion* 2003; 43:202–214.
7. Zou S, Stramer SL, Dodd RY. Donor testing and risk: current prevalence, incidence, and residual risk of transfusion-transmissible agents in US allogeneic donations. *Transfus Med Rev* 2012; 26:119–128.
8. Mahony JB, Chernesky MA. 2000. Immunoassays for the diagnosis of infectious diseases, p 202–214. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (ed), *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed. ASM Press, Washington, DC.
9. Hodinka RL. 2010. Serological tests in clinical virology, p 133–150. In Jerome KR (ed.), *Lennette's Laboratory Diagnosis of Viral Infections*, 4th ed. Informa Healthcare USA, Inc., New York, NY.
10. Marks V. False-positive immunoassay results: a multicenter survey of erroneous immunoassay results from assays of 74 analytes in 10 donors from 66 laboratories in seven countries. *Clin Chem* 2002; 48:2008–2016.
11. Kiely P, Stewart Y, Castro L. Analysis of voluntary blood donors with biologic false reactivity on chemiluminescent immunoassays and implications for donor management. *Transfusion* 2003; 43:584–589.
12. Kiely P, Walker K, Parker S, Cheng A. Analysis of sample-to-cutoff ratios on chemiluminescent immunoassays used for blood donor screening highlights the need for serologic confirmatory testing. *Transfusion* 2010; 50:1344–1351.
13. Šimundić AM. Measures of Diagnostic Accuracy: Basic Definitions. *EJIFCC*. 2009; 19:203–211.
14. Leung VK, Lee CK, Chau TN, Cheung WI, Lo FH, Lai KB, *et al*. A probable case of transfusion-transmitted hepatitis B virus infection in an immunosuppressed recipient caused by an occult HBV-infected donor with negative ID-NAT. *Transfus Med* 2010; 20:276–277.
15. Candotti D, Boizeau L, Laperche S. Occult hepatitis B infection and transfusion-transmission risk. *Transfus Clin Biol* 2017; 24:189–195.
16. Seed CR, Maloney R, Kiely P, Bell B, Keller AJ, Pink J, *et al*. Infectivity of blood components from donors with occult hepatitis B infection: results from an Australian lookback programme. *Vox Sang* 2015; 108:113–122.
17. Zervou EK, Boumba DS, Liaskos Ch, Georgiadou S, Tsianos EV, Dalekos GN. Low Prevalence of HCV, HIV, and HTLV-I/II Infection Markers in Northwestern Greece: Results of a 3-Year Prospective Donor Study (1995–1997). *Eur J Intern Med* 2003; 14:39–44.
18. Lanini S, Easterbrook PJ, Zumla A, Ippolito G. Hepatitis C: global epidemiology and strategies for control. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22:833–838.
19. Kaur G, Kaur P. Syphilis testing in blood donors: an update. *Blood Transfus* 2015; 13:197–204.
20. Binnicker MJ, Jespersen DJ, Rollins LO. Direct comparison of the traditional and reverse syphilis screening algorithms prevalence of syphilis. *J Clin Microbiol* 2012; 50:48–50.
21. Mishra S, Boily MC, Ng V, Gold WL, Okura T, Shaw M, *et al*. The laboratory impact of changing syphilis screening from the rapid plasma reagin to a treponemal enzyme immunoassay: a case-study from the Greater Toronto Area. *Sex Transm Dis* 2011; 38:190–196.
22. Πολίτη Κ, Καβαλλιέρου Α, Γεωργακοπούλου Ε, Γούναρη Φ, Ζερβού Ε, Σπηλιωτοπούλου Ι, και συν. Συχνότητα αντι-HTLV-I-II σε αιμοδοτικό πληθυσμό στην Ελλάδα Πολυκεντρική μελέτη, *ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ* 1999; 16:480–487.
23. Stamoulis K., Kastaniotis G., *et al*. Low prevalence of HTLV-I/II infection markers: A 6-Years retrospective analysis. ISBT 2005, 9th European, Athens.
24. Kaur G, Kaur P, Basu S, Kaur R, Sharma S. Donor notification and counseling. Experience and challenges. *Transfus Apher Sci* 2013; 49:291–294.

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 της Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας, μέσω της ιστοσελίδας 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 (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 εξαρχής 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 Σύνοδο: 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 Σύνοδο: 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]. 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 ανακύβουν 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]. 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]. 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 Συζή-**

τηση. 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 κεί-

μενο 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.⁴ και έχει επιβεβαιωθεί και από άλλες μελέτες.^{5,7,8-12}).

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 ανηρτημένες), δεν περιλαμβάνονται στην βιβλιογραφία, αλλά μπορεί να παρατίθενται σε παρένθεση στο κείμενο, εφόσον δεν έχουν παρέλθει πάνω από δύο έτη από την παρουσίασή τους, αναφέ-



ροντας 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 εγχρωμες 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 αντιστοιχισμένης 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/μλ 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 Σύνταξη** και τα **άρθρα της Σύνταξης** ακολουθούν τις προηγούμενες γενικές οδηγίες, εκτός του γεγονότος ότι δεν έχουν περίληψη ή κεφαλαιοποίηση (υποβάλλονται σε μια ενιαία παράγραφο).

Διαδικασία κρίσης

Όλες οι εργασίες που υποβάλλονται κρίνονται από τουλάχιστον έναν εξωτερικό κριτή και από την ομάδα σύνταξης 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 δοκιμίων 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.

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 specialties 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 (Journal/Submission). Manuscripts received by post, regardless of whether complemented 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].

The journal considers all authors, irrespective of the order of appearance, as equally bearing full responsi-



bility 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 authors, 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].

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 received 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 unde-

clared 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].

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 IA-TROTEK (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.*⁴ and has been confirmed by other studies as well.^{5,7,8-12}).

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. Juncosa 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 measurement** 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 resent 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). 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.