

δελτίον
ελληνικής
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ
ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ



Acta Microbiologica Hellenica

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

Οκτώβριος-Δεκέμβριος 2023 • Τόμος 68 • Τεύχος 4
October-December 2023 • Volume 68 • Issue 4

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

215

**Applications of MALDI-TOF mass spectrometry
in the diagnosis of mycobacterial infections***Amalia Tzanatou, Dimitrios Papaventsis, Georgia Vrioni,
Joseph Papaparaskevas*

REVIEW

231

Interleukin-17 and Immunity of Ocular infections*Israa Asaad Aziz, Marwan Y. Al-Maqtoofi, Ahmed A. Burghal*

ORIGINAL ARTICLE

241

**Genotypic resistance profile
of ESBL-producing enterobacteriales
from wound infections in Salem, India***Sureshkumar Mathavi, Gopal Sree Sadhana, Rao A V Raghavendra,
Rajan Reena*

ORIGINAL ARTICLE

249

**Prevalence of serum cryptococcal antigen
among HIV infected patients attending a university
of Benin Teaching Hospital, Edo state, Nigeria***Okam Chioma Constance, Morka Emmanuel, Morka Blessing Ubulu*

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

267



ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

215

**Εφαρμογές της φασματομετρίας μάζας MALDI-TOF
στη διάγνωση των λοιμώξεων από μυκοβακτηρίδια**
*Αμαλία Τζανάτου, Δημήτριος Παπαβέντσος, Γεωργία Βρυώνη,
Ιωσήφ Παπαπαρασκευάς*

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

231

Interleukin-17 and Immunity of Ocular infections
Israa Asaad Aziz, Marwan Y. Al-Maqtoofi, Ahmed A. Burghal

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

241

**Genotypic resistance profile
of ESBL-producing enterobacteriales
from wound infections in Salem, India**
*Sureshkumar Mathavi, Gopal Sree Sadhana, Rao A V Raghavendra,
Rajan Reena*

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

249

**Prevalence of serum cryptococcal antigen
among HIV infected patients attending a university
of Benin Teaching Hospital, Edo state, Nigeria**
Okam Chioma Constance, Morka Emmanuel, Morka Blessing Ubulu

ΟΔΗΓΙΕΣ ΠΡΟΣ ΤΟΥΣ ΣΥΓΓΡΑΦΕΙΣ

261

Αγαπητοί συνάδελφοι, αγαπητοί φίλοι

Το τριμηνιαίο περιοδικό της Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας «*Acta Microbiologica Hellenica*» μετά από περισσότερα από 65 χρόνια συνεχούς παρουσίας στο χώρο της Ιατρικής Βιοπαθολογίας εισέρχεται σε μια νέα εποχή!

Από 1/1/2024 θα φιλοξενηθεί υπό την αιγίδα του εκδοτικού οίκου MDPI.

Σε αυτό το κρίσιμο σημείο για την συνέχιση του Περιοδικού, θα ήταν τιμή και χαρά μας να συνεργαστούμε με την υποβολή νέων εργασιών σας στην ανανεωμένη του έκδοση.

Σας ευχαριστούμε όλους για την υποστήριξή σας όλα αυτά τα χρόνια!

Η Συντακτική Επιτροπή



Dear colleagues, dear friends

The quarterly journal of the Hellenic Microbiological Society “*Acta Microbiologica Hellenica*” after more than 65 years of continuous presence in the field of Medical Biopathology is entering a new era!

From 1/1/2024 it will be hosted under the auspices of the MDPI publishing house.

At this critical point, we would be happy to consider your valuable submissions to the renewed edition of our Journal.

Thank you all for your support over all these years!

The Editorial Board

Εφαρμογές της φασματομετρίας μάζας MALDI-TOF στη διάγνωση των λοιμώξεων από μυκοβακτηρίδια

Αμαλία Τζανάτου¹, Δημήτριος Παπαβέντσας², Γεωργία Βρυώνη¹, Ιωσήφ Παπαπαρασκευάς¹

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

²Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Μυκοβακτηριδίων, Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Γενικό Νοσοκομείο Νοσημάτων Θώρακα «Η Σωτηρία»

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.10203252>



Περίληψη

Το γένος *Mycobacterium* περιλαμβάνει είδη όπως τα μέλη του παθογόνου συμπλέγματος ειδών *M. tuberculosis complex*, έναν παγκόσμιο σημαντικό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία, καθώς κι ένα συνεχώς αυξανόμενο αριθμό ειδών μη φυματιωδών μυκοβακτηριδίων, το 1/3 περίπου των οποίων έχουν συσχετιστεί με λοιμώξεις σημαντικής νοσηρότητας και θνητότητας. Επομένως η ταχεία κι ακριβής ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων είναι κρίσιμη στην αντιμετώπιση των λοιμώξεων αυτών.

Η MALDI-TOF MS μεθοδολογία έχει εισαχθεί την τελευταία δεκαετία στην εργαστηριακή πρακτική για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών. Αξιοποιεί τα μοναδικά, σαν αποτυπώματα,

για το κάθε είδος πρωτεϊνικά φάσματα μαζών κι επιτυγχάνει ταχεία, εύκολη, αξιόπιστη κι οικονομικά αποδοτική αναγνώριση βακτηρίων, ζυμομυκήτων, και υφομυκήτων. Καθώς οι συμβατικές μέθοδοι ταυτοποίησης των μυκοβακτηριδίων είναι χρονοβόρες, η MALDI-TOF MS προσφέρει μια νέα εναλλακτική προσέγγιση που μειώνει το χρόνο μέχρι το αποτέλεσμα.

Τα πρωτόκολλα αδρανισμού και προετοιμασίας του δείγματος των μυκοβακτηριδίων για τη MALDI-TOF MS ανάλυση των πρωτεϊνών τους έχουν περιγραφεί λεπτομερώς και χρησιμοποιούνται ευρέως στα κλινικά μικροβιολογικά εργαστήρια. Παράλληλα οι μελέτες αξιολόγησης της MALDI-TOF MS ως μεθόδου ταυτοποίησης των μυκοβακτηριδίων έχουν διαπιστώσει υψηλή ευαισθησία, ειδικότητα και διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα. Η συνεχής αναβάθμιση των βάσεων δεδομένων με την ενσωμάτωση όλο και μεγαλύτερου αριθμού προφίλ φασμάτων μαζών από είδη *Mycobacterium*, αλλά και η ανάπτυξη ισχυρότερων λογισμικών για την ανάλυση με τη MALDI-TOF MS, είναι βασικοί επιδιωκόμενοι στόχοι. Μέσω αυτών πιστεύεται πως θα επιτυγχάνεται αξιόπιστη ταυτοποίηση μεγαλύτερου αριθμού ειδών *Mycobacterium*, αλλά και καλύτερη διάκριση μεταξύ των φυλογενετικά στενά συσχετιζόμενων ειδών, καθώς το τελευταίο αποτελεί και τον κύριο περιορισμό της μεθόδου. Η MALDI-TOF MS ανάλυση των επιφανειακών, ειδικών του κάθε είδους *Mycobacterium* λιπιδίων αποτελεί πεδίο έρευνας του οποίου οι εξελίξεις αναμένονται και υπόσχεται να συντομεύσει ακόμη περισσότερο το χρόνο ταυτοποίησης των μυκοβακτηριδίων, ίσως και να κατορθώσει την τυποποίησή τους.

Οι προοπτικές που ανοίχτηκαν με την εισαγωγή της τεχνολογίας MALDI-TOF MS στη διαγνωστική των μυκοβακτηριδίων έχουν θεαματικό αντίκτυπο στην ταυτοποίηση κι ελπίζεται πως θα έχουν τον ανάλογο αντίκτυπο, τόσο στην τυποποίηση, όσο και στην ανίχνευση αντοχής στα αντιφυματικά φάρμακα.



Λέξεις κλειδιά

Μυκοβακτηρίδια, MALDI-TOF MS, ταυτοποίηση, προετοιμασία δείγματος, βάσεις δεδομένων, μελλοντικές προοπτικές

Υπεύθυνος αλληλογραφίας

Ιωσήφ Παπαπαρασκευάς
Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή,
Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Μικράς Ασίας 75, 11527 Αθήνα, Ελλάδα
Email: ipapapar@med.uoa.gr

1. Εισαγωγή

Μέχρι σήμερα, περισσότερα από 180 είδη μυκοβακτηριδίων έχουν περιγραφεί. Τα πλέον γνωστά είναι το *Mycobacterium tuberculosis* (Μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης) και πολύ συγγενικά του γενετικά είδη, μεταξύ των οποίων τα *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis* (στέλεχος εμβολίου BCG), τα οποία

αναφέρονται ως σύμπλεγμα του Μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης (*M. tuberculosis complex*, MTBC). Ακόμη στα γνωστά είδη που προκαλούν ανθρώπινες λοιμώξεις ανήκει και το *Mycobacterium leprae* (Μυκοβακτηρίδιο της λέπρας). Εκτός από τα παραπάνω, τα είδη των μυκοβακτηριδίων που απομένουν χαρακτηρίζονται με τον όρο μη φυματιώδη μυκοβακτηρίδια (Non-tuberculous mycobacteria - NTM) ή συνήθως και με τον χαρακτηρισμό άτυπα μυκοβακτηρίδια.¹

Τα στελέχη που ανήκουν στην ομάδα MTBC προκαλούν φυματίωση, λοιμώδη νόσο που μεταδίδεται κυρίως αερογενώς από άτομο σε άτομο μέσω μικρών αιωρούμενων σωματιδίων. Η πιο συχνή μορφή της νόσου είναι η πνευμονική φυματίωση, ενώ εξωπνευμονικές εστίες λοιμώξεως δημιουργούνται συνηθέστερα με λεμφαγγειακή διασπορά ή κατ' επέκταση ιστού από γειτονική βλάβη. Τέτοιες είναι η φυματιώδης λεμφαδενίτιδα, πλευρίτιδα, περικαρδίτιδα, η φυματίωση του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, του ουροποιητικού, του δέρματος, του περιτοναίου, των οστών.²

Τα NTM είναι ευρέως διαδεδομένοι στο περιβάλλον σαπροφυτικοί κι ευκαιριακώς παθογόνοι μικροοργανισμοί κι απομονώνονται από μια ποικιλία πηγών όπως το έδαφος, η σκόνη, το νερό, τα μολυσμένα ζώα. Στον άνθρωπο μεταδίδονται από το περιβάλλον, η μετάδοση από άτομο σε άτομο παρατηρείται εξαιρετικά σπάνια και μπορούν να προκαλέσουν τόσο πνευμονική όσο και εξωπνευμονική νόσο.³ Έχουν συσχετιστεί με λοιμώξεις στους ανθρώπους που εκδηλώνονται ως πνευμονικές λοιμώξεις, δερματικές λοιμώξεις, λεμφαδενίτιδες στα παιδιά, όπως και γενικευμένες λοιμώξεις, ενώ εμφανίζονται στο μεγάλο ποσοστό τους σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς.⁴ Αν και συνήθως τα μυκοβακτηρίδια αυτά θεωρούνται ήσσονος παθογένειας, προκαλώντας κυρίως ευκαιριακές λοιμώξεις, τα τελευταία χρόνια οι λοιμώξεις αυτές από τα NTM όχι μόνο έχουν αυξηθεί, αλλά οι εντοπίσεις τους στον ανθρώπινο οργανισμό παρουσιάζουν συνεχώς μεγαλύτερη ποικιλία. Ακόμη ανοδικά σε αριθμό είναι και τα περιστατικά τέτοιου είδους λοιμώξεων σε ανοσοεπαρκή άτομα.¹ Ένα από τα χαρακτηριστικά και πρόσφατα παραδείγματα λοίμωξης από NTM είναι η αιτιολογική συσχέτιση λοιμώξεων μετά από καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις με το *Mycobacterium chimaera*.

Παρόλο που οι μυκοβακτηριδιακές λοιμώξεις αντιμετωπίζονται στις μέρες μας με τη χρήση της κατάλληλης αντιφυματικής αγωγής, εξακολουθούν να αποτελούν ένα αξιοσημείωτο πρόβλημα δημόσιας υγείας που προκαλεί σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα. Για να επιτευχθεί ταχεία έναρξη στοχευμένης θεραπείας, ώστε να βελτιωθεί η έκβαση των ασθενών αλλά και να προληφθεί η ανάπτυξη ανθεκτικών στα αντιφυματικά φάρμακα στελεχών, η ταχεία κι ακριβής διάγνωση των λοιμώξεων από μυκοβακτηρίδια είναι καθοριστική.

2. Η μεθοδολογία MALDI-TOF MS στην ταυτοποίηση των βακτηρίων

Οι διαθέσιμες εργαστηριακές τεχνικές ταυτοποίησης

μετά από θετική καλλιέργεια, όπως οι βιοχημικές αντιδράσεις, οι μοριακές τεχνικές πολλαπλασιασμού κάθε είδους (PCR, PCR με ανάστροφο υβριδισμό, κλπ.) καθώς και οι τεχνικές αλληλούχισης κάθε είδους (sequencing πολλαπλών γονιδίων, whole genome sequencing, κλπ.), παρότι παρέχουν αξιόπιστα αποτελέσματα στην ταυτοποίηση των βακτηρίων εν γένει, μειονεκτούν για τα δεδομένα της καθημερινής ρουτίνας των σύγχρονων κλινικών εργαστηρίων. Έτσι οι βιοχημικές δοκιμασίες είναι χρονοβόρες και δεν εφαρμόζεται σε όλα τα είδη, η PCR είναι σχετικά ακριβή, ενώ όσον αφορά την αλληλούχιση απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό και αρκετές ημέρες για την ανάλυση των δεδομένων και αποτελεσμάτων, ενώ παράλληλα το κόστος της είναι υψηλό.⁵

Τα τελευταία χρόνια έχει εισαχθεί στα μικροβιολογικά εργαστήρια ως ένας γρήγορος τρόπος ταυτοποίησης των βακτηρίων από τα καλλιεργήματά τους η ανάλυση με φασματομετρία μάζας του πρωτεϊνικού προφίλ των εξεταζόμενων κυττάρων. Το προφίλ που λαμβάνεται συγκρίνεται με μια βιβλιοθήκη φασμάτων μαζών πρωτεϊνών που έχει δημιουργηθεί προγενέστερα με φασματομετρία μάζας που εφαρμόστηκε σε αναγνωρισμένα στελέχη τα οποία ήταν ταυτοποιημένα με πρότυπες μεθόδους αναφοράς. Η φασματομετρία μάζας που χρησιμοποιείται στην μικροβιολογική πρακτική καλείται MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry). Θεωρείται μια σημαντική σε αξιοπιστία μέθοδος ταυτοποίησης των βακτηρίων, με ένα φάσμα αναγνωρισμών ειδών ανώτερο από κάθε άλλης μεθόδου ταυτοποίησης, εξαιρουμένου του Sequencing.⁶ Το κύριο πλεονέκτημα της MALDI-TOF MS είναι ο ελάχιστος χρόνος που απαιτείται για να ληφθεί το αποτέλεσμα της ταυτοποίησης αλλά και το χαμηλό κόστος της εξέτασης ανά δείγμα.

3. Τεχνικά χαρακτηριστικά της μεθοδολογίας MALDI-TOF MS

Η MALDI-TOF MS βασίζει τη λειτουργία της σε ένα φασματογράφο μάζας που αποτελείται από τρία λειτουργικά μέρη: 1) μία πηγή ιόντων, η οποία θα ιονίσει και θα μεταφέρει τα ιονισμένα μόρια του δείγματος στην αέρια φάση, 2) ένας αναλυτής μαζών που θα διαχωρίσει τα ιόντα ανάλογα με το πηλίκιο μάζα προς φορτίο τους (m/z) και 3) μια συσκευή ανίχνευσης των διαχωρισμένων ιονισμένων μορίων. Στη MALDI-TOF MS προκαλείται «ήπιος» ιονισμός, γεγονός που επιτρέπει τον ακέραιο ιονισμό και την εξάτμιση μεγάλων, μη πτητικών βιομορίων, όπως οι πρωτεΐνες.

Η διαδικασία ξεκινά με την τοποθέτηση του δείγματος του καλλιεργημένου μικροοργανισμού σε μια με-



ταλλική πλάκα ή πλάκα μιας χρήσης. Το δείγμα καλύπτεται με ειδικό διάλυμα που ονομάζεται matrix (μήτρα), το οποίο κρυσταλλοποιείται μαζί με το δείγμα. Μετά την κρυσταλλοποίηση του matrix και του μικροβιακού δείγματος, η πλάκα εισάγεται στο φασματογράφο μάζας όπου δέχεται βολές σύντομων παλμών laser, συνήθεστερα από laser αζώτου. Το matrix απορροφάει ενέργεια από το laser γεγονός που προκαλεί εκρόφηση των βιομορίων του δείγματος τα οποία στη συνέχεια εξατμίζονται κι ιονίζονται στην αέρια φάση. Αυτά τα ιονισμένα μόρια αρχικά επιταχύνονται διαμέσου ενός ηλεκτροστατικού πεδίου και στη συνέχεια εκτινάσσονται διαμέσου ενός μεταλλικού σωλήνα ο οποίος υπόκειται σε κενό αέρος, ώστε να τον διατρέξουν μέχρι να φτάσουν σε έναν ανιχνευτή. Τα μικρότερα ιόντα κινούνται γρηγορότερα από τα μεγαλύτερα μέσα στο σωλήνα και φθάνουν συνεπώς ταχύτερα στον ανιχνευτή. Ο χρόνος πτήσης (Time-of-Flight, TOF) που απαιτείται για να φθάσουν στον ανιχνευτή εξαρτάται από τη μάζα κι από το φορτίο των ιόντων του βιοαναλύτη κι είναι ανάλογος της τετραγωνικής ρίζας του ηλίκου m/z . Επομένως τα ιόντα των βιομορίων που ήταν μέρος του δείγματος κι έχουν διαφορετικό m/z διαχωρίζονται με την παραπάνω μέθοδο ανάλογα με το TOF τους και δημιουργείται έτσι ένα φάσμα μαζών το οποίο χαρακτηρίζεται

από το m/z στον άξονα των x και την ένταση των ιόντων, που είναι ο αριθμός των ιόντων συγκεκριμένου m/z που «χτυπούν» στον ανιχνευτή στον άξονα των y . Το φάσμα μαζών λοιπόν του αναλυόμενου δείγματος συνθέτουν κορυφές m/z διαφόρων εντάσεων που αποτελούν την υπογραφή του μικροοργανισμού στο αναλυόμενο δείγμα, καθότι είναι μοναδικό για το είδος του μικροοργανισμού (Εικόνα 1). Αυτό το φάσμα μαζών των βιομορίων, πρωτεϊνών κατά βάση, του εξεταζόμενου προς ταυτοποίηση μικροβίου συγκρίνεται με γνωστά φάσματα μαζών πρότυπα ταυτοποιημένων μικροοργανισμών τα οποία είναι ενσωματωμένα σε μια βάση δεδομένων του αναλυτή MALDI-TOF MS, ώστε αν ταιριάζει με κάποιο σε ικανοποιητική ομολογία, να γίνει κατ' αυτόν τον τρόπο η αναγνώρισή του σε επίπεδο γένους και είδους.

4. Η εφαρμογή της MALDI-TOF MS στα μυκοβακτηρίδια

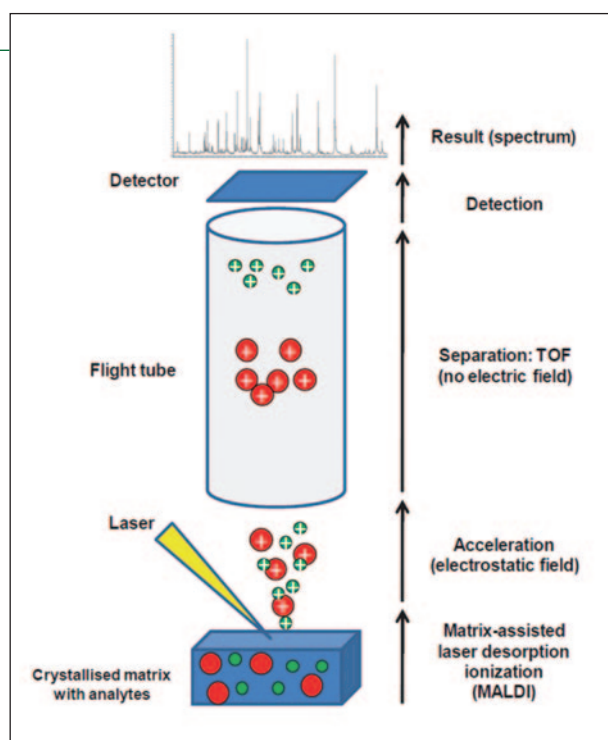
4.1 Γενικά στοιχεία

Μια μέθοδος ταυτοποίησης σαν την MALDI-TOF MS, ήταν εύλογο να θεωρηθεί πως με τη χρήση της στην αναγνώριση των μυκοβακτηριδίων, θα προσέφερε νέες δυνατότητες για ταχύτερη και ακριβέστερη διά-

Εικόνα 1

Απεικόνιση της τεχνικής MALDI-TOF MS.

Πηγή: Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews* 2012;36:380-407.



γνωση των λοιμώξεων που προκαλούνται από τα σημαντικά αυτά παθογόνα μικρόβια. Η διάκριση μεταξύ μιας λοίμωξης από μυκοβακτηρίδια του MTBC και μιας από NTM είναι σημαντικό να γίνει όσο το δυνατόν συντομότερα και με ακρίβεια, λόγω της διαφορετικής αγωγής που πρέπει να λάβουν οι ασθενείς σε κάθε περίπτωση. Στις βασικές εργαστηριακές μεθόδους ταυτοποίησης μυκοβακτηριδίων από θετικό καλλιέργημα που έχουν χρησιμοποιηθεί ανήκουν οι συμβατικές φαινοτυπικές και βιοχημικές μέθοδοι, όπως και χρωματογραφικές μέθοδοι. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) των μυκολικών οξέων των μυκοβακτηριδίων θεωρήθηκε και μέθοδος αναφοράς. Ωστόσο, έχουν εγκαταλειφθεί σήμερα ως κοπιώδεις και χρονοβόρες τεχνικές κι εκτελούνται μόνο σε εργαστήρια αναφοράς. Ακόμη η ανοσοχρωματογραφική μέθοδος ανίχνευσης του αντιγόνου ΜΡΤ64, η οποία εφαρμόζεται σε θετική για μυκοβακτηρίδια καλλιέργεια τόσο από υγρό όσο και από στερεό υλικό μέσο, είναι τεχνική που προσφέρει γρήγορη διάκριση των μυκοβακτηριδίων του MTBC από τα NTM, ωστόσο δεν παρέχει καμία επιπλέον ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους του εξεταζόμενου δείγματος. Από την άλλη πλευρά οι νεότερες μοριακές τεχνικές με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), έχουν φέρει σημαντική ελάττωση του απαιτούμενου χρόνου διάγνωσης. Οι δοκιμασίες μοριακής ανίχνευσης βασίζονται στην ενίσχυση ειδικών για τα μυκοβακτηρίδια γονιδιακών στόχων. Ευρύτατα χρησιμοποιούμενη είναι η μοριακή ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων με μεθόδους αναστροφου υβριδισμού, γνωστές ως Line Probe Assays. Εφαρμόζονται σε καλλιέργηματα, όπου κατόπιν εκχύλισης του DNA των μυκοβακτηριδίων, ενισχύονται τμήματά του μέσω PCR με σεσημασμένους εκκινητές, και στη συνέχεια ακολουθεί υβριδισμός με ακίνητους, δεσμευμένους σε ταινίες νιτροκυτταρίνης ιχνηθέτες. Υπάρχουν διαθέσιμες εμπορικά διάφορες τέτοιες δοκιμασίες που δίνουν τη δυνατότητα ταυτοποίησης των MTBC όσο και αρκετών NTM μυκοβακτηριδίων. Σε αυτό το υπάρχον πεδίο η τεχνολογία MALDI-TOF MS έρχεται να προσφέρει μια καινούρια εναλλακτική προσέγγιση στη διάγνωση αυτών των πάντα επίκαιρων λοιμώξεων. Με τα περιστατικά λοιμώξεων από NTM να αυξάνονται βαθμιαία παγκοσμίως, η ταχύτερη κι εγκυρότερη ταυτοποίηση και ο διαχωρισμός τους από τα MTBC μυκοβακτηρίδια μπορεί να βελτιώσει την αντιμετώπιση των ασθενών εφαρμόζοντας ταχύτερα την κατάλληλη για το συγκεκριμένο είδος μυκοβακτηριδίου φαρμακευτική αγωγή.³

Η εφαρμογή της MALDI-TOF MS στην ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων έρχεται ακόμη αντιμέτωπη με προκλήσεις, οι οποίες προκύπτουν εξαιτίας του αργού ρυθμού ανάπτυξης της πλειοψηφίας των μυκοβακτηριδίων, του σχετικά χαμηλότερου αριθμού ριβοσωμι-

κών πρωτεϊνών που περιέχουν σε σύγκριση με άλλα μικρόβια, αλλά κατά κύριο λόγο εξαιτίας του κυτταρικού τους τοιχώματος το οποίο είναι παχύ, πυκνό και κηρώδες. Ακόμη για τη χρήση της μεθόδου απαιτείται, για τον ασφαλή χειρισμό τους, η αδρανοποίηση των δειγμάτων τα οποία είναι ύποπτα για MTBC και NTM μυκοβακτηρίδια, επομένως και δυνητικά υψηλώς μολυσματικά.⁴

4.2 Αδρανοποίηση των μυκοβακτηριδίων για λόγους βιοασφάλειας

Ο χειρισμός κλινικών δειγμάτων που περιέχουν μυκοβακτηρίδια εγείρει θέματα βιοασφάλειας. Επειδή δεν είναι εύκολο να αποκλείσουμε ότι στο ίδιο δείγμα μπορεί να συνυπάρχουν μυκοβακτηρίδια τόσο του MTBC όσο και NTM, η σύσταση είναι να εξασφαλίζεται επίπεδο Βιοασφάλειας 3 (BSL 3) όταν το προσωπικό κλινικών εργαστηρίων χειρίζεται δείγματα με οξεάντοχα μυκοβακτηρίδια. Για να χρησιμοποιηθούν αυτά τα δείγματα για περαιτέρω ανάλυση με σκοπό την ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων, όπως στην περίπτωση που θα επιχειρηθεί η εφαρμογή της MALDI-TOF MS τεχνολογίας, θα πρέπει αρχικά να αδρανοποιηθούν, ώστε με ασφάλεια να μεταφερθούν στο χαμηλότερο επίπεδο Βιοασφάλειας 2 (BSL 2) που εφαρμόζεται συνήθως στους υπόλοιπους χώρους του εργαστηρίου. Μέθοδοι που έχουν προταθεί και χρησιμοποιούνται είναι η αδρανοποίηση των μυκοβακτηριδίων με θέρμανση, ή και η επώαση μιας μικρής ποσότητας των βακτηρίων σε διάλυμα αιθανόλης 70%. Θεωρούνται και οι δύο ασφαλείς τρόποι αδρανοποίησης τόσο των MTBC όσο και των NTM.⁷

Σε πρόσφατα δημοσιευμένη ερευνητική τους μελέτη οι Wang και συν. (2021) έθεσαν ως στόχο την αξιολόγηση της βιοασφάλειας που προσφέρουν διαφορετικά πρωτόκολλα για την αδρανοποίηση του *M. tuberculosis* με θέρμανση. Η ερευνά τους απέδειξε ότι στα στελέχη *M. tuberculosis* στα οποία εφαρμόστηκε η διαδικασία αδρανοποίησης με θέρμανση σε ένα θερμικό μπλοκ είτε στους 80°C για 90 λεπτά, είτε στους 95°C για 30 λεπτά, παρουσίαζαν συνεχώς τα υψηλότερα σκορ στην ταυτοποίησή τους με την MALDI-TOF MS ανάλυση (log score >2,0) με το MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, 28359, Bremen, Germany). Τα αποτελέσματα της έρευνας ενίσχυσαν την παραδοχή ότι η διαδικασία αδρανοποίησης αυτή που ακολουθήσαν ήταν αποτελεσματική στην επίτευξη καλής βιοασφάλειας κατά τον χειρισμό των εξεταζόμενων στελεχών *M. tuberculosis*.⁸

4.3 Μέθοδοι προετοιμασίας του δείγματος μυκοβακτηριδίων για MALDI-TOF MS ανάλυση

Έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία διάφορες καινοτόμες μέθοδοι προεργασίας του δείγματος, οι οποίες



έχουν ως τελικό προϊόν το εκχύλισμα των πρωτεϊνών των μυκοβακτηριδίων σε ικανοποιητικά επαρκή ποσότητα, το οποίο και χρησιμοποιείται για ανάλυση με MALDI-TOF MS. Η προετοιμασία του δείγματος μυκοβακτηριδίων που θα αναλυθεί γίνεται χρησιμοποιώντας βιομάζα από μυκοβακτηρίδια προερχόμενα από καλλιέργειες σε στερεά καλλιεργητικά μέσα. Είναι μάλιστα δυνατή και η χρήση μυκοβακτηριδιακών κυττάρων που αναπτύχθηκαν σε υγρά καλλιεργητικά μέσα, όπως το ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα BD BACTEC MGIT Automated Mycobacterial Detection System που βασίζεται στο σωληνάριο Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) που επωάζεται στον κλίβανο BACTEC MGIT 960 System (Becton Dickinson, East Rutherford, NJ) και το οποίο βασίζεται στην αυτόματη ανίχνευση της κατανάλωσης O₂ με βάση την τεχνολογία ανίχνευσης φθορισμού. Η δυνατότητα να εφαρμόζεται η διεργασία για την εκχύλιση των πρωτεϊνών από το υλικό θετικών υγρών καλλιεργειών που επωάστηκαν σε αυτοματοποιημένα συστήματα με σκοπό την επακόλουθη ανάλυση του επεξεργασμένου δείγματος με MALDI-TOF MS επιταχύνει σε μεγάλο βαθμό την ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδιακών στελεχών, κι άρα τη διάγνωση.⁹

Οι Alcaide και συν. (2018) έχουν κάνει μια αξιολογή και περιεκτική δημοσίευση-ανασκόπησης των διαφορετικών διαθέσιμων μεθόδων επεξεργασίας των δειγμάτων μυκοβακτηριδίων για την επακόλουθη ανάλυσή τους με την MALDI-TOF MS τις οποίες χρησιμοποιούν τα κλινικά εργαστήρια επί του παρόντος.⁴ Σύμφωνα με αυτήν, κύριος στόχος της διαδικασίας προετοιμασίας του δείγματος είναι η σχάση του κυτταρικού τοιχώματος των μυκοβακτηριδίων χρησιμοποιώντας χημικές και μηχανικές μεθόδους, και στη συνέχεια η εκχύλιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας φορμικό οξύ και ακετονιτρίλιο. Η σχάση των μυκοβακτηριδιακών κυττάρων επιτυγχάνεται είτε με την εφαρμογή υπερήχων στο δείγμα, είτε με την ανάδευση του δείγματος μαζί με σφαιρίδια τα οποία εφαρμόζουν μηχανικές δυνάμεις στα κύτταρα, είτε με έντονη περιδίνηση του δείγματος παρουσία σφαιριδίων πυριτίου (Εικόνα 2). Το πρωτόκολλο επεξεργασίας που περιγράφουν οι συγγραφείς, ξεκινά με την απαλή επαναιώρηση 1 μl από τη μυκοβακτηριδιακή βιομάζα που λαμβάνεται από το καλλιεργητικό μέσο σε 300 μl απεσταγμένου νερού. Τα μυκοβακτηρίδια αδρανοποιούνται με θέρμανση σε ξηρό υδατόλουτρο στους 95°C για 30 λεπτά και κατόπιν προστίθεται αιθανόλη μέχρι τελικής συγκεντρώσεως 75%.

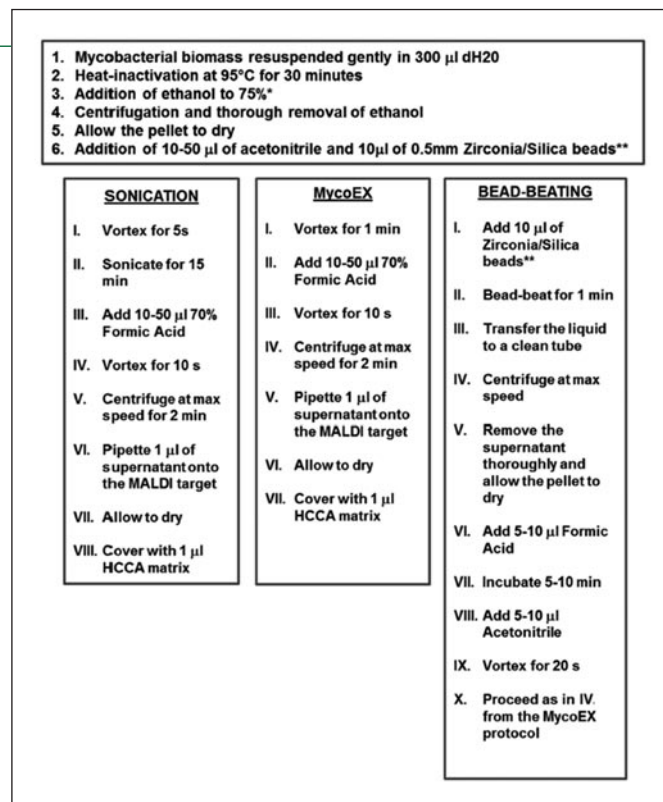
Εικόνα 2

Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας επεξεργασίας του δείγματος μυκοβακτηριδίων για ταυτοποίηση με MALDI-TOF MS.

*Το πρωτόκολλο της θραύσης του δείγματος με σφαιρίδια συνεχίζει από αυτό το βήμα.

**Τα σφαιρίδια ζirkονίου/πυριτίου μπορούν να αντικατασταθούν από γυάλινα σφαιρίδια.

Πηγή: Alcaide F, Amlerová J, Bou G, Ceysens PJ, Coll P, Corcoran D, Fangous MS, González-Álvarez I, Gorton R, Greub G, Hery-Arnaud G. How to: identify non-tuberculous Mycobacterium species using MALDI-TOF mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*. 2018;24:599-603.



Το πρωτόκολλο υπερήχησης αποτελεί το πρώτο από τα τρία βασικά πρωτόκολλα που περιγράφουν οι Alcaide και συν. (2018). Σύμφωνα με αυτό, η διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος των μυκοβακτηριδίων για την MALDI-TOF MS συνεχίζει με τη φυγοκέντρηση του δείγματος στις μέγιστες στροφές και με τη διεξοδική και πλήρη απομάκρυνση της αιθανόλης. Το βήμα της απομάκρυνσης της αιθανόλης είναι σημαντικό για να ληφθούν κατόπιν υψηλής ποιότητας πρωτεϊνικά φάσματα μαζών. Το ίζημα με τη μορφή σφαιριδίου αφήνεται τότε να στεγνώσει καλά ώστε να εξατμιστεί κάθε ίχνος αιθανόλης. Εν συνεχεία προστίθενται ακετονιτρίλιο και 0,5mm σφαιρίδια ζirkονίου/πυριτίου ή γυάλινα σφαιρίδια, και το μείγμα περιδινίζεται για 5 δευτερόλεπτα. Ακολουθεί ένα 15λεπτο στάδιο υπερήχησης μέσα σε ένα απλό υπερηχητικό υδατόλουτρο με μια μοναδική ένταση υπερήχησης. Έπειτα προστίθεται 70% φορμικό οξύ, και το δοκιμαστικό σωληνάριο στο οποίο γίνεται η διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος περιδινίζεται ξανά για 10 δευτερόλεπτα και γίνεται μια τελευταία φυγοκέντρωσή του για 2 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα. Στην συνέχεια, 1 μl από το υπερκείμενο, που αποτελεί το τελικώς λαμβανόμενο εκχύλισμα με τις μυκοβακτηριδιακές πρωτείνες, τοποθετείται σε μια θέση της μεταλλικής μικροπλάκας του MALDI, αφήνεται να στεγνώσει καλά και καλύπτεται με 1 μl matrix α-κυανο-4-υδρόξυ-κινναμωμικό οξύ (HCCA). Μόλις στεγνώσει το δείγμα είναι έτοιμο να τοποθετηθεί στον MALDI-TOF MS αναλυτή.¹⁰

Το πρωτόκολλο ανάδευσης με σφαιρίδια είναι το δεύτερο πρωτόκολλο, όπου το δείγμα αναδεύεται με σφαιρίδια ώστε να επιτευχθεί καλύτερα η μηχανική ρήξη των μυκοβακτηριδιακών κυτταρικών τοιχωμάτων. Στην πράξη, η αρχική διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος συνεχίζεται σε αυτή την περίπτωση με την προσθήκη 10 μl σφαιριδίων ζirkονίου/πυριτίου και τα βακτήρια αναδεύονται με αυτά για ένα λεπτό, χωρίς να έχει όμως αφαιρεθεί η αιθανόλη. Κατόπιν το υγρό εναιώρημα μεταφέρεται σε καθαρό δοκιμαστικό σωληνάριο και φυγοκεντρείται στις μέγιστες στροφές. Αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο πλήρως, και το ίζημα υπό μορφή σφαιριδίου στεγνώσει, ακολουθούνται τα επόμενα βήματα εκχύλισης των πρωτεϊνών. Πρώτα προστίθεται φορμικό οξύ κι αφήνεται να επωαστεί για 5-10 λεπτά. Εν συνεχεία, προστίθεται και ακετονιτρίλιο. Το σωληνάριο περιδινίζεται για 20 δευτερόλεπτα κι ακολουθεί φυγοκέντρηση 2 λεπτών στη μέγιστη ταχύτητα. Το τελευταίο βήμα είναι κι εδώ η λήψη 1 μl από το υπερκείμενο και η ανάλυσή του με MALDI-TOF MS, αφού στεγνώσει και καλυφθεί με 1 μl από HCCA matrix επάνω στην μεταλλική πλάκα.¹¹

Τέλος, το πρωτόκολλο MycoEX προέρχεται από τους κατασκευαστές του MALDI Biotyper της εταιρείας

Bruker Daltonics. Σύμφωνα με αυτό, ακολουθείται η αρχικά περιγραφόμενη διαδικασία με αφαίρεση της αιθανόλης και κατόπιν γίνεται προσθήκη ακετονιτρίλιου και σφαιριδίων ζirkονίου/πυριτίου, με επακόλουθη περιδίνιση διάρκειας ενός λεπτού του σωληναρίου προετοιμασίας του δείγματος. Παρομοίως με τα προηγούμενα πρωτόκολλα, προστίθεται φορμικό οξύ 70%, μετά ακολουθεί περιδίνιση 10 δευτερολέπτων και φυγοκέντρηση 2 λεπτών στη μέγιστη ταχύτητα. Τελικά 1 μl από το υπερκείμενο εκχύλισμα χρησιμοποιείται και σε αυτή την περίπτωση με υπερκάλυψή του από 1 μl HCCA matrix, αφού έχει στεγνώσει, για να γίνει ανάλυση με την τεχνική MALDI-TOF MS.¹²

Αντίστοιχα η εταιρεία bioMérieux για το Vitek MS σύστημά της έχει αναφέρει παρόμοια διαδικασία προετοιμασίας δείγματος, με εναιώρηση του δείγματος των μυκοβακτηριδίων σε διάλυμα αιθανόλης που ακολουθείται από μηχανική ρήξη του κυτταρικού τοιχώματος χρησιμοποιώντας σφαιρίδια πυριτίου. Τα ακόλουθα και στην παραπάνω διαδικασία βήματα για την εκχύλιση των πρωτεϊνών είναι η προσθήκη φορμικού οξέος κι ακετονιτρίλιου.^{13,14} Σημειώνεται τέλος ότι από τη στιγμή που το δείγμα θα αδρανοποιηθεί, οι χρόνοι που χρειάζονται για τις διαδικασίες της υπερήχησης, του χτυπήματος με τα σφαιρίδια και του πρωτοκόλλου MycoEX είναι αντίστοιχα 40, 45 και 30 λεπτά.⁴

5. Κριτήρια ερμηνείας για την ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων με την MALDI-TOF MS

Τα ιδιαίτερα βιολογικά χαρακτηριστικά των μυκοβακτηριδίων, όπως αναφέρθηκε, έχουν σταθεί ως μεγάλη πρόκληση για την τεχνική MALDI-TOF MS, κάτι που δε θα μπορούσε να μην αποτυπωθεί και στα ερμηνευτικά κριτήρια των τιμών για την ταυτοποίησή τους. Έτσι λοιπόν για το σύστημα MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) η τιμή log (score) που είναι παραδεκτή για ταυτοποίηση υψηλής αξιοπιστίας των μυκοβακτηριδίων έχει καθιερωθεί στο ≥ 1.8 αντί του ≥ 2.0 που χρησιμοποιείται για τα περισσότερα βακτηρίδια, και η τιμή όριο (cut-off) για τη χαμηλής αξιοπιστίας ταυτοποίηση είναι στο ≥ 1.6 αντί του ≥ 1.7 .¹⁵ Για το δε Vitek MS σύστημα της bioMérieux το κατώφλι για την αξιόπιστη ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους έχει καθιερωθεί στο $>90\%$ για τα μυκοβακτηρίδια, αν και τιμές score ανάμεσα στο 80% κι 90% γίνονται επίσης αποδεκτές σαν αξιόπιστες. Αποτελέσματα ταυτοποιήσεων ανάμεσα σε τιμές 60% κι 80% θεωρούνται ως χαμηλής εμπιστοσύνης και αξιοπιστίας και ίσως ανταποκρίνονται μόνο σε επίπεδο γένους. Ενώ αποτελέσματα με τιμή score κάτω από 60% δε θεωρούνται αξιόπιστα για την ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων.¹⁶



Αρκετές μελέτες έχουν συμφωνήσει επί του παρόντος ότι αυτά τα χαμηλότερα κατώφλια τιμών score για την ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων με τη MALDI-TOF MS είναι πιο κατάλληλα για αυτούς τους μικροοργανισμούς, καθώς παρατήρησαν με αυτά αυξημένη συχνότητα ταυτοποίησής τους, επομένως είναι δυνατόν να χρησιμοποιούνται αποτελεσματικά.⁴ Μια αρκετά πρόσφατη δημοσίευση από τους Rodriguez-Temporal και συν. (2020) πρότεινε το κατώφλι για την υψηλής αξιοπιστίας ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων να τεθεί στο ≥ 2.0 . Ωστόσο, σημειώνει πως το εύρος τιμών score από 1.60 έως 1.99 ήταν έγκυρο για σχεδόν όλα τα είδη μυκοβακτηριδίων που ανέλυσαν οι ερευνητές, με εξαίρεση τα *Mycobacterium angelicum*, *Mycobacterium parascrofulaceum*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium porcinum* και *Mycobacterium gastri*, τα οποία απαιτούσαν υψηλότερες τιμές score ≥ 2.0 .¹⁷

Έτσι λοιπόν γίνεται κατανοητό πως δεν έχει ομόφωνα οριστεί ένα παγκοσμίως αποδεκτό κατώφλι τιμών που να ακολουθείται ανεξαιρέτως για την ερμηνεία της ταυτοποίησης των διαφόρων ειδών των μυκοβακτηριδίων με την MALDI-TOF MS. Αναμφίβολα, και άλλες τρέχουσες και μελλοντικές μελέτες θα βοηθήσουν στο να εκτιμηθούν καλύτερα τα κριτήρια ερμηνείας των τιμών score που λαμβάνονται σαν αποτελέσματα της MALDI-TOF MS ανάλυσης σε στελέχη μυκοβακτηριδίων. Με τον τρόπο αυτό θα επιτυγχάνεται η ακριβέστερη δυνατή ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδιακών ειδών χρησιμοποιώντας κοινά κριτήρια ερμηνείας των τιμών score σε όλα τα κλινικά εργαστήρια.

6. Βάσεις δεδομένων φασμάτων μαζών μυκοβακτηριδιακών ειδών

Το θεμέλιο στο οποίο στηρίζεται η ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων με την διαδικασία MALDI-TOF MS είναι οι βάσεις δεδομένων (databases) που αποτελούν βιβλιοθήκες αποθήκευσης φασμάτων αναφοράς που ανήκουν σε γνωστά είδη. Η διαδικασία μέσω της οποίας θα γίνει η αναγνώριση του είδους μυκοβακτηριδίου του εξεταζόμενου δείγματος, περιλαμβάνει τη σύγκριση του φάσματος που θα αποκτηθεί μέσω της ανάλυσής του με τα διαθέσιμα φάσματα μυκοβακτηριδιακών ειδών της χρησιμοποιούμενης βάσης δεδομένων. Η σύγκριση αυτή επιτυγχάνεται με τη χρήση αλγορίθμου που εφαρμόζεται από το λογισμικό που βρίσκεται ενσωματωμένο στον αναλυτή MALDI-TOF MS. Είναι κατανοητό ότι όσο μεγαλύτερη σε εύρος είναι η εκπροσώπηση καλά αναγνωρισμένων φασμάτων μυκοβακτηριδιακών ειδών κλινικού ενδιαφέροντος στη βάση δεδομένων που χρησιμοποιείται, τόσο

πιθανότερη είναι η αξιόπιστη ταυτοποίηση μεγαλύτερου αριθμού των εξεταζόμενων μυκοβακτηριδιακών στελεχών.

Οι κατασκευαστές των πιο διαδεδομένων συστημάτων MALDI-TOF MS φροντίζουν ώστε να επεκτείνονται συνεχώς οι βάσεις δεδομένων με καινούρια προφίλ φασμάτων αναφοράς, με σκοπό να καλύψουν τα είδη μικροοργανισμών με κλινική σημασία. Η προοδευτικά αυξανόμενη ποικιλία των πρότυπων φασμάτων μικροοργανισμών στις βάσεις δεδομένων έχει επιφέρει τα τελευταία χρόνια αύξηση του αριθμού των ταυτοποιήσεων στελεχών από κλινικά δείγματα σε επίπεδο είδους, ή έστω γένους, όπως διαπιστώνεται στη ρουτίνα των κλινικών εργαστηρίων που διαθέτουν αναλυτή MALDI-TOF MS.⁹

Αυτός ο προοδευτικά αυξανόμενος με το πέρασμα του χρόνου αριθμός φασμάτων αναφοράς, αντικατοπτρίστηκε και στις εμπορικά διαθέσιμες βάσεις δεδομένων των μυκοβακτηριδιακών φασμάτων. Στην πλατφόρμα της Bruker Daltonics η έκδοση 3.0 της βάσης δεδομένων (Mycobacteria db v3.0) περιελάμβανε 853 προφίλ πρωτεϊνικών φασμάτων από 149 διαφορετικά είδη μυκοβακτηριδίων το έτος 2015. Η έκδοση Mycobacteria Library v 5.0 που βγήκε διαθέσιμη στην αγορά το 2017 αντιπροσωπεύει μια σημαντική βελτίωση με ένα σύνολο 912 προφίλ φασμάτων προερχόμενων από 164 είδη μυκοβακτηριδίων. Η τελευταία βάση δεδομένων της Bruker Daltonics για το MALDI Biotyper είναι η Mycobacteria db v6.0, διαθέσιμη από το 2019, με συνολικά 1.038 φάσματα από 178 διαφορετικά είδη μυκοβακτηριδίων.¹⁴

7. Περιορισμοί της MALDI-TOF MS στην ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων

Οι περιορισμοί που ακόμη απαντώνται είναι η αδυναμία της MALDI-TOF MS τεχνολογίας να διακρίνει αποτελεσματικά βάσει των πρωτεϊνικών φασμάτων τους, είδη μυκοβακτηριδίων τα οποία έχουν πολύ στενή φυλογενετική συσχέτιση μεταξύ τους. Υπάρχουν στο γένος των μυκοβακτηριδίων ομάδες ειδών που παρουσιάζουν υψηλή γενετική ομοιότητα. Το γεγονός αυτό αντικατοπτρίζεται και στα παραγόμενα από αυτά τα είδη φάσματα όταν αναλύονται με την MALDI-TOF MS. Τα φάσματα αυτά για τις αναλυτικές ικανότητες της μεθόδου θεωρούνται πανομοιότυπα. Επομένως κάτι τέτοιο δεν επιτρέπει την ορθή ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους.

Τα είδη τα οποία κατατάσσονται στο MTBC περιλαμβάνουν τα *M. tuberculosis*, *M. africanum*, και τα σχετιζόμενα με ζώα *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii* και το *M. canettii*. Τα είδη αυτά του MTBC επιδεικνύουν πολύ υψηλό επίπεδο ομοιότητας. Έχει

βρεθεί με Sequencing ότι τα είδη αυτά μοιράζονται κατά 99% ίδιες αλληλουχίες στο γονιδίωμά τους. Η ταυτοποίηση αυτών των ειδών με την τεχνική της MALDI-TOF MS γίνεται ως μέλη του MTBC με υψηλή ευαισθησία κι ειδικότητα,^{19,20} ενώ πιο ακριβής ταυτοποίησή τους στο επίπεδο του είδους δεν είναι για την ώρα εφικτή.²¹

Όσον αφορά τα NTM, στενά σχετιζόμενα γενετικά είδη τα οποία επίσης αδυνατεί να διαφοροποιήσει μεταξύ τους η MALDI-TOF MS τεχνική είναι τα είδη που απαρτίζουν το σύμπλεγμα του *Mycobacterium abscessus complex* (MABS). Μέλη του MABS είναι τα *M. abscessus subspecies abscessus*, *M. abscessus subspecies bolletii* και *M. abscessus subspecies massiliense*. Άλλο παράδειγμα είναι τα NTM μυκοβακτηρίδια *M. setense*, *M. peregrinum* και *M. porcinum* τα οποία δεν μπορεί να διακριθούν στην ταυτοποίησή τους αξιόπιστα το ένα από το άλλο, και λαμβάνεται με την MALDI-TOF MS λανθασμένη ταυτοποίηση ανάμεσα σε αυτά τα είδη. Γι' αυτό το αποτέλεσμα, και σε αυτήν την περίπτωση ευθύνεται η στενή φυλογενετική συσχέτιση των συγκεκριμένων ειδών τα οποία κι ομαδοποιούνται στο σύμπλεγμα *Mycobacterium fortuitum complex*. Άλλες περιπτώσεις που δηλώνουν την υψηλή γενετική ομοιότητα κάποιων ειδών NTM, η οποία και καθιστά ακόμη δυσχερή την ορθή ταυτοποίησή τους με την MALDI-TOF MS, είναι το *M. scrofulaceum* στενά σχετιζόμενο με το *M. parascrofulaceum* καθώς και το *M. kansasii* που κι αυτό μπορεί να ταυτοποιηθεί λανθασμένα όταν αναλυθεί με την MALDI-TOF MS ως *M. gastri* λόγω της ισχυρής τους φυλογενετικής συσχέτισης.¹⁷

Στο *Mycobacterium avium complex* (MAC) περιλαμβάνονται τα *M. avium*, *M. intracellulare* και *M. chimaera*. Είναι κι αυτά είδη NTM μυκοβακτηριδίων που εξαιτίας του υψηλού βαθμού γενετικής ομοιότητας που παρουσιάζουν παράγουν παρόμοια φάσματα που δυσχεραίνουν το διαχωρισμό τους με την MALDI-TOF MS ανάλυσης.²² Αποτελούν λοιπόν, όπως και τα παραπάνω που αναφέρθηκαν, αλλά και όλα τα φυλογενετικώς στενά σχετιζόμενα μεταξύ τους μυκοβακτηριδιακά είδη, πεδίο έντονης ερευνητικής πρόκλησης, ώστε να κατορθωθεί με MALDI-TOF MS η ορθή κι αξιόπιστη ταυτοποίησή τους στο επίπεδο του είδους ή και υποείδους τους. Το *M. chimaera*, μέλος του MAC, έχει προξενήσει παγκόσμια ανησυχία για τη δημόσια υγεία, εξαιτίας των σοβαρών λοιμώξεων που διαπιστώθηκε ότι μπορεί να προκαλέσει, μετά από μια παρατεταμένη επιδημία λοιμώξεων με τον μικροοργανισμό αυτό οι οποίες εμφανίζονταν κατόπιν επεμβάσεων ανοικτής καρδιάς.²³ Οι λοιμώξεις από το *M. chimaera* χαρακτηρίζονται από μια μεγάλη λανθάνουσα περίοδο μετά την καρδιοχειρουργική επέμβαση που φτάνει τα 1,5 έως 3,6 έτη. Οι κλινικές εκδηλώσεις της λοίμωξης περιλαμβάνουν ενδοκαρδίτιδα, ηπατίτιδα, νεφρίτιδα,

εγκεφαλίτιδα και χοριοαμφιβληστροειδίτιδα. Το συγκεκριμένο μυκοβακτηρίδιο ανιχνεύθηκε μέσω καλλιέργειών που πάρθηκαν από τα κυκλώματα νερού των μονάδων θέρμανσης/ψύξης των συσκευών που χρησιμοποιούνται στο δίκτυο της εξωσωματικής κυκλοφορίας για τη μηχανική υποστήριξη του κυκλοφορικού και του αναπνευστικού συστήματος κατά τη διάρκεια των καρδιοχειρουργικών επεμβάσεων. Έτσι οι μολυσμένες με το *M. chimaera* αυτές συσκευές θεωρήθηκαν ο αιτιολογικός παράγοντας που προξένησε το παγκόσμιο αυτό κύμα επιδημίας, με περισσότερα από 100 περιστατικά παγκοσμίως.²⁴

Κι είναι τόσο η ανησυχία για το *M. chimaera*, όσο και οι όλο και συχνότερες σοβαρές λοιμώξεις από NTM κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένους αλλά και σε ανοσοεπαρκείς, που ώθησε την Αμερικανική Εταιρεία Θώρακος και την Εταιρεία Λοιμωδών Νοσημάτων της Αμερικής (ATS/IDSA) αλλά και τη Βρετανική Εταιρεία Θώρακος να προβούν σε σύσταση να παρέχεται αναφορά της ταυτοποίησης των NTM που απομονώνονται από κλινικά δείγματα ασθενών σε επίπεδο είδους, ώστε να μπορεί να τεκμηριωθεί η κλινική σημασία τους στη διάγνωση λοίμωξης.^{4,71,72}

Η ανάλυση με την MALDI-TOF MS των μυκοβακτηριδιακών πρωτεϊνικών φασμάτων δεν μπορεί να διακρίνει μεταξύ του φάσματος που παράγει το *M. chimaera* και του φάσματος του *M. intracellulare*, με αποτέλεσμα και τα δύο αυτά διαφορετικά είδη να αναγνωρίζονται ως ομάδα *M. intracellulare/M. chimaera*.¹⁷ Πρόσφατες προσπάθειες ωστόσο να βελτιωθούν οι δυνατότητες διάκρισης των πρωτεϊνικών φασμάτων των στενά συσχετιζόμενων γενετικά μυκοβακτηριδιακών ειδών, επικεντρώθηκαν στην ανάπτυξη και χρήση ισχυρότερων λογισμικών. Τα λογισμικά αυτά αναλύουν τα προφίλ των φασμάτων ανιχνεύοντας επιπλέον χαρακτηριστικές και ειδικές για το κάθε ξεχωριστό είδος μυκοβακτηριδίου κορυφές, με σκοπό να καταφέρουν να διαφοροποιούν μεταξύ τους φάσματα μαζών πολύ στενά συσχετιζόμενων μυκοβακτηριδιακών ειδών. Στην περίπτωση των *M. intracellulare* και *M. chimaera* η MALDI-TOF MS ανάλυση για την αναγνώριση διακριτών κορυφών φασμάτων ειδικών για το *M. intracellulare* και κορυφών ειδικών για το *M. chimaera* κατόρθωσε να πετύχει τη διαφοροποίηση στην ταυτοποίηση μεταξύ των δύο αυτών ειδών. Σε πρόσφατη δημοσίευση των Pranada και συν. (2017) αναφέρεται ότι ένα νέο λογισμικό με ισχυρότερο αλγόριθμο, ο οποίος ανιχνεύει την παρουσία ειδικών για το είδος κορυφών των πρωτεϊνικών φασμάτων, ονομαζόμενο "the subtyping module" του MALDI Biotyper, έχει αναπτυχθεί και προσφέρει τη δυνατότητα της αυτόματης διάκρισης μεταξύ των ειδών *M. intracellulare* και *M. chimaera*.²⁷ Ακόμη βέβαια αυτή η νέα εφαρμογή δεν είναι διαθέσιμη σε όλα τα κλινικά μι-



κροβιολογικά εργαστήρια που χρησιμοποιούν την MALDI-TOF MS τεχνολογία, ενώ για την ώρα δεν έχουν γίνει αρκετές μελέτες αξιολόγησής της.²⁸

8. MALDI-TOF MS ανάλυση του λιπιδικού προφίλ των μυκοβακτηριδίων

Ένα πεδίο που τελευταία έχει αρχίσει να εξερευνάται κι εκφράζονται μεγάλες προσδοκίες ότι μπορεί να έχει τη δύναμη να ξεκλειδώσει νέες δυνατότητες στη διαγνωστική των μυκοβακτηριδίων είναι η μελέτη του λιπιδικού προφίλ φασμάτων μαζών για την ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων με την τεχνική MALDI-TOF MS. Κι αυτό εξαιτίας της μεγάλης αφθονίας λιπιδίων από τα οποία συντίθεται το κυτταρικό τους τοίχωμα. Αρκετές είναι οι ερευνητικές ομάδες που εργάζονται με κατεύθυνση να αποδείξουν πως η MALDI-TOF MS που προσεγγίζει τα λιπίδια ως αποτυπώματα των μικροοργανισμών, μπορεί να αποτελέσει τη μεγάλη ανατροπή στην ταχεία ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδιακών ειδών, ακόμη κι αυτών που είναι φυλογενετικά στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους, αλλά και να συντελέσει στον καθορισμό της ευαισθησίας ή αντοχής τους στα αντιφυματικά φάρμακα. Η συμβατική MALDI-TOF MS με βάση τα πρωτεϊνικά φάσματα μαζών των μυκοβακτηριδίων έχει τα μειονεκτήματα ότι απαιτεί εκτενή πρωτόκολλα προετοιμασίας του δείγματος, ενώ δεν μπορεί να διακρίνει μεταξύ τους και να ταυτοποιήσει σωστά κάποια είδη ή υποείδη που βρίσκονται στο ίδιο γένος ή σύμπλεγμα, όπως για παράδειγμα στο MTBC.

Στα μυκοβακτηρίδια έχουν αναγνωριστεί και περιγραφεί αρκετά λιπίδια ειδικά για το κάθε είδος. Τα μυκολικά οξέα είναι μοναδικά μακριάς αλυσίδας λιπαρά οξέα τα οποία επιδεικνύουν υψηλή δομική ποικιλομορφία με διαφοροποιήσεις στο μήκος της αλυσίδας τους, στο επίπεδο της ακορεστότητας και της ύπαρξης χημικών ομάδων όπως οι κετόνες και τα μεθοξύλια. Αυτό το υψηλό επίπεδο ποικιλότητας εφοδιάζει τα μυκολικά οξέα με χαρακτηριστικά ειδικά του είδους του μυκοβακτηριδίου κι επομένως τα καθιστά ικανά να χρησιμοποιηθούν ως στόχοι προς ανάλυση με την MALDI-TOF MS τεχνική για ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους.^{29,30,31} Εκτός από τα μυκολικά οξέα κι άλλα λιπίδια έχει διαπιστωθεί ότι είναι ειδικά για συγκεκριμένα είδη μυκοβακτηριδίων. Για παράδειγμα τα σουλφογλυκολιπίδια 1 (SL-1) και οι πολυακυλοτρεχαλόζες (PATs) απαντώνται αποκλειστικά στο MTBC, ενώ άλλα λιπίδια όπως τα γλυκοπεπτιδολιπίδια της C-μυκοσίδης (GPLs) και οι πολυφυλλικές τρεχαλόζες (TPPs) παρουσιάζονται μόνο στα NTM.^{32,33}

Μια πρωτοποριακή μέθοδος αναπτύχθηκε πρόσφατα από τους Larrouy-Maumus και Puzo (2015) η

οποία περιγράφει ως δυνατή την άμεση ανάλυση με MALDI-TOF MS των λιπιδίων σε άθικτα μικροβιακά κύτταρα. Το μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι πως πρόκειται για μια προσέγγιση που περιλαμβάνει μια γρήγορη κι απλή προετοιμασία του μικροβιακού δείγματος. Κατ' αυτήν δε χρειάζεται καμία χημική κατεργασία ούτε εκχύλιση του δείγματος πριν να εισαχθεί στο μηχάνημα της MALDI-TOF MS ανάλυσης. Η διαδικασία που ακολούθησαν περιγράφει αρχικά την αδρανοποίηση με θέρμανση των μυκοβακτηριδίων. Κατόπιν οι μικροοργανισμοί ξεπλένονται 3 φορές με διπλά απεσταγμένο νερό και τοποθετούνται στη μεταλλική πλάκα του αναλυτή MALDI-TOF MS, καλυπτόμενοι από ένα ειδικό matrix. Το ειδικό αυτό matrix αποτελείται από ένα μίγμα 9:1 διυδροξυβενζοϊκού οξέος και 2-υδροξυ-5-μεθοξυβενζοϊκού οξέος (super-DHB) διαλυμένο σε έναν μη πολικό διαλύτη.^{34,35} Το super-DHB matrix επιλέχθηκε λόγω της ικανότητάς του να επιτρέπει την αποδοτική ανάλυση των λιπιδίων και των φωσφολιπιδίων με την τεχνική MALDI-TOF MS.³⁶

Αντιπροσωπευτική κι αξιολογη μελέτη της προσπάθειας που γίνεται να αξιοποιηθούν τα ειδικά για κάθε είδος μυκοβακτηριδίων εκφραζόμενα στην επιφάνειά τους λιπίδια ανιχνεύοντάς τα με την MALDI-TOF MS τεχνική, είναι αυτή των Gonzalo και συν. (2021). Στη μελέτη τους αξιολόγησαν την μεθοδολογία που είχε περιγραφεί από τους Larrouy-Maumus και Puzo, εφαρμόζοντας ανάλυση των λιπιδίων από ακέραια και αδρανοποιημένα με θέρμανση μυκοβακτηρίδια χρησιμοποιώντας την MALDI-TOF MS. Το δείγμα που χρησιμοποιήσαν ήταν 273 μυκοβακτηριδιακά στελέχη που προέρχονταν τόσο από το MTBC, όσο και από τα NTM. Το ειδικό matrix που χρησιμοποίησαν ήταν το super-DHB matrix διαλυμένο σε 9:1 χλωροφόρμιο και μεθανόλη, ενώ η καταγραφή των φασμάτων μαζών των λιπιδίων έγινε με τη λειτουργία ανίχνευσης θετικών ιόντων όσο και με την αρνητικών ιόντων σε αναλυτή MALDI-TOF MS. Σκοπός της μελέτης ήταν να καθιερωθεί μια μεθοδολογία ώστε να διακρίνονται τα MTBC στελέχη από τα NTM και να ταυτοποιούνται τα NTM στελέχη. Όλα αυτά χρησιμοποιώντας τη βασιζόμενη σε λιπίδια ειδικά του είδους των μυκοβακτηριδίων MALDI-TOF MS ανάλυση σε ακέραια μυκοβακτηρίδια. Τα MTBC στελέχη της μελέτης υποβλήθηκαν σε Whole-Genome Sequencing (WGS) ως μέθοδο αναφοράς για την ταυτοποίησή τους, ενώ τα NTM που περιλήφθηκαν ήταν στελέχη αναφοράς, προερχόμενα από το δίκτυο εργαστηρίων αναφοράς του European Center for Disease Prevention and Control (ECDC). Τα δείγματα αναλύθηκαν στη λειτουργία ανίχνευσης θετικών και αρνητικών ιόντων, η επεξεργασία των φασμάτων μαζών των λιπιδίων έγινε με το λογισμικό του αναλυτή, ενώ η αναγνώριση ως MTBC ή NTM έγινε τυφλά, μετά από οπτική ερμηνεία των φασμάτων μα-

ζών από τους ερευνητές, ακολουθώντας κριτήρια προηγούμενων δημοσιεύσεων.³⁴ Η ταυτοποίηση ενός στελέχους ως στελέχους του MTBC έγινε με την αναγνώριση των ειδικών γι' αυτό SL-1, με καλύτερη απόδοση στη λειτουργία ανίχνευσης αρνητικών ιόντων. Για την ομάδα των NTM στελεχών η ταυτοποίηση κατορθώθηκε καλύτερα στη λειτουργία ανίχνευσης θετικών ιόντων. Οι ερευνητές διαπίστωσαν πως ο ιονισμός των ειδικών λιπιδίων για κάθε NTM είδος επέφερε παραγωγή φασμάτων μαζών των λιπιδίων αυτών, τα οποία ήταν μοναδικά και καλά διακριτά μεταξύ τους, επιτρέποντας την ξεκάθαρη διάκριση και ταυτοποίηση των NTM στελεχών που αναλύθηκαν στη μελέτη. Στα συμπεράσματα της μελέτης τους οι ερευνητές σημειώνουν ότι η εν λόγω μέθοδος είναι γρήγορη, καθώς ολοκληρώνεται σε περίπου 10 λεπτά, και χρειάζεται σε αριθμό λιγότερα από 1.000 μυκοβακτηρίδια, γεγονός που την κάνει αρκετά ευαίσθητη κι εξαιρετικά χρήσιμη στο κλινικό εργαστήριο. Ακόμη, αυτή η μέθοδος πέτυχε στη μελέτη ακριβή ταυτοποίηση με 96.7% ευαισθησία και 91.7% ειδικότητα για τα στελέχη εκείνα τα οποία παρήγαγαν αναγνωρίσιμο φάσμα μαζών λιπιδίων. Τέτοια ποσοστά είναι ιδιαίτερος ενθαρρυντικός, καθιστώντας την MALDI-TOF MS τεχνική με τη χρήση των λιπιδίων έναν καινούριο ευκολότερο, ταχύτερο κι αξιόπιστο τρόπο ταυτοποίησης των μυκοβακτηριδίων.³⁷

Η ανάγκη για επιπλέον μελέτες είναι μεγάλη, καθώς επιβάλλεται σε αυτή τη φάση η ανάπτυξη εργαλείων βιοπληροφορικής για την ανάλυση των φασμάτων μαζών των λιπιδίων των μικροβίων που λαμβάνονται με την MALDI-TOF MS ανάλυση. Βάσεις δεδομένων με προφίλ φασμάτων μαζών λιπιδίων από γνωστά, με πρότυπη μέθοδο ταυτοποιημένα, μυκοβακτηριδιακά είδη θα πρέπει να δημιουργηθούν, που να είναι συγκρίσιμες σε μέγεθος με τις υπάρχουσες των πρωτεϊνικών προφίλ φασμάτων μαζών, ώστε να επιτυγχάνεται πιο ακριβής και πιο αξιόπιστη ταυτοποίηση των υπό ανάλυση δειγμάτων μυκοβακτηριδίων.³⁸ Με πλούσιες κι ισχυρές βάσεις δεδομένων και με τελευταίας τεχνολογίας λογισμικά για την ανάλυση των λιπιδικών φασμάτων μαζών και τη σύγκρισή τους με εκείνα που υπάρχουν στη βάση δεδομένων του αναλυτή, θα είμαστε σε θέση να ταυτοποιούμε τα μυκοβακτηριακά είδη ταχέως και λεπτομερώς με την MALDI-TOF MS τεχνική που στηρίζεται στα λιπίδιά τους.³⁷

9. MALDI-TOF MS και τυποποίηση των μυκοβακτηριδίων

Η προσοχή των ερευνητών έχει στραφεί σε μεγάλο βαθμό προς την κατεύθυνση της αναγνώρισης, με την τεχνική MALDI-TOF MS, μυκοβακτηριδίων που σχετί-

ζονται πολύ στενά γενετικά μεταξύ τους κι αποτελούν υποείδη ή διαφορετικά στελέχη ίδιου είδους. Τέτοια παραδείγματα χάρη είναι το MTBC και το MABS. Η παραπάνω αναγνώριση, όπως έχουμε αναφέρει, δεν είναι εφικτή μέχρι τώρα, αν βασιστούμε μόνο στην ανάλυση των πρωτεϊνικών φασμάτων μαζών που προέρχονται από τα μυκοβακτηριδιακά είδη και υποείδη. Η τυποποίηση σε επίπεδο υποείδους ή στελέχους είναι χρήσιμη, όχι μόνο γιατί παρέχει την ακριβέστερη διάγνωση του παθογόνου μυκοβακτηριδίου που προκαλεί τη λοίμωξη, αλλά και γιατί μπορεί να καθοδηγήσει σε μερικές περιπτώσεις εγκαίρως την αντιβιοτική αγωγή προς την καλύτερη επιλογή, συνεπώς να πετύχει καλύτερη έκβαση της θεραπείας. Το τελευταίο υπογραμμίζεται εντόνως στην περίπτωση των υποειδών μυκοβακτηριδίων που ανήκουν στο MABS, η διαφοροδιάγνωση μεταξύ των οποίων είναι σημαντική, καθώς έχουν διαφορετική ευαισθησία στις μακρολίδες. Κι είναι αυτά τα μέλη του MABS που διάλεξαν οι Jia Khor και συν (2021) ώστε να επιχειρήσουν να τα ξεχωρίσουν, διαφοροποιώντας τα σε επίπεδο υποείδους, με τη χρήση της MALDI-TOF MS ανάλυσης των λιπιδίων τους.⁵ Τα μυκοβακτηρίδια του MABS κατηγοριοποιούνται σε τρία υποείδη, τα οποία είναι το *M. abscessus* subsp. *abscessus*, το *M. abscessus* subsp. *bolletii* και το *M. abscessus* subsp. *massiliense*. Από αυτά, το *M. abscessus* subsp. *massiliense* είναι ευαίσθητο στις μακρολίδες, ενώ τα *M. abscessus* subsp. *abscessus* και *M. abscessus* subsp. *bolletii* εμφανίζουν συχνά αντοχή σε αυτές. Έτσι η γρήγορη κι αξιόπιστη αναγνώριση των υποειδών αυτών θα ήταν καθοριστικής σημασίας για την κλινική πράξη. Οι ερευνητές στην παραπάνω μελέτη, χρησιμοποίησαν εννιά στελέχη αναφοράς μυκοβακτηριδιακών υποειδών του MABS, των οποίων τα λιπίδια επιφάνειάς τους ανέλυσαν με την MALDI-TOF MS τεχνική, όπως είχε περιγραφεί κι από τους Gonzalo και συν.³⁷ Το διαφορετικό που έκαναν είναι πως χρησιμοποίησαν αιθανόλη ως διαλύτη του super-DHB matrix αντί για χλωροφόρμιο και μεθανόλη, οι οποίοι είναι ιδιαίτερα τοξικοί οργανικοί διαλύτες. Κάνοντας πολλαπλές δοκιμές στην ερευνά τους, βρήκαν ότι ο συνδυασμός του super-DHB matrix σε 25% αιθανόλη, η οποία είναι ένας οργανικός διαλύτης που υπάρχει σε όλα τα κλινικά μικροβιολογικά εργαστήρια, με ένα εναιώρημα 2.0 της κλίμακας Mc Farland από άθικτα μυκοβακτηρίδια αδραντοποιημένα με θέρμανση στους 95°C για 30 λεπτά, παρείχε κατόπιν MALDI-TOF MS ανάλυσης τα καλύτερης ποιότητας λιπιδικά φάσματα μαζών των εξεταζόμενων στελεχών της μελέτης. Βελτιστοποιήσαν έτσι από τη μια πλευρά την ποσότητα της μυκοβακτηριδιακής βιομάζας που τοποθετείται στη μεταλλική πλάκα της MALDI-TOF MS. Ενώ από την άλλη ανακάλυψαν την καλύτερη συγκέντρωση της αι-



θανόλης στην οποία πρέπει να διαλυτοποιείται το super-DHB matrix ώστε να είναι αποτελεσματική η πάνω στην πλάκα εκχύλιση των επιφανειακών μυκοβακτηριδιακών λιπιδίων και η κρυσταλλοποίηση του δείγματος με το matrix. Εν συνεχεία ανέλυσαν τα δείγματα των γνωστών πρότυπων στελεχών υποειδών του MABS που είχαν προέλθει από το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς (National Mycobacterium Reference-NMRS-South, United Kingdom) σε αναλυτή MALDI Biotyper Sirius της Bruker Daltonics στη λειτουργία ανίχνευσης θετικών ιόντων. Τα προφίλ φασμάτων μαζών λιπιδίων που έλαβαν ήταν υψηλής ποιότητας κι ευκρίνειας, σε βαθμό που επέτρεψαν να διακριθούν μεταξύ τους τα τρία υποείδη. Συγκεκριμένα, υπήρχαν εύκολα αναγνωρίσιμες διαφορές στις κορυφές των λιπιδιακών φασμάτων μαζών των τριών υποειδών μυκοβακτηριδίων του MABS. Όπως σημειώνουν οι ερευνητές, τα δεδομένα της μελέτης τους, παρόλο που αυτή συμπεριέλαβε μικρό αριθμό στελεχών (μόλις εννέα), υποδηλώνουν πως η MALDI-TOF MS ανάλυση των ειδικών μυκοβακτηριδιακών λιπιδίων κατέχει τη δυναμική να διακρίνει τα υποείδη μέσα στο σύμπλεγμα MABS.⁵

Το βέβαιο είναι πως κατόπιν αυτών των αποτελεσμάτων ανοίγει ο δρόμος για περισσότερες μελέτες της καινούριας αυτής προσέγγισης ταυτοποίησης των ειδών αλλά και των υποειδών μυκοβακτηριδίων. Αυτό δείχνει πως ενδεχομένως έχει γίνει ένα μεγάλο βήμα προς την επίτευξη μιας εξαιρετικά ταχείας αλλά κι αξιόπιστης μεθόδου βακτηριακής τυποποίησης των μυκοβακτηριδίων με την MALDI-TOF MS τεχνολογία αξιοποιώντας τα λιπίδιά τους. Μια τέτοια προοπτική θα ωθήσει σε μεγάλο βαθμό τόσο την ταχύτερη κι αποτελεσματικότερη διαγνωστική και θεραπευτική αντιμετώπιση των μυκοβακτηριδιακών λοιμώξεων, αλλά και την επιδημιολογική διερεύνηση και φυλογενετική ταξινόμηση των απομονούμενων στελεχών μυκοβακτηριδίων.

10. Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές

Ο χρόνος που χρειάζεται για την αξιόπιστη ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδιακών ειδών έχει μειωθεί θεα-

ματικά με την εφαρμογή της MALDI-TOF MS μεθοδολογίας. Η εδραίωση πρωτοκόλλων αδρανοποίησης και προετοιμασίας του δείγματος μυκοβακτηριδίων έχει καταστήσει την τεχνική ταυτοποίησής τους με την MALDI-TOF MS προσιτή στα κλινικά μικροβιολογικά εργαστήρια. Οι συνεχώς αναβαθμισμένες διαθέσιμες βάσεις δεδομένων με φάσματα μαζών αναφοράς, καθώς και τα όλο και μεγαλύτερης αναλυτικής διακριτικής ικανότητας λογισμικά προσέθεσαν μαζί με την ταχύτητα και την ανάλογη ακρίβεια στην ταυτοποίηση ολοένα και περισσότερων ειδών.

Τεράστιο βήμα προς την ακόμη ταχύτερη αναγνώριση των μυκοβακτηριδιακών ειδών θα είναι η άμεση εφαρμογή της MALDI-TOF MS ανάλυσης των επιφανειακών λιπιδίων σε δείγματα με άθικτα αδρανοποιημένα μυκοβακτηρίδια, χωρίς το στάδιο της προετοιμασίας πρωτεϊνικού τους εκχυλίσματος, κάτι που προωθείται επί του παρόντος με αρκετά επιτυχημένες μελέτες.

Ο επιτυχής διαχωρισμός στενά συσχετιζόμενων μυκοβακτηριδιακών ειδών αλλά και υποειδών, η επίτευξη του οποίου περιορίζεται για την ώρα από τις τρέχουσες δυνατότητες της τεχνικής, είναι ένα άλλο στοίχημα που έχουν βαλθεί να κερδίσουν οι ερευνητές και προς αυτή την κατεύθυνση διεξάγονται ελπιδοφόρες μελέτες.

Σίγουρα, με τις όλο και πιο ολοκληρωμένες βάσεις δεδομένων, με τα συνεχώς και πιο ισχυρά εργαλεία βιοπληροφορικής και με το συνδυασμό της MALDI-TOF MS ανάλυσης των πρωτεϊνών όσο και των λιπιδίων των μυκοβακτηριδίων, αναμένεται ακόμη πιο σημαντική προσφορά της πρωτοποριακής αυτής τεχνολογίας στη διάγνωση των μυκοβακτηριδιακών λοιμώξεων.

Περισσότερες μελέτες είναι βέβαιο πως θα σχεδιάζονται και θα εκτελούνται για την συνεχόμενη βελτίωση αυτής της απλής, γρήγορης, αξιόπιστης κι οικονομικής μεθόδου για την ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων σε επίπεδο είδους. Ταυτόχρονα το μέλλον, με βάσει τις ενδείξεις που έχουν οι ερευνητές, υπόσχεται πως θα εξελιχθεί η δυνατότητα της MALDI-TOF MS να παρέχει ταυτοποίηση ακόμα και στο επίπεδο υποείδους των μυκοβακτηριδίων.



Summary

Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in the diagnosis of mycobacterial infections

Amalia Tzanatou¹, Dimitrios Papaventsis², Georgia Vrioni¹, Joseph Papaparaskevas^{1*}

¹Department of Microbiology, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens

²National Reference Center for Mycobacteria, Microbiology Laboratory, "Sotiria" Chest Hospital

*Corresponding author

The genus *Mycobacterium* includes species like the members of the pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* complex, a major global public health burden, and an ever-increasing number of nontuberculous mycobacterial species, of which approximately 1/3 have been associated with infections linked to substantial morbidity and mortality. Therefore, the rapid and accurate identification of mycobacteria is crucial for disease management.

MALDI-TOF MS technique was introduced for the identification of microorganisms as a common laboratory practice during the last decade. It utilizes the unique for each species, fingerprint-like, protein mass spectra and achieves rapid, easy, reliable and cost-effective identification of bacteria, yeasts, moulds and mycobacteria. As conventional methods for the identification of mycobacteria are time-consuming, MALDI-TOF MS offers a new alternative approach that reduces the turnaround time.

Protocols for inactivation and sample preparation of mycobacteria for MALDI-TOF MS proteins' analysis have been described in detail and are used in clinical microbiology laboratories. The continuous upgrading of databases through incorporation of an increasing number of mass spectral profiles of mycobacterial species, as well as the development of more powerful software for the analysis with MALDI-TOF MS, are future key goals. Through them, it is believed that a reliable identification of a greater number of mycobacterial species will be achieved and an improved distinction between phylogenetically closely related species could be accomplished, as the latter remains the main limitation of the method. Finally, MALDI-TOF MS analysis of surface lipids, specific to each mycobacterial species, is a field of research which developments are expected and promises to further shorten the identification time of mycobacteria, and perhaps even achieving their typing.

The prospects launched by the introduction of MALDI-TOF MS technology in the diagnosis of mycobacteria have had a spectacular impact on species identification and it is anticipated that they will have a similar impact on both typing and detection of antituberculosis drugs resistance.



Key words

Mycobacteria, MALDI-TOF MS, identification, sample preparation, databases, future perspectives



Βιβλιογραφικές Αναφορές

- 1 Kostrzewa M, Nagy E, Schröttner P, Pranada AB. How MALDI-TOF mass spectrometry can aid the diagnosis of hard-to-identify pathogenic bacteria—the rare and the unknown. Expert review of molecular diagnostics. 2019;19:667-682.
- 2 Pai M, Behr MA, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC. Nature reviews disease primers. *Tuberculosis*. 2016;2:16076.
- 3 Kalaiarasan E, Thangavelu K, Krishnapriya K, Muthuraj M, Jose M, Joseph NM. Diagnostic performance of real time PCR and MALDI-TOF in the detection of nontuberculous mycobacteria from clinical isolates. *Tuberculosis*. 2020;125:101988.
- 4 Alcaide F, Amlerová J, Bou G, Ceysens PJ, Coll P, Corcoran D, Fangous MS, González-Álvarez I, Gorton R, Greub G, Hery-Arnaud G. How to: identify non-tuberculous Mycobacterium species using MALDI-TOF mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*. 2018;24:599-603.
- 5 Jia Khor M, Broda A, Kostrzewa M, Drobniewski F, Larrouy-Maumus G. An improved method for rapid detection of Mycobacterium abscessus complex based on species-specific lipid fingerprint by routine MALDI-TOF. *Frontiers in Chemistry*. 2021;9:715890.
- 6 Samper S, González-Martin J. Microbiological diagnosis of infections caused by the genus Mycobacterium. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (English ed.)*. 2018;36:104-111.
- 7 Mediavilla-Gradolph MC, Toro-Peinado D, Bermúdez-Ruiz MP, García-Martínez MD, Ortega-Torres M, Montiel Quezel-Guerraz N, Palop-Borrás B. Use of MALDI-TOF MS for identification of nontuberculous Mycobacterium species isolated from clinical specimens. *BioMed Research International*. 2015 Oct;2015.
- 8 Wang CH, Putri DU, Lee JC, Liao CC, Tsao ST, Hsiao AL, Wu JH, Chen XW, Lee CH, Tsai IL. Biosafety and proteome profiles of different heat inactivation methods for *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology spectrum*. 2021;9:e00716-21.
- 9 Pranada AB, Schwarz G, Kostrzewa M. MALDI Biotyping for microorganism identification in clinical microbiology. *Advances in MALDI and laser-induced soft ionization mass spectrometry*. 2016:197-225.
- 10 O'Connor JA, Lynch-Healy M, Corcoran D, O'Reilly B, O'Mahony J, Lucey B. Improved matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)-based identification of *Mycobacterium* spp. by use of a novel two-step cell disruption preparatory technique. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016;54:495.
- 11 Ceysens PJ, Soetaert K, Timke M, Van den Bossche A, Sparbier K, De Cremer K, Kostrzewa M, Hendrickx M, Mathys V. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for combined species identification and drug sensitivity testing in mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017;55:624-634.
- 12 Rodríguez-Sánchez B, Ruiz-Serrano MJ, Marín M, Lopez Roa P, Rodríguez-Crèixems M, Bouza E. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of nontuberculous mycobacteria from clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015;53:2737-2740.
- 13 Leyer C, Gregorowicz G, Mougari F, Raskine L, Cambau E, de Briel D. Comparison of Saramis 4.12 and IVD 3.0 Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of mycobacteria from solid and liquid culture media. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017; 55:2045-2054.
- 14 Balada-Llasat JM, Kamboj K, Pancholi P. Identification of mycobacteria from solid and liquid media by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;5:2875-2879.
- 15 Rodríguez-Sánchez B, Ruiz-Serrano MJ, Ruiz A, Timke M, Kostrzewa M, Bouza E. Evaluation of MALDI Biotyper Mycobacteria Library v3. 0 for identification of nontuberculous mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016;54:1144-1147.
- 16 Martiny D, Busson L, Wybo I, El Haj RA, Dediste A, Vandenberg O. Comparison of the Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;50:1313-1325.
- 17 Rodríguez-Temporal D, Rodríguez-Sánchez B, Alcaide F. Evaluation of MALDI biotyper interpretation criteria for accurate identification of nontuberculous mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 2020;58:100-128.
- 18 Song J, Yoon S, In Y, Kim D, Lee H, Yong D, Lee K. Substantial improvement in nontuberculous mycobacterial identification using ASTA MicroIDSys matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry with an upgraded database. *Annals of Laboratory Medicine*. 2022;42:358-362.
- 19 Buckwalter SP, Olson SL, Connelly BJ, Lucas BC, Rodning AA, Walchak RC, Deml SM, Wohlfiel SL, Wengenack NL. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of Mycobacterium species, Nocardia species, and other aerobic Actinomycetes. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016;54:376-384.

- 20 Girard V, Mailler S, Welker M, Arsac M, Cellière B, Cotte-Pattat PJ, Chatellier S, Durand G, Béni AM, Schrenzel J, Miller E. Identification of *Mycobacterium* spp. and *Nocardia* spp. from solid and liquid cultures by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2016;86:277-283.
- 21 Van Belkum A, Welker M, Pincus D, Charrier JP, Girard V. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical microbiology: what are the current issues? *Annals of Laboratory Medicine*. 2017;37:475.
- 22 Lorente-Leal V, Liandris E, Bezos J, Pérez-Sancho M, Romero B, Juan LD. MALDI-TOF mass spectrometry as a rapid screening alternative for non-tuberculous mycobacterial species identification in the veterinary laboratory. *Frontiers in Veterinary Science*. 2022; 9: 827702.
- 23 Sax H, Bloemberg G, Hasse B, Sommerstein R, Kohler P, Achermann Y, Rössle M, Falk V, Kuster SP, Böttger EC, Weber R. Prolonged outbreak of *Mycobacterium chimaera* infection after open-chest heart surgery. *Clinical Infectious Diseases*. 2015;61:67-75.
- 24 Kasperbauer SH, Daley CL. *Mycobacterium chimaera* infections related to the heater–cooler unit outbreak: a guide to diagnosis and management. *Clinical Infectious Diseases*. 2019;68:1244-1250.
- 25 Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland SM, Horsburgh R, Huitt G, Iademarco MF, Iseman M. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of Nontuberculous Mycobacterial diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2007;175:367-416.
- 26 Falkinham JO. Current epidemiologic trends of the nontuberculous mycobacteria (NTM). *Current Environmental Health Reports*. 2016;3:161-167.
- 27 Pranada AB, Witt E, Bienia M, Kostrzewa M, Timke M. Accurate differentiation of *Mycobacterium chimaera* from *Mycobacterium intracellulare* by MALDI-TOF MS analysis. *Journal of Medical Microbiology*. 2017;66:670-677.
- 28 Epperson LE, Timke M, Hasan NA, Godo P, Durbin D, Helstrom NK, Shi G, Kostrzewa M, Strong M, Salfinger M. Evaluation of a novel MALDI biotyper algorithm to distinguish *Mycobacterium intracellulare* from *Mycobacterium chimaera*. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9:3140.
- 29 Jackson M. The mycobacterial cell envelope—lipids. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2014; 4(10).
- 30 Marrakchi H, Lanéelle MA, Daffé M. Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond. *Chemistry & Biology*. 2014;21:67-85.
- 31 Song SH, Park KU, Lee JH, Kim EC, Kim JQ, Song J. Electrospray ionization-tandem mass spectrometry analysis of the mycolic acid profiles for the identification of common clinical isolates of mycobacterial species. *Journal of Microbiological Methods*. 2009; 77:165-177.
- 32 Layre E, Cala-De Paepé D, Larrouy-Maumus G, Vau-bourgeix J, Mundayoor S, Lindner B, Puzo G, Gille-ron M. Deciphering sulfoglycolipids of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Lipid Research*. 2011;52:1098-1110.
- 33 Burbaud S, Laval F, Lemassu A, Daffé M, Guilhot C, Chalut C. Trehalose polyphleates are produced by a glycolipid biosynthetic pathway conserved across phylogenetically distant mycobacteria. *Cell Chemical Biology*. 2016;23:278-289.
- 34 Larrouy-Maumus G, Puzo G. Mycobacterial envelope lipids fingerprint from direct MALDI-TOF MS analysis of intact bacilli. *Tuberculosis*. 2015;95:75-85.
- 35 Larrouy-Maumus G, Clements A, Filloux A, McCarthy RR, Mostowy S. Direct detection of lipid A on intact Gram-negative bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*. 2016;120:68-71.
- 36 Schiller J, Süß R, Fuchs B, Müller M, Petković M, Zschörnig O, Waschipky H. The suitability of different DHB isomers as matrices for the MALDI-TOF MS analysis of phospholipids: which isomer for what purpose? *European Biophysics Journal*. 2007;36:517-527.
- 37 Gonzalo X, Broda A, Drobniowski F, Larrouy-Maumus G. Performance of lipid fingerprint-based MALDI-ToF for the diagnosis of mycobacterial infections. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021; 27:912-e1.
- 38 Solntceva V, Kostrzewa M, Larrouy-Maumus G. Detection of species-specific lipids by routine MALDI TOF mass spectrometry to unlock the challenges of microbial identification and antimicrobial susceptibility testing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021;10:621452.





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



Interleukin-17 and Immunity of Ocular infections

Israa Asaad Aziz,^{1,2} Marwan Y. Al-Maqtoufi,² Ahmed A. Burghal²

¹Basrah Teaching Hospital, Basrah Health Department, Ministry of Health, Basrah, Iraq.

²Department of Biology, College of Science, University of Basrah, Basrah, 61004, Iraq.

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.10203266>



Summary

The field of Interleukin-17 (IL-17) biology has received more attention during the last decade for evaluating the role of this cytokine to enhance the host defence against microbial infections. IL-17 is essential in controlling microbial colonization through the expeditious innate immune response to pathogens which involves the recruitment of neutrophils and the induction of antimicrobial peptides. IL-17 is synthesized by cell populations predominantly present within epithelial barriers, including specific subsets of Th17 cells and innate lymphoid cells. In

this review, we highlight both bacterial and fungal infections in human eyes and the role of IL-17 in host defence in addition to the benefit of using IL-17 for immunotherapy.



Key words

IL-17, bacteria, fungi, immune, innate immunity, adaptive immunity, ocular, eye, immunotherapy

Corresponding author

Marwan Y. Al-Maqtoofi

Department of Biology,

College of Science,

University of Basrah, Basrah, 61004, Iraq

Email: marwan.almaqtoofi@uobasrah.edu.iq

Introduction

The human eyes are valuable organs that are exposed to the external environment. For this reason, they are susceptible to ocular infections caused by various microorganisms worldwide. Infections can be by single or multiple pathogens that are associated with many factors including using contact lenses, immune system states, dry eye state, surgery, trauma, chronic nasolacrimal duct obstruction, age, and previous ocular infections.^{1,2} Generally, bacteria, followed by viruses and fungi are involved in ocular infections. Bacteria are associated with many types of eye infections including keratitis, dacryocystitis, blepharitis, endophthalmitis, orbital cellulitis and conjunctivitis.³ Fungi are widespread eukaryotic, unicellular or multicellular, and commonly associated with food spoilage. Many of these organisms are the primary source of carcinogenic mycotoxins, which can effect significantly human health.⁴ There is a growing occurrence of opportunistic fungal infections among immunocompromised, including individuals with neutropenia, haematological malignancies, and those who have undergone bone marrow transplantation.^{5,6} Eye infections caused by fungi are rare, but they can cause severe infections. Fungal infections can affect different parts of the human eye. Previous reports showed a direct association of opportunistic fungi with keratitis due to eye injury or using contaminated contact lenses.⁷ Infected eyes if left untreated, can lead to a potentially blinding disease and in advance cases surgery for removing infected eyes as what happened in Sin-

gapore and the USA in 2006. Clinical symptoms of fungal eye infections can appear for several days to several weeks after fungal elements invasion. Generally, clinical symptoms of ocular infections by opportunistic fungi are similar to those of other microbial infections. For this reason, diagnosis and detection of the source of ocular infections are seriously critical without a precise and accurate identification test. The identification of clinical specimens can be achieved using conventional methods such as mycological culture and direct microscopic examination, as well as non-culture-based methods such as nucleic acid-based techniques and monoclonal antibodies. Treatment and management of emerging fungal infections are critical due to the spread of multidrug-resistant fungi. For this reason, despite developing new drugs, controlling fungal infections remain difficult in many cases. Meanwhile, compared to antibacterial antibiotics, antifungals have a lower efficacy due to their mechanism of action. Fungi are eukaryotes, so one has to take into account the side effects of antifungals on human tissues; therefore there is a limitation in considering fungal infections and treatment. Co-infections or poly-infections is a term used to describe the involvement of two or more than one microbial isolate including different species of bacteria or fungi or even bacteria and fungi at the same ocular site. This kind of infection can affect one or both eyes. Studies showed an increasing trend of co-infections. Eye co-infections are considered a serious challenge for ophthalmologists due to the difficulty to diagnose as bacterial eye infections mimic fungal infections.⁸ Patients with ocular co-infections

present similar clinical symptoms such as ocular discharge, visual symptoms or a red or painful eye in case of bacterial and fungal infections. The immune system plays a key role in the human body's protection against microbial invasion. For this reason, the immune response within ocular sites protects eyes from infection and regulates healing processes following injuries. Within the eye microenvironment, the immune system expresses a response toward infections through immunosuppression and anti-inflammatory actions via ocular resident cells/tissues. Since the eye has limited regenerative properties, microbial infection and inflammation can lead to devastating health consequences. Thus, human eyes possess extraordinary features for immune-mediated inflammation reduction. This phenomenon is known as an immune privilege that has a pivotal role in ocular protection.⁹ Interleukin-17A (IL-17A) is one of a family (IL-17B, C, D, E and F) that plays a central role in the control of microbial infections and mediate protective innate immunity to pathogens. IL-17A links T-cell activation to neutrophil mobilization and activation. For this reason, IL-17A is a pro-inflammatory cytokine, which was described fairly recently in 1995, that contributes to the pathogenesis of several inflammatory diseases.¹⁰ The bioactivity of IL-17A has received immunological attention over the last few years due to their association with bacterial and fungal infections, psoriasis and other autoinflammatory disorders.^{11,12} In addition, disorders in IL-17A regulation can lead to ocular diseases such as dry eye disease (DED) and infectious keratitis.

Microbial Eye Infections

The human eyes are very delicate and value sensory systems, serving as a primary source of information about the external environment. Humans heavily rely on vision as their predominant sense, making the eye the most delicate and perceptive organ within the human body.¹³ Ocular infections can lead to impairments in visual which resulting in a major sight-threatening consequences such as keratitis and conjunctivitis.¹⁴ Frequently, microorganisms involved in eye infections are bacteria, followed by viruses and fungi. Pathogenic bacteria are the primary agents responsible for conjunctivitis. Bacteria infect the ocular surface, specifically the mucous membrane of the conjunctiva. However, it is colonization population is regulated by the tears' lysosomes and humoral secretions such antibodies, as well as the protective mechanism of blinking.¹⁵ Accurate and rapid diagnosis of microbial keratitis is needed for managing treatment and preventing a potentially vision-threatening risk.

Bacteria associated with eye infections

Bacteria typically target the external surface of the eye for colonization, while the internal parts of the ocular cavity remain sterile. In terms of immunology, the eye surface has multiple protective barriers that effectively prevent the occurrence of eye infections. Normally, the conjunctiva contains mostly antibodies, complement proteins, lysozyme, C-reactive protein, fibronectin, and transferrin that related to innate immunity. These components collectively contribute to the defence against bacterial pathogens. However, if any of the epithelium's ocular surface is compromised due to trauma or a decrease in local or systemic immune responses, eyes become more susceptible to microbial infections such as bacterial invasion.¹⁶ Bacterial pathogens have been implicated in a spectrum of ocular surface infections, including conjunctivitis, scleritis, keratitis, blepharitis, canaliculitis, and dacryocystitis. Moreover, these bacteria can also cause more severe infections that extend to deeper ocular tissues, such as orbital cellulitis, preseptal cellulitis, necrotizing fasciitis, as well as intraocular infections like uveitis and endophthalmitis.¹⁷

Antibacterial treatment for eye infections

Bacterial infections of the eye are common, and ophthalmologists have a wide choice of antibiotic treatments comparing with other microbial infections. There are many ways of delivering antibiotics into the eye including subconjunctival injection, topical administration, subtenon injection, and intraocular injection. Ophthalmologists have a wide range of commercially eye antibiotics such in many different pharmaceutical formula including drops, cream and ointment that enables the achievement of elevated antibiotic concentrations for ocular tissues therapy.¹⁸

Fungal associated with eye infections

Ocular fungal infections are extremely rare. However, these kinds of infections can cause serious health consequences. Opportunistic fungi can affect different locations of the eyes. For example, keratitis is front layer of the eye, the cornea, that easily infected by fungal elements. These kind of infections occurs as a result of eye injury or bad usage of contact lenses.¹⁹ Inflammation of eyes is called endophthalmitis that can be exogenous, when associated with direct fungal spores invasion,²⁰ and endogenous, when fungal elements spreads to one or both eyes from another primal body source.²¹ Fungal infections are frequently associated with trauma as significant contributing agents. Fungal eye infection symptoms can occur after a few days to several weeks. These symptoms mimic bacterial eye infections including eye redness, eye pain, blurring in vi-



sion, tearing, and eye discharge.²² Comparing with other pathogenic fungi, species related to the genus of *Fusarium*, *Aspergillus* and *Candida* are the most common opportunistic fungal agent causing ocular infections to human.²³ Routine laboratory techniques such as culturing and direct microscopic examination remain classical approaches for detection of fungal elements during ocular samples testing and permits a rapid presumptive diagnosis. Serological and molecular approaches have been widely used in recent years.²⁴

Antifungal treatment for eye infections

Since the initial documentation of fungal keratitis, there has been an upward trend in the incidence of this condition. Compared to antibacterial drugs, antifungal agents have a lower efficacy due to lower tissue penetration.²⁵ Generally, amphotericin B, nystatin and natamycin are the most frequently used antifungals. There is a limited use of nystatin due to its toxicity and low rate of tissue penetration for treatment of opportunistic fungal keratitis compared to amphotericin B and natamycin.^{26,27}

Antifungal resistance to eye infection

Resistance to common antifungal drugs by pathogenic fungi is a risky point. Fungal cells can develop mechanisms for resistance to antifungal drugs resulting in expanding fungal infections and complicating their treatment. Because of the genetic inherent resistance of some fungi, certain antifungal treatment might ineffective in treating fungal infections. For example, *Aspergillus* exhibited a notable fluconazole resistance.²⁸ Due to too low dosage of antifungal drugs or when treatment courses are not long enough, fungi have a chance to develop resistance to antifungal agents over time.²⁹⁻³¹

Eye Coinfections

In developing countries, corneal blindness following cataracts is primarily attributed to ocular infections caused by bacteria, viruses, and fungi.³² However, an escalating incidence of co-infections, wherein two or more pathogens coexist in the same ocular environment, affecting either one or both eyes, has been increasingly documented. In contrast to single-microorganism infections, which lack competitive dynamics in theory, co-infections have been demonstrated to engage multiple mechanisms that compete for host resources. This competitive interplay constitutes a pivotal factor that significantly influences the clinical trajectory and progression of the infection.³³ Clinical presentations of eye co-infections mimic different clinical

cases resulting in a serious diagnostic challenge for ophthalmologists. This challenge affects directly patients through receiving multiple treatments instead of a specific treatment.³⁴ Among immunocompetent patients, eye infections are common particularly co-infection due to impaired the immune system.³⁵ Bacteria and fungi are the most frequent clinical entities causing eye co-infection.

Bacteria and Fungi of Eye Infections

Bacterial and fungal co-infections constitute the most prevalent type of ocular co-infection. *Staphylococcus* spp., followed by *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp., *Bacillus* spp., and species related to *Haemophilus* are main bacterial causative agents. Meanwhile, the species belong to *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, followed by *Curvularia*, *Alternaria*, *Cladosporium*, and *Bipolaris*, represent the genera of opportunistic fungal pathogens that are associated to ocular infections.³⁶ Co-infections of bacteria and fungus are more likely to be between the species related to the genus *Staphylococcus* and *Aspergillus* or *Fusarium* resulting in serious clinical symptoms.^{35,37-40} To distinguish between bacterial and fungal keratitis based on clinical presentation is considered a serious challenge, as the characteristic symptoms of each infection may be overridden by mixed microbial infections.⁴¹

Immune System

Immune tissue, cells, and organs work together to form the immune system for protecting the body against harmful microbial pathogens, such as bacteria, viruses and fungi. Cellular defence mechanisms of the immune system involve various immune cells, such as specific killer T cells (T-cells), natural killer cells (NK), polymorphonuclear leukocytes, and macrophages that directly target pathogenic cells. Additionally, signalling networks via cytokines, humoral immunity affects cellular immunity through producing a range of immune mediators such as antibodies, cytokines, chemokines, and complement proteins to enhance immune protection against foreign invaders.⁴² Altogether, the immune system parts help to recognize and eliminate the infectious agents causing the inflammation. Keratitis due to bacteria or fungi triggers the immune response to combat the invading microbial elements.

The Ocular Immune Response

The ocular surface is normally protected from mi-

crobes physically by a mucosal layer. The ocular immune response refers to the specialized immune mechanisms protecting the eyes from microbial infections. However, lymph vessels are missing in the interior of the ocular structure.⁴³ The eye components in nature have immunosuppressive and anti-inflammatory effects. The immunosuppressive activity exhibited by resident cells in the eye is commonly known as immune privilege, and it serves a critical function in preventing significant damage caused by infiltrating inflammatory cells, which can result in vision loss. The eye employs a wide range of mechanisms to regulate innate and adaptive immune cells, thus effectively mitigating the risk of blindness associated with intraocular inflammation.^{44,45} Several immunosuppressive mechanisms have been identified thus far, which are attributed to the microenvironment within the eye. These mechanisms encompass ocular fluids, the blood-retina barriers, and resident parenchymal cells present in the eye. In order to safeguard the continuity of vision from two main domains: physical and immunological factors, intricate networks of neurons and immune components collaborate. It is worth noting that this complex interplay occurs within the context of the presence of microorganisms, whether they establish long-term residence in the ocular mucosa or are transient visitors introduced from the external environment, which have the potential to induce modifications in this delicate balance.⁴⁶

The Eye and Immune Privilege

The immune privilege of the eyes is a unique state of anatomical, physiological, and immunoregulatory processes within the ocular tissues to protect eye and sight. This phenomenon allows eyes maintenance and immunological tolerance through restriction of the over-expression of inflammatory immune response.⁹ The eyes' local immune components include macrophages and dendritic cells, as well as immunoglobulins, complement proteins. The immune privilege is a unique immune mechanism within eyes that prevents excessive immune responses and thus prevents the potentially eye-destroying consequences of unregulated inflammation.^{42,47}

Interleukin-17 in Antifungal Immunity

In 1993, interleukin 17A (IL-17A), was first discovered.⁴⁸ From mouse EL4 thymoma cells, receptor of IL-17A was first cloned and identified in 1995.^{49,50} IL-17 level increases in cases of inflammation and autoim-

mune diseases indicating to association with human immune disease.^{51,52} T helper 17 (Th17) cells is a subset of cluster differentiation 4⁺ (CD4⁺) which are the main IL-17 producers.⁵³ Later on, CD8⁺ cells (Tc17), natural killer-T cells (NKT), $\gamma\delta$ T cells, group 3 innate lymphoid cells (ILC3s), neutrophils and microglia were reported as sources of IL-17 production.^{54,55} Meanwhile, IL-17 has an ability to stimulate the production of antimicrobial peptides (AMPs) such as cathelicidins and defensins, that exhibit direct antifungal bioactivity.⁵⁶ Also, IL-17 can induce secretion of pro-inflammatory cytokines, IL-1 β , TNF- α and IL-6 which contribute to the elimination of fungal pathogens,⁵⁷ resulting in enhancing phagocytosis via macrophages and neutrophils to intracellular fungal elements.⁵⁸ Meanwhile, eye-colonizing by commensal induced the recruitment of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells to the conjunctiva where they play a direct role in enhancing the neutrophil recruitment and the release of antimicrobials into the tears and protected the eye from pathogenic microbial infection.⁵⁹ Therefore, congenital defects in the IL-17 pathway induce opportunistic fungal pathogens such as *Candida albicans* for causing infections.⁶⁰ Studies indicated high production of L-17 by peripheral blood neutrophils in patients with fungal keratitis due to high levels of airborne *Aspergillus* and *Fusarium* conidia.⁶¹ This also indicates the vital role of IL-17 in protection and fungal ocular infections.

IL-17 Immunity in Health and Disease

IL-17 plays a crucial role in protection against various pathogens including bacterial and fungal infections, in addition to diseases, inflammatory autoimmune disorders, and cancer.⁶² Recently, over the last years, IL-17 has attracted attention in the context of immunology and as an immunotherapeutic agent.⁶³ IL-17 plays a vital role in maintaining the equilibrium between the host and the microbiota in barrier tissues under normal conditions. This cytokine coordinates an effective mechanism within the epithelium, preventing disruptions in microbial composition and uncontrolled microbial cell proliferation.^{64,65} However, considering anti-IL-17 therapy is a critical, as it has the potential to disturb microbial cells and increase the risk of opportunistic infections.^{66,67} Overexpression of IL-17 may lead to dry eye-induced corneal damage and goblet cell loss in this case anti-IL-17 treatment strongly recommended.⁶⁸ For example, monoclonal antibodies, are already available to inhibit the IL17 pathway (such as ixekizumab, brodalumab, or secukinumab).⁶⁹



Conclusions

In general, ocular co-infections caused by bacterial and fungal pathogens are most common in immunocompromised individuals due to a weakened immune system. Eye immune privilege is a unique state of immunity against microbial invaders. IL-17 plays an important role in triggering the immune response against microbial pathogens and, in particular, pathogenic fungi.

Conflict of Interest

Authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

Authors thank the Ministry of Higher Education and Scientific Research, Iraq and University of Basrah, College of Science, Department of Biology for their funding and support.



Περίληψη

Interleukin-17 and Immunity of Ocular infections

236

Israa Asaad Aziz,^{1,2} Marwan Y. Al-Maqtoofi,^{2*} Ahmed A. Burghal²

¹Basrah Teaching Hospital, Basrah Health Department, Ministry of Health, Basrah, Iraq.

²Department of Biology, College of Science, University of Basrah, Basrah, 61004, Iraq.

*Corresponding author

Το πεδίο έρευνας αναφορικά με τη βιολογία της Ιντερλευκίνης-17 (IL-17) έχει λάβει μεγάλη προσοχή κατά την τελευταία δεκαετία για την αξιολόγηση του ρόλου της στην ενίσχυση της άμυνας του ξενιστή έναντι μικροβιακών λοιμώξεων. Η IL-17 είναι απαραίτητη για τον έλεγχο του μικροβιακού αποικισμού μέσω της ταχείας φυσικής ανοσοαπόκρισης σε παθογόνα που περιλαμβάνει τη στρατολόγηση ουδετερόφιλων και την επαγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων. Η IL-17 συντίθεται από πληθυσμούς κυττάρων που υπάρχουν κυρίως εντός επιθηλιακών φραγμών, συμπεριλαμβανομένων συγκεκριμένων υποομάδων κυττάρων Th17 και εγγενών λεμφοειδών κυττάρων. Στην παρούσα ανασκόπηση επισημαίνονται τόσο οι βακτηριακές όσο και οι μυκητιασικές λοιμώξεις των οφθαλμών και ο ρόλος της IL-17 στην άμυνα του ξενιστή, και επιπλέον τα οφέλη από τη χρήση της IL-17 ως ανοσοθεραπεία.



Λέξεις κλειδιά

IL-17, βακτήρια, μύκητες, ανοσοποιητικό, φυσική ανοσία, επίκτητη ανοσία, οφθαλμός, ανοσοθεραπεία

References

- Callegan MC, Engelbert M, Parke DW, Jett BD, Gilmore MS. Bacterial endophthalmitis: Epidemiology, therapeutics, and bacterium-host interactions. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:111–124
- Hanet M-S, Jamart J, & Chaves AP. Fluoroquinolones or fortified antibiotics for treating bacterial keratitis: Systematic review and meta-analysis of comparative studies. *Can J Ophthalmol* 2012; 47:493–499.
- Bertino JS. Impact of antibiotic resistance in the management of ocular infections: The role of current and future antibiotics. *Clin Ophthalmol* 2009; 3:507–521.
- Pitt JI, Hocking AD. *Fungi and food spoilage*. 2009. Springer.
- Kauffman CA, Pappas PG, Sobel JD, Dismukes WE. *Essentials of Clinical Mycology* (2nd ed.). 2011. Springer
- Moore D, Robson GD, Trinci AP. *21st Century Guidebook to Fungi* with CD. 2011. Cambridge University Press.
- Phan CM, Subbaraman L, Jones L. Contact lenses for antifungal ocular drug delivery: A review. *Expert Opin Drug Deliv* 2014; 11:537–546.
- Abouzeid AI, Eissa SAE, Aboelnour AE, Awad AMR. Bacterial and fungal causes of infectious keratitis among patients attending Research Institute of Ophthalmology. *Bull Nat Res Centre* 2020; 44:72.
- Niederhorn JY. The Eye Sees Eye to Eye With the Immune System: The 2019 Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 2019; 60:4489–4495.
- Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11:763–776.
- McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL. The IL-17 family of cytokines in health and disease. *Immunity* 2019; 50:892.
- Sparber F, LeibundGut-Landmann S. Interleukin-17 in Antifungal Immunity. *Pathogens* 2019; 8:54
- Lee SK. The History of Neuroscience 2: From the Roman Empire to the Renaissance. *Epilepsia: Epilepsy Commu* 2020; 2:1–7.
- Modarres S, Lasheii A, Oskoi NN. Bacterial etiologic agents of ocular infection in children in the Islamic Republic of Iran. *EMHJ*. 1998;4:44–49.
- Hori Y, Nakazawa T, Maeda N, Sakamoto M, Yokokura S, Kubota A, et al. Susceptibility comparisons of normal preoperative conjunctival bacteria to fluoroquinolones. *J Cataract Refract Surg* 2009; 35:475–479.
- Teweldemedhin M, Gebreyesus H, Atsbaha AH, Asgedom SW, Saravanan M. Bacterial profile of ocular infections: A systematic review. *BMC Ophthalmol* 2017; 17:212.
- Ayehubizu Z, Mulu W, Biadlegne F. Common bacterial causes of external ocular infections, associated risk factors and antibiotic resistance among patients at ophthalmology unit of Felege Hiwot Referral Hospital, Northwest Ethiopia: A cross-sectional study. *J Ophthal Inflamm Infect* 2021; 11:7.
- Fintelmann RE, Hoskins EN, Lietman TM, Keenan JD, Gaynor BD, Cevallos V, et al. Topical Fluoroquinolone Use as a Risk Factor for In Vitro Fluoroquinolone Resistance in Ocular Cultures. *Arch Ophthalmol* 2011; 129:399–402.
- Garg P, Roy A, Roy S. Update on fungal keratitis. *Curr Opin Ophthalmol*, 2016; 27:333–339.
- Wykoff CC, Flynn HW, Miller D, Scott IU, Alfonso EC. Exogenous fungal endophthalmitis: Microbiology and clinical outcomes. *Ophthalmology* 2008; 115:1501–1507.
- Durand ML. Bacterial and Fungal Endophthalmitis. *Clin Microbiol Rev* 2017; 30:597–613.
- Kalkanci A. Microbiological Diagnosis of Fungal Keratitis. In *Mycotic Keratitis*. 2019 CRC Press.
- Rammohan R, Suneetha V, Sen S, Gunasekaran R, Lalitha P. Fungal Infections of the Eye. *Curr Clin Microbiol Rep* 2020; 7:39-50.
- Kavanagh K. *New Insights in Medical Mycology*. 2007 <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6397-8>.
- Müller GG, Kara-José N, de Castro RS. Antifúngicos em infecções oculares: Drogas e vias de administração. *Rev Bras Oftalmol* 2012; 72:132–141.
- FlorCruz NV, Evans JR. Medical interventions for fungal keratitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2015; 4:CD004241.
- De Oliveira PR, Resende SM, de Oliveira FC, de Oliveira AC. Ceratite fúngica. *Arq Bras Oftalmol* 2001; 64:75–79.
- Leonardelli F, Macedo D, Dudiuk C, Cabeza MS, Gamarra S, Garcia-Effron G. *Aspergillus fumigatus* Intrinsic Fluconazole Resistance Is Due to the Naturally Occurring T301I Substitution in Cyp51A. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60:5420–5426.
- Chaabane F, Graf A, Jequier L, Coste AT. Review on Antifungal Resistance Mechanisms in the Emerging Pathogen *Candida auris*. *Front Microbiol* 2019; 10:2788
- Cowen LE, Sanglard D, Howard SJ, Rogers PD, Perlin DS. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; 5:a019752.
- Martinez-Rossi NM, Bitencourt TA, Peres NTA, Lang EAS, Gomes EV, Quaresimin NR, et al. Dermatophyte Resistance to Antifungal Drugs: Mechanisms and Prospectus. *Front Microbiol* 2018; 9:1108
- Ung L, Bispo PJM, Shanbhag SS, Gilmore MS, Cho-



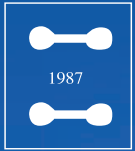
- dosh J. The persistent dilemma of microbial keratitis: global burden, diagnosis, and antimicrobial resistance. *Surv Ophthalmol* 2019; 64:255-271.
33. Birger RB, Kouyos RD, Cohen T, Griffiths EC, Huijben S, Mina MJ, *et al.* The potential impact of coinfection on antimicrobial chemotherapy and drug resistance. *Trends Microbiol* 2015;23:537-544.
 34. Jindal A, Moreker MR, Pathengay A, Khera M, Jalali S, Majji A, *et al.* Polymicrobial endophthalmitis: Prevalence, causative organisms, and visual outcomes. *J Ophthalmic Inflamm Infect* 2013; 3:6.
 35. Frey-Klett P, Burlinson P, Deveau A, Barret M, Tarkka M, Sarniguet A. Bacterial-fungal interactions: Hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. *Microbiol Mol Biol Rev* 2011; 75:583-609.
 36. Huang Y, Yang B, Li W. Defining the normal core microbiome of conjunctival microbial communities. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22:643.e7-643.e12.
 37. Basak SK, Basak S, Mohanta A, Bhowmick A. Epidemiological and microbiological diagnosis of suppurative keratitis in Gangetic West Bengal, eastern India. *Indian J Ophthalmol* 2005; 53:17-22.
 38. Bharathi MJ, Ramakrishnan R, Vasu S, Meenakshi, Palaniappan R. Aetiological diagnosis of microbial keratitis in South India—A study of 1618 cases. *Indian J Med Microbiol* 2002; 20:19-24.
 39. Gopinathan U, Sharma S, Garg P, Rao GN. Review of epidemiological features, microbiological diagnosis and treatment outcome of microbial keratitis: Experience of over a decade. *Indian J Ophthalmol* 2009; 57:273-279.
 40. Lim NCS, Lim DKA, Ray M. Polymicrobial versus monomicrobial keratitis: A retrospective comparative study. *Eye Contact Lens* 2013; 39:348-354.
 41. Brand A, Barnes JD, Mackenzie KS, Odds FC, Gow NAR. Cell wall glycans and soluble factors determine the interactions between the hyphae of *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Letters*. 2008;287:48-55.
 42. Stepp MA, Menko AS. Immune responses to injury and their links to eye disease. *J Lab Clin Med* 2021; 236:52-71.
 43. McMenamin PG. The distribution of immune cells in the uveal tract of the normal eye. *Eye* 1997; 11:183-193.
 44. Streilein JW. Ocular immune privilege: Therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nat Rev Immunol* 2003 3:879-889.
 45. Streilein JW, Ma N, Wenkel H, Ng TF, Zamiri P. Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. *Vision Res* 2002; 42:487-495.
 46. de Paiva CS., St. Leger AJ., Caspi RR. Mucosal immunology of the ocular surface. *Mucosal Immunol* 2022; 15:1143-1157
 47. Taylor AW. Ocular Immune Privilege and Transplantation. *Front Immunol* 2016; 7:37
 48. Rouvier E, Luciani MF, Mattéi MG, Denizot F, Golstein P. CTLA-8, Cloned from an Activated T Cell, Bearing AU-Rich Messenger RNA Instability Sequences, and Homologous to a Herpesvirus Saimiri Gene. *J Immunol* 1993; 150:5445-5456.
 49. Gaffen SL. Life before Seventeen: Cloning of the IL-17 Receptor. *J Immunol* 2011; 187:4389-4391.
 50. Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, Rousseau A-M, Painter SL, Comeau MR, *et al.* Herpesvirus saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *J Immunol* 2011; 187:4392-4402.
 51. Luzza F, Parrello T, Monteleone G, Sebkova L, Romano M, Zarrilli R, *et al.* Up-regulation of IL-17 is associated with bioactive IL-8 expression in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *J Immunol* 2000; 165:5332-5337.
 52. Prinz I, Sandrock I, Mrowietz U. Interleukin-17 cytokines: Effectors and targets in psoriasis—A breakthrough in understanding and treatment. *J Exp Med*. 2020; 217:e20191397.
 53. Stadhouders R, Lubberts E, Hendriks RW. A cellular and molecular view of T helper 17 cell plasticity in autoimmunity. *J Autoimmun* 2018; 87:1-15.
 54. Chen F, Cao A, Yao S, Evans-Marin HL, Liu H, Wu W, *et al.* mTOR Mediates IL-23 Induction of Neutrophil IL-17 and IL-22 Production. *J Immunol* 2016; 196:4390-4399.
 55. Tamassia N, Arruda-Silva F, Calzetti F, Lonardi S, Gasperini S, Gardiman E, *et al.* A Reappraisal on the Potential Ability of Human Neutrophils to Express and Produce IL-17 Family Members In Vitro: Failure to Reproducibly Detect It. *Front Immunol* 2018; 9:795.
 56. Archer NK, Adappa ND, Palmer JN, Cohen NA, Harro JM, Lee SK, *et al.* Interleukin-17A (IL-17A) and IL-17F Are Critical for Antimicrobial Peptide Production and Clearance of *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization. *Infect Immun* 2016; 84:3575-3583.
 57. Huang J, Meng S, Hong S, Lin X, Jin W, Dong C. IL-17C is required for lethal inflammation during systemic fungal infection. *Cel Mol Immunol* 2016; 13:474-483.
 58. Sawada Y, Setoyama A, Sakuragi Y, Saito-Sasaki N, Yoshioka H, Nakamura M. The Role of IL-17-Producing Cells in Cutaneous Fungal Infections. *Int J Mol Sci* 2021;22:5794.
 59. Leger AJS, Desai JV, Drummond RA, Kugadas A, Almaghrabi F, Silver P, *et al.* An Ocular Commensal Protects against Corneal Infection by Driving an Interleukin-17 Response from Mucosal $\gamma\delta$ T Cells. *Immunity* 2017; 47:148-158.e5.
 60. Puel A, Cypowij S, Maródi L, Abel L, Picard C, Casanova J-L. Inborn errors of human IL-17 immunity underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012; 12:616-622.

61. Karthikeyan RS, Vareechon C, Prajna NV, Dharmalingam K, Pearlman E, Lalitha, P. Interleukin 17 Expression in Peripheral Blood Neutrophils From Fungal Keratitis Patients and Healthy Cohorts in Southern India. *J Infect Dis* 2015; 211:130–134.
62. Ge Y, Huang M, Yao Y. Biology of Interleukin-17 and Its Pathophysiological Significance in Sepsis. *Front Immunol* 2020; 11:1558.
63. Bär E, Whitney PG, Moor K, Reis e Sousa C, LeibundGut-Landmann S. IL-17 regulates systemic fungal immunity by controlling the functional competence of NK cells. *Immunity* 2014; 40:117–127.
64. Cui X, Gao N, Me R, Xu J, Yu FX. TSLP Protects Corneas From *Pseudomonas aeruginosa* Infection by Regulating Dendritic Cells and IL-23-IL-17 Pathway. *Investig Ophthalmol Vis Sci*, 2018; 59:4228–4237.
65. Suryawanshi A, Cao Z, Sampson JF, Panjwani N. IL-17A-mediated protection against *Acanthamoeba keratitis*. *J Immunol* 2015; 194:650–663.
66. Kumar P, Monin L, Castillo P, Elsegeiny W, Horne W, Eddens T., *et al.* Intestinal Interleukin-17 Receptor Signaling Mediates Reciprocal Control of the Gut Microbiota and Autoimmune Inflammation. *Immunity* 2016; 44: 659–671.
67. Martínez-López M, Iborra S, Conde-Garrosa R, Mas-trangelo A, Danne C, Mann ER, *et al.* Microbiota Sensing by Mincle-Syk Axis in Dendritic Cells Regulates Interleukin-17 and -22 Production and Promotes Intestinal Barrier Integrity. *Immunity* 2019; 50:446-461.e9.
68. Alam J, Yazdanpanah G, Ratnapriy R, Borcharding N, de Paiva CS, Li D, *et al.* IL-17 Producing Lymphocytes Cause Dry Eye and Corneal Disease With Aging in RXR α Mutant Mouse. *Front Med* 2022; 9:849990.
69. Greigert V, Bittich-Fahmi F, Pfaff AW. Pathophysiology of ocular toxoplasmosis: Facts and open questions. *PLOS Neglect Trop Dis* 2020; 14:e0008905.





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

Genotypic resistance profile of ESBL-producing enterobacterales from wound infections in Salem, India

Sureshkumar Mathavi, Gopal Sree Sadhana, Rao A V Raghavendra, Rajan Reena

Department of Microbiology, Vinayaka Mission's Kirupananda Variyar Medical College & Hospitals, Salem, India.

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.10203286>



Summary

The Extended Spectrum β -lactamases (ESBLs) have been abruptly increasing in hospital and community settings. The present study aimed to detect ESBL producers from wound infections and to determine the associated ESBL genotypes. Gram-negative bacilli obtained from wound infections for a period of one year from November 2020 to October 2021 were included. Isolates with inhibition zone size ≤ 27 mm for Cefotaxime and ≤ 22 mm to Ceftazidime were subjected to phenotypic confirmation by Vitek 2 ID / AST. Extended spectrum β -lactamase genes OXA-10/11, TEM, SHV & CTX-M were detected by Real Time PCR. The CTX-M enzyme was the most common ESBL genotype observed among Enterobacterales in our study. The co-expression of ESBL genes was observed in clinical isolates of *Klebsiella pneumonia* and *Escherichia coli*. CTX-

M & TEM genes were observed in 40% of *E. coli* isolates. All isolates of *E. coli* with CTX-M & TEM genes were susceptible to carbapenems and amikacin. 8.33% of *E. coli* isolates with CTX-M genotype alone were resistant to carbapenems and amikacin. 50% of *K. pneumoniae* isolates with SHV, CTX-M & TEM genes showed resistance to carbapenems, β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations, cefepime and aminoglycosides. In conclusion ESBL associated infections are becoming a public health issue with respect to wide dissemination of ESBL genes and limited therapeutic options.



Key words

wound infections, ESBL Enterobacterales, ESBLs genotypes

Corresponding author

Gopal Sree Sadhana

Post Graduate, Department of Microbiology,

Vinayaka Mission's Kirupananda Variyar

Medical College & Hospitals, Salem, India

Email: sadhu1995@gmail.com, subashstat@gmail.com

Introduction

Enterobacterales have emerged as the most common etiological agent associated with nosocomial and community acquired infection. Extended spectrum β -lactamases (ESBLs) are commonly plasmid encoded β -lactamases that can inactivate narrow and extended spectrum cephalosporins, monobactams and penicillins but are susceptible to inhibition by clavulanic acid.¹ The frequent co-expression of resistance to various classes of antibiotics such as fluoroquinolones, tetracyclines, aminoglycosides and trimethoprim/sulfamethazole limits the wide range of active antimicrobials against ESBL isolates.²

The first plasmid encoded β -lactamase, TEM 1, was described in 1960s after the introduction of first and second generation cephalosporins in clinical practice. The TEM enzyme is found in Enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* and *Neisseria gonorrhoea*.³ With the use of third generation cephalosporins in clinical settings, SHV-2 ESBL type evolved. This type could hydrolyze third generation cephalosporins or oxy-imino cephalosporins. The SHV ESBL type β -lactamases are most often found in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates as well as in other Enterobacterales and *P. aeruginosa*.^{2,3} The inhibitory activity of β -lactam/ β -lactamase inhibitors may vary

depending on the type of inhibitor and ESBL type. Clavulanic acid and tazobactam have been found to be more potent than sulbactam in inhibiting SHV and TEM ESBL types.

The CTX-M β -lactamases hydrolyze cefotaxime and are susceptible to inhibition by clavulanate, sulbactam and tazobactam, even though CTX-M-15 and CTX-M-19 can hydrolyze ceftazidime, which might complicate their phenotypic recognition.^{3,4} Compared to the CTX-M type, TEM and SHV β -lactamases show higher hydrolytic activity for ceftazidime than cefotaxime. The CTX-M variants have been reported among members of Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* species. The community acquired urinary tract infection has been highly associated with CTX-M enzymes.⁴ The OXA β -lactamases are frequently found in *P. aeruginosa* than in members of Enterobacterales. Most OXA ESBL type exhibit resistance to β -lactam inhibitors and are characterised by their high hydrolytic activity against oxacillin and cloxacillin.⁵

Rapid detection and identification of ESBLs are essential to the epidemiology of antibiotic resistant isolates. Molecular detection of ESBL producers helps in rapid diagnosis and obtaining epidemiological information during outbreaks. The detection of ESBL mediated resistance in Gram-negative bacilli is of high importance due to its clinical significance and the lim-

ited therapeutic options.⁶ The emergence of drug resistance in bacteria has made the treatment of the wound infections more difficult and also expensive. The phenotypic confirmatory tests are highly sensitive and specific but there are instances where the phenotypic confirmatory tests fail to detect ESBL phenotypes.⁷ The determination of the predominant ESBL phenotype is necessary for improved therapeutic management of wound infections as well as for strengthening the hospital infection control measures and antibiotic stewardship practices.

Materials & Methods

This prospective cross sectional study was carried out for a period of one year from November 2020 to October 2021. Under strict aseptic conditions, wound swabs were collected from patients with clinically suspected wound infections. Wound swabs were inoculated on blood agar and MacConkey agar and incubated overnight at 37°C.

Isolates were further identified by standard biochemical methods.⁸ All Gram-negative bacilli isolates from wound infections were subjected to antimicrobial susceptibility testing by the Kirby-Bauer disc diffusion method using the following discs (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, India): gentamicin (10µg), amikacin (30µg), cefotaxime (30µg), cefepime (30µg), ceftazidime (30µg), ciprofloxacin (5µg), cefoperazone/sulbactam (75/30µg), imipenem (10µg), meropenem (10µg), piperacillin/tazobactam (100/10µg), amoxicillin/clavulanate (20/10 µg) and co-trimoxazole (25 µg).

All Gram-negative bacilli with inhibition zone size ≤ 27 mm for cefotaxime and ≤ 22mm to ceftazidime were subjected to phenotypic confirmation by Vitek 2 ID / AST.⁹ Turbidometrically controlled bacterial suspension was used to inoculate Vitek 2 ID/AST cards. The minimum inhibitory concentration of amikacin, gentamicin, ciprofloxacin, imipenem, meropenem, piperacillin/tazobactam, amoxicillin/clavulanate, co-trimoxazole, cefotaxime, ceftazidime, ceftriazone and cefepime were determined by Vitek 2 ID/AST cards.

For extraction and purification of DNA, HiPur A Bacterial Genomic DNA Purification Kit (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, India) was used. Extended spectrum β-lactamase genes OXA-10/11, TEM, SHV & CTX-M were detected by Real Time PCR using the following cyclic condition: Initial denaturation at 95°C for 10 minutes followed by denaturation at 95°C for 15 seconds and annealing and extension at 60°C for 30 seconds. Fluorescence reading for all the channels was taken at the end of the extension stage. The cycle threshold (Ct) is determined as the point at which the fluorescence exceeds the threshold limit. The cycle threshold (Ct) value of ≤ 40 was interpreted as positive for OXA-10/11, TEM, SHV & CTX-M genes. Lack of amplification curve in the target genes channel was interpreted as negative.

Results

A total of 100 Gram-negative bacilli obtained from wound samples during the study period was subjected to ESBL screening (Fig 1). Out of 100 Gram-neg-

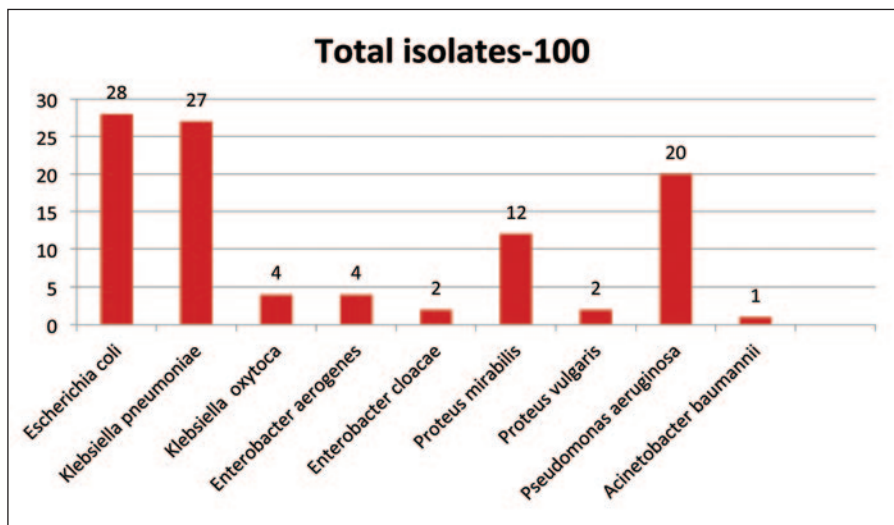


Figure 1 Distribution of Gram-negative bacilli from wound infections.



ative bacilli screened for ESBL production by the disk diffusion method, 43 isolates were subjected to phenotypic confirmation by Vitek 2 ID/AST. 37 (86.05%) out of 43 isolates were phenotypically confirmed by Vitek 2 ID/AST (Fig 2). Among the ESBL producers, 23 (62.16%) were *E. coli*, 9 (24.32%) were *K. pneumoniae*, 2 (5.41%) were *Proteus mirabilis* and one isolate each was *Enterobacter aerogenes* (2.70%), *Enterobacter cloacae* (2.70%) and *P. aeruginosa* (2.70%). Out of 43 isolates, 27 ESBL genes were detected by PCR (Fig 3). Among the ESBL isolates identified by PCR, 20 (74.00%) were *E. coli*, 6 (22.22%) were *K. pneumoniae*

and a single isolate (3.70%) was *E. aerogenes*. ESBL genotype, CTX-M was detected in 48.15% (13/27) isolates. TEM and CTX-M were detected in 29.63% isolates (8/27). The presence of the SHV, CTX-M & TEM genotype was detected in 22.22% (6/27) isolates. The CTX-M ESBL type was the most predominant among ESBL producing Enterobacterales in our study. The co-expression of ESBL genes was observed in isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae*. All *K. pneumoniae* isolates harboured SHV, CTX-M & TEM genes. CTX-M and TEM genes were observed in 40% of the *E. Coli* isolates. (Table 1)

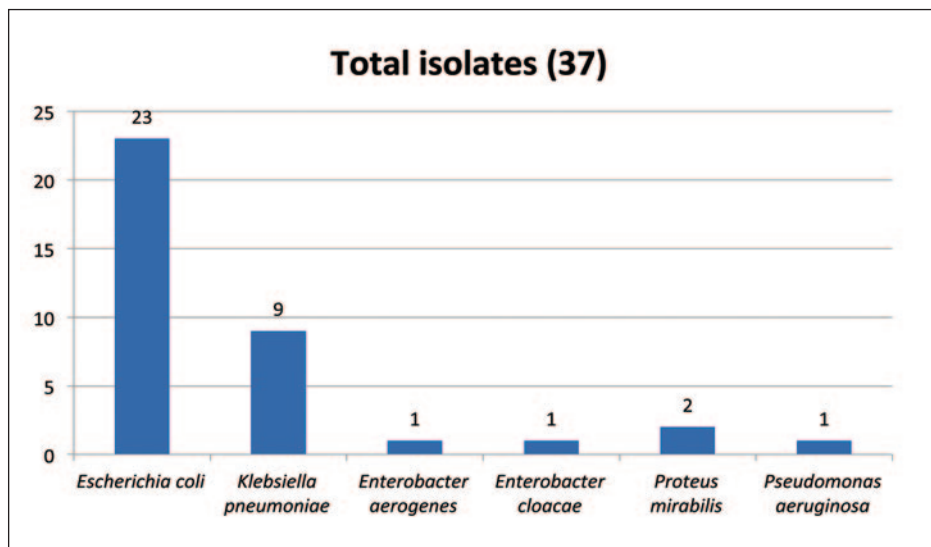


Figure 2 Number of ESBL-producing isolates detected by the Vitek 2 automated method.

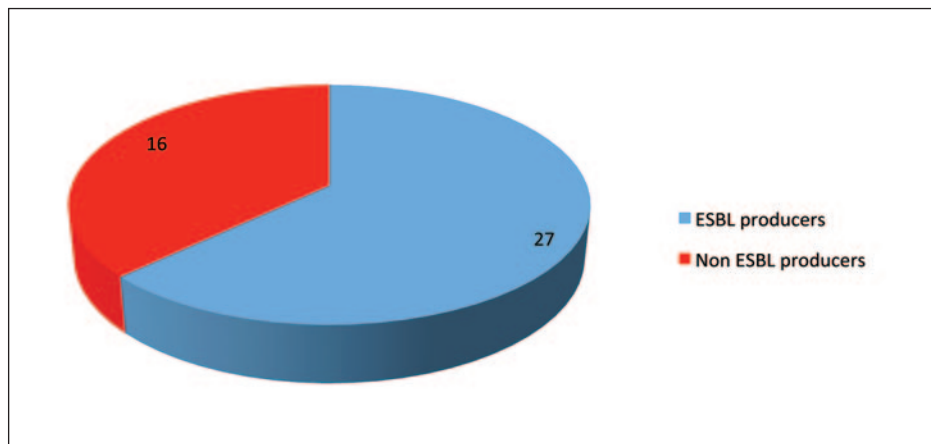


Figure 3 Distribution of ESBL producers from wound infections.

Out of 27 ESBL producers, 14.81% isolates showed resistance to carbapenems, 81.48% were resistant to fluoroquinolones and 74.07% to trimethoprim-sulfamethoxazole. Regarding the aminoglycoside susceptibility testing, 14.81% of the isolates showed resistance to amikacin and 40.74% were resistant to gentamicin. Of the β -lactam- β -lactamase inhibitor drugs tested, 40.74% isolates showed resistance to piperacillin-tazobactam and 25.93% were resistant to amoxicillin-clavulanate (Table 2). 50% of *K. pneumoniae* isolates with SHV, CTX-M & TEM genes showed resistance to carbapenems, β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations and aminoglycosides. All *E. coli* with CTX-M & TEM enzymes showed susceptibility to carbapenems and amikacin. 8.33% of *E. coli* isolates with CTX-M genotype alone were resistant to carbapenems and amikacin. Among the β -lactam/ β -lac-

tamase inhibitor drugs tested, more than 30% of *E. coli* isolates with either CTX-M ESBL type or with CTX-M & TEM ESBL enzymes were resistant to piperacillin-tazobactam combination whereas more than 10% *E. coli* isolates with either CTX-M ESBL type or with CTX-M & TEM ESBL enzymes showed non susceptibility to amoxicillin-clavulanate combination.

Discussion

In this study, the prevalence of ESBL producers and associated genes were studied by phenotypic and genotypic methods. The prevalence of different ESBL genes in clinical isolates varies worldwide depending on geographical location, sample size and period of study.¹⁰ In our study, 27 out of 100 Gram-negative bacilli from

Table 1 1-Distribution of ESBL genes in the study's isolates.

| ESBL genotype | No of isolates | | |
|------------------|------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| | <i>Escherichia coli</i> (20) | <i>Klebsiella pneumoniae</i> (6) | <i>Enterobacter aerogenes</i> (1) |
| CTX-M | 12 (60.00%) | 0 (0.00%) | 1 (100.00%) |
| CTX-M TEM | 8 (40.00%) | 0 (0.00%) | 0 (0.00%) |
| SHV, CTX-M & TEM | 0 (0.00%) | 6 (66.67%) | 0 (0.00%) |

Table 2 Antimicrobial resistance pattern of ESBL producers.

| ESBL genotype | AMC | PIT | AK | GEN | CIP | COT | IMI | MER |
|---------------------|---------------|----------------|---------------|----------------|----------------|----------------|---------------|---------------|
| CTX-M (13) | 3 (23.08%) | 5 (38.46%) | 1 (7.69%) | 6 (46.15%) | 12 (92.31%) | 10 (76.92%) | 1 (7.69%) | 1 (7.69%) |
| CTX-M & TEM (8) | 1 (12.50%) | 3 (37.50%) | 0 (0%) | 2 (25%) | 5 (62.50%) | 4 (50%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| SHV,CTX-M & TEM (6) | 3 (50%) | 3 (50%) | 3 (50%) | 3 (50%) | 5 (83%) | 6 (100%) | 3 (50%) | 3 (50%) |
| Total (27) | 7 (25.93%) | 11 (40.74%) | 4 (14.81%) | 11 (40.74%) | 22 (81.48%) | 20 (74.07%) | 4 (14.81%) | 4 (14.81%) |

AMC-amoxicillin/clavulanate, PIT-piperacillin/tazobactam, CIP-ciprofloxacin, COT-cotrimoxazole, AK-amikacin, GEN-gentamicin, IMI-meropenem, MER-meropenem

wound infections were found to be ESBL producers. In a similar report from south India, 10.76% of isolates from pus samples were ESBL producers. In a study on ESBL associated community acquired infection, 27% were wound isolates.¹¹ Betsy Andrews et al. have reported 32.2% ESBL isolates from wound infections.¹²

By genotypic method, the most common ESBL producer among Enterobacterales were *E. coli* 20/23 (86.95%), *K. pneumoniae* 6/9 (66.67%) and *E. aerogenes* 1/1 (100.00%). None of the *Proteus* isolates in our study harboured ESBL genes. In a similar study from North India, Sahoo et al have reported the predominant ESBL producers among Enterobacterales as *E. coli* (44.00%), *K. pneumoniae* (42.60%) and *Enterobacter* species (48.00%).¹³

In this study, the CTX-M ESBL type was more predominant among Enterobacterales. The co-expression of ESBL genes was observed in isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae*. All *K. pneumoniae* isolates harboured SHV, CTX-M & TEM genes. CTX-M and TEM genes were observed in 40% of *E. coli* isolates. In a multicentre study from India, the predominant ESBL genotype among *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates were reported as TEM and OXA.⁷ CTX-M enzymes have become predominant worldwide with CTX M-15 reported as the most common variant detected in nosocomial and community acquired infection.¹⁴ The high frequency of CTX-M enzymes among *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates and their drug resistance to multiple antibiotics have been reported from previous Indian studies.^{15,16} On the other hand, absence of CTX-M enzymes in ESBL-producing *K. pneumoniae* clinical isolates was reported in an Indian study in 2019.¹⁷

In this study, 50% of *K. pneumoniae* isolates with SHV, CTX-M & TEM genes showed resistance to carbapenems (imipenem and meropenem), aminoglycosides (amikacin and gentamicin), β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations (amoxicillin/clavulanate and piperacillin/tazobactam) and fourth generation cephalosporin (cefepime). In *E. coli* isolates with CTX-M genotype, 16.67% of isolates showed resistance to amoxicillin/clavulanate and 33.33% were resistant to piperacillin/tazobactam. Resistance to carbapenems (imipenem and meropenem) and amikacin was observed among 8.33% of isolates. 50% of isolates showed resistance to gentamicin and 40% of isolates were resistant to cefepime.

All isolates of *E. coli* with CTX-M & TEM enzymes showed susceptibility to carbapenems and amikacin. 12.50% of the isolates showed resistance to amoxicillin/clavulanate, whereas 37.50% showed resistance to piperacillin/tazobactam combinations. A single isolate of *E. aerogenes* with CTX-M ESBL type showed susceptibility to carbapenems, cefepime and aminoglycosides, but was resistant to β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations. Nosocomial isolates of ESBL-producing *E. coli* with high level resistance to ampicillin, cephalosporins, amoxicillin/clavulanate, quinolones and piperacillin /tazobactam have been already reported.¹⁸

The *bla*_{CTX-M} type is identified to be the highest disseminated ESBL resistant gene.¹⁹ Gram-negative bacteria that harbour the CTX-M gene have the ability to transfer plasmid borne resistance to other bacterial cells. The *bla*_{CTX-M} type confers resistance to third/fourth generation cephalosporin groups.²⁰ The choice of drug for ESBL producers varies between β -lactam/ β -lactamase inhibitors and carbapenems. β -lactam/ β -lactamase inhibitors have been the preferred agents for less severe infection whereas carbapenems are preferred for more severe infections. However the production of multiple ESBL's, the co-expression of Amp C β -lactamases and the inoculum effect may limit the efficacy of β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations.²¹

The prevalence of ESBL varies from <1% to >70% across the globe.²² The extended use of cephalosporins in health care settings favours the spread of ESBL-encoding genes. Thus, the determination of predominant ESBL genotypes could aid in the rapid selection of the appropriate treatment. The knowledge of ESBL genotypes that are prevalent in healthcare settings probably helps in clinical decision making.

The prevalence of ESBL varies from <1% to >70% across the globe.²² The extended use of cephalosporins in health care settings favours the spread of ESBL-encoding genes. Thus, the determination of predominant ESBL genotypes could aid in the rapid selection of the appropriate treatment. The knowledge of ESBL genotypes that are prevalent in healthcare settings probably helps in clinical decision making.

Limitation of the study

This study has limitations such as selection of samples and shorter duration of research. Existence of Amp C betalactamases and carbapenemase enzymes among the study isolates were not evaluated in our study. Future research on exploration of β -lactamases from multiple samples for a prolonged period will overcome the drawbacks of present study.

Conclusion

CTX-M type was the predominant ESBL genotype detected among the clinical isolates in our study. Existence of multiple ESBL genotypes, SHV, CTX-M & TEM was observed among *Klebsiella pneumoniae* isolates. The knowledge on ESBL genotypes that are prevalent in a geographical region is of great importance for epidemiological surveillance and for determining effective measures of infection control. The high burden of antimicrobial resistance in Indian settings is challenging for clinical decision making.



Περίληψη

Genotypic resistance profile of ESBL-producing enterobacterales from wound infections in Salem, India

Sureshkumar Mathavi, Gopal Sree Sadhana*, Rao A V Raghavendra, Rajan Reena

Department of Microbiology, Vinayaka Mission's Kirupananda Variyar Medical College & Hospitals, Salem, India.

*Corresponding author

Οι β-λακταμάσες ευρέως φάσματος (Extended Spectrum β-lactamases, ESBL) έχουν αυξηθεί εκρηκτικά, τόσο στο νοσοκομείο όσο και στην κοινότητα. Η παρούσα μελέτη είχε στόχο να ανιχνεύσει τους μικροοργανισμούς που παράγουν ESBL σε λοιμώξεις μαλακών μορίων και να καθορίσει τα είδη γονιδίων ESBLs. Μελετήθηκαν αρνητικοί κατά Gram βακτηρίδια που απομονώθηκαν από λοιμώξεις μαλακών μορίων για διάστημα ενός έτους, από τον Νοέμβριο του 2020 έως τον Οκτώβριο του 2021. Μικροοργανισμοί με ζώνη αναστολής ≤ 27 mm για την Κεφοταξίμη και ≤ 22 mm για την Κεφταζιδίμη υποβλήθηκαν σε φαινοτυπική επιβεβαίωση με Vitek 2 ID / AST. Τα γονίδια β-λακταμάσης εκτεταμένου φάσματος OXA-10/11, TEM, SHV & CTX-M ανιχνεύθηκαν με Real Time PCR. Το ένζυμο CTX-M ήταν ο πιο κοινός γονότυπος ESBL που παρατηρήθηκε μεταξύ των Εντεροβακτηριακών. Συν-έκφραση των γονιδίων ESBL παρατηρήθηκε σε κλινικά στελέχη των *Klebsiella pneumoniae* και *Escherichia coli*. Τα γονίδια CTX-M & TEM παρατηρήθηκαν στο 40% των απομονώσεων *E. coli*. Όλα τα στελέχη *E. coli* με γονίδια CTX-M & TEM ήταν ευαίσθητα σε καρβαπενέμες και αμικασίνη. Το 8,33% των απομονωθέντων *E. coli* με μόνο γονότυπο CTX-M ήταν ανθεκτικά στις καρβαπενέμες και την αμικασίνη. Το 50% των απομονωθέντων στελεχών *K. pneumoniae* με γονίδια SHV, CTX-M & TEM εμφάνισαν ανθεκτικότητα στις καρβαπενέμες, σε συνδυασμούς αναστολέων β-λακτάμης/β-λακταμάσης, κεφεπίμη και αμινογλυκοσίδες. Συμπερασματικά, οι λοιμώξεις που σχετίζονται με την παρουσία ESBL αποτελούν σοβαρό θέμα δημόσιας υγείας όσον αφορά την ευρεία διάδοση των γονιδίων ESBL και τις περιορισμένες θεραπευτικές επιλογές.



Λέξεις κλειδιά

λοιμώξεις μαλακών μορίων, Εντεροβακτηριακά που παράγουν ESBL, γονίδια ESBLs



References

- Farzi S, Ranjbar R, Niakan M, Ahmadi MH. Molecular Characterization of Antibiotic Resistance Associated with TEM and CTX-M ESBL in Uropathogenic *E. coli* Strains Isolated from Outpatients. *Iran J Pathol* 2021; 16: 386-391.
- Castanheira M, Simmer PJ, Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC Antimicrob Resist* 2021; 16:dlab092
- Rawat D, Nair D. Extended-spectrum β -lactamases in Gram Negative Bacteria. *J Glob Infect Dis* 2010; 2:263-274
- Nagshetty K, Shilpa BM, Patil SA, Shivannavar CT, Manjula NG. An Overview of Extended Spectrum Beta Lactamases and Metallo Beta Lactamases. *Adv Microbiol* 2021; 11:37-62.
- Ghafourian S, Sadeghifard N, Soheili S, Sekawi Z. Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. *Curr Issues Mol Biol* 2015; 7:11-22.
- Rupp ME, Fey PD. Extended spectrum betalactamase (ESBL) producing Enterobacterales: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs* 2003; 63:353-65.
- Gautam V, Thakur A, Sharma M, Singh A, Bansal S, Sharma A, et al. Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae*: A multicentric study from tertiary care hospitals in India. *Indian J Med Res* 2019; 149:208-215.
- Collee JG, Miles RS, Watt B. Tests for the Identification of Bacteria. In: Collee, J.G., Marmion, B.P, Fraser, A.G. and Simmons, A., Eds., Mackie & McCartney Practical Medical Microbiology, 14th Edition, Churchill Livingstone, New York; 1996
- Wayne P. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentyfifth informational supplement. CLSI Document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
- Kannaiyan M, Abebe GM, Kanimozhi C, Thambidurai P, Selvam SA, Vinodhini R, et al. Prevalence Of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing Enterobacterales Members Isolated From Clinically Suspected Patients. *Asian J Pharm Clin Res* 2018; 11; 364-369
- Mirza S, Jadhav S, Misra RN, Das NK. Coexistence of β -Lactamases in Community- Acquired Infections in a Tertiary Care Hospital in India. *Int J Microbiol* 2019; 2019:7019578
- Andrews B, Joshi S, Swaminathan R, Sonawane J, Shetty K. Prevalence of Extended Spectrum B-Lactamase (ESBL) Producing Bacteria among the Clinical Samples in and around a Tertiary Care Centre in Nerul, Navi Mumbai, India. *Int J Curr Microbiol App Sci* 2018;7: 3402-3409
- Sahoo S, Otta S, Swain B, Kar SK. Detection and genetic characterization of extended- spectrum beta-lactamases producers in a tertiary care hospital. *J Lab Physicians* 2019; 11:253-258.
- Hashemizadeh Z, Kalantar-Neyestanaki D, Mansouri S. Clonal relationships, antimicrobial susceptibilities, and molecular characterization of extended-spectrum beta- lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections and fecal samples in Southeast Iran. *Rev Soc Bras Med Trop* 2018; 51:44-51
- Ateya RM, Amr GE, Mohamed HE, Gamil NM. Molecular Characterization of CTX- M15 Beta Lactamase Producing *Escherichia coli* Isolates in Intensive Care Units. *Int J Curr Microbiol App Sci* 2019; 8:317-329
- Gupta V, Singh M, Datta P, Goel A, Singh S, Prasad K, et al. Detection of various beta- Lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella sp.*: A study from Tertiary Care Centre of North India. *Indian J Med Microbiol* 2020; 38:390-396.
- Bhaskar BH, Mulki SS, Joshi S, Adhikary N, Venkatesh BM. Molecular Characterization of Extended Spectrum β -lactamase and Carbapenemase Producing *Klebsiella pneumoniae* from a Tertiary Care Hospital. *Indian J Crit Care Med* 2019; 23:61- 66.
- Sahni RD, Mathai D, Sudarsanam TD, Balaji V, Brahamadathan KN, Jesudasan MV, et al. Extended spectrum Beta lactamase Producers: Detection for the Diagnostic Laboratory. *J Glob Infect Dis* 2018; 10: 140-146.
- Nachimuthu R, Kannan VR, Bozdogan B, Krishnakumar V, Pandian S K, Manohar P. CTX-M-type ESBL-mediated resistance to third-generation cephalosporins and conjugative transfer of resistance in Gram-negative bacteria isolated from hospitals in Tamil Nadu, India. *Access Microbiol* 2021; 3:000142
- Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med* 2012; 27:128-142
- Veeraraghavan B, Pragasam AK, Bakthavatchalam YD, Anandan S, Ramasubramanian V, Swaminathan S, et al. Newer β -Lactam/ β -Lactamase inhibitor for multidrug-resistant gram-negative infections: Challenges, implications and surveillance strategy for India. *Indian J Med Microbiol* 2018; 36:334-343.
- Shakya P, Shrestha D, Maharjan E, Sharma VK, Paudyal R. ESBL production among *E. coli* and *Klebsiella spp.* causing urinary tract infection: a hospital based study. *Open Microbiol J* 2017; 11:23-30

Prevalence of serum cryptococcal antigen among HIV infected patients attending a university of Benin Teaching Hospital, Edo state, Nigeria

Okam Chioma Constance,¹ Morka Emmanuel,^{2*} Morka Blessing Ubulu¹

¹Department of Microbiology, University of Benin, Edo State, Nigeria

²Department of Microbiology, Delta State University, Abraka, Nigeria

*Corresponding author

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.10203294>



Summary

The study was designed to determine the prevalence of serum cryptococcal antigen (CrAg) among HIV-infected patients at the University of Benin Teaching Hospital (UBTH), Edo state, Nigeria. The clinical symptoms, risk factors and past history of some diseases in association with CrAg was determined on 200 HIV-infected patients within the age range of 18 to 71 years, using the cryptococcal antigen lateral flow assay (CrAg LFA). The CD4 count of each patient was determined using the fluorescent-activated cell sorter BD FACS count system. A structured questionnaire was used to gather information on the socio-demographic characteristics, medical and treatment history of patients. Ninety percent of the patients were ART treatment-experi-

enced and 10% were ART naïve. A prevalence of 4.5% cryptococcal antigenemia was observed in the study. The infection rate was higher among the ART naïve patients 5/20 (25%) than in the treatment-experienced group 4/180 (2.2%). Age had no significant association with CrAg ($P = 0.731$). The association between serum CrAg and CD4 count was found to be significant ($P < 0.001$). More females were CrAg-positive when compared to their male counterparts, but this difference was not statistically significant. History of past diseases such as tuberculosis, hepatitis and diabetes mellitus were not statistically significant among the patients. Exposure to risk factors such as alcohol intake, use of steroids and injection of drugs (drug abuse) was statistically significant, whereas cigarette smoking and exposure to pigeon droppings were insignificant. Although the prevalence of serum CrAg was low in this study, risk factors associated with cryptococcosis must be avoided. In addition, routine screening should be implemented to improve wellbeing and reduce morbidity. In this study we also found out that cryptococcal infection is characteristic to AIDS patients and not HIV patients as generally perceived.



Key words

Prevalence cryptococcal antigen, CrAg, serum, AIDS, HIV

Corresponding author

Morka Emmanuel
Department of Microbiology,
Delta State University,
Abraka, Nigeria
Email: emorka@delsu.edu.ng

Introduction

Cryptococcus spp. is known for its capability to cause lethal fungal infections. The major cause of cryptococcosis is either *Cryptococcus neoformans* (believed to be the primary cause of human cryptococcal infection) or *Cryptococcus gattii*. These were initially thought to be subspecies of *C. neoformans* but have now been identified as distinct species by molecular method in 2002.^{1,2} Little is known about *C. gattii* infection in Africa, where this pathogen has been isolated from both clinical and environmental samples.³ Current knowledge on the epidemiology and clinical presentation of *C. neoformans* infection in Africa is higher compared to *C. gattii* infection.⁴ Inhalation of the infectious propagule from the environment is believed to be the major mode of transmission of cryptococcosis and genotypic evidence suggests acquisition can occur many years before the development of clinical cryptococcosis in the context of immunosuppression.^{5,6}

Although the exact nature of the infectious propagule is unknown, the basidiospore which is created through sexual or asexual reproduction is an encapsulated, round-to-oval yeast measuring 4-6 microns with a surrounding polysaccharide capsule ranging in size from 1 to >30 microns when cultivated in the laboratory.⁷ This infection occurs mainly in people with HIV or other immune compromising conditions, but rare in immune-competent individuals,^{8,9} whereas *C. gattii* infection has been mainly described in apparently immunocompetent patients.⁴ Cryptococcal infection is a common cause of meningitis leading to high mortality among people living with HIV/AIDS in Africa and Asia.^{10,11} It is also one of the leading causes of death in patients in the first year of Antiretroviral Therapy (ART), accounting for up to 20% of deaths among AIDS patients with CD4 count < 50 cells/ μ L in Africa.¹² In India, *Cryptococcus* meningitis occurs in 2 - 45% of HIV positive patients.^{13,14} The World Health Organization (WHO) recommends considering for

cryptococcal antigen screening and providing prophylactic therapy to those found positive for cryptococcal antigen among HIV-positive patients with CD4 count <100 cells/mm³ in highly prevalent areas.¹⁵ Pulmonary infection has the tendency to spontaneously resolve and is frequently asymptomatic,¹⁶ but localized pulmonary infection may manifest as pneumonia,⁸ it may disseminate to other systems of the body with a wide clinical spectrum, which may include cryptococcaemia,¹⁷ cutaneous and oral cryptococcosis,¹⁸ diarrhea,¹⁹ and most commonly, central nervous system (CNS) manifestations.^{1,9,16} Globally, cryptococcosis remains a remarkable cause of mortality among HIV-infected persons despite the advent of highly active antiretroviral therapy (HAART). In developed countries, the 10-week mortality in HIV patients remains high, ranging from 10–25%,^{20,21} while in resource-poor countries such as Uganda, a 14-day mortality rate of 20–42% has been reported among patients with cryptococcal meningitis, despite treatment with amphotericin B.²² In Zambia, the 6-month mortality was 100%, with a median survival of only 19 days, among AIDS patients without access to antiretroviral therapy who were treated with fluconazole. Serum cryptococcal antigen (CrAg) is a marker for invasive or disseminated cryptococcal infection and the most sensitive and specific indicator for systemic cryptococcosis.²³ A positive test therefore, warrants a search for disseminated disease. The purpose of the study was to determine the prevalence of serum cryptococcal antigen among HIV-infected patients at the University of Benin teaching hospital, using a serum CrAg lateral flow dipstick assay. We also analysed the clinical symptoms, risk factors and past history of underlying diseases in association with CrAg.

Materials and methods

Study population

This study was carried out at the University of Benin Teaching Hospital (UBTH), a 700-bed tertiary hospital located in the southern part of Nigeria, with a dedicated laboratory for HIV investigations, which is supported by PEPFAR (Presidential Emergency Plan for AIDS Relief) of the USA. Two hundred HIV-positive patients, both ART naïve and treatment experienced, within the ages of 18 and 71 years, who attended the ART clinic, were enrolled in this study. Written informed consent was obtained from each study participant and ethical approval was obtained from the Ethics and Research Committee of the UBTH. Each patient was interviewed, and a structured questionnaire was used to collect information on socio- demo-

graphic data, medical and treatment history. This information included past history on the following disease conditions: Tuberculosis, Hepatitis and *Diabetes mellitus*. History on the risk factors associated with CrAg such as exposure to pigeon droppings, alcohol intake, and smoking, use of steroids and injection of drugs was also obtained. The patients were monitored for clinical symptoms such as headache, fever, cough, nausea and vomiting, which are associated with cryptococcosis and these were also recorded in the questionnaire. The history on intake of antiretroviral and duration of ART was also obtained.

Serum cryptococcal antigen (CrAg) lateral flow assay

The CrAg lateral flow assay (Immy Immuno-Mycolitics Inc, Norman, Oklahoma, USA) was further carried out, following the manufacturer's instructions. In brief, one drop of LF specimen diluent was put in a disposable micro-centrifuge tube using a pipette, 40 µl of serum was added to the reservoir and mixed, and then the white end of the cryptococcal antigen lateral flow test strip was submerged into the specimen. The result was read and recorded after 10 minutes. Double lines showed a positive result while a single line indicated a negative result.

CD4 cell counts

The EDTA sample was used to determine CD4 cell counts by flow cytometry (Partec, Germany) following the manufacturer's instruction. Briefly, 20 µl of whole blood was placed in a Partec tube and 20 µl of CD4 T-cell monoclonal antibodies was added. The mixture was then incubated in the dark for 15 minutes at room temperature after which 800 µl of buffer was added. The tube was then placed in the flow cytometer for counting and the CD4 T-cell value was obtained by a programmed computer connected to the instrument.²⁴

Statistical analysis

All data obtained from each patient, including results of laboratory tests were analyzed using SPSS version 22.0. CD4 count was categorized, cross-tabulated with serum CrAg results and association was determined using Chi-square. All statistical test of significance were carried out at 95% level of confidence and a P-value of < 0.05 was considered significant.²⁵

Results

Two hundred HIV-positive patients were enrolled in this study and their demographic characteristics were



obtained via questionnaire as represented in Table 1. Out of 200 HIV infected patients, 180 (90%) were ART treatment experienced, while 20 (10%) were ART naïve. Four (2.2%) treatment experienced patients were positive for CrAg, while 5 (25%) ART naïve patients were positive for CrAg, which makes it a total of 9 subjects positive for CrAg as presented in Table 2. The prevalence of risk factors in relation to serum CrAg in the population such as alcohol intake (excessive intake), use of steroids, drug injection/smoking were statistically significant, while exposure to pigeon droppings and smoking were not statistically significant; disease conditions such as tuberculosis, hepatitis and diabetes mellitus were not statistically significant, as presented in Table 3. The age range of patients was between 18 years and 71 years. The difference in age prevalence in relation to CrAg was not statistically significant ($P = 0.731$) as presented in Table 4. In considering sex distribution in relation to serum CrAg, out of 53 males, 4 were positive for CrAg, while out of 147 females, 5 were positive for CrAg. The prevalence in sex distribution was not statistically significant ($P = 0.212$) as presented in Table 5. CD4 counts of < 100 cells/ μ l had a higher prevalence of cryptococcal antigen, this was followed by CD4 counts of 100-199 cells/ μ l and CD4 counts of > 200 cells/ μ l had the least prevalence as presented in Table 6. There was a statistically significant association between cryptococcus infection and the CD4 count of the patients < 200

Table 1 Demographic characteristics of HIV patients enrolled in the study.

| Age Distribution | Frequency (%) |
|------------------|---------------|
| < 20 years | 1 (0.5) |
| 20 – 29 years | 21 (10.5) |
| 30 – 39 years | 70 (35.0) |
| 40 – 49 years | 56 (28.0) |
| 50 – 59 years | 38 (19.0) |
| 60 – 69 years | 12 (6.0) |
| 70 and above | 2 (1.0) |
| Total | 200 (100) |
| Gender | |
| Male | 53 (26.5) |
| Female | 147 (73.5) |
| Total | 200 (100) |

cells/ μ l ($P < 0.001$). All the patients had at least one symptom and fever was the commonest in multivariate analysis, all these symptoms were all not statistically significant in the multivariate analysis as shown in Table 7. Headache and nausea were found to have

Table 2 Determination of CrAg among ART Naïve and Treatment experienced patients.

| Age (years) | Treatment experienced | | ART Naïve | | Total No. of patients | Total CrAg positive (%) |
|-------------|-----------------------|----------------------|------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|
| | No. tested | No. +ve patients (%) | No. tested | No. of +ve patients (%) | | |
| <20 | - | - | 1 | 0 (0) | 1 | 0 (0) |
| 20-29 | 16 | 0 (0) | 5 | 2 (40) | 21 | 2 (9.5) |
| 30-39 | 62 | 2 (3.2) | 8 | 0 (0) | 70 | 2 (2.86) |
| 40-49 | 52 | 2 (3.8) | 4 | 2 (50) | 56 | 4 (7.14) |
| 50-59 | 36 | 0 (0) | 2 | 1 (50) | 38 | 1 (2.6) |
| 60-69 | 12 | 0 (0) | - | - | 12 | 0 (0) |
| >70 | 2 | 0 (0) | - | - | 2 | 0 (0) |
| Total | 180 | 4 (2.2) | 20 | 5 (25) | 200 | 9 (4.5) |

$P = 0.786$; $P > 0.05$

Table 3 Prevalence of risk factors and disease conditions associated with serum CrAg in the population.

| Risk factors | Frequency (%) Positive | Frequency (%) Positive | P - value |
|------------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| Exposure to pigeon droppings | 5 (2.5) | 1 (20) | 0.133 |
| Alcohol intake | 26 (13.0) | 5 (19.2) | 0.001 |
| Smoking | 14 (7.0) | 2 (14.3) | 0.090 |
| Use of steroids | 8 (4.0) | 4 (50) | 0.001 |
| Smoke/ inject drugs | 9 (4.5) | 3 (33.3) | 0.001 |
| Diseases | | | |
| Tuberculosis | 11 (5.5) | 1 (90.9) | 0.462 |
| Hepatitis | 4 (2.0) | 1 (75) | 0.089 |
| <i>Diabetes mellitus</i> | 5 (2.5) | 1 (20) | 0.133 |

Table 4 Age distribution of patients in relation to serum CrAg N = 200.

| Age (years) | Total (%) | Negative (%) | Positive (%) | P - value |
|-------------|-----------|--------------|--------------|-----------|
| <20 | 1 | 1 (100) | 0 (0.0) | |
| 20 – 29 | 21 | 19 (90.5%) | 2 (9.5) | |
| 30 – 39 | 70 | 68 (97.1) | 2 (2.9) | |
| 40 – 49 | 56 | 52 (92.9) | 4 (7.1) | 0.731 |
| 50 – 59 | 38 | 37 (97.4) | 1 (2.6) | |
| 60– 69 | 12 | 12 (100) | 0 (0.0) | |
| >70 | 2 | 2 (100) | 0 (0.0) | |
| Total | 200 | 191 (95.5) | 9 (4.5) | |

Table 5 Sex distribution of patients in relation to serum CrAg.

| Sex | Total | Negative | Positive | P - value |
|----------------------------------|-------|----------|----------|-----------|
| Male | 53 | 49 | 4 | 0.212 |
| Female | 147 | 142 | 5 | |
| Chisquare = 1.558, df = 1 | | | | |



significant association with serum CrAg in univariate analysis while vomiting and cough were not statistically significant. Excessive alcohol intake, use of steroids and injection of drugs were statistically significant while exposure to pigeon droppings and smoking were not statistically significant in the univariate analysis (Table 8).

Discussion

Serum cryptococcal antigen (CrAg) is a marker for invasive or disseminated cryptococcal infection and the most sensitive and specific indicator for systemic cryptococcosis.²³ A 12 ml blood sample was collected from each participant by vein puncture and an aliquot of 5 ml was put in a vacutainer bottle for serum cryptococcal antigen (CrAg) screening, using the cryptococcal antigen lateral flow assay (CrAg LFA), and another 5 ml into a container with EDTA (ethylenediamine tetracetic acid) for the determination of CD₄ cell count. Higher CD₄ count implies greater immunity against cryptococcal infection in HIV/ AIDS patients.

CrAg Lateral Flow Assay

The detection of cryptococcal capsular polysaccharide antigen (CrAg) in serum and cerebrospinal fluid using latex agglutination test (CrAg-latex) or enzyme-linked immunoassay (EIA) has been in existence for over decades.²⁶ They are also remarkable for better diagnosis of cryptococcal infection both in asymptomatic and symptomatic patients. In recent time the cryptococcal antigen lateral flow assay (CrAg LFA) was included as a valuable diagnostic tool for cryptococcal screening. Unlike the other tests, the CrAg LFA is a dipstick immunochromatographic assay which is very simple, rapid, low-cost test and requires no lab infrastructure. It also meets the WHO assured criteria (sensitive, specific, affordable, user-friendly, rapid and equipment-free). It has a high sensitivity for CrAg of all serotypes.²⁷ The CrAg LFA uses a combination of two monoclonal antibodies which allows for consistent reagent quality and performance. One monoclonal antibody is highly reactive with CrAg of serotypes A, B, and C, the second monoclonal is highly reactive with CrAg of serotypes A and D. When combined the antibodies are highly reactive with CrAg of

Table 6 Prevalence of serum CrAg in relation to CD₄ count of patients.

| CD ₄ count | Negative (%) | Positive (%) | Total (%) | P - value |
|----------------------------------|--------------|--------------|-----------|-----------|
| <100 | 6 (54.5) | 5 (45.5) | 11 | |
| 100- 199 | 16 (88.9) | 2 (11.1) | 18 | |
| > 200 | 169 (98.8) | 2 (1.2) | 171 | 0.001 |
| Total | 191 (95.5) | 9 (4.5) | 200 | |
| Chisquare = 49.176 df = 2 | | | | |

Table 7 Multivariate analysis.

| Symptoms | Total (%) | +ve | -ve | OR | 95% C.I | P |
|----------|-----------|-----------|------------|-------|---------------|-------|
| Headache | 81 | 8 (9.9%) | 73 (90.1) | 0.428 | 0.020 - 9.147 | 0.587 |
| Fever | 74 | 9 (12.2%) | 65 (87.8%) | 0.000 | 0.000 - 0.000 | 0.996 |
| Nausea | 61 | 8 (86.9%) | 53 (13.1%) | 0.216 | 0.021- 2.189 | 0.195 |
| Vomiting | 6 | 1 (83.3%) | 5 (16.7%) | 0.269 | 0.018 - 4.001 | 0.340 |
| Cough | 37 | 4 (10.8%) | 33 (89.2%) | 0.204 | 0.030 - 1.415 | 0.108 |

Table 8 Univariate analysis.

| Diseases | Total (100%) | +ve | -ve | OR | 95% CI | P- value |
|------------------------------|--------------|-----------|------------|-------|---------------|----------|
| Tuberculosis | 11 | 1 (90.9%) | 10 (9.1%) | 0.442 | 0.050 - 3.887 | 0.462 |
| Hepatitis | 4 | 1 (75%) | 3 (25%) | 0.089 | 0.012 - 1.367 | 0.089 |
| Diabetes mellitus | 5 | 1 (20%) | 4 (80%) | 0.171 | 0.017 - 1.711 | 0.133 |
| RISK FACTORS | | | | | | |
| Exposure to pigeon droppings | 5 | 1 (20%) | 4 (80%) | 0.171 | 0.017 - 1.711 | 0.133 |
| Alcohol intake | 26 | 5 (19.2%) | 21(80.8%) | 0.099 | 0.025 - 0.397 | 0.001 |
| Smoking | 14 | 2 (14.3%) | 12 (85.7%) | 0.235 | 0.044 - 1.255 | 0.090 |
| Use of steroids | 8 | 4 (50.0%) | 4 (50.0%) | 0.027 | 0.005 - 0.139 | 0.000 |
| Smoke/ inject drugs | 9 | 3 (33.3%) | 6 (66.7%) | 0.065 | 0.013 - 0.323 | 0.001 |
| Clinical symptoms | | | | | | |
| Headache | 81 | 8 (9.9) | 73 (90.1%) | 0.077 | 0.009 - 0.631 | 0.017 |
| Fever | 74 | 9 (12.2%) | 65 (87.8%) | 0.878 | 0.807 - 0.956 | - |
| Nausea | 61 | 8 (86.9%) | 53 (13.1%) | 0.048 | 0.006 - 0.393 | 0.005 |
| Vomiting | 6 | 1 (83.3%) | 5 (16.7%) | 0.215 | 0.022 - 2.062 | 0.183 |
| Cough | 37 | 4 (10.8%) | 33 (89.2%) | 0.270 | 0.069 - 1.058 | 0.060 |

all range of cryptococcal serotypes which is an advantage over CrAg latex and EIA.²⁶ The CrAg LFA is highly recommended for use with Serum, plasma, or CSF for diagnosis of cryptococcal meningitis or cryptococcosis (non – meningeal) in symptomatic patients.²⁷ It is also used for screening of serum or plasma in ART-naïve adults with CD₄ counts less than 100 cells/mm³ in biogeographical regions with a very high prevalence of cryptococcal antigenemia. CrAg LFA also has the capacity to detect patients with asymptomatic cryptococcal infection for urgent preemptive antifungal therapy.²⁷ It also has a better analytical sensitivity for *C. gattii* than CrAg- latex or EIA.²⁶

In this study, CrAg LFA was used because of its efficiency in detecting cryptococcosis at an early stage both in symptomatic and asymptomatic patients. There was no need for pretreatment of sample as is always the case in Latex agglutination test.²⁷ The test

is small, lightweight and requires no refrigeration with a long shelf life (in the case of delivery). The result was very rapid (produced in 10 minutes).

The prevalence of Cryptococcal antigen observed in this study was 4.5% among 200 HIV-positive patients. This is low compared to previous studies done in the University of Benin Teaching Hospital (UBTH), Nigeria (9.8%),²³ University of Calabar Teaching Hospital (UCTH) (13.1%),²⁸ and in Ethiopia (8.4%).²⁹ This disparity in reported prevalence could be due to the measures taken to combat this fungal infection in Nigeria since 2012, such as the majority of the patients undergo antiretroviral therapy (ART), and the patients are started on fluconazole as soon as they are positive to cryptococcal infection. Patients are also aware of the risk factors associated with this infection and they adhere strictly to the advice given to them by the physician during counseling. This study corroborates



with low prevalence of serum CrAg 2% and 5% reported in developing countries such as Vietnam,³⁰ and South Africa³¹ respectively. This shows that the burden of cryptococcosis as an opportunistic infection in HIV-infected individuals in subSaharan Africa has been reduced drastically. The 2.2% prevalence of serum cryptococcal antigen recorded among ART treatment experienced patients in this study is low compared to 7.1% in UCTH,³² 9.91% in UBTH²⁴ and 13.1% in Thailand.³³ Also a 25% serum cryptococcal antigen was observed among ART naïve patients. This finding is higher than the 12.7% prevalence reported in Benin city Nigeria³⁴ and 2.6% recorded among ART naïve patients in UCTH.³² This disparity in reported prevalence could be due to the population enrolled for the study. In the UBTH and UCTH study, larger ART naïve numbers (150 and 116) were enrolled for the study while in this study only 20 persons were enrolled as ART naïve patients. The duration of ART among treatment experienced patients ranged from < 1 year to 10 years and above among the subjects, the duration of ART within 2 – 5 years recorded the highest number of patients, the patients within < 1 year to 2 years of duration of ART were those ART naïve patients newly introduced to antiretroviral therapy (ART) while those who have been on ART for 6 years and above who are supposed to have a stronger immunity against these opportunistic infections but still have a low CD₄ count (low immunity), could be due to their exposure to some ailments like diabetes, cancer e.t.c. that also reduce their CD₄ count; more attention should be paid

to these patients as they are more prone to cryptococcal infection. In the prevalence of disease conditions associated with CrAg in the population, tuberculosis had 11 (5.5%) positive patients followed by diabetes mellitus 5 (2.5%) and hepatitis 4 (2.0%); these disease conditions are known to reduce immunity even though the patients are on ART. Also observed in this study was high prevalence of antigenemia (45.5%) associated with lower CD₄ counts within the range of <100 cell/μl. This is similar to previous studies done in USA,³⁰ and Nigeria.^{24,34} This could be a result of lack of immunity against this opportunistic infection as HIV is characteristically associated with T lymphocyte depletion and is highly marked in ART naïve patients^{35,36} and as also observed in this study, while a low prevalence of antigenemia (1.2%) was associated with higher CD₄ count within the range of >200 cells/μl. This is in line with previous studies done in Nigeria.^{23,32} Highly active anti-retroviral therapy (HAART) has been reported to improve CD₄ counts, however patients on HAART that still have low CD₄ counts of < 200 cell/μl are at an increased risk of developing opportunistic infections which includes *Cryptococcus neoformans*. In sex distribution in relation to CrAg, more females were seropositive for CrAg when compared to their male counterparts. This could be a result of lower CD₄ count level among females than males, the female population being also higher in this study, but no statistically significant difference was found ($P = 0.212$). The majority of patients (7.1%) fell between 40-49 years of age. The difference in age

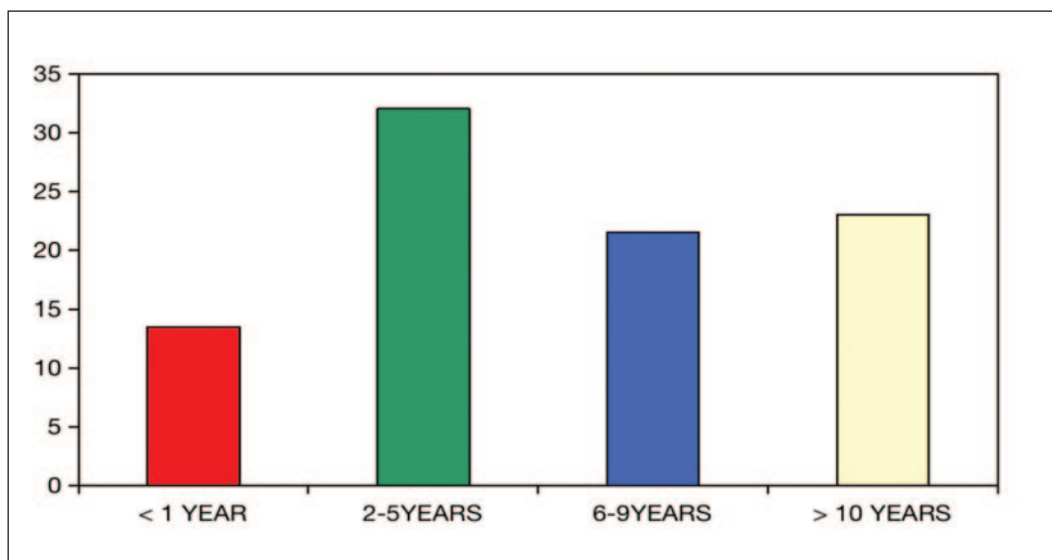


Figure 1 Duration of ART.

prevalence was also not statistically significant ($P = 0.731$). Risk factors associated with serum CrAg such as alcohol intake, cigarette smoking, use of steroids and drug abuse (smoked/injected drugs) had a significant association with serum CrAg in the univariate analysis while exposure to pigeon droppings was not significantly associated with serum CrAg. Clinical symptoms of CrAg were not statistically significant in association with CrAg in the multivariate analysis but they were all found to independently predict serum CrAg in a univariate analysis except for cough and vomiting which were not statistically significant (Tables 7, 8). History of disease conditions such as tuberculosis, hepatitis and diabetes mellitus were also not statistically significant in association with serum CrAg in the univariate analysis. A positive serum CrAg in a symptomatic (such as fever, nausea, headache) HIV-positive patient on ART, may imply primary cryptococcal meningitis in the background of immune suppression or immune reconstitution syndrome (IRIS) resulting from the initiation of ART, in the background of disseminated cryptococcosis. The former scenario would benefit from the management of the meningitis while the later would benefit from both meningitis treatment and IRIS treatment.

Conclusion

The low prevalence of serum CrAg among HIV-infected patients as found in this study implies that this infection has been drastically reduced in Benin city, Nigeria, due to the fact that individuals are already aware of this fungal infection and the risk factors associated with it, and the appropriate measures to combat this infection are being taken. Patients with CD₄ count <100 are more prone to cryptococcal infection. Higher CD₄ count implies greater immunity against cryptococcal infection in HIV/AIDS. ART treatment experienced patients have higher immunity against CrAg than ART naïve patients because HAART has boosted their immunity. Significant risk factors associated with serum CrAg are excessive alcohol intake, use of steroids and drug abuse as these further reduce immunity. Thus, cryptococcal antigen screening should be made a routine for all HIV-positive patients accessing care in an ART clinic. This will improve the lives of patients, reduce morbidity and prevent deaths which may arise from cryptococcal meningitis.



Περίληψη

Prevalence of serum cryptococcal antigen among HIV infected patients attending a university of Benin Teaching Hospital, Edo state, Nigeria

Okam Chioma Constance,¹ Morka Emmanuel,^{2*} Morka Blessing Ubulu³

^{1,3}Department of Microbiology, University of Benin, Edo State, Nigeria

²Department of Microbiology, Delta State University, Abraka, Nigeria

*Corresponding author

Η μελέτη σχεδιάστηκε για να προσδιορίσει τον επιπολασμό του κρυπτοκοκκικού αντιγόνου ορού (CrAg) μεταξύ ασθενών με HIV λοίμωξη στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο του Μπενίν (UBTH), στην πολιτεία Έντο της Νιγηρίας. Τα κλινικά συμπτώματα, οι παράγοντες κινδύνου και το ιστορικό ορισμένων ασθενειών σε συνδυασμό με το CrAg προσδιορίστηκαν σε 200 ασθενείς με HIV λοίμωξη ηλικίας 18 έως 71 ετών, χρησιμοποιώντας την ανοσοχρωματογραφία ανίχνευσης του κρυπτοκοκκικού αντιγόνου (CrAg LFA). Ο αριθμός CD4 κάθε ασθενή προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας το σύστημα μέτρησης BD FACS κυτταρικού διαλογέα ενεργοποιημένου με φθορισμό. Χρησιμοποιήθηκε ένα δομημένο ερωτηματολόγιο για τη συλλογή πληροφοριών σχετικά με τα δημογραφικά χαρακτηριστικά, και το ιατρικό ιστορικό των ασθενών. Το 90% των ασθενών είχαν ιστορικό λήψης θεραπείας ART και το 10% δεν είχαν λάβει ποτέ. Στη μελέτη σε 4,5% ανιχνεύθηκε κρυπτοκοκκική αντιγοναιμία. Το ποσοστό μόλυνσης ήταν υψηλότερο μεταξύ των ασθενών που δεν είχαν λάβει ART 5/20 (25%) από ό,τι στην ομάδα 4/180 που είχε λάβει θεραπεία (2,2%). Η ηλικία δεν είχε σημαντική συσχέτιση με το CrAg ($P = 0,731$). Η συσχέτιση μεταξύ της ποσότητας CrAg ορού και του αριθμού CD4 βρέθηκε να είναι σημαντική ($P < 0,001$). Περισσότερες γυναίκες ήταν θετικές στο CrAg σε σύγκριση με τους άντρες, αλλά αυτή η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Το ιστορικό προηγούμενων ασθενειών, όπως η φυματίωση, η ηπατίτιδα και ο σακχαρώδης διαβήτης δεν ήταν στατιστικά σημαντικό μεταξύ των ασθενών. Η έκθεση σε παράγοντες κινδύνου, όπως η πρόσληψη αλκοόλ, η χρήση στεροειδών και η ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών ήταν στατιστικά σημαντική, ενώ το κάπνισμα και η έκθεση σε περιττώματα περιστερών ήταν μη στατιστικά σημαντική. Αν και ο επιπολασμός του CrAg ορού ήταν χαμηλός στην παρούσα μελέτη, οι παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την κρυπτοκοκκωση πρέπει να αποφεύγονται. Επιπλέον, θα πρέπει να εφαρμόζεται έλεγχος ρουτίνας για τη βελτίωση της υγείας και τη μείωση της νοσηρότητας. Σε αυτή τη μελέτη βρέθηκε επίσης ότι η κρυπτοκοκκική λοίμωξη αφορά ασθενείς με AIDS και όχι ασθενείς με HIV, όπως γενικά γίνεται αντιληπτό.



Λέξεις κλειδιά

Επιπολασμός κρυπτοκοκκικού αντιγόνου, CrAg, ορός, AIDS, HIV

References

1. Capoor MR, Nair D, Deb M, Gupta B, Aggarwal P. Clinical and mycological profile of cryptococcosis in a tertiary care hospital. *Indian J Med Microbiol* 2007; 25:401-404.
2. May RC, Stone NR, Wiesner DL, Bicanic T, Nielsen K. *Cryptococcus* from environmental saprophyte to global pathogen. *Nat Rev Microbiol* 2016; 14:106–117.
3. Herkert P, Hagen F, Pinheiro R, Muro M, Meis J, Flávio Q. Epidemiology of *Cryptococcus gattii* in developing countries. *J Fungi* 2017; 3:62
4. Chen SCA, Meyer W, Sorrell TC. *Cryptococcus gattii* infection. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27:980 – 1024.
5. Castelnuovo B, Manabe YC, Kiragga A, Kanya M, Easterbrook P, Kambugu A. Cause-specific mortality and the contribution of immune reconstitution inflammatory syndrome in the first 3 years after antiretroviral therapy initiation in an urban African cohort. *Clin Infect Dis* 2009; 49:965-997.
6. Garcia-Hermoso D, Janbon G, Dromer F. Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3204-3209
7. Aberg JA, Powderly WG. Cryptococcosis. *Adv Pharmacol* 1997; 37:215 – 251.
8. Hung MS, Tsai YH, Lee CH, Yang CT. Pulmonary cryptococcosis: clinical, radiographical and serological markers of dissemination. *Respirology* 2008; 13:247-251.
9. Perfect JR, Casadevall A. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am* 2002; 16:837-874.
10. Kumar S, Wanchu A, Chakrabarti A, Sharma A, Bambery P, Singh S. Cryptococcal meningitis in HIV infected: experience from a North Indian tertiary center. *Neurol India* 2008; 56:444-449.
11. Sloan D, Dlamini S, Dedicoat M. Management of cryptococcal meningitis in resource-limited settings: a systematic review. *S Afr Med J* 2009; 99:310-312.
12. Lawn SD, Harries AD, Anglaret X, Myer L, Wood R. Early mortality among adults accessing antiretroviral treatment programs in sub-Saharan Africa. *AIDS* 2008; 22:1897- 1908.
13. Baradkar V, Mathur M, De A, Kumar S, Rathi M. Prevalence and clinical presentation of Cryptococcal meningitis among HIV seropositive patients. *Indian J Sex Transm Dis AIDS* 2009; 30:19-22.
14. Mahale K, Patil SS, Ravikumar RF, Mahale R. Prevalence of Cryptococcal meningitis among immunocompetent and immuno-compromised individuals in Bellary, South India: a prospective study. *J Clin Diagn Res* 2012; 6:288-292.
15. Rajasingham R, Meya DB, Boulware DR. Integrating cryptococcal antigen screening and pre-emptive treatment into routine HIV care. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012; 59:85–91.
16. John EB. Cryptococcosis In: Kasper DL, Fauci AS, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Jameson JL, (eds). *Harrison's Principles of Internal Medicine (16th edition) McGraw-Hill* New York. 2005:p 1183-1184.
17. Jean SS, Fang CT, Shau WY, Chen YC, Chang SC, Hsueh PR, et al. Cryptococcaemia: clinical features and prognostic factors. *QJM* 2002; 95:511-518.
18. Neville S, Dromer F, Morin O, Dupond B, Romin O, Lorthotary O. French cryptococcosis study group, primary cutaneous cryptococcosis: a distinct clinical entity. *Clin Infect Dis* 2003; 36:211-212.
19. Sungkanuparpho S, Tanphaichitra D, Prachaktam R. Chronic diarrhea caused by *Cryptococcus neoformans* in a non-human immunodeficiency virus-infected patient. *Scand J Infect Dis* 2003; 35:211-215
20. Jarvis J, Percival A, Bauman S, Pelfrey J, Meintjes G, Williams G. Evaluation of a novel point of care Cryptococcal Antigen Test on Serum, Plasma and Urine from Patients with HIV associated Cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis* 2011; 53:1019-1023.
21. Lotholary O, Poizat G, Zeller V, Neuville S, Boibieux A, Alvarez M. Long-term outcome of AIDS associated cryptococcosis in the era of combination antiretroviral therapy. *AIDS* 2006; 20:2183-2191.
22. Kambugu A, Meya DB, Rhein J, O'Brien M, Janoff EN, Ronald AR, et al. Outcomes of cryptococcal meningitis in Uganda before and after the availability of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2008; 46:1694-1701.
23. Gabriel J, Ogbaini-Emovon E, Okwara BU, Onunu A, Kubeyinje E. Prevalence of disseminated cryptococcosis among Human Immunodeficiency Virus infected patients in Benin City, Nigeria. *Br J Med Med Res* 2015; 6:715-722.
24. Egbe CA, Omoregie R, Ighodalo CA. *Cryptococcus neoformans* infection among human immunodeficiency virus patients on highly active antiretroviral therapy in Benin city, Nigeria. *New Zealand J Medical Lab Sci* 2015; 69:21-23.
25. Ogbeibu AE. Biostatistics: A Practical Approach to Research and Data Handling (2nd ed.). Mindex publishing company, Benin City, Nigeria. 2015:pp 246
26. Vidal JE, Boulware DR. Lateral flow assay for cryptococcal antigen: An important advance to improve the continuum of HIV care and reduce cryptococcal meningitis-related mortality. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2015; 57:38-45.
27. Kozel TR, Bauman SK. CrAg lateral flow assay for cryptococcosis. *Expert Opin Med Diagn* 2012; 6:245–251.



28. Chukwuanuku R, Manafa P, Iloghalu E, Onyenekwe C, Ifeanyichukwu M, Mbamalu C. *Cryptococcal neoformans* antigenaemia in HIV- positive pregnant women attending a PMTCT clinic in South-East Nigeria. *J Biol Agricult Healthc* 2013; 3:15-20.
29. Alemu AS, Kempker RR, Tenna A, Smitson C. High prevalence of cryptococcal antigenemia among HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy in Ethiopia. *PLoS One* 2013; 8:e58377.
30. McKenney J, Smith RM, Chiller TM. Prevalence and correlates of cryptococcal antigen positivity among AIDS patients United State 1986-2012. *MMWR* 2014; 63:585-587.
31. Smith RM, Nguyen TA, Ha HTT, Thang PH, Thuy C, Lien TX, *et al.* Prevalence of cryptococcal antigenemia and cost effectiveness of a cryptococcal antigen screening program- Vietnam. *PLoS One* 2013; 8:e62213.
32. Ogba OM, Abia-Bassey L. Cryptococcal antigenemia among HIV seropositive patients accessing care in antiretroviral therapy (ART) clinics in Calabar, South Southern Nigeria. *Microbiol Discov* 2015; 3:7
33. Harris JR, Lindsley MD, Henchaichon S. High prevalence of cryptococcal infection among HIV infected patients hospitalized with pneumonia in Thailand. *Clin Infect Dis* 2012; 54:43 -50.
34. Osazuwa F, Dirisu JO, Okuonghae PE, Ugbebor O. Screening for cryptococcal antigenemia in anti-retroviral naive AIDS patients in Benin City, Nigeria. *Oman Med J* 2012; 27:228–231.
35. Jarvis JN, Lawn SD, Vogt M, Bangani N, Wood R. Screening for cryptococcal antigenemia in patients accessing an antiretroviral treatment program in South Africa. *Clin Infect Dis* 2009; 48:856–862.
36. Jarvis JN, Meintjes G, Harrison TS. Outcome of cryptococcal meningitis in antiretroviral naïve and experienced patients in South Africa. *J Infect* 2010; 60:496-498.

ΔΕΛΤΙΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ

Οδηγίες προς τους συγγραφείς

Γενικά στοιχεία - Σκοπός του περιοδικού

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

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

Πρόσβαση στο περιοδικό

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

Διαδικασία υποβολής προς δημοσίευση

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

Είδη άρθρων προς δημοσίευση

Δημοσιεύονται οι παρακάτω κατηγορίες άρθρων:

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

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

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

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

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



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

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

Ορισμός συγγραφέα άρθρου

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

Ευχαριστίες

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

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

Σύγκρουση συμφερόντων

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

[http://www.icmje.org/ethical_4conflicts.html]. 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 Συζήτηση**. Στο Υλικό και Μέθοδοι περιγράφεται λεπτομερώς ο τρόπος επιλογής του υλικού ή των ασθενών, καθώς και οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν, ώστε η έρευνα να μπορεί να αναπαραχθεί από ερευνητές που επιθυμούν την εφαρμογή της. Σε περιπτώσεις ερευνών που αφορούν σε ανθρώπους, πρέπει να διευκρινίζεται ότι τηρήθηκε η Διακήρυξη του Ελσίνκι (1975) και θα πρέπει να αναφέρεται εάν η μελέτη έχει λάβει έγκριση από την αντίστοιχη Επιτροπή Βιοηθικής και Δεοντολογίας. Στα αποτελέσματα θα πρέπει να αναφέρονται αναλυτικά τα αποτελέσματα με μορφή κειμένου ή πινάκων (όσο πιο συνοπτικά γίνεται, χωρίς επαναλήψεις). Στη συζήτηση μπορεί να γίνει σύγκριση με τα αποτελέσματα άλλων εργασιών και να αναφέρονται τα συμπεράσματα, τα οποία προκύπτουν από τα αποτελέσματα της μελέτης. Ανάλογα με το μέγεθος του άρθρου μπορεί να γίνει σύντμηση των κεφαλαίων των αποτελεσμάτων και της συζήτησης σε ένα κεφάλαιο (Αποτελέσματα-Συζήτηση).

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

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

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



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

Στη **βιβλιογραφία** ακολουθείται το διεθνές σύστημα Vancouver. Επειδή η αναπαραγωγή των άρθρων από τις ιστοσελίδες ανεύρεσης δεν μεταφέρει απόλυτα όλα τα τυπογραφικά στοιχεία (π.χ. ειδικά γράμματα) οι συγγραφείς για να εξασφαλίσουν την ορθή απόδοση των αναφορών θα πρέπει να ανατρέχουν στο τυπωμένο κείμενο, είτε σε έντυπη, είτε σε ηλεκτρονική μορφή (αρχεία .pdf). Όλοι οι συγγραφείς ενός άρθρου θεωρούνται από κοινού υπεύθυνοι για την σωστή αναπαραγωγή των βιβλιογραφικών αναφορών του άρθρου και η συντακτική ομάδα του περιοδικού δεν ελέγχει την τυπογραφική ακρίβειά τους. Κόστος διόρθωσης λάθους αναφοράς που τυχόν ζητηθεί από τρίτο άτομο μετά την τελική εκτύπωση του τεύχους του περιοδικού, επιβαρύνει εξ ολοκλήρου τους συγγραφείς. Η αρίθμηση των αναφορών στο κείμενο γίνεται με την σειρά που αναφέρονται στο κείμενο, με αραβικούς αριθμούς, ως εκθέτες, μετά τα σημεία στίξης (π.χ.: η συγκεκριμένη παρατήρηση έχει αναφερθεί αρχικά από τους Jones και συν.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 ανητημένες), δεν περιλαμβάνονται στην βιβλιογραφία, αλλά μπορεί να παρατίθενται σε παρένθεση στο κείμενο, εφόσον δεν έχουν παρέλθει πάνω από δύο έτη από την παρουσίασή τους, αναφέροντας το όνομα του πρώτου συγγραφέα, το συνέδριο και την σελίδα του τόμου πρακτικών (π.χ. Juncosa B et al, XVII Lancefield International Symposium on Streptococci & Streptococcal Diseases, Porto Heli, Greece, 2008, pp63). Με παρόμοιο τρόπο θα πρέπει να αναγράφονται και οι

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

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

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

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

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

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

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

Διαδικασία κρίσης

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



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

JOURNAL OF THE HELLENIC MICROBIOLOGICAL SOCIETY

Instructions to authors

General features – Scope of the Journal

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

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

Access to the Journal

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

Submission procedure for publication

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

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

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

Types of papers for publication

The following types of articles are published in the journal:

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

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

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



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

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

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

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

Defining the author of an article

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

[http://www.icmje.org/ethical_1author.html].

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

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

Acknowledgements

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

Conflict of interest

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

[http://www.icmje.org/ethical_4conflicts.html].

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

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

Guidelines for writing articles

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

ferences 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 5 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/dkr 138).

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 clarifica-

tions 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 cor-



rections 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.