

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ  
ΕΡΓΑΣΙΑ\_ΠΟΛΟΥΦΗ  
ΔΗΜΗΤΡΑ  
*by* ΧΡΥΣΟΥΛΑ ΔΙΟΛΗ

---

**Submission date:** 28-Sep-2021 12:15AM (UTC+0300)

**Submission ID:** 1659126050

**File name:** \_.pdf (883.02K)

**Word count:** 9065

**Character count:** 55871



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ  
UNIVERSITY OF WEST ATTICA

31

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μοριακή ανίχνευση γονιδίων και μηχανισμών ανάπτυξης  
αντιμικροβιακής αντοχής σε στελέχη *Escherichia coli***

Όνοματεπώνυμο Φοιτήτριας (ΑΜ)

Δήμητρα Πολονύφη (ΑΜ: 62116018)

Όνοματεπώνυμο Επιβλέποντα: Αποστολός Μπελούκας

Αθήνα, 2021



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ  
UNIVERSITY OF WEST ATTICA

FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES

SECTION OF MEDICAL LABORATORIES

DISSERTATION

**Molecular detection of genes and mechanisms for the development of antimicrobial resistance in Escherichia coli strains**

Student Name (CN)

Dimitra Polonifi (62116018)

Name of Supervisor: Apostolos Beloukas

Athens, 2021



## Ευχαριστίες – Αφιερώσεις

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2020-2021, υπό την επίβλεψη του κύριου Απόστολου Μπελούκα, τον οποίο και θέλω να ευχαριστήσω θερμά για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ τόσο μαζί του όσο και με τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, αλλά και για την επιστημονική του καθοδήγηση και υποστήριξη από την αρχή της συνεργασίας μας.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτωρ του τμήματος Βιοϊατρικών επιστημών του τομέα ιατρικών εργαστηρίων Χρυσούλα Διολή, για τις σημαντικές συμβουλές της κατά την εκτέλεση των απαραίτητων για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας πειραματικών διαδικασιών, καθώς και για την υπομονή και την προθυμία της να λύσει οποιαδήποτε απορία και προβληματισμό μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την ψυχολογική υποστήριξη, την κατανόηση και την αγάπη που μου έδειξαν και συνεχίζουν να μου δείχνουν σε κάθε βήμα της ζωής μου. Αυτή την εργασία την αφιερώνω στους γονείς μου Μαρία και Κώστα καθώς και στα αδέρφια μου Ταξιάρχη και Γιώργο.

## Περίληψη

Η ανακάλυψη και η εφαρμογή των αντιβιοτικών για την πρόληψη και τη θεραπεία των ασθενειών, τόσο στην ιατρική όσο και την κτηνιατρική αποτέλεσε σταθμό στην ιατρική επιστήμη. Όμως η ευρεία και πολλές φορές αλόγιστη χρήση τους, έχει οδηγήσει σε ανησυχητική αύξηση των ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών, δυσκολεύοντας έτσι την θεραπεία των λοιμώξεων. Το φαινόμενο της μικροβιακής αντοχής αποτελεί πλέον ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα δημόσιας υγείας του 21ου αιώνα. Τα ανθεκτικά βακτήρια δεν εντοπίζονται μόνο στο περιβάλλον του νοσοκομείου. Βάσει της διεθνούς βιβλιογραφίας ανθεκτικοί μικροοργανισμοί εντοπίζονται συνεχώς στο υδάτινο περιβάλλον (όπως ποτάμια, λίμνες), στα λύματα και στο έδαφος. Σε αυτά τα ενδιαιτήματα ευνοείται η οριζόντια μεταφορά γονιδίων αντοχής, συμβάλλοντας στην περαιτέρω εξάπλωση των ανθεκτικών πληθυσμών. Επιπλέον, τα επιβαρυνόμενα ποτάμια (αποδέκτες λυμάτων) αποτελούν πηγή μόλυνσης από ανθεκτικά και πολύ-ανθεκτικά βακτήρια καθώς συχνά αξιοποιούνται για αρδευτικούς και ψυχαγωγικούς (ψάρεμα, κωπηλασία, κολύμπι) σκοπούς. Το βακτήριο *Escherichia coli* (*E. coli*) καθώς συγκαταλέγεται στους φυσιολογικούς άποικους του γαστρεντερικού σωλήνα των ανθρώπων και των άλλων θερμόαιμων ζώων, καταλήγει στο λύμα και μέσω αυτού στο υδάτινο οικοσύστημα. Αποτελεί βασικό και καθιερωμένο δείκτη πρόσφατης κοπρανώδους μόλυνσης των υδάτων. Επιπρόσθετα, είναι η πιο κοινή αιτία ουρολομώξεων και γαστρεντερίτιδων, τόσο στο νοσοκομειακό περιβάλλον όσο και στη κοινότητα. Επομένως η εμφάνιση ανθεκτικών και πολύ-ανθεκτικών στελεχών *E. coli* έχει προκαλέσει τεράστια ανησυχία στην επιστημονική κοινότητα. Για αυτό το λόγο, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μοριακή ανίχνευση γονιδίων αντιμικροβιακής αντοχής σε στελέχη *E. coli*, τα οποία απομονώθηκαν τον Ιούλιο του 2020 από το Ποτάμι Έρκυνα της Λιβαδειάς, στο οποίο εκβάλλει το λύμα της Μονάδας Επεξεργασίας Λυμάτων της περιοχής. Συνολικά απομονώθηκαν τριάντα ένα (31) στελέχη *E. coli*, τα οποία υποβλήθηκαν: α) σε έλεγχο μικροβιακής ευαισθησίας σε 18 ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά, β) σε φυλογενετική ταξινόμηση με τη μοριακή μέθοδο του Phylogrouping και γ) σε έλεγχο παρουσίας γονιδίων αντοχής με την μέθοδο της PCR. Βάσει των αποτελεσμάτων η πλειοψηφία των στελεχών (23/31 ή 74,2%) εμφάνισε αντοχή σε τουλάχιστον ένα αντιβιοτικό παράγοντα ενώ σε 4 στελέχη ανιχνεύθηκαν γονίδια που προσδίδουν αντοχή σε καφαλοσπορίνες εκτεταμένου φάσματος. Σύμφωνα με τη φυλογενετική τυποποιητική μέθοδο, κατατάχθηκαν σε 4 ομάδες με την ομάδα A να είναι επικρατέστερη (20/31 ή 64,50%).

## Abstract

The discovery and application of antibiotics for the prevention and treatment of diseases, both in medicine and veterinary medicine was a milestone in medical science. However, their widespread and often reckless use has led to a worrying increase in resistant bacterial strains, making it difficult to treat infections. The phenomenon of antimicrobial resistance is now one of the most serious public health problems of the 21st century. Resistant bacteria are not only found in the hospital environment. According to the international literature, resistant microorganisms are constantly found in the aquatic environment (such as rivers, lakes), sewage and soil. Horizontal transfer of resistance genes is favored in these habitats, contributing to the further spread of resistant populations. In addition, polluted rivers (sewage recipients) are a source of contamination by resistant and highly resistant bacteria as they are often used for irrigation and recreational purposes (fishing, rowing, swimming).

The bacterium *Escherichia coli* (*E. coli*) as one of the normal colonists of the gastrointestinal tract of humans and other warm-blooded animals, ends up in the sewage and through it in the aquatic ecosystem. It is a basic and well-established indicator of recent faecal water contamination. In addition, it is the most common cause of urinary tract infections and gastroenteritis, both in the hospital setting and in the community. Therefore, the emergence of resistant and highly resistant *E. coli* strains has caused great concern in the scientific community. For this reason, the purpose of this dissertation was the molecular detection of antimicrobial resistance genes in *E. coli* strains, which were isolated in July 2020 from the Erkyna River in Livadia, where the effluent of the wastewater treatment plant in the area flows. Thirty-one (31) *E. coli* strains were isolated, which underwent: a) microbial susceptibility testing to 18 widely used antibiotics, b) phylogenetic classification by the Phylogrouping method, and c) resistance gene testing by resistance method of PCR. Based on the results, the majority of strains (23/31 or 74.2%) showed resistance to at least one antibiotic agent, while in 4 strains genes were identified that confer resistance to broad-spectrum cephalosporins. According to the phylogenetic standardization method, they were classified into 4 groups with group A being predominant (20/31 or 64.50%).

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες – Αφιερώσεις.....	i
Περίληψη.....	ii
Abstract.....	iii
1.1 Εισαγωγή.....	1
1.2 Αντιβιοτικά και Μικροβιακή Αντοχή.....	2
1.3 Χαρακτηριστικά του βακτηρίου <i>Escherichia coli</i> .....	6
1.4 Υδάτινο οικοσύστημα και διασπορά ανθεκτικών στελεχών <i>E. coli</i> .....	7
1.5 Εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες.....	9
1.6. OXA-48.....	12
Σκοπός της εργασίας.....	16
2.1 Συλλογή και ταυτοποίηση στελεχών <i>E. coli</i> .....	16
2.2 Έλεγχος επιπέδων ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.....	17
2.3 Έλεγχος παρουσίας γονιδίων αντοχής με την μέθοδο της PCR.....	20
2.4 Τυποποίηση με την μέθοδο του Phylogrouping.....	21
2.5 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτική αгарόζη.....	22
3.1 Αποτελέσματα επιπέδων ευαισθησίας στα αντιβιοτικά.....	24
3.2 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης των στελεχών – Phylotyping.....	27
3.3 Αποτελέσματα της PCR για τον έλεγχο παρουσίας γονιδίων αντοχής.....	28
Ανακεφαλαίωση.....	31
Συζήτηση.....	32



## ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Διάγραμμα Venn που απεικονίζει τους τρεις τομείς της Ενιαίας Υγείας (One Health).....	2
Εικόνα 2: Μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών διαφορετικών κατηγοριών.....	3
Εικόνα 3: Τα κύρια βιολογικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη αντοχής στα αντιβιοτικά. (Α) Κάθετη μετάδοση (Β) Οριζόντια μετάδοση.....	4
Εικόνα 4: Βασικοί μηχανισμοί αντοχής.....	5
Εικόνα 5 : Επιλεκτική πίεση που ασκούν τα αντιβιοτικά στους βακτηριακούς πληθυσμούς.....	8
Εικόνα 6: Παραδείγματα των διαφορετικών γενετικών υποβάθρων των γονιδίων blaCTX-M.....	11
Εικόνα 7: Οι έξι γνωστές ομάδες των β-λακταμασών τύπου CTX-M.....	11
Εικόνα 8: Παγκόσμια κατανομή των γονότυπων CTX-M [9].....	12
Εικόνα 9 : Σχηματική αναπαράσταση της δομής των τρανσποζονίων.....	14
Εικόνα 10: Παράδειγμα θετικής DDS δοκιμασίας.....	19
Εικόνα 11: Διάγραμμα που δείχνει τον τρόπο ταξινόμησης των στελεχών στις φυλογενετικές ομάδες.....	21
Εικόνα 12 : Διαγραμματική απεικόνιση των συχνοτήτων εμφάνισης των διαφορετικών προφίλ αντοχής WT, R, MDR των στελεχών <i>E. coli</i> .....	26
Εικόνα 13 : Διαγραμματική απεικόνιση των ποσοστών αντοχής (R:resistance) και ευαισθησίας (S: sensitive) στον κάθε αντιμικροβιακό παράγοντα.....	26
Εικόνα 14 : Διαγραμματική απεικόνιση των ποσοστών εμφάνισης των φυλογενετικών ομάδων A, B1, B2 και D.....	27
Εικόνα 15: Συσχέτιση μεταξύ φυλογενετικής ομάδας και προφίλ αντοχής (WT, R, MDR).....	28

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Κατηγορίες αντιβιοτικών και στόχος δράσης.....	4
Πίνακας 2 : Παθογόνα είδη E. coli και νόσος που προκαλεί.....	6
Πίνακας 3. Ανθεκτικά στελέχη και πολύ-ανθεκτικά E. coli (% R) που απομονώθηκαν από ανθρώπινα δείγματα (αίμα ή εγκεφαλονωτιαίο υγρό) στην Ευρώπη [28].....	9
Πίνακας 4: Ποσοστά εμφάνισης στελεχών E. coli που παράγουν εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες σε διάφορες χώρες πριν και μετά το 2010 .....	10
Πίνακας 5: Δίσκοι αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν.....	18
Πίνακας 6: Πληροφορίες σχετικά με τη φυλογενετική ομάδα, των προφίλ και προτύπων αντοχής των στελεχών E. coli που απομονώθηκαν από τον ποταμό Έρκυνα, 100 από την έξοδο του βιολογικού καθαρισμού.....	25
Πίνακας 7: Αποτελέσματα του ελέγχου παρουσίας γονιδίων αντοχής.....	29
Πίνακας 8: Σύνοψη των αποτελεσμάτων των σημαντικών στελεχών.....	30

# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

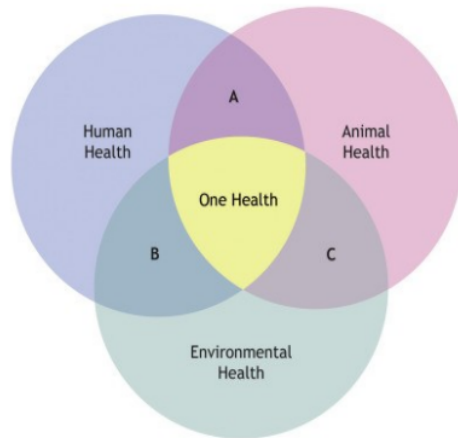
## 1.1 Εισαγωγή

Οι άνθρωποι συνεχώς αλληλεπιδρούν με τα υπόλοιπα ζώα, καθώς μοιράζονται με αυτά το ίδιο περιβάλλον, γεγονός που υποδηλώνει αυτόματα πως η υγεία του ανθρώπου συνδέεται άμεσα με την υγεία των ζώων και του ευρύτερου περιβάλλοντος. Επομένως τα ζητήματα που απασχολούν την Δημόσια/Παγκόσμια υγεία θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ολιστικά και όχι μεμονωμένα. Αυτό ακριβώς προεβλέπει η Ενιαία Υγεία (One Health), μια παγκόσμια στρατηγική που στοχεύει στην εξάπλωση της διεπιστημονικής συνεργασίας και επικοινωνίας, σε όλους τους τομείς που σχετίζονται με την υγεία των ανθρώπων των ζώων και του περιβάλλοντος [Εικόνα 1][1, 2].

Η ιδέα της Ενιαίας Υγείας δεν είναι καινούργια. Ο όρος πρωτο-χρησιμοποιήθηκε το 1947 από τον Δρ. James Steele, ιδρυτή του τμήματος κτηνιατρικής δημόσιας υγείας στο CDC των ΗΠΑ, ο οποίος συνέδεσε την ανθρώπινη υγεία και την υγεία των ζώων με τον όρο «One Medicine», ενώ το 2008, όπου σημειώθηκε πανδημία γρίπης των πτηνών, ο όρος απέκτησε οντότητα και η Ενιαία Υγεία εντάχθηκε επισήμως στις πολιτικές υγείας [1, 3].

Ωστόσο, τη σήμερον εποχή η άμεση συνεργασία ειδικών διαφορετικών ειδικοτήτων υπό το πρίσμα μιας Ενιαίας, σφαιρικής αντιμετώπισης έχει καταστεί πιο σημαντική από ποτέ. Η παγκοσμιοποίηση και το παγκόσμιο εμπόριο, η αύξηση των ταξιδιών, το μεταναστευτικό ρεύμα, οι κλιματολογικές αλλαγές και οι αλλαγές στην κτηνοτροφία καθιστούν αναγκαία την άμεση χάραξη πολιτικών δημόσιας υγείας βασισμένες στο τρίπτυχο άνθρωπος-ζώα-περιβάλλον[1, 4].

Η σημασία της εφαρμογής της ενιαίας υγείας έχει αρχίσει να κερδίζει έδαφος για την επίλυση σοβαρών λοιμωδών νοσημάτων του ανθρώπου, το μεγαλύτερο μέρος των οποίων είναι ζωοανθρωπονόσοι, καθώς και του ζητήματος της μικροβιακής αντοχής που πλήττει το σύστημα υγείας και το οποίο σχετίζεται μεταξύ άλλων και με την αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών σε ανθρώπους και κτηνοτροφία. Η μικροβιακή αντοχή τα τελευταία χρόνια έχει λάβει τεράστιες διαστάσεις και πλέον έχει γίνει αντιληπτό ότι η αντιμετώπιση της απαιτεί διακρατικές και διηπειρωτικές συνεργασίες [5, 6, 7, 8, 9].



Εικόνα 1: Διάγραμμα Venn που απεικονίζει τους τρεις τομείς της Ενιαίας Υγείας (One Health) [1].

## 1.2 Αντιβιοτικά και Μικροβιακή Αντοχή

Ο όρος αντιβιοτικά αναφέρετε σε φυσικές, ημισυνθετικές ή συνθετικές ουσίες ικανές να θανατώνουν (μικροβιοκτόνα) ή να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό (μικροβιοστατικά) των μικροβίων [10]. Η ανακάλυψη των αντιβιοτικών θεωρείται σταθμός στην ιστορία της Ιατρικής καθώς έφερε τεράστιες αλλαγές στον κλάδο και αύξησε τη μέση διάρκεια ζωής του ανθρώπου κατά 23 χρόνια [11].

Υπάρχουν πολλές κατηγορίες αντιβιοτικών καθεμία από τις οποίες έχει συγκεκριμένο μικροβιακό φάσμα και συγκεκριμένο τρόπο και στόχο δράσης [Εικόνα 2, Πίνακας 1]. Ωστόσο, η ευεργετική τους δράση απειλείται λόγω της ανάπτυξης της μικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά [12,13].

Ως μικροβιακή αντοχή (Antimicrobial Resistance, AMR) ορίζεται το φαινόμενο κατά το οποίο οι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να επιβιώνουν παρουσία αντιβιοτικών [14]. Η αντοχή στα αντιβιοτικά μπορεί να είναι εγγενής είτε επίκτητη. Ωστόσο, αυτή που απασχολεί την επιστημονική κοινότητα είναι η επίκτητη καθώς η εγγενής είναι προκαθορισμένη και καλά μελετημένη [15].

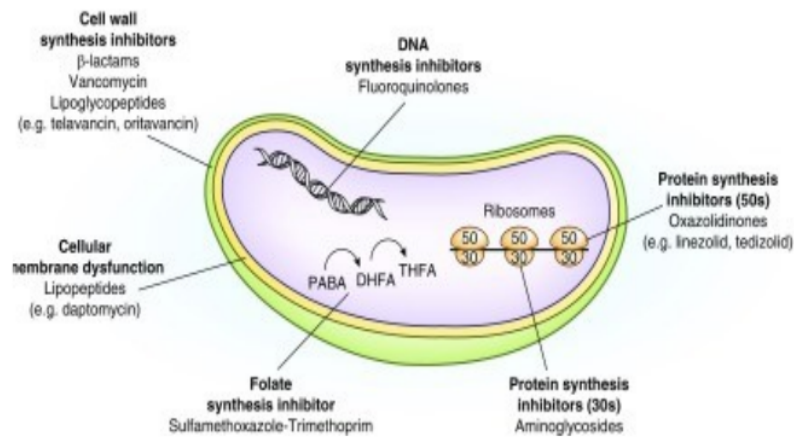
Η επίκτητη αντοχή είναι ένα βιολογικό φαινόμενο που οφείλεται: είτε Α) σε τυχαίες μεταλλάξεις στο γονιδίωμα του μικροοργανισμού, οι οποίες μεταβιβάζονται κάθετα στις επόμενες γενεές είτε Β) σε απόκτηση εξωγενών γενετικών στοιχείων όπως πλασμιδίων, τα οποία φέρουν γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα [Εικόνα 3] [8,16]. Τα εξωγενή

γενετικά στοιχεία δύναται να μεταφέρονται οριζοντίως μεταξύ των βακτηριακών πληθυσμών και αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω τριών βασικών μηχανισμών:

A) της σύζευξη (conjugation)

B) του μετασχηματισμού (transformation), δηλαδή μέσω της πρόσληψης και ενσωμάτωσης γυμνού DNA που προέρχεται από το περιβάλλον

Γ) της μεταγωγής (transduction), δηλαδή με τη μεσολάβηση βακτηριοφάγων [Εικόνα 3] [17].

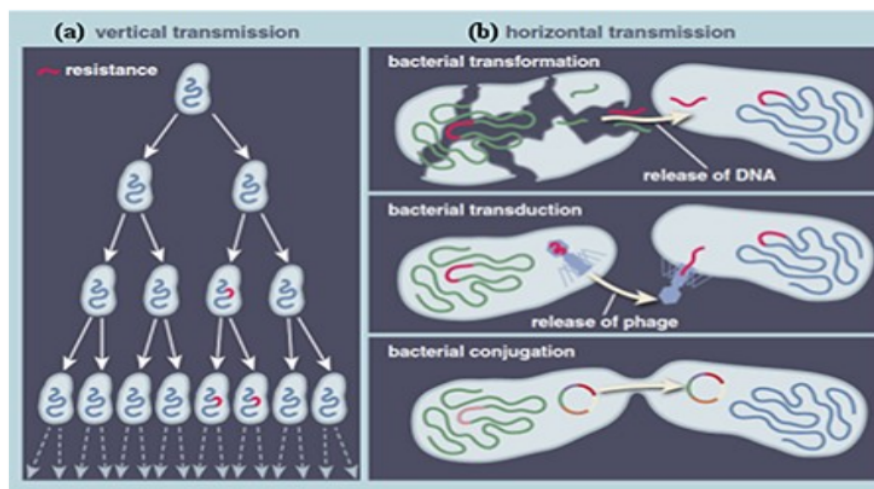


Εικόνα 2: Μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών διαφορετικών κατηγοριών [18].

**Πίνακας 1: Κατηγορίες αντιβιοτικών και στόχος δράσης [12].**

Αντιβιοτικά	Μηχανισμός δράσης/ Βιολογική λειτουργία που παρεμποδίζεται	Μηχανισμοί αντοχής
<b>β-Λακταμικά</b>	Σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος μέσω αδρανοποίησης των PBPs.	β-λακταμάσες: τροποποίηση πενικιλίνο-δεσμευτικές πρωτεΐνες <sup>1</sup> (penicillin-binding proteins, PBPs) ελαττωμένη κυτταρική διαπερατότητα, ενεργητική απέκκριση
<b>Αμινογλυκοσίδες</b>	Σύνθεση πρωτεϊνών	Τροποποιητικά ένζυμα, ριβοσωμικές αλλαγές, ελαττωμένη κυτταρική διαπερατότητα, ενεργητική απέκκριση
<b>Κινολόνες</b>	Σύνθεση DNA	Τροποποίηση DNA γυράσης και τοποϊσομεράσης IV, ενεργητική απέκκριση
<b>Τριμεθοπρίμη</b>	Μεταβολισμός φυλλικού οξέος	Ενεργητική απέκκριση, παράκαμψη στόχου

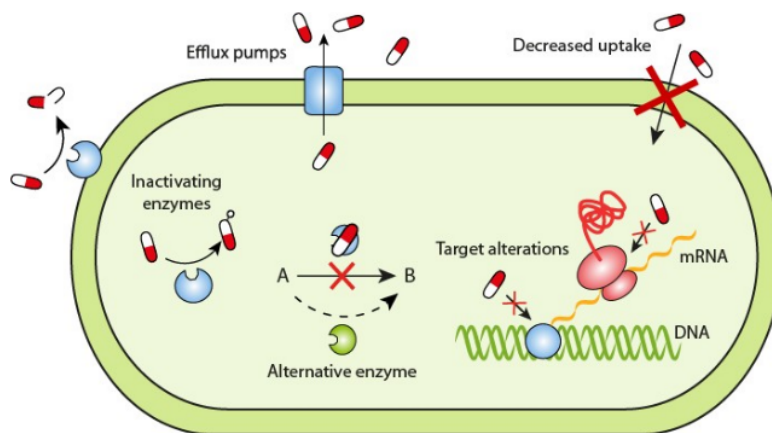
<sup>1</sup>Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην κατάλυση του τελικού σταδίου της σύνθεσης του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος



**Εικόνα 3: Τα κύρια βιολογικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη αντοχής στα αντιβιοτικά. (Α) Κάθετη μετάδοση (Β) Οριζόντια μετάδοση [19].**

1.2.1 Οι βασικοί μηχανισμοί που οδηγούν στην ανάπτυξη αντοχής είναι:

- (i) Μειωμένη έκφραση πορινών οδηγεί στην ελαττωμένη διαπερατότητα του βακτηριακού κυττάρου, γεγονός που καθιστά αδύνατη την είσοδο του αντιβιοτικού στο εσωτερικό του βακτηρίου.
- (ii) Αυξημένη έκφραση αντλιών εκροής, οδηγώντας στην ταχεία και άμεση αποβολή του αντιβιοτικού εκτός του κυττάρου, πριν ακόμα δράσει με το στόχο του
- (iii) Τροποποίηση του σημείου-στόχου του αντιβιοτικού λόγω κάποιας μετάλλαξης. Με αυτό τον τρόπο, η σύνδεση του αντιβιοτικού με το στόχο του παρεμποδίζεται και έτσι αντιμικροβιακή δράση εκμηδενίζεται.
- (iv) Παρουσία γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα που υδρολύουν τα αντιβιοτικά, τα οποία συχνά εδράζονται σε πλασμίδια. Λόγω του ότι τα πλασμίδια έχουν την ικανότητα να μεταδίδονται μεταξύ των βακτηρίων μέσω αυτών ευνοείται η εξάπλωση της μικροβιακής αντοχής [Εικόνα 4][20,21].



Εικόνα 4: Βασικοί μηχανισμοί αντοχής [22].



### 1.3 Χαρακτηριστικά του βακτηρίου *Escherichia coli*.

Το *E. coli* είναι gram-αρνητικό βακτήριο ραβδοειδούς σχήματος, μέλος της οικογένειας Enterobacteriaceae, το οποίο εντοπίζεται παντού στο περιβάλλον όπως στο χώμα, σε τρόφιμα ενώ ορισμένα στελέχη ανήκουν στη φυσιολογική μικροχλωρίδα του γαστρεντερικού σωλήνα του ανθρώπου και των θερμόαιμων ζώων. Ακόμα, αποτελεί καθιερωμένο δείκτη πρόσφατης κοπρανώδους μόλυνσης των υδάτων [23,24,25].

Η ομάδα των βακτηρίων *E. coli* είναι μεγάλη και χαρακτηρίζεται από υψηλή ετερογένεια. Τα περισσότερα στελέχη είναι αβλαβή και σημαντικά για την ομαλή λειτουργία του εντέρου. Ωστόσο, δύναται να προκαλέσουν ευκαιριακές λοιμώξεις, στις οποίες περιλαμβάνονται η γαστρεντερίτιδα και εξωεντερικές λοιμώξεις όπως ουρολοιμώξεις, η νεογνική μηνιγγίτιδα και βακτηριαμίες [26,27]. Αν και τα περισσότερα στελέχη του *E. coli* είναι αβλαβή υπάρχουν και αρκετά παθογόνα [Πίνακας 2], τα οποία προκαλούν σοβαρές λοιμώξεις. Αυτό το καταφέρνουν λόγω της απόκτησης συγκεκριμένων λοιμογόνων παραγόντων που εδράζονται σε πλασμίδια. Μερικές οροομάδες, σχετίζονται με μεγαλύτερη λοιμογόνο δράση, με το *E. coli* O157 να αποτελεί τη συνηθέστερη αιτία αιμορραγικής κολίτιδας [23,28,29].

**Πίνακας 2 :** Παθογόνα είδη *E. coli* και νόσος που προκαλεί [29].

Παθογόνο	Νόσος
<b>Εντεροπαθογόνο κολοβακτηρίδιο (EPEC)</b>	Βρεφική διάρροια σε υπανάπτυκτες χώρες . Υδαρής διάρροια και έμετοι, μη αιματηρά κόπρανα.
<b>Εντεροτοξινογόνο κολοβακτηρίδιο (ETEC)</b>	Διάρροια ταξιδιωτών. Βρεφική διάρροια σε αναπτυσσόμενες χώρες. Υδαρής διάρροια, έμετος, κράμπες, ναυτία, χαμηλός πυρετός.
<b>Εντεροαιμορραγικό κολοβακτηρίδιο (EHEC)</b>	Αρχικά υδαρής διάρροια, ακολουθεί διάρροια με ορατό αίμα (αιμορραγική κολίτιδα) κοιλιακές κράμπες . Πυρετός χαμηλός ή καθόλου μπορεί να εξελιχθεί σε ΑΟΣ(αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο).
<b>Εντεροδιεισδυτικό κολοβακτηρίδιο (EIEC)</b>	Νόσος των υπανάπτυκτων χωρών . μπορεί να εξελιχθεί σε δυσεντερία με κόπρανα αραιά και αιματηρά.
<b>Εντεροπροσκολλητικό κολοβακτηρίδιο (EAEC)</b>	Βρεφική διάρροια σε αναπτυσσόμενες χώρες. Διάρροια ταξιδιωτών . επίμονη υδαρής διάρροια με έμετο, αφυδάτωση και δεκαπική πυρετική κίνηση.

Το *E. coli* αν και δεν έχει καμία εγγενή αντοχή σε αντιβιοτικά, συνεχώς παρατηρούνται ανθεκτικά στελέχη. Το 2019, στην Ευρώπη το 57,1% των στελεχών *E. coli* παρουσίασε αντοχή στις αμινοπενικιλίνες, το 23,8% στις φλουοροκινολόνες ενώ η συχνότητα αντοχής στις κεφαλοσπορίνες 3<sup>ης</sup> γενιάς και στις αμινογλυκοσίδες άγγιξε το 15,1% και 10,8%, αντίστοιχα [30]. Το γεγονός αυτό οφείλεται είτε στην απόκτηση κινητών γενετικών στοιχείων (όπως πλασμίδια, ιντεγκρόνια) που φέρουν γονίδια αντοχής, είτε σε σημειακές μεταλλάξεις.

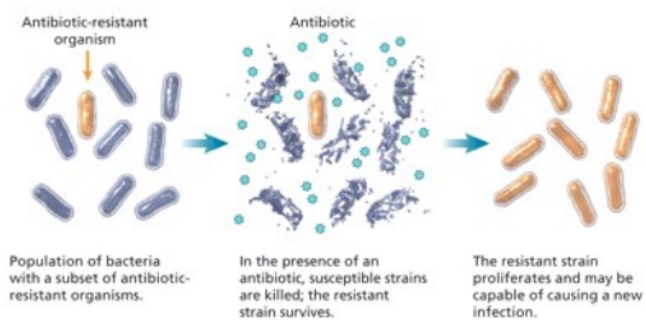
Χαρακτηριστικό παράδειγμα πλασμιδιακών γονιδίων που ανιχνεύονται συνεχώς τόσο σε κλινικά [31,32] όσο και σε περιβαλλοντικά στελέχη *E. Coli* [33,34] είναι αυτά που προσδίδουν αντοχή στις εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (expanded spectrum β-lactamases, ESBLs). Ένα άλλο παράδειγμα πλασμιδιακών γονιδίων που εντοπίζονται αρκετά συχνά σε εντεροβακτηριακά και ιδίως στο *E. coli*, είναι τα *mcr*, τα οποία προσδίδουν αντοχή στην κολιστίνη. *E. coli* που φέρουν *mcr* γονίδια συνήθως απομονώνονται από κόπρανα ή/και ιστούς ζώων (ιδίως χοίρων και πουλερικών) από νερό ποταμών [35,36] ενώ παράλληλα έχουν παρατηρηθεί και σε κλινικά στελέχη [37].

#### 1.4 Υδάτινο οικοσύστημα και διασπορά ανθεκτικών στελεχών *E. coli*

Τα βακτήριο *E. coli* ως φυσιολογικός άποικος της εντερικής μικροχλωρίδας συχνά έρχεται αντιμέτωπο με αντιβιοτικά, τα οποία ασκούν εξελικτική πίεση, ευνοώντας την επιβίωση άρα και την επικράτηση των στελεχών που είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά που καταναλώνονται από τον ξενιστή [Εικόνα 5] [38,39,40]. Η υπερβολική χρήση αντιβιοτικών και απολυμαντικών, τόσο στο νοσοκομείο όσο και στην κοινότητα καθώς και στην γεωργία και κτηνοτροφία, αυξάνει συνεχώς τις συγκεντρώσεις τους στο ευρύτερο περιβάλλον. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την συνεχή αύξηση και εξάπλωση των ανθεκτικών πληθυσμών [Πίνακας 3] [38,41].

Επιπλέον, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία τα αστικά και τα νοσοκομειακά λύματα αποτελούν σημαντική πηγή εντεροβακτηριδίων που παράγουν γονίδια αντοχής σε κεφαλοσπορίνες και καρβαπενέμες [42,43]. Στο υδάτινο οικοσύστημα (π.χ. ποτάμια και λίμνες) συνεχώς εντοπίζονται ανθεκτικά και πολύ-ανθεκτικά στελέχη *E. coli*, συμπεριλαμβανομένου των ανθεκτικών στις εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες, γεγονός που σχετίζεται με την απελευθέρωση λυμάτων (αστικού και νοσοκομειακού) στους υδάτινους αποδέκτες. Επειδή, τα γονίδια αντοχής κυρίως εδράζονται σε κινητές γενετικές μονάδες (όπως πλασμίδια) μεταφέρονται εύκολα από βακτήριο σε βακτήρια, συμβάλλοντας έτσι στην περαιτέρω αύξηση της διασποράς της αντοχής [43,44].

Το νερό των ποταμών παίζει σημαντικό ρόλο στη εξάπλωση των ανθεκτικών βακτηρίων στο υπόλοιπο οικοσύστημα καθώς χρησιμοποιείται για την άρδευση καλλιεργειών αλλά και για δραστηριότητες όπως κωπηλασία, κολύμπι και άλλα [39, 45]. Ως εκ τούτου, μπορεί να αποτελέσει πηγή λοίμωξης από ανθεκτικά ή/και πολύ-ανθεκτικά στελέχη, εκθέτοντας σε κίνδυνο την υγεία του ανθρώπου [43].



Εικόνα 5 : Επιλεκτική πίεση που ασκούν τα αντιβιοτικά στους βακτηριακούς πληθυσμούς [15].

**Πίνακας 3.** Ανθεκτικά στελέχη και πολύ-ανθεκτικά *E. coli* (% R) που απομονώθηκαν από ανθρώπινα δείγματα (αίμα ή εγκεφαλονωτιαίο υγρό) στην Ευρώπη [28].

Χώρα	Κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς	Φθοριοκινολόνες	Αμινογλυκοσίδες	Πόλυ-ανθεκτικά
<b>Ελλάδα</b>	<b>14.9</b>	<b>26.6</b>	<b>16.8</b>	<b>10.8</b>
Τουρκία	42.0	52.0	35.0	23.0
Κύπρος	36.2	47.4	23.9	18.2
Ηνωμένο Βασίλειο	9.6	17.5	8.2	3.6
Ιταλία	19.8	40.5	18.3	10.3
Βέλγιο	6.0	21.5	9.3	1.4
Δανία	8.5	14.1	6.4	3.0
Πολωνία	11.7	27.3	8.4	4.0
Ισπανία	12.0	34.5	14.8	4.9
Ρουμανία	22.0	30.4	19.6	10.9

### 1.5 Εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες

Στα gram-αρνητικά βακτήρια, ο κύριος μηχανισμός αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά είναι η παρουσία γονιδίων που εκφράζουν αντοχή για εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (expanded spectrum β-lactamases, ESBLs). Τόσο σε μονάδες υγειονομικής περίθαλψης όσο και στην κοινότητα, ο επιπολασμός των περιστατικών λοιμώξεων από βακτήρια που παράγουν ESBLs αυξάνεται παγκοσμίως [Πίνακας 4] [46,47].

Τα ESBL προσδίδουν αντοχή σε ευρύ φάσμα αντιβιοτικών β-λακτάμης, συμπεριλαμβανομένων των πενικιλινών (π.χ. αμικικιλίνη, πιπερακιλλίνη) και των κεφαλοσπορινών 1<sup>ης</sup>, 2<sup>ης</sup>, 3<sup>ης</sup>, και 4<sup>ης</sup> γενιάς (π.χ. κεφτριαξόνη, κεφοταξίμη και κεφταζιδίμη), καθώς και σε μονοβακτάμες (αζτρεονάμη) [6]. Ωστόσο, αδυνατούν να υδρολύσουν κεφαμυκίνες και καρβαπενέμες ενώ αναστέλλονται από το κλαβουλανικό οξύ ή την ταζομπακτάμη [48, 49, 50].

Είναι μια ταχέως εξελισσόμενη ομάδα β-λακταμασών τάξης A (βάσει την ταξινόμηση κατά Ambler), με τα ένζυμα CTX-M, TEM και SHV να αποτελούν τους βασικότερους εκπροσώπους. Παλαιότερα, οι κυρίαρχοι τύποι ESBL ήταν οι TEM και SHV, ωστόσο, την τελευταία δεκαετία, οι ESBL τύπου CTX-M είναι πλέον οι πιο διαδεδομένοι [7,48].

Η παρουσία ESBL τύπου CTX-M σχετίζεται συχνά με φαινοτύπους συν-αντοχής, ιδίως σε φθοροκινολόνες και αμινογλυκοσίδες. Η ομάδα ESBL τύπου CTX-M αποτελείται

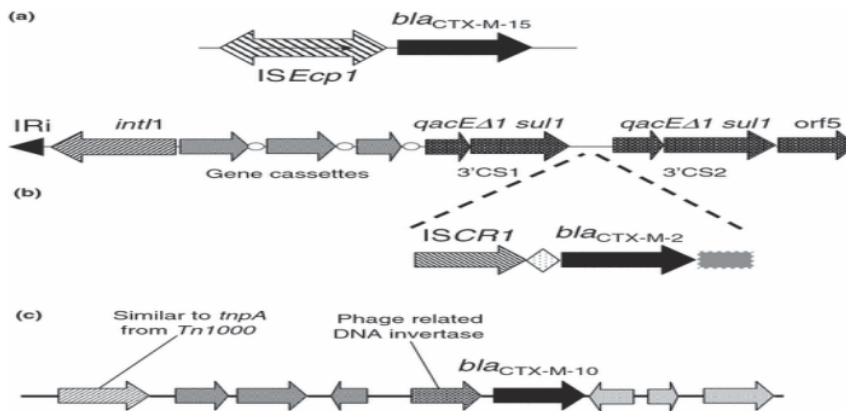
από 170 και άνω αλληλικές παραλλαγές (μεταλλάκτες), οι οποίες ομαδοποιούνται σε πέντε μεγάλες κατηγορίες με βάση την ομολογία των αλληλουχιών. Οι πέντε αυτές ομάδες CTX-M είναι: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 και CTX-M-25 [Εικόνα 7] [51,52]. Κάθε ομάδα αποτελείται από έναν αριθμό μεταλλακτών. Ορισμένοι από τους μεταλλάκτες εντοπίζονται σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές, ενώ άλλοι έχουν παγκόσμια κατανομή [Εικόνα 8] [53].

Οι CTX-M β-λακταμάσες κυρίως ανιχνεύονται σε *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella* (σε τυφοειδή και μη στελέχη), *Shigella*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.*, and *Serratia marcescens*. Τα γονίδια που εκφράζουν για τα εν λόγω ένζυμα εδράζονται σε μεταβιβασίμα πλασμιδία ενώ αλληλουχίες εισδοχής (όπως *ISEcp1* ή *ISEcp1-like*) ευθύνονται για την αύξηση της αποτελεσματικότητας της μεταφοράς [Εικόνα 6] [54].

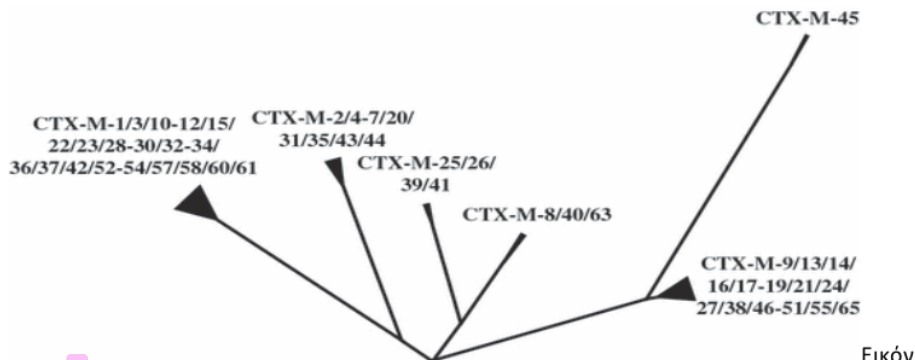
Τα γονίδια αυτά εδράζονται είτε στο βασικό βακτηριακό χρωμόσωμα είτε σε πλασμιδία. Οι χρωμοσωμικές β-λακταμάσες ανιχνεύονται αρκετά συχνά στα gram-αρνητικά βακτήρια [55]. Τα ένζυμα αυτά καταλύουν την υδρόλυση του αμιδικού δεσμού του τετραμελούς δακτυλίου β-λακτάμης με αποτέλεσμα να αδρανοποιούν τα αντιβιοτικά αυτής της κατηγορίας [56].

**Πίνακας 4:** Ποσοστά εμφάνισης στελεχών *E. coli* που παράγουν εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες σε διάφορες χώρες πριν και μετά το 2010 [47].

	Πριν το 2010	Μετά το 2010
<b>Ηνωμένο Βασίλειο</b>	4.6 %	6.6 %
<b>Γαλλία</b>	1.1 %	3.3 %
<b>Ισπανία</b>	2.4-18.2 %	8.9-23.6 %
<b>Ιταλία</b>	3.5 %	6.7 %
<b>Τουρκία</b>	8-13.1 %	24 %
<b>Νοτιο Ασία</b>	21.7 %	33.2 %
<b>Άπο Ανατολική Ασία</b>	4.8-7.5 %	7.6-10.7 %
<b>Λατινική Αμερική</b>	1.7 %	7.1-12.5 %
<b>ΗΠΑ και Καναδά</b>	7.4 %	1.8-8 %

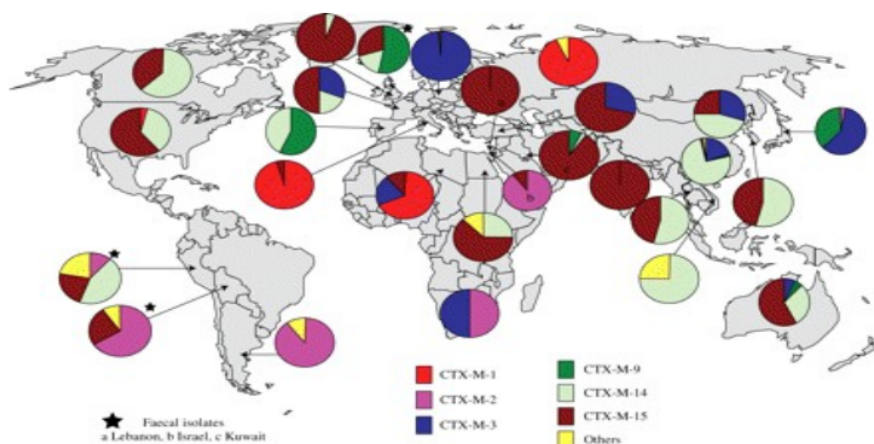


Εικόνα 6: Παραδείγματα των διαφορετικών γενετικών υποβάθρων των γονιδίων *bla*<sub>CTX-M</sub>. (α) αλληλουχία εισδοχής που βρίσκεται ανοδικά του γονιδίου *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Παρόμοια διάταξη έχει επίσης παρατηρηθεί σε αρκετούς άλλους τύπους *bla*<sub>CTX-M</sub> των ομάδων CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9 και CXT-M-25 [4, 33]. (β) *bla*<sub>CTX-M-2</sub> που βρίσκεται καθοδικά της αλληλουχίας του *ISCR1*, μια παρόμοια διάταξη έχει επίσης παρατηρηθεί σε αρκετούς άλλους τύπους *bla*<sub>CTX-M</sub> των ομάδων CTX-M-2 και CXT-M-9. (γ) *bla*<sub>CTX-M-10</sub> που γειτνιάζει με τρανσποζόνιο και αλληλουχίες εισδοχής που προέρχονται από φάγο. [52]



α 7: Οι έξι γνωστές ομάδες των β-λακταμασών τύπου CTX-M. Η ταξινόμηση έχει βασιστεί στην ομολογία της αλληλουχίας των αμινοξέων. [52]





Εικόνα 8: Παγκόσμια κατανομή των γονότυπων CTX-M [9]

Τα ESBL τύπου TEM είναι παράγωγα των TEM-1 και TEM-2. Τα TEM-1 και TEM-2 υδρολύουν αποτελεσματικότερα την αμικιλίνη παρά την καρβενικιλίνη, την οξακιλίνη ή την κεφαλοθίνη, ενώ η δράση τους έναντι των κεφαλοσπορινών εκτεταμένου φάσματος είναι αμελητέα. Τα TEM-1 και TEM-2 δεν ανήκουν στα ESBL, ωστόσο από αυτά έχουν προέλθει >180 παραλλαγές TEM. Κάποιους από αυτούς τους μεταλλάκτες κατατάσσονται στην ομάδα των ESBLs καθώς υδρολύουν αποτελεσματικά επιπρόσθετες κατηγορίες αντιβιοτικών, όπως κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς [ 55, 57, 58] . Η TEM-3 ήταν η πρώτη ESBL τύπου TEM. Πλέον η πλειονότητα των νέων TEM μεταλλακτών είναι ESBL [55].

#### 1.6. OXA-48

Οι β-λακταμάσες τύπου OXA ή αλλιώς οξακιλινάσες ονομάζονται έτσι λόγω της ικανότητάς τους να υδρολύουν την οξακιλίνη και ανήκουν στη κατηγορία D β-λακταμασών [57]. Έχουν αναφερθεί περισσότεροι από 750 τύποι β-λακταμασών OXA [59], μεταξύ των οποίων ορισμένες παραλλαγές έχουν δραστηριότητα καρβαπενεμάσης [γνωστές και ως CHDLs (Class D carbapenem-hydrolyzing β-lactamases)] [60]. Ο κύριος μηχανισμός αντοχής σε καρβαπενέμες μεταξύ των στελεχών *Acinetobacter baumannii* και των Enterobacterales είναι η παρουσία γονιδίων που εκφράζουν για CHDLs. Γενικά, οι καρβαπενεμάσες κατηγορίας D δεν αναστέλλονται από κλαβουλανικό οξύ, ταζομπακτάμη και σουλμπακτάμη (εκτός από ελάχιστες εξαιρέσεις), εμφανίζουν ήπια υδρολυτική δράση κατά των καρβαπενέμων, είναι αρκετά δραστικά έναντι των πενικιλινών και των κεφαλοσπορινών

στενού φάσματος (π.χ. κεφαλοθίνη) ενώ αδυνατούν να αδρανοποιήσουν τις κεφαλοσπορίνες ευρέος φάσματος (ειδικά την κεφταζιδίμη) [59].

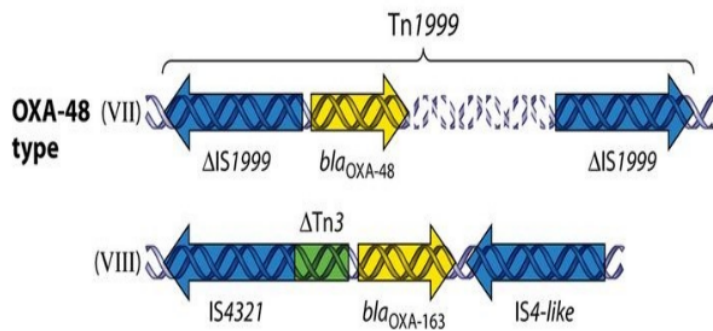
Χωρίζονται σε δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα κυρίως εντοπίζεται στο *A. baumannii* και αποτελείται από τέσσερις υποομάδες: β-λακταμάσες τύπου -OXA-23, -OXA-24/40, -OXA-51 και -OXA-58). Στη δεύτερη ομάδα ανήκουν οι μεταλλάκτες που σχετίζονται με την OXA-48 και ονομάζεται β-λακταμάσες τύπου OXA-48. Η OXA-48, σε αντίθεση με τις παραπάνω, εντοπίζεται σε εντεροβακτηριακά είδη (όπως *E. coli* και *K. pneumoniae*) [61]. Η OXA-48 ενώ διαθέτει ισχυρή υδρολυτική δράση έναντι των πενικιλινών, υδρολύει ασθενώς τις καρβαπενέμες. Επιπλέον, υδρολύει ήπια την κεφοταζιμή ενώ η υδρολυτική ικανότητα έναντι της κεφταζιδίμης και της κεφεπίμης είναι ασήμαντη [62].

Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γεγονός πως ενώ CHDLs παρουσιάζουν ασθενή δραστηριότητα καρβαπενεμάσης, όταν συνυπάρχουν με άλλους παράγοντες όπως η μειωμένη διαπερατότητα ή με ESBLs εξασφαλίζουν ικανοποιητικά επίπεδα αντοχής στις καρβαπενέμες αλλά και σε κεφαλοσπορίνες [59].

Η προέλευση ορισμένων CHDLs, σε αντίθεση με τα άλλα γονίδια καρβαπενεμασών όπως KPC, NDM και VIM, έχουν ταυτοποιηθεί. Το υδατογενές είδος *Shewanella oneidensis*, διαθέτει εγγενώς το γονίδιο blaOXA-54 β-λακταμάσης, το οποίο εμφανίζει 92% ομολογία με το OXA-48. Γενικότερα, τα είδη *Shewanella* spp. αποτελούν δεξαμενές γονιδίων που κωδικοποιούν CHDL. Πιθανότατα, η μεταφορά των γονιδίων αυτών σε κινητά γενετικά στοιχεία οδήγησε στην εξάπλωση τους στα Εντεροβακτηριακά είδη και στην απόκτηση αντοχής στις καρβαπενέμες. Επομένως, το ότι το μη ανθρώπινο παθογόνο είδος *Shewanella* που ζει στο νερό, είναι ο πρόγονος των γονιδίων που μοιάζουν με blaOXA-48, οδηγεί στην υπόθεση πως τα γονίδια αυτά υπάρχουν στο περιβάλλον. Εικάζεται, πως γενετικά στοιχεία όπως αλληλουχίες εισδοχής συνέβαλαν στην μετακίνηση των χρωμοσωμικών γονιδίων σε πλασμίδια που στη συνέχεια διαδόθηκαν σε είδη όπως σε βακτήρια *K. pneumoniae* ή *E. coli* [59,63,64].

Πλέον, το γονίδιο του OXA-48 εντοπίζεται σε εξαιρετικά μεταβιβάσιμα πλασμίδια [Εικόνα 9] και για αυτό το λόγο η εμφάνιση βακτηριακών στελεχών που παράγουν OXA-48 έχουν παγκόσμια κατανομή. Τα εντεροβακτηρίδια που παράγουν OXA-48 απομονώνονται συχνά από δείγματα ανθρώπων, ζώων αλλά και από περιβαλλοντικά δείγματα [59,60].





Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση της δομής των τρανσποζονίων. Πάνω απεικονίζεται η δομή του τρανποζονίου Tn1999 που περικλείει γονίδιο OXA-48. Η δομή αυτή εδράζεται στο πλασμίδιο pA-1. Κάτω παρουσιάζεται η δομή του τρανποζονίου  $\Delta$ Tn3 που πλαισιώνει το γονίδιο OXA-163, στο πλασμίδιο p6299 (GenBank αύξων αριθμός HQ700343) (216), αντίστοιχα [64].

**ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**  
**ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής ήταν η μελέτη των προφίλ αντοχής με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων και ο μοριακός έλεγχος στελεχών *E. coli* για την παρουσία γονιδίων αντοχής CTX-M group 1, CTX-M group 2, CTX-M group 9, TEM και OXA-48, με την μέθοδο της PCR. Ο έλεγχος έγινε σε 31 στελέχη *E. coli* που απομονώθηκαν τον Ιούλιο του 2020 από τον Ποταμό Έρκυνα στην Λιβαδειά, 100m καθοδικά από την Μονάδα Επεξεργασίας Λυμάτων της Λιβαδειάς. Τα στελέχη αυτά μετά την απομόνωση, ταυτοποιήθηκαν και φυλάχθηκαν σε κατάλληλες συνθήκες στο αρχείο μικροβιακών στελεχών του Εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

### 2.1 Συλλογή και ταυτοποίηση στελεχών *E. coli*

Κατά τη δειγματοληψία, που πραγματοποιήθηκε τον Ιούλιο του 2020, συλλέχθηκε μεταξύ άλλων και δείγμα νερού από τον Ποταμό Έρκυνα της Λιβαδειάς. Στο ποτάμι Έρκυνα καταλήγουν τα λύματα της Μονάδας Επεξεργασίας Λυμάτων της Λιβαδειάς, ύστερα από επεξεργασία (δευτεροβάθμια). Συγκεκριμένα, το δείγμα νερού είχε συλλεχθεί από σημείο που απέχει 100m (καθοδικά) από την έξοδο των λυμάτων. Από το δείγμα αυτό απομονώθηκαν 37 ύποπτες αποικίες *E. coli* και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν σε σωληνάκια κρυοσυντήρησης (cryovials), σε διάλυμα BrainHeartInfusion + 20% glycerol στους -80 °C του Εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσοβιολογίας.

Οι 37 ύποπτες αποικίες *E. Coli* υποβλήθηκαν σε ταυτοποιητικό έλεγχο τόσο βιοχημικό όσο και μοριακό. Για την βιοχημική ταυτοποίηση εφαρμόστηκε η δοκιμασία ινδόλης, ενώ η μοριακή ταυτοποίηση στηρίχθηκε στην ανίχνευση του συντηρημένου (housekeeping) γονιδίου της β-γλυκουρονιδάσης, *uidA*, με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR). Επιβεβαιωμένα στελέχη *E. coli* θεωρήθηκαν αυτά που έδωσαν θετικό αποτέλεσμα και στις δυο δοκιμασίες. Από τα 37 στελέχη που ελέγχθηκαν, τα 31 επιβεβαιώθηκαν ως *E. coli* και μόνο αυτά μελετήθηκαν περαιτέρω.

## 2.2 Έλεγχος επιπέδων ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Τα 31 επιβεβαιωμένα στελέχη, υποβλήθηκαν σε έλεγχο της μικροβιακής ευαισθησίας σε 18 ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά, έξι διαφορετικών τάξεων (πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες, μονοβακτάμες, αμινογλυκοσίδες, κινόλες) [Πίνακας 5], με την μέθοδο διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών σε άγαρ (μέθοδος KirbyBauer), σύμφωνα με τις οδηγίες της πρότυπης μεθόδου του 'The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing' (EUCAST) [65].

Τα στελέχη χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητα/άγριου τύπου (Sensitive, S/wildtype, WT: καμία αντοχή σε κανένα αντιμικροβιακό παράγοντα), ανθεκτικά (Resistant, R: αντοχή σε αντιβιοτικά το πολύ μέχρι δύο διαφορετικών κατηγοριών ) και πολύ-ανθεκτικά (Multi-drugResistant, MDR: αντοχή σε ένα τουλάχιστον παράγοντα από 3 και πάνω διαφορετικές κατηγορίες αντιβιοτικών), πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με προτεινόμενες οδηγίες τόσο από το EUCAST καθώς και από δημοσιευμένες κατευθύνσεις. Επίσης, πραγματοποιήθηκε έλεγχος παραγωγής εκτεταμένου φάσματος β-λακταμασών (extended-spectrum-lactamase, ESBLs) με την δοκιμασία συνέργειας με κλαβουλανικό οξύ (DoubleDiskSynergyTest, DDST).

### 2.2α Υλικά

- Φρέσκες καλλιέργειες E. coli σε μη εκλεκτικό υλικό- Nutrientagar
- Mueller-Hintonagar για το αντιβιογράμμα
- Οροί NaCl 0,9 M για την παρασκευή βακτηριακού εναιωρήματος
- Δίσκοι αντιβιοτικών

**Πίνακας 5:** Δίσκοι αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν

Κατηγορία αντιβιοτικού	Αντιβιοτικά δίσκία	Περιεκτικότητα ανά δίσκιο	Όρια
Πενικιλίνες	Αμπικιλίνη-AMP	10μg	WT: ≥14
	Αμοξικιλίνη/Κλαβουλανικό οξύ-AMC	20μg/10μg	WT: ≥19
	Πιπερακιλλίνη/Ταζομπακτάμη-TZP	100μg/ 10μg	WT: ≥20
	Πιπερακιλλίνη-PIP	100μg	WT: ≥20
Κεφαλοσπορίνες	Κεφουροξίμη-CXM	30μg	WT: ≥18
	Κεφταζιδίμη-CAZ	30μg	WT: ≥22
	Κεφοταξίμη-CTX	30μg	WT: ≥23
	Κεφοξιτίμη-FOX	30μg	WT: ≥19
	Κεφεπίμη-FEP	30μg	WT: ≥28
	Κεφτριαξόνη-CRO	30μg	WT: ≥25
Μονοβακτάμες	Αζτρεονάμη-ATM	30μg	WT: ≥26
Καρβαπενέμες	Μεροπενέμη-MEM	10μg	WT: ≥25
	Ιμιπενέμη-IPM	10μg	WT: ≥25
Αμοιγλυκοσίδες	Γενταμυκίνη-GM	10μg	WT: ≥16
	Αμικασίνη-AN	30μg	WT: ≥18
Ανάμεικτοι παράγοντες	Σουλφαμεθοξαζόλη/Τριμεθοπρίμη-SXT	23.75μg/1.25μg	WT: ≥16
Φθοριοκινολόνες	Σιπροφλοξασίνη-CIP	5μg	WT: ≥25
	Ναλιδιξικό οξύ-NAL	30μg	WT: ≥17

**2.2β Διαδικασία αντιβιογραμμάτων:**

A. Παρασκευή εναιωρήματος : διάλυση μεμονωμένων αποικιών από φρέσκια καλλιέργεια από μη εκλεκτικό υλικό Nutrient Agar, σε φυσιολογικό ορό (5ml 0,9 NaCl).

B. Επίστρωση του εναιωρήματος σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου που περιέχει Mueller-Hinton Agar.

Γ. Τοποθέτηση των δίσκων αντιβιοτικού σε απόσταση 30 cm.

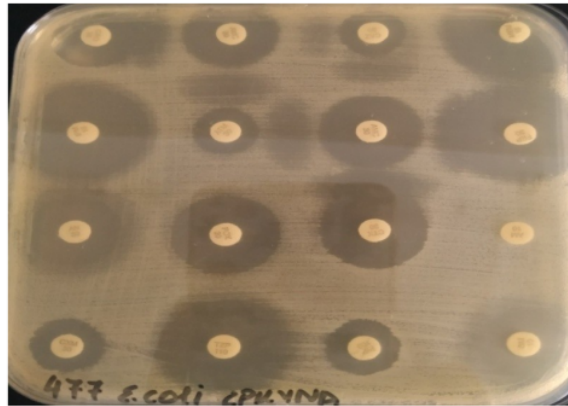
*2.2γ Διαδικασία για το DDST- φαινοτυπική δοκιμασία ανίχνευση ESBLs*

A. Παρασκευή εναιωρήματος: διάλυση μεμονωμένων αποικιών από φρέσκια καλλιέργεια μη εκλεκτικό υλικό Nutrient Agar, σε φυσιολογικό ορό (5ml 0,9% NaCl).

B. Επίστρωση του εναιωρήματος σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου που περιέχει Mueller-Hinton Agar.

Γ. Τοποθέτηση των δίσκων αντιβιοτικού που περιέχουν κεφαλοσπορίνη (όπως κεφοταξίμη-CTX, κεφτριαζόνη-CRO, κεφαζιδίμη-CAZ, κεφεπίμη-FEP και αζτρεονάμη-ATM) δίπλα σε δίσκο που περιέχει κλαβουλανικό οξύ (όπως αμοξικιλίνη/κλαβουλανικό οξύ, AMC) σε απόσταση 20 cm.

Ως θετικό αποτέλεσμα ερμηνεύεται η παρατήρηση ζωνών αναστολής γύρω από οποιοδήποτε δίσκο κεφαλοσπορίνης, οι οποίες αυξάνουν προς την κατεύθυνση του δίσκου που περιέχει κλαβουλανικό οξύ [Εικόνα 10].



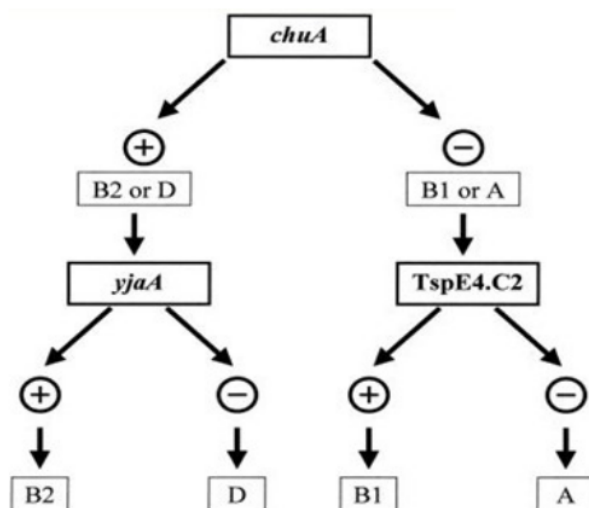
Εικόνα 10: Παράδειγμα θετικής DDS δοκιμασίας

### 2.3 Έλεγχος παρουσίας γονιδίων αντοχής με την μέθοδο της PCR.

Τα στελέχη *E. coli* που ανέδειξαν θετικό DDST αποτέλεσμα ελέγχθηκαν για την παρουσία γονιδίων που εκφράζουν για εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες και συγκεκριμένα για τα γονίδια CTX-M-group1, CTX-M-group2, CTX-M-group9 και TEM, με την μοριακή μέθοδο την PCR, βάσει δημοσιευμένων πρωτοκόλλων [66,67]. Τέλος, στελέχη που παρουσίασαν μειωμένη ευαισθησία στις καρβαπενέμες (μειωμένη –MEM, ιμιπενέμη-IMP) ελέγχθηκαν για την παρουσία του γονιδίου της OXA-48 (ήπια καρβαπενεμάση) [67], για την ανίχνευση του οποίου δεν υπάρχει κάποια διαθέσιμη φαινοτυπική δοκιμασία.

## 2.4 Τυποποίηση με την μέθοδο του Phylogrouping

Τα 31 στελέχη τυποποιήθηκαν σε φυλογενετικές ομάδες, με τη μοριακή μέθοδο του Phylogrouping-TriplexPCR, βάσει δημοσιευμένου πρωτοκόλλου [68]. Με την μέθοδο αυτή, η οποία βασίζεται στην παρουσία ή όχι τριών γενετικών στοιχείων (γονίδιο *chuA*, γονίδιο *yjaA* και ο γενετικός τόπος άγνωστης λειτουργίας TSPE4.C2) τα στελέχη κατατάσσονται σε τέσσερις φυλογενετικές ομάδες: A, B1, B2, και D σύμφωνα με το σχήμα της **Εικόνας 11**. Η ταξινόμηση των στελεχών σε φυλογενετικές ομάδες συμβάλει στην αδρή εκτίμηση των διαφορετικών γονοτύπων που κυκλοφορούν στα υδάτινα οικοσυστήματα.



Εικόνα 11: Διάγραμμα που δείχνει τον τρόπο ταξινόμησης των στελεχών στις φυλογενετικές ομάδες [68].



## 2.5 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτική αγαρόζη

### **Υλικά και αντιδραστήρια**

- TBE 0,5X
- TBE 1X
- Agarose (NIPPON GENETICS).
- Midori Green Advance DNA stain (NIPPON GENETICS).
- BLUE JUICETM LOADING GEL BUFFER 10X (Invitrogen-Thermofischer scientific).
- TrackIt 100bp DNA Ladder (Invitrogen-Thermofischer scientific).

### **Συσκευές**

- Τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας UV (modelTVC-312ASPECTROLINE).
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Kiskerbiotechmschoisetrio) και τροφοδοτικό ρεύματος (Electropowersupply-EPS 301,AmershamBioscience).

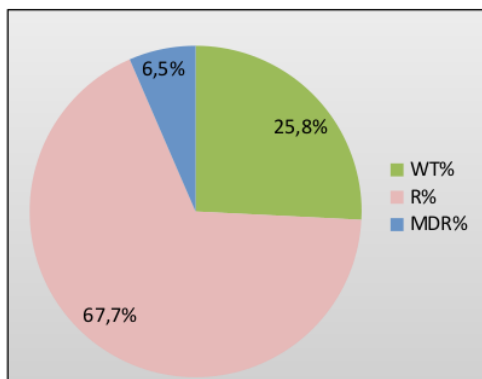
**ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**  
**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### 3.1 Αποτελέσματα επιπέδων ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

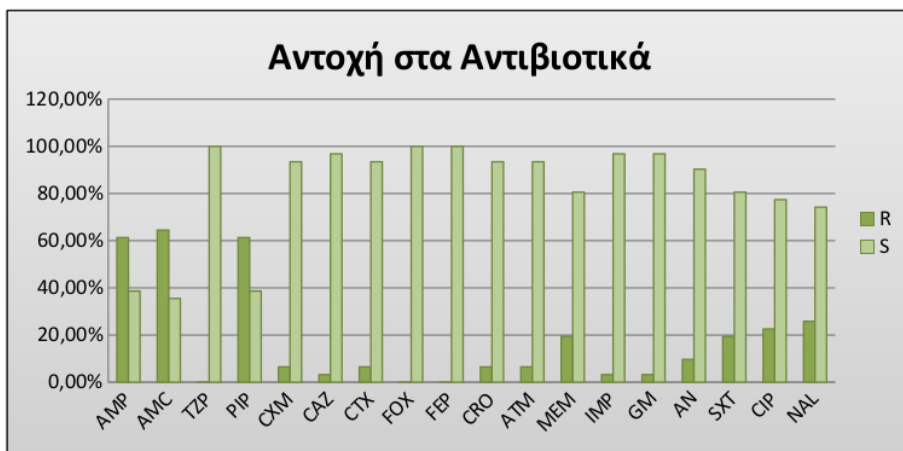
Βάσει των ορίων που προτείνει ο ευρωπαϊκός οργανισμός EUCAST, από τα 31 συνολικά στελέχη *E. coli* τα 8 (25,8%) χαρακτηρίστηκαν ως άγριου τύπου (wildtype-WT), 21 ως ανθεκτικά (67,7%) (resistant-R) και μόλις 2 ως πολύ-ανθεκτικά (6,5%) (Multidrug Resistant-MDR) [Εικόνα 12]. Παρατηρείτε ότι η πλειοψηφία (67,7%) των στελεχών κατατάχθηκε στην κατηγορία R. Αξιοσημείωτες αντοχές παρατηρήθηκαν στα στελέχη 472, 477 όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα [Πίνακας 6]. Επίσης σημειώθηκε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό στελεχών ήταν ανθεκτικό στην AMC (Αμοξικιλίνη/Κλαβουλανικό οξύ), ακολουθούν οι AMP (Αμπικιλίνη) και PIP (Πιπερακίλινη). Ενώ όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα στα: TZP (Πιπερακίλινη/Ταζομπακτάμη), FOX (Κεφοξιτίνη) και FEP (Κεφεπίμη) [Εικόνα 13].

**Πίνακας 6:** Πληροφορίες σχετικά με τη φυλογενετική ομάδα, των προφίλ και προτύπων αντοχής των στελεχών *E. coli* που απομονώθηκαν από τον ποταμό Έρκυνα, 100 από την έξοδο του βιολογικού καθαρισμού.

	Στέλεχος	Φυλογενετική Ομάδα	Προφίλ Αντοχής	Πρότυπο Αντοχών
1	450	A	WT	WT
2	451	A	R	AMC, MEM
3	452	A	R	AMC, MEM
4	453	A	R	AMP, AMC, PIP, MEM
5	454	B2	R	AMC, AN
6	455	B2	R	AMP, AMC, PIP, MEM
7	456	A	R	AMP, AMC, PIP
8	457	A	R	MEM, IMP
9	458	A	R	AMP, PIP, MEM, SXT, NAL, CIP
10	459	A	WT	WT
11	460	B2	WT	WT
12	461	A	WT	WT
13	462	A	WT	WT
14	463	B2	WT	WT
15	464	B1	WT	WT
16	465	A	WT	WT
17	466	A	R	AMP, AMC, PIP, SXT, NAL, CIP
18	467	D	R	AMP, AMC, PIP, SXT, NAL, CIP
19	468	B2	R	AMP, AMC, PIP, AN
20	469	B2	R	AMP, AMC, PIP
21	470	A	R	AMP, AMC, PIP, CIP, NAL
22	471	B1	R	AMP, AMC, PIP, GM, SXT
23	472	A <sup>16</sup>	MDR	AMP, AMC, PIP, CXM, CTX, CRO, ATM, NAL
24	473	A	R	AMP, AMC, PIP
25	474	A	R	AMP, AMC, PIP
26	475	A	R	AMP, AMC, PIP, CIP, NAL
27	476	A	R	AMP, AMC, PIP, SXT, CIP, NAL
28	477	B1	MDR	AMP, PIP, CXM, CAZ, CTX, CRO, ATM, CIP, NAL
29	478	A	R	AMP, AMC, PIP, AN, SXT
30	479	A	R	AMP, AMC, PIP
31	481	B1	R	AMP, AMC, PIP



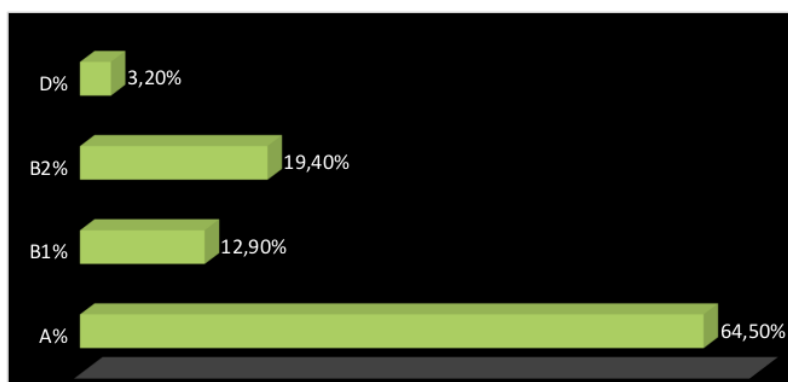
Εικόνα 12 : Διαγραμματική απεικόνιση των συχνοτήτων εμφάνισης των διαφορετικών προφίλ αντοχής WT, R, MDR των στελεχών *E. coli* [WT-wild type: άγριου τύπου/ευαίσθητα, R-resistant: ανθεκτικά, MDR-multidrug resistant: πολύ-ανθεκτικά]



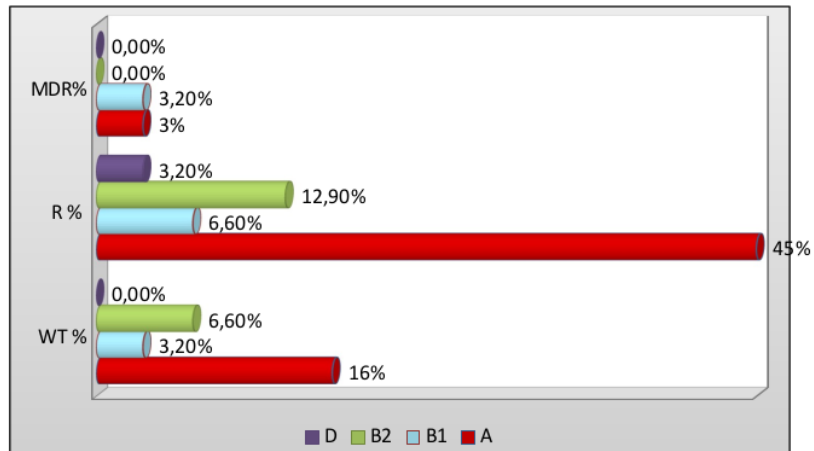
Εικόνα 13 : Διαγραμματική απεικόνιση των ποσοστών αντοχής (R:resistance) και ευαισθησίας (S: sensitive) στον κάθε αντιμικροβιακό παράγοντα. [Αμπικιλίνη-AMP, Αμοξικιλίνη/Κλαβουλανικό οξύ-AMC, Πιπερακιλλίνη/Ταζομπακτάμη-TZP, Πιπερακιλλίνη-PIP, Κεφουροξίμη-CXM, Κεφταζιδίμη-CAZ, Κεφοταξίμη-CTX, Κεφοξιτίνη-FOX, Κεφεπίμη-FEP, Κεφτριαζόνη-CRO, Αζτρεονάμη-ATM, Μεροπενέμη-MEM, Ιμιπενέμη-IPM, Γενταμικίνη-GM, Αμικασίνη-AN, Σουλφαμεθοξαζόλη/Τριμεθοπρίμη-SXT, Σιπροφλοξασίνη-CIP, Ναλιδιξικό οξύ-NAL]

### 3.2 Αποτελέσματα φυλογενετικής τυποποίησης των στελεχών – Phylotyping

Από τα 31 στελέχη τα 20 κατατάχθηκαν στην Α ομάδα (64,5%), 4 στην Β1 (12,9%), 6 στην Β2 (19,4%), και μόνο 1 στην D (3,2%) [Εικόνα 14]. Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της τυποποιητικής μεθόδου σε ποσοστά επί τις εκατό. Στην **Εικόνα 15** απεικονίζεται διαγραμματικά η συσχέτιση μεταξύ προφίλ αντοχής και φυλογενετικής ομάδας όπου παρατηρείται ότι η ομάδα Α είναι επικρατέστερη στους R (ανθεκτικοί) και στους WT (άγριου-τύπου/ευαίσθητοι) πληθυσμούς. Επίσης φαίνεται πως η συχνότητα της ομάδας Β2 είναι αρκετά υψηλή στους R πληθυσμούς (αριθμό και ποσοστό).



Εικόνα 14 : Διαγραμματική απεικόνιση των ποσοστών εμφάνισης των φυλογενετικών ομάδων Α, Β1, Β2 και D



Εικόνα 15: Συσχέτιση μεταξύ φυλογενετικής ομάδας και προφίλ αντοχής (WT, R, MDR) [WT-wild type: άγριου τύπου/ευαίσθητα, R-resistant: ανθεκτικά, MDR-multidrug resistant: πολύ-ανθεκτικά]

### 3.3 Αποτελέσματα της PCR για τον έλεγχο παρουσίας γονιδίων αντοχής

Από τα τέσσερα (4) στελέχη *E. coli* που είχαν αναδείξει θετική DDS αντίδραση τα δύο βρέθηκαν θετικά για το γονίδιο CTX-M-group 1 και ένα για το CTX-M-group9 στο οποίο επίσης εντοπίστηκε και το γονίδιο TEM. Το CTX-Mgroup 2 δεν εντοπίστηκε σε κανένα από τα στελέχη. Επίσης το στέλεχος 408, το οποίο είχε μειωμένη ευαισθησία στις καρβαπενέμες, βρέθηκε θετικό, εκτός από το CTX-M-group1 και στη καρβαπενεμάση OXA-48. Τέλος δυο στελέχη που εμφάνισαν αντοχή στην αμικικιλίνη (AMP) αλλά ευαισθησία στην αμοξυκιλίνη/καλβουλανικό (AMC) ήταν θετικά για το TEM [Πίνακας 7].

**Πίνακας 7:** Αποτελέσματα του ελέγχου παρουσίας γονιδίων αντοχής.

Στέλεχος	Ημερομηνία Απομόνωσης	Δείγμα/Περιοχή	DDST	14	CTX-M	CTX-M	CTX-M	OXA-48	TEM
				group 1	group 2	group 9			
356	2/12/2019	ΠΟΤΑΜΙ ΕΡΚΥΝΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	+	+	-				
405	4/2/2020	ΠΟΤΑΜΙ ΕΡΚΥΝΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	+	+	-				
<b>408</b>	<b>4/2/2020</b>	<b>ΠΟΤΑΜΙ ΕΡΚΥΝΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ</b>		<b>+</b>				<b>+</b>	
451	13/7/2020	ΠΟΤΑΜΙ ΕΡΚΥΝΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ						-	
453	13/7/2020	ΠΟΤΑΜΙ ΕΡΚΥΝΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ						-	
455	13/7/2020	ΠΟΤΑΜΙ ΕΡΚΥΝΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ						-	+
457	13/7/2020	ΠΟΤΑΜΙ ΕΡΚΥΝΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ						-	
458	13/7/2020	ΠΟΤΑΜΙ ΕΡΚΥΝΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ						-	+
<b>472</b>	<b>13/7/2020</b>	<b>ΠΟΤΑΜΙ ΕΡΚΥΝΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>			<b>+</b>
477	13/7/2020	ΠΟΤΑΜΙ ΕΡΚΥΝΑ/ΛΙΒΑΔΕΙΑ	+	-	-				-



Από τα 6 στελέχη που διέθεταν γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά τα τρία κατατάχθηκαν στην φυλογενετική ομάδα D, δύο στην ομάδα A και ένα στην B2. Επίσης όσον αφορά το προφίλ αντοχής τους τα τέσσερα χαρακτηρίστηκαν ως MDR και δύο ως R. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται αναλυτικά όλες οι πληροφορίες των στελεχών που είχαν γονίδια αντοχής [Πίνακας 8].

**Πίνακας 8:** Σύνοψη των αποτελεσμάτων των σημαντικών στελεχών

Στέλεχος	Ημερομηνία Απομόνωσης	DDST	Γονίδια αντοχής	Φυλογενετική ομάδα	Προφίλ αντοχής	Αντοχές
356	2/12/2019	+	CTX-M group 1	D	MDR	AMP, AMC, PIP, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM
405	4/2/2020	+	CTX-M group 1	D	MDR	AMP, AMC, PIP, CXM, CTX, CRO, ATM, CIP, NAL
408	4/2/2020	-	CTX-M group 1, OXA-48	D	MDR	AMP, AMC, TZP, PIP, TCC, CXM, CAZ, CTX, FEP, CRO, ATM, MEM, SXT
455	13/7/2020	-	TEM	B2	R	AMP, AMC, PIP, MEM
458	13/7/2020	-	TEM	A	R	AMP, PIP, MEM, SXT, NAL, CIP
472	13/7/2020	+	TEM, CTX-M group 9	A	MDR	AMP, AMC, PIP, CXM, CTX, CRO, ATM, NAL

## Ανακεφαλαίωση

### Τα κυριότερα ευρήματα της ερευνητικής εργασίας :

1. Η πλειονότητα των στελεχών (67,7%) ανήκει στην κατηγορία R (resistant) δηλαδή παρατηρήθηκε σε αυτά αντοχή σε αντιβιοτικά το πολύ μέχρι δύο διαφορετικών κατηγοριών. Ακολουθεί με αρκετά μικρότερο ποσοστό (25,8%) η ομάδα WT (wildtype) στην οποία δεν παρατηρείται καμία αντοχή σε κανένα αντιβιοτικό. Τέλος η MDR (Multidrugresistant ) (6,5%) όπου τα στελέχη της ομάδας αυτής εμφανίζουν αντοχή σε ένα τουλάχιστον παράγοντα από 3 και πάνω διαφορετικές κατηγορίες αντιβιοτικών.
2. Το μεγαλύτερο ποσοστό στελεχών ήταν ανθεκτικό στην AMC (Αμοξικιλίνη/Κλαβουλανικό οξύ), ακολουθούν οι AMP (Αμπικιλίνη) και PIP (Πιπερακιλλίνη)
3. Όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα στα : TZP (Πιπερακιλλίνη/Ταζομπακτάμη), FOX (Κεφοξιτίνη) και FEP (Κεφεπίμη).
4. Η φυλογενετική ομάδα που επικράτησε ήταν η A (64,5%) και ακολούθησαν οι: B2 (19,4%), B1 (12,9%) και D (3,2%).
5. Στο DDST test σημειώθηκαν 4 θετικά στελέχη.
6. Τρία θετικά στελέχη για το γονίδιο CTX-Mgroup1
7. Κανένα θετικό για CTX-Mgroup 2
8. Ένα στέλεχος θετικό για CTX-Mgroup 9
9. Τρία θετικά στελέχη για το TEM
10. Ένα στέλεχος θετικό στο OXA-48
11. Εντοπίστηκε ένα στέλεχος το οποίο ήταν θετικό ταυτόχρονα και στο γονίδιο CTX-M group1 και στο OXA-48 , ένα αρκετά συχνό φαινόμενο σε κλινικά στελέχη. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι τα γονίδια αυτά βρίσκονται στο ίδιο πλασμίδιο, επομένως συνμεταφέρονται.
12. Τέλος βρέθηκε ένα στέλεχος με TEM και CTX-Mgroup 9.

## Συζήτηση

Το κακής ποιότητας νερό έχει αποδιοργανωτικό αντίκτυπο στη δημόσια υγεία καθώς είναι απαραίτητο συστατικό για την διατήρηση της υγείας. Ένας σημαντικός αριθμός νοσημάτων του ανθρώπου οφείλεται σε παθογόνους μικροοργανισμούς, οι οποίοι μεταδίδονται με το νερό. Η μετάδοση μπορεί να συμβεί: α) μέσω κατανάλωσης μολυσμένου πόσιμου νερού, β) μέσω δραστηριοτήτων αναψυχής, όπως κολύμπι σε θάλασσες, λίμνες, ποτάμια, πισίνες ή αθλοπαιδιές (π.χ. θαλάσσιο σκι, κανό-καγιάκ, ιστιοσανίδα κτλ.), γ) μέσω της μολυσμένης τροφής, είτε καταναλώνοντας οργανισμούς που ζουν στο υδάτινο περιβάλλον (π.χ. ψάρια), είτε από τρόφιμα (π.χ. λαχανικά) που έχουν μολυνθεί από το νερό ποτίσματος [44].

Η ύπαρξη ανθεκτικών στελεχών *E. coli* σε υδάτινα περιβάλλοντα σημαίνει την εύκολη μεταφορά τους σε ανθρώπους και ζώα, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει σοβαρές λοιμώξεις που είναι δύσκολο να αντιμετωπιστούν. Με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία *E. coli* που παράγουν ESBLs συνεχώς ανιχνεύονται σε ποτάμια [42,69,70]. Αυτό επιβεβαιώνεται και στην συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία, στα πλαίσια της οποίας, εντοπίστηκαν έξι θετικά στελέχη για ESBL γονίδια, τύπου CTX-M αλλά και τύπου TEM, καθώς και ένα στέλεχος θετικό για OXA-48 (συν-μεταφορά με CTX-M-group 1). Βακτηριακά στελέχη με τα συγκεκριμένα γονίδια εμπλέκονται και σε ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις [71]. Επομένως είναι πολύ πιθανό τα στελέχη αυτά να απελευθερώνονται στο υδάτινο περιβάλλον, στη συγκεκριμένη περίπτωση στο Ποταμό Έρκυνα, από τα λύματα (νοσοκομειακά και αστικά).

Στη μελέτη μας όπως και σε άλλες, τα θετικά σε ESBL στελέχη *E. coli*, εκτός από κε-φαλοσπορίνες και μονοβακτάμες, ήταν επίσης ανθεκτικά στις κινολόνες και στο συνδυασμό τριμεθοπρίμης-σουλφαμεθοξαζόλης (SXT) [72,73,74,75]. Το γεγονός αυτό εκθέτει την υγεία του ανθρώπου σε υψηλό κίνδυνο, δεδομένου ότι τα συγκεκριμένα αντιβιοτικά χορηγούνται για την αντιμετώπιση λοιμώξεων και ότι το νερό του ποταμού Έρκυνα χρησιμοποιείται για αρδευτικούς σκοπούς.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Phylogrouping ένα ποσοστό στελεχών κατατάχθηκε στην ομάδα B2 (19,4%) και στην ομάδα D (3,2%). Τα βακτήρια που εντάχθηκαν σε αυτές τις ομάδες είχαν το γονίδιο chuA. Το γονίδιο chuA κωδικοποιεί εξωκυττάρια πρωτεΐνη-υποδοχέα που απαιτείται για την πρόσληψη της ομάδας αίμης και απαντάται κυρίως στα εντεροαιμορραγικά *E. coli* [76]. Αυτό υποδηλώνει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ παθογένειας και των φυλογενετικών ομάδων B2 και D. Σύμφωνα με άλλες μελέτες, η φυλογενετική ομάδα B2 είναι κυρίαρχη στο νοσοκομειακό περιβάλλον, [77]. Στην παρούσα διατριβή η πλειοψηφία των ESBLs στελεχών κατατάχθηκαν στην ομάδα D (3/6) ενώ στην B2 1/6. Πιθανότατα λοιπόν αυτά τα στελέχη εκτός από πολύ-ανθεκτικά να είναι και παθογόνα. Ωστόσο, θα πρέπει να αναλυθούν περαιτέρω, εφαρμόζοντας και άλλες τεχνικές που θα

δώσουν περισσότερες και ακριβείς πληροφορίες για την γενετική σύσταση των στελεχών, όπως η παρουσία παραγόντων λοιμογονικότητας (π.χ. γονίδια τοξίνης).

Συμπερασματικά, όλα τα παραπάνω επιβεβαιώνουν την θεώρηση ότι η υγεία του ανθρώπου είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την υγεία των ζώων και του περιβάλλοντος. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να πραγματοποιούνται συστηματικές μελέτες σε δείγματα ποικίλων υδάτινων οικοσυστημάτων που θα στοχεύουν στον έλεγχο της μικροβιακής αντοχής και των μηχανισμών αντοχής των στελεχών *E. coli*. Θα πρέπει επίσης να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην επεξεργασία των λυμάτων που καταλήγουν στα υδάτινα περιβάλλοντα, διότι αποτελούν μια από τις βασικές πηγές ανθεκτικών στα αντιβιοτικά γονιδίων.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Davis, M.F., et al., Checklist for One Health Epidemiological Reporting of Evidence (CO-HERE). *One Health*, 2017. Vol 4: p. 14-21.
2. Calistri P., et al., The Components of 'One World-One Health' Approach. Wiley Online Library, 2013. Citations 24, p. 4-13.
3. Robinson T. P., et al., Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *OXFORD ACADEMIC. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene.*, 2016, Vol 110, issue 7, p.377-380.
4. Rousham Emily K., Leanne Unicomb and Mohammad Aminul Islam., Human, animal and environmental contributors to antibiotic resistance in low-resource setting: integrating behavioural, epidemiological and One Health approaches., *Proceedings of the Royal society B.*, 2018, Vol 285, issue 1876.
5. Ghernaout D., Elboughdiri N., Antibiotics Resistance in Water Mediums: Background, Facts, and Trends. *Applied Engineering*. 2020, 4(1), p.1-6.
6. Basak S., Singh P. & Rajurkar M., Multidrug Resistant and Extensively Drug Resistant Bacteria: A Study., *Journal of Pathogens.*, 2016., Vol 2016.
7. Liakopoulos A., Mevius D. & Ceccarelli D., A Review of SHV extended-spectrum  $\beta$ -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. *Frontiers in Microbiology*. 2016.
8. Stålsby Lundborg, C., et al., Protocol: a 'One health' two year follow-up mixed methods study on antibiotic resistance, focusing children under 5 and their environment in rural India. *Springer Link*. 2015, 15, 1321.
9. Hawkey P. M. & Jones A. M. , The changing epidemiology of resistance., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2009, Vol 64, Issue suppl\_1, p.i3-i10.
10. Διολή Χ. Μεταπτυχιακό Προγραμμα Διπλωματική Εργασία: Μελέτη των κλινικών στελεχών Κρνευμονιαε που παράγουν καρβαπενεμάση OXA-48, τα οποία στάλθηκαν στο Κεντρικό Εργαστήριο Δημόσιας Υγείας (ΚΕΔΥ) το πρώτο εξάμηνο του 2017. Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας. 2017.
11. Hutchings M.I., Truman A.W & Wilkinson B., Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*. 2019, Vol 51, p. 72-80.

12. Καζατζή Όλγα . Μεταπτυχιακό πρόγραμμα. Αντοχή στα αντιβιοτικά στελεχών Escherichia Coli που απομονώθηκαν από πόσιμο νερό. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. 2018.
13. Wohlleben W. , Mast Y., Stegmann E & Ziemert N., Antibiotic drug discovery. *Microbial Biotechnology*. 2016 , 9(5), p.541-548.
14. Αγγελούδου Σ. , Διπλωματική Εργασία : Εντεροβακτηριακά που παράγουν ευρέως φάσματος β-λακταμάσες στην αλυσίδα παραγωγής κρεάτων., Πανεπιστήμιο Πατρών., 2019.
15. Mulvey M.R. & Simor A.E., Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be?, *Cmaj.*, Vol 180, Issue 4, p.408-415.
16. Furuya Y. E. & Lowy F.D., Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nature Reviews Microbiology*, 2006,4, p.36-45.
17. Munita J. M. & Arias C.A. Mechanisms of Antibiotic Resistance., *Microbiology spectrum.*, 2016, 4(2).
18. Eyer R.F. & Shvets K. Clinical Pharmacology of Antibiotics. *Clinical journal of the American Society of Nephrology CJASN.*, 2019, 14(7), p.1080-1090.
19. Founou L.L., Founou R.C., & Essack S. Y., Antibiotic Resistance in the Food Chain : A Developing Country-Perspective. *Frontiers in Microbiology*. 2016.
20. Αγιασσωτη Β.Τ., Διπλωματική Εργασία : Εργαστηριακή μελέτη καλλιεργημάτων Shigella spp από την τράπεζα στελεχών του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Σαλμονελλών-Σιγκελλών. Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής. 2021.
21. Coates Anthony RM, Halls G. & Hu Y. Novel classes of antibiotics or more of the same? *British Journal of Pharmacology*. 2011, Vol 163, issue 1, p. 184-194.
22. ReAct, Resistance mechanisms.
23. Jang J., et al. Environmental Escherichia Coli : ecology and public health implications- a review. *Journal of Applied Microbiology*. 2017. Vol 123, issue 3. P.570-581.
24. Andersen J. L. , et al., Multidrug Efflux Pumps from Enterobacteriaceae, Vibrio cholera and Staphylococcus aureus Bacteria Food Pathogens. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2015.
25. Clermont O., Bonacorsi S., & Bingen E. Rapid and Simple Determination of the Escherichia Coli Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000. Vol 66, No 10, p.4555-4558.

26. CDC, E. coli (*Escherichia coli*), 2021.
27. Τσακρής Α. Εισαγωγή στη Μικροβιολογία . 2<sup>η</sup> Ελληνική έκδοση . Εκδόσεις Π.Χ. Πα-  
σχαλίδης, 2017 , p.320-345, p.603-607.
28. Allocati N., Masulli M., Alexeyev M.F & Di Ilio C., *Escherichia coli* in Europe: An  
Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2013,  
10,p.6235-6254.
29. Murray P. R., Rosenthal K. S., Pfaller M. A., ΙΑΤΡΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ, Επιστημο-  
νικές εκδόσεις ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ, 2012.
30. ECDC, Antimicrobial resistance in the EU/EEA, 2019. Annual report of the European  
Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), 2015.
31. Hamid O., Amin A & Bayoumi M., Extended Spectrum Beta-Lactamase Producing En-  
terobacteriaceae: Hospital-Acquired Urinary Tract Infections, Khartoum-Sudan., Research-  
Gate., 2019.
32. Marion S. Helfand & Robert A. Bonomo., Extended-Spectrum β-Lactamases in Mul-  
tidrug-Resistant *Escherichia coli*: Changing the Therapy for Hospital-Acquired and Commu-  
nity-Acquired Infections., *Clinical Infectious Diseases*, 2006, Vol. 43, Issue 11, p.1415–  
1416.
33. Hannah B. Haberecht et al., Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* from Environmen-  
tal Waters in Northern Colorado., *Journal of Environmental and Public Health*., 2019,  
Vol.2019.
34. Liu, H., *et al.*, Molecular characteristics of extended-spectrum β-lactamase-produc-  
ing *Escherichia coli* isolated from the rivers and lakes in Northwest China. *BMC Micro-  
biol.*, 2018,**18**, 125.
35. Tuo H, et al., The Prevalence of Colistin Resistant Strains and Antibiotic Resistance  
Gene Profiles in Funan River., China. *Front. Microbiol.*, 2018, 9:3094.
36. Liu, Y. Y., et al., Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1  
in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study., *The  
Lancet. Infectious diseases.*, 2016, 16(2), p.161–168.
37. Karki, D., *et al.*, Antibiotic resistance and detection of plasmid mediated colistin resis-  
tance *mcr-1* gene among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical  
samples. *Gut Pathog.*, 2021, **13**, 45.

38. CDC, Antibiotic Resistance. 2020.
39. Berthe T., et al., Evidence for Coexistence of Distinct *Escherichia coli* Populations in Various Aquatic Environments and Their Survival in Estuary Water., *Applied and Environmental Microbiology.*, 2013, Vol 79, No 15.
40. Manuel Espinosa-Urgel and Roberto Kolter., *Escherichia coli* genes expressed preferentially in an aquatic environment., *Wiley Online Library, molecular microbiology.*, 2002, Vol 28, Issue 2, p.325-332.
41. Manzar Alam & Mohd Imran., Multiple antibiotic resistances in metal tolerant *E. coli* from hospital waste water., *BIOINFORMATION Discovery at the interface of physical and biological sciences.*, 2014, 10(5), p.267-272.
42. Zabedayo Baniga, et al., Genome-Based Analysis of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in the Aquatic Environment and Nile Perch (*Lates niloticus*) of Lake Victoria, Tanzania., *Frontiers in Microbiology, Antimicrobials Resistance and Chemotherapy.*, 2020.
43. Amaya E., et al., Antibiotic resistance patterns of *E. coli* isolates from different aquatic environmental sources in Leon, Nicaragua., *CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTION.*, 2012, Vol 18, Issue 9, E347-E354.
44. Γεώργιος Χ. Ζακάς., Διδακτορική διατριβή : Διερεύνηση της μικροβιολογικής ρύπανσης του υδάτινου περιβάλλοντος στην ΒΔ Ελλάδα και μελέτη της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των απομονωθέντων βακτηρίων στελεχών (από νερό και ψάρια). Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων Ιατρική σχολή., 2006.
45. Nambram S. Singh, Neelja Singhal & Jugsharan S. Virdi., Genetic Environment of *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CMY-42</sub> and Characterization of Integrons of *Escherichia coli* Isolated From an Indian Urban Aquatic Environment., *Frontiers in Microbiology, Antimicrobials Resistance and Chemotherapy.*, 2018.
46. Abayneh M., et al., Assessment of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (*ESBLs*) – producing *Escherichia coli* from minced meat of cattle and swab samples and hygienic status of meat retailer shops in Jimma town, Southwest Ethiopia., *BMC Infectious Diseases.*, 2019, 19:897.
47. Lee D.S., Lee S & Choe H., Community-Acquired Urinary Tract Infection by *Escherichia coli* in the Era of Antibiotic Resistance. *BioMed Research International.* 2018.



48. Gundran R. S., et al., Prevalence and distribution of *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> genes in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *E. coli* isolates from broiler farms in the Philippines., *BMC Veterinary Research*, 2019, **15**.
49. Seo Y. B. et al., Randomized controlled trial of piperacillin-tazobactam, cefepime and erapenem for the treatment of urinary tract infection caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *BMC Infectious.*, 2017, **17**: 404.
50. Pitout J.D., Nordmann P., Laupland K. B & Poirel L., Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005, Vol 56, issue 1, p.52-59.
51. Seo K. W., & Lee Y.J., The occurrence of CTX-M-producing *E. coli* in the broiler parent stock in Korea., *ELSEVIER Poultry Science*. 2020, 100(2).
52. Rossolini G. M., D'Andrea M.M & Mugnaioli C., The spread of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases., *Wiley Online Library*., 2007.
53. Zeynudin, A., et al., Prevalence and antibiotic susceptibility pattern of CTX-M type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among clinical isolates of gram-negative bacilli in Jimma., Ethiopia. *BMC infectious diseases.*, 2018, **18**(1), 524.
54. Eckert C., Gautier V & Arlet G., DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*<sub>CTX-M</sub> genes., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.*, 2005, Vol 57, Issue 7, p. 14-23.
55. Bradford Patricia A., Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21<sup>st</sup> Century : Characterization, Epidemiology and Detection of This Important Resistance Threat., *ASM Journals. Clinical Microbiology Reviews.*, 2020, Vol 14, No 4.
56. Kaur M. & Aggarwal A., Occurrence of the CTX-M, SHV and the TEM Genes Among the Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase Producing Isolates of Enterobacteriaceae in a Tertiary Care Hospital of North India., *Journal of Clinical & Diagnostic Research*. 2013, **7**(4), p. 642-645.
57. Paterson D. L. & Bonomo R. A., Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update., *ASM Journals, Clinical Microbiology Reviews.*, 2020, Vol 18. No4.
58. Bailey J. K., Pinyon J. L., Anantham S & Hall R. M., Distribution of the *bla*<sub>TEM</sub> – Containing transposons in commensal *E. coli* , *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.*, 2001, Vol 66, Issue 4, p.745-751.

59. Pitout J. D.D., Peirano C., Kock M.M., Strydom K.A & Matsumura Y., The Global Ascendancy of OXA-48-Type Carbapenemases., *ASM Journals. Clinical Microbiology Reviews.*, 2019, Vol33, No1.
60. Nordmann P & Poirel L., The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide., *Clinical Microbiology and Infection.*, 2014, Vol 20, Issue 9, p.821-830.
61. Nordmann P., Naas T., Poirel L & Global Spread of Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*., *Emerging Infectious Diseases.*, 2011, 17(10), p.1791-1798.
62. Poirel L., Porton A & Nordmann P., OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2012, Vol 67, Issue 7, p.1597-1606.
63. Evans B.A & Amyes S.G.B., OXA  $\beta$ -Lactamases., *ASM Journals. Clinical Microbiology Reviews.*, 2020, Vol 27, No2.
64. Tzouvelekis L.S., et al., Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and Other *Enterobacteriaceae*: an Evolving Crisis of Global Dimensions., *ASM Journals. Clinical Microbiology Reviews.*, 2020, Vol 25, No4.
65. EUCAST, Antimicrobial wild type distributions of microorganisms, Species: *Escherichia coli* (Method: Disk diffusion ).
66. Neil Woodford, Elizabeth J. Fagan, & Matthew J. Ellington., Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.*, 2006, Vol. 57, Issue 1, , Pages 154-155.
67. Poirel, L., Héritier, C., Tolün, V., & Nordmann, P., Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*., *Antimicrobial agents and chemotherapy.*, 2004, 48(1), 15–22.
68. Clermont O., Bonacorci S., & Bingen E., Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group., *American Society for Microbiology.*, 2020, Vol. 66, No. 10, p. 4555–4558.
69. Doi, Y., Iovleva, A., & Bonomo, R. A., The ecology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in the developed world., *Journal of travel medicine.*, 2017, 24(suppl\_1), S44–S51.
70. Kazemian, H., et al., Phenotypic and Genotypic Characterization of ESBL-, AmpC-, and Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Isolates., *Medical*

*principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre.*, 2019, 28(6), 547–551.

71. Ma, Jie MD, et al., Antimicrobial resistance patterns, clinical features, and risk factors for septic shock and death of nosocomial E coli bacteremia in adult patients with hematological disease, *Medicine.*, 2017 - Volume 96 - Issue 21 - p e6959.

72. Zarkan, A., et al., Inhibition of indole production increases the activity of quinolone antibiotics against E. coli persisters., *Scientific reports.*, 2020, 10(1), 11742.

73. López-Cerero, L., et al., Comparative assessment of inoculum effects on the antimicrobial activity of amoxicillin-clavulanate and piperacillin-tazobactam with extended-spectrum beta-lactamase-producing and extended-spectrum beta-lactamase-non-producing *Escherichia coli* isolates., *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.*, 2010, 16(2), 132–136.

74. Liu, X., Liu, H., Wang, L., Peng, Q., Li, Y., Zhou, H., & Li, Q., Molecular Characterization of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Multidrug Resistant *Escherichia coli* From Swine in Northwest China., *Frontiers in microbiology.*, 2018, 9, 1756.

75. Cai, J. C., Zhang, R., Hu, Y. Y., Zhou, H. W., & Chen, G. X., Emergence of *Escherichia coli* sequence type 131 isolates producing KPC-2 carbapenemase in China., *Antimicrobial agents and chemotherapy.*, 2014, 58(2), 1146–1152.

76. Nagy, G., Dobrindt, et al., Expression of hemin receptor molecule ChuA is influenced by RfaH in uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infection and immunity.*, 2001, 69(3), 1924-1928.

77. Dadi B.R., et al. Distribution of virulence genes and phylogenetics of uropathogenic *Escherichia coli* among urinary tract infection patients in Addis Ababa, Ethiopia., *BMC Infect Dis.*, 2020, **20**, 108.

# ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ\_ΠΟΛΟΥΦΗ ΔΗΜΗΤΡΑ

## ORIGINALITY REPORT

11%

SIMILARITY INDEX

9%

INTERNET SOURCES

4%

PUBLICATIONS

3%

STUDENT PAPERS

## PRIMARY SOURCES

1	<a href="http://pergamos.lib.uoa.gr">pergamos.lib.uoa.gr</a> Internet Source	2%
2	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Internet Source	1%
3	Submitted to University of West Attica Student Paper	1%
4	YAĞCI, Serap, GERÇEKER, Devran, BALTACI, Sümer, YAĞCI, Cemil and ERDEM, Birsal. "Perkutan nefrostomi uygulanan hidronefrozu hastaların pelvis renalisinden alınan idrar örneklerinin mikrobiyolojik incelenmesi", Ankara Üniversitesi, 2000. Publication	1%
5	<a href="http://www.pasteur.gr">www.pasteur.gr</a> Internet Source	<1%
6	Submitted to Hellenic Open University Student Paper	<1%
7	<a href="http://aboca.com.gr">aboca.com.gr</a> Internet Source	<1%

8	147.102.210.12 Internet Source	<1 %
9	"Posters", Clinical Microbiology and Infection, 5/2008 Publication	<1 %
10	docs.wixstatic.com Internet Source	<1 %
11	9lib.net Internet Source	<1 %
12	www.pigutnet.eu Internet Source	<1 %
13	www.journalagent.com Internet Source	<1 %
14	Submitted to Monash University Student Paper	<1 %
15	journals.plos.org Internet Source	<1 %
16	spu.fem.uniag.sk Internet Source	<1 %
17	"13th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases", Clinical Microbiology and Infection, 2003 Publication	<1 %
18	Submitted to Aristotle University of Thessaloniki	<1 %

19

Submitted to Consorcio CIXUG

Student Paper

<1 %

---

20

Submitted to University of Cyprus

Student Paper

<1 %

---

21

[mts.intechopen.com](https://mts.intechopen.com)

Internet Source

<1 %

---

22

[pesquisa.bvsalud.org](https://pesquisa.bvsalud.org)

Internet Source

<1 %

---

23

[pinnacle.allenpress.com](https://pinnacle.allenpress.com)

Internet Source

<1 %

---

24

[www.dogger.gr](https://www.dogger.gr)

Internet Source

<1 %

---

25

[ir.yic.ac.cn](https://ir.yic.ac.cn)

Internet Source

<1 %

---

26

[ikee.lib.auth.gr](https://ikee.lib.auth.gr)

Internet Source

<1 %

---

27

[ellinikiafipnisis.blogspot.com](https://ellinikiafipnisis.blogspot.com)

Internet Source

<1 %

---

28

[purehost.bath.ac.uk](https://purehost.bath.ac.uk)

Internet Source

<1 %

---

29

[www.mdpi.com](https://www.mdpi.com)

Internet Source

<1 %

---

30

[aueb.gr](https://aueb.gr)

Internet Source

<1 %

31

[docplayer.gr](http://docplayer.gr)

Internet Source

<1 %

32

[docplayer.net](http://docplayer.net)

Internet Source

<1 %

33

[doktori.bibl.u-szeged.hu](http://doktori.bibl.u-szeged.hu)

Internet Source

<1 %

34

[dyuthi.cusat.ac.in](http://dyuthi.cusat.ac.in)

Internet Source

<1 %

35

[ir.lib.uth.gr](http://ir.lib.uth.gr)

Internet Source

<1 %

36

[ktisis.cut.ac.cy](http://ktisis.cut.ac.cy)

Internet Source

<1 %

37

[researchspace.ukzn.ac.za](http://researchspace.ukzn.ac.za)

Internet Source

<1 %

38

[riunet.upv.es](http://riunet.upv.es)

Internet Source

<1 %

39

[users.uoa.gr](http://users.uoa.gr)

Internet Source

<1 %

40

[eur-lex.europa.eu](http://eur-lex.europa.eu)

Internet Source

<1 %

---

Exclude quotes      On

Exclude matches      Off

Exclude bibliography      On